

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Soltész Beáta

**Candidiasis és Epstein-Barr fertőzés molekuláris
patológiája primer immundeficienciában**

DEBRECENI EGYETEM

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

Debrecen, 2017

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Candidiasis és Epstein-Barr fertőzés molekuláris
patológiája primer immundeficienciában**

Soltész Beáta

Témavezető: Prof. Dr. Maródi László



DEBRECENI EGYETEM

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

Debrecen, 2017

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	3
1 RÖVIDÍTÉSEK	6
2 ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS	9
3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
3.1 Krónikus mucocutan candidiasis.....	11
3.1.1 <i>Candida albicans</i> , mint a krónikus mucocutan candidiasis fő okozója	12
3.1.2 A <i>Candida</i> elleni védekezésben szerepet játszó sejtek és az általuk termelt citokinek	15
3.1.2.1 CD4+IL-17+ T helper („Th17”) sejtek	15
3.1.2.2 CD4+IL-22+ T helper („Th22”) sejtek	16
3.1.3 Krónikus mucocutan candidiasis betegség tünetei és differenciáldiagnosztikája..	17
3.1.4 A krónikus mucocutan candidiasis terápiája	20
3.1.5 A krónikus mucocutan candidiasis és STAT1 kapcsolata.....	22
3.1.5.1 STAT1 - Jelátvivő és transzkripciót aktiváló 1 molekula	22
3.1.5.2 STAT1 domének szerkezete és funkciójuk	23
3.1.5.2.1 N-terminális domén.....	23
3.1.5.2.2 Kettős tekercs domén (CCD).....	24
3.1.5.2.3 DNS-kötő domén (DBD).....	24
3.1.5.2.4 Összekötő (linker) domén, SH2 domén és farki (tail) szegmens (TS):	25
3.1.5.2.5 Transzkripciót aktiváló domén (TAD)	25
3.1.5.3 A STAT1 transzkripció molekula jelátvitele és funkciója	25
3.1.5.4 <i>STAT1</i> gént érintő mutációk	29
3.2 X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség (XLP)	31
3.2.1 X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség epidemiológiája és klinikai manifesztációi	31
3.2.1.1 Az XLP1 klinikai tünetei.....	31
3.2.1.2 Az XLP1 és XLP2 differenciáldiagnosztikája	32
3.2.1.3 X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség kezelési stratégiája és prognózisa.....	34
3.2.2 Az X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség molekuláris genetikai háttere	35
3.2.2.1 Az XLP1 genetikai defektusai (<i>SH2D1A</i> mutációk).....	36
3.2.2.2 Az XLP2 genetikai defektusai (<i>XIAP</i> mutációk)	37
3.2.3 Az X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség patomechanizmusa ...	37

4	CÉLKITŰZÉSEK	42
5	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	43
5.1	Betegek	43
5.2	Laboratóriumi vizsgálatok	44
5.3	Molekuláris genetikai és biológiai vizsgálatok.....	44
5.3.1	DNS izolálás	45
5.3.2	Amplifikációs polimeráz láncreakció (PCR) és agaróz gélelektroforézis.....	45
5.3.3	Szekvenálási PCR	46
5.3.4	Szekvenálási adatok (szekvenogrammmok) kiértékelése.....	46
5.3.5	cDNS vizsgálata és Real-time PCR	46
5.3.6	Perifériális vér mononukleáris sejtek izolálása	47
5.3.7	B sejtek immortalizálása Epstein-Barr vírussal	47
5.3.8	<i>Candida</i> szuszpenzió készítése és PBMC sejtek stimulálása <i>Candida</i> szuszpenzióval	47
5.3.9	Termelődött citokinek koncentrációjának meghatározása enzim-kötött immunszorbens vizsgálat (ELISA) segítségével.....	48
5.3.10	Luciferáz teszt	48
5.3.11	IP-10 termelés vizsgálata ELISA módszerrel.....	49
5.3.12	IL-17+ T sejtek differenciáltatása	49
5.4	Különböző fehérje frakciók izolálása és vizsgálata Western blot módszerrel.....	49
5.4.1	STAT1 fehérje vizsgálata Western blot módszerrel	49
5.4.2	SAP fehérje vizsgálata Western blot módszerrel.....	50
5.5	Áramlási citometriás vizsgálatok	51
5.5.1	IL-17+ T sejtek meghatározása áramlási citometria segítségével	51
5.5.2	SAP protein expressziójának vizsgálata áramlási citometriával.....	51
5.5.3	Foszforilált-STAT1 vizsgálata áramlási citometriával.....	52
6	EREDMÉNYEK	53
6.1	IL-17-mediált immunitás és krónikus mucocutan candidiasis.....	53
6.1.1	A <i>STAT1</i> gén molekuláris genetikai vizsgálata	53
6.1.2	Új, mutációs adatbázisban nem szereplő <i>STAT1</i> szekvencia variánsok patogenitásának az igazolása	56
6.1.3	Az N179K és Q285R mutációk STAT1 protein funkciójára gyakorolt hatásának vizsgálata (Luciferáz teszt)	57
6.1.4	IP-10 termelés vizsgálata CMCD betegekben	58
6.1.5	CMCD betegek STAT1 defoszforilációs és foszforilációs képességének vizsgálata Western blot módszerrel.....	59

6.1.6	Foszforilált-STAT1 vizsgálata áramlási citometriával.....	62
6.1.7	<i>Candida</i> -stimulált mononukleáris sejtek citokin termelése.....	63
6.1.8	A CMCD betegek CD4+IL-17+ és CD4+IL-22+ T sejtek arányának vizsgálata..	66
6.2	X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség	70
6.2.1	Az <i>SH2D1A</i> gén molekuláris genetikai analízise	70
6.2.2	A SAP fehérje expressziójának kimutatása Western blot módszerrel és áramlási citometriával	72
7	MEGBESZÉLÉS.....	75
7.1	IL-17-mediált immunitás és a krónikus mucocutan candidiasis	75
7.2	X- kromoszómához kötött limfoproliferatív betegség	80
8	ÚJ EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	82
9	ÖSSZEFOGLALÁS	83
10	SUMMARY	85
11	IRODALOMJEGYZÉK	87
12	TÁRGYSZAVAK.....	112
12.1	Key words	112
12.2	Tárgyszavak	112
13	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	113
14	FÜGGELÉK	115

1 RÖVIDÍTÉSEK

AD	Autosomal dominant (Autoszomális domináns)
ALS3	Agglutinin-like sequence 3 (Agglutinin-szerű szekvencia 3)
AR	Autosomal recessive (Autoszomális recesszív)
BMT	Bone marrow transplantation (Csontvelő transzplantáció)
CARD	Caspase recruitment domain
CC	Coiled-coil (Kettős tekerecs)
CD	Cluster of differentiation
CID	Combined Immune Deficiency (Kombinált immundeficienciák)
CLR	C-type lectin receptor (C-típusu lektin receptor)
CMC	Chronic mucocutaneous candidiasis (Krónikus mucocutan candidiasis)
CMCD	Chronic mucocutaneous candidiasis disease (Krónikus mucocutan candidiasis betegség)
CMV	Cytomegalovirus (Cytomegalovírus)
Ct	Cycle threshold (Küszöb ciklus)
DB	DNA-binding (DNS-kötő)
DOCK	Dedicator of cytokinesis
EAT-2	Ewing sarcoma-associated transcript-2 (Ewing szarkóma-asszociált transzkriptum-2)
EBV	Epstein-Barr virus (Epstein-Barr vírus)
ERT	EAT-2-related transducer (EAT-2-kapcsolt jelátvivő)
FIM	Fatal Infectious Mononucleosis (Halálos kimenetelű infektív mononucleosis)
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor (Granulocita kolónia-stimuláló faktor)
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (Granulocita makrofág kolónia-stimuláló faktor)
GOF	Gain of function (Funkciónyerő)
GRO α	Growth-regulated oncogene alpha
GTP	Guanosine triphosphate (Guanozin trifoszfát)
GTPáz	Guanosine triphosphatase (Guanozin trifoszfátáz)
HDAC	Histone deacetylase (Hiszton deacetiláz)
HIES	Hyper-IgE syndrome (Hyper-IgE szindróma)
HLH	Hemophagocytic lymphohistiocytosis (Hemophagocytikus lymphohistiocytosis)

HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation (Hematopoetikus őssejt transzplantáció)
HSV	Herpes simplex virus (Herpes simplex vírus)
Hwp1	Hyphal wall protein 1 (Hifa sejtfal protein 1)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1 (Intracelluláris adhéziós molekula-1)
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin (Immunglobulin)
IL	Interleukin
IL-12R β 1	Interleukin-12 receptor β 1 subunit (Interleukin-12 receptor β 1 alegység)
IL-17RA	Interleukin-17 receptor A
IL-2R γ	Interleukin-2 receptor γ chain (Interleukin-2 receptor γ lánc)
iNKT	Invariant natural killer T cells (Invariáns természetes ölő T sejtek)
INT1	Integrin-like protein 1 (Integrin-szerű fehérje 1)
IP-10	Interferon gamma- induced protein-10 (Interferon gamma-indukált fehérje-10)
IRF	Interferon regulatory factor (Interferon szabályozó faktor)
ISGF3	Interferon stimulated gene factor 3 (Interferon stimulált gén faktor 3)
ITSM	Immunotyrosine switch motifs
IV	Intravenous (Intravénásan)
IVIG	Intravenous immunoglobulin (Intravénás immunglobulin)
I κ B α	NF- κ B inhibitor alpha
LOF	Loss of function (Funkcióvesztő)
MAC	Myeloablative conditioning (Myeloablatív kondicionálás)
MCV	Molluscum contagiosum virus (Molluscum contagiosum vírus)
MINCLE	Macrophage-inducible C-type lecitin (Makrofág-indukált C-típusú lecitin)
MMR	Macrophag mannose receptor (Makrofág mannóz receptor)
MR	Mannose receptor (Mannóz receptor)
MSMD	Mendelian susceptibility to mycobacterial disease
NEMO	NF- κ B essential modulator
NES	Nuclear export signal (Nukleáris export szignál)
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural killer cells (Természetes ölő sejtek)
NKT	Natural killer T cells (Természetes ölő T sejtek)
NLS	Nuclear localisation signal (Nukleáris lokalizációs szignál)
NPC	Nuclear pore complex (Sejtmagi pórus komplex)

PAMPs	Pathogen associated molecular patterns (Patogén asszociált molekuláris mintázatok)
PIAS	Protein inhibitor of activated STATs (Aktivált STAT sejtmagi fehérje inhibitora)
PID	Primary immunodeficiency (Elsődleges immunhiány)
PRR	Pattern recognition receptor (Mintázat felismerő receptor)
RGD	Arginylglycylaspartic acid (Arginin-glicin-aszpartát sav)
RIC	Reduced intensity conditioning (Csökkent intenzitású kondicionálás)
RICD	Restimulation-induced cell death (Restimuláció-indukálta sejthalál)
ROR	Retinoic acid-related orphan receptor
RSV	Respiratory syncytial virus (Légúti óriássejtes vírus)
SAP	Signaling lymphocytic Activation Molecule (SLAM)-Associated protein (Szignalizációs lymphocyta aktivációs molekula (SLAM)-asszociált fehérje)
SCID	Severe combined immunodeficiency (Súlyos kombinált immunhiány)
SH2	Src-homology 2 (Src-homológ 2)
SH2D1A	SH2 Domain Containing 1A (SH2 domén tartalmú 1A)
SHIP	SH2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase (SH2 domén tartalmú inositol 5'-foszfátáz)
SHP1	SH2 domain-containing Phosphatase-1 (SH2-domén tartalmú foszfátáz 1)
SLAM	Signaling lymphocytic Activation Molecule (Szignalizációs lymphocyta aktivációs molekula)
STAT	Signal transducer and activator of transcription (Jelátvívő és transzkripciót aktiváló)
TAD	Transactivator domain (Transzaktivációs domén)
TCR	T-cell receptor (T sejt receptor)
TGF	Transforming growth factor (Transzformáló növekedési faktor)
Th	Helper T lymphocyta (SegítőT lymphocyta)
TLR	Toll-like receptor (Toll-szerű receptor)
TNF	Tumor necrosis factor (Tumor nekrozis faktor)
TYK2	Tirosine kinase-2 (Tirozin kináz-2)
VZV	Varicella zoster virus
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis (X kromoszómához kötött, apoptózist gátló)
XLP	X-linked lymphoproliferative disease (X kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség)

2 ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

A szervezetünkbe jutott kórokozókkal (baktériumokkal, vírusokkal, gombákkal, parazitákkal) szembeni védelmet az immunrendszerünk folyamatos, összehangolt működése biztosítja, ha az immunológiai szabályozás egyensúlya felbomlik (az immunrendszer bármelyik sejtje, sejtfelszíni vagy sejten belüli molekuláinak nem megfelelő funkciója vagy hiánya) akkor immunhiányos (immundeficiencia) állapot alakul ki. Elsődleges (primer, öröklött) immunhiányos állapotnak (PID; primary immunodeficiency) nevezzük, ha az immunrendszer működéséhez fontos génben változás (mutáció) történt, ami a génről átvitt fehérjetermék hiányához vagy hibás működéséhez vezet, ami már születéskor is jelen van, örökíthető és családi halmozódást mutat. Későbbi életkorban valamilyen bakteriális vagy virális fertőzések, betegségek kezelése immunszuppresszív szerekkel, továbbá alultápláltság másodlagos (szerzett) immunhiányos állapot kialakulásához vezethet (Lim és Elenitoba-Johnson, 2004; Erdei 2012).

Extracelluláris bakteriális fertőzések gyakori előfordulása a humorális immunválasz (B sejtek), míg az intracelluláris kórokozók vagy vírusok okozta visszatérő megbetegedések a T sejttes (celluláris) immunválasz hiányára vagy csökkent működésére utalhat (Cooper, 2003). Az elsődleges T sejt deficienciák 11%-t teszik ki a PID-nek (Edgar, 2008).

A veleszületett és a szerzett immunitás folyamatainak összehangolása összetett feladat, a sejtközvetített immunválasz folyamán az aktivált T limfociták kialakulásához és funkciójuk betöltéséhez szükséges az antigén prezentáló és egyéb sejtek jelenléte, majd visszahatnak ezen sejtekre és részt vesznek a szervezetbe jutott antigének eltávolításában (Swain, 2012).

A csontvelő eredetű limfoid progenitor sejtek vérkeringés útján a tímuszba jutnak, ahol nagymértékben naív, érett CD4⁺ és CD8⁺ T limfociták alakulnak ki. A tímusból kikerülve a naív CD4⁺ sejtek antigén prezentáló sejtekkel (APC; antigen presenting cells) kapcsolódnak össze, és először Th0 sejtek alakulnak ki, majd különböző effektor sejtekké differenciálódnak különböző citokinek jelenlétében (pl. Th1, Th2, Th17, Treg), amint az effektor sejtek funkciójukat ellátták, egy kevés memória sejt marad a szervezetben (Swain, 2012).

A vírusok vagy gomba bejutását követően, a mintázat felismerő receptorokhoz (PRR; pattern recognition receptor) bekötődnek a patogének, ezt követően aktiválódnak a veleszületett immunrendszer sejtjei, segítségükkel az adaptív immunrendszer sejtjei

végrehajtó sejtekké alakulnak és eliminálják a vírusokat és gombákat (Mogensen, 2009; Swain, 2012).

A Treg sejteknek szerepük van a gyulladásos folyamatok szabályozásában, Th1 sejteknek a makrofágok aktivációjában és az intracelluláris baktériumok eltávolításában, a Th2 sejteknek a humorális immunválasz szabályozásában és a parazita fertőzéssel szemben és a Th17 sejteknek a gomba ellenes immunválaszban, extracelluláris baktériumokkal szemben és a gyulladásos folyamatok közvetítésében játszanak szerepet (Swain, 2012).

Ha a szervezetünkben valamilyen hiba következtében a naív CD4+ sejtek differenciációja különböző effektor T sejtekké elmarad, akkor a szervezet ellenállása a vírusokkal és parazitákkal szemben lecsökken vagy teljesen elmarad, és különböző betegségek kialakulásához vezethet. Öröklötten vagy szerzetten már újszülött korban és gyermekkorban megjelenhet. Ha a szervezetünkben valamilyen génhiba következtében az IL-17-mediált immunitás károsodik, akkor candidiasis alakul ki (Puel, 2010; 2011; 2012).

A helper T sejtek az APC-khez kapcsolódnak a MHC II-n, „előkészítik” azokat, majd a MHC I-n a citotoxikus T sejteken is kötődnek, ahol „engedélyezik” az ölő funkciót, a megfelelő citokin jelenlétében (IL-2) kialakulnak a citotoxikus CD8+ T sejtek és a fertőzött területekre vándorolnak, ahol a vírusfertőzött sejteket elpusztítják. Ezt követően hosszú életű memória CD8+ sejtek alakulnak ki, amelyek antigén ingerre gyorsan reagálnak (Swain, 2012).

EBV hatására EBV specifikus természetes ölő sejtek (NK; natural killer), CD4+ és CD8+ T sejtek meggátolják fertőzött limfociták osztódását. X kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségben szenvedő betegek esetében EBV fertőzést követően a természetes ölő sejtek (NK) nem képesek eltávolítani a kontrollálatlan osztódásnak indult B sejteket. Az IgG izotípus váltás is zavart szenved, így nem alakul ki a humorális immunválasz az EBV-vel szemben és a citotoxikus CD8+T sejtek is elvesztik a funkciójukat (Seemayer, 1995; Maródi és Notarangelo, 2007).

A kutatómunkám során tágabb értelemben a T sejt defektusok közé tartozó két elsődleges immunhiány betegség, a *STAT1* funkciónyerő (GOF; gain of function) mutációnak köszönhetően kialakult krónikus mucocutan candidiasis (CMC; chronic mucocutaneous candidiasis) és az X-hez kötött lymphoproliferatív betegség (XLP; X-linked lymphoproliferative syndrome) háttérben álló genetikai eltérések és molekuláris pathomechanizmusok vizsgálatát tűztem ki célul.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Krónikus mucocutan candidiasis

A krónikus mucocutan candidiasis (CMC) heterogén genetikai háttérrel rendelkezik, viszont fenotípusában egymással összekapcsolódó kórképként jelenik meg, amelyre jellemző a bőr, a nyálkahártyák és a körmök perzisztáló és visszatérő gombás fertőzése különböző *Candida* fajokkal, főként *Candida albicans*-szal (Maródi, 1997; Puel, 2012; Engelhardt és Grimbacher, 2012; Soltész, 2013). A CMC-t az 1920-as években írták le először, de bővebb leírását csak a 60-as, 70-es években közölték (Thorpe és Handley, 1929; Canales, 1969; Wells, 1972). A szervezetben, a bőrön és a nyálkahártyákon a *Candida* fajok természetes körülmények között, a normál flóra tagjaként is előfordulnak, viszont azon betegeknél, akiknél átmeneti, öröklött vagy szerzett, kvantitatív vagy kvalitatív T sejt hiány fordul elő, visszatérő vagy krónikus mucocutan candidiasis figyelhető meg (Gaffen, 2011; Puel, 2012; Maródi, 2012). A betegségnek idáig három formáját írták le: primer immundeficienciákhoz társuló krónikus mucocutan candidiasis, szindrómás CMC és izolált CMC, amelyet krónikus mucocutan candidiasis betegségnek (CMCD) is neveznek (Puel, 2012; Lanternier, 2013). A CMCD előfordulási gyakorisága 1:100000 (Puel, 2012).

Kezdetben a CMC-t olyan betegeknél írták le, akiknél a T sejtek száma lecsökkent vagy funkciójuk károsodott, ilyen betegségek a súlyos kombinált immunhiány (SCID), előre haladott HIV fertőzés és a DiGeorge szindróma (Maródi, 1997). Egyéb kombinált immundeficienciák (CIDs) esetében a bakteriális és virális fertőzéseken kívül a candidiasis társtünetként jelenik meg, melynek hátterében CD-25 deficiencia, NF- κ B essential modulator (NEMO), NF- κ B inhibitor alpha (I κ B α) GOF mutációk, dedicator of cytokinesis (DOCK)8 deficiencia, T-cell receptor (TCR)- α deficiencia, tirozin kináz (TYK)2 deficiencia, calcium release-activated calcium modulator (CRACM) 1 deficiencia vagy macrophage stimulating 1 / serine/threonine-protein kinase 4 (MST1/STK4) deficiencia állhat (Puel, 2012; Lanternier, 2013).

A szindrómás CMC csoportjába tartozik az IL-12 citokin p40 alegység (IL-12p40), IL-12 receptor β 1 alegység (IL-12R β 1) deficiencia, az autoszomális domináns hyper-IgE szindróma (AD-HIES), autoimmun polyendocrin syndrome I. típusa (APS-I), dectin-1 deficiencia, vagy CARD9 deficiencia (Puel, 2012; Lanternier, 2013).

A CMC olykor az egyetlen fenotípusos megjelenés izolált krónikus mucocutan candidiasis (CMCD) esetében. Némely beteg esetében leírtak enyhe *Staphylococcus* infekciót, visszatérő herpes vírusfertőzéseket vagy autoimmunitást, de sokkal enyhébb formában, mint APS-I vagy AD-HIES betegeknél (Puel, 2012). Ezen csoportba tartozik a teljes interleukin-17RA deficiencia, részleges IL-17F deficiencia, recesszív *ACT1* vagy a *STAT1* GOF mutációk.

3.1.1 *Candida albicans*, mint a krónikus mucocutan candidiasis fő okozója

A *Candida* fajok olyan sarjadzó gombák, amelyek szervezettani besorolása szerint a *Deuteromycetes* osztályba tartoznak, képesek mind blasztoconídiumokat mint sarjadzó élesztőként, mind gombafonalakat, úgymint hifa vagy álhifa létrehozni (Romani, 2003,2011; Williams, 2013). A *Candida albicans* sejtfalát tekintve egy kitin és β 1,3-glükán tartalmú belső rétegből és glikoproteinekből felépülő külső rétegből áll, melyek ellen hatásos gombaellenes szereket fejlesztettek ki pl. nikkomycin Z (kitin szintetáz inhibitor) vagy a Calcofluor (β 1,6-glükán szintézist gátolja) (Diaz-Jimenez, 2012).

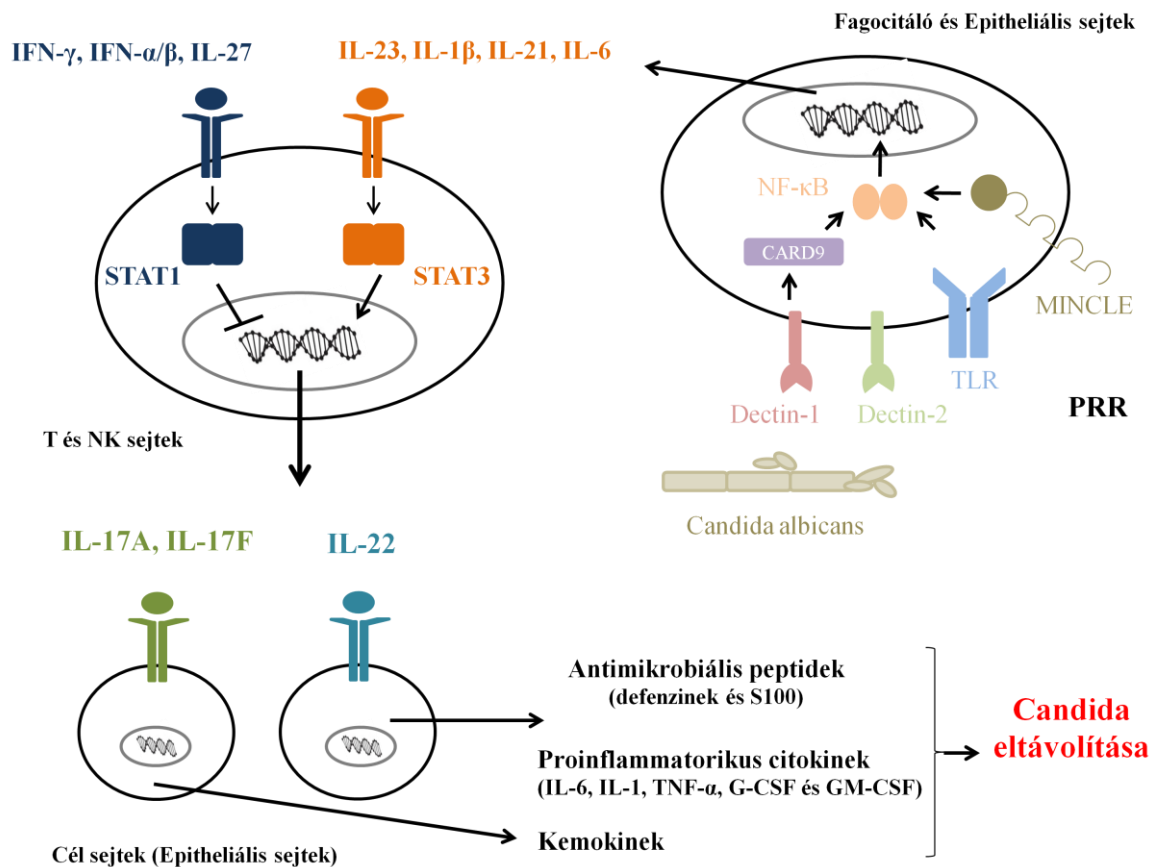
Közel 20 olyan *Candida* fajról tudunk, ami képes candidiasist kiváltani az emberi szervezetben (Romani, 2003; Williams, 2013).

A *Candida* után az *Aspergillus* és a *Cryptococcus* fajokat tekintjük oppurtunista gombafajoknak és a *Candida* fajokon belül is a *Candida albicans* tekinthető a legfőbb patogénnek az emberi szervezetben, mert sokkal agresszívebben hatolnak a *Candida albicans* hifái a sejtekbe, mint a nem-*albicans* fajoké (Zhu és Filler, 2010). Az epitheliális kötődés során a hyphal wall protein (Hwp) 1 (ami egy *Candida* adhesin) kötődik a transz-glutaminázokhoz és az agglutinin-like sequence (ALS) 3 kapcsolódik az epitheliális sejt kadhezinjéhez (Staab, 1999; Phan, 2007). Az epitheliális sejtek arginin-glicin-aszpartát sav (RGD) szekvenciáját ismeri fel a gombafonal adhezinjéi (Gale, 1998), ilyen pl. integrin-like protein (INT) 1, amely az emberi integrinek homológjai és RGD helyet tartalmaznak, amelyet a humán sejtek integrinjéi felismernek (Gale, 1998).

Normálisan az emberi flóra tagjaként megtalálható az emberi szervezet nyálkahártyáin (pl. emésztőrendszer), de ha a szervezet antifungális védekezése károsodott, a gomba túlzottan elszaporodik, akkor visszatérő vagy tartósan fennálló gombás megbetegedés alakul ki (Naglik, 2011; Kumamoto, 2011).

Candida fajok képesek versenyezni más kolonizáló ágensekkel, mint pl. baktériumok a gastrointestinalis traktusban, sőt hosszabban képes túlélni a szervezet nyálkahártyáinak immun és nem-immunvédekezését, CMC-t és invazív candidiasist kialakítva (Soltész, 2015). Invazív candidiasis kialakulhat nemcsak *C. albicans*, hanem *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. parapsilosis* gombafajok hatására (Zhu és Filler, 2010).

Hatásos gombaellenes immunitás kialakulásához szükséges, hogy a *Candida* gomba fajok kapcsolódjanak az immunsejtekhez (a receptorok elhelyezkedhetnek granulocitákon, monocitákon, makrofágokon) és dendritikus sejteken (mint nem immunsejteken) a mintázat felismerő receptorokon (PRR, pattern recognition receptor) keresztül, úgymint TLR2, TLR4, MR, dectin-1, dectin-2 és MINCLE ezek kapcsolódnak a patogén-asszociált molekuláris mintázatokhoz pl. gomba mannoproteinek, kitin (N-acetil-glükózamin) és $\beta(1,3)$ -glükánok. (Maródi, 1991; Maródi, 1993; van der Veerdonk, 2009; Netea és Maródi, 2010; Bourgeois, 2010; Dambuza, 2014). A mannán, de nem a β -glükán vagy kitin, indukálhatja a mononukleáris sejtek IL-17+ T sejtekké történő differenciációját, ami mutatja a mannóz receptor függő szabályozását az IL-17+ T sejtek kialakulásában (van der Veerdonk, 2009). A ligand bekötődése után IL-6, IL-23 és TNF- α fognak termelődni, ami szükséges, hogy a CD4+ T sejtek CD4+IL-17+ T helper sejtekké differenciálódjanak, amelyeknek a gomba ellenes védekezésben nagy szerepük van (Chen, 2007; Korn, 2009). (1. ábra)



1. Ábra Az IL-17- termelő sejtek differenciálódásának és funkciójának sematikus ábrázolása

A fagocitáló és epitheliális sejtek a mintázat felismerő receptorok (PRR) segítségével felismerik a *Candida albicans* gombát és proinflammatorikus citokinek keletkezését indukálja, mint IL-1 β , IL-6, IL-21 és IL-23, ezen citokinek a STAT3 útvonalon keresztül a T sejtek differenciálódását segíti elő IL-17-termelő T sejtekké. Ugyanakkor a STAT1 útvonalon keresztül gátolódik a Th17 differenciáció.

Az IL-17A, -F, és IL-22 citokinek hatására további proinflammatorikus citokinek és antimikrobiális peptidek keletkeznek, amelyek eltávolítják a *Candida* gombát a gazdaszervezetből.

Az ábrát Puel, 2012; Hernández-Santos és Gaffen, 2012 és Soltész, 2015 tudományos közlemények ábrái alapján módosítottam.

