

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Primer immundeficienciák:
A betegágytól a génszekvenálásig**

Dr. Erdős Melinda

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
INFEKTOLÓGIAI ÉS GYERMEKIMMUNOLÓGIAI TANSZÉK
DEBRECEN, 2006

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Primer immundeficienciák:
A betegágytól a génszekvenálásig**

Dr. Erdős Melinda

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
INFEKTOLÓGIAI ÉS GYERMEKIMMUNOLÓGIAI TANSZÉK

Témavezető:

Dr. Maródi László
Tanszékvezető egyetemi tanár

Debrecen, 2006

*"Keressétek leginkább a szellem javait, a
többet vagy megtaláljátok, vagy nem érzitek
hiányát."*

Francis Bacon

TARTALOM

Rövidítések

1.	BEVEZETÉS	10
1.1	Mutáció analízis primer immundefektusokban	10
1.2	Célkitűzések	14
2.	VIZSGÁLT PRIMER IMMUNODEFICIENTIA SZINDRÓMÁK	15
2.1	X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség	15
2.2	X-kromoszómához kötött hyper-immunglobulin M szindróma	16
2.3	Shwachman-Diamond szindróma	18
3.	BETEGEK	19
3.1	X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségben szenvedő betegek	19
3.2	X-kromoszómához kötött hyper-immunglobulin M szindrómában szenvedő betegek	20
3.3	Shwachman-Diamond szindrómában szenvedő beteg	22
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
4.1	Genomikus DNS izolálás	24
4.2	Génszekvenálás	24
4.3	Sejtvonalak és antitestek	26
4.4	Plazmidok és transzfekció	26
4.5	Immunprecipitáció és Western blot	27
4.6	Pulse-chase assay	27
4.7	PCR-restrikciós fragment hossz polimorfizmus (PCR-RFLP)	28

4.8	Összehasonlító szekvencia analízis	28
5.	EREDMÉNYEK	29
5.1	Új, betegséget okozó mutáció X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségben	29
5.1.1	Mutáció az <i>SH2D1A</i> génben	29
5.1.2	A mutáns p.G16D protein féléletidejének meghatározása	31
5.1.3	A mutáns p.G16D protein fiziológiás receptorokhoz való kötődésének vizsgálata	33
5.2	Invazív <i>Cryptococcus laurentii</i> fertőzés X-kromoszómához kötött hyper-immunglobulin M szindrómában szenvedő kilenc éves fiúgyermekben	34
5.2.1	Mutáció a <i>CD40L</i> génben	34
5.2.2	A <i>Cryptococcus laurentii</i> identifikálása	36
5.3	Új, betegséget okozó missense mutációk Shwachman-Diamond szindrómában	37
5.3.1	Mutációk az <i>SBDS</i> génben	37
5.3.2	Az <i>SBDS</i> gén 3 exonjának vizsgálata PCR-restrikciós fragment hossz polimorfizmussal	39
5.3.3	A mutáns proteinek féléletidejének meghatározása	40
5.3.4	Az <i>SBDS</i> és rokon génszekvenciák összehasonlító analízise	42
6.	MEGBESZÉLÉS	42
6.1	X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség	42
6.2	X-kromoszómához kötött hyper-immunglobulin M szindróma	44
6.3	Shwachman-Diamond szindróma	46
7.	ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	49

8.	KONKLÚZIÓ	50
9.	IRODALOM	52
	Közlemények	61
	Köszönetnyilvánítás	72

Rövidítések

AID	Aktiváció indukált citidin-deamináz, Activation-induced cytidine deaminase
B	Beteg
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bp	bázispár
BTK	Bruton tirozin-kináz, Bruton's tyrosine kinase
CD	Cluster of differentiation, cluster designation
CD40L	CD40 ligand
cDNA	complementary DNA
CHAPS	3-[(3-cholamidopropil) dimetilammónio]-1-propánszulfát
CMV	Cytomegalovírus
CSF	Cerebrospinális folyadék, Cerebrospinal fluid
CSR	Osztályváltás, Class switch recombination
CT	Computer tomográfia, Computer tomography
EAT-2	EWS/FLI1-activated transcript-2
EBV	Epstein-Barr vírus
EDTA	Etiléndinitrilotetraecetsav
EWS	Ewing sarcoma
FCS	Fetális borjú szérum, Fetal calf serum
FIM	Fatális IM
FLI1	Friend leukemia virus integration 1
FLAG	Fluoreszcenszesen jelölt antigén, Fluorescence labeled antigen
G-CSF	Granulocyta-kolónia stimuláló faktor, Granulocyte colony stimulating factor

gDNS	genomikus DNS
IM	Infekciós mononucleosis
Ig	Immunglobulin
IP	Immunprecipitáció
IPEX	X-kromoszómához kötött immundysreguláció polyendocrinopathiával
NK	Természetes ölő, Natural killer
NF-κB	Nukleáris faktor-κB, Nuclear factor-κB
NEMO	NF-κB esszenciális modulátor, NF-κB essential modulator
PAGE	Poliakrilamid gél elektroforézis, Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polimeráz láncreakció, Polymerase chain reaction
PID	Primer immundeficientia, Primary immunodeficiency
PMA	Phorbol myristate acetate
PVD	Polyvinil difluorid
RFLP	Restrikciós fragment hossz polimorfizmus, Restriction fragment length polymorphism
SAP	SLAM-asszociált protein, SLAM-associated protein
SKID	Súlyos kombinált immundeficientia, Severe combined immunodeficiency
SDS	Shwachman-Diamond szindróma
SDS	Sodium dodecil szulfát
SBDS	Shwachman-Bodian-Diamond szindróma
SBDSP	SBDS pszeudogén
SHM	Szomatikus hipermutáció, Somatic hypermutation

SLAM	Szignalizációs lymphocyta aktivációs molekula, Signaling lymphocyte activating molecule
UNG	Uracil-DNS glükóziláz, Uracil-DNA glycosylase
vt	Vad típus
WAS	Wiskott-Aldrich szindróma
WB	Western blot
X-HIGM	X-kromoszómához kötött hyper-immunglobulin M szindróma
XLP	X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség

1. BEVEZETÉS

Az első veleszületett immunhiány betegséget, az X-kromoszómához kötött agammaglobulinaemiát 1952-ben Ogden Bruton amerikai katonaoorvos ismerte fel, aki recidiváló, súlyos fertőzésben szenvedő fiúgyermekben a gammaglobulin csúcs teljes hiányát észlelte a fehérje elektroforézis képen [10]. Az első agammaglobulinaemiás beteg esetének leírását több évtizedes kutatómunka követte, amely közel 150 primer immundeficientia (PID) betegség felismeréséhez vezetett.

Az elmúlt 15 évben a molekuláris genetikai diagnosztika fejlődésének köszönhetően több mint 110 primer immunhiány betegség genetikai hátterét sikerült tisztázni. Az esetek döntő többségében a molekuláris genetikai vizsgálatok segítségével pontos diagnózis állítható fel és új terápiás módszerként egyre nagyobb teret hódít a génterápia is. A genotípus-fenotípus vizsgálatok és az állatkísérletes modellek révén a PID betegségek többségében tisztázható a betegség patomechanizmusa és az érintett génekről átíródó fehérjék funkciója. A nagyléptékű fejlődés ellenére azonban mind a mai napig nem ismert, hogyan vezet, pl. a BTK vagy a WASP gén mutációja X-kromoszómához kötött agammaglobulinaemia illetve Wiskott-Aldrich szindróma kialakulásához. A veleszületett immunhiány betegségek diagnosztikájában elért eredmények a molekuláris genetika fejlődésének egyik legreprezentatívabb bizonyítékai.

1.1 Mutáció analízis primer immundefektusokban

Immundefektusnak vagy más néven immundeficientiának, immunhiányos állapotnak, az immunrendszer csökkent, extrém esetben hiányzó működését

nevezzük. A defektusok lehetnek primerek, amikor az immunitáshiány az immunrendszer öröklött rendellenességének következménye, amely különböző fertőzések, allergia, autoimmun és daganatos betegségek kialakulására hajlamosítja az egyént. Immunhiányos állapotra utalhat a krónikus étvágytalanság, az emésztési és felszívódási zavar, az idült hasmenés, a gyakori hőemelkedés és láz, a somaticus retardatio, a vérzékenység és a súlyos oltási reakció. A legjellemzőbb következmény a gyakori, recidiváló, súlyos lefolyású, terápiára rosszul reagáló, változó lokalizációjú, gyakran maradványtünetekkel gyógyuló fertőzések kialakulása. Különös figyelmet érdemelnek az opportunisták, ritkán előforduló kórokozók által okozott recidiváló infekciók, az antibiotikum kezelés mellett is szokatlanul elhúzódó lefolyás vagy az infekciók szövődésének szokatlan súlyossága. Az érintett családokban gyakran észlelhető a fertőzésekre való fogékonyság halmozott előfordulása, immundefektus, autoimmun betegség, allergiás hajlam, malignus megbetegedés vagy korai gyermekhalál.

Gyakorlati szempontból a PID betegségek a következő csoportokba sorolhatók: 1) az első viszonylag nagy esetszámú csoportba az antitest illetve a komplement deficienciák tartoznak, amelyek recidív alsó és felső légúti fertőzések kialakulására hajlamosítanak; 2) a T-sejt illetve a kombinált immundeficienciákra a somaticus fejlődés elmaradása, visszatérő hasmenések és opportunisták fertőzések jellemzők; 3) a phagocyták sejt defektusokra a pyogén baktériumok és gombák által okozott nyálkahártya és invazív fertőzések típusosak.

A PID betegségek klinikailag heterogén kórképek. Az immundeficienciák egy része a típusos klinikai tünetek és a jellegzetes kórokozó spektrum alapján

egyértelműen felismerhető. Az esetek nagyobb százalékában azonban a humorális és a celluláris immundeficienciák, valamint a komplement defektusok tünettanában átfedések észlelhetők. Mindezek miatt a pontos diagnózis megállapításához a részletes anamnézis, a fertőzések etiológiájának, lefolyásának, típusának, lokalizációjának gondos elemzése, az ismételt elvégzett fizikális vizsgálat, a rutin laboratóriumi vizsgálatok és az in vivo és in vitro immunológiai tesztek sokszor nem elegendők; az egyértelmű diagnózishoz genetikai vizsgálatra is szükség van.

Napjainkban az immundeficienciák molekuláris genetikai kutatásában robbanásszerű fejlődés észlelhető. Egy évtizede még alig néhány immundeficientia gén volt ismert, napjainkban azonban egyre több immundeficientia esetén tisztázható a háttérben álló betegségi gén. Csak 2003-ban 13 különböző, primer immunhiányos betegség genetikai hátterét sikerült tisztázni [25]. A jelenleg ismert 111 immundeficientia gén felismerése hozzájárult a veleszületett és az adaptív immunrendszer fejlődésének és szabályozásának jobb megértéséhez.

Az immunhiányos állapotok korai felismerésében – bár alacsony incidenciájú megbetegedésekről van szó – a genetikai szűrővizsgálatoknak óriási jelentősége van. A korai, biztos diagnózis lehetővé teszi a fertőzések kialakulásának megelőzését és korai adekvát immunterápiáját, a genetikai tanácsadást, a hordozóállapot kiszűrését, a prenatális diagnózist. A PID-ben szenvedő betegek esetén a gén szintű diagnosztika a következők miatt nem nélkülözhető:

- 1) A molekuláris genetikai vizsgálatok megerősíthetik a feltételezett diagnózist, ami különösen akkor fontos, ha a laboratóriumi leletek és a klinikai kép a klasszikustól, a megszokottól eltérő, szokatlan.
- 2) A genetikai vizsgálatok segítségével fény derülhet az immunreguláció addig még ismeretlen részleteire és tisztázható az immunhiányos betegség patomechanizmusa.
- 3) A PID által érintett családokban a prenatális genetikai vizsgálatok óriási jelentőségét a családtervezésben nem kell hangsúlyozni.

A primer immundefektusok lényegesen gyakoribbak, mint azt korábban gondoltuk. Ma már több mint 150 különböző immunhiányos betegség ismert, amelyek száma a genetikai kutatások nagymértékű fejlődésével egyre gyarapszik. A leggyakoribb primer immundefektus, a szelektív IgA hiány előfordulási gyakorisága 1:500 és legalább ilyen arányban az immunhiányos betegségek nem kerülnek felismerésre, vagy téves diagnózis születik [7]. A becsült gyakoriság tehát Magyarországon 1:250. Ezek a számadatok is megerősítik, hogy ezekre a betegekre különösen nagy figyelmet kell fordítanunk. A mutáció analízissel diagnosztizálható primer immundefektusok száma ma már több mint 110. Laboratóriumunkban 2003-ig döntően a humorális és a celluláris immunválasz felmérésére alkalmas funkcionális, immunkémiai és biokémiai módszereket alkalmaztunk. A korszerű diagnosztikai feltételek biztosítása szükségessé tették molekuláris genetikai vizsgálómódszerek beállítását is. A Magyar Gyermekimmunológiai Munkacsoport 2002-es konferenciáján megfogalmazódott az igény, hogy Magyarországon legalább egy helyen létre kell hozni immundeficiencia molekuláris genetikai központot. A nagy várakozást követően, 2003-ban

Tanszékünkön létrejött molekuláris genetikai laboratórium országos igényt igyekszik kielégíteni, hiszen laboratóriumunkban a hagyományos vizsgálmódszereken kívül a mutáció analízis és más molekuláris genetikai vizsgálatok elvégzése is biztosított. A ritka, öröklődő primer immundeficienciában szenvedő betegek és családtagjaik számára laboratóriumunkban a prenatális genetikai diagnosztika is hozzáférhető, így lehetőségünk van arra is, hogy a családtervezésnél felmerülő fontos kérdésekre választ adjunk.

Az esetek egy kis részében a genomikus DNS vizsgálata sem mindig elegendő, hiszen ugyanaz a fenotípus nem egyszer különböző géndefektusok következménye is lehet; sőt, ugyanaz a génmutáció sokszor egy családon belül is teljesen eltérő fenotípusos megjelenést eredményez. Ezen genotípus-fenotípus megfigyelések további kutatásokra ösztönöznek, elsősorban a környezeti és más genetikai faktorok pontos szerepének tisztázására és a gének szerkezete és funkciója közötti összefüggések pontosabb megismerésére.

1.2 Célkitűzések

Az Infektológiai- és Gyermekimmunológiai Tanszék primer immundeficiencia munkacsoportjában 2000 óta dolgozom. A Tanszék országos vezető központ a veleszületett immunhiány betegségek diagnosztizálásában, az érintett gyermekek kezelésében és gondozásában. PhD kutatási területem a veleszületett immunhiány betegségek patomechanizmusa és molekuláris genetikája, különös tekintettel a mutáció analízis vizsgálatokra és a mutáns fehérje funkcionális változásának meghatározására. Az értekezésben X-

kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségben, X- kromoszómához kötött hyper-immunglobulin M szindrómában és Shwachman-Diamond szindrómában szenvedő betegekben végzett molekuláris genetikai vizsgálataink eredményéről számolok be. A postnatalis genetikai vizsgálatok mellett, külön is hangsúlyozom a prenatalis genetikai vizsgálatok jelentőségét a veleszületett immunhiányos betegségek diagnosztikájában.