3.1.2 A *Candida* elleni védekezésben szerepet játszó sejtek és az általuk termelt citokinek

3.1.2.1 CD4+IL-17+ T helper („Th17”) sejtek

A *Candida* fertőzésekkel szembeni érzékenység hátterében a lecsökkent IL-17-mediált immunitás állhat (Maródi, 2012; Puel, 2012; Cypowyj, 2012). A CD4+ T helper (Th) sejtek családjába tartoznak a CD4+IL-17+ T sejtek, mit korábban IL-17-termelő T sejtek vagy Th17 sejtek néven ismertek. Ezen sejtek képesek különböző citokinek termelésére: IL-17 A–F, és IL-22 (Stockinger és Veldhoen, 2007; Chen, 2007; Korn, 2009). Felismerésük 2005-höz köthető, ez a felismerés megváltoztatta a szervezet antifungális védekezésről alkotott hipotéziseket, ugyanis addig úgy hitték, hogy *Candida* szembeni immunvédekezésben a Th1-mediált folyamatoknak van szerepük, 2006-ban sikerült a differenciálódásuk hátterében álló molekuláris mechanizmusokat is felderíteni (Harrington, 2005; Veldhoven, 2006; Gaffen, 2011).

A naív CD4+ T sejtek IL-17+ T sejtekké differenciálódásához és éréséhez különböző citokinekre van szükség, úgymint IL-6, IL-1 β , IL-21, IL-23 és (valószínűleg) TGF- β , transzkripciós faktorokra, mint STAT3, interferon regulatory factor 4 (IRF4) és retinoic acid-related orphan receptor γ t (ROR γ t) (Stockinger és Veldhoen, 2007; Chen, 2007; McGeachy és Cua, 2008; Hirahara, 2010; Korn, 2009; Maródi, 2013; Puel, 2012). (1. ábra)

Nemcsak a CD4+IL-17+T sejtek termelnek IL-17A-t, hanem a limfoid sejtek és a $\gamma\delta$ T sejtek is (Ness-Schwickerath, 2010), de CD8+ T sejtek, NK sejtek, B sejtek, neutrofilek, epitheliális sejtek, érrendszeri endotheliális sejtek, fibroblasztok, myelomonocitikus sejtek és csontvelői sztróma sejtek is képesek IL-17A-t termelni (Kawaguchi, 2004; Akdis és Akdis, 2009). A T és B sejtek differenciációjában és funkciójában szerepe van az IL-17 jelátviteli útvonalnak. Az IL-17 citokinek közreműködnek a nyálkahártya barrierek sértetlenségének megőrzésében, hozzájárulnak az antimikrobiális peptidek termeléséhez és első védelmi vonalként gyorsan érzékelik a fertőzéseket, majd gyorsan a neutrofilektoborzását és képződését segítik elő, ezáltal hozzájárulnak a nyálkahártyák homeosztázisához (Abusleme és Moutsopoulos, 2016).

Az IL-17R család öt különböző receptort foglal magába (IL-17RA – IL-17RE). Th17 sejtek által termelt fő citokinek, IL-17A-IL-17A homodimer és IL-17A-IL-17F heterodimer formájában (ezen kívül IL-21 és IL-22 is szekretálódik) az IL-17RA és IL-17RC heterodimer receptorokhoz (ami különböző szövetekben található meg pl. lép, vese, tüdő, máj) kötődnek

be, indukálják a proinflammatorikus citokinek (IL-6, IL-1, TNF- α , G-CSF és GM-CSF), antimikrobiális peptidek (defenzinek és S100), kemokinek (CXCL1, CXCL5, CCL2, CCL7 és IL-8) és mátrix metalloproteinázok (MMP1, MMP3 és MMP13) szekrécióját, ezáltal megfékezik a patogének elszaporodását a barrierék területén. Termelődésüket különböző sejt típusokban az endotheliumban, az epitheliumban és fibroblasztokban figyelték meg (Kawaguchi, 2004; Abusleme és Moutsopoulos, 2016). (1. ábra)

Ezen molekulák szükségesek a neutrofil granulociták toborzásához és aktiválásához, vagyis jelentős szerepük van a gomba elleni védekezésben a nyálkahártyákon (Maródi, 2013).

3.1.2.2 CD4+IL-22+ T helper („Th22”) sejtek

A fehérvérsejtek egy új csoportját képezi a CD4+ IL-22+ T helper sejtek (ami különbözik az CD4+ IL-17+ T helper és Th1 sejtektől), ami korábbi elnevezése szerint Th22 vagy IL-22-termelő sejtek. Egérmodellen bizonyították, hogy az általuk termelt IL-22-nek fontos szerepe van a bakteriális fertőzésekkel szemben, később vizsgálták, hogy a gombaelleni immunitásban is szerepük van. Differenciálódásukhoz különböző citokinekre van szükség (Liu, 2009).

A CD4+ IL-22 Th sejtek főként IL-22 citokint termelnek, de képesek TNF- α és IL-13-t is szekretálni, ezen kívül IFN- γ , IL-17, IL-2 és TNF- α -t is képesek szekretálni. Az IL-10 citokin receptor családba tartozik az IL-22 citokin, amely az IL-22R1/IL-10R2 receptor komplexhez kötődik (IL-22R1 főként az epitheliális sejtek és néhány fibroblaszt felszínén expresszálódik pl. bőrben, emésztő- és légző rendszerben, addig az IL-10R2 különböző immunsejtek felszínén expresszálódik). Az IL-22 hatására különböző antimikrobiális peptidek, mint pl. a human β defensin 2 és S100 fehérje szekretálódnak (Liu, 2009; Eyerich, 2011; Zelante, 2011). A Th22 sejtek által termelt IL-22 és TNF- α , a MAP kinázok és az AP-1 transzkripciós faktor család tagjai együttesen aktiválják a keratinocitákat, ez a jelátviteli kaszkád szükséges a *C. albicans* elleni hatásos epidermális barrier kialakításához (Eyerich, 2011).

A JAK/STAT jelátviteli útvonalon keresztül a STAT3 aktiválódik (tirozin foszforilálódik) és közvetlenül hozzájárul az S100A8 és S100A9 peptidek termeléséhez a bélrendszer epitheliális sejtjeiben, tehát az IL-22-nek fontos szerepe van a nyálkahártyák gomba és gyulladással járó betegségek elleni védekezésében. Továbbá az IL-22 szükséges a bőr a bélrendszer homeosztázisának szabályozásához és a nyálkahártyák sebgyógyulásához is

hozzájárul. IL-22 hatására a keratinociták vagy a nyelvszövet sejtjei aktiválódnak, 1-es típusú kollagén és MMP1 metalloproteináz termelődéséhez vezet, ami a STAT3 útvonalon keresztül hozzájárul a sebhely nélküli sebgyógyuláshoz (Zelante, 2011; Yu, 2016).

Th22, Th1, Th17, természetes ölő sejt 22 (natural killer 22, NK22), természetes ölő T sejt (natural killer T, NKT), természetes limfoid sejtek (innate lymphoid cells, ILCs) és $\gamma\delta$ T sejtek termelhetnek IL-22-t citokint (Lu, 2016), de Th1 és Th17 sejtek jelenléte nélkül is termelődhet IL-22 (De Luca, 2010; Zelante, 2011).

A Th22 sejteknek és az általuk termelt IL-22-nek szerepük van a bőr gyulladásos betegségeiben, pl. dermatitisz, atópiás ekzema és psoriasis (Koga, 2008), továbbá autoimmun kórképekben pl. reumatoid arthritis, szisztémás lupusz erythematosus, I-es és II-es típusú diabetes, thrombocytopenia (Azizi, 2015).

3.1.3 Krónikus mucocutan candidiasis betegsége tünetei és differenciáldiagnosztikája

1929-ben már leírták a CMC társulását glanduláris hypofunkciókkal (Thorpe és Handley, 1929). Canales és munkatársai 1969-ben elsőként írták le a krónikus mucocutan candidiasist egy 11 éves fiúbetegnél, a nővére és kislánya esetében (Canales, 1969). Wells és munkatársai 1972-ben megfigyelték a családi halmozódást, Sams és munkatársai (1979) és Jorizzo és munkatársai (1980) leírták, hogy a betegségre mind az autoszómális domináns illetve recesszív öröklésment jellemző. Jellemzően a CMC elsődleges tünetként már születés után nem sokkal vagy kora gyermekkorban megjelenik, de megjelenése és tünetei még a családokon belül is eltérőek lehetnek (Liu, 2011) háttérben a lecsökkent IL-17 immunitás állhat (Puel, 2012).

A *STAT1* GOF mutációk különböző fenotípusokat okozhatnak, különböző gombás, virális és bakteriális fertőzéseket diagnosztizáltak a betegeknél, akik *STAT1* GOF mutációt hordoznak (Toubiana, 2016). Toubiana és munkatársai 274 egyént vizsgáltak egy összehasonlító közleményben. Az esetek 98%-ában (268 beteg) találtak CMC-t, tehát a CMC penetrációja igen magas, minden beteg bizonyítottan funkciónyerő *STAT1* mutációt hordoznak (Toubiana, 2016).

A krónikus mucocutan candidiasis egyik első és leggyakoribb tünete a szájpenész (soor) és oropharyngealis candidiasis (Puel, 2012). 2016-ban megjelent közleményben a *STAT1* GOF betegek 93%-ában a szájnyálkahártyát érintette a gombás megbetegedés

(szájpenész, ajakgyulladás és/vagy nyelvgyulladás), 57%-ban a bőrt érintette (gennyes hólyagok, bőr felszínes megbetegedései: gyűrűs plakkok, intertrigo), 56%-ban a nyelőcsőt, genitális nyálkahártyákat és vagy körmöket fertőzte meg (perionyxis, onyxis). Aphtás stomatitis megjelent az esetek 46%-ában, előfordult a fejtető gombás megbetegedése 20%-ban a betegek körében. (Toubiana, 2016)

A gombás megbetegedéseket a leggyakrabban *Candida albicans* okozta (95%). Előfordult még *Microsporon spp.* és *Trichophyton spp.* által okozott gombás fertőzés. Invazív gombás fertőzés és invazív candidiasis alacsony százalékban, de megjelent *Pneumocystis jirovecii*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus spp.* és *Histoplasma spp.* fajok által okozott tüdőgyulladást diagnosztizáltak (Toubiana, 2016).

Invazív mycosis is előfordul *STAT1* GOF betegeknél, Sampaio és munkatársai két beteg (E267V, E353K) esetéről számoltak be, akik disszeminált coccidioidomycosisban szenvedtek, amit *Coccidioides* fajok okoztak és három másik esetben, akiknek szintén *STAT1* GOF mutációjuk van (T385M, R274G, F172L), disszeminált histoplasmosist írtak le, amit a *Histoplasma capsulatum* okozott (Sampaio, 2013).

Bakteriális megbetegedések is gyakran fordulnak elő. Az esetek 47%-ban figyeltek meg alsó légúti megbetegedéseket, úgymint bronchitis. Ugyanezen munkacsoport 44%-ban talált olyan bakteriális fertőzéseket, amelyek a felső légutakat (pl. sinusitis) és 28%-ban a bőrt érintették (pl. folliculitis, cellulitis, tályogok és paronychia) (Toubiana, 2016).

STAT1 funkció-vesztő mutációknál (loss-of-function; LOF) írták le elsődlegesen a virális és mycobakteriális fertőzésekre való hajlamot, de kis százalékban (6%) mycobakteriális fertőzéseket is megfigyeltek olyan betegekben, akiknél *STAT1* GOF mutációt azonosítottak a tüdő (2%), a bőr (2%) vagy az egész szervezet érintettségével (Toubiana, 2016).

Gyakran súlyos elsődleges HSV (herpes vírus encephalitis) fertőzés jelentkezik olyan betegeknél, akik autoszómális recesszív *STAT1* mutációkat hordoznak (Boisson-Dupuis, 2012). Két magyarországi betegnél diagnosztizáltuk a herpes vírus kiújulását, akiknél a *STAT1* kettős tekerics doménjén R274W mutációt azonosítottunk, amelyről bizonyítottuk, hogy funkcionyerő *STAT1* mutáció (Tóth, 2012; Soltész, 2013).

Visszatérő mucocután virális fertőzést is találtak (rash, stomatitis, vulvitis vagy keratitis) 88 *STAT1* GOF beteg (32%) esetében, amit főként herpes simplex vírus (HSV) és varicella zoster vírus (VZV) okozott. Súlyos szisztémás virális fertőzéseket is megfigyeltek 23 betegnél (8%), amit cytomegalovírus (CMV) és Epstein-Barr vírus (EBV) okozott (Toubiana, 2016).

Kilic és munkatársai funkcionyerő R274W mutációt azonosítottak egy férfi betegnél, akinél orf vírus fertőzést írtak le, ami a *Poxviridae* család, *Parapoxvirus* genus egyik DNS vírusa (Kilic, 2015).

Majdnem a *STAT1* GOF betegek felénél (43%) azonosítottak klinikailag igazolt autoimmunitást és vagy autoimmun antitesteket, főként pajzsmirigy betegséget diagnosztizáltak és a vizsgált betegek több mint fele nő volt. Ezen kívül diagnosztizáltak vitiligot, alopeciát, psoriasist, SLE-t, autoimmun hepatitiszt, autoimmun citopéniákat. (Toubiana, 2016)

Cerebrális aneurizmát 47 *STAT1* GOF beteget vizsgálva 2 beteg esetében diagnosztizáltak 2011-ben (Liu, 2011). A 2016-os összefoglaló közleményben leírták a *STAT1* GOF betegek között cerebrális és extracerebrális aneurizmát, rosszindulatú tumorokat (következtetésként levonták, hogy a *STAT1* GOF betegeknek nagyobb esélyük van a rák kialakulására), laphámrákot (squamous cell carcinoma), emellett találtak ekzémát, asthmát és egyéb allergiás tüneteket (Toubiana, 2016). Egy *STAT1* GOF (E235G) betegnél már korábban is diagnosztizáltak laphámrákot (Chang, 2016).

Öt gyermek esetén találtak poliendocrinopátiás, enteropátiás és dermatitises tüneteket, négy esetben előfordult gombás fertőzés, a tünetek alapján az X kromoszómához kapcsolt immundiszreguláció – poliendocrinopátia – enteropátia (IPEX; immune dysregulation – polyendocrinopathy – enteropathy – X-linked) szindrómára következtettek, de a *FOXP3* génen nem találtak eltérést és a Treg sejtek szintje és funkciója is normális volt. A *STAT1* génen mind az öt esetben funkcionyerő mutációkat igazoltak (R201I, L385W, T385M, V266I, T385M) és alacsony arányban találtak CD4+ IL-17-termelő T sejteket. Tehát ez volt az első olyan tudományos közlemény, ahol a *STAT1* GOF mutációk kapcsolatban állnak az IPEX-szerű tünetek megjelenésével (Uzel, 2013).

Öt beteget vizsgáltak súlyos kombinált immunhiány betegséggel (SCID; severe combined immunodeficiency), akiknél *STAT1* GOF mutációkat azonosítottak, három esetben T385M és egy-egy esetben I294T, C324R mutációkat találtak. Az anamnézisében többször szerepelt a mikrobiális, virális és gombás fertőzések, amik a tüdőt érintették. Különböző virális fertőzések (CMV, EBV vagy Jamestown Canyon vírus) következményei miatt három beteg exitált. Minden beteg esetében az életkorral egyre csökkenő T és NK sejtszámot tapasztaltak és megnövekedett hajlamot a különböző fertőzések kialakulására, de egyik beteg sem mutatta a CMC-re jellemző tipikus tüneteket (egy esetben szájpenész és egy másik esetben az ajkak candidiasisa fordult elő) (Sharfe, 2014).

STAT1 GOF-fal társultan írtak le fogproblémákat (mind az elsődleges és maradandó fogak gyors elvesztését, fogszuvasodást és a fogak erózióját) egy beteg esetében, aki a T385M GOF mutációt hordozza (Frans, 2014).

Progresszív multifokális leukoencephalopathia (PML; progressive multifocal leukoencephalopathy) –ban szenvedő új *STAT1* GOF mutációt hordozó (L400Q) beteget diagnosztizáltak (Zerbe, 2016).

Ebben az évben (2016) egy másik összefoglaló közlemény is megjelent, amelyben Depner és munkatársai ötvenhét CMC-s beteg adatait foglalták össze, ahol 61 százalék a betegeknek funkciónyerő *STAT1* mutációt hordozott (35 beteg), de ebből csak 26 beteg klinikai tüneteit írták le részletesen. Tizenkilenc betegnél fordult elő a szájnyálkahártya candidiasis (73%), elég magas százalékban fordult elő aphtás stomatitis (69%), nyelőcső candidiasis (65%), a körmök gombás megbetegedése (64%), a szeméremtest és a hüvely érintettsége (67%). Bakteriális légúti infekciók (bronchitis, pneumonia, sinusitis) is jellemzőek voltak a betegek körében. Virális infekciók közül a *Herpes simplex* és a *Humán papilloma vírus* okozta megbetegedések voltak jelentősebbek. A betegek 44%-nál autoimmun hypothyreosist diagnosztizáltak (Depner, 2016).

A tünetek fenti összefoglalásából következtetésként levonhatjuk, hogy a *STAT1* GOF mutációkkal rendelkező betegek fenotípusa eltérő és nincs összefüggés a genotípus és fenotípus között.

3.1.4 A krónikus mucocutan candidiasis terápiája

A betegek klinikai fenotípusai nagyon eltérőek, ezért nem lehet egységes kezelési tervet készíteni a betegek számára. Egy nemzetközi kutatócsoport 274 beteget vizsgált, akik különböző *STAT1* GOF mutációkat hordoznak. A betegek 74%-ánál hosszantartó gombaellenes terápiát alkalmaztak, első vonalbeli gyógyszerként fluconazolt, majd itraconazolt vagy posaconazolt illetve másodlagos vagy harmadlagos szerként voriconazolt, echinocandinokat (IV; intravénásan), terbinafint (szájon át) vagy amfotericin B-t (IV) adtak a betegeknek. Megelőzőként antibakteriális (Co-trimoxazol vagy macrolidok) és vagy anti-virális szereket alkalmaztak. Polivalens intravénás immunglobulin pótlást kapott a betegek 14%-a (37 beteg) (Toubiana, 2016).

Már 1970-ben Kirkpatrick és munkatársai donor limfocitákat adtak (transzfuzionáltak) CMC betegeknek, amely következtében a gombás megbetegedés tüneteinek visszahúzódását tapasztalták (Kirkpatrick, 1970).

A csontvelő transzplantáció (BMT; bone marrow transplantation) egyik lehetséges módja a kezelési stratégiának a CMC-s betegeknél, főként azoknál a betegeknél, akik rezisztensek a gombaellenes terápiára. Két sikeres allogén csontvelő transzplantációról számoltak be olyan betegeknél (HLA-azonos testvérek voltak a donorok), akik krónikus mucocutan candidiasisban szenvedtek (Deeg, 1986; Hoh, 1996). Viszont 2013-ban megjelent egy közlemény, melyben egy *de novo* *STAT1* GOF (N397D) mutációt hordozó egy éves kislányt (a donor a 2 éves bátyja volt) kezeltek hematopoetikus őssejt transzplantációval (HSCT; hematopoietic stem cell transplantation). A kislány 10 hónappal a HSCT-t követően pneumonia következtében exitált. Korábban transzplantáltak egy 34 éves nőbeteget (AD CMC beteg), aki egy hónappal a kezelést követően agyi aneurizma következtében elhunyt (Aldave 2013, Liu és munkatársai nem közölt adat).

1995-ben beszámoltak egy CMC-s beteg esetéről, aki granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktort kapott (GM-CSF), aminek hatására a beteg állapota javult (Shahar, 1995), később a beteg G-CSF-t kapott, ami szintén javulást eredményezett (Wildbaum, 2013). A GM-CSF-ről feltételezik, hogy visszaállítja a normál „Th17” válaszokat. Az irodalomban ellentmondást is találhatunk, mert egy 2016-os közleményben a GM-CSF kezelést hatástalannak írják le (Toubiana, 2016).

A ruxolitinib hatóanyagú gyógyszert, mint a JAK1/JAK2 kináz gátló, a JAK1/JAK2 jelátviteli útvonalon gátolja az IFN- γ és IL-27 negatív hatását a Th17 sejtek kialakulására. A *STAT1* GOF mutációt hordozó betegek állapota javult a kezelés hatására (Higgins, 2015; Mössner, 2016).

3.1.5 A krónikus mucocutan candidiasis és STAT1 kapcsolata

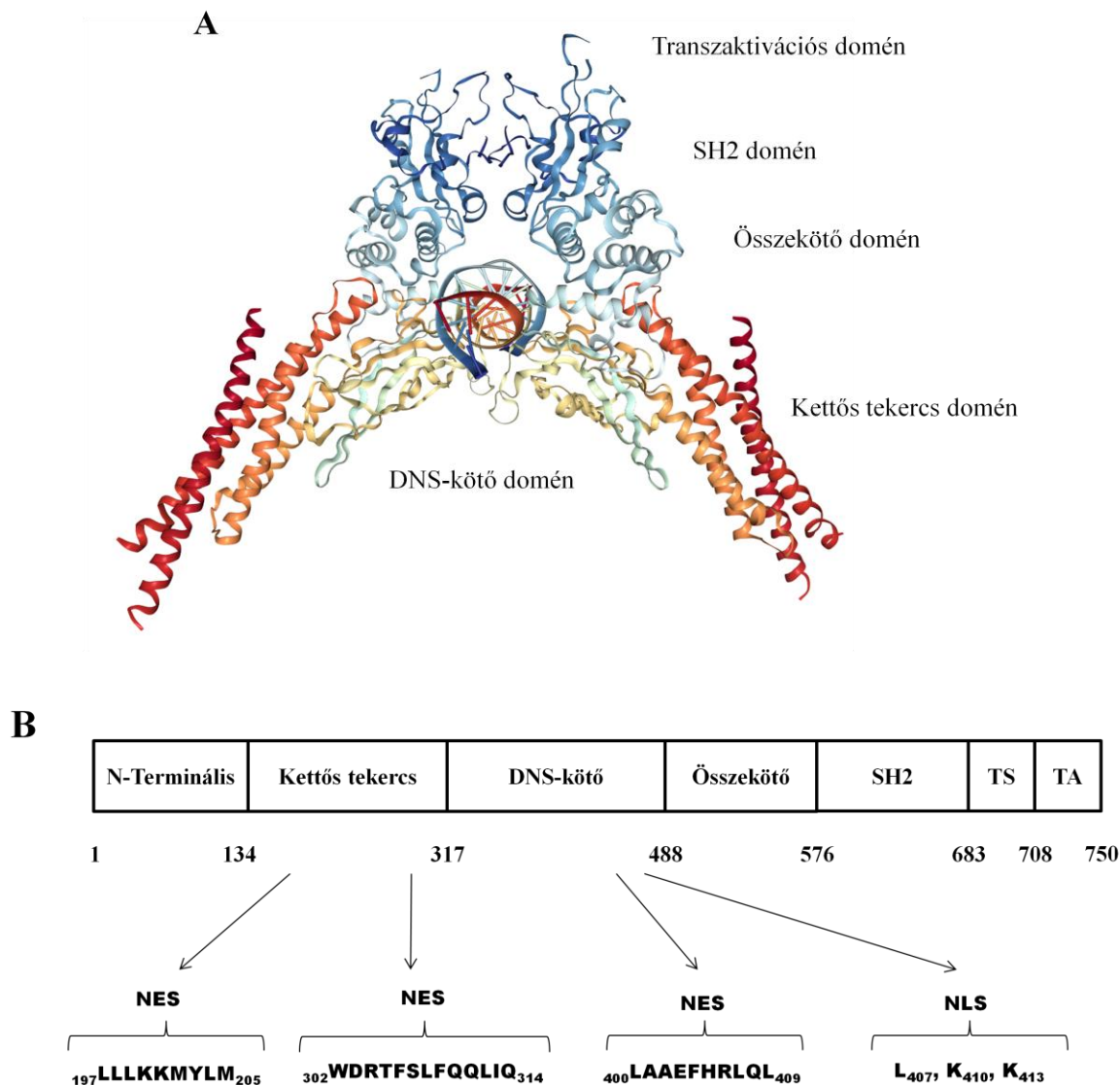
3.1.5.1 STAT1 - Jelátvivő és transzkripciót aktiváló 1 molekula

A signal transducer and activator of transcription (STAT; jelközvetítő és transzkripciót aktiváló) családba 7 transzkripciós faktor tartozik (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6) (Leonard és O'Shea, 1998), amelyek számos jelátviteli folyamatban vesznek részt (Murray, 2007). A jelen munkámban a STAT1 jelátvivő molekula fontosságát és szerepét emelném ki.

A STAT1 molekula jelentőségének felismerése az 1992-es évekhez köthető. Schindler és munkatársai ebben az évben bizonyították, hogy IFN-ok hatására a STAT fehérjék tirozin molekulái foszforilálódnak (Fu, 1992; Schindler, 1992).

A STAT1 transzkripciós faktor 750 aminosavból épül fel és 91 kDa nagyságú fehérje, melyet a 2. kromoszóma hosszú karján (2q32) elhelyezkedő *STAT1* gén kódolja. Felépítésében hét domén vesz részt: N-terminális domén, kettős tekercs domén (CCD), DNS-kötő domén (DBD), kapcsoló domén, Src-homológ 2 (SH2) domén, farki („tail”) szegmens domén (TS) és C-terminális transzaktivációs domén (TAD) (Levy és Darnell, 2002). A DNS-kötő domén felelős a foszforilált STAT nukleáris importjában illetve a STAT1 exportjában és a DNS-hez való kötődésben, a kettős tekercs domén a dimerizációért és a nukleáris defoszforilációért felelős (Boisson-Dupuis, 2012). (2. ábra)

A STAT1 molekulának két izoformája ismert: STAT1- α (p91) és STAT1- β (p84). A STAT1- α fehérje 750 aminosavból áll, míg a STAT1- β izoformánál a 713-750 aminosavak hiányoznak, vagyis a karboxil vég és a Ser727 foszforilációs hely az alternatív splicing-nak köszönhetően lehasítódik (<http://www.uniprot.org/uniprot/P42224>). Azáltal, hogy a STAT molekulák különböző izoformái versenyeznek a DNS kötőhelyért, a kisebb hosszúságú izoformái gátolhatják a célgének transzkripciós aktivitását és megnövekedett expressziójuknak köszönhetően a transzkripció negatív szabályozói lehetnek azáltal, hogy DNS-hez kötődnek, de funkciójukat nem töltik be vagy a vad típusú STAT fehérjéhez kötődnek. IFN- α és IFN- β (I-es típusú interferonok) hatására a STAT1- β , a STAT2 és az IRF9 kialakítják az interferon stimulált gén faktor 3 (ISGF3; interferon stimulated gene factor 3) komplexet. (Darnell, 1994; Zhang, 1999; Pilz, 2003) (2. ábra)



2. Ábra STAT1 felépítése és a domének szerkezete

(A) 3D modell bemutatja a homodimer STAT1 tirozin foszforilált szerkezetét a domének elhelyezkedésével, (B) STAT1 α -isomer domén szerkezete, jelölve a nukleáris export szignál (NES) és a nukleáris lokalizációs szignál (NLS) szekvenciájával

(Felhasznált irodalom: Begitt, 2000; Mowen és David, 2000; McBride, 2000; Liu, 2011; <http://www.rcsb.org/pdb/ngl/>)

3.1.5.2 STAT1 domének szerkezete és funkciójuk

3.1.5.2.1 N-terminális domén

Az N-terminális domén az 1-134 aminosavak között helyezkedik el, erősen konzervált domén a STAT család tagjai között (Shuai, 1996). Jelentős szerepe van a tirozin defoszforiláció szabályozásában (Shuai, 1996), nukleáris transzlokáció és STAT deaktiváció

szabályozásában (Strehlow és Schindler, 1998) és részt vesz a citokin receptor doménnel való kommunikációban (Li, 1997). A fehérje arginin metil-transzferáz (PRMT1; protein arginine methyl-transferase) metilálja (poszt-transzlációs módosítás) a STAT1 31. aminosav pozíciójában lévő arginint, a metiláció következtében gátlódik a PIAS1 (protein inhibitor of activated STATs) fehérjéhez való kötődés, ezáltal megnövekszik a STAT1 transzkripció aktivitása és DNS-hez való kötődése (Mowen, 2001). (2. ábra)

3.1.5.2.2 Kettős tekercs domén (CCD)

A kettős tekercs domén (CCD) az 135-317 aminosavak között helyezkedik el. Négy α -hélixből (két hosszabb: α_1 , α_2 és két rövidebb: α_3 , α_4) felépülő kettős csavart szerkezet egy hidrofil felületi részt képez a különböző fehérjékkel való interakcióhoz (Chen, 1998). A STAT1 kettős tekercs doménje képes kapcsolatba lépni az interferon reguláló faktor 9 (IRF9; Interferon Regulatory Factor 9) molekulával, ami az interferon stimulált gén faktor 3 complex egyik alkotója (Horvath, 1996), továbbá a N-myc interactor (Nmi) fehérjével is kapcsolatba lép, IFN- γ és IL-12 citokinek hatására így fokozódni fog a STAT-mediált transzkripció (Zhu, 1999). A STAT1 fehérje CC-doménjén két különböző nukleáris export szignált azonosítottak: 302–314 (Begitt, 2000) és a 197-205 aminosavak között (Mowen és David, 2000), amelyeknek fontos szerepük van a STAT1 fehérje sejtmagból-citoplazmába történő szállításában. (2. ábra)

3.1.5.2.3 DNS-kötő domén (DBD)

A DNS-kötő domén az 318-488 aminosavak között helyezkedik el. A DNS-kötő doménen azonosítottak egy nukleáris export szignált: $_{400}\text{LAAEFHRLQL}_{409}$, és nukleáris lokalizációs szignált (NLS): L407, K410, és K413 (McBride, 2000; Reich és Liu, 2006). A DNS-kötő domén számos β -redőt tartalmaz a 320 és 490 aminosavak között, felépítésében hasonlóságot mutat a nukleáris faktor $\kappa\beta$ (NK- $\kappa\beta$ - nuclear factor $\kappa\beta$) és p53 DNS-kötő doménjéhez (Yang, 2002). (2. ábra)

3.1.5.2.4 Összekötő (linker) domén, SH2 domén és farki (tail) szegmens (TS):

Az összekötő domén a DNS-kötő domént és a SH2 domént kapcsolja össze, konzervált szakaszokat tartalmaz. Erősen konzervált aminosavakból épül fel, a 490 és 580 aminosavak közötti részek a funkcióját egyelőre nem ismerjük, viszont Yang és munkatársai azonosítottak mutációkat a linker doménon, ami hatással van a DNS-kötés stabilitására, így egy gyors „off-rate” állapotot okoz és IFN- γ stimulus hatására sem aktiválódnak a megfelelő gének (Yang, 2002). A farki (tail) szegmensen található a pY701 hely, amely nagyon fontos a STAT1 fehérjék aktiválásához (tirozin foszforiláció) (Greenlund, 1994). (2. ábra)

3.1.5.2.5 Transzkripciót aktiváló domén (TAD)

A karboxil-terminális domén szükséges a transzkripció aktivitáshoz. Az egyedi karboxil régió meghatározhatja a pontos funkcióját a transzkripciós komplexek csoportján belül (Ihle, 1996). A szerin 727 pozícióban bekövetkező foszforiláció szükséges a STAT1 teljes transzkripciós aktivitásához (Wen, 1995), a szerin foszforiláció független a tirozin foszforilációtól. Különböző bakteriális fehérjék képesek kiváltani a STAT1 szerin foszforilációját makrofágokban (Decker és Kovarik, 2000).

STAT1 transzaktivációs doménjének jelentős szerepe van a gén expresszió elindításában, ugyanis különböző fehérjékkel (pl. CBP/p300) képes kapcsolatba lépni, amelyeknek szerepük van a gén transzkripcióban, ugyanis a STAT1 transzkripciós doménjének konzervált LPMSPE elemi kapcsolata lépnek a CBP/p300 koaktivációs molekula cisztein/hisztidin régióival (TAZ1 és TAZ2) (Wojciak, 2009). (2. ábra)

3.1.5.3 A STAT1 transzkripciós molekula jelátvittele és funkciója

Az eukarióta sejtek magját maghártya határolja el a citoplazmától, így nincs a két kompartment között szabad anyagáramlás, tehát a molekulatranszport a sejtmag és a citoplazma között a maghártya kettős membrán rétegébe ágyazott magpórus komplexeken (NPC; nuclear pore complex) keresztül valósul meg. A 40-60 kDa-nál kisebb fehérjék

egyszerű szabad diffúzióval, az ennél nagyobb molekulák (ide tartozik a STAT1 fehérje is) szállítófehérjék („carrier”) részvételével, facilitált diffúzióval jutnak át a magpóruson. A facilitált diffúzió specifikus transzport receptorokhoz kötötten történik, amik felismerik a szállítandó fehérjéket, habár az átjutás nem energiaigényes, de koncentrációgradiens ellenében megy végbe, ezért energiaigényes aktív transzport, aminek hajtóereje a RanGTPáz ciklus (Görlich, 1999; Wenté és Rout, 2010; Reich, 2013).

A STAT transzkripciós faktor család tagjai tirozin foszforilációt követően aktiválódnak, ez történhet receptor asszociált Janus kinázokon, növekedési faktor receptor tirozin kinázokon és nem-receptor tirozin kinázokon keresztül (Reich és Liu, 2006) interferonok (I-es típusú: α , β és II-es típusú: γ) és thrombocita-eredetű növekedési faktorok (PDGF; platelet-derived growth factor) hatására (Vignais, 1996; Reich, 2007). (3. ábra)

I-es típusú interferonok (IFN- α/β) bekötődnek az IFNARI és IFNARII receptoraikhoz, amelyekhez kapcsolatosan a tirozin-kináz 2 (TYK2) és Janus kináz 1 (JAK1) fehérjék találhatóak, e molekulák foszforilálják a tirozint a receptorokon és a STAT1 és STAT2 fehérjéken. JAK molekulák két doménből épülnek fel: karboxil-terminális katalitikus doménből és pseudo-kináz vagy kináz-szerű doménből, ami inaktív. IFN- α/β hatására a foszfortirozin oldallánc és SH2 doméneken keresztül a STAT1 heterodimerizálódhat a STAT2-vel, ezt követően egy nem transzkripciós faktor, az IFN-reguláló faktor (IRF9; IFN regulatory factor 9) kapcsolódik heterodimerhez a STAT2 kettős tekerics doménjén keresztül és létrejön az IFN-stimulált gén faktor 3 (ISGF3; IFN stimulated gene factor 3). Az IRF9 fehérje N-terminális részén található nukleáris lokalizációs jelet az importin- $\alpha 5$:importin- $\beta 1$ transzporter molekulák ismernek fel és a sejtmagba szállítják a fehérje komplexet (Banninger és Reich, 2004). Ez a három fehérjét tartalmazó komplex (ISGF3) specifikusan képes kötődni cél DNS 15 bázispárnyi szakaszához, az IFN stimulált válaszadó elemhez (ISRE; IFN stimulated response element), amely GAAA ismétlődéseket tartalmaz 2 nukleotid kihagyásával (Gilmour 1995; Banninger és Reich, 2004). Az IRF9 különböző szerepet játszik a természetes immunitásban (Taniguchi, 2001). (3. ábra)

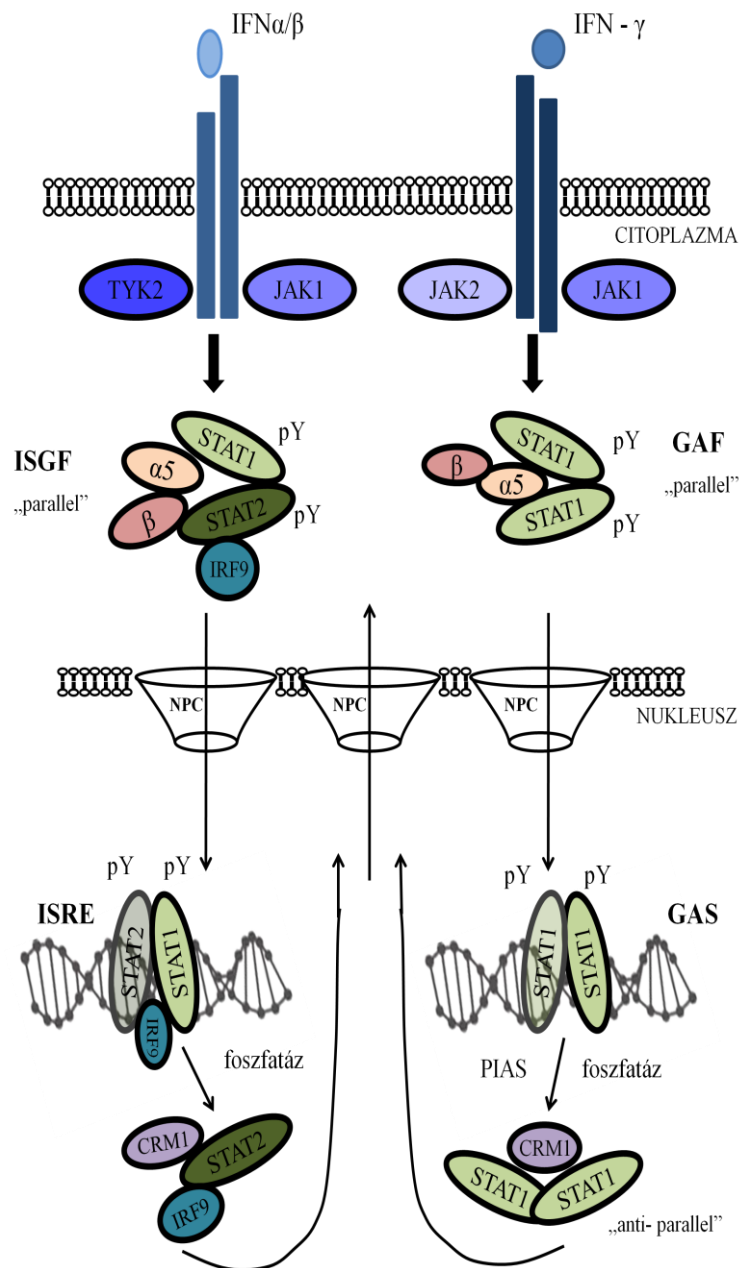
A defoszforilációt követően a STAT2-IRF9 leválik a DNS-ről, a STAT2 karboxil-terminális doménjén található nukleáris export szignál (NES) -hoz kötődik a CRM-1 szállító molekula és visszajut a citoplazmába (Banninger és Reich, 2004). (3. ábra)

II-es típusú interferonok (IFN- γ) az IFNGR1 és IFNGR2 receptorokhoz kapcsolt JAK1 és JAK2 kinázokon keresztül aktiválja a STAT1 fehérjét (de a STAT2-t nem) (Gilmour, 1995). IFN- γ hatására a STAT1 SH2 doménjével a receptor foszforilált helyéhez kötődik, ahol a JAK kinázok (JAK1 és JAK2) a tirozin 701-es pozícióban (pY701)

foszforilálják (Greenlund, 1994). A Y701 foszforilációja szükséges, hogy a STAT1 fehérje leváljon az IFNGR1 receptorról, a homodimerizációhoz és a nukleáris transzlokációhoz (Ramana, 2010). A nem-foszforilált állapotban lévő STAT1 „anti-parallel” dimerként van jelen a citoplazmában, akkor az NLS rejtve van és az importin- $\alpha 5$ nem ismeri fel (Chen, 1998). A JAK kináz tirozin-foszforilálja a STAT1-t, a két monomer SH2 doménje és tirozinja fordított módon kapcsolódik egymáshoz, ez a konformáció változás fontos a nukleáris importhoz. Ezt követően „parallel” dimerekké kapcsolódik össze, amit korábban gamma-IFN aktivált faktornak (GAF; gamma-IFN activated factor) neveztek. A szállítandó fehérjén lévő nukleáris lokalizációs szignál (NLS; nuclear localisation signal) az importin- $\alpha 5$:importin- $\beta 1$ heterodimer adapter szállítómolekula közvetlenül felismeri és hozzákötődik (Mao, 2005; Zhong, 2005; Reich, 2013). A STAT1 dimer az importin- $\alpha 5$ karboxil régiójához kötődik, ami 9-10 armadillo ismétlődéseket tartalmaz (McBride, 2002). Ezt követően a szállítófehérjék a sejtmagi komplexen keresztül átszállítják a sejtmagba. (Mao, 2005; Zhong, 2005; Reich, 2013).

A foszforilált STAT1 dimernek a cél DNS-hez való bekötődésében két mechanizmus játszik szerepet. A sejtmagban a Ran-GTP az importin- $\beta 1$ szállítómolekulához kötődik, így a STAT1 dimer felszabdul. A második mechanizmus szerint a cél-DNS-nek magasabb affinitása van a STAT1 dimerekhez kötődni, mint az importin- $\alpha 5$ -nek, így a sejtmagban a STAT1 specifikusan hozzákötődik a célhelyhez az importin- $\alpha 5$ leválása után (McBride, 2002; Fagerlund, 2002). A gamma-IFN aktivált faktor felismeri és kötődik a gamma-IFN aktivált helyhez (GAS; gamma-IFN activated site), ami 2-4 nukleotidokként GAAA szekvencia fordított ismétlődéseiből épül fel (Decker, 1991). (3. ábra)

Amíg a STAT1 molekula a cél-DNS-hez kötődik, addig a DNS-kötő doménon található hidrofób szerkezetű, nukleáris export szignál szekvencia ($_{400}$ LAAEFRHLQL $_{409}$), rejtve van (McBride, 2000). A STAT1 leválását a DNS-ről két mechanizmus segíti, a tirozin defoszforiláció foszfatáz által (ten Hoeve, 2002) és a sejtmagi inaktiváció által, vagyis az aktivált STAT sejtmagi fehérje inhibitora (PIAS; nuclear protein inhibitor of activated STAT) hozzákötődik a „parallel” STAT1 dimerhez és mindkét esetben a NES felismerhetővé válik a CRM-1 szállítómolekula számára (Shuai, 2006). A NES rejtettséget („masking” hipotézis) alátámasztja az a közlemény, ami szerint a L400, F404, L407 és L409 oldalláncok kötési képessége korlátozva van (Chen, 1998). (3. ábra)



3. Ábra A JAK-STAT jelátviteli útvonal sematikus ábrázolása és a STAT1 és STAT2 transzkripciós faktorok sejtmag-citoplazmatikus transzportja

Az I-es típusú (IFN- α/β) és a II-es típusú (IFN- γ) interferonok a receptoraikhoz kapcsolódnak, a JAK1, JAK2 és TYK2 molekulák tirozin foszforilálják (pY) a STAT transzkripciós faktorokat, amelyek ezt követően heterodimerizálódnak (STAT1-STAT2) illetve homodimerizálódnak (STAT1-STAT1). A szállítómolekulák (α 5- és β importin) felismerik a nukleáris lokalizációs szignál (NLS) szekvenciákat, majd a sejtmag pórusokon (NPC) keresztül a molekula komplexek a citoplazmából bejutnak a sejtmagba és a DNS megfelelő szakaszaihoz kötődnek (ISRE és GAS). Foszfataz vagy PIAS hatására a molekula komplexek szétesnek és „anti-parallel” helyzetbe kerülnek, így felismerhetővé válik a nukleáris export szignál (NES) szekvencia, amelyet a CRM1 szállítómolekula felismer és segítségével a sejtmagból visszajutnak a citoplazmába.

IFN: interferon, NES: nukleáris export szignál, NLS: nukleáris lokalizációs szignál, NPC: sejtmag pórus komplex, ISRE: interferon stimulált válaszadó elem, GAS: IFN-gamma aktivált szekvencia

Az ábra Reich, 2006; 2007 és 2013 tudományos közlemények ábrái alapján készült módosításokkal.

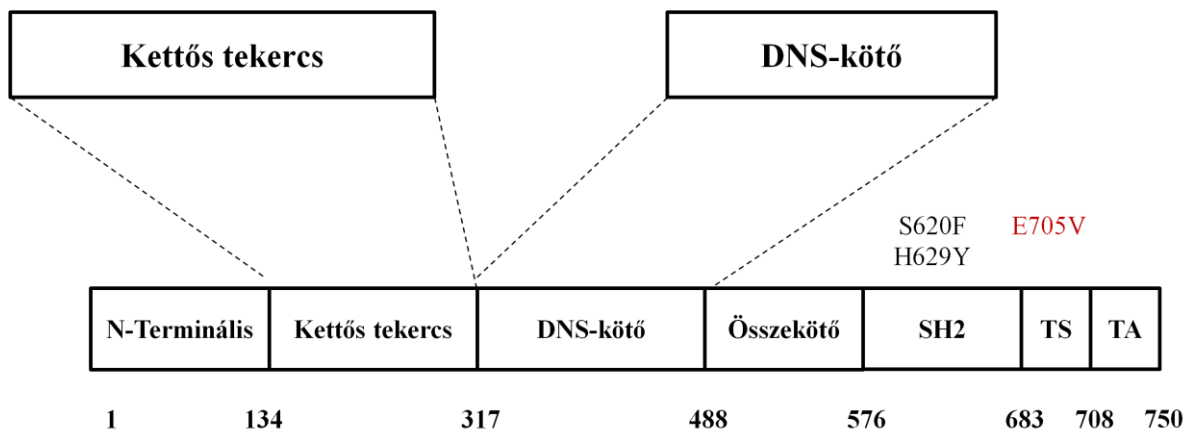
3.1.5.4 *STAT1* gént érintő mutációk

A 2010-es évek elején két független kutatócsoport szinte egyidőben publikálta a STAT1 transzkripció faktor funkciónyerő (GOF; gain-of-function) mutációját (Liu, 2011, Takezaki 2012). A CMCD leggyakoribb oka a STAT1 kettős tekercs (coiled-coil; CC) doménjét érintő mutációk, ennél kisebb gyakorisággal fordulnak elő mutációk a DNS-kötő (DNA-binding; DB) doméneken, de ezek a defektusok is okozhatnak CMCD-t, ezen kívül találtak még funkciónyerő mutációkat az SH2, a „tail segment” (TS) és a transzaktivációs (TA) doméneken is (Takezaki, 2012; Soltész, 2013; Sampaio, 2016 a,b; Sobh, 2016; Szolnoky, 2016). Az IL-17+ T sejtek differenciációjára ható citokinek jelátviteli útvonalaiban fontos szerepe van a STAT1 molekulának, az IFN- α/β , IFN- γ és az IL-27 citokinek a STAT1 függő szignalizációs útvonalon keresztül gátolják a naiv T-limfociták IL-17+ T sejtekké történő érését (Maródi, 2012; Maródi, 2013; Liu, 2011; Soltész, 2013). Autoszomális recesszív részleges vagy teljes STAT1 deficienciában szenvedő betegeknél mycobakteriális és virális fertőzéseket írtak le, míg autoszomális domináns STAT1 deficiencia esetében MSMD-t találtak (Dupuis, 2001; Chapgier, 2006, Boisson-Dupuis, 2012; Soltész, 2013). A STAT1 hiperfoszforilációja és a sejtmagi defoszforiláció elvesztése következtében alakul ki a funkciónyerés (Liu, 2011; Takezaki, 2012; Soltész, 2013). Fokozott celluláris válasz tapasztalható IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-27 (IL-17+ T sejtek differenciálódásának inhibitorai STAT1 jelátviteli útvonalon keresztül) citokinek jelenlétére, illetve fokozódik a STAT1 aktivációja az IL-17+ T sejtek differenciálódását elősegítő citokinek (IL-6, IL-21, IL-23) hatására is a STAT3 jelátviteli útvonalon keresztül (Liu, 2011). A *STAT1* génen eddig leírt funkciónyerő mutációkat a 4. ábra foglalja össze.

Ahogy korábban beszámoltak róla, a *STAT1* génen vannak olyan helyek, amelyek fontosak a nukleáris importban és exportban. A *STAT1* génen a sejtmagi lokalizációs jel magába foglalja a Leu407, Lys410 és Lys413 aminosavakat. Vizsgálatok bizonyítják, hogy mutáció következtében a Leu407 pozícióban, a STAT1 képes IFN- γ stimulus hatására tirozin-

foszforilálódni, dimerizálódni, viszont nem képes kötődni az importin- $\alpha 5$ molekulához, amely így a nukleáris importban okoz gátlást és nem transzlokálódik a sejtmagba, vagyis a citoplazmában marad (McBride, 2002). A vad típusú STAT1 részben képes megmenteni a nukleáris import mechanizmusát, azáltal, hogy heterodimerizálódik a mutáns leucin 407 STAT1 molekulával (Meyer, 2002). Továbbá a L407 mutáció környezetében található két másik aminosav, amely szintén a nukleáris lokalizációs jel tagja. A fent említettek mellett, a STAT1 Lys410 és Lys413 pozícióiban létrejött dupla mutáció gátolja a DNS-hez való kötődést (McKendry, 1991; Fagerlund, 2002; Meyer, 2002).

I156T	R210I	L283M	C324R	T385K
L163R	R210K	Q285R	P329L	T387A
D165G	E235A	K286I	L351F	K388E
D165H	E235G	Y287D	E353K	M390T
Y170N	V266I	T288A	L354M	N397D
F172L	A267V	T288I	L358F	L400Q
C174R	Q271P	Y289C	L358W	L400V
N179K	R274Q	P293S	E370D	F404Y
M202I	R274W	I294T	G384D	L407R*
M202V	R274G	K298N	T385M	S466R
	K278E	M309T		



4. Ábra *STAT1* gén funkcionyerő (GOF) mutációi

Felhasznált irodalom: Al Rushood, 2013; Aldave, 2013; Al-Mousa, 2016; Chang, 2016; Depner, 2016; Dhalla, 2015; Dotta, 2016; Frans, 2014; Giardino, 2016; Higgins, 2015; Kumar, 2014; Lee, 2014; Liu, 2011; Martinez-Martinez, 2015; Mekki, 2014; Mizoguchi, 2014; Romberg, 2013; Sampaio, 2013; Sampaio, 2016a,b; Sharfe, 2014; Sobh, 2016; Soltész, 2013; Takezaki, 2012; Uzel, 2013; van de Veerdonk, 2011; Yamazaki, 2014; Zerbe, 2016

(Fekete: CMCD, Kék: IPEX-szerű szindróma, Lila: Disszeminált histoplasmosis, Zöld: SCID, Piros: Disszeminált coccidioidomycosis, Sárga: Disszeminált mucormycosis, Naranessárga: CID, Barackszín: progresszív multifokális leukoencephalopathia, Vörös: Disszeminált *Rhodococcus* fertőzés, Olivazöld: Laphámrák (squamous cell carcinoma), *: nem bizonyított GOF)

3.2 X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség (XLP)

3.2.1 X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség epidemiológiája és klinikai manifesztációi

X kromoszómához kötötten öröklődő elsődleges immunhiányos betegség, melynek előfordulási gyakorisága 1-3:1000000. A betegséget először David Purtilo írta le 1975-ben egy Duncan nevű család esetében, a betegséget eredetileg „X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency” néven írták le, de az irodalomban a „Purtilo disease” és a „Duncan’s disease” megnevezés is megtalálható (Purtilo, 1975; Strahm, 2000).

X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségnek két típusát írták le. A SAP fehérjét kódoló *SH2D1A* gén mutációja felelős az XLP1 kialakulásáért, míg a XIAP fehérjét kódoló *BIRC4* gén mutációja felelős a XLP2 kifejlődésért.

3.2.1.1 Az XLP1 klinikai tünetei

Az Epstein-Barr vírus (EBV), a human γ -herpes vírus család tagja, amelyet Burkitt lymphoma tumorsejtekből azonosították 1964-ben (Epstein, 1964), igen elterjedt, az emberek több mint 90%-a találkozott már élete folyamán EBV-vel (Cohen, 2000). Az elsődleges EBV fertőzés általában tünetmentes vagy kevés tünettől jár egészséges gyerekekben (Sumaya és Ench, 1985). Már 1987-ben felismerték, hogy XLP betegekben az EBV fertőzés hepatitishez, csontvelő aplasiához és hemophagocytic lymphohistiocytosishoz (HLH) vezethet (Mroczek, 1987). Tehát XLP betegségben szenvedő gyermekeknél az EBV fertőzés súlyos, gyakran halálos kimenetelű infektív mononucleosis (FIM) jár vagy másodlagosan haemophagocytás lymphohistiocytosis (HLH) alakul ki, melyek az XLP betegség fő klinikai manifesztációi (55-58%) közé tartoznak. A betegekben a mononucleosis túlélését követően hypo- vagy dysgammaglobulinaemia (31-36%), malignus lymphoma (21-30%), vasculitis (3-6%) és aplasztikus anaemia (3%) alakulhat ki szövődményként (Seemayer, 1995; Sumegi, 2002; Kanegane, 2012). Csak a FIM kialakulásához szükséges az EBV jelenléte, malignus lymphoma illetve dysgammaglobulinaemia EBV-pozitív és EBV-negatív betegekben

egyaránt kialakulhat. A beteg B-, CD8+ T sejtjei és makrofágjai beszűrődnek az érintett szövetekbe, beleértve a limfoid szöveteket, májat, központi idegrendszert és a csontvelőt (Brandau, 1999; Strahm, 2000; Sümegi, 2000).

XLP betegek közel 30%-a szenved lymphomában (Seemayer, 1995; Speckmann, 2008). Nagyon sok beteg esetében a lymphomák EBV fertőzést követően alakulnak ki, de vannak olyan betegek is, akiknél korábbi EB fertőzés nem volt kimutatható (Brandau, 1999; Sümegi, 2000). A lymphomák nagy része B sejt eredetű és 50%-ban Burkitt-típusú hisztológiával rendelkezik (Gaspar, 2002). Egyes feltételezések szerint a T és B sejtekben a SAP fehérje pro-apoptotikus funkciójának elvesztése vezethet a lymphomák kialakulásához (Nagy, 2009; 2010).

XLP betegségben szenvedő betegek kóros humorális immunválaszokat produkálnak (Grierson, 1991), ennek köszönhetően sinopulmonáris infekciók jelentkehetnek (Seemayer, 1995). XLP betegnek rendszerint normális mennyiségű keringő B sejtjeik vannak, de viszont CD27+ memória B sejtek arányában jelentős csökkenést tapasztaltak (Lindstein, 1982; Ma, 2005; Malbran, 2004). A megmaradt memória B sejtek nagy része IgM immunglobulint termelnek, Grierson és munkatársai magas IgM szintet találtak XLP betegeknél (Grierson, 1991), viszont nem képesek IgG-t termelni, ami a naív B sejtek differenciálódásának zavarára utalhat (Ma, 2006). Az XLP betegségben szenvedő emberek lépében alacsony számban azonosítottak centrum germinatívumot (GC), amely szükséges a hosszantartó izotípus-váltott B sejt válaszok kialakulásához (Ma, 2006).

3.2.1.2 Az XLP1 és XLP2 differenciáldiagnosztikája

Mindkét esetben (XLP1 és XLP2) megfigyelhető HLH és dys- vagy hypogammaglobulinemia, viszont az XLP2 betegek esetében lymphoma nem volt jellemző (Seemayer, 1995; Rigaud, 2006; Pachlopnik Schmid, 2011; Yang, 2012 a,b; Kanegane, 2012). A HLH az XLP2-ben nagyobb gyakorisággal fordul elő, mint XLP1 esetében (Pachlopnik Schmid, 2011). XLP1-ben előfordul aplasztikus anémia és vasculitis (Seemayer, 1995; Pachlopnik Schmid, 2011; Booth, 2011; Kanegane, 2012). XLP2-ben megfigyeltek splenomegáliát (Marsh, 2009 b) és enterocolitist (Pachlopnik Schmid, 2011; Yang, 2012).

Ha felmerül az XLP gyanúja a molekuláris genetikai vizsgálat adhat biztosabb diagnózist, ugyanis normális mennyiségű SAP vagy XIAP fehérje expressziója esetén

(áramlási citométerrel mérve) is előfordulhat mutáció a *SH2D1A* vagy *XIAP* génen, ha a klinikai tünetek meggyőzően XLP1 vagy XLP2 betegségre utalnak (Gifford, 2014).

Néhány éve kidolgoztak áramlási citometriás protokollt, a SAP és XIAP defektus elkülönítésére (Tabata, 2005; Marsh, 2009 a; 2010 a,b; 2013 a). Az áramlási citometriás mérés során T és NK sejtekben SAP expresszióját lehet mérni gyorsan (1-2 nap) és megbízható eredményt (90%; Gifford, 2014) lehet kapni kevesebb, mint 1 ml perifériás vérmennyiségből (Marsh, 2010 a). A gyors diagnózis felállítása nagyon fontos XLP betegségben szenvedőknél a megfelelő kezelés megválasztása érdekében. Azokban a laborokban, ahol nincs lehetőség áramlási citometriás mérések kivitelezésére, a SAP expressziójának kimutatására Western blot módszert lehet alkalmazni PBMC sejtekből, de tisztított T, B és monocita sejtekből is meg lehet határozni a SAP expresszióját Western blottal (Gilmour, 2000). XLP2 diagnózisának felállítását is segítheti az áramlási citometriás mérés, mely rövid időn belül eredményt ad. A XIAP expresszióját különböző sejteken (CD4+, CD8+ T, NK, B sejtek, monociták, granulociták) lehet mérni (Marsh, 2009 a; 2010 a).

Az XLP diagnózisát számos más laboratóriumi teszttel lehet megerősíteni, ugyanis a perifériás vér iNKT sejtjei (hasonlóan a SAP-hiányos egerekhez) alaposan lecsökkent vagy teljesen hiányoznak XLP betegekben (Nichols, 2005 a), a sejtek arányát áramlási citométerrel határozták meg (Marsh, 2009 b). A SAP szükséges az iNKT sejtek kialakulásához (Nichols, 2005 a), e sejteknek fontos szerepük van a fertőzések, tumorok és autoimmun folyamatok elleni védekezésben (Godfrey és Kronenberg, 2004). Elsőként az XLP-nél, mint öröklött PID azonosították az iNKT sejtek hiányát (Pachlopnik Schmid, 2011). Ugyancsak csökkent arányban lehet CD27+ memória B sejteket kimutatni perifériás vérből XLP betegekben (Ma, 2005; Malbran, 2004).

A T sejt receptor restimuláció okozta sejthalál (RICD; TCR restimulation induced cell death) vizsgálata segítheti a két betegség differenciál diagnosztikáját ugyanis XLP1 betegeknél csökkent, míg XLP2 betegeknél megnövekedett a CD4+ és CD8+ T sejtek apoptózisa (Rigaud, 2006; Snow, 2009; Marsh, 2010 a; Marsh, 2013 a; Gerart, 2013), bár ez még ma nem ad teljesen megbízható eredményt (Marsh, 2010 a,b).

3.2.1.3 X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség kezelési stratégiája és prognózisa

XLP1 betegségben szenvedő betegek 75%-a meghal 10 éves koruk előtt, azoknál a betegeknél akik EBV-vel fertőződtek meg (tehát HLH alakult ki), alig 4% volt a túlélés esélye (Seemayer, 1995). Az elmúlt években több új protokollt vezettek be az XLP betegség megelőzésére és kezelésére. HLH kezelésére hatásos kemoterápiás szereket használnak, úgymint a Rituximab (anti-CD20; megjelenése a halálozást csökkentette), ugyanis lecsökkenti az EBV és a szérum ferritin szintet és eliminálja az érett B sejteket a szervezetből, amelyeket az EBV elsőként fertőz meg. Habár a rituximab kezelésnek is előfordultak mellékhatásai a vizsgált betegcsoportban, mint pl. láz, alacsony vérnyomás (Chellapandian, 2013), illetve egyéb hatásos kemoterápiás szereket használnak (Trottestam, 2009). Jelenleg az egyetlen gyógyító és hosszú távú túlélést jelentő terápia az allogénikus hematopoetikus őssejt transzplantáció (HSCT). 2005-ben megjelent közleményben 71%-os túlélésről (10/14 beteg) számoltak be HSCT –t követően (Lankester, 2005). A túlélést jelentősen javítja a HSCT, de mielőtt a HLH kialakul, érdemes elvégezni (Marsh, 2010 a). Transzplantációt követően 16 beteg esetében lymphoma és HLH tekintetében visszaesést nem tapasztaltak (Marsh, 2014).