2. VIZSGÁLT PRIMER IMMUNODEFICIENTIA SZINDRÓMÁK

2.1 X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség

Az X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség (X-linked lymphoproliferative disease, XLP), vagy első leírójáról Purtilo-betegség, illetve az első családról, amelyben leírták, Duncan-betegség, X-kromoszómához kötött, recesszíven öröklődő, ritka immunhiány, amelyre súlyos T-sejtes immundeficientia, az *Epstein-Barr vírus (EBV)* fertőzéssel szembeni feltűnő fogékonyság és az EBV elleni védekezőképesség hiánya jellemző [51, 61, 69]. Egészséges gyermekekben a primer EBV fertőzés általában tünetmentes vagy tünetszegény formában zajlik és vezet szerokonverzió kialakulásához [66]. Idősebb gyermekekben és fiatal felnőttekben, az EBV fertőzés infekciós mononucleosis (IM) képében mutatkozik, magas lázzal, masszív lymphadenopathiával, hepatosplenomegaliával és lymphocytosissal. Immunkompetens szervezetben a víruskapszid-antigén (VCA) ellen termelődő immunglobulin (Ig) G molekulák és az EBV nucleáris antigén (EBNA) ellenes antitestek pozitivitása jelzi a betegség átvészelését [67]. Ezzel szemben, XLP-ben szenvedő fiúgyermekekben az EBV fertőzés súlyos, gyakran fatális IM

(FIM) formájában zajlik. Az IM-t túlélő betegekben szövődményként malignus lymphoma, dysgammaglobulinaemia, aplasztikus anaemia, lymphohistiocytosis és vasculitis alakulhat ki [69]. Mai ismereteink szerint az EBV jelenléte csak a FIM-hez elengedhetetlen, dysgammaglobulinaemia és lymphoproliferatív betegség EBV infekció nélkül is jelentkezhet [9]. XLP-ben a T- és NK-sejtes cytotoxicitás és az Ig izotípus váltás súlyos zavara észlelhető, valamint az EBV-specifikus antitestek rendszerint hiányoznak [5, 49, 57, 61].

Az XLP betegségi gén, az *SH2D1A*, amelyet 1998-ban három munkacsoport is azonosított, az X-kromoszóma hosszú karján, az Xq25 régióra lokalizálható [15, 46, 58]. Az *SH2D1A* gén egy 128 aminosavból felépülő kis fehérjét kódol, amelyet a SLAM-hez (szignalizációs lymphocita aktivációs molekula, signaling lymphocyte activating molecule) asszociált protein után, SAP-nak nevezünk [58]. A SAP egyetlen SH2 funkcionális doménből felépülő szignalizációs fehérje, amely a T- és NK-sejtekben expresszálódik [58]. Szerkezetileg az EAT-2 (EWS/FLI1-activated transcript-2) protein családnak tartozik, amelynek tagjai a SLAM és más, pl. 2B4 Ig szupercsalád receptorokhoz kapcsolódnak [70]. A SAP vagy az EAT-2 kötődése a SLAM citoplazmatikus részéhez meggátolja az SH-2 foszfatázok kötődését a SLAM citoplazmatikus farok részéhez [58].

2.2 X-kromoszómához kötött hyper-immunglobulin M szindróma

A hyper-immunglobulin M (HIGM) szindróma egy ritka veleszületett immundeficientia, amelyre recidiváló fertőzések és normális vagy emelkedett szérumszint mellett, jelentősen csökkent szérumszintű IgG, IgA és IgE szintek jellemzők. A HIGM szindróma CD40 ligand (CD40L), CD40, NF- κ B

esszenciális modulátor (NEMO), aktiváció-indukált citidin deamináz (AID) és uracil-DNS glükoziláz (UNG) deficiencia következménye egyaránt lehet [21].

Az érintett betegek többségében a betegség X-kromoszómához kötött formája (CD40L deficiencia) észlelhető, amelynek oka a *CD40L* (*CD154*) gén mutációja. A CD40L a tumor nekrosis faktor (TNF) család tagja, amely aktivált CD4⁺ T-sejteken expresszálódik [24, 34]. Receptora a CD40 glikoprotein, amely elsősorban a B-lymphocyták felszínén fejeződik ki, de megtalálható monocitákon, a follicularis dendritikus sejteken, fibroblasztokon, endotél- és tímuszepitelésejteken is [48]. A *CD40* gén mutációi a CD40 csökkent expressziójához és a HIGM szindróma autoszomális recesszív formájához vezetnek [1, 2, 17, 26, 37]. A CD40/CD40L interakció kiemelkedő jelentőségű a B-sejtek proliferációjában, érésében, a centrum germinativumok, az Ig izotípus osztályváltás (class switch recombination, CSR) és a szomatikus hipermutáció (somatic hypermutation, SHM) kialakulásában. A CD40/CD40L kapcsolódás a B-sejt memória létrejöttében is nélkülözhetetlen. A T- és a B-sejtek közötti kommunikáció károsodása, (CD40L és CD40 deficienciák) [19, 27], vagy a CD40 mediált szignalizációs útvonal működésének zavara esetén (NEMO deficiencia) az antigénstimulációt követően az IgM-t termelő B-sejtek nem képesek IgG, IgA és IgE immunglobulinokat termelő B-sejtekké differenciálódni [31]. Az izotípusváltás egy régió-specifikus génátrendeződés következménye, amelynek során a C μ és C δ nehézlánc gének, más izotípust kódoló C-génnel (γ , α , ϵ) helyettesítődnek. A SHM során az Ig gének variábilis (V)-régiójában, halmozottan pontmutációk jönnek létre, amelyek az ellenanyag repertoár növekedését eredményezik. A Muramatsu és mtsai által 1999-ben leírt AID [44], egy 198 aminosavból felépülő mRNS enzim, amely

nélkülözhetetlen a CSR és a SHM kialakulásához. Az AID deficienciák a HIGM szindróma autosomális recesszív formáját okozzák [22, 54]. B-sejtekben a CSR és az SHM intrinsic defektusai, mint pl. az *UNG* gén mutációi szintén HIGM fenotípus kialakulásához vezethetnek [52].

2.3 Shwachman-Diamond szindróma

A Shwachman-Diamond szindróma (SDS) ritka, autoszomális recesszív öröklődésű, multisztémás primer immunhiány betegség, amelyre exocrin pancreas elégtelenség, metaphysealis dysostosis, növekedési retardáció, csontvelő dysfunctio és visszatérő fertőzések jellemzők [6, 20, 38, 42, 60, 63]. A lymphoproliferatív és malignus hematológiai betegségek, különösen a myelodysplasiás szindróma és az akut myeloid leukémia társulása gyakori. A csontvelői hypoplasia és zsíros infiltráció következtében valamennyi sejtvonal érintett lehet, de leggyakrabban neutropenia észlelhető, amely néha intermittáló, ritkábban ciklikus jellegű [18]. Az exocrin pancreas elégtelenség tünetei mindig kimutathatók és rendszerint már újszülött korban észlelhetők, bár az életkor előrehaladtával mérsékelt javulás várható [29, 41]. SDS-ben gyakoriak a felső és alsó légúti fertőzések, a bőrgennyedések; a kórokozó spektrum rendkívül széles lehet.

Az SDS betegségi gén, az *SBDS* (*Shwachman-Bodian-Diamond szindróma, SBDS gén*) a 7. kromoszóma hosszú karján, a q11 régióban található, amely egy 250 aminosavból felépülő proteint, az SBDS proteint kódolja. SBDS egy rendkívül konzervált protein család tagja, amelynek pontos funkciója máig ismeretlen. Boocock és mtsai (2003) szerint a kórkép az RNS metabolizmus zavarának következménye lehet [8]. A legújabb kutatások az

SBDS fehérje funkcióját a riboszómákhoz kötik, amely fontos szerepet játszik az exocrin pancreaszövet működésében, a hematopoiesisben és a chondrogenesisben egyaránt. [59]. Az SDS mutációk többsége génkonverzió következménye, amely a *SBDS* és a vele 97%-os szekvencia azonosságot mutató pseudogén (*SBDSP*) között jön létre [62]. Génkonverziót a betegek 89%-ban lehetett kimutatni, 60%-ban pedig mindkét mutációt összetett heterozigóta formában jelentkező génkonverzió eredményezte [8, 35, 45, 47, 62, 71]. A génkonverzió rendszerint a 2. exon rövid, kb. 240 bázispár (bp) hosszúságú szakaszát érinti. Egy 2004-ben, Japánban végzett tanulmány szerint a génkonverzió a gén nagyobb szakaszán, az 1-3 exonokban is létrejöhet [45].

Bár az SBDS protein egy rendkívül konzervált fehérje eukariótáktól kezdve az emberig, pontos funkciója mégis tisztázatlan. A fehérje aminosav szekvenciája nem mutat homológiát más ismert fehérjékkel. Az SBDS protein nagy valószínűséggel az RNS metabolizmus szabályozásában játszik szerepet [3, 59, 62]. Ezt látszanak alátámasztani a fibroblast és HeLa sejtenyészetekben végzett transzfekciós kísérletek is, amelyek során protein expressziót elsősorban a nucleusban észleltek [3]. Az intranuclearis lokalizáció további bizonyítéka lehet az SBDS fehérjének az RNS metabolizmus szabályozásában betöltött nélkülözhetetlen szerepének.

3. BETEGEK

3.1 X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségben szenvedő betegek

A kilenc éves fiúgyermeket (B1, II.3; 1. ábra, a panel), nyolc hónapos korában kezelték először kórházban pneumonia és hypochrom anaemia miatt. Kilenc éves koráig egészséges volt, ekkor pharyngitis, hepatosplenomegalia, lymphadenopathia, légzési elégtelenség, sárgaság és bágyadtság miatt igényelt hospitalizációt. Tízórás ápolás után gyorsan progrediáló májelégtelenség, shock, agyi oedema és beékelődés következtében exitált. Szérumában az anti-EBV IgM titer emelkedett volt. A szövettani vizsgálatok a májban, a lépben és a tüdőben diffúz, atípusos lymphocytás és plazmasejtes infiltrációt igazoltak. A nyirokcsomók thymus-dependens területén a lymphocyták jelentős mértékű depleciója volt látható. A beteg unokaöccsének (B2, III.1) kórházi felvétele nyolc hónapos korában kéthetes hurutos panaszok, láz, pharyngitis, hepatosplenomegalia, maculopapularis exanthemák és generalizált lymphadenopathia miatt vált szükségessé. Gyors progressziót mutató májelégtelenség és légzési distress miatt gépi lélegeztetést igényelt, de az intenzív kezelés ellenére a felvételét követő 4. napon exitált. A szövettani vizsgálatok a májban, a csontvelőben és a központi idegrendszer területén diffúz, T- és plazmasejtes infiltrációt igazoltak. A lymphocyt marker vizsgálatok a nyirokcsomókban és a májban a CD8⁺ T lymphocyták dominanciáját és intakt B-sejtes területeket mutattak.

3.2 X-kromoszómához kötött hyper-immunglobulin M szindrómában szenvedő betegek

A HIGM szindrómában szenvedő fiúgyermek (B, II.2; 4. ábra, a panel) egészséges szülők második gyermekeként született. Idősebb fiútestvére (II.1) rekuráló stomatitis aphthosa, visszatérő alsó és felső légúti infekciók,

purulens otitis media, mastoiditis és bakteriális pneumoniák miatt gyakran igényelt kezelést; kilenc éves korában pneumonia következtében exitált. A beteget először három éves korában kezelték kórházban egy hónapja perzisztáló stomatitis aphthosa miatt. Védőoltásait (BCG, DiPerTe, MMR, Polio) szövődmény nélkül megkapta. Laboratóriumi vizsgálatai normális lymphocyta és thrombocytaszámot mutattak, csökkent neutrophil granulocyta számmal ($330-792/\text{mm}^3$). Antineutrophil antitestek nem voltak kimutathatók. A lymphocyta marker vizsgálatok normál tartományba eső T-, B- és NK-sejt arányt igazoltak. A szérum Ig izotípus szintek közül az IgM (1.2-1.6 g/l; kontrol: 0.5-2.0 g/l) és IgA (0.78-1.25 g/l; kontrol: 0.5-2.8 g/l) koncentrációk a korspecifikus normál tartománynak megfeleltek, azonban az IgG izotípus mérsékelten csökkent koncentrációban (4.0-4.2 g/l; kontrol: 4.9-10.6 g/l) volt mérhető. Áramlási citometriás vizsgálatokkal az in vitro aktivált (PMA, ionomycin) CD4^+ T-sejtek felszínén CD40L expresszió nem volt kimutatható. A beteg a későbbiekben légúti és gastrointestinális fertőzések, rekuráló stomatitis aphthosa, purulens otitis media és bakteriális pneumoniák miatt számos alkalommal igényelt kezelést. Négy éves korától rendszeresen, havonta részesült intravénás IgG (IVIG) szubsztitúcióban. Hat éves korában irreguláris ciklusokat mutató neutropenia és visszatérő szájnyálkahártya candidiasis miatt rekombináns humán granulocyta-kolónia stimuláló faktor (G-CSF) kezelésben részesült. A kombinált IVIG (400 mg/kg/hó) és a G-CSF (5-10 U/kg/die) kezelés tartós tünetmentességet és normális granulocyta számot ($>1500/\text{mm}^3$) eredményezett.

Kilenc éves korában jelentkező cervicalis és submandibularis nyirokcsomó duzzanat és mérsékelt hepatosplenomegalia háttérében EBV és

T. gondii infekció kizárható volt. A nyirokcsomó szövettani vizsgálat granulomatosus léziót igazolt. Perjódsav-Schiff-festéssel kerek és ovális, vékony tokkal rendelkező, élesztőszerű mikroorganizmusok voltak látható, amelyek Krutsay-festéssel is pozitívnak bizonyultak (5. ábra). Hamarosan fejfájás, hányinger, tarkókörttség és somnolentia alakult ki. A fehérvérsejtszám $9200/\text{mm}^3$ volt, 54% neutrophil és 8% eosinophil számmal. A cerebrospinalis folyadékban (CSF) 0.51 g/l protein, 3.1 mmol/L glükóz és $1193/\text{mm}^3$ mononuclearis sejt volt kimutatható. A mellkas röntgenfelvétel és az agyi CT negatív volt. Speciális festéssel a CSF-ben cryptococcusra jellegzetes kerek illetve kissé ovális, tükrötjához hasonló, tokos, élesztősejtek voltak láthatók.

A betegből izolált *C. laurentii* amphotericin B-re és fluconazolra is érzékenynek bizonyult (Fungitest, BioRad). Egy hónapos intravénás fluconazol (12 mg/kg/die) terápia hatására gyors klinikai javulás volt észlelhető, a nyirokcsomó duzzanat megszűnt, az ismételt CSF tenyésztés negatív volt. A fluconazol terápiát még további három hónapon át 6 mg/kg, illetve további hat hónapig 4 mg/kg napi dózissal folytattuk. Tíz hónapos kezelést követően a hemokultúra is negatívvá vált. Egy évvel a terápia befejezését követően relapszus nem volt észlelhető.