Mivel az allogénikus HSCT túlélési rátája 81,4% volt a bizonyítottan XLP betegeknél (Booth, 2011), ezért a kutatók olyan módszerek kidolgozását tűzték ki, amely megnöveli a túlélés esélyét, ha nem találnak megfelelő HLA azonos donort. Nemrég megjelent tanulmányban vizsgálták az önaktiváló lenti vírus vektorok használatának lehetőségeit *in vitro* és preklinikai vizsgálatokkal az XLP gyógyítására (Farinelli, 2014), korábbi tanulmányok bizonyították, hogy a lentivírusoknak kisebb a genotoxicitásuk a γ -retrovírusokkal szemben, ugyanis a γ -retrovírus vektorok alkalmazása leukémia kialakulásához vezetett néhány elsődleges immunhiány betegségénél pl. Wiskott-Aldrich szindróma (Coci, 2015).

A hypogammaglobulinemia kezelésére immunglobulin pótlást, (Speckmann, 2008), a lymphoma kezelésére standard kemoterápiás szereket javasolnak, melyet onkológusokkal egyeztetve adnak a betegeknél. Anaemia kezelésére transzfúzió (vérátömlesztés) adását javasolják. HSCT terápia esetén jelenlegi álláspont szerint a transzplantált betegek túlélési hányada nagyobb volt, mint a nem-transzplantált betegeknél (Booth, 2011).

Az XLP2 tüneteinek kezelésére is alkalmazhatók azok a szerek, amiket XLP1 betegségénél használnak, kiegészítve, hogy ha enterocolitis tünete megjelenik a betegnél, akkor

immunszuppresszív szereket javasolnak az orvosok pl. szteroidok, ciklosporin. Marsh és munkatársai 2013-ban közölték, hogy csak 14% volt a túlélés azon XLP2 betegek között, akik myeloablatív kondicionálást (MAC) kaptak, viszont 57%-os volt a túlélés esélye azon betegcsoportoknál, akik csökkent intenzitású kondicionálást (RIC) kaptak csontvelő transzplantáció előtt (Marsh, 2013 b). Egy nemrég megjelent közleményben beszámoltak eredményes allogénikus őssejttranszplantációról egy fiatal XIAP deficienciában szenvedő fiúbetegnél csökkent intenzitású kondicionálási protokollt használva, mely szükséges a kezeléssel járó toxicitás csökkentéséhez (Chellapandian, 2016).

X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség prognózisát tekintve Booth és munkatársai 2011-ben 91 XLP1 beteget vizsgáltak és a túlélés 71,4%-os volt (Booth, 2011). Pachlopnik Schmid és munkatársai 2011-ben 30 XIAP beteget vizsgáltak, ahol a túlélés 57%-os volt (Pachlopnik Schmid, 2011).

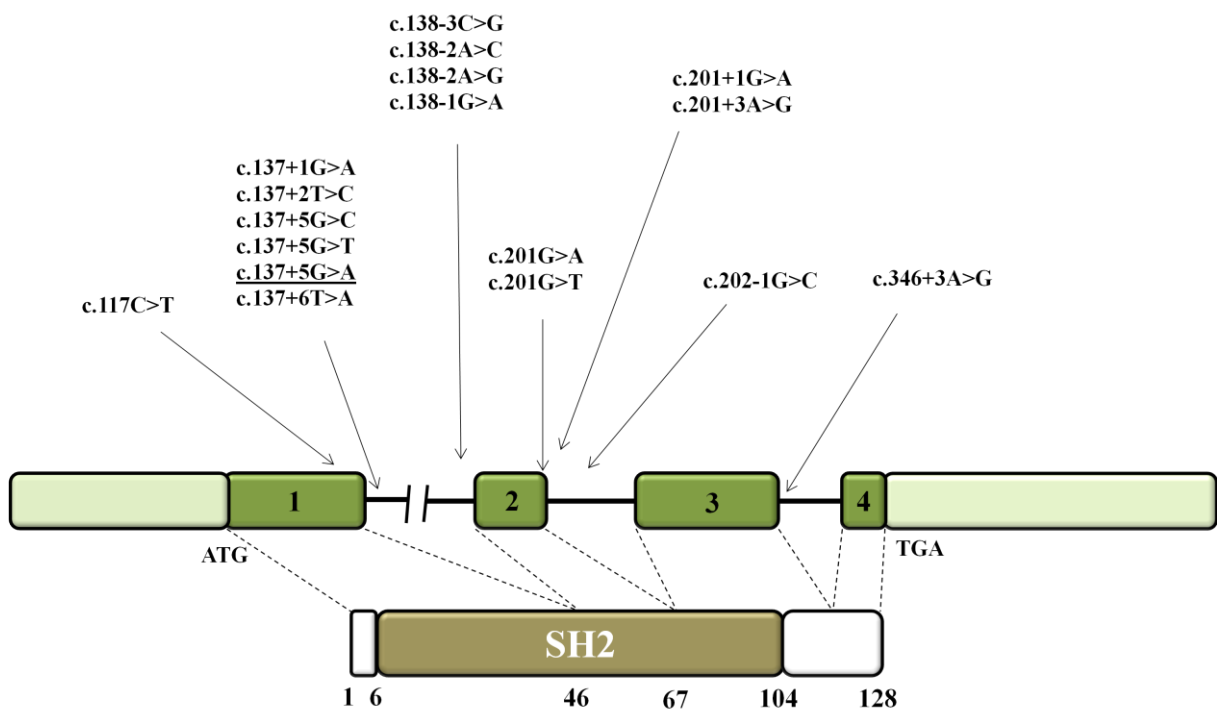
3.2.2 Az X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség molekuláris genetikai háttere

Három munkacsoport egymástól függetlenül határozta meg a betegségért felelős Src Homology 2 (SH2) Domain Containing Gene 1A (*SH2D1A*) gént (Coffey, 1998; Nichols, 1998; Sayos, 1998). Coffey és munkatársai, Nichols és munkatársai térképezéses klónozással (positional cloning), míg Sayos és munkatársai a SLAM fehérje kölcsönhatásainak tanulmányozásával határozták meg a gén elhelyezkedését. Az *SH2D1A* gén az X kromoszóma hosszú karján (Xq25) helyezkedik el, 4 exonból épül fel és több mint 25 kilobázis (kb) hosszúságú (Coffey, 1998; Nichols, 1998; Sayos, 1998).

Rigaud és munkatársai 2006-ban írták le az XLP másik típusát, klinikai tünetek hasonlósága és a X kromoszómán való elhelyezkedése miatt elnevezték XLP2-nek. Három családból származó 12 beteg esetében, amit a X-hez kötött apoptózist gátló (*XIAP*; korábban *BIRC4*) génen bekövetkezett mutáció okozott. A gén szintén a X kromoszóma hosszú karján (Xq25) található és 6 exonból áll (Rigaud, 2006).

3.2.2.1 Az XLP1 genetikai defektusai (*SH2DIA* mutációk)

A betegség kialakulásáért felelősek lehetnek deléciók, inszerciók, nukleotid cserék: missense vagy nonsense, vagy „splicing” mutációk, jelenleg több mint 110 különböző mutációt írtak le a *SH2DIA* gén esetében (HGMD Professional 2016.2 mutációs adatbázis). Habár a legtöbb mutáció csökkent vagy teljesen hiányzó fehérje expressziót eredményez, a genotípusok és a betegség klinikai tünetei között nem figyeltek meg összefüggést (Brandau, 1999; Nelson és Terhorst, 2000; Sümegi, 2000; Gaspar, 2002). Jelen munkában az intronikus régióban bekövetkezett mutációkat tárgyaljuk részletesen. Ismereteink szerint 17 „splicing” mutációt írtak le idáig az *SH2DIA* génen, beleértve az általunk azonosított új mutációt is. Három esetben a mutáció exonikus szakaszban található, a másik tizennégy genetikai eltérés intronikus régióban helyezkedik el, amelyből tizenegy esetben a mutáció az egyes intront érinti. (5. ábra)



5. Ábra *SH2DIA* gén „splicing” mutációi

Felhasznált irodalom: An, 2014; Brandau, 1999; Coffey, 1998; Debeljak, 2008; Filipovich, 2010; Gifford, 2014; Recher, 2013; Sayos, 1998; Sumazaki, 2001; Sümegi, 2000; Tabata, 2005; Tóth, 2015; Yin, 1999. Az ábra Tóth, 2015 tudományos közlemény alapján készült módosításokkal.

Találtak olyan eseteket, ahol nem volt kimutatható SAP expresszió viszont az *SH2DIA* génen nem találtak mutációt, ezt követően megnézték az intronikus szakaszokat is, ahol intronban elhelyezkedő új mutációt azonosítottak, amely ahhoz a megállapításhoz vezetett miszerint az intronban és a promoterben található bizonyos mutációk éppúgy kialakíthatnak XLP betegséget (Recher, 2013).

3.2.2.2 AZ XLP2 genetikai defektusai (XIAP mutációk)

Az XLP2 kialakulásának hátterében a *XIAP* gén genetikai károsodása áll. A *XIAP* génen több mint 70 különböző mutációt írtak le, deléciók, inszerciók, vagy nukleotid cserék egyaránt ismertek (HGMD Professional 2016.2 mutációs adatbázis). A mutációk többsége a *XIAP* fehérje expresszió csökkenését vagy teljes hiányát eredményezi, néhány mutáció esetében pedig trunkált fehérjét detektáltak. Western blot és áramlási citometriás vizsgálatok trunkált fehérje jelenlétét igazolták egy beteg esetén, akinél a *XIAP* gén hatodik exonjának kiesését azonosították (Rigaud, 2006; Marsh, 2009 a; Pachlopnik Schmid, 2011; Yang, 2012 a; Marsh, 2010 b). A genotípus és fenotípus között nem található korreláció (Sümegei, 2000).

3.2.3 Az X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség patomechanizmusa

Az *SH2DIA* gén egy 128 aminosavból álló szignalizációs lymphocita aktivációs molekula (Signaling lymphocytic Activation Molecule; SLAM) asszociált fehérjét (SAP) kódol. A SAP adapter fehérje egy SH2 doménből (foszfortirozin kötő hely) és egy rövid carboxyl-terminális régióból áll (Sayos, 1998; Filipovich, 2010). A SAP fehérje az aktivált NK, T és invariáns NK (iNKT) sejtekben expresszálódik, és néhány malignus B lymphocytában (Coffey, 1998; Nichols, 1998; Sayos, 1998; Nagy, 2000; Nagy, 2002; Veillette, 2008). A SAP fehérje modulálja a jelátviteli útvonalakat azáltal, hogy a SLAM család receptoraihoz kötődik (Latour, 2003 a, b).

A SAP fehérjének különböző szerepe van az immunfolyamatokban. A SAP megakadályozza a gátló foszfatázok (SH2 domén tartalmú fehérjék) kötődését a SLAM receptorhoz, mint a SH2-domén tartalmú foszfatáz 1 (SHP1; SH2 domain-containing Phosphatase-1; PTPN6; tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6) és paralógja a SHP2 (PTPN11; tyrosine-phosphatase non-receptor type 11) vagy a SH2 domén tartalmú Inozitol 5'-

foszfátáz (SHIP; SH2 domain-containing Inositol 5'-Phosphatase). A SAP, mint adapter fehérje SH2 doménjével kötődik az Src tyrosine kinase családba tartozó Fyn SH3 doménjéhez, majd aktiválja, ezt követően kapcsolódik a SLAM receptorhoz, és további tirozin oldalláncokat foszforilál (Sümegei, 2000; Latour, 2001)

Jelenlegi ismereteink szerint a SLAM család 9 tagból áll: SLAM (Cocks, 1995), CD2-szerű receptor aktiváló cytotoxikus sejtek (CD2-like receptor activating cytotoxic cells; CRACC; CD319) (Bouchon, 2001; Boles, 2001), BLAME (Kingsbury, 2001), CD48 (Fisher, 1991; Wong, 1990) CD84 (de la Fuente, 1997; de la Fuente, 1999), 2B4 (CD244) (Mathew, 1993; Sivori, 2000), Ly-9 (CD229) (Mathieson, 1980; Hogarth, 1980), NK- T- és B sejt antigén (NTB-A; Ly108) (Bottino, 2001; Fraser, 2002), és a SF2001 (Fraser, 2002). A SAP és homológ fehérjéi, Ewing szarkóma-asszociált transzkriptum-2 (EAT-2; Ewing sarcoma-associated transcript-2) és EAT-2-related transducer (ERT) is képes kötödni a SLAM család receptoraihoz, úgymint SLAM, 2B4, CRACC, NTB-A, CD84 és Ly9. Ezek a receptorok 2 immunoglobulin-szerű domént tartalmaznak, kivéve a Ly-9, amely 4 ilyen domént tartalmaz (Latour és Veillette, 2003) ezen kívül transzmembrán domént és citoplazmatikus farki részt, amely úgynevezett „immunotyrosine switch motifs (ITSM)” elemet tartalmaz. A SLAM (CD150) molekula az aktivált és memória T sejtek felszínén kívül, a dendritikus sejtek, makrofágok és aktivált B sejtek felszínén is megtalálható (Cocks, 1995; Maródi és Notarangelo, 2007). A SLAM-SLAM interakció (homoasszociáció) során, az ITSM elem kötődik a SLAM-receptor családba tartozó fehérjék citoplazmatikus régiójában található TxYxxV/I konszenzus szekvenciákhoz (T treonin, Y tirozin, V valin, I izoleucin, és x más aminosav), amelyhez nagy affinitással kötődik a SAP adapter fehérje (Sayos, 1998; Veillette, 2003). A SAP SH2 doménje kapcsolódik a src tirozin kináz családba tartozó, FynT SH3 doménjével, ugyanakkor a SAP kötődik a SLAM receptorhoz, mert a kötődési pont (arginin 78) az SH2 domén foszfortirozin kötőhelyével ellentétesen található (Latour, 2003 a; Davidson, 2004). A SAP bekötődése aktiválja az Fyn molekulát, amely további tirozin oldalláncokat foszforilál a SLAM receptor citoplazmatikus részén, a már foszforilált oldalláncokhoz SH2 domén-tartalmú inozitol foszfátáz (SHIP; SH2 domain-containing inositol phosphatase) szignálmolekula; Dok1, Dok2, Shc adaptor molekulák és Ras GTPáz-aktiváló fehérje (RasGAP) kötődik, ami elindítja a tirozin foszforilációt a T sejtekben SAP-függő útvonalon (Latour, 2001; Latour, 2003 a). (6. ábra) SLAM jelátviteli útvonalon keresztül a SAP olyan citokinek termelését irányítja a CD4+ T sejtekben, amelyek szükségesek az EBV- fertőzött sejtek CD8+ T- illetve NK-sejtes citotoxikus eltávolításához, ezáltal az IFN- γ szekréció lecsökken és nő az IL-4 termelés. XLP betegségben szenvedő

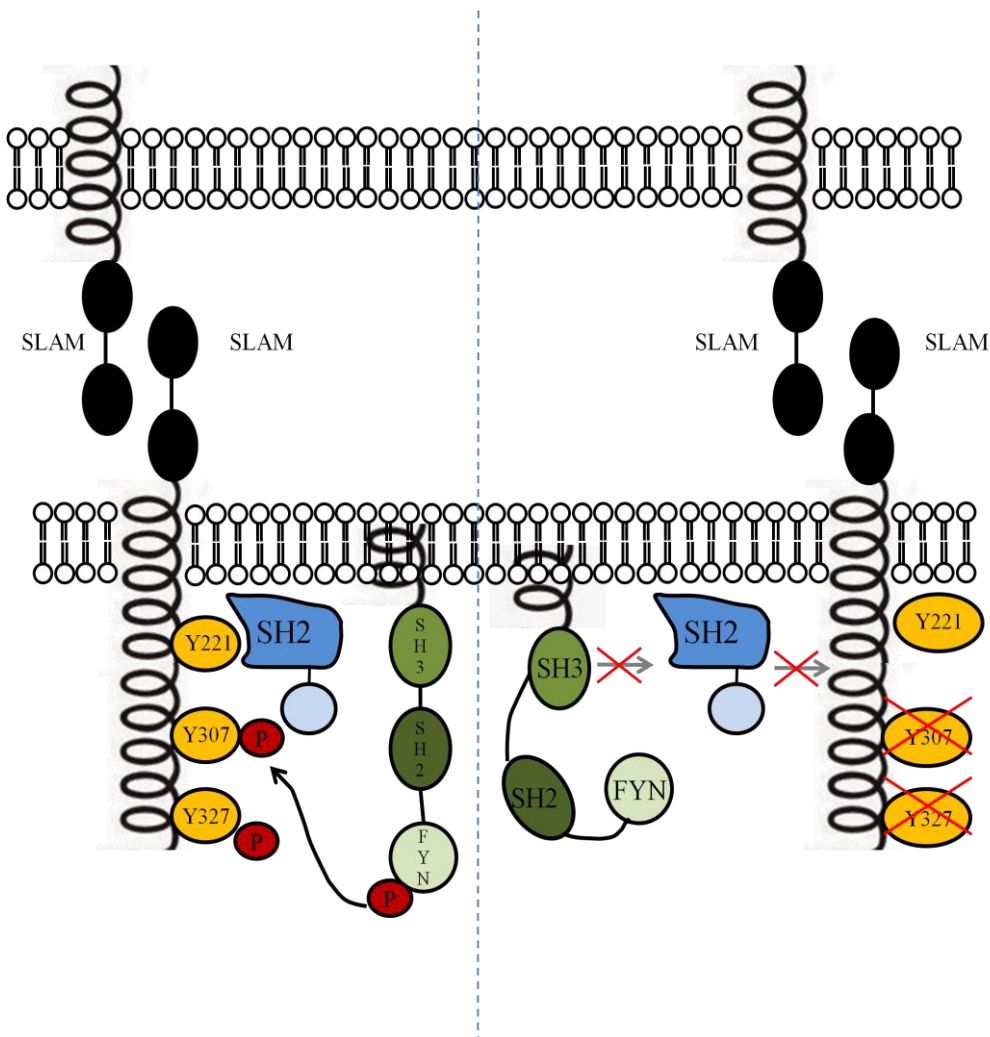
betegeknél a T és NK sejtek által mediált citotoxicitás elmarad, így nem következik be az EBV-fertőzött sejtek eliminációja, mivel SAP-deficiens sejtekben az IL-4 szekréció alacsony és magas az IFN- γ termelés (Latour, 2001; Wu, 2001; Latour, 2003 a; Cannons, 2004; Davidson, 2004).

A SLAM család egyik receptora, a 2B4 (CD244, SLAMF4) egy aktiváló receptor, amely az NK- és aktivált CD8⁺ T sejteken expresszálódik (Brown, 1998; Latchman, 1998). Egér és emberi immunsejteken található 2B4 receptorhoz hozzákötődik a CD48, mint természetes ligandumához. 2B4 receptor citoplazmatikus farki részén ITSM elemek találhatóak, így képes a SAP-hoz kapcsolódni (Latour és Veillette, 2003; Eissmann, 2005). A 2B4-CD48 interakció elősegíti az NK és CD8⁺ T sejt citotoxicitást SAP-függő jelátviteli útvonalon keresztül, ezáltal elősegíti az CD48⁺ EBV-fertőzött B sejtek eliminációját az egészséges emberek szervezetéből (Dupre, 2005). A CD48 nagy mértékben expresszálódik a B sejteken EBV fertőzést követően (Thorley-Lowson, 1982). 2B4, mint aktiváló receptor megnöveli a TCR-indukált CD8⁺ T sejtek osztódását és az EBV-fertőzött sejtek elpusztítását (Sharifi, 2004; Dupre, 2005). SAP-hiányos sejtek esetén elmarad a célsejtek eliminációja, a 2B4 receptor citoplazmatikus farki részéhez a gátló foszfatázok (SHP-1, SHP-2, SHIP) kötődnek, amelyek lecsökkentik a 2B4 általi aktiváló jelátvitelt és megakadályozzák a fertőzött sejtek lízisét (Parolini, 2000; Dong, 2009). Egy másik feltételezés szerint az EAT-2 kötődik a 2B4 recetorhoz és gátolja az NK sejt aktivációt (Roncagalli, 2005). SAP-hiányos sejtek csökkent IFN- γ szekréciót és citotoxicitást mutatnak (Sharifi, 2004; Dupre, 2005).

NTB-A (Ly108 az egerekben), SLAM család tagja, citoplazmatikus farki részén ITSM elemeket tartalmaz. Bottino és munkatársai bizonyították, hogy a foszforilált NTB-A kötődik a SAP fehérjével és képes kötődni a SHP-1 és SHP-2 gátló foszfatázokkal (Bottino, 2001). NTB-A megnöveli az NK sejtek citotoxicitását (Bottino, 2001), az IFN- γ szekréciót (Valdez, 2004; Eissmann és Watzl, 2006). SAP-hiányos emberi NK sejtek esetén lecsökkent a célsejtek elpusztítása (Bottino, 2001). NTB-A aktiváló receptorként működik az emberi NK sejtek felszínén SAP-függő útvonalon keresztül és részt vesz a „restimulation-induced cell death (RICD)” folyamatban (Snow, 2009), azáltal, hogy a túlélési citokinek, mint az IL-2 nagy mértékben vannak jelen, a TCR receptorokon keresztüli újrástímulálás elpusztítja az aktivált effektor T sejteket, tehát megakadályozza a limfoproliferációt és T sejt-mediált szövetkárosodást. XLP betegeknél ez a folyamat hiányzik (Snow, 2009).

A XIAP gén egy 497 aminosavból álló fehérjét, az X-hez kötött apoptózist gátló fehérjét (XIAP; X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein;) kódolja. A fehérje három

Baculovirus apoptózist gátló ismétlődő doméneket tartalmaz (BIR; Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Repeat domains), amelynek szerepe van a kaspázokkal történő interakciókban, illetve egy C-terminális gyűrű domént (C-terminal ring domain) tartalmaz, amelynek E3 ubiquitin ligáz aktivitása van. XIAP fehérje részt vesz az apoptózis szabályozásában és a természetes immunitás intracelluláris jelátvitelének elindításában. A XIAP fehérje a T, NK, NKT, B és mieloid sejtekben expresszálódik (Rigaud, 2006; Marsh, 2009 a, b).



6. Ábra X-hez kötött lymphoproliferatív betegség patofiziológiájának elméletei alapja

Egészséges személyekben a SAP (kék színnel jelölve) a SLAM receptor citoplazmatikus részéhez kötődik, aktiválja a Fyn tirozin kinázt (zöld színnel jelölve), amely további tirozin oldalláncokat foszforilál, amelyekhez további jelátvivő molekulák kapcsolódnak. A SAP-SLAM fehérjekölcsönhatás hozzájárul a CD4⁺ T sejtek citokin termeléséhez, amelyek szükségesek a CD8⁺ T és NK sejtek általi citotoxikus eliminációhoz. XLP betegekben, a mutáns SAP nem tud kötődni a SLAM receptorhoz, elmarad Fyn foszforilálása is, így gátolt a CD8⁺ T és NK-sejtek által közvetített citotoxicitás és nem valósul meg az EBV fertőzött sejtek elpusztítása.

SAP: SLAM-asszociált fehérje, SLAM: jelközvetítő limfocita aktiváló molekula, XLP: X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség (Az ábra Maródi és Notarangelo, 2007 tudományos közlemény ábrája alapján készült módosításokkal)

4 CÉLKITŰZÉSEK

1. A kutatómunkánk első részében a krónikus mucocutan candidiasisban (CMC) szenvedő betegek és családtagjaik molekuláris genetikai vizsgálatait tűztük ki célul.
2. Új, mutációs adatbázisokban nem szereplő *STAT1* szekvencia variánsok patogenitásának igazolása.
Az új mutációk STAT1 protein funkciójára gyakorolt hatásának vizsgálata.
3. Krónikus mucocutan candidiasisban szenvedő betegek CD4+IL-17+ és CD4+IL-22+ T sejtek arányának és citokin termelésének vizsgálata.
4. A CMC betegek *Candida* ellenes citokin válaszainak tanulmányozása.
5. A kutatómunkánk második részében az X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségben szenvedő betegek és családtagjaik molekuláris genetikai vizsgálata volt a célunk.
6. A *SH2D1A* gén intronikus szakaszában azonosított mutáció patogenitásának igazolása XLP1-ben szenvedő betegnél.

5 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Etikai Bizottsága (Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága) által meghatározott követelményeknek megfelelően a vizsgálatok megkezdése előtt megtörtént a vizsgálandó személyek és/vagy törvényes képviselőjük tájékoztatása és a beleegyező nyilatkozatok aláírása. A közép- és kelet-európai országok illetékes hatóságai engedélyt adtak a genetikai és klinikai kutatásokhoz.

5.1 Betegek

Krónikus mucocutan candidiasisban szenvedő betegek

Kilenc CMCD-ben szenvedő beteg (P1-P9) esetében végeztük el a *STAT1* gén mutáció analízisét. A betegek klinikai tünetei és immunológiai eredményei a krónikus mucocutan candidiasis diagnózisát vetették fel. A betegek a következő országokból érkeztek: három beteg Csehországból, kettő Magyarországról, kettő Oroszországból és kettő beteg Ukrajnából.

X kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségben szenvedő betegek

P10 beteg

Az édesanya első gyermekeként született, motoros, mentális, illetve beszédfejlődése megfelelő volt, viszont csecsemőkorától ekcémás jellegű bőrtüneteket figyeltek meg. Kilenc évesen pharyngitis, magas láz, hányás miatt kórházi felvételre került, amely során a test több részén, de főként a végtagok feszítő felszínén számtalan, helyenként összeolvadó hyperaemiás exanthemák, kéz- és lábfej oedema, vérbő, hypertrophiás tonsillák, és submandibularisan babnyi nyirokcsomók voltak megfigyelhetők. A laboratóriumi vizsgálatok alkalmával a vérképben súlyos anaemiát, thrombocytopeniát és neutropeniát találtak, LDH szintje emelkedett volt, pozitív gyulladási paraméterekre és kóros májfunkciókra utaló jeleket észleltek. Az immunkémiai vizsgálatok során a szérumban alacsony IgA és IgG illetve emelkedett IgM szintet mutattak. Akut infekciót igazolt az EBV szerológiai vizsgálata. A gyermeknek többször volt véres, nyákos széklete, több alkalommal epilepsziás rohama zajlott, eszméletvesztéssel, a jobb szemben subretinalis és retinalis vérzés alakult ki.

A csontvelővizsgálat megakaryocyták nélküli aplasiás csontvelői képet mutatott. A sejtek nagyrészt lymphocyták voltak, atipusos morfológiájú, érett fenotípusú T sejt populációval. A mellkas röntgen felvételen fokozott bronchovascularis rajzolat, jobb oldali kevés pleurális folyadék és a sinus costophrenicus fedettség látszódott. Hepatomegaliát, splenomegaliát, szabad hasúri- illetve pleurális folyadékgyülemet figyeltek meg a hasi UH vizsgálat során.

A gyermeknél maradandó hypotensio alakult ki és testszerte oedemássá vált, gépi lélegeztetésre és folyamatos keringéstámogató kezelésre szorult, ennek ellenére állapota folyamatosan rosszabbodott, folyamatos vérzés jelentkezett a szűrőcsatornából. Hemofiltrációs kezeléseket igényelt a veseelégtelensége miatt. Megállíthatatlan tubusvérzés jelentkezett, bradycardizálódott, majd asystoliás lett, újraélesztése sikertelen volt, a torokgyulladás után öt héttel elhunyt.

P11 beteg

A P11 beteg a P10 beteg féltestvére anyai ágon. Az édesanya a családi anamnézis miatt vállalta a magzat genetikai vizsgálatát. Prenatalis genetikai analízis alkalmával a magzati mintában kimutatható volt a P10 betegben detektált genetikai eltérés. Az édesanya a terhesség megtartása mellett döntött. A gyermek a 39. gesztációs héten 3320 grammal természetes úton született. Két éves korban phimosiszt figyeltek meg, laboratóriumi vizsgálatok során EBV szerológia negatív volt, az EBV PCR is negatív eredményt mutatott. A vérkép megfelelő volt, az immunkémiai vizsgálatok során a szérum IgG, IgA és IgM immunglobulin szintek a korspecifikus normál tartományban voltak mérhetőek.

Az egészséges kontrollok tünetmentes személyek voltak.

5.2 Laboratóriumi vizsgálatok

A vérvétel aszeptikus körülmények között történt. A klinikai kémiai és immunológiai paraméterek meghatározását rutin laboratóriumi tesztekkel a vérvétel napján végezték el.

5.3 Molekuláris genetikai és biológiai vizsgálatok

5.3.1 DNS izolálás

Etilén-diamin-tetraacetáttal (EDTA) alvadásgátolt perifériás vérmintából genomiális DNS-t (gDNS) izoláltunk Gen ELUTE BloodGenomic DNA mini kit (Sigma-Aldrich Ltd., St. Louis, Missouri, USA) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően. A gDNS koncentrációját és tisztaságát (normál érték 1,7 és 1,9 között van) spektrofotométerrel (NanoDrop 2000) határoztuk meg.

5.3.2 Amplifikációs polimeráz láncreakció (PCR) és agaróz gélelektroforézis

A *STAT1* és az *SH2D1A* gének proteint kódoló szakaszának és az exon-intron határok vizsgálatát végeztük el bidirekcionális DNS szekvenálással.