3.3 Shwachman-Diamond szindrómában szenvedő beteg

Az öt hónapos fiúcsesemőt (B, II.2; 6. ábra, a panel) immundeficientia gyanúja miatt utalták Tanszékünkre kivizsgálásra. A kisded, egészséges szülők második gyermekeként, normális időre, 2950 grammal, 47 cm-rel született. Az újszülött két napos korában légzési elégtelenség, anaemia és

pneumonia miatt intenzív osztályos kezelést igényelt. A klinikai képet már újszülött korától halmozottan jelentkező, bakteriális és virális légúti infekciók, permanenssé váló nyálkás, zsírfényű, nagyobb tömegű rendellenes székletürítés, haspuffadás, pyodermák, hányások, megfelelő kalóriabevitel mellett sem javuló dystrophia uralta. A végtagokon, a mellkas és a hát bőrén viszkető, ekzematoid bőrtünet alakult ki. Születése óta észlelhető volt mérsékelt thrombocytopeniával (thrombocytá, $52-125 \times 10^3/\text{mm}^3$) társuló fokozódó anaemiája (hemoglobinn, $<9.0 \text{ g/dL}$) és neutropeniája (neutrophil, $<1.000/\text{mm}^3$). Kötelező védőoltásait (BCG, DiPerTe, Polio) szövődmény nélkül megkapta. Három hónapos korában a krónikus hasmenés háttérében a széklet emelkedett zsírtartalma és csökkent tripszin/chimotripszin aktivitása alapján exocrin pancreas elégtelenséget diagnosztizáltak. Mucoviscidosis az ismételt negatív verejték és a cysticus fibrosis irányú genetikai vizsgálat alapján egyértelműen kizárható volt. A pancreas enzimpótló kezelés és a zsírban oldódó vitaminok supplementációja ellenére, a gyermek súly- és hossz percentil értéke – egy hónapos korától fokozódó mértékben – 3 percentil alatt maradt. A csontok röntgen vizsgálata az epifízisek mineralizációs defektusára, metaphysealis dysostosisra utalt. A nyirokcsomók, a lép és a máj mérsékelten megnagyobbodott volt.

Immunológiai vizsgálatait során a szérumban Ig izotípusok a korszpecifikus tartományban vagy emelkedett koncentrációban voltak mérhetőek (IgG, 13.5 g/l , normál tartomány: $2.4-8.8 \text{ g/l}$; IgA, 0.84 g/l , normál tartomány: $0.1-0.5 \text{ g/l}$; IgM, 0.76 g/l , normál tartomány: $0.2-1.0 \text{ g/l}$). Az IgG alosztályokban és a lymphocytá subpopulációkban eltérés nem volt észlelhető: T-sejtek (CD3^+ , 71%, normál tartomány: 60-85%; CD4^+ , 53%, normál tartomány: 29-59%;

CD8⁺, 18%, normál tartomány: 19-48%), B-sejtek (CD19⁺, 15%, normál tartomány: 7-23%) és NK-sejtek (CD56⁺, 15%, normál tartomány: 6-29%). A csontvelő valamennyi sejtvonalat érintően hypoplasiás volt, de clonalitásra, myelodysplasiára utaló eltérés nem volt kimutatható. A növekedési retardatio, az exocrin pancreas elégtelenség, a visszatérő infekciók, a perzisztáló neutropenia, anaemia és thrombocytopenia alapján SDS klinikai diagnózisa merült fel.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A rutin hematológiai, immunológiai, mikrobiológiai és radiológiai módszereket, amelyekre a "Betegek" című fejezetben említést tettünk nem részletezzük.

4.1 Genomikus DNS izolálás

A genomiális DNS (gDNS) szeparálása etiléndinitrilotetraecetsavval (EDTA) alvadásgátolt perifériás vérből és magzati chorionboholy mintából QIAamp DNA Blood Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Németország) felhasználásával történt. A nyirokcsomó szövettani mintából történő gDNS szeparálást és a terhes édesanyák esetében a magzati gDNS izolálását, transabdominalis chorion boholy mintavételt követően a fenti DNS kivonó kittel végeztük el.

4.2 Génszekvenálás

Az *SH2D1A* gén 1-4 exonjának, a *CD40L* gén 1-5 exonjának és az *SBDS* gén 1-5 exonjának amplifikálása polimeráz láncreakcióval (PCR, Polymerase chain reaction) az 1. táblázatban feltüntetett PCR kondíciók és primer szekvenciák

mellett történt. A PCR reakcióelegy minden egyes exon esetén a következőket tartalmazta: 12.5 μ L JumpStart REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (SIGMA-ALDRICH GmbH, Budapest), 6.5 μ L desztillált víz, 0.5 μ L 50 pmol/ μ L primer F, 0.5 μ L 50 pmol/ μ L primer R és 5 μ L gDNA.

1. Táblázat Primer szekvenciák, az amplifikált DNS fragmentum bázispár (bp) hossza és az alkalmazott PCR kondíciók XLP, X-HIGM és SDS mutáció analízis vizsgálatában.

Amplifikált Exon	Sense primer (5' → 3')	Antisense primer (5' → 3')	Fragment hossz (bp)
SH2D1A	Kezdeti denaturáció 95°C-on 3 percig, majd 35 ciklus: 95°C 30 mperc, 58°C 30 mperc, 72°C 45 mperc, végül 4 perc final extensio 72°C-on.		
Exon 1	GAA GGA GGT TTA AGG CAA GTA GACA	AGG GAT TGA GGC GAA AGT GT	492
Exon 2	TTG GGC AGA TAC AAT ATG GAG AC	GGA CTG GGA CCA AAA TTC TCT AA	423
Exon 3	ATA CCA CCT TTG GGA GAA CTG AA	TCA TTT GAC TTG CTG GCT ACA TC	513
Exon 4	TCC AAG TTG GCT AGT TGT TTT	CAT TTG TAG CTC ACC GAA CT	335
CD40L	Kezdeti denaturáció 95°C-on 3 percig, majd 35 ciklus: 95°C 30 mperc, 58°C 30 mperc, 72°C 45 mperc, végül 4 perc extensio 72°C-on.		
Exon 1	TTT GCT GGG AGA GAA GAC TAC	TTG ACT AGG CAA CAA ACA TTA	457
Exon 2	CGT GGA AAT GAA TGT AGA GG	CTT TAA ACA TTG GCA TTG TCA G	305
Exon 3	CCA GAA ACA GAC AAC AGA GTA A	CCC TGA TGC AAC AAC ACT	261
Exon 4	TCA GTG GGA GAG ATG TCA G	GAA GGG AAT AGG AGA AGT GTA G	353
Exon 5	GGA AGG GGC CTT GAG AAT	TGG GCT TAA CCG CTG TG	574
SBDS	Kezdeti denaturáció 95°C-on 3 percig, majd 35 ciklus: 95°C 30 mperc, 52,2°C (1 exon), 56,6°C (2 exon), 60,2°C (3 exon), 53,7°C (4 exon), 54,8°C (5 exon) 30 mperc, 72°C 45 mperc (1, 4 és 5 exon), 40 mperc (2 exon), 90 mperc (3 exon) végül 4 perc extensio 72°C-on.		
Exon 1	TAA GCC TGC CAG ACA CAC	CCG AAC CAA CCA AAT AAA GA	509
Exon 2	AAA TGG TAA GGC AAA TAC GG	ACC AAG TTC TTT ATT ATT AGA AGT	733
Exon 3	GCT CAA ACC ATT ACT TAC ATA TTG A	CAC TTG CTT CCA TGC AGA	899
Exon 4	GCC TTC ACT TTC TTC ATA GT	GAA AAT ATC TGA CGT TTA CAA CA	480
Exon 5	GCT TGC CTC AAA GGA AGT T	CAC TCT GGA CTT TGC ATC TT	459

A PCR termékek tisztítása MICROCON YM-100 (Millipore Co., Bedford, USA)

tisztító oszloppal történt. A PCR-termékek szekvenciáját BigDye Terminator Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) felhasználásával határoztuk meg. A szekvenálási PCR reakció elegy 20 μ L össztérfogatban a következőket tartalmazta: 4 μ L 5X szekvenálási puffer, 4 μ L BigDye Terminator v3.1, 3 μ L desztillált víz, 1 μ L 3.3 pmol/ μ L primer és 8 μ L PCR

termék. A szekvenálási PCR termékek tisztítása SigmaSpin Post-Reaction Clean-Up Columns (SIGMA-ALDRICH GmbH, Budapest) tisztító oszlopokon történt. A mutáció analízis vizsgálatot ABI PRISM 310 illetve 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA) automata szekvenáló készülékkel végeztük. A szekvenciát a korábban közölt vad típusú *SH2D1A*, *CD40L* illetve *SDS* szekvenciákkal hasonlítottuk össze. A DNS mutációk számozása a cDNS (complementary DNS) szekvenciának megfelelően történt. A cDNA számozásánál azt az általánosan elfogadott szabályt alkalmaztuk, amely + 1-nek a kezdő ATG kodon "A" nukleotidját jelöli.

4.3 Sejtvonalak és antitestek

A COS-7 sejtek tenyésztése Dulbecco's modified Eagle's médiumban (Life Technologies, Grand Island, NY) 10% fetalis borjú szérum (FCS, fetal calf serum) hozzáadásával történt [58]. A Jurkat T sejteket az American Type Culture Collection bocsátotta rendelkezésünkre. Az anti-humán SLAM monoclonalis antitestet, a nyúl anti-SHP-2 polyclonalis antitestet, a peroxidázzal konjugált kecske anti-egér antitestet és az anti-nyúl IgG polyclonalis antitestet a Santa Cruz Biotechnology-től vásároltuk meg. Az anti-egér 2B4 monoclonalis antitestet a Pharmingen, az anti-FLAG monoclonalis M5 antitestet az Eastman Kodak Corporation, az EQKLISEEDL peptidet felismerő anti-myc antitestet az Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA) cégtől rendeltük meg.

4.4 Plazmidok és transzfekció

A mutáns *SH2D1A* (p.G16D) és *SBDS* (p.N121T és p.R175W) cDNS-ek amplifikálása PCR-rel, a pontmutációt is magába foglaló oligonukleotid primerek felhasználásával történt [43]. A vad típusú (vt) SAP és SBDS, valamint a mutáns p.G16D és p.N121T illetve p.R175W fehérjéket pCMV-FLAG (Eastern Kodak Co.) vektor segítségével klónoztuk, hogy fluoreszcensen jelölt (FLAG)-SAP és (FLAG)-SBDS komplexet hozzunk létre [43]. A pJFE14-SR vektor által hordozott humán SLAM cDNS a DNAX Research Institute cég ajándéka volt. A humán 2B4 cDNS-t pcDNA3.1 vektorban, a humán FynT-t myc-FynT fúziós proteinként expresszáltuk [39]. A COS-7 sejteket (1×10^6) FuGene 6 által bevitt, megfelelő cDNS-t tartalmazó expressziós vektorral transzfektáltuk (Stratagene). A sejteket 72 órával a transzekciót követően vizsgálatuk.

4.5 Immunprecipitáció és Western blot

A sejtek lízisét 0.5%-os 3-[(3-cholamidopropil) dimetilammóio]-1-propánszulfát (CHAPS) oldattal végeztük, az immunoprecipitációhoz 2 órán át 4 °C-on különböző antitesteket és 30 µl protein A-agaróz gyöngyöt (Invitrogen) használtunk. A fehérjéket sodium dodecil szulfát-polyacrilamid gél elektroforézissel (SDS-PAGE) szeparáltuk és polyvinyl difluorid (PVD) membránra (Immobilon, Millipore Corp.) vittük át. A filtert 1 órán át 5% blokkoltuk, majd a megfelelő primer antitesttel kezeltük. A lekötődött antitestek kimutatására, szekunder antitestként peroxidázzal-konjugált antitestet alkalmaztunk (Supersignal, Pierce).

4.6 Pulse-chase assay

A transzfektált COS-7 sejteket 1 óráig metionin és cisztein megvonást követően, Tran³⁵S-jelölt (ICN Radiochemicals, Cleveland, OH) [³⁵S]metioninnal és [³⁵S]ciszteinnel három órán át kezeltük [28]. Az újonnan szintetizált proteinek eltávolítása cycloheximidet (végső koncentráció, 25 µg/ml) tartalmazó médiumban történt. A sejt alikvotok (5 x 10⁶ sejt) lízisét követően, a radiojelölt wt és mutáns SAP és SBDS proteineket immunprecipitációval M5 FLAG-antitest segítségével analizáltuk. A fehérjék szeparálása 15%-os SDS-PAGE segítségével történt (BioRad, Hercules, CA). Az autoradiográfiát megelőzően a gélt Immobilon membránra vittük át vagy PVD nylon membránra blottoltuk.

4.7 PCR-restriktációs fragment hossz polimorfizmus (PCR-RFLP)

A c.362A>C mutáció esetén a 3-as exon primerpárjaival felamplifikált 899 bp hosszúságú PCR termékeket MaeIII restriktációs enzimmel két órán át, 55 C^o-on inkubáltuk. A vizsgálatot a betegben, a beteg családtagjaiban és 50 egészséges egyénben is elvégeztük. A hasítási termékeket 2%-os agaróz gélelektroforézissel mutattuk ki. Az enzimmel történő emésztést követően a mutációt nem hordozókban két hasítási termék: egy 836 és egy 63 bp hosszúságú keletkezik, míg a mutációt hordozókban négy hasítási terméket látunk (836, 653, 183 és 63 kb) a gélelektroforézis képen.

4.8 Összehasonlító szekvencia analízis

Az összehasonlító szekvencia vizsgálatokat a ClustalW szekvencia illesztő program, (<http://ebi.ac.uk/clustalw>) segítségével végeztük. A vizsgálatokhoz a GeneBank következő nyilvántartási számú szekvenciáit használtuk:

NM_016038.2 (humán), NM_023248.1 (egér), NM_001008289.1 (patkány),
NM_001006211.1 (csirke) és NM_201121.1 (zebrahal).

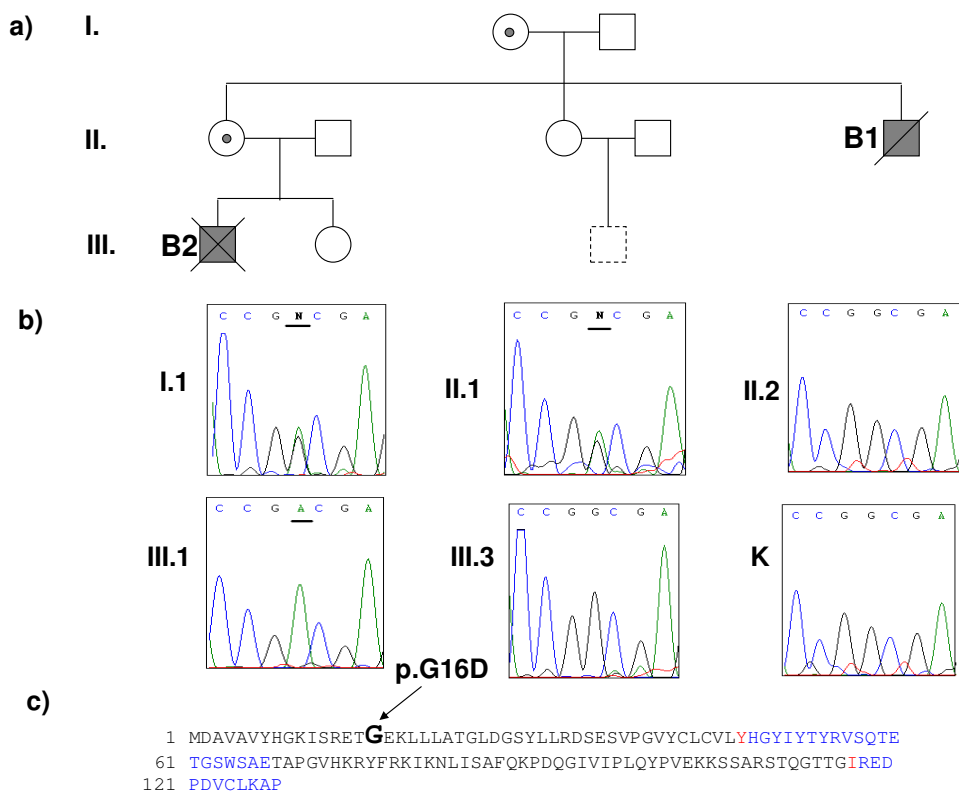
5. EREDMÉNYEK

5.1 Új, betegséget okozó mutáció X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségben

Az *SH2D1A* génben egy új, korábban még nem leírt missense mutációt igazoltuk, amely a SAP proteinben egy p.G16D aminosav cserét eredményezett. A mutáció kóroki szerepének igazolására a mutáns SAP féléletidejének és természetes receptorához, a SLAM-hez és a szintén a SLAM családba tartozó 2B4-hez való kötődését vizsgáltuk. A p.G16D protein féléletidejében eltérést nem észleltünk, azonban a fiziológias receptorhoz való kötődés, a vt SAP-hoz képest csökkent [23, 53].