Polimeráz láncreakcióval (PCR) specifikus intronikus primer párokat használatával felszorzottuk a vizsgálni kívánt DNS szakaszokat. A reakcióelegyek 12,5 µl JumpStart RedTaq Ready Mixet (Sigma-Aldrich), 100-200 ng gDNS mintát, 0,5 µl forward és 0,5 µl reverse primereket (koncentráció: 10 pmol/ml) tartalmaztak, amelyeket desztillált vízzel 25 µl-re egészítettünk ki. A polimeráz láncreakció során GeneAmp® PCR System 2720 és 2700 készülékeket (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) használtuk.

A felszorzósított PCR termékek méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A DNS fragmentumok detektálására 2%-os agarózgél, fluoreszcens jelzésként GelRed-et (Biotium, Hayward, CA, USA) és DNS markerként, EasyLadder I –t (2000 bp-100 bp; Bionline, London, UK) használtunk. (A GelRed a DNS-molekulához kapcsolódik és UV transzilluminátor segítségével UV fényben vörösés-narancs színben fluoreszkál.)

Ha a PCR reakciónk eredményes és specifikus volt, akkor a PCR termékek megtisztítása következett. Az amplifikációs PCR termék tisztításához NucleoSpin Gel and PCR clean-up kitet (Macherey-Nagel; Düren, Germany) használtunk. Az oszlop szilika membránja megköti a DNS-t, a mosó puffer biztosítja a szennyeződések (nukleotidok, primerek, detergensok, sók) eliminációját.

5.3.3 Szekvenálási PCR

A szekvenálási PCR folyamán a már felszorzított kétszálú DNS fragmentumokhoz csak a primer pár egyik tagját adjuk, így a reakció során egyszálú DNS szakaszt sokszorozunk fel. A fluoreszcens festékekkel jelölt ddNTP-k véletlenszerűen beépülnek az új szálba és leállítják a reakciót, így eltérő hosszúságú egyszálú DNS szakaszok jöttek létre, amelyek a 3' végen jelöltek. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 8,5 µl desztillált víz, 4 µl puffer (Applied Biosystem), 2,5 µl Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystem), 1 µl forward primer vagy reverse primer (5 pmol/ml), és 4 µl tisztított amplifikációs PCR termék. A PCR reakcióhoz GeneAmp® PCR System 2720 és 2700 készülékeket (Applied Biosystems) használtuk. A szekvenálási PCR termékek megtisztításához Sigma Spin Post Reaction Purification Columns zselés tisztító oszlopokat (Sigma-Aldrich Ltd.) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A tisztított PCR mintákat ezt követően előkészítettük a szekvenálásra: vákuumcentrifugával a minták bepárlása, formamidban felvételük és denaturálásuk 95°C-on. A célzott szekvenálás ABI 3130 DNS automata szekvenáló készülék (Applied Biosystems) segítségével történt.

5.3.4 Szekvenálási adatok (szekvenogramok) kiértékelése

Az eredmények kiértékeléséhez a GenBank adatbázisát használtuk (*STAT1*: Ensembl ENSG00000115415; *SH2D1A*: Ensembl ENSG00000183918). A cDNS iniciációs kodonjának (ATG) adeninje felel meg az első nukleotidnak a sorrend számításakor. A mutációk leírásához den Dunnen and Antonarakis 2001-ben megjelent tudományos közleményüket vettük alapul (den Dunnen and Antonarakis, 2001). Az azonosított mutációkat a Human Gene Mutation Database Professional (HGMD) adatbázisban található mutációkkal hasonlítottuk össze (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac>).

5.3.5 cDNS vizsgálata és Real-time PCR

A teljes RNS-t PBMC sejtekből Trizol reagenst (Invitrogen Life Technology, Carlsbad, California, USA), kloroformos extrakciót és etanolos kicsapást alkalmazva izoláltuk. A reverz transzkriptáz reakcióhoz (RT-PCR) Superscript III first-strand synthesis supermixet (Invitrogen) és random hexamert használtunk. Az *SH2D1A* gén első és negyedik

exonjára tervezett primerekkel sokszoroztuk fel a vizsgálni kívánt génszakaszt. Az RT-PCR termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük. A kvantitatív real-time PCR-t TaqMan teszt (Hs00158978_m1; Applied Biosystems) segítségével végeztük és a mintákat triplikátumban mértük meg. Komparatív Ct módszert alkalmazva határoztuk meg a transzkriptumok mennyiségét a GAPDH expresszióhoz normalizálva.

5.3.6 Perifériális vér mononukleáris sejtek izolálása

A betegek és egészséges kontrollok heparinal alvadásgátolt perifériális vérmintájából sűrűség gradiens centrifugálással (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) mononukleáris sejteket (PBMC; peripheral mononuclear cells) izoláltunk, majd a sejteket 1X foszfát puffer sóoldattal (PBS; Phosphate buffer saline; Sigma-Aldrich) többször mostuk.

5.3.7 B sejtek immortalizálása Epstein-Barr vírussal

A B95:8 Epstein-Barr vírust termelő sejtvonalat (folyékony nitrogénből gyorskiolvasztás után) RPMI-ben (Sigma-Aldrich) szuszpendáltuk fel, ami 10% foetal bovine serum-ot (FBS), 100 U/ml penicillint és 10 µg/ml streptomycint tartalmazott, majd 3 héten keresztül tenyésztettük a sejteket. Az EBV-t tartalmazó médiumot centrifugálás után először 0,45 µm (Merk Millipore, Darmstadt, Germany), majd 0,22 µm (VWR, Radnor, PA, USA) szűrő segítségével sterilre szűrtük és felhasználásig -70°C-on tároltuk. A PBMC sejteket PBS mosást követően kétszer mostuk Hanks balanced salt solution (HBSS; Sigma-Aldrich) oldattal. 10⁷/ml sejtet 2,5 ml RPMI-ben (kiegészítve 10% FBS-sel és 1 µg/ml cyclosporin A (CyA; Sigma-Aldrich)-val) tenyésztettünk, majd hozzáadtunk 2,5 ml EBV szuszpenziót és 2 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk, majd 5 ml RPMI (10% FBS és 1 µg/ml CyA) -vel egészítettük ki a sejtuszuszpenziót. A sejteket 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó termosztátban tenyésztettük 3 hétig.

5.3.8 *Candida* szuszpenzió készítése és PBMC sejtek stimulálása *Candida* szuszpenzióval

Candida albicans-t (ATCC 10231) Sabouraud dextróz agaron 4°C-on tartottuk, majd Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) –ba oltottuk át, ami 100 U/ml penicillint és

10 µg/ml streptomycint tartalmazott. A gomba sejtek hőinaktiválását 56°C-on 1 órán keresztül végeztük és a *Candida* sejt szuszpenzió sűrűségét 1×10^6 sejt/ml koncentrációra McFarland densitóméterrel állítottuk be.

A PBMC-t Krebs-Ringer foszfát pufferrel történő mosást követően DMEM médiumban tenyésztettük a sejteket. 96 mélyedést tartalmazó lemezt használva 5×10^5 sejt/mélyedés koncentrációban sejtuszpenziót és/vagy 1×10^5 *Candida*/mélyedés gombaszuszpenziót tartalmazott. 48 órán keresztül inkubáltuk, a felülúszót centrifugálás után -20°C-on tároltuk.

5.3.9 Termelődött citokinek koncentrációjának meghatározása enzim-kötött immunsorbens vizsgálat (ELISA) segítségével

IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17A és IL-22 citokinek koncentrációját *Candida*-stimulált PBMC sejtek felülúszójából határoztuk meg szendvics enzim-kötött immunsorbens vizsgálat (Quantikine, R&D Systems, Minnesota, USA) segítségével. A mintákat duplikátumban vagy triplikátumban vittük fel.

5.3.10 Luciferáz teszt

1×10^4 sejt /mélyedés koncentrációban U3C (STAT1-hiányos fibrosarcoma sejtvonal) sejteket tapasztottunk le 96 mélyedést tartalmazó lemezt használva. A sejteket riporter plazmiddal (Cignal GAS Reporter Assay kit, SA Biosciences) és a normál valamint a mutációt hordozó *STAT1* gént tartalmazó plazmidokkal (c.537C>A, c.821G>A és c.854A>G *STAT1* allélok) transzfektáltuk Lipofectamine LTX (Invitrogen) jelenlétében. A transzfektált sejteket IFN- γ -val (10U/ml és 1000U/ml) stimuláltuk és 16 óra múlva luciferáz tesztet végeztünk a Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) segítségével. A mintákat triplikátumban vittük fel. A vizsgálat kollaboráció keretében történt Prof. Dr. Jean-Laurent Casanova laboratóriumában.

5.3.11 IP-10 termelés vizsgálata ELISA módszerrel

Az EBV-transzformált sejteket 1000 U/ml IFN- γ -val stimuláltuk 6 órán keresztül, majd a felülúszóból meghatároztuk a termelődött IP-10 mennyiségét ELISA módszerrel (Quantikine, R&D Systems). A módszert Takezaki és munkatársai 2012-ben megjelent tudományos közleményében leírtak szerint végeztük (Takezaki, 2012).

5.3.12 IL-17+ T sejtek differenciálata

Betegek és egészséges kontrollok perifériás mononukleáris sejtjeit RPMI médiumban (10 % FBS és 1 % Pen-Strep) tenyésztettük és 4 óráig inkubáltuk 37°C-on, hogy az adherens monociták letapadjanak, ezt követően a nem-adherens limfocitákat ($1,5 \times 10^6$ sejt/ml) anti-CD3 antitesttel (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) aktiváltuk és különböző citokinek tartalmazó koktéllal kezeltük: rekombináns human interleukin (IL)-23 (20 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml), és human növekedési faktor (transforming growth factor, TGF)-1 β (5 ng/ml); mindegyik citokin forgalmazója a PeproTech (London, UK). Két nap elteltével friss teljes RPMI médiumot adtunk a sejtekhez, amely a fenti citokinek az említett koncentrációban tartalmazta, ezen kívül IL-2 (22 ng/ml) citokint adtunk a sejtekhez. Újabb két nap elteltével friss RPMI médiumot kiegészítve citokinekkel. A következő napon a sejteket 50 ng/ml phorbol 12-mirisztát 13-acetáttal (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA; Sigma-Aldrich) és 10^{-5} M ionomicin-nel (ionomycin, IMC; Sigma-Aldrich) kezeltük 1 μ g/ml Golgi stop (Sigma-Aldrich) jelenlétében 6 órán keresztül 37°C-on. A módszert Liu és munkatársai 2011-ben megjelent tudományos közleményében leírtak szerint végeztük kisebb módosításokkal (Liu, 2011).

5.4 Különböző fehérje frakciók izolálása és vizsgálata Western blot módszerrel

5.4.1 STAT1 fehérje vizsgálata Western blot módszerrel

Az EBV-transzformált B sejteket IFN- γ (2000 U/ml), IFN- α (2000 U/ml) vagy IL-27 (2000 U/ml) citokinekkel stimuláltuk 30 percen keresztül és a Subcellular Protein Fractionation kit for Cultured Cells (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) segítségével

sejtmagi fehérjét vontunk ki a gyártó utasításainak megfelelően. A vizsgálataink következő részében a sejteket 30 percen keresztül 2000 U/ml IFN- γ -val, majd 15 vagy 30 percen át 1 μ M staurosporin-nal (Sigma-Aldrich) kezeltük és a fenti kit segítségével sejtmagi fehérjét izoláltunk. Foszfátáz gátló pervanadáttal (0,8 mM orthovanadát és 0,2 mM hidrogén-peroxid; Sigma-Aldrich) 5 percig kezeltük az EBV-B sejteket, majd 30 percig inkubáltuk IFN- γ -val és a fent említett kit segítségével sejtmagi fehérjét izoláltunk. A sejtmagi fehérjéket denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk szét méret szerint, majd polivinildifluorid (PVDF) membránra blottoltuk. Elsődleges antitestként STAT1 nyúl IgG antitestet (Santa-Cruz), foszforilált human STAT1 (pY701) egér IgG₁ antitestet (BD Biosciences), Lamin B1 egér IgG₁ antitestet (Santa-Cruz) használtunk, majd mosás után tormaperoxidáz-konjugált kecske anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel (Sigma-Aldrich) vagy tormaperoxidáz-konjugált bárány anti-egér IgG másodlagos antitesttel (Sigma-Aldrich) jelöltük a membránt. Kemilumineszcenciás (Thermo Science, Rockford, IL, USA) módszert alkalmaztunk a detektáláshoz. A módszert Liu és munkatársai 2011-ben, illetve Takezaki és munkatársai 2012-ben megjelent tudományos közleményekben leírtak szerint végeztük kisebb módosításokkal (Liu, 2011; Takezaki, 2012)

5.4.2 SAP fehérje vizsgálata Western blot módszerrel

A SAP fehérje expresszióját Western blot módszerrel határoztuk meg. Mononukleáris sejteket 6mélyedést tartalmazó lemezen 5 ml teljes RPMI médiumban inkubáltuk 1×10^6 koncentrációban 2000 ng/ml phytohaemagglutinin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) jelenlétében vagy hiányában 72 órán keresztül. Teljes fehérjéket denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk szét méret szerint, majd polivinildifluorid (PVDF) membránra blottoltuk. Indirekt jelölést használtunk a SAP fehérje kimutatásához. Elsődleges antitestként SAP-specifikus nyúl szérumot használtunk, majd mosás után tormaperoxidáz-konjugált szamár anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) jelöltük a membránt. Kemilumineszcenciás (Thermo Science, Rockford, IL, USA) módszert alkalmaztunk a detektáláshoz. Aktin kontroll mellett végeztük a kísérletet (aktinra specifikus nyúl poliklonális antitest; Sigma-Aldrich). A vizsgálat Dr. Lányi Árpád laboratóriumában, kollaborációs vizsgálat keretében történt.

5.5 Áramlási citometriás vizsgálatok

5.5.1 IL-17+ T sejtek meghatározása áramlási citometria segítségével

A már differenciált IL-17+ T sejteket mosó pufferrel (2% FBS-BSA-PBS) mostuk. A sejtfelszíni jelöléshez a sejteket allophycocianin (APC)-konjugált egér anti-hCD4 IgG₁ monoklonális antitesttel (mAb) (BD, San Jose, California, USA) vagy fluoreszcein izotiocianát (FITC)-konjugált egér anti-CD3 IgG₁ antitesttel (BD) inkubáltuk 30 percen keresztül 4°C-on. A sejteket Fix & Perm „A” (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) oldattal 15 percen keresztül fixáltuk 4°C-on, majd mosást követően Fix & Perm „B” permeabilizáló oldatban (Invitrogen) inkubáltuk a sejteket phycoerythrin (PE)-konjugált egér anti-human IL-17A IgG₁ antitest (R&D Systems, Minneapolis, Minneapolis, USA) és fluoreszcein izotiocianát-konjugált anti-human IL-22 IgG₁ monoklonális antitest (R&D Systems) jelenlétében 30 percen keresztül 4°C-on. Mosási lépések után 1%-os paraformaldehide-ben vettük fel a sejteket és Accuri C6 áramlási citométerrel mértük meg a sejtarányokat (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

5.5.2 SAP protein expressziójának vizsgálata áramlási citometriával

Sejtfelszíni jelölésként peridinin-chlorophyll fehérje-konjugált egér anti-CD3 (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA), phycoerythrin-konjugált egér anti-CD8 (Sigma-Aldrich) és allophycocyanin-konjugált egér anti-CD56 (Beckton Dickinson) antitesteket használtunk 20 percen keresztül szobahőmérsékleten. A mintákat Fix & Perm „A” (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) oldattal 20 percen keresztül fixáltuk, majd mosást követően Fix & Perm „B” permeabilizáló oldatban inkubáltuk a sejteket patkány IgG₁ isotípus kontrollal (Beckton Dickinson) vagy patkány anti-SH2D1A nem-konjugált monoklonális antitesttel (klón: KST-3) 20 percen át szobahőmérsékleten. Mosási lépéseket követően 1%-os paraformaldehide-ben vettük fel a sejteket és FACS Calibur áramlási citométert használtunk a méréshez (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A vizsgálatok a DE KK III. Belgyógyászat Immunológiai Laboratóriumával kollaborációban történtek.

5.5.3 Foszforilált-STAT1 vizsgálata áramlási citometriával

EBV-transzformált limfocita sejteket (5×10^6 sejt/ml) szérummentes RPMI-ben (Sigma-Aldrich) szuszpendáltuk és 15 percen keresztül 1000 IU/ml IFN- γ -val inkubáltuk 37°C-on. A sejteket 0,5 μ M staurosporin-nal (Sigma-Aldrich) kezeltük 15 vagy 30 percen keresztül, az aktiválást hideg PBS-sel állítottuk le. A sejtek fixálásához Fix & Perm „A” (Invitrogen) oldatot használtunk. Az elsődleges antitest anti-pSTAT1 (pY701, Beckton Dickinson) volt, majd másodlagos antitestként Alexa Fluor 488 konjugált anti-egér IgG (Cell Signaling) használtunk. Mosási lépéseket követően a sejteket 1% paraformaldehidben fixáltuk és Accuri C6 áramlási citométerrel mértük meg a pSTAT1 expresszióját. A módszer kidolgozásához Mizoguchi és munkatársai 2014-ben megjelent közleménye szolgált, kisebb változtatásokat alkalmaztunk (Mizoguchi, 2014).

6 EREDMÉNYEK

6.1 IL-17-mediált immunitás és krónikus mucocutan candidiasis

6.1.1 A *STAT1* gén molekuláris genetikai vizsgálata

A CMC klinikai tüneteit mutató betegekben meghatároztuk a *STAT1* gén fehérjét kódoló szakaszának és az exon-intron határok nukleotid sorrendjét automata DNS szekvenálással. A kilenc betegben aminosav cserével járó pontmutációkat azonosítottunk heterozigóta formában (1. táblázat, 7. ábra). A mutációk a kettős tekercs domént (CCD) és a DNS-kötő domént (DBD) érintették (1. táblázat).

Ország	Beteg (életkor)	Mutáció	Aminosav eltérés	Domén
Csehország	P1 (9*)	c.537C>A	N179K	CCD
Csehország	P2 (40)	c.800C>T	A267V	CCD
Csehország	P3 (13)	c.800C>T	A267V	CCD
Magyarország	P4 (49)	c.820C>T	R274W	CCD
Magyarország	P5 (18)	c.820C>T	R274W	CCD
Oroszország	P6 (18)	c.821G>A	R274Q	CCD
Oroszország	P7 (10)	c.854A>G	Q285R	CCD
Ukrajna	P8 (14)	c.1154C>T	T385M	DBD
Ukrajna	P9 (22)	c.494A>G	D165G	CCD

1. Táblázat A CMCD betegekben azonosított *STAT1* mutációk

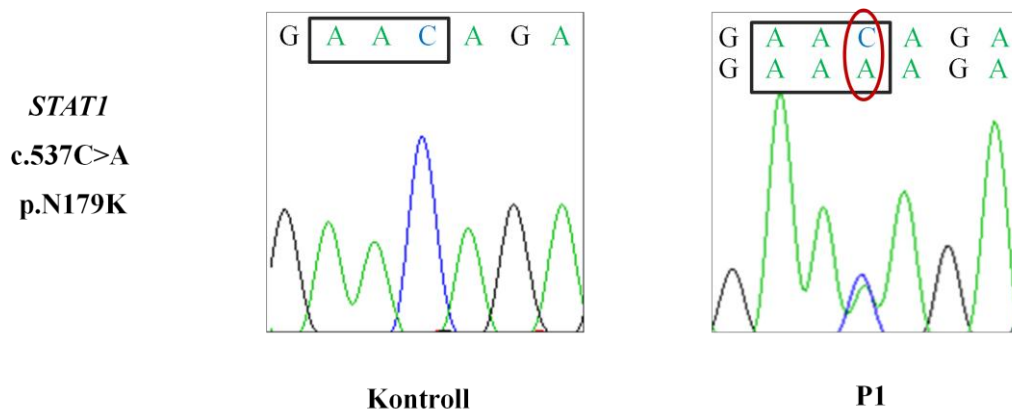
CCD: kettős tekercs domén, DBD: DNS-kötő domén, P: beteg (patient) (Félkövérrel kiemelve az általunk azonosított új mutációk láthatóak.)

A kilenc beteg közül hét esetben korábban már leírt mutációkat azonosítottunk és kettő esetben (P1, P7) új mutációkat találtunk. A P4, P5 betegek (Tóth, 2012) és P9 beteg (Liu, 2011) esetében az eredmények korábban már közlésre kerültek. A P1 betegben azonosított heterozigóta citozin-adenin csere a STAT1 protein 179-es aminosav pozíciójában aszparagin-lizin cserét eredményez a kettős tekercs doménon belül (1. táblázat, 7. A ábra). A P7 beteg esetében szintén új mutációt azonosítottunk, az adenin-guanin csere következtében megváltozik a bázis triplet és glutamin helyett arginin kódolódik a protein 285 aminosav pozíciójában, ami a kettős tekercs domént érinti (1. táblázat, 7. B ábra).

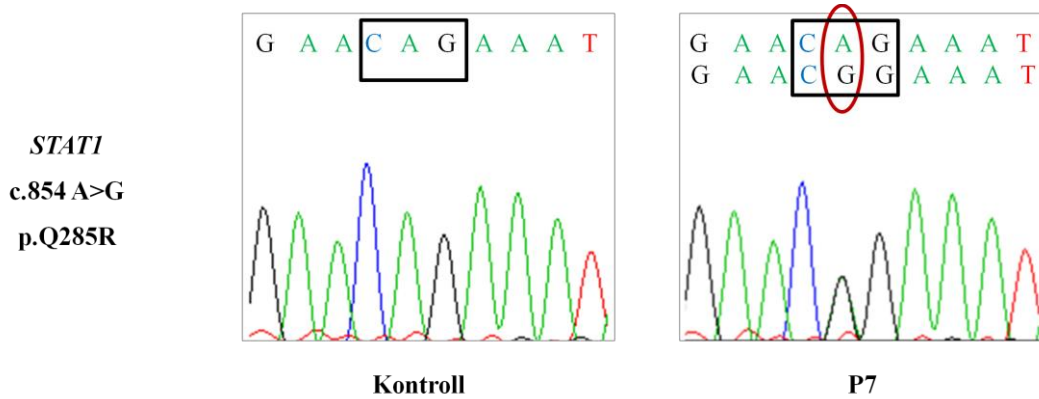
A P2 beteg a P3 beteg édesanyja, a P4 és P5 betegek szintén családtagok, a P5 lánygyermek édesanyja a P4 beteg, az ő esetükben, irodalomban szereplő, ismert mutációt azonosítottunk. A P6, P8 és P9 betegeknél is ismert STAT1 szekvencia variánsokat detektáltunk (1. táblázat).

A funkcionális tesztekhez felhasznált Epstein-Barr vírus-transzformált B sejtvonalon sejteiben Sanger szekvenálással ellenőriztük, hogy a genomiális DNS-en korábban azonosított mutáció jelen van-e és megerősítettük ugyanazokat a genetikai eltéréseket, amit előzőleg találtunk. (8. ábra)

A

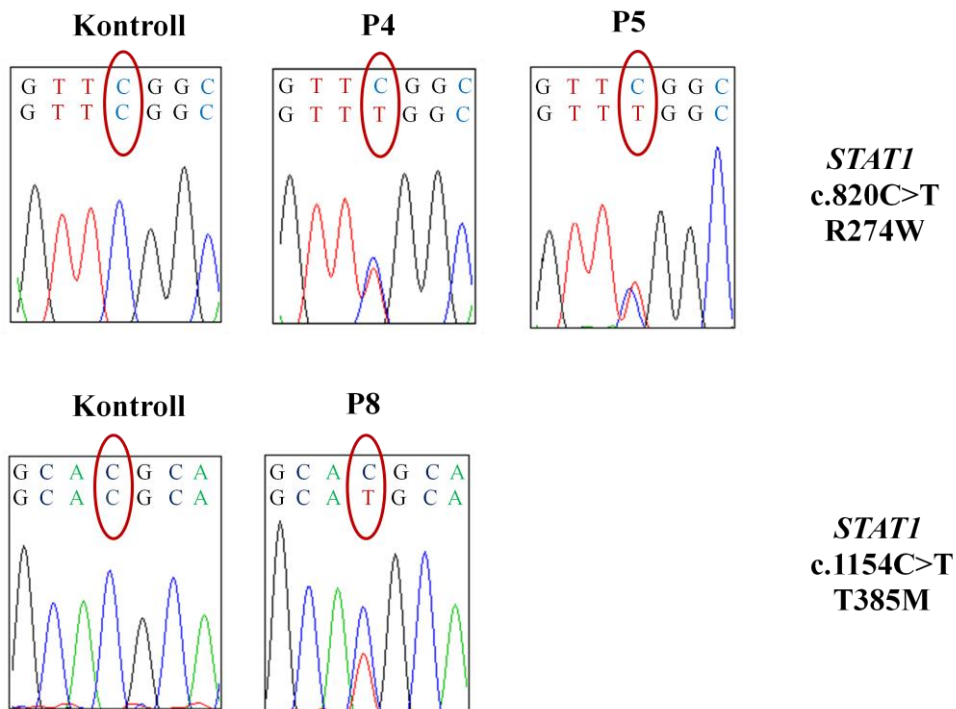


B



7. Ábra A *STAT1* gén molekuláris genetikai vizsgálata

A CMCD betegek és egészséges kontrollok perifériás véréből genomiális DNS-t izoláltunk, majd Sanger szekvenálással meghatároztuk a *STAT1* gén nukleotid sorrendjét. P: beteg



8. Ábra A CMCD betegek EBV-B sejtjeinek molekuláris genetikai analízise

A CMCD betegek és egészséges kontrollok EBV- transzformált B sejtjeiből DNS-t vontunk ki, majd megfelelő primer pár segítségével a *STAT1* gén adott szakaszait ellenőriztük Sanger szekvenálással. A funkcionális tesztek végzéséhez használt EBV-B sejtek hordozzák a mutációkat.

6.1.2 Új, mutációs adatbázisban nem szereplő *STAT1* szekvencia variánsok patogenitásának az igazolása

Az általunk azonosított 2 új *STAT1* genetikai eltérés (N179K, Q285R) patogenitásának igazolása vált szükségessé. Első lépésként megnéztük, hogy a két mutáció szerepel-e adatbázisokban, mint az egészséges populációban jelenlévő polimorfizmus. Az NCBI SNP és az ExAc (Exome Aggregation Consortium) adatbázis egyikében sem szerepelt a N179K és Q285R mutáció a polimorfizmusok között (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>, <http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000115415>). Az *in silico* teszthez a Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) predikciós szoftvert használtuk (Adzhubei, 2010). A szoftverek működésének elve az aminosavcsere fehérjeszerkezetére és funkciójára gyakorolt lehetséges hatás elemzése az adatbázisban található homológ szekvenciák és szerkezeti jellemzők összehasonlító vizsgálata alapján. A 2. táblázatban összefoglaltuk az általunk azonosított, mutációs adatbázisokban eddig nem talált mutációk predikciós eredményeit a PolyPhen-2 szoftver adatai alapján. A PolyPhen-2 szoftver a N179K és Q285R aminosav cseréket „jóindulatú” („benign”) eltérésként prediktálta, illetve a N179 és Q285 aminosav pozíciókban magas fokú konzerváltságot láttunk.

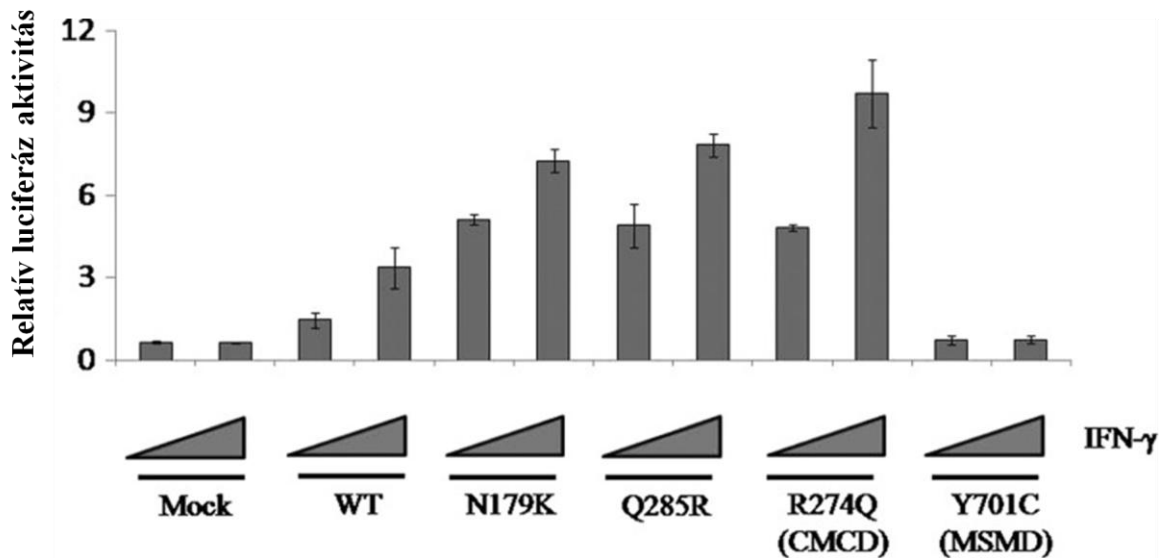
	Eredmény	Score	Érzékenység (Sensitivity)	Specifitás (Specificity)
N179K	„Jóindulatú”	0,004	0,97	0,59
Q285R	„Jóindulatú”	0,003	0,98	0,44

2. Táblázat Az új mutációk prediktált eredményei a PolyPhen-2 szoftver által

A táblázatban összefoglalásra került az új mutációknak a szoftver által előre megjósolt lehetséges funkcionális következményei. (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

6.1.3 Az N179K és Q285R mutációk STAT1 protein funkciójára gyakorolt hatásának vizsgálata (Luciferáz teszt)

A STAT1 kettős tekercs doménjét érintő N179K és Q285R mutáns STAT1 fehérjék γ -aktivált faktor (GAF)-függő sejtválaszait luciferáz teszt segítségével vizsgáltuk.