5.1.1 Mutáció az *SH2D1A* génben

Egy család két fiúgyermekében FIM-et diagnosztizáltunk (1. ábra, a panel).



1. ábra X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségben szenvedő beteg családfája és a család molekuláris genetikai vizsgálatának eredményei. **a)** A betegek családfája. Szürke négyzetek, fiú betegek fatális infekciós mononucleosissal; áthúzás, meghalt betegek; szaggatott négyzet: fiúmagzat; B, beteg. **b)** A genomális DNS szekvenálás eredményeit jelző elektroforegrammok az *SH2D1A* gén, 1. exonján a B2 (III.1) beteg esetén c.47G>A mutációt látunk és a vad típusú szekvenciát a kontrollnál (K); a mutáció helyét aláhúzással jelöltük. Az elektroforegrammok az anyai nagymama (I.1) és az édesanya (II.1) esetén heterozigóta állapotot, az édesanya testvérében (II.2) és a fiúmagzatban (III.3) vad típust mutatnak. **c)** A SAP protein aminosav szekvenciája (fekete-kék váltakozó színek, exonok; piros betű: átfedő aminosav). A mutáció helyét nyíllal jelöltük.

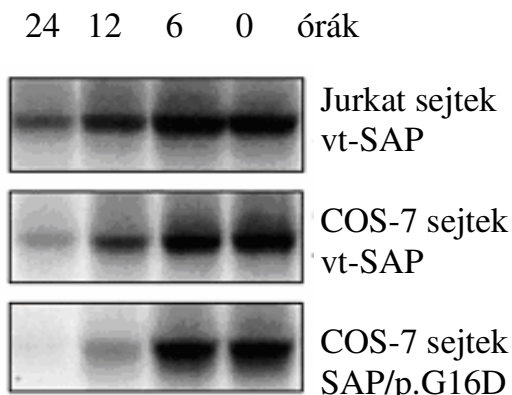
A súlyos klinikai kép és a szövettani vizsgálatok eredménye alapján *SH2D1A* gén mutációjának lehetősége merült fel. A betegek családtagjainak perifériás véréből gDNS-t izoláltunk és az *SH2D1A* génmutáció analízis vizsgálatát végeztük el. Először a B2 beteg édesanyját (II.1) és anyai nagymamáját (I.1) vizsgáltuk, akik az 1. exon, c.47G>A mutációjára nézve heterozigótának bizonyultak (1. ábra, b panel). Ugyanezt a mutációt a B2 (III.1) beteg nyirokcsomó szövettani blokkjából izolált gDNS-ben is igazoltuk. (1. ábra, b panel). Bár a B1 beteg (II.3) mutáció analízis vizsgálatára nem volt lehetőségünk, a klinikai kép, az X-kromoszómához kötött öröklődés és a szövettani eltérések alapján feltételeztük, hogy ő is az unokaöccsében igazolt mutációt hordozta. A család kivizsgálása közben a B2 beteg nagynénje (II.2) várandós lett és a magzati nem meghatározás fiú magzatot (III.3) igazolt. Az édesanya és a fetus a mutációra nézve vad típusúnak bizonyult (1. ábra, b panel).

A SAP protein p.G16D aminosav cseréhez vezető c.47G>A mutációja XLP betegek között korábban még nem volt ismert. (1. ábra, c panel), ezért a mutáns fehérje patogenetikai szerepének igazolására további vizsgálatokat végeztünk.

5.1.2 A mutáns p.G16D protein féléletidejének meghatározása

Korábbi megfigyelések az XLP patogenezisében két fontos tényező lehetséges kóroki szerepét hangsúlyozzák [43]. Az egyik az SH2D1A protein jelentősen csökkent féléletideje miatt lecsökkenő intracelluláris fehérje koncentráció, a másik az SH2D1A kötődésének károsodása SLAM családba tartozó receptorokhoz. Feltételezésünk szerint a p.G16D mutáció a SAP

stabilitásának csökkenéséhez és a T lymphocytákban és az NK-sejtekben csökkent SAP koncentrációhoz vezet, amely az XLP-re jellegzetes klinikai tünetek kialakulását eredményezi. Hipotézisünk igazolására pulse-chase assay segítségével a COS-7 sejtekben expresszált mutáns SAP féléletidejét vizsgáltuk (2. ábra).

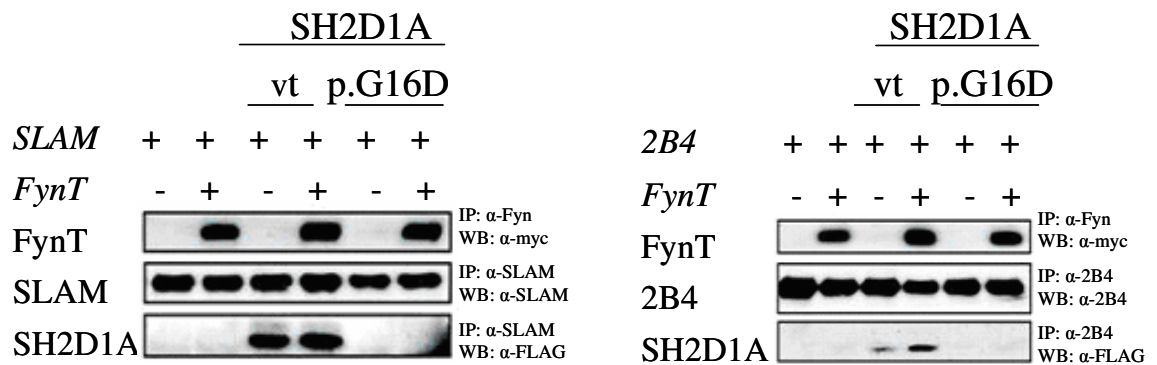


2. ábra A mutáns és a vad típusú (vt) proteinek féléletideje. A panelek [³⁵S]metionin- és [³⁵S]cisztein-jelölt SAP autoradiográfiás képét mutatják különböző időpontokban (0, 6, 12 és 24 ó), 24 órás periódus alatt, jelentős mennyiségű hideg aminosav tenyésztő médiumhoz való hozzáadását követően. Az adatok a mutáns és a vt SAP féléletideje között jelentős különbséget nem mutatnak. A vt SAP Jurkat sejtekben és COS-7 sejtekben mért féléletideje megegyező volt (felső és középső panel). A fehérjéket az SDS polyacrilamid gél elektroforézist megelőzően anti-FLAG antitesttel hibridizáltuk.

A 2. ábra a [³⁵S]metionin- és [³⁵S]cisztein-jelölt SAP autoradiográfiás képét mutatja különböző időpontokban, 24 órás periódus alatt. A p.G16D féléletideje a COS-7 illetve a Jurkat sejtekben kifejezett vt SAP fehérje féléletidejének megfelelő volt (2. ábra). Ezek az adatok egyértelműen arra utalnak, hogy a súlyos klinikai kép nem a mutáns SH2D1A csökkent féléletidejével magyarázható.

5.1.3 A mutáns p.G16D protein fiziológias receptorokhoz való kötődésének vizsgálata

Feltételezésünk szerint a SAP fehérje aminosav szekvenciájában bekövetkező glicin aszpartát csere, a SAP fehérje receptorhoz való kötődését befolyásolja. Ezért a vt és a mutáns SAP, SLAM és 2B4 receptorokhoz való kötődését vizsgáltuk (3 ábra).



3. ábra A mutáns p.G16D SAP kötődése a SLAM és a 2B4 receptorokhoz. A SAP dependens interakció vizsgálatára COS-7 sejtek vad típusú (vt) vagy mutáns SAP, FynT tirozin-kináz és SLAM (bal panel) vagy 2B4 (jobb panel) receptorokkal történt kotranszfekcióját követően került sor. A cDNS-ek kombinációját az egyes panelek felett +/- jellel jelöltük. A lizált sejteket (1×10^7 cells) az immunprecipitáció (IP) során a SLAM (bal) illetve a 2B4 (jobb) receptorokat felismerő monoclonalis antitestekkel hibridizáltuk. A mintákat Western blot (WB) vizsgálattal anti-SLAM (α -SLAM), anti-2B4 (α -2B4), anti-myc (α -MYC) és anti-FLAG (α -FLAG) antitestek felhasználásával elemeztük. A FLAG-SAP (vt) illetve a FLAG-p.G16D fúziós proteinek és a SLAM vagy 2B4 receptorokat immunoprecipációval anti-SLAM vagy anti-2B4 antitestekkel, illetve anti-FLAG M5 immunblottal mutattuk ki.

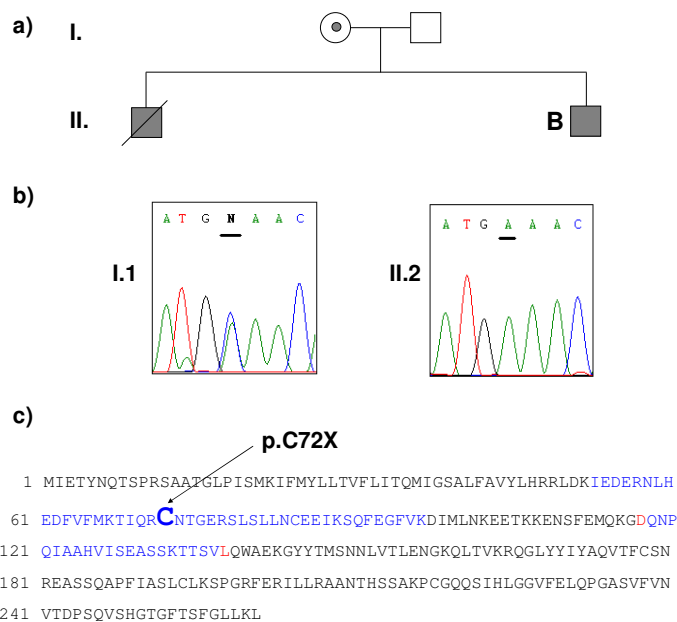
A COS-7 sejtekbe transzfekcióval bejuttatott Fyn tirozin-kináz foszforilálja az ugyancsak transzfekcióval bejuttatott SLAM illetve 2B4 fehérjéket. A COS-7 sejteket SLAM vagy 2B4 receptorokat kódoló plazmidokkal transzfektáltuk, a receptorok kifejeződése 72 órával a transzfekció után következett be. Amennyiben ugyanezen COS-7 sejtekbe SH2D1A/SAP fehérjét is transzfektálunk a Fyn általi SLAM/2B4 foszforiláció jelentősen megnő. Az SH2D1A/SAP fehérje jelenléte ugyanis megakadályozza egy protein tirozinfoszfátáznak, az SHP-2-foszfátáznak a SLAM-receptorhoz való kötődését. Eredményeink azt mutatják, hogy a SAP fehérje SLAM és a 2B4 receptorokhoz való kötődése a mutáns p.G16D protein esetén nem következik be (3. ábra).

5.2 Invazív *Cryptococcus laurentii* fertőzés X-kromoszómához kötött hyper-immunglobulin M szindrómában szenvedő kilenc éves fiúgyermekben

Egy X-HIGM szindrómában szenvedő betegben (II.2, 4. ábra, a panel) invazív *C. laurentii* fertőzés kialakulásáról számoltunk be. Az áramlási citometriás vizsgálatok a PMA és ionomycin aktivált T-sejtek felszínén a CD40L expresszió hiányát mutatták (64).

5.2.1 Mutáció a *CD40L* génben

A mutáció analízis vizsgálatok a beteg (B, II.2; 4. ábra, b panel) esetében a *CD40L* gén, 2-es exonján, a 216. nukleotid pozícióban hemizigóta formában C>A transzverziót igazoltak (c.216C>A). Az édesanya (I.1;) ugyanerre a mutációra nézve heterozigótának bizonyult.



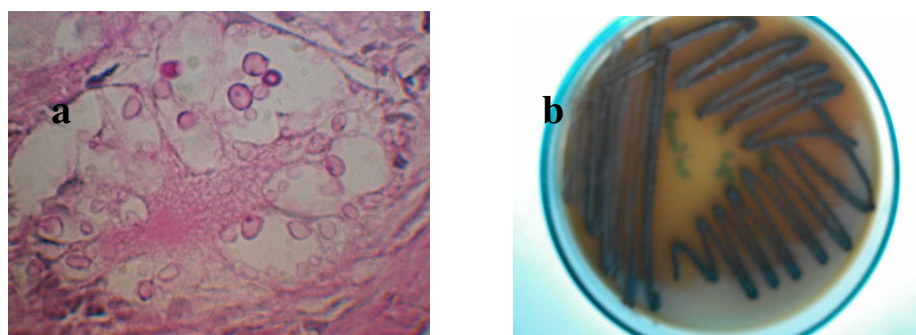
4. ábra X-kromoszómához kötött hyperimmunglobulin M (X-HIGM) szindrómában szenvedő beteg családfája és a család molekuláris genetikai vizsgálatának eredményei. **a)** A beteg családfája. Szürke négyzetek, fiú betegek X-HIGM szindrómával; áthúzás, meghalt betegek; B, beteg. **b)** A genomiális DNS szekvenálás eredményeit mutató elektroforegrammokon a *CD40 ligand (CD40L)* gén 2-es exonján c.216C>A báziscsere látható a betegben (B, II.2) hemizigóta, édesanyjában (I.1) heterozigóta formában. A mutáció helyét aláhúzással jelöltük. **c)** A CD40L protein aminosav szekvenciája (fekete-kék váltakozó színek, exonok; piros betű: átfedő aminosav); a nonsense mutáció következtében a 72. aminosav pozícióban a protein szintézis leáll.

Fehérje szinten a mutáció a 72. aminosav pozícióban stop codon képződéséhez vezet (p.C72X) (4. ábra, c panel). A beteg idősebb fiútestvérében (II.1) genetikai vizsgálat végzésére ugyan nem volt lehetőségünk, de az X-HIGM szindrómának megfelelő súlyos klinikai kép és az

X-kromoszómához kötött öröklődésment alapján feltételeztük, hogy a testvéréhez hasonlóan édesanyjától ő is a hibás allélt örökölte.

5.2.2 A *Cryptococcus laurentii* azonosítása

A gomba tenyésztése élesztő kivonatot tartalmazó Sabouraud agar táptalajon, 26 °C-on történt. A gomba növekedése 36 °C-on nem biztosítható. A nyákos, krémszínű telepekben ellipszis vagy gömb alakú, 2.5-7.0 x 2.0-5.5 µm átmérőjű élesztősejtek voltak láthatók. "Bird seed" agar táptalajon végezve a tenyésztést fekete színű telepeket láttunk (5. ábra).