9. Ábra IFN-gamma aktivált szekvencia (GAS)-függő riporter gén transzkripciójának indukálása U3C sejtekben IFN- γ stimulust követően. (Luciferáz teszt)

Tizenhat óra 10 U/ml vagy 1000 U/ml IFN- γ stimulust követően mértük meg a riporter gén luciferáz aktivitását a GAS promoter ellenőrzése alatt. A relatív luciferáz aktivitás mutatja a GAS transzkripció aktivitását. Az üres („mock”) és a MSMD-t okozó allélok (Y701C) szolgáltak negatív kontrollként, a CMCD-t okozó allél (R274Q) szolgált pozitív kontrollként. A mutáns plazmidokat STAT1-null fibroszarkóma sejtvonalba (U3C sejtek) transzfektáltuk. Az új allélok esetében kétszer-háromszor magasabb luciferáz aktivitást mértünk, mint a vad típusú vagy negatív kontrollként használt MSMD allél esetén. (A vizsgálat kollaborációs kutatómunka keretében Prof. Dr. Jean-Laurent Casanova professzor úr által vezetett laboratóriumban készült)

GAS: IFN-gamma-aktivált szekvenciák, IFN, Interferon, MSMD: Mendeli fogékonyság a mycobakteriális betegségekre, Wt: vad típus (wild-type), mock: üres vektor

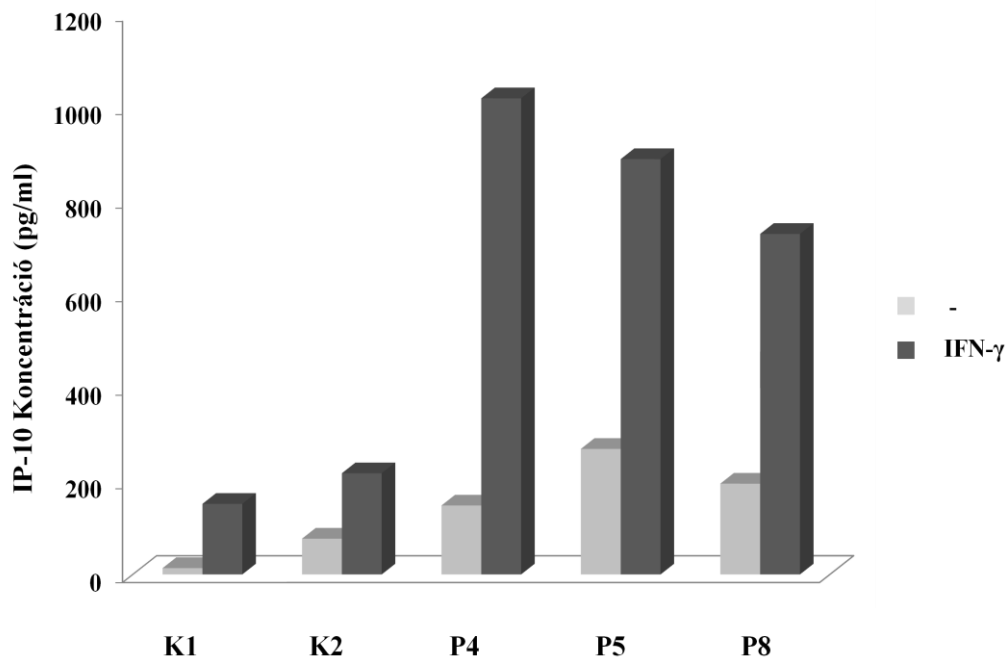
Mutagenézis kittel mesterségesen létrehoztuk a mutációkat a STAT1 vad típusú plazmidon, a mutagenézis sikerességét és az esetleges egyéb helyen keletkezett mutációk kizárása érdekében a szekvenciát szekvenálással ellenőriztük. Lipofektamin segítségével transzfektáltuk U3C (STAT1-null) sejtvonalba a plazmidokat és IFN- γ stimulust követően vizsgáltuk γ -aktivált faktor (GAF)-függő sejtválaszokat. A citokinre adott válaszokat a

riporter gén luciferáz aktivitásának mérésével határoztuk meg. A két új mutáció (N179K és Q285R) és a pozitív kontrollként használt, korábban bizonyítottan CMCD-t okozó allél (R274Q) esetében kétszer-háromszor magasabb luciferáz aktivitást mértünk, a vad típusú és ismert MSMD-t okozó funkcióvesztő Y701C (Ives, 2013; Hirata, 2013) allélhoz képest. A kapott eredmények mutatják, hogy az új mutációk funkciónyerő *STAT1* mutációk (9. ábra).

A vizsgálatok kollaborációban Prof. Dr. Jean-Laurent Casanova professzor úr által vezetett laboratóriumban történtek.

6.1.4 IP-10 termelés vizsgálata CMCD betegeknél

A CMCD betegekből izolált mononukleáris sejteket EBV-vel immortalitáltuk és az EBV-transzformált limfocitákat IFN- γ -val stimuláltuk, a felülúszóból ELISA módszerrel meghatároztuk az IP-10 koncentrációját.



10. Ábra IP-10 termelés vizsgálata CMCD betegek EBV-B sejtjeinek felülúszójából

A betegek (P4, P5, P8) EBV-B sejtjeit IFN γ -val stimuláltuk 6 órán keresztül, majd a felülúszókból határoztuk meg az IP-10 mennyiségét. A P4 (R274W), P5 (R274W) és P8 (T385M) betegek sejtjei magasabb koncentrációban szekretálják az IP-10 fehérjét, mint az egészséges kontrollok, ami a STAT1 funkciónyerésére utalhat.

EBV: Epstein-Barr vírus, IFN: Interferon, P: beteg, K: Kontroll, STAT1: signal transducer and activator of transcription 1

Az IP-10 termelés a P4 (R274W), P5 (R274W) és P8 (T385M) betegek EBV-transzformált limfocitái által sokkal magasabb volt, mint egészséges kontrollok esetében (10. ábra). A magas IP-10 termelés utal arra, hogy a mutációk funkciónyerő STAT1 mutációk, ugyanis az IP-10 a STAT1 "downstream" célpontja. A magas IP-10 mennyiséget korábban Takezaki és munkatársai igazolták funkciónyerő STAT1 mutáció esetén (Takezaki, 2012). (10. ábra)

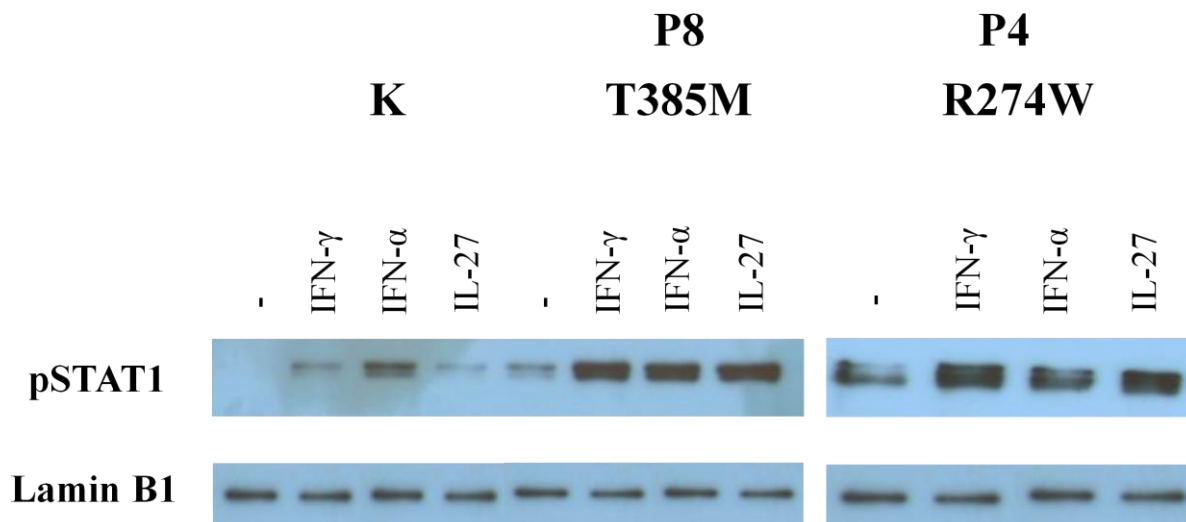
6.1.5 CMCD betegek STAT1 defoszforilációs és foszforilációs képességének vizsgálata Western blot módszerrel

Ahhoz, hogy meghatározzuk a funkciónyerő mutáció mechanizmusát, tanulmányoztuk a STAT1 foszforilációját: két beteg (P4 és P8) esetében a pSTAT1 és a STAT1 fehérje expresszióját Western blot módszerrel vizsgáltuk. Az EBV-transzformált limfocita vonalakat (P4 és P8) különböző citokinekkel (IFN- γ , IFN- α és IL-27, amik aktiválják a STAT1 molekulát; Liu, 2011) aktiváltuk és vizsgáltuk az expresszáldott STAT1 protein és a foszforilálódott STAT1 (pSTAT1) fehérje mennyiségét. A R274W és a T385M mutáció esetében nagyobb mennyiségben volt kimutatható a pSTAT1 fehérje a kontroll mintához képest a sejtmagi fehérje extraktumban, ami a funkciónyerő STAT1 foszforiláció domináns megnyilvánulására utal (11. ábra).

Az EBV-transzformált sejteket ismét IFN- γ -val aktiváltuk, de különböző időpontokban staurosporinnal kezeltük, hogy vizsgálni tudjuk a defoszforilációt. A tirozin-kináz inhibitor, staurosporin kezelést követően az egészséges kontroll sejtekben a pSTAT1 mennyisége lecsökkent, viszont ez nem következett be a R274W és T385M mutáns allélt hordozó betegek esetében, ugyanis a funkciónyerő mutációnak köszönhetően elveszthetik a defoszforilációs képességet (12. A ábra).

Ezzel ellentétben a foszfatáz inhibitor, pervanadát hatására a T385M és R274W allélok STAT1 foszforilációja hasonló volt az egészséges kontrollhoz (12.B. ábra).

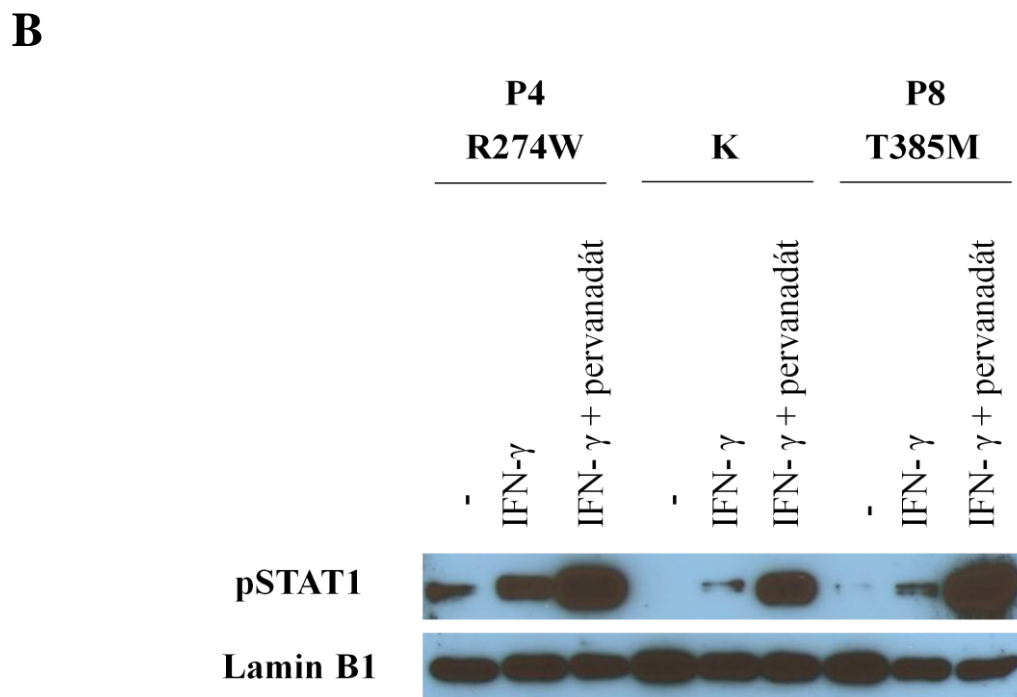
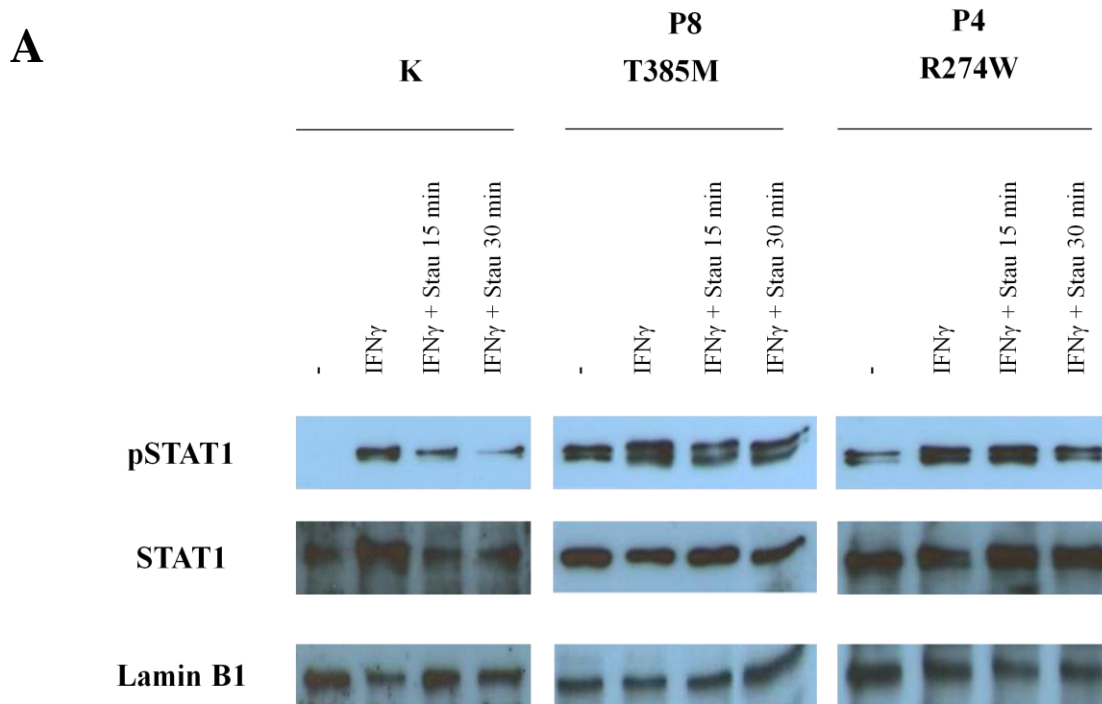
Az eredményeink alátámasztják a feltételezésünk, mely szerint a R274W és T385M STAT1 mutáns aminosav cserék a STAT1 hiperfoszforilációjához vezetnek, melynek a hátterében a defoszforiláció károsodása állhat.



11. Ábra Sejtmagi extraktumokban a STAT1 és pSTAT1 expressziójának vizsgálata Western blot módszerrel

EBV-transzformált B sejteket 2000 U/ml IFN- γ , 2000 U/ml IFN- α vagy 2000 U/ml IL-27 citokinekkal kezeltük 30 percen keresztül, majd sejtmagi extraktumot vontunk ki és Western blot módszerrel vizsgáltuk a fehérjék expresszióját. A T385M (P8) és az R274W (P4) allélt hordozó beteg STAT1 fehérjéi erősebben foszforiláltak IFN- γ , IFN- α és IL-27 citokinek hatására, mint a vad típusú sejtekben.

EBV: Epstein-Barr vírus, IFN: Interferon, P: beteg, STAT1: signal transducer and activator of transcription 1



12. Ábra STAT1 defoszforilációjának és foszforilációjának vizsgálata Western blot módszerrel

A panel: 2000 U/ml IFN- γ -val stimuláltuk, majd 15 és 30 percen keresztül tirozin kináz inhibitorral, staurosporinnal (1 μ M) kezeltük az EBV-transzformált sejteket, sejtmagi extraktumot vontunk ki és Western blot módszerrel vizsgáltuk a fehérjéket. Egészséges kontroll sejtek esetében a staurosporin kezelést követően elindul a STAT1 defoszforilációja, de ez nem következik be a T385M (P8) és az R274W (P4) allélt hordozó betegek esetén.

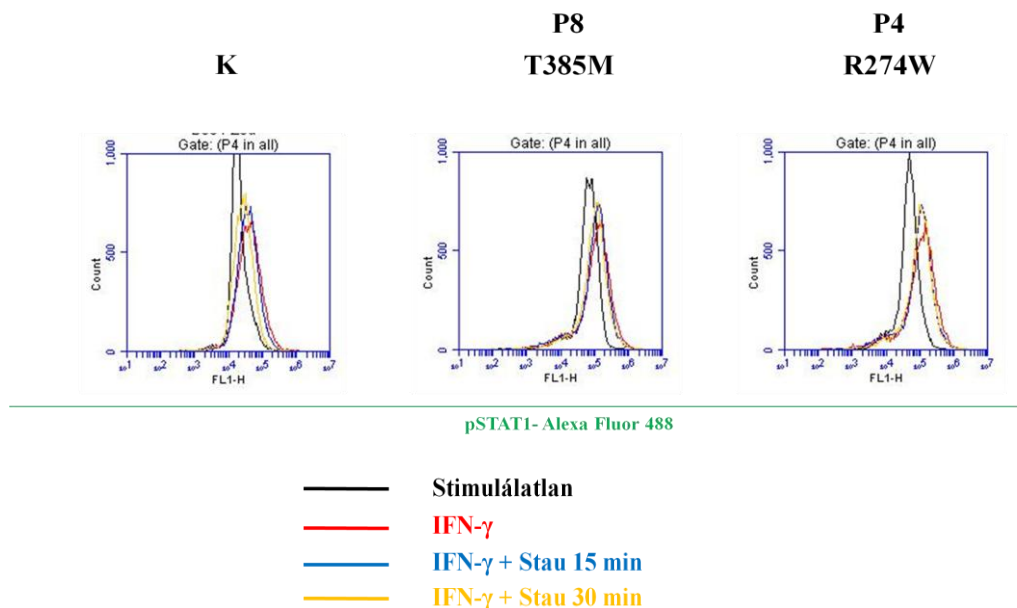
B panel: Az EBV-B sejteket foszfatáz inhibitor, pervanadáttal kezeltük 5 percen keresztül, majd 2000 U/ml IFN- γ -val stimuláltuk, és sejtmagi extraktumot vontunk ki. A T385M (P8) és az R274W (P4) allélt hordozó betegek esetén magasabb foszforilációt tapasztaltunk, mint vad típusú sejtek esetén.

EBV: Epstein-Barr vírus, IFN: Interferon, Stau: staurosporin, P: beteg, STAT1: signal transducer and activator of transcription 1

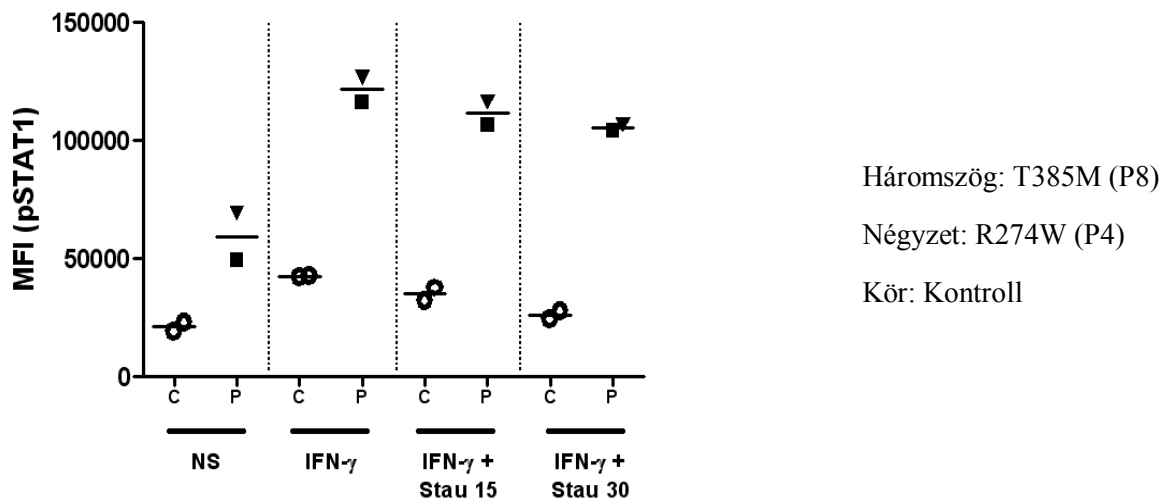
6.1.6 Foszforilált-STAT1 vizsgálata áramlási citometriával

Az EBV-B sejteket IFN- γ -val stimuláltuk majd tirozin kináz inhibitorral (staurosporin) kezeltük 15 és 30 percen keresztül, a reakciót leállítottuk és pSTAT1 antitesttel intracellulárisan jelöltük az áramlási citometriás vizsgálatokhoz. Magasabb IFN- γ indukált pSTAT1 intenzitást mértünk a CMCD betegeknél (R274W és T385M), mint egészséges kontroll esetén Accuri C6 áramlási citométerrel. A STAT1 defoszforilációjának vizsgálatához staurosporint használtunk IFN- γ stimulust követően. Ahogy Western blot módszert alkalmazva már tapasztaltuk egészséges kontroll esetén a staurosporin hatására a pSTAT1 szintje lecsökken a gátló mechanizmus következményeként, a betegeknél a pSTAT1 intenzitása alig változott staurosporin kezelés hatására (13. A. ábra). A MFI értékek összefoglalását a 14. B ábra mutatja, melyen jól látszódik, hogy a pSTAT1 szintje magasabb volt a betegeknél, mint a kontrollnál (13. B. ábra). Feltételezésünk szerint a foszforiláció elhúzódik, tovább tart a betegeknél, tehát a defoszforiláció folyamata károsodhat.

A



B



13. Ábra pSTAT1 expressziójának vizsgálata áramlási citométerrel EBV-B sejtekben

Az EBV-transzformált B sejteket 1000 U/ml IFN- γ -val stimuláltuk, majd 15 vagy 30 percen keresztül staurosporinnal (0,5 μ M) kezeltük. A pSTAT1 expresszióját Accuri C6 áramlási citométerrel mértük meg. A T385M (P8) és az R274W (P4) allélt hordozó betegek esetén a defoszforiláció folyamata károsodott, a vad típusú sejtek esetében a defoszforiláció végbe megy staurosporin hatására. A pSTAT1 intenzitásának hisztogramjait (A panel) és MFI értékeinek összefoglaló ábráját (B panel) mutatja.

Fekete vonal: nem stimulált, Piros vonal: IFN- γ stimulus, Kék vonal: IFN- γ és staurosporin 15 percen keresztül, Sárga vonal: IFN- γ és staurosporin 30 percen keresztül, Háromszög: T385M (P8), Négyzet: R274W (P4), Kör: Kontroll

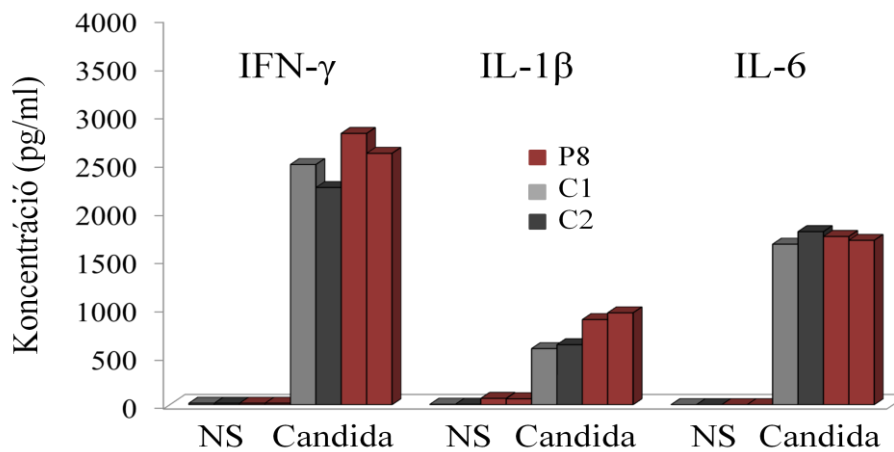
EBV: Epstein-Barr vírus, IFN: Interferon, P: beteg, STAT1: signal transducer and activator of transcription 1

6.1.7 *Candida*-stimulált mononukleáris sejtek citokin termelése

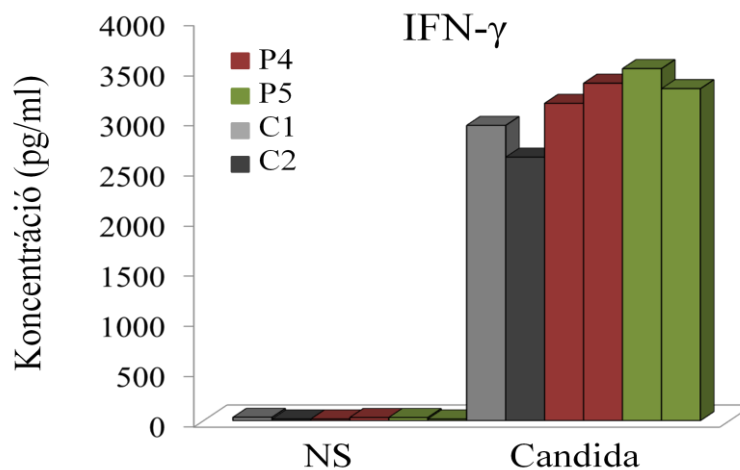
A *Candida* elleni immunitásban és gyulladási folyamatokban szerepet játszó citokinek mennyiségét ELISA módszerrel határoztuk meg frissen izolált PBMC-ből hőinaktivált *Candida* stimulust követően. A T385M mutáns allélt hordozó beteg (P8) és a kontroll sejtek közel hasonló mennyiségben termeltek IFN- γ , IL-1 β és IL-6 citokineket (14. A. ábra), viszont az IL-17A és IL-22 citokinek mennyisége jelentősen kevesebb volt a P8 beteg esetén, mint a kontroll sejteken (14. C. ábra). A R274W (P4 és P5) allélt hordozó betegek esetén szintén nagyon alacsony mértékben detektáltunk IL-17A, IL-22 citokineket

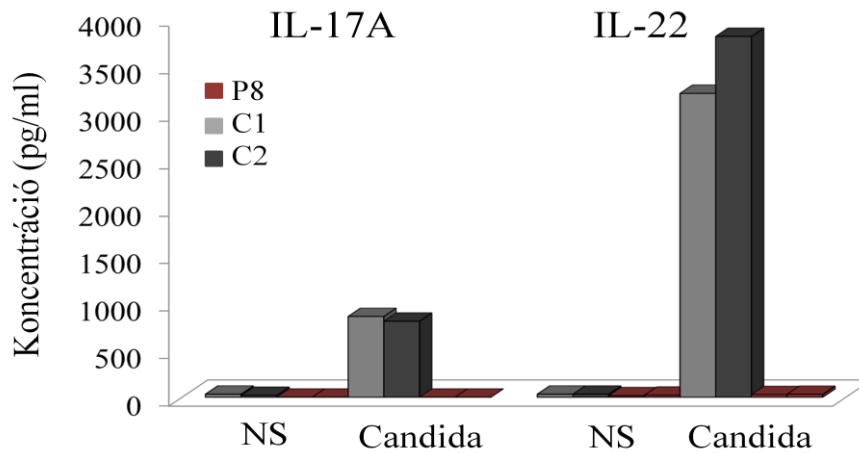
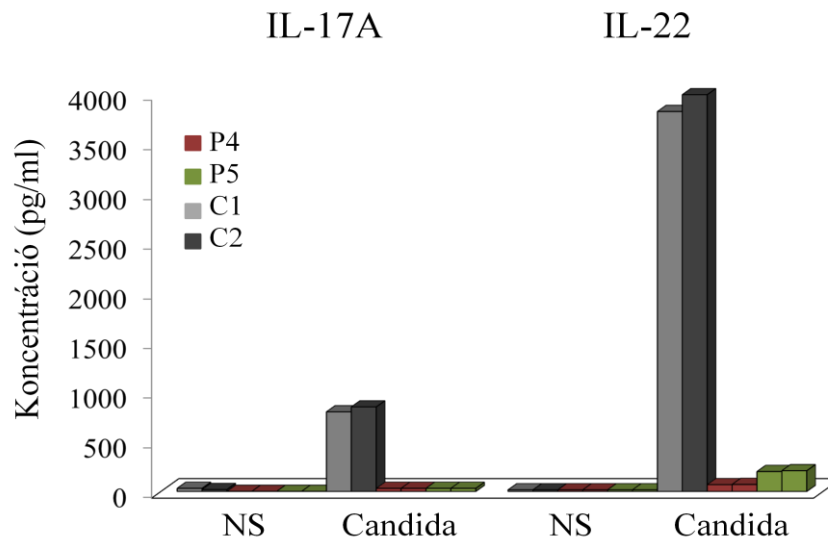
egészséges kontrollokhoz képest (14. D. ábra), habár az IFN- γ szekréció a P4 és P5 betegek esetében az egészséges kontrollnak megfelelő volt. (14. B. ábra) Az eredményeink jól működő, normál „Th1-típusú” válaszokat mutattak, ugyanis az IL-6 és IL-1 β citokinek mennyisége hasonló volt, mint a kontroll sejtekben *Candida* stimulálást követően, viszont csökkent „Th17-típusú” válaszokat feltételeztünk P4, P5 és P8 betegek esetében köszönhetően a nagyon alacsony IL-17A és IL-22 citokin koncentrációnak.