5. ábra. Nyirokcsomó szövettani vizsgálat és a cerebrospinalis folyadékból nyert minta tenyésztése. **a)** A nyaki nyirokcsomóból nyert szövettani mintában periódsav-Schiff reagens festéssel kerek és ovális, élesztőszerű mikroorganizmusok láthatók. **b)** A cerebrospinalis folyadékból nyert minta "bird seed" agar táptalajon történő tenyésztésekor fekete gombatelepek formájában mutatkozó, tokos *cryptococcus*ok láthatók.

A *Cryptococcus* ellenes antitest titer az akut és a rekonvaleszcens szérumban 1/1000 és 1/400 volt. A *Cryptococcus*ra specifikus latex agglutinációs teszt (Ramco) pozitív volt. Az Auxacolor (BioRad) rendszerrel végzett azonosítás *C. laurentii* jelenlétét igazolta a vizsgált mintában. Az azonosítást a

hagyományos módszerekkel is megismételve, a laktóz és a melibióz bontás, valamint a csökkent hőtürés alapján *C. neoformans* kizárható volt.

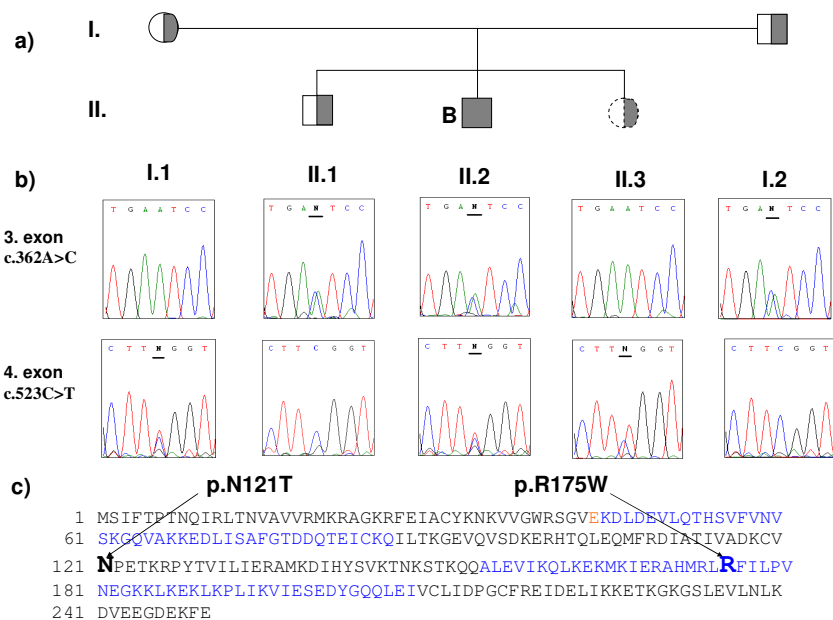
5.3 Új, betegséget okozó missense mutációk Shwachman-Diamond szindrómában

Jelen munkában Magyarországon elsőként számoltunk be genetikai vizsgálattal is igazoltan súlyos SDS-ben szenvedő betegről, akiben mutáció analízis vizsgálattal az *SBDS* génen két új, korábban még nem ismert missense mutációt találtunk a 3-as és a 4-es exonban. A missense mutációk következtében az *SBDS* által kódolt fehérjében p.N121T és p.R175W aminosav cserék jönnek létre, amelyek a fehérje féléletidejét csökkentik. A RFLP vizsgálatot a beteg családtagjaiban és 50 egészséges egyénben elvégezve egyértelműen igazoltuk a c.362A>C mutáció patogenetikai szerepét. Mindezek alapján feltételeztük, hogy súlyos SDS fenotípust nemcsak az *SBDS* és pszeudogénje közötti konverziós mutációk, hanem összetett heterozigóta missense mutációk is okozhatnak.

5.3.1 Mutációk az *SBDS* génen

Mutáció analízis vizsgálattal a beteg gyermekben (B, II.2) az autoszomális recesszív öröklődésmenetnek megfelelően, összetett heterozigóta állapotot igazoltunk (6. ábra, b panel). Az *SBDS* gén 3-as exonján a 362. nukleotid pozícióban egy adenin→citozin csere (c.362A>C), a 4-es exonon az 523. nukleotid pozícióban egy citozin→timin csere (c.523C>T) eredményezte a hibás kodon kialakulását. A missense mutációk következtében az *SBDS* által kódolt fehérjében a 121. aminosav aszparaginsav helyett treoninre (p.N121T)

illetve a 175. aminosav argininről triptofánra (p.R175W) változik (6. ábra, c panel). Stop kodon tehát nem keletkezik, így a SBDS szintézise nem áll le, de hibás funkciójú fehérje szintetizálódik. A család genetikai vizsgálata az anya (I.1), az apa (I.2) és az egészséges fiútestvér (II.1) esetében hordozó állapotot igazolt. Az édesanya időközben ismét várandós lett és kérte születendő gyermeke prenatális genetikai vizsgálatát. A magzat (II.3) hordozónak bizonyult, a magzati DNS-en mutáció csak a 4-es exonon volt kimutatható. Az édesanya a terhességet zavartalanul kiviselte és egészséges leánygyermeknek adott életet.



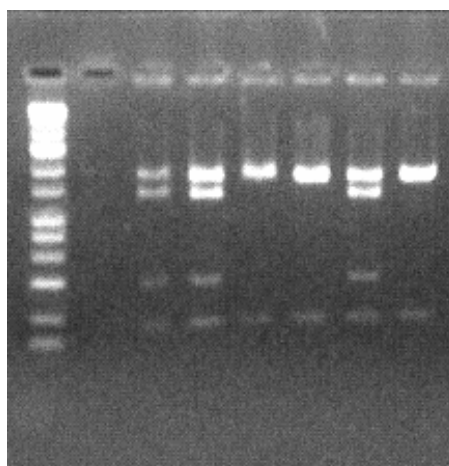
6. ábra Shwachman-Diamond szindrómában (SDS) szenvedő beteg családfája és a család molekuláris genetikai vizsgálatának eredményei. **a)** A beteg családfája. Szürke négyzet, SDS-ben szenvedő fiú beteg; szaggatott kör, leánymagzat; félig kitöltött négyzet és kör, hordozó állapot; B, beteg. **b)** A genomiális DNS szekvenálás a betegben (B, II.2) összetett heterozigóta állapotot igazolt; a mutáció helyét aláhúzással jelöltük. Az apa (I.2) és az idősebb fiútestvér (II.1) a (c.362A>C) mutációra, az anya (I.1) és a

fetus (II.3) a c.523C>T mutációra nézve bizonyult hordozónak. **c)** A mutációk következménye az SBDS protein aminosav szekvenciájában (fekete-kék váltakozó színek, exonok; piros betű: átfedő aminosav). A mutációk helyét nyilak jelölik.

5.3.2 Az *SBDS* gén 3. exonjának vizsgálata PCR-restrikciós fragment hossz polimorfizmussal

Tekintettel arra, hogy a fent leírt két mutáció korábban még nem volt ismert, igazolni kellett azok patogenetikai szerepét, kizárva az esetleges polimorfizmus lehetőségét. A 3-as exonon található (c.362A>C) mutáció esetében MaeIII restrikciós enzimmel PCR-RFLP vizsgálatot végeztünk. A nukleotid sorrendben a 362. pozícióban bekövetkező adenin→citidin csere a MaeIII restrikciós enzim számára új (második) hasítási helyet hoz létre. Az enzimmel történő emésztést követően így a mutációt nem hordozókban két hasítási termék: egy 836 és egy 63 bp hosszúságú keletkezik, míg a mutációt hordozókban négy hasítási terméket látunk (836, 653, 183 és 63 bp) a gélelektroforézis képen (7. ábra).

L V Ap B An Ft F K



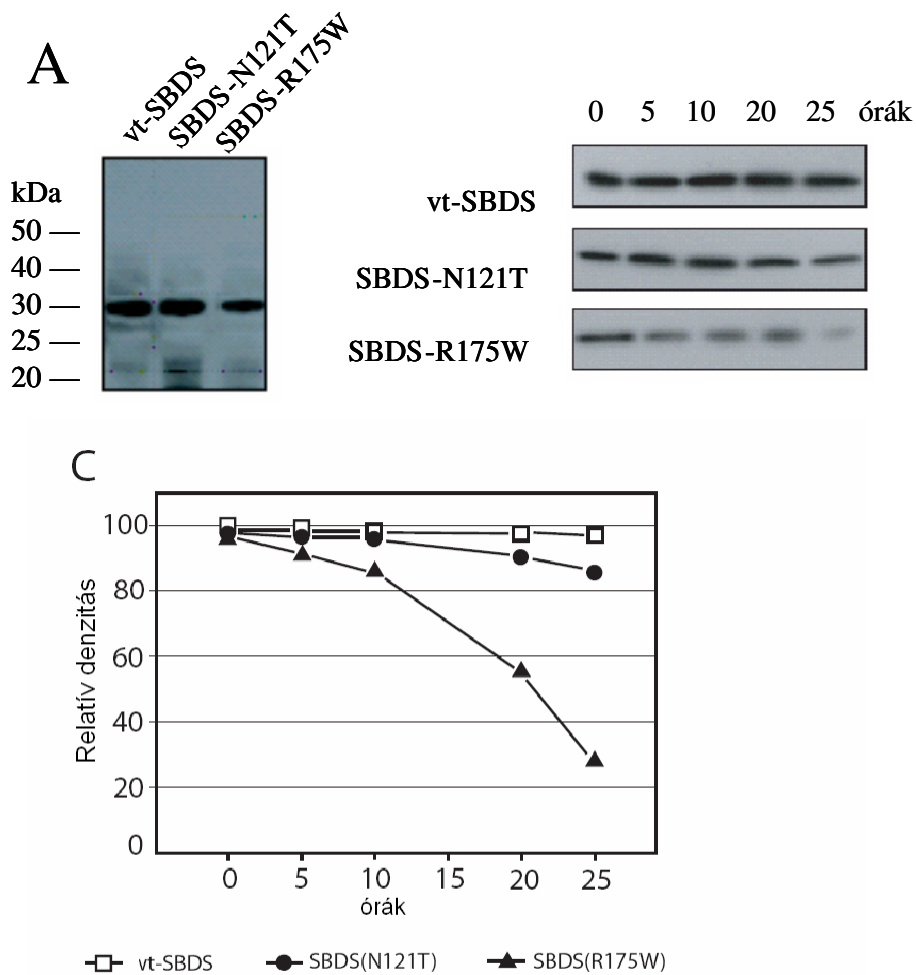
836 bp
653 bp
183 bp
63 bp

7. ábra Az *SBDS* gén c.362A>C mutációjának előfordulása Shwachman-Diamond szindrómában szenvedő betegben és családtagjaiban PCR-RFLP vizsgálattal 2%-os agaróz gél elektroforézist követően. A mutáció a MaeIII restrikciós enzim számára egy új, második hasítási helyet hoz létre. A mutációt nem hordozókban (homozigóta, vad típus) egy 836 és egy 63 bázispár (bp) hosszúságú hasítási termék keletkezik, ezt látjuk az anya (An), a fetus (Ft) és az egészséges kontroll (K) esetében. A mutációt hordozókban, így az apában (Ap), az idősebb fiútestvérben (F) és a betegben (B) négy különböző hosszúságú (63 bp, 183 bp, 653 bp és 836 bp) hasítási terméket látunk a gélelektroforézis képen. L, molekulasúly létra; V, vízkontrol.

Az RFLP vizsgálatot 50 egészséges egyénben (100 allél) elvégezve, egyértelműen igazolható volt, hogy a fent leírt mutáció patogén és nem tekinthető polimorfizmusnak. A PCR-RFLP vizsgálatot a 4-es exonon lévő mutáció esetében a megfelelő restrikciós enzim hiányában nem tudtuk elvégezni, ezért 50 egészséges egyénben (100 allél) gDNS szekvenálást végeztünk, amely egyetlen esetben sem igazolt mutációt a 4-es exonban. A beteg összetett heterozigóta állapota és a hordozók tünetmentessége is a mutációk kóroki szerepe mellett szólt.

5.3.3 A mutáns proteinek féléletidejének meghatározása

A p.N121T és p.R175W mutációt hordozó FLAG-gal jelölt *SBDS* proteinek féléletidejét immunoprecipitációt és SDS-PAG elektroforézist követően vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a mutációk csökkentik az *SBDS* proteinek féléletidejét (8. ábra).



8. ábra A mutáns SBDS fehérjék féléletidejének meghatározása. **A)** A FLAG-SBDS fúziós fehérjék Western-blot analízise. pCMV-FLAG plazmid segítségével a COS 7 sejteket vad típusú (vt) és mutáns SBDS cDNS-sel transzfektáltuk. A sejteket 48 órával a transzfekciót követően lizáltuk és M5 antitestekkel hibridizáltuk. Az immunprecipitátumokat 4-15% SDS polyacrilamid gélen szeparáltuk, majd PVD membránra vittük át. **B)** A mutáns SBDS fehérjék féléletidejének meghatározása COS 7 sejtekben. A vizsgálatot az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírtaknak megfelelően végeztük. Az egyes panelek [³⁵S]metioninnal és [³⁵S]ciszteinnel jelült SBDS proteinek autoradiográfiás képét mutatják különböző időpontokban (0, 5, 10, 20 és 25 ó) a fehérjeszintézist gátló cycloheximid eltávolítását követően. **C)** A vt

és a mutáns fehérjék mennyiségét a fenti időpontokban denzitometriás vizsgálattal határoztuk meg, 100%-nak a 0. időpontban mért fehérje mennyiséget tekintve.

5.3.4 Az SBDS és rokon génszekvenciák összehasonlító analízise

A 9. ábrán látható, hogy a p.N121T és p.R175W aminosav változások a halaktól kezdődően az emberig (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Danio rerio*) az SBDS fehérje rendkívül konzervált aminosavait érintik. Ez a megfigyelés is megerősíti a mutációk kóroki szerepét.

	c.362A>C		c.523C>T
	↓		↓
Homo sapiens	GTGA A TCCT ---/---	CTT C GGTTC	
Mus musculus	GTGA A CCCA ---/---	TTG C GCTTC	
Rattus norvegicus	GTGA A CCCG ---/---	TTG C GCTTC	
Gallus gallus	GTGA A TCCT ---/---	TTA C GATTT	
Danio rerio	GTGA A TCCT ---/---	CTG C GCTTC	

Figure 9. Az SBDS és rokon mRNS szekvenciák összehasonlító szekvencia analízise ClustaW szekvencia illesztő program segítségével. Felül a mutációk helyét jelöltük a cDNS-nek megfelelő számozás szerint.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1 X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség

Az X-kromoszómához kötötten öröklődő, az EBV fertőzéssel szembeni rendkívüli fogékonyságban megnyilvánuló immunhiány betegség oka az SH2 domént hordozó SH2D1A vagy más néven SAP fehérjét kódoló *SH2D1A* gén mutációja. Jelen munkában két fiúgyermekről számoltunk be, akikben az XLP-re típusos súlyos, fenotípus és szövettani eltérések voltak észlelhetők. A

család mutáció analízis vizsgálata az *SH2D1A* gén 1-es exonjában c.47G>A missense mutációt igazolt. Fehérje szinten a mutáció egy p.G16D aminosav cserét eredményezett. Irodalmi adatok szerint a missense mutációk az *SH2D1A* gén bármelyik szakaszát érinthetik [68]. Ezek a mutációk az SH2D1A protein jelentősen csökkent féléletideje miatt, a fehérje instabilitásához vezethetnek, vagy az SH2D1A fiziológias receptorához, elsősorban a SLAM receptorcsaládba tartozó receptorokhoz való kötődésének károsodását eredményezik. A mutáció fehérje szintű funkcionális következményeinek vizsgálatára a wt és a mutáns cDNS-eket COS 7 sejtekben expresszáltuk. A mutáns (p.G16D) SH2D1A protein relatíve stabilnak bizonyult. A p.G16D protein féléletideje a vad típuséval megegyező volt. A mutáns fehérje kötődése azonban a fiziológias receptorokhoz (SLAM és 2B4) károsodott. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a receptorhoz való kötődés károsodása hozzájárul a SAP fehérje funkciójának elvesztéséhez a p.G16D mutációt hordozó betegekben. A SAP/SLAM aktivációs útvonal károsodása felelős lehet az interferon- γ termelés szabályozásának zavaráért, míg az SAP/2B4 interakció károsodása a cytotoxikus T- és NK-sejtek működészavarát eredményezheti. Ez a kombinált defektus felelős a súlyos klinikai tünetek kialakulásáért és az EBV indukálta immunválasz, illetve sejtproliferáció szabályozásának összeomlásáért. Mindazonáltal további vizsgálatok szükségesek a genotípus-fenotípus összefüggések pontos tisztázására, hiszen mind a mai napig nem ismert az *SH2D1A* génmutációk típusa és az EBV fertőzések súlyossága, illetve a prognózis közötti kapcsolat [43, 68]. Eddigi megfigyelések alapján a missense mutációk a betegség enyhébb lefolyású, kevésbé súlyos kimenetelű formáját eredményezik. Saját adataink ezt a megfigyelést nem erősítik meg.

A mutáns p.G16D protein konformációs vizsgálata igazolta, hogy az aminosav változás hatására a SAP fehérje tirozin-kötő régiója megváltozik, amely befolyásolja a SLAM és a 2B4 receptorokhoz való kötődést. A klasszikus SH2 domének a foszfopeptid molekulákat “kettős-fogú” formában kötik. A foszfortirozin molekulák egyrészt a SAP centrális részével és a C terminális rész 3-5 aminosavával kapcsolódva (“első fog”) kötődhetnek a receptor zsebbe. A SAP fehérjének van egy másik tirozin-kötő régiója is, egy N-terminális Tyr aminosav. Ez az N-terminális “második fog” az Arg13, a Glu17, az Ile51 és a Thr53 aminosavak által formált kötőhelybe illeszkedik [30, 50]. Bár a 16-os Gly nem vesz részt direkt a peptid kötésben, a 17-es Glu-hoz való közelsége magyarázhatja a SLAM és a 2B4 receptorokhoz való kötődés zavarát. Lehetséges, hogy a SAP 16-os pozíciójában lévő glicin biztosítja a receptor kötéshez szükséges fehérjestruktúrát. Bármilyen is legyen a pontos mechanizmus, megfigyeléseink egyértelműen aláhúzzák a 16-os glicin jelentőségét az EBV indukált T-sejtek működésében és a SAP-SAP receptor interakcióban.

Összefoglalva egy XLP miatt érintett család két FIM következtében exitált fiúgyermekében egy új, korábban még nem leírt missense mutációt igazoltunk az *SH2D1A* génen. A p.G16D mutáció a SAP protein féléletidejében szignifikáns csökkenést nem eredményezett, de megakadályozta a SAP kötődését a SLAM receptorcsalád legalább két receptorához (SLAM és 2B4). Megfigyeléseink a p.G16D kóroki szerepére utalnak XLP-ben.

6.2 X-kromoszómához kötött hyper-immunglobulin M szindróma

Egy kilenc éves X-HIGM miatt gondozott fiúgyermek esetét ismertettük, akiben a mikrobiológiai, a szerológiai és a biokémiai vizsgálmódszerek segítségével invazív *C. laurentii* fertőzést diagnosztizáltunk. A gyermekben fluconazol terápia hatására teljes regresszió következett be. A gyermek alapbetegségét az áramlási citometriás vizsgálatok mellett, gDNA szekvenálással is alátámasztottuk, amely a *CD40L* gén, 2-es exonján, a 216. nukleotid pozícióban hemizigóta formában C>A transzverziót (c.216C>A) igazolt. A *CD40L* gén az X-kromoszóma q26-os régiójára lokalizálható, 5 exonból épül fel. A *CD40L* génben eddig leírt különböző típusú (missense, nonsense, deléció, inszerció, splice-site) mutációk a gén egészét érinthetik, de leggyakrabban a TNF-homológ doménben mutatkoznak. A humán CD40L egy 261 aminosavból felépülő II. típusú transzmembrán fehérje, amely egy rövid intracellularis farki részből, egy transzmembrán régióból és egy TNF-el homológiát mutató extracellularis doménből épül fel. Az irodalmi adatok szerint nonsense, tehát stop kodon képződéséhez vezető mutációt eddig 18 családban írtak le a *CD40L* génben, amely 12 különböző kodont érintett. Az esetek egy részében a fehérjeszintézis idő előtti leállása (premature termination) és a mutáns CD40L sejtfelszíni expressziója között összefüggés észlelhető. A betegünkben a 2-es exonban igazolt p.C72X mutáció az extracelluláaris domént érintően, a fehérjeszintézis idő előtti leállításához és a funkcióképes CD40L protein expressziójának hiányához vezet az aktivált T-sejtek felszínén.

C. laurentii egy közelmúltban azonosított, oportunista patogén gomba, amelyet kórokozóként elsősorban csökkent immunitású betegekből izolálnak. Korábban szaprofita, nem patogén gombának tartották, de később egyre

növekvő előfordulását észlelték bőrfertőzésekben, keratitisben, endophthalmitisben, tüdő tályogban, peritonitisben, meningitisben és fungaemiában [13, 16, 32, 33, 36, 40, 55, 65]. A kemoterápia, az immunszuppresszív kezelés, a parenteralis táplálás, az intravénás katéterek és a széles spektrumú antibiotikumok alkalmazása egyértelműen növeli a *C. laurentii* infekciók kialakulásának lehetőségét [4]. Irodalmi ritkaságnak számító esetünk is bizonyítja, hogy öröklött immunodeficientiák is hajlamosíthatnak invazív *C. laurentii* fertőzések kialakulására. Primer T-sejt defektusokban, mint amilyen a CD40L deficiencia is a *C. laurentii* fertőzéseknek differenciál diagnosztikai jelentősége is lehet.

Jelenleg még nem rendelkezünk a *C. laurentii* fertőzésekre vonatkozóan általánosan elfogadott kezelési protokollal. Az izolátumok többsége érzékenynek bizonyul amphotericin B-re, fluconazol esetén pedig a minimális inhibitor koncentráció 4 és 64 µg/ml közötti [13, 32, 36]. Az érzékenységi vizsgálatok eredménye alapján és a fluconazol kisebb toxicitása miatt, betegünkben fluconazol terápiát alkalmaztunk. Saját és mások [16] tapasztalata alapján immunhiányos betegek fluconazol-érzékeny *C. laurentii* fertőzése esetén, a fluconazol az elsőként választandó antifungális szerek közé tartozik.

6.3 Shwachman-Diamond szindróma

Egy öt hónapos fiúsecsemőben a súlyos pancytopenia, az exocrin pancreas elégtelenség és az ennek következtében kialakuló súlyos malabsorptiós szindróma, valamint a visszatérő, gennyes bőr- illetve alsó- és felső légúti fertőzések alapján SDS-t diagnosztizáltunk. Mutáció analízis vizsgálattal az

SBDS génen két új, az irodalomban korábban még nem leírt mutációt (c.362A>C és c.523C>T) találtunk. A transzfekcióval vizsgálva a mutáns p.N121T és p.R175W *SBDS* proteinek féléletidejét, a vad típushoz képest csökkenés volt észlelhető. A PCR-RFLP vizsgálattal a c.362A>C mutáció, amelyet a beteg gyermek édesapjától örökölt 50 egészséges egyénben nem volt kimutatható. A c.523C>T mutáció kóroki szerepét a 4. exont kódoló gDNS szekvenálásával igazoltuk, amely 50 egészséges egyénben a mutációra nézve negatívnak bizonyult. Az összehasonlító szekvencia analízis vizsgálatok igazolták, hogy mindkét mutáció az *SBDS* fehérje rendkívül konzervált aminosavait érinti. Megfigyeléseink egyértelműen arra utalnak, hogy súlyos SDS fenotípus a korábban gondoltakkal ellentétben nemcsak az *SBDS* és pseudogénje, az *SBDSP* közötti konverziós mutációk következménye lehet, hanem összetett heterozigóta formában missense mutációk is eredményezhetik.

A humán genom vizsgálatok igazolták, hogy a 7. kromoszóma tartalmazza az emberi DNS legnagyobb intrakromozómális duplikátumát [14]. A 7. kromoszóma ezen szegmentális duplikátuma, vagy más néven duplikonja jelenti a génkonverziós események legfontosabb célpontjait [60]. A génkonverzió egy ismert mutáció mechanizmus, amelyet számos genetikai betegségben, így SDS-ben is leírtak [11, 12, 56]. Az első közlésekben az SDS fenotípus kialakulását az *SBDS* és pseudogénje, az 5.8 Mb távolságra elhelyezkedő, *SBDSP* közötti konverziós mutációk következményének tartották [8]. Az *SBDS* szekvencia analízis vizsgálatai azt mutatták, hogy a konverziós mutációk többségében az 183-184TA→TC, illetve a 201A→G és a 258+2T→C mutációk megtalálhatók. Hasonló adatokat közöltek kisebb

betegcsoportot feldolgozó japán és olaszországi tanulmányok is [35, 45, 47]. Néhány betegben az *SBDS* génen mutáció nem volt kimutatható, jelezve, hogy az SDS genetikailag heterogén betegség [71]. A frameshift és a missense mutációk meglehetősen ritkák, és mindezidáig ettől az egy esettől eltekintve összetett heterozigóta missense mutáció által okozott betegségről a világon sehol sem számoltak be.

Az előbb említettek miatt a jelen munkában közölt két mutáció molekuláris szintű következményeinek elemzése nagy kihívást jelent. A leírt missense *SBDS* mutációk valószínűleg a fehérje folding folyamatát befolyásolják és ezen keresztül a fehérje instabilitásához és csökkent fehérje féléletidőhöz vezetnek. Vizsgálataink szerint a mutáns és a vt *SBDS* proteinek féléletidejében különbség észlelhető. A missense mutációk módosíthatják a felszíni epitópokat és megváltoztathatják a felszíni elektrosztatikus potenciált. A fehérje kristályszerkezeti vizsgálatok az *SBDS* három-doménes szerkezetét igazolták, egy N-terminális résszel, egy a mutációk által leginkább érintett centrális doménnel és egy C-terminális résszel, amely szerkezeti homológiát mutat ismert RNS-kötő doménekkal [59]. A C-terminális régió mutációi extrém ritkák. A p.N121T mutáció az *SBDS* fehérje 98-169 aminosavait magában foglaló centrális doménjében található [59]. A hidrofil, bázikus aminosavról hidrofób, semleges aminosavra történő cserét eredményező p.R175W mutációt az *SBDS* fehérje C-terminális része (170-250 aminosavak) tartalmazza. Az itt leírt új, mutációk valószínűleg a centrális és a C-terminális domének elektrosztatikus töltéseit változtatják meg [62]. Ennek a változásnak a jelentőségét húzza alá az a jól ismert tény is, miszerint nukleinsav-kötő fehérjék rendszerint bázikus aminosavakon keresztül kötődnek a cukor-foszfát

oldalláncokhoz [62]. Az SBDS fehérje pontos funkciójának megismeréséhez további kutatások szükségesek, amelyek elengedhetetlenül fontosak a fent leírt két, új missense mutáció következményének tisztázásához is.

7. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

- Az *SH2D1A* génen új, betegséget okozó missense mutációt (c.47G>A) írtunk le, amely a SAP proteinben p.G16D aminosav cserét eredményezett.
- A p.G16D mutációt hordozó betegekben a SAP fehérje funkcióvesztését a mutáns, p.G16D protein fiziológias receptorokhoz, - mint a SLAM és a 2B4 - való kötődésének károsodása magyarázhatja.
- Súlyos CD40L deficienciában szenvedő betegben c.216C>A (p.C172X) mutációt igazoltunk.
- Elsőként számoltunk be invazív *C. laurentii* infekció előfordulásáról X-HIGM szindrómában szenvedő betegben.
- Magyarországon elsőként, súlyos SDS szindrómában szenvedő beteg esetét ismertettük, akinél mutáció analízis vizsgálattal két, új, korábban még nem leírt, missense mutációt találtunk, az *SBDS* gén 3-as (c.362A>C, p.N121T) és a 4-es (c.523C>T, p.R175W) exonjaiban.
- Szintén elsőként igazoltuk, hogy súlyos SDS fenotípus a korábban gondoltakkal ellentétben nemcsak az *SBDS* és pseudogénje, az *SBDSP* közötti konverziós mutációk

következménye lehet, hanem összetett heterozigóta formában missense mutációk is eredményezhetik.

8. KONKLÚZIÓ

Az elmúlt évtizedben a molekuláris genetika területén robbanásszerű fejlődésnek lehettünk szemtanúi, amely számos korábban misztikusnak vélt immunhiányos betegség patomechanizmusának megértéséhez vezetett. A közelmúltban több primer immundeficientia molekuláris genetikai alapjait sikerült tisztázni, így fény derült a rövid végtagú törpeség, az X-kromoszómához kötött IPEX szindróma, a NEMO deficiencia, a leukocita adhéziós deficiencia II. típusa és a fokozott radioszenzitivitással társuló SKID hátterére. Bár a klinikai szintű manifesztációkat nem minden esetben tudjuk egy jól meghatározott molekuláris eseményhez kötni, a klinikai immunológiai megfigyelések és az immunológiai alapkutatások molekuláris szintű eredményeinek folyamatos összevetése mindkét oldal számára gyümölcsöző lehet. A primer immundeficientiák hasznos modellként szolgálhatnak a jövő kutatásaiban, az autoimmun vagy az allergiás immunpatomechanizmusú, multifaktoriális betegségek tanulmányozására is.

Ha a tünetek hátterében hereditér betegség lehetősége is felmerül, a családi anamnézis mellett, a családfakészítésnek is az első diagnosztikus lépések között kell szerepelnie. Bár a legtöbb öröklött immundeficientia genetikai szintű leírására csak a közelmúltban került sor, a családfák és a családtagok anamnézisének pontos elemzése, az esetek többségében segít feltérképezni a korábbi generációk érintett családtagjait, akiknek a klinikai

tünetei, kórlefolyása a betegével megegyező. A precíz adatgyűjtés, a távoli rokonok felkutatása természetesen időigényes feladat és rendszerint több családlátogatást igényel, mint csak a beteg közvetlen hozzátartozóival való elbeszélgetést. A családtagok korábbi zárójelentéseinek, orvosi dokumentációjának áttekintése is hasznos lehet.

Az immunológiai alap kutatások és a genetikai szűrővizsgálati módszerek és műszerek fejlődése, az immunrendszer számos betegségének molekuláris szintű megértéséhez vezetett. Az immunbiológia területén növekvő tudásunk egyben lehetőséget teremtett új terápiás eljárások bevezetésére, nemcsak az immundeficientiák, hanem különböző autoimmun-, gyulladásos-, illetve transzplantációhoz kapcsolódó betegségekben is. Az immundeficientiák molekuláris kutatása területén tapasztalható hatalmas fejlődés ellenére maradtak kihívások. Ezen lehetséges kihívások egyike a mutáns gén korrekciója őssejt transzfekcióval. A primer immunhiány betegségekben, a génterápiás próbálkozások kezdeti eredményei biztatónak tűnnek, és remény van arra, hogy a génterápia hamarosan az első vonalbeli terápiás eljárások között szerepeljen.