A



B



C**D**

14. Ábra Perifériális mononukleáris sejtek citokin szekréciója hő-inaktivált *Candida* stimulust követően

Perifériális mononukleáris sejteket hő-inaktivált *Candida* gombaszuszpenzióval stimuláltuk és mértük az IFN- γ (A és B panel), IL-1 β , IL-6 (A panel), IL-17A és IL-22 (C, D és E panelek) citokinek szekrécióját enzim-kötött immunszorbens vizsgálattal (ELISA). Az R274W (P4, P5) és T385M (P8) allélt hordozó betegek esetén hasonló az IFN- γ szekréció szintje az egészséges kontrollokhoz képest (A és B panel). Az IL-1 β , IL-6 citokinek szekréciójának szintje hasonlóan tekinthető a kontrollokhoz képest a T385M (P8) allélt hordozó beteg esetén (A panel).

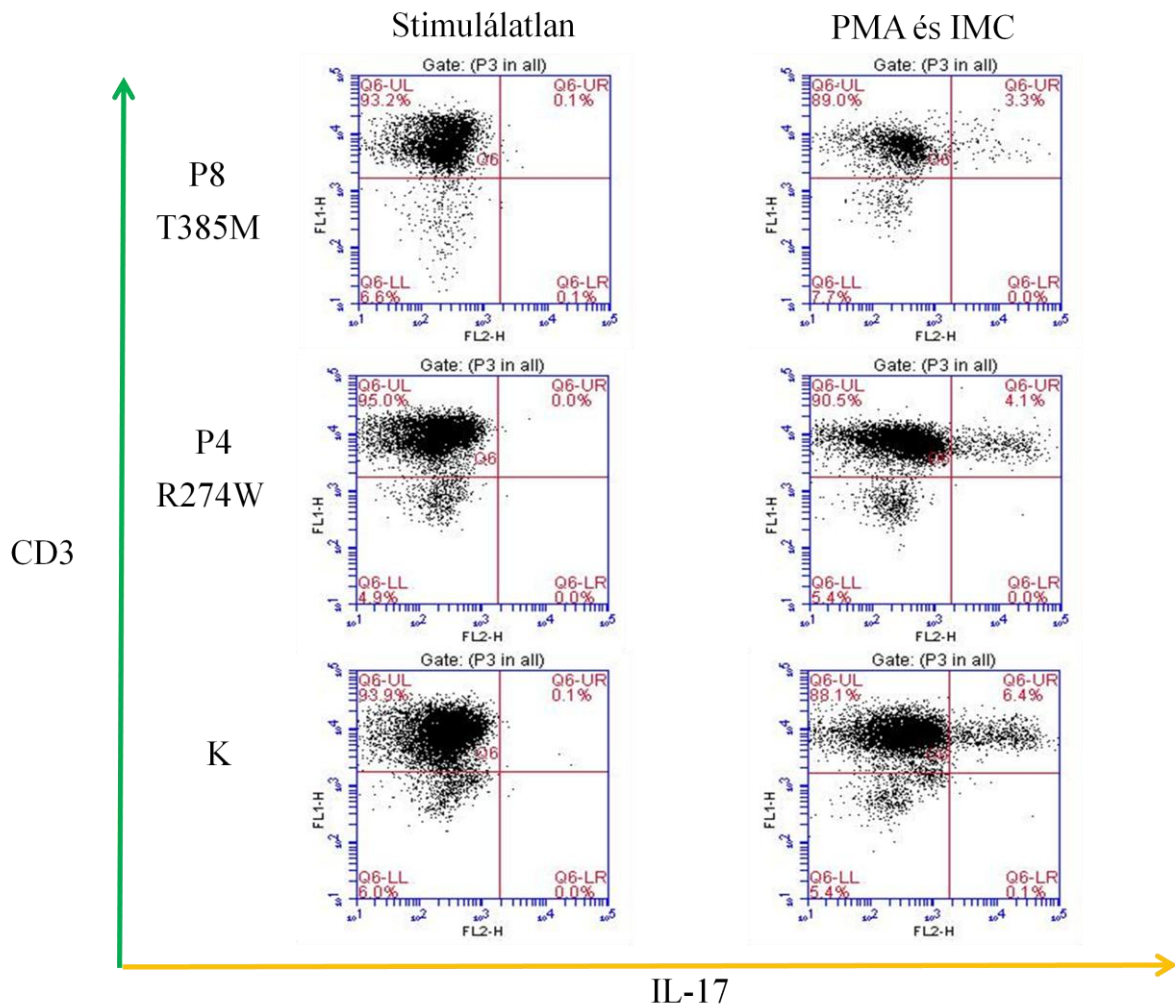
Ezzel ellentétben az IL-17A és IL-22 citokinek szekréciója az R274W (P4, P5) és T385M (P8) STAT1 betegek esetén nagyon alacsony volt (C és D panelek).

Candida: hő-inaktivált *Candida albicans*, NS: nem stimulált, P: beteg, C: Kontroll

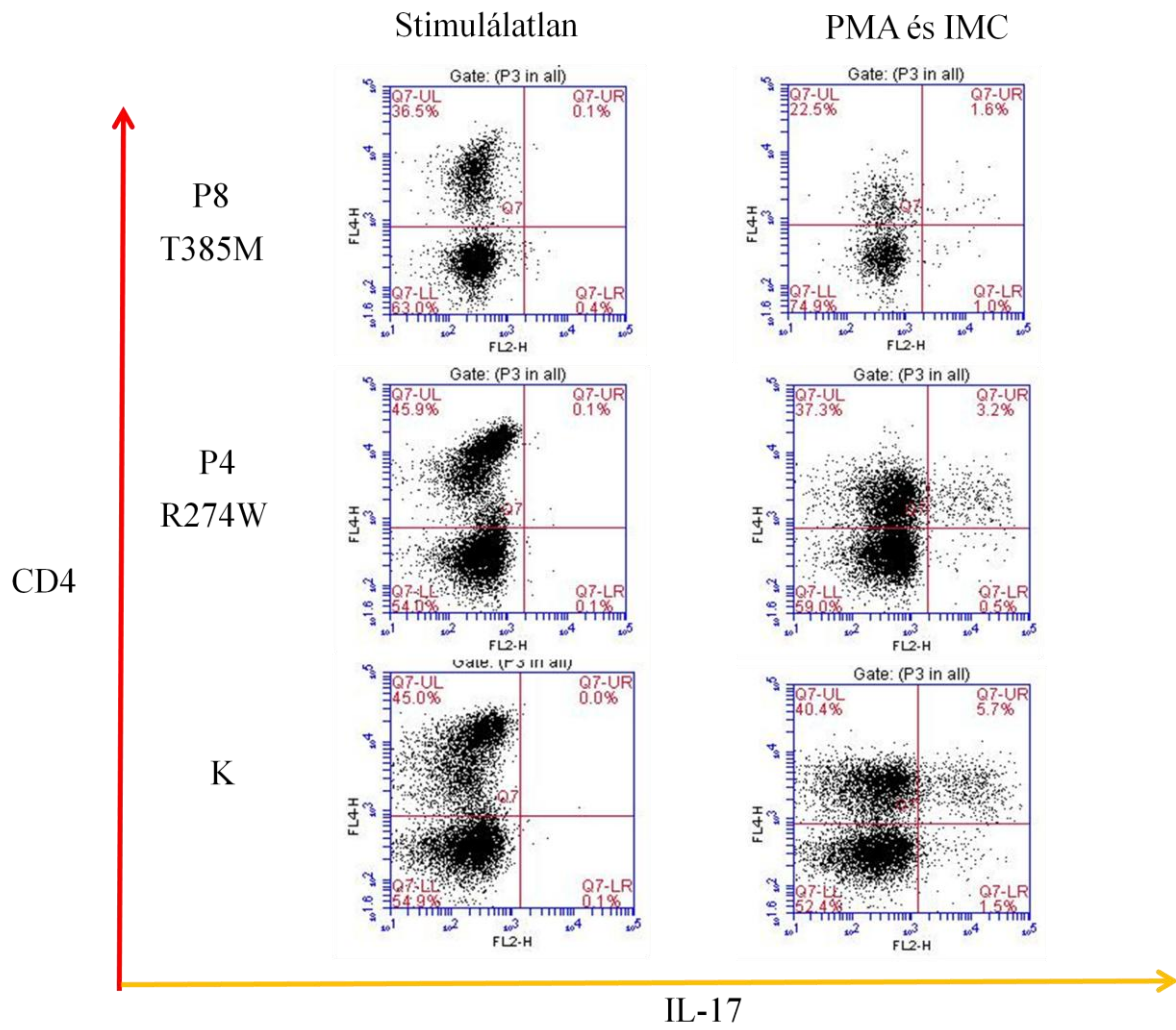
6.1.8 A CMCD betegek CD4+IL-17+ és CD4+IL-22+ T sejtek arányának vizsgálata

Az úszó limfocitákból Th17 sejteket differenciáltattunk megfelelő citokinek jelenlétében, majd PMA-val és IMC-vel kezeltük Golgi-plug jelenlétében, és áramlási citométer segítségével határoztuk meg a CD3+IL-17+, CD4+IL-17+ és CD4+IL-22+ T sejtarányokat (15. ábra). A R274W és T385M mutáns allélokat hordozó betegek „IL-17-termelő” és „IL-22-termelő” T sejtjeinek aránya alacsonyabb volt egészséges kontrollokéhoz képest, amely összhangban áll az alacsonyabb IL-17A és IL-22 citokinek mennyiségével (16. ábra).

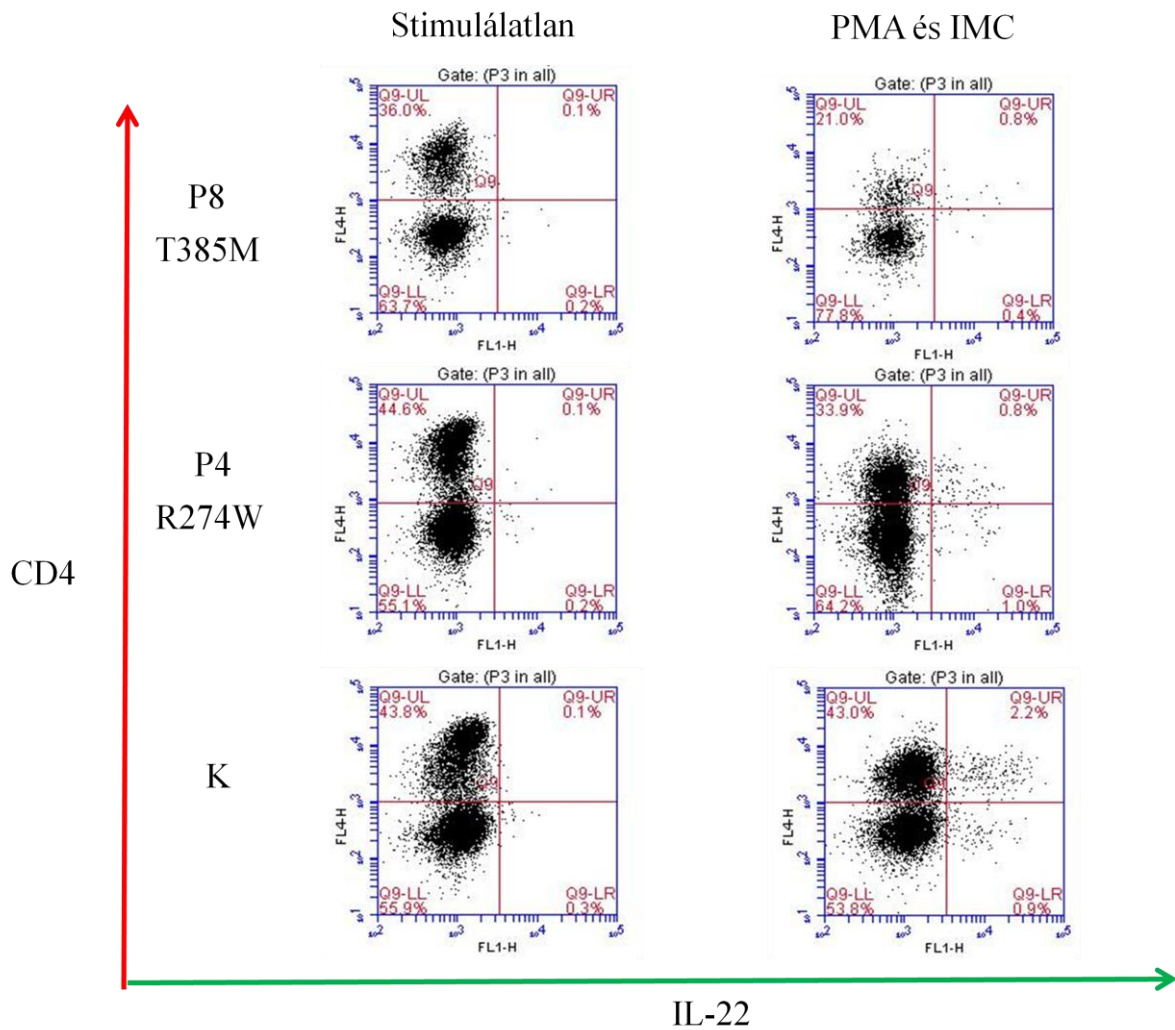
A



B



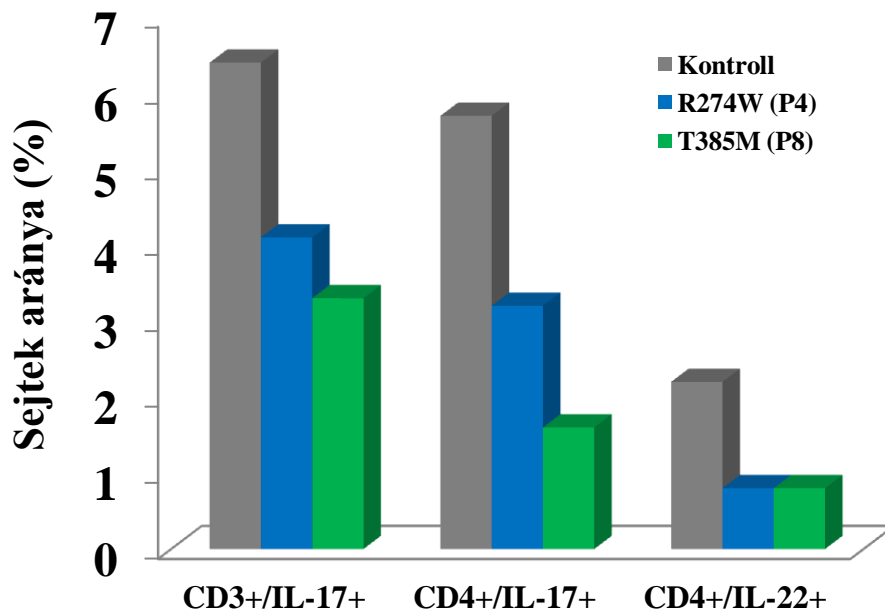
C



15. Ábra A CD3+ IL-17+ T, CD4+ IL-17+ T és CD4+ IL-22+ T sejtek *ex vivo* differenciáltatása

Az úszó limfocitákat anti-CD3, IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23, TGF- β és IL-2 citokinekkal differenciáltattuk, majd 5 nap elteltével 6 órán keresztül Golgi Plug jelenlétében PMA-val és IMC-vel kezeltük és áramlási citométer (Accuri C6) segítségével mértük meg a CD3+ IL-17+ T (A panel), CD4+ IL-17+ T (B panel) és CD4+ IL-22+ T (C panel) sejtek arányát. Az ábra reprezentatív, bemutatja a dot plot eredményeket.

PMA: phorbol 12-mirisztát 13-acetát, IMC: ionomycin, P: beteg, K: Kontroll



16. Ábra A CD3+ IL-17+ T, CD4+ IL-17+ T és CD4+ IL-22+ T sejtek *ex vivo* differenciáltatásának eredményeinek összefoglalása

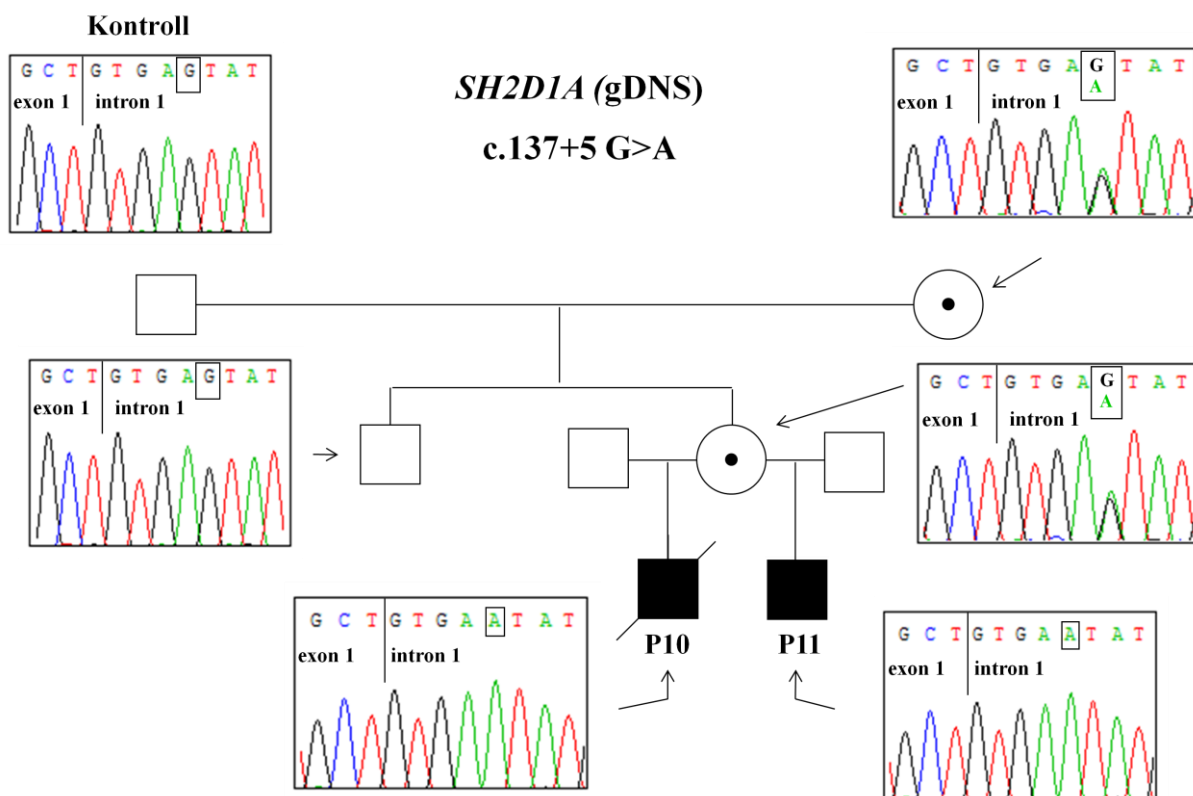
A nem-adherens limfocitákat anti-CD3, IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23, TGF- β és IL-2 citokinekkal differenciáltattuk, majd 5 nap után PMA-val és IMC-vel kezeltük Golgi Plug jelenlétében 6 órán keresztül a már differenciáltatott sejteket. Áramlási citométer (Accuri C6) segítségével mértük meg a CD3+ IL-17+ T, CD4+ IL-17+ T és CD4+ IL-22+ T sejtek arányát a P4 (R274W) és P8 (T385M) betegek esetén. A betegek esetén alacsonyabb arányban találtunk IL-17-termelő T és IL-22-termelő T sejteket, mint a kontrollok esetén.

PMA: phorbol 12-mirisztát 13-acetát, IMC: ionomycin, P: beteg, K: Kontroll

6.2 X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség

6.2.1 Az *SH2D1A* gén molekuláris genetikai analízise

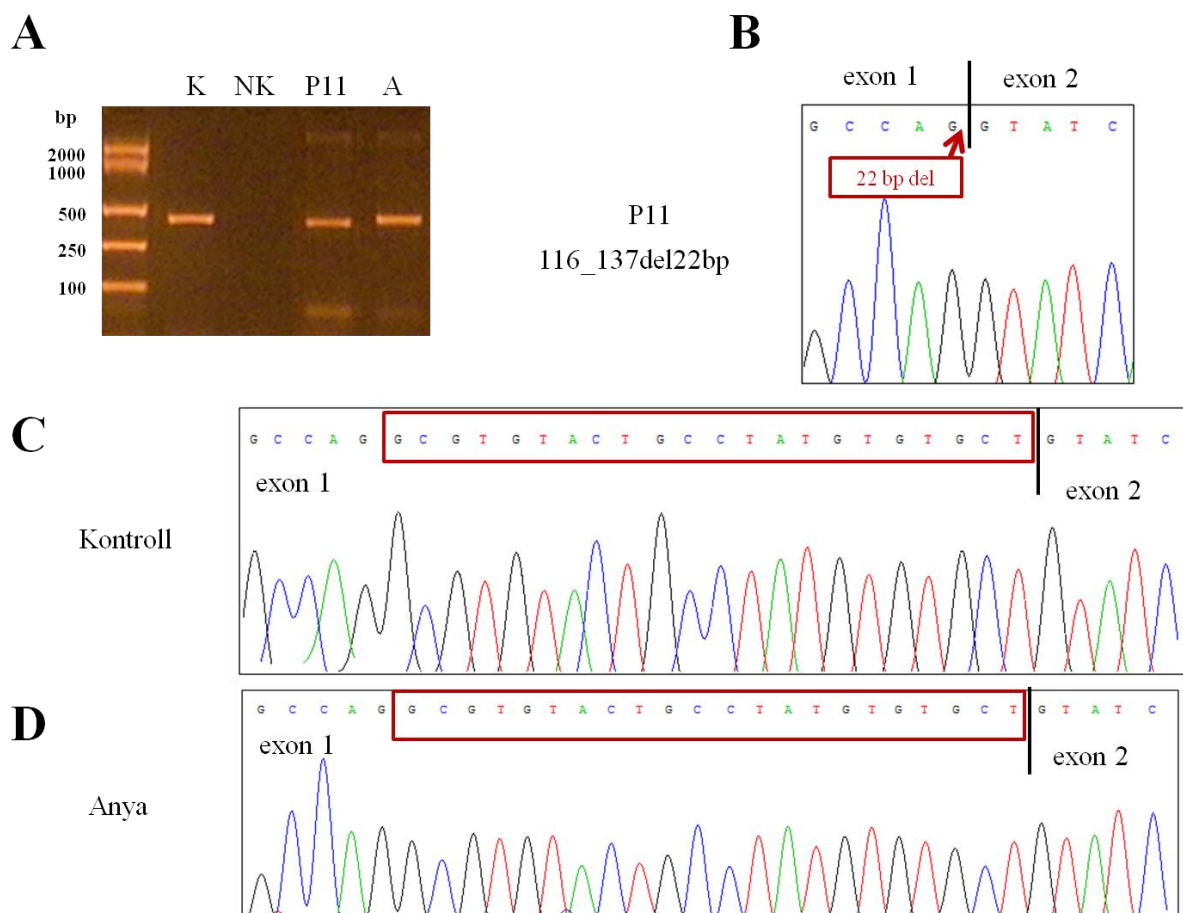
Az *SH2D1A* génen azonosítottunk egy új intronikus mutációt (c.137+5G>A) hemizigóta formában P10 beteg esetében teljes vérből izolált genomiális DNS-t használva. Ez a mutáció megtalálható volt heterozigóta formában az anyánál és az anyai nagymamánál. A P10 beteg édesapja vad típusú volt az azonosított mutációra nézve. A P11 beteg esetében prenatális genetikai vizsgálattal már magzati korban detektáltuk a mutációt hemizigóta formában. A P11 beteg édesapja nem volt elérhető genetikai vizsgálat céljából. (17. ábra)



17. ábra P10 és P11 testvérpár családfája és molekuláris genetikai vizsgálatának eredménye

Az *SH2D1A* gén egyes intronjában azonosított új intronikus mutáció a 137+5 pozícióban guanin-adenin (G>A) cserét okoz, amely mindkét beteg esetében detektálható volt hemizigóta formában Sanger szekvenálással, illetve heterozigóta formában jelen volt az anyánál és az anyai nagymamánál. P: beteg; gDNS: genomiális DNS

A P10 beteg mutáció analizisét követően szeretnénk volna a mutáció hatását tanulmányozni, de sajnos erre nem volt lehetőségünk, mert a beteg elhunyt. A P11 beteg esetében néhány hónapos korában volt lehetőségünk mintavételre és ekkor tudtuk elvégezni a vizsgálatokat. Az *SH2D1A* cDNS amplikonok agaróz gélelektroforézissel történő vizsgálatokor egy kisebb méretű sáv (352 bp) volt látható a P11 beteg esetében a kontrollhoz képest, az édesanyjánál az egészséges kontrollnak megfelelő (374 bp) sávot láttunk (18. A. ábra). A cDNS szekvenálása, egy 22 bp-t érintő deléciót mutatott (116_137del22bp) a P11 beteg esetében, egészséges kontrollnál és az édesanyjánál normál szekvenciát figyeltünk meg. (18. B-D. ábra)



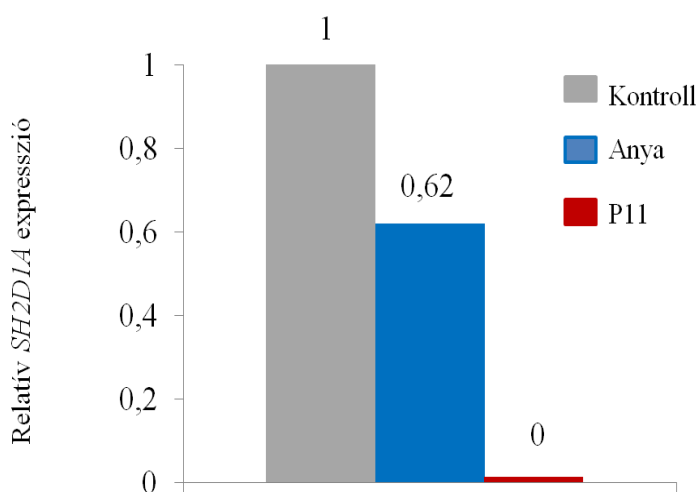
18. ábra. 22 bp deléció igazolása cDNS szinten

A) A cDNS amplikon ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel egy kisebb 352 bp sávot mutatott a betegben (P11), míg az anyánál a kontrollnak megfelelő (374 bp) sáv volt látható. K: kontroll; NK: negatív kontroll; P11: beteg; A: édesanya

B-D) Sanger szekvenálással azonosítottuk a 22 bp kiesését az egyes exonban a beteg mintában, viszont az édesanya és a kontroll esetében normális szekvenciát figyeltünk meg.

Nagy valószínűséggel a c.137+5G>A genetikai eltérés egy alternatív donor hasító helyet eredményez, aminek következtében megváltozik a cDNS szekvenciája és nem megfelelő fehérje expresszióhoz vezet.

A továbbiakban vizsgáltuk az *SH2D1A* relatív expresszióját kvantitatív real-time PCR módszerrel, a vizsgálat során az *SH2D1A* csökkent expresszióját mértük az édesanyjától izolált mintán, míg a P11 beteg esetében a teljes hiányát mutattuk ki. (19. ábra)



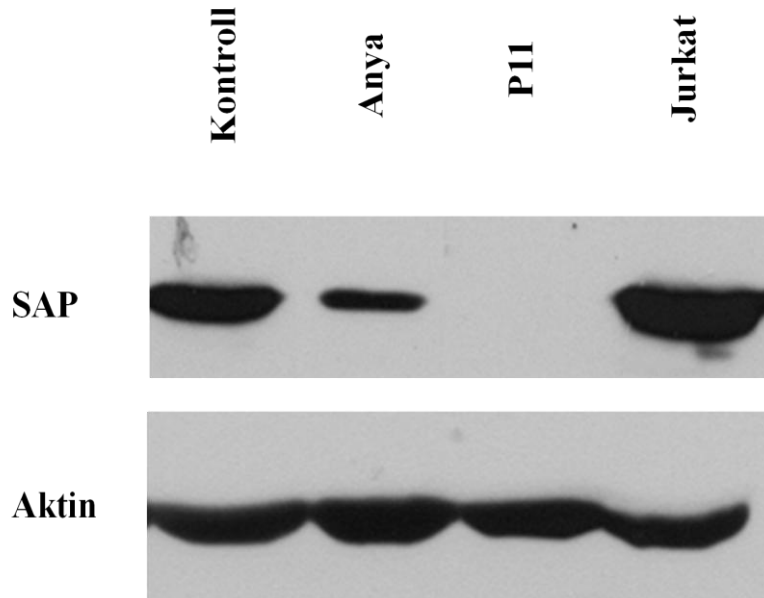
19. ábra Relatív SH2D1A expresszió vizsgálata real-time PCR-rel

Az egészséges kontrollhoz képest az édesanyában csökkent mennyiségben, addig a betegben egyáltalán nem volt kimutatható az SH2D1A expressziója real-time PCR-rel. P: beteg

6.2.2 A SAP fehérje expressziójának kimutatása Western blot módszerrel és áramlási citometriával

A SAP fehérje expresszióját fitohemagglutinin-indukált blaszt sejteken vizsgáltuk Western blot módszerrel, a beteg (P11) esetében a SAP fehérje teljes hiánya volt megfigyelhető, míg a heterozigóta édesanyánál egy vékonyabb fehérje sávot láttunk. A Western blot során aktin jelölést, mint háztartási fehérjét („housekeeping protein”)

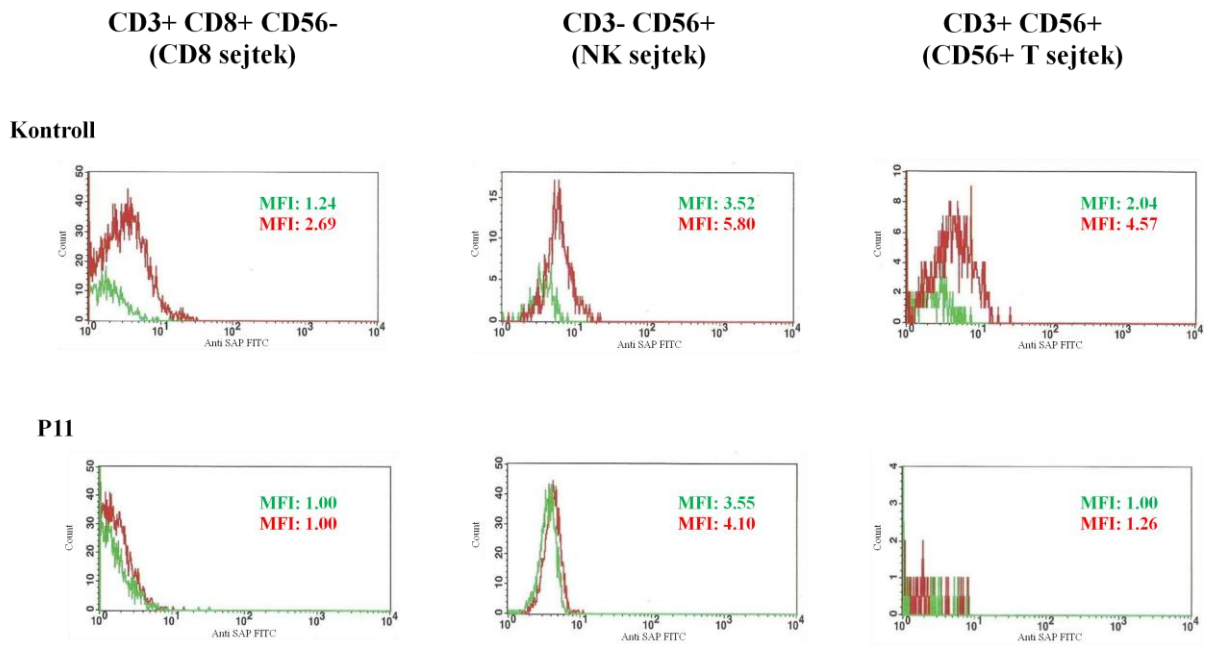
használtunk kontrollnak. A vizsgálat Dr. Lányi Árpád laboratóriumában, kollaborációs vizsgálat keretében történt (20. ábra).