9. IRODALOM

- 1) Allen R.C., Armitage R.J., Conley M.E. et al.: CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 1993; 259:990-3.
- 2) Aruffo A., Farrington M., Hollenbaugh D. et al.: The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T-cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 1993; 72:291-300.
- 3) Austin K.M., Leary R.J., Shimamura A.: The Shwachman-Diamond SBDS protein localizes to the nucleolus. *Blood* 2005; 106:1253-8.
- 4) Averbuch D., Boekhout T., Falk R. et al.: Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus laurentii*. *Med. Mycol.* 2002; 40:479-84.
- 5) Benoit L., Wang X., Pabst H.F. et al.: Defective NK cell activation in X-linked lymphoproliferative disease. *J. Immunol.* 2000; 165:3549-53.
- 6) Bodian M., Sheldon W., Lightwood R.: Congenital hypoplasia of the exocrine pancreas. *Acta Paediat.* 1964; 53:282-93.
- 7) Bonilla F.A., Geha R.S.: Primary immunodeficiency diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 111:S571-81.
- 8) Boocock G.R.B., Morrison J.A., Popovic M. et al.: Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome. *Nature Genet.* 2003; 33:97-101.
- 9) Brandau O., Schuster V., Weiss M. et al.: Epstein-Barr virus-negative boys with non-Hodgkin lymphoma are mutated in the SH2D1A gene, as are patients with X-linked lymphoproliferative disease (XLP). *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8:2407-13.
- 10) Bruton O.C.: Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; 9:722-7.

- 11) Bunge S., Rathmann M., Steglich C. et al.: Homologous nonallelic recombinations between the iduronate-sulfatase gene and pseudogene cause various intragenic deletions and inversions in patients with mucopolysaccharidosis type II. *Eur. J. Hum. Genet.* 1998; 6:492-500.
- 12) Chen J.M., Raguenes O., Ferec C. et al.: A CGC>CAT gene conversion-like event resulting in the R122H mutation in the cationic trypsinogen gene and its implication in the genotyping of pancreatitis. *J. Med. Genet.* 2000; 37:E36.
- 13) Cheng M.F., Chiou C.C., Liu Y.C. et al.: *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:1608-11.
- 14) Cheung J., Estivill X., Khaja R. et al.: Genome-wide detection of segmental duplications and potential assembly errors in the human genome sequence. *Genome Biol.* 2003; 4:R25.
- 15) Coffey A.J., Brooksbank R.A., Brandau O. et al.: Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat. Genet.* 1998; 20:129-35.
- 16) Custis P.H., Haller J.A., de Juan E. Jr. An unusual case of cryptococcal endophthalmitis. *Retina* 1995; 15:300-4.
- 17) DiSanto J.P., Bonnefoy J.Y., Gauchat J.F. et al: CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; 361:541-3.
- 18) Donadieu J., Michel G., Merlin E. et al.: Hematopoietic stem cell transplantation for Shwachman-Diamond syndrome: experience of the French neutropenia registry. *Bone Marrow Transplant.* 2005; 36:787-92.

- 19) Durandy A., Revy P., Fischer A.: Human models of inherited immunoglobulin class switch recombination and somatic hypermutation defects (hyper-IgM syndromes). *Adv. Immunol.* 2004; 82:295-330.
- 20) Dror Y., Freedman M.H.: Shwachman-Diamond syndrome. *Brit. J. Haemat.* 2002; 118:701-13.
- 21) Erdős M., Durandy A., Maródi L.: Genetically acquired class-switch recombination defects: the multi-faced hyper-IgM syndrome. *Immunol. Lett.* 2005; 97:1-6.
- 22) Erdős M., Maródi L.: Hyper-IgM szindróma. *Gyermekgyógyászat* 2003; 54:117-25.
- 23) Erdős M., Úzvölgyi É., Nemes Z. et al.: Characterization of a new disease-causing mutation of SH2D1A in a family with X-linked lymphoproliferative disease. *Hum. Mutat.* 2005; 25:506-12.
- 24) Ferrari S., Gilliani S., Incalaco A. et al.: Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper-IgM. *J. Immunol.* 2001; 98:12614-9.
- 25) Fischer A.: Human primary immunodeficiency diseases: a perspective. *Nat. Immunol.* 2004; 5:23-30.
- 26) Fuleihan R., Ramesh N., Loh R. et al.: Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90:2170-3.
- 27) Gulino A.V., Notarangelo L.D.: Hyper-IgM syndromes. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2003; 15:422-9.

- 28) Hall C., Berkhout B., Alarcon B. et al.: Requirements for cell surface expression of the human TCR/CD3 complex in non-T cells. *Int. Immunol.* 1991; 3:359-68.
- 29) Hill R.E., Durie P.R., Gaskin K.J. et al.: Steatorrhea and pancreatic insufficiency in Shwachman syndrome. *Gastroenterology* 1982; 83:22-7.
- 30) Hwang P.M., Li C., Morra M. et al.: A "three-pronged" binding mechanism for the SAP/SH2D1A SH2 domain: structural basis and relevance to the XLP syndrome. *EMBO J.* 2002; 21:314-23.
- 31) Jain A., Ma C.A., Liu S. et al.: Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohydrotic ectodermal dysplasia. *Nat. Immunol.* 2001; 2:223-8.
- 32) Johnson L.B., Bradley S.F., Kauffman C.A.: Fungemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia. *Mycoses* 1998; 41:277-80.
- 33) Kamalam A., Yesudian P., Thambiah A.S.: Cutaneous infection by *Cryptococcus laurentii*. *Br J Dermatol.* 1977; 97:221-3.
- 34) Kawabe T., Naka T., Yoshida K. et al.: The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1994; 1:67-78.
- 35) Kawakami T., Mitsui T., Kanai M. et al.: Genetic analysis of Shwachman-Diamond syndrome: phenotypic heterogeneity in patients carrying identical SBDS mutations. *Tohoku J. Exp. Med.* 2005; 206:253-9.

- 36) Kordossis T., Avlami A., Velegraki A. et al.: First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. *Med. Mycol.* 1998; 36:335-9.
- 37) Korthauer R., Graf D., Mages H.W. et al.: Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; 361:539-41.
- 38) Kuijpers T.W., Nannenberg E., Alders M. et al.: Congenital aplastic anaemia caused by mutations in the SBDS gene: A rare presentation of Shwachman-Diamond syndrome. *Pediatrics* 2004; 114:387-91.
- 39) Latour S., Roncagalli R., Chen R. et al.: Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signaling in immune regulation. *Nat. Cell Biol.* 2003; 5:149-55.
- 40) Lynch J.P. 3rd, Schaberg D.R., Kissner D.G. et al.: *Cryptococcus laurentii* lung abscess. *Am Rev Respir Dis.* 1981; 123:135-8.
- 41) Mack D.R., Forstner G.G., Wilschanski M. et al.: Shwachman syndrome: exocrine pancreatic dysfunction and variable phenotypic expression. *Gastroenterology* 1996; 111:1593-602.
- 42) Makitie O., Ellis L., Durie P.R. et al.: Skeletal phenotype in patients with Shwachman-Diamond syndrome and mutations in SBDS. 2004. *Clin. Genet.* 2004; 65:101-12.
- 43) Morra M., Simarro-Grande M., Martin M. et al.: Characterization of SH2D1A missense mutations identified in X-linked lymphoproliferative disease patients. *Biol. Chem.* 2001; 276:36809-16.

- 44) Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S. et al.: Class switch recombination and hypermutation require activation-induced deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000; 102:553-63.
- 45) Nakashima E., Mabuchi A., Makita Y. et al.: Novel SBDS mutations caused by gene conversion in Japanese patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Hum. Genet.* 2004; 114:345-8.
- 46) Nichols K.E., Harkin D.P., Levitz S. et al.: Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95:13765-70.
- 47) Nicolis E., Bonizzato A., Assael B.M. et al.: Identification of novel mutations in patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Hum. Mutat.* 2005; 25:410.
- 48) Noelle R.J.: CD40 and its ligand in host defense. *Immunity* 1996; 4:415-9.
- 49) Ochs H.D., Sullivan J.L., Wedgwood R.J. et al.: X-linked lymphoproliferative syndrome: abnormal antibody responses to bacteriophage phi X174. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 1983; 19:321-3.
- 50) Poy F., Yaffe M.B., Sayos J. et al.: Crystal structures of the XLP protein SAP reveal a class of SH2 domains with extended, phosphotyrosine-independent sequence recognition. *Mol. Cell* 1999; 4:555-61.
- 51) Purtilo D.T., Cassel C.K., Yang J.P. et al.: X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet* 1975; 7913:935-40.

- 52) Rada C., Williams G.T., Nilsen H. et al.: Immunoglobulin isotype switching in inhibited and somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 2004; 12:1748-55.
- 53) Rákóczi É., Erdős M., Bartyik K. et al.: X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség. *Gyermekgyógyászat* 2004; 55: 27-30.
- 54) Revy P., Muto T., Levy Y. et al.: Activation-induced deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 2000; 102:565-75.
- 55) Ritterband D.C., Seedor J.A., Shah M.K. et al.: A unique case of *Cryptococcus laurentii* keratitis spread by a rigid gas permeable contact lens in a patient with onychomycosis. *Cornea* 1998; 17:115-8.
- 56) Roesler J., Curnutte J.T., Rae J. et al.: Recombination events between the p47-phox gene and its highly homologous pseudogenes are the main cause of autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Blood* 2000; 95:2150-6.
- 57) Sakamoto K., Freed H.J., Purtilo D.T.: Antibody responses to Epstein-Barr virus in families with the X-linked lymphoproliferative syndrome. *J. Immunol.* 1980; 125:921-5.
- 58) Sayos J., Wu C., Morra M. et al.: The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998; 395:462-9.
- 59) Savchenko A., Krogan N., Cort J.R. et al.: The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein family is involved in RNA metabolism. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:19213-20.

- 60) Scherer S.W., Cheung J., MacDonald J.R. et al.: Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science* 2003; 300:767-72.
- 61) Seemayer T.A., Gross T.G., Egeler R.M. et al.: X-linked lymphoproliferative disease: twenty-five years after the discovery. *Pediatr. Res.* 1995; 38:471-8.
- 62) Shamma C., Menne T.F., Hilcenko C. et al.: Structural analysis of the SBDS protein family: insight into the leukemia-associated Shwachman-Diamond syndrome. *J. Biol. Chem.* 2005; 280:19221-9.
- 63) Shwachman H., Diamond L.K., Oski F.A. et al.: The syndrome of pancreatic insufficiency and bone marrow dysfunction. *J. Pediatr.* 1964; 65:645-63.
- 64) Simon G., Simon G., Erdős M. et al.: Invasive *Cryptococcus laurentii* disease in a nine-year-old boy with X-linked hyper-immunoglobulin M syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2005; 24:935-7.
- 65) Sinnott J.T. 4th, Rodniti J., Emmanuel P.J. et al.: *Cryptococcus laurentii* infection complicating peritoneal dialysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1989; 8:803-5.
- 66) Sumaya C.V., Ench Y.: Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. I. Clinical and general laboratory findings. *Pediatrics* 1985; 75:1003-10.
- 67) Sumaya C.V., Ench Y.: Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. II. Heterophil antibody and viral-specific responses. *Pediatrics* 1985; 75:1011-9.
- 68) Sümegi J., Huang D., Lányi A. et al.: Correlation of mutations of the SH2D1A gene and Epstein-Barr virus infection with clinical phenotype

and outcome in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 2000; 96:3118-25.

- 69) Sümegi J., Seemayer T.A., Huang D. et al.: A spectrum of mutations in SH2D1A that causes X-linked lymphoproliferative disease and other Epstein-Barr virus-associated illnesses. *Leuk. Lymphoma* 2002; 43:1189-201.
- 70) Thompson A.D., Braun B.S., Arvand A. et al.: EAT-2 is a novel SH2 domain containing protein that is up regulated by Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Oncogene* 1996; 13:2649-58.
- 71) Woloszynek J.R., Rothbaum R.J., Rawls A.S. et al.: Mutations of the SBDS gene are present in most patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Blood* 2004; 104:3588-90.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezést megalapozó közlemények:

1. **Erdős M.**, Maródi L.: Hyper-IgM szindróma.
Gyermekgyógyászat 2003; 54:117-25.
2. Rákóczi É., **Erdős M.**, Bartyik K., Kemény É., Nemes Z., Maródi L. X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség.
Gyermekgyógyászat 2004; 55:27-30.
3. **Erdős M.**, Uzvölgyi É., Nemes Z., Török O., Rákóczi É., Went-Sümegei N., Sümegei J., Maródi L. Characterization of a new disease-causing mutation of *SH2D1A* in a family with X-linked lymphoproliferative disease.
Hum. Mutat. 2005; 25:506. **IF: 7.923**
4. **Erdős M.**, Durandy A., Maródi L.: Genetically-acquired class-switch recombination defects: The multi-faced hyper-IgM syndrome.
Immunol. Lett. 2005; 97:1-6. **IF: 2.301**
5. Simon G., Simon G., **Erdős M.**, Maródi L.: Invasive *Cryptococcus laurentii* disease in a 9-year-old boy with X-linked hyper-immunoglobulin M syndrome.
Pediatr. Infect. Dis. J. 2005; 24:935-7. **IF: 3.047**
6. **Erdős M.**, Alapi K., Balogh I., Oroszlán G., Rákóczi É., Sümegei J., Maródi L.: Severe Shwachman-Diamond syndrome phenotype caused by missense mutations in the *SBDS* gene.
Exp. Hematol. 2006 (accepted for publication) **IF: 4.019**

Az értekezést megalapozó közlemények impact faktora: 17.29

Egyéb az értekezés témáján belüli angol nyelvű közlemények:

1. Alapi K., **Erdős M.**, Török O., Maródi L.: Prenatal diagnosis of the R86H WASP gene mutation in heterozygous twins.
Clin. Chem. 2006; 52:901-3. **IF: 7.717**
2. **Erdős M.**, Alapi K., Maródi L.: Retrospective diagnosis of X-linked hyper-IgM syndrome in a family with multiple deaths of affected males.
Haematologica 2006 (accepted for publication) **IF: 4.575**
3. Ku C. L., Picard C., **Erdős M.**, Jeurissen A., Bustamante J., Puel A., von Bernuth H., Filipe-Santos O., Chang H.H., Lawrence T., Raes M., Maródi L., Bossuyt X., Casanova JL.: IRAK-4 and NEMO mutations in otherwise healthy children with recurrent invasive pneumococcal disease.
J. Med. Genet. 2006 (accepted for publication) **IF: 4.33**

Egyéb az értekezés témáján kívüli angol nyelvű közlemények:

4. Tóth J., **Erdős M.**, Maródi L.: Rebound hepatosplenomegaly in type 1 Gaucher disease.
Eur. J. Haematol. 2003; 70:125-8. **IF: 1.714**
5. Moskwa P., Palicz A., Paclet M., Dagher M., **Erdős M.**, Maródi L., Ligeti E.: Glucocerebroside inhibits NADPH oxidase activation in cell-free system.
Biochi. Biophys. Acta 2004; 1688:197-203. **IF: 3.046**
6. Garzuly F., Maródi L., **Erdős M.**, Grubits J., Varga Z., Gelphi E., Rohonyi B., Mázló M., Molnár A., Budka H.: Megadolichobasilar anomaly with thrombosis in a family with Fabry's disease and a novel mutation in the α -galactosidase A gene. *Brain* 2005; 128:2078-83. **IF: 7.535**

Egyéb közlemények impact faktora: 28.917

Összesített impact faktor: 46.207

Az értekezés témáján kívüli magyar nyelvű közlemények:

1. **Erdős M.**, Maródi L.: Az interferon- γ aktivációs utak primer defektusai.
Orv. Hetil. 2001; 142:2557-61.
2. **Erdős M.**, Maródi L.: Az interferon- γ aktiváció újszülöttkori sajátosságai macrophagokban.
Magyar Immunológia 2002; 1:12-8.
3. **Erdős M.**, Maródi L.: Az IVIG gyulladásgátló hatásának mechanizmusa immunthrombocytopeniás purpurában.
Magyar Immunológia 2002; 1:26-7.
4. **Erdős M.**, Tóth J., Maródi L.: Prezentációs jelek és tünetek Gaucher-kórban.
Orv. Hetil. 2002; 143:2327-35.
5. **Erdős M.**, Maródi L.: Az autoimmun lymphoproliferatív szindróma klinikuma és molekuláris genetikája.
Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle 2003; 8:4-9.
6. **Erdős M.**, Maródi L.: Gaucher-kór.
Granum 2003; 6:23-7.
7. Aleksza M., **Erdős M.**, Maródi L.: Az áramlási citometria szerepe a primer immunhiányos betegségek diagnosztikájában.
Gyermekgyógyászat 2003; 54:181-7.
8. Boda A., **Erdős M.**, Tóth J., Nagy J., Maródi L.: Több csont destruktív elváltozása 1. típusú Gaucher-kórban.
Orv. Hetil. 2003; 144:625-7.