20. ábra A SAP fehérje expressziójának detektálása Western blot módszerrel

Perifériás vér mononukleáris sejteket 2000 ng/ml fitohemagglutininnal aktiváltuk, majd vizsgáltuk a SAP fehérje expresszióját, betegnél nem detektáltunk SAP fehérjét, míg az anyánál egy vékonyabb sávot láttunk, ami a heterozigótaságára utalhat. Pozitív kontrollként Jurkat sejtek lizátumát vittük fel. Aktin jelölést használtunk, mint háztartási fehérje kontroll. P: beteg

Áramlási citometriával vizsgáltuk a SAP fehérje expresszióját CD3+CD8+CD56- (CD8 sejtek), CD3-CD56+ (NK sejtek), CD3+CD56+ (CD56 T sejtek) sejteken intracelluláris jelölést követően. A beteg (P11) sejtjeiben elhanyagolható mennyiségben detektáltunk SAP fehérje expressziót az egészséges kontrollhoz viszonyítva. A vizsgálatok a DE KK III. Belgyógyászat Immunológiai Laboratóriumával kollaborációban történtek. (21. ábra)



21. ábra A SAP fehérje expressziójának detektálása áramlási citometriával

Az ábra a különböző limfocitákon belül mutatja a SAP expressziót (piros vonal) az IgG₁ izotípus kontroll (zöld vonal) ellenében. MFI: medián fluoreszcencia intenzitás.

7 MEGBESZÉLÉS

7.1 IL-17-mediált immunitás és a krónikus mucocutan candidiasis

Az Infektológiai és Gyermekeimmunológiai Tanszék nemzetközi kapcsolatainak és J Projectnek köszönhetően lehetőségünk volt nemcsak a magyarországi, hanem Közép-Európa és Kelet-Európa országaiból (Csehország, Ukrajna, Oroszország) kapott minták molekuláris genetikai vizsgálatára és egyes esetekben a funkcionális tesztek elvégzésére.

A krónikus mucocutan candidiasis egyik legfőbb okának a *STAT1* génen bekövetkezett mutációkat tartják, pontosabban a funkciónyerő (GOF) mutációkat (van der Veerdonk, 2011), ellenben a funkcióvesztő mutációk mycobakteriális fertőzéseket („Mendelian susceptibility to mycobacterial disease”) okoznak (Al-Muhsen és Casanova, 2008).

A kettős tekercs (CCD) és a DNS-kötő (DBD) doméneken található a leírt funkciónyerő mutációk többsége, beleértve az irodalmi adatokat és az általunk azonosított mutációkat (Al Rushood, 2013; Aldave, 2013; Al-Mousa, 2016; Chang, 2016; Depner, 2016; Dhalla, 2015; Dotta, 2015; Frans, 2014; Giardino, 2016; Higgins, 2015; Kumar, 2014; Lee, 2014; Liu, 2011; Martinez-Martinez, 2015; Mekki, 2014; Mizoguchi, 2014; Romberg, 2013; Sampaio, 2013; Sharfe, 2014; Soltész, 2013; Takezaki, 2012; Uzel, 2013; van de Veerdonk, 2011; Yamazaki, 2014; Zerbe, 2016), azonban mára már találtak olyan missense mutációkat, amelyek a SH2, farki (TS) és transzaktivációs (TA) doméneket is érintik (Sampaio, 2016 a,b; Sobh, 2016; Szolnoky, 2016; és nem publikált adatok).

Jelen kutatómunkánkban kilenc CMCD betegnél találtunk *STAT1* GOF mutációkat, kettő esetben a genetikai eltérések mutációs adatbázisokban nem voltak megtalálhatóak, ezekben az esetekben különösen fontos a mutációk patogenitásának bizonyítása.

A funkciónyerő mutációk megerősítésére kiválóan alkalmas a luciferáz teszt, mert *STAT1* fehérjét nem expresszáló sejtvonalba juttatunk be olyan plazmidokat, amely az új variánst tartalmazza és IFN- γ stimulus hatására vizsgáljuk a gamma-interferon aktivált faktor (GAF) válaszokat (Liu, 2011). A GAF felismeri és kötődik a DNS egy speciális szakaszához a gamma-IFN aktivált helyhez (GAS) (Decker, 1991). Korábban már vizsgáltak olyan CMCD-t okozó allélokat luciferáz teszttel, ahol magasabb volt a GAS-függő riporter gén indukciója, mint a vad típusú *STAT1* allél esetében, tehát bizonyítást nyert a funkciónyerés (Liu, 2011). Az általunk talált genetikai eltérések szintén magasabb luciferáz aktivitást

mutattak IFN- γ kezelést követően, tehát a N179K és Q285R allélek funkciónyerő STAT1 mutációk (Soltesz, 2013).

A funkciónyerést bizonyíthatjuk interferon gamma-indukált fehérje-10 (IP-10) vizsgálatával is, ugyanis a fehérje a STAT1 „downstream” célpontja. A vad típusú allélt hordozó kontrollokhoz képest magasabb koncentrációban jelen lévő IP-10 utal a funkciónyerésre. T385M allélt hordozó japán betegnél szintén magas IP-10 fehérje jelenlétét találták IFN- γ kezelést követően, tehát igazolták a funkciónyerő STAT1 mutációt (Takezaki, 2012). Három betegnél (P4, P5 és P8) vizsgáltuk a gamma-interferon indukált fehérje-10 mennyiségét ELISA módszerrel, a méréseink szintén alátámasztották azt a feltételezésünket, hogy a R274W és T385M allélek funkciónyerő mutációk.

Kísérleteink következő részében azt vizsgáltuk, hogy különböző citokinek hatására, a STAT1 milyen mértékben foszforilálódik. IFN kezelés hatására a tirozin foszforilált STAT1 molekula percekben belül átjut a sejtmagba (Schindler, 2000). IL-27 citokint, I-es (IFN- α) és II-es (IFN- γ) típusú interferonokat választottunk a vizsgálatainkhoz, ezek a STAT1 útvonalon keresztül az IL-17+ T sejtek kialakulását gátolják (Liu, 2011). Megnövekedett a STAT1 foszforilációja ezen citokinek hatására a R274W és T385M alléleket hordozó sejtekben, mely magyarázhatja, hogy a betegeknél az IL-17+ T sejtek csökkent mennyiségben vannak jelen.

A defoszforiláció mechanizmusának károsodása és a foszforiláció képességének megnövekedése hozzájárul a lecsökkent IL-17+ T sejt immunitáshoz. A defoszforiláció károsodását korábban is megfigyelték a T385M és R274Q allélek esetében staurosporin vagy pervanadát hatására (Liu, 2011; Takezaki, 2012). A P4 (R274W) és P8 (T385M) betegek EBV-B sejtjeinél tirozin kináz inhibitor, staurosporin kezelést követően megfigyeltük a defoszforilációs képesség elvesztését. A R274W és T385M alléleket hordozó sejteknél foszfátáz inhibitor, pervanadát kezelés után a STAT1 fehérje emelkedett foszforilálódását tapasztaltuk. Mesterségesen létrehozott STAT1 mutációkat (F172W, G384A vagy G384W) vizsgálva bizonyították, hogy csökkentik a STAT1 defoszforilációját (Zhong, 2005; Mertens, 2006), ezek a mutációk a N179K és a T385M mutációk közelében vannak. Nem feltétlenül a defoszforilációs képesség károsodása az egyetlen mechanizmus, amely a funkciónyerésért felelős, hipotéziseink szerint oka lehet, hogy a mutáns DNS-kötő domén erőteljesebben kötődik a DNS gamma-interferon aktivált helyéhez (Soltesz, 2013). *STAT1* GOF mutációk tehetők felelőssé a megnövekedett STAT1 dimerizációjáért és transzlokációjáért a sejtmagba a citoplazmából (Liu, 2011).

Egy beteg esetében, aki a T385M mutációt hordozza Western blot vizsgálattal funkcióvesztést tapasztaltak a pSTAT1 esetében. A sejtek csökkent STAT1 expressziót mutattak, feltételezésük szerint annak köszönhetően, hogy a mutáns protein képtelen transzlálódni vagy nem stabil (Sharfe, 2014).

F172 pozíció fontos helynek számít a defoszforiláció szempontjából (Zhong, 2005) ezen a helyen találtak egy mutációt (F172L), a mutáns allélt hordozó beteget histoplasmosissal diagnosztizálták (Sampaio, 2013). A *STAT1* génen vannak olyan mutációk, amik megakadályozzák a tirozin foszforilációt (a 701-es pozícióban tirozin helyett alanin kódolódik) vagy a dimerizációt a SH2 doménon (605-ös pozícióban leucin helyett arginin kódolódik) illetve gátlódik a sejtmagba történő transzlokáció (Shuai, 1994).

A perifériás mononukleáris sejtek (PBMC) általi IL-17A és IL-22 szekréciót korábban vizsgálták már CMCD betegeknél, ami szerint alacsony koncentrációban voltak jelen ezen citokinek ez a megfigyelés összhangban áll a gomba elleni védekezés károsodásával, vagyis az IL-17+ T sejtes immunitás csökkenésével (Tóth, 2012). Vizsgálataink megerősítették ezeket az eredményeket. Hő-inaktivált *Candida* kezelést követően nagyon alacsony koncentrációban detektáltunk IL-17A és IL-22 citokineket a P4, P5 és P8 betegeknél, ami nagyobb fokú hajlamot mutat a *Candida* fertőzések iránt a CMCD betegeknél (Soltesz, 2013). Más alternatív citokin útvonalakat is vizsgáltunk, hogy megnézzük, hogy a Th1 válaszokat mennyiben befolyásolja a *Candida* jelenléte. Szintén hő-inaktivált *Candida* kezelés hatására az IFN- γ , IL-1 β és IL-6 szekréció az egészséges kontrollhoz volt hasonló, ami mutatta, hogy nem sérült a „Th1” válaszok a CMCD betegek esetén. Klinikai és laboratóriumi megfigyelések alapján elmondható, hogy az IFN- γ nem játszik szerepet a *Candida albicans* elleni védekezésben (Filipe-Santos, 2006).

A csökkent IL-17A és IL-22 citokin szekréció összefüggésben áll a csökkent IL-17+ T és IL-22+ T sejtek számával. *STAT1* GOF mutációt hordozó betegeknél alacsony mértékben találtak IL-17-termelő és IL-22-termelő T sejteket a CD3+ T sejt populáción belül, viszont funkcióvesztő *STAT1* mutációknál a sejtek aránya magasabb volt, hasonló az egészséges kontrollokhoz (Liu, 2011). A R274Q és T385M mutációkat hordozó betegek esetében vizsgálták az IL-17+ T és IL-22+ T sejteket a CD4+ T sejt csoporton belül, és mindkét allél esetében alacsonyabb volt ezen sejtek aránya (Takezaki, 2012). A munkacsoportunk az IL-17+ T és az IL-22+ T sejteket a CD3+ és a CD4+ T sejt populációkon belül is vizsgálta. A

CMCD betegeknél (P4 és P8) alacsonyabb volt a CD3+IL-17+ T, CD4+IL-17+ T és CD4+IL-22+ T sejtek aránya az egészséges kontrollokhoz viszonyítva.

A foszforilált STAT1 jelenlétét *ex vivo* is ki lehet mutatni áramlási citometriával. Korábbi vizsgálatok mutatták, hogy az E235A *STAT1* GOF mutációt hordozó beteg IL-21 kezelt T sejtjei megnövekedett pSTAT1 expressziót mutattak (Romberg, 2013). IFN- γ , IL-6 vagy IL-21 citokin stimulusok hatására a CD3+ T sejtekben (L385M és T385M mutációt hordozó betegek) magasabb volt a foszforilált STAT1, de STAT1-null sejtvonalakba transzfektált R201I, L385M és T385M mutáns plazmidokkal rendelkező sejteknél is emelkedett volt a pSTAT1 IFN- γ kezelést követően áramlási citometriás vizsgálattal (Uzel, 2013). A STAT1 defoszforilációját vizsgálták CD14+ sejteken belül IFN- γ , majd staurosporin kezelést követően. Az L354M mutációt hordozó betegnél és más CMCD betegeknél a defoszforiláció elvesztését lehetett detektálni áramlási citométerrel (Mizoguchi, 2014). A foszforilált STAT1 expressziójának emelkedését találtuk T385M és R274W allélt hordozó betegek sejtjeiben IFN- γ stimulust követően, majd staurosporin hatására a defoszforilációs képesség károsodását lehetett megfigyelni.

A T385M funkciónyerő mutációt több tudományos közleményben is említik, de a betegek fenotípusa eltérő. Japán betegek esetében visszatérő alsó légúti fertőzések, bronchiectasis és autoimmun thyroiditis volt jellemző, az egyik beteg ismeretlen tüdőelégtelenség miatt exitált (Takezaki, 2012). Egy másik betegnél IPEX-szerű szindrómával társultan írták le (Uzel, 2013), ugyanebben az évben írták le egy betegnél, akinél szintén ezt a mutációt azonosították, de a betegnek disszeminált histoplasmosis volt köszönhetően a *Histoplasma capsulatum* fertőzésnek (Sampaio, 2013). A mutációt súlyosan kombinált immunhiánybetegséggel (SCID) kapcsolatban is megfigyelték (Sharfe, 2014). Egy nemrég megjelent közleményben progresszív multifokális leukoencephalopathiában szenvedő betegnél is szintén ezt a mutációt detektálták (Zerbe, 2016). Az általunk diagnosztizált ukrainai betegnek visszatérő súlyos HSV fertőzései voltak és nyelőcső szűkülete, amely szükségessé tette a Nissen fundoplication-t (Soltesz, 2013). Ezek a közlemények megerősítik azt a feltételezést, mely szerint nincs kapcsolat a genotípus és fenotípus között.

Az R274W mutációt azonosítottuk egy magyar anyánál és lányánál, feltételezésünk szerint a mutáció hotspot helyet érint, habár korábban úgy gondolták, hogy alapító mutációról van szó (van der Veerdonk, 2011). Haplotípus analízist végeztünk és sikerült bizonyítanunk, hogy valóban az R274 hotspot mutációs forrópontnak („hotspot”) számít (Soltesz, 2013).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a funkcióyerő STAT1 közvetített útvonalon keresztül, a lecsökkent IL-17+ T sejtés immunitás állhat a *Candida* fertőzések kialakulásának háttérében, ami a krónikus mucocutan candidiasishoz vezet.

7.2 X- kromoszómához kötött limfoproliferatív betegség

Az XLP1 immunhiány betegség legfőbb oka a SAP fehérjét kódoló *SH2D1A* génen bekövetkezett mutáció, amely hibás fehérjeképződéshez vagy fehérjehiányhoz vezethet. Az XLP ritka betegségnek tekinthető. A betegséget sajnos nem minden esetben ismerik fel időben, vagy csak akkor kerül felismerésre, amikor a beteg EBV-vel találkozik és a vírusfertőzést követően kialakulnak az XLP súlyosabb következményei. Mivel a betegség mortalitása az EBV fertőzést követően magas, ezért nagyon fontos a korai felismerés.

Kutatómunkánkban két magyar fiúgyermek esetéről számolunk be, akiknél súlyos XLP fenotípus volt megfigyelhető. A molekuláris genetikai vizsgálat során egy új, irodalomban és mutációs adatbázisban nem szereplő splicing mutációt azonosítottunk.

A testvérpár idősebbik tagjánál a splicing mutációt (c.137+5G>A) hemizigóta formában találtuk Sanger szekvenálással, az édesanya és az anyai nagymama heterozigóta formában hordozza a mutációt. Az édesanyánál a második terhessége során prenatalis vizsgálatot végeztünk, a magzatnál ugyanazt a mutációt azonosítottuk hemizigóta formában, mint az idősebb testvérnél, ezért a gyermek megszületése előtt már elkezdődhetett a donor keresés a csontvelő transzplantációhoz, melyen a gyermek sikeresen átesett (Tóth, 2015).

Korábban irodalomban beszámoltak eredményesen transzplantált betegekről (Lankester, 2005; Marsh, 2014).

A genotípus és fenotípus között máig nem találtak összefüggést, ahogy korábbi megfigyelésekben ezt már feltételezték (Morra, 2001; Sümegi, 2000). Ezt alátámasztja jelenlegi megfigyeléseink is, mely szerint ugyanabban a pozícióban bekövetkezett, bár eltérő mutációk (c.137+5G>C és c.137+5G>A) eltérő fenotípusok kialakulásához vezet.

Korábban beszámoltak egy splicing mutációról, c.137+5G>C, ami ugyanazon intron pozícióban található, mint az általunk analizált genetikai eltérés. A beteg fenotípusára a visszatérő légzőszervi fertőzések és agammaglobulinemia volt jellemző. Annak ellenére, hogy nem volt a beteg szervezetében detektálható mennyiségű immunglobulin, a beteg B sejtjei tudtak osztódni és differenciálódni antitesttermelő plazmasejteké in vitro körülmények között. A mutáció a *SH2D1A* gén transzkripciójára hatott, de a mRNS splicing mechanizmusára nem, ugyanis normál hosszúságú és szekvenciájú mRNS-t találtak. A SAP

fehérje expressziója alacsony mértékben kimutatható volt Western blotmódszerrel. (Recher, 2013).

Ezzel ellentétben a mi betegünk esetében súlyos XLP fenotípust figyeltünk meg. Az idősebb fiúgyermeknek thrombocitopéniája, neutropéniája, anémiája, majd pancitopéniája alakult ki. Hemofagocitózisa utalt a mononucleosisra (FIM) és a lázzal járó betegség következményeként elhunyt. A fiatalabb testvér egy komplikációmentes terhességből született, de szintén hordozta a mutációt hemizigóta formában. Részletes molekuláris vizsgálatokat végeztünk, annak felderítésére, hogy az új intronikus variáns patogénnek tekinthető e. A *SH2D1A* cDNS szekvenciájának vizsgálatakor egy 22 bp kiesést tapasztaltunk az egyes exonon (116_137del22bp), melyet nem találtunk meg sem az egészséges kontrollban sem az édesanya esetében. Ezt követően valós idejű PCR-t terveztünk, hogy megnézzük az *SH2D1A* relatív expresszióját, a vizsgálat eredménye azt mutatta, hogy a betegnél teljesen hiányzott a mRNS expresszió, míg az édesanyánál csökkent expressziót mutatott. A c.137+5G>A nukleotid eltérés a cDNS szekvenciájában okoz változásokat, ezért úgy gondoltuk, hogy fehérje szinten is ki tudjuk mutatni a cDNS 22 bázispárnyi delécióját. Ennek bizonyítására Western blot módszert választottunk. A beteg leukoblasztjaiban egyáltalán nem detektáltunk SAP fehérje expressziót. Az édesanya leukoblasztjaiban csökkent fehérje termelődést tapasztaltunk, ami utalhat a hordozó állapotra, ezzel ellentétben az egészséges édesapa esetén normál mennyiségű SAP fehérjét detektáltunk. Mivel a CD8+ T és NK sejteknek fontos szerepük van az EBV-fertőzött B sejtek eltávolításában (Latour, 2001), ezért következő lépésként áramlási citométerrel határoztuk meg ezen sejtek SAP fehérje expresszióját (Marsh, 2013 a). A beteg CD8+ T (CD3+CD8+CD56-), NK (CD3-CD56+) és CD56+ T (CD3+CD56+) sejtjeiben nem volt kimutatható a SAP fehérje az egészséges kontrollhoz viszonyítva. Az eredmény alátámasztotta azt a hipotézist mely szerint a c.137+5G>A genetikai eltérés az oka annak, hogy nem termelődik SAP fehérje és nem alakul ki a SAP-mediált CD8+ T és NK-sejtek általi citotoxicitás az Epstein-Barr vírussal fertőzött B sejtek ellen. Ha lecsökken az NKT sejtek száma, akkor a betegeknél hozzájárul a Hemofagocitikus lymphohistiocytosis-hoz (Latour, 2007). Tehát az exon-intron határtól távolabb található genetikai mutációk is okozhatnak súlyos XLP fenotípust.

Összefoglalva az eredményeinket elmondhatjuk, hogy az új *SH2D1A* gént érintő splicing mutáció következtében nem termelődik SAP fehérje a beteg szervezetében, és ez okozhatja a súlyos X kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség kialakulását.

8 ÚJ EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. Kilenc krónikus mucocutan candidiasis beteg esetében sikerült azonosítanunk a *STAT1* (jelátvivő és transzkripció aktiváló 1) génen bekövetkezett mutációkat, amelyek a betegség kialakulásáért tehető felelőssé.
2. Két új, mutációs adatbázisokban és irodalomban nem szerepelt *STAT1* szekvencia variáns azonosítottunk. A két új *STAT1* mutáció esetében igazoltuk, hogy a STAT1 protein fokozott működését eredményezi.
3. További két beteg esetében bizonyítottuk, hogy a *STAT1* génen bekövetkezett mutációk funkcionyerő foszforilációhoz és a defoszforiláció károsodásához vezethetnek.
4. A *STAT1* funkcionyerő mutáció az IL-17+ T és IL-22+ T helper sejtek kialakulásának és differenciálódásának károsodását eredményezi a krónikus mucocutan candidiasisban szenvedő betegeknél.
5. A *STAT1* mutációt hordozó betegekben alacsonyabb IL-17A és IL-22 citokin szekréciót tapasztaltunk, ami összefüggésben áll a gomba elleni immunválasz csökkenésével.
6. X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségben szenvedő magyar testvérpár esetében új, intronban elhelyezkedő mutációt azonosítottunk a *SH2D1A* génen.
7. A c.137+5G > A nukleotid csere hasítási defektust okozva károsítja a SAP protein expresszióját. A SAP protein hiánya tehető felelőssé az X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség kialakulásáért.

9 ÖSSZEFOGLALÁS

A celluláris (T sejt) immunválasz hiányára vagy csökkent működésére utalhatnak a gyakori és visszatérő intracelluláris patogén (pl. *Candida albicans*) vagy vírus (pl. Epstein-Barr vírus) fertőzések (Cooper, 2003). Az IL-17+ T sejt immunitás károsodik a *STAT1* funkciónyerő genetikai defektusának következtében, ezáltal a szervezet védekezőképessége lecsökken a gombafertőzésekkel szemben és kialakul a krónikus mucocutan candidiasis betegség (CMCD) (Puel, 2012). Az X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegségben (XLP) az Epstein-Barr vírusfertőzést követően a természetes ölő sejtek nem képesek a szervezetből eltávolítani a kontrollálatlan osztódásnak indult B sejteket és a CD8+ T és NK sejtek általi citotoxicitás sem alakul ki. Mind a CMCD, mind a XLP az elsődleges immunhiány betegségek közé sorolható (Maródi és Notarangelo, 2007).

Kutatómunkám során vizsgáltam a CMCD és XLP molekuláris patológiai mechanizmusait. Mindkét esetben bidirekcionális DNS szekvenálással erősítettük meg a betegségek kialakulásáért felelős genetikai eltéréseket, sejt vizsgálatokkal és különböző molekuláris biológiai módszerekkel bizonyítottuk a mutációk patogenitását.

Kilenc beteg esetében azonosítottunk heterozigóta missense mutációkat a *STAT1* génen. Az azonosított mutációk közül egy esetben a mutáció a DNS-kötő domént (DBD) érinti, 8 betegnél olyan mutációkat azonosítottunk, ami a *STAT1* gén kettős tekerics doménjére (CCD) hat. A kilenc beteg közül kettő esetben új, mutációs adatbázisokban és irodalomban nem leírt mutációkat találtunk. Kettő beteg esetében PMA (phorbol 12-myrisztát 13-acetát) és IMC (ionomycin) kezelés után csökkent IL-17+ T sejteket (áramlási citometriával) és *Candida* stimulust követően elhanyagolható mennyiségű IL-17A és IL-22 szekréciót (ELISA-val) figyeltünk meg egészséges kontrollokhoz képest. A differenciáltatott IL-17+ T sejteket PMA/IMC-vel kezeltük, az új mutációt hordozó beteg esetén alacsony koncentrációban volt jelen az IL-17A és IL-22 citokin az egészséges kontrollhoz képest. A CMCD betegek és egészséges kontrollok Epstein-Barr vírus (EBV)- transzformált sejt vonalát IFN- γ -val stimuláltuk és tirozin-kináz gátló kezelést követően a betegek sejtjeiből kivont nukleáris extraktumban magasabb mértékben detektáltunk foszforilált STAT1 fehérjét, a defoszforiláció képességének elvesztése miatt. Luciferáz transzkripciós riporter rendszer alkalmazása során az új mutációt hordozó plazmidot tartalmazó U3C sejt vonalban IFN- γ stimulus hatására

magasabb luciferáz aktivitást tudtunk kimutatni a kontrollhoz (vad típusú plazmid) képest, ami szintén alátámasztotta a funkciónyerés tényét.

Jelen munkában egy XLP-s testvérpár esetében azonosítottunk új, korábban még nem leírt intronikus mutációt, az édesanya és az anyai nagymama heterozigóta a mutációra nézve. A *SH2D1A* relatív expressziója a betegnél teljesen hiányzott, az anyánál csökkent volt az egészséges kontrollhoz viszonyítva. A SAP fehérje expressziója a betegnél nem volt kimutatható sem Western blot módszerrel, sem áramlási citometriával, az anyánál csökkent fehérje expressziót detektáltunk, ami utalt a hordozó állapotra.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a *STAT1* gént ért mutáció fokozza a STAT1 funkcióját, fokozódik az IL-17+ T sejtek differenciálódásának a gátlása. Az IL-17+ T sejtek csökkent jelenléte fokozza a beteg *Candida* fertőzések iránti érzékenységet.

A *SH2D1A* gént érintett mutáció vizsgálatának eredményeként azt kaptuk, hogy nem alakul ki SAP fehérje, tehát nem jön létre az EBV-fertőzött B sejtek citotoxikus eltávolítása NK és CD8+ T sejtek által, ami hozzájárul a súlyos XLP fenotípus kialakulásához.

10 SUMMARY

The frequent and recurrent intracellular pathogens (e.g. *Candida albicans*) and viral (e.g. Epstein-Barr virus) infections may cause the lack or impaired function of cellular immune responses (T cell deficiency). The IL-17+ T cell immunity is impaired due to the gain-of-function STAT1 genetic defects, leading to the reduction of host defense against fungal infections and the development of chronic mucocutaneous candidiasis disease (CMCD). In X-linked lymphoproliferative disease (XLP) after Epstein-Barr virus infection, the natural killer cells are not able to remove uncontrollably multiplied B cells, and CD8 + T and NK cells – mediated cytotoxicity may not be developed. Both CMCD and the XLP can be classified as primary immunodeficiency diseases.

In my research work, the molecular pathological mechanisms of CMCD and XLP were examined. In both cases, the genetic alterations responsible for the development of diseases were confirmed by bi-directional DNA sequencing and the pathogenicity of mutations was proven by cell assays and various molecular biology methods.

Heterozygous missense mutations were identified on *STAT1* gene in nine patients with CMCD. Two mutations to DNA binding domain (DBD) and eight mutations were affected to the coil-coiled domain (CCD) of *STAT1*. Two genetic alterations were not described earlier in mutation databases, so novel sequence variants were determined. In two patients, decreased level of IL-17+ T cells after treatment of PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) and IMC (ionomycin) was measured by flow cytometry and negligible secretion of IL-17A and IL-22 cytokines were analysed by ELISA after stimulation of heat-killed *Candida* compared to healthy controls. The differentiated IL-17+ T cells treated with PMA/IMC secreted low levels of IL-17A and IL-22 cytokines in the patient carrying the novel allele compared to healthy control. Epstein-Barr virus (EBV) - transformed cell lines from CMCD patients and healthy controls were stimulated with IFN- γ and treated with tyrosine kinase inhibitor, the nuclear extract extracted from cells higher phosphorylated STAT1 protein was detected due to the loss