9. **Erdős M.**, Nagy L., Szentkereszty Z., Sáfrány G., Maródi L.: Fasciitis necrotisans hyper-IgE szindrómában.
Orv. Hetil. 2004; 145:15-20.
10. **Erdős M.**, Maródi L.: Klinikai manifesztációk hyper-IgE szindrómában.
Gyermekgyógyászat 2004; 55:15-25.
11. **Erdős M.**, Maródi L.: Klinikai manifesztációk hyper-IgE szindrómában.
Focus Medicinae 2004; 6:3-9.
12. **Erdős M.**, Maródi L.: Intravénás immunglobulin terápia autoimmun kórképekben. *Focus Medicinae* 2004; 6:11-7.
13. **Erdős M.**, Maródi L.: Fertőzések etiopatológiája veleszületett immunglobulin-defektusokban.
Családorvosi Fórum 2005; 2:34-40.
14. **Erdős M.**, Maródi L.: Szelektív antipoliszaccharidantitest-hiány szindróma és IRAK-4-deficiencia invazív Pneumococcus-fertőzésben.
Gyermekgyógyászat 2005; 56:115-21.
15. Alapi K., **Erdős M.**, Maródi L.: Wiskott-Aldrich szindróma génjének mutációja congenitalis thrombocytopeniás csecsemőben.
Gyermekgyógyászat 2005; 56:135-9.
16. **Erdős M.**, Maródi L.: Invazív pneumococcus fertőzések primer immundefektusokban.
Orv. Hetil. 2006; 147: 29-34.
17. **Erdős M.**, Maródi L.: Az interferon aktivációs utak primer és átmeneti defektusai. *Magyar Immunológia* 2006; 5:40-1.

Megjelent absztraktok

1. Aleksza M., **Erdős M.**, Maródi L.: CD40-ligand deficiency. *Magyar Immunológia* 2002; 3:8.
2. **Erdős M.**, Durandy A., Maródi L.: Autosomal recessive hyper-IgM syndrome. *Magyar Immunológia* 2002; 3:17.
3. **Erdős M.**, Ku CL., Bossuyt X., Casanova JL., Maródi L.: Invasive pneumococcal disease in a 6 year-old child with IRAK-4 deficiency and anti-polysaccharide antibody deficiency. *Tissue Antigens* 2004; 64:402.
4. Rákóczi É., **Erdős M.**, Maródi L.: Fatalis mononucleosis infectiosa. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia* 2004; 11:S12.
5. **Erdős M.**, Ku CL., Bossuyt X., Casanova JL., Maródi L.: Invasive pneumococcal disease with IRAK-4 deficiency and anti-polysaccharide antibody deficiency. *Magyar Immunológia* 2004; 3:28.
6. **Erdős M.**, Úzvölgyi É., Nemes Z., Török O., Rákóczi É., Went-Sümegei N., Sümegei J., Maródi L.: Characterization of a new disease-causing mutation in the SAP protein observed in a family with X-linked lymphoproliferative disease. *Magyar Immunológia* 2004; 3:74.
7. Alapi K., Gulácsy V., **Erdős M.**, Török O., Ochs H., Maródi L.: Mutation analysis in Wiskott-Aldrich syndrome. *Magyar Immunológia* 2005; 2:9.
8. **Erdős M.**, Went-Sümegei N., Alapi K., Oroszlán G., Sümegei J., Maródi L.: New disease-causing mutations in Shwachman-Diamond syndrome. *Magyar Immunológia* 2005; 2:14.

Angol nyelvű előadások

1. Hyper-IgM syndrome in three siblings. XXXII. Meeting of the Hungarian Society for Immunology. Kaposvár, Hungary, 2002.

2. Necrotizing fasciitis in a patient with hyper-IgE syndrome. Primary Immunodeficiency (PID) Awareness Meeting. PID Round Tour in East-Central Europe: The J project. Targu Mures, Romania, 2004.
3. Hyper-IgE syndrome: Review. Primary Immunodeficiency (PID) Awareness Meeting. PID Round Tour in East-Central Europe: The J project. Beograd, Serbia and Montenegro, 2004.
4. Selective anti-polysaccharide antibody deficiency. Primary Immunodeficiency (PID) Awareness Meeting. PID Round Tour in East-Central Europe: The J project. Skopje, Macedonia, 2004.
5. Interleukin-1 receptor associated kinase-4 deficiency. Primary Immunodeficiency (PID) Awareness Meeting. PID Round Tour in East-Central Europe: The J project. Kiev, Ukraine, 2004.
6. Clinical and immunological characteristics of hyper-IgE syndrome. Primary Immunodeficiency (PID) Awareness Meeting. PID Round Tour in East-Central Europe: The J project. Sofia, Bulgaria, 2005.
7. A new mutation in the *SBDS* gene. European Society for Pediatric Haematology and Immunology (ESPHI) Biannual Meeting, Molecular Genetics in Pediatric Haematology and Immunology. Budapest, Hungary, 2005
8. Identification of a new disease-causing mutation in an infant with Shwachman-Diamond syndrome. Meeting of the Hungarian Working Group for Pediatric Immunology. Debrecen, Hungary, 2005.
9. Severe Shwachman-Diamond syndrome phenotype caused by compound heterozygous missense mutations in the *SBDS* gene. XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary, 2006.

Magyar nyelvű előadások

1. Interferon gamma deficienciák klinikai manifesztációi. Magyar Gyermekorvosok Társasága Északkelet-Magyarországi Területi Szervezetének Konferenciája, Eger, 2001.
2. Primer Th1 citokin defektusok klinikai manifesztációi és elkülönítő diagnosztikája. A Magyar Gyermekimmunológiai Munkacsoport Tudományos Ülése, Szeged, 2001.
3. Magyarországi Gaucher regiszter. Lysosomal Tárolási Betegségek: Molekuláris mechanizmus, diagnosztika és terápia. MTA DAB Tudományos Ülés, Debrecen 2002.
4. Hyper-IgM szindróma. A Magyar Gyermekimmunológiai Munkacsoport Tudományos Ülése, Budapest, 2002.
5. A magyarországi Gaucher-regiszter. A veleszületett anyagcsere-betegségek kezelése. Tudományos Ülés, Visegrád, 2003.
6. A magyarországi Gaucher-regiszter. Ritka betegségek. MTA DAB Tudományos Ülés, Debrecen, 2003.
7. Fasciitis necrotisans hyper-IgE szindrómában. A Magyar Gyermekorvosok Társasága Északkelet-Magyarországi Területi Szervezetének Konferenciája, Miskolc, 2003.
8. Fasciitis necrotisans hyper-IgE szindrómában. A Magyar Gyermekimmunológiai Munkacsoport Tudományos Ülése, Noszvaj, 2003.
9. Interleukin-1 receptor-asszociált kináz-4 génmutáció invazív pneumococcus fertőzésben. A Magyar Gyermekimmunológiai Munkacsoport Tudományos Ülése, Székesfehérvár, 2004.

10. A hyper-IgE szindróma klinikuma és immunpathológiája. A Magyar Allergológiai és Klinikai Immunológiai Társaság XXXIII. Kongresszusa, Debrecen, 2005.
11. Új génmutáció Shwachman-Diamond szindrómában. Tüdőgyógyászati, Allergológiai és Immunológiai Megbetegedések Közhasznú Nemzetközi Alapítvány VIII. Tudományos Kongresszusa, Debrecen, 2005.
12. Új génmutáció Shwachman-Diamond szindrómában. A Gyermekek Gyógyításáért Alapítvány Kuratóriuma, a Markhot Ferenc Kórház - Rendelőintézet Igazgatósága és Tudományos Bizottsága: XII. Dr. Frank Mária Emlékülés, Eger, 2005.
13. Characterization of a new disease-causing mutation of *SH2D1A* in a family with X-linked lymphoproliferative disease. Magyar Gyermekorvosok Társasága Nagygyűlés, Balatonszárszó, 2005.
14. Új génmutáció Shwachman-Diamond szindrómában. Magyar Immunológiai Társaság XXXV. Vándorgyűlése, Sopron, 2005.

Angol nyelvű poszterek

1. **Erdős M.**, Forveille M., Durandy A., Maródi L.: Activation-induced cytidine deaminase deficiency in three siblings with hyper-IgM syndrome. International Symposium on Primary Immunodeficiency Diseases. Debrecen, Hungary, 2002.
2. Aleksza M., Savoldi G., **Erdős M.**, Notarangelo L., Maródi L.. X-linked hyper-IgM syndrome due to splice-site mutation in the CD40 ligand gene. International Symposium on Primary Immunodeficiency Diseases. Debrecen, Hungary, 2002.

3. Maródi L., Savoldi G., **Erdős M.**, Notarangelo L.. Retrospective diagnosis of CD40 ligand deficiency in a Hungarian family. International Symposium on Primary Immunodeficiency Diseases. Debrecen, Hungary, 2002.
4. **Erdős M.**, Forveille M., Durandy A., Maródi L.. Activation-induced cytidine deaminase deficiency in three siblings with hyper-IgM syndrome. Xth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Weimar, Germany, 2002.
5. Moskwa P., Palicz A., Ligeti E., **Erdős M.**, Maródi L.. Glucocerebroside inhibits NADPH oxidase activation in cell-free system. 32nd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (ISEH). Paris, France, 2003.
6. **Erdős M.**, Lung-Ku C., Bossuyt X., Casanova JL., Maródi L.: Invasive pneumococcal disease in a 6 year-old child with IRAK-4 deficiency and anti-polysaccharide antibody deficiency. 1st international Conference on Basic and Clinical Immunogenomics (BCI). Budapest, Hungary, 2004.
7. **Erdős M.**, Lung-Ku C., Bossuyt X., Casanova JL., Maródi L.: Invasive pneumococcal disease in a 6 year-old child with IRAK-4 deficiency and anti-polysaccharide antibody deficiency. XIst Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Paris, France, 2004.
8. **Erdős M.**, Úzvölgyi É, Nemes Z., Török O., Rákóczi É., Went-Sümegei N., Sümegei J., Maródi L.: Characterization of a new disease causing mutation in the SAP protein observed in a family with X-linked lymphoproliferative disease. XIst Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Paris, France, 2004.

9. **Erdős M.**, Maródi L.: Clinical manifestations in hyper-IgE syndrome. European Society for Pediatric Hematology and Immunology (ESPHI) Biannual Meeting, Molecular Genetics in Pediatric Hematology and Immunology. Budapest, Hungary, 2005.
10. Alapi K., **Erdős M.**, Maródi L.: Mutation analysis in three Hungarian families with Wiskott-Aldrich syndrome. European Society for Pediatric Hematology and Immunology (ESPHI) Biannual Meeting, Molecular Genetics in Pediatric Haematology and Immunology. Budapest, Hungary, 2005.
11. Dobay O., **Erdős M.**, Szabó J., Borbély Á., Rozgonyi F., Nagy K., Maródi L.: Repeated isolation of a genetically identical Pneumococcus from a child suffering from IRAK-4 deficiency. European Society of Clinical Microbiology and Immunodeficiency. Nizza, France, 2006.
12. **Erdős M.**, Alapi K., Kovács G., Tóth B., Maródi L.: Recurrent c.1000C>T CXCR4 sequence variant in a girl with incomplete WHIM syndrome. XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary, 2006.
13. **Erdős M.**, Maródi L.: Clinical manifestations of hyper-IgE syndrome: Association of HIGE with necrotizing fasciitis. XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary, 2006.
14. **Erdős M.**, Péter M. jr., Rákóczi É., Kovács G., Tóth B., Maródi L.: Hepatic variant of chronic granulomatous disease. XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary, 2006.
15. **Erdős M.**, Varga L., Kovács G., Maródi L.: Type 1 C2 deficiency in a boy with recurrent bacterial infections. XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary, 2006.

16. Simon G., **Erdős M.**, Maródi L.: Invasive *Cryptococcus laurentii* disease in a 9-year-old boy with X-linked hyperimmunoglobulin M syndrome. XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary, 2006.

Magyar nyelvű poszterek

1. Alapi K., Gulácsy V., **Erdős M.**, Török O., Ochs H., Maródi L.: A gDNA-mutációanalízis Wiskott-Aldrich-szindrómában. Magyar Immunológiai Társaság XXXV. Vándorgyűlése, Sopron, 2005.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Megköszönöm *Maródi László professzor úrnak*, témavezetőmnek munkámhoz nyújtott támogatását és segítségét. Irányításával az immunológiai és infektológiai kórképek széles spektrumát ismerhettem meg és lehetőséget kaptam arra, hogy a klinikai munka mellett molekuláris genetikai kutatómunkát is végezhessenek.

Hálás vagyok a szerzőtársak: *Prof. Anne Durandy, Prof. Sümegei János, Prof. Jean-Laurent Casanova, Dr. Rákóczi Éva, Dr. Úzvölgyi Éva, Dr. Török Olga, Dr. Simon Gábor, Dr. Simon Gyula és Dr. Balogh István* tudományos együttműködéséért.

A molekuláris genetikai és az immunkémiai vizsgálatok elvégzésében segítségemre voltak: *Alapi Krisztina biológus, Taskó Szilvia, Molnár Piroska és Kovács Gabriella* asszisztensek. Köszönöm segítőkészségüket, precíz, gyors és megbízható munkájukat. Külön hálával tartozom, az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszék orvosainak és nővéreinek, hogy kutatómunkámat kedvességükkel segítették. Külön köszönettel tartozom a betegeknek és családtagjaiknak, megértésükért és segítőkész együttműködésükért.

Köszönöm *édesanyám* türelmét, szeretetteljes támogatását, megértését és pozitív kritikáit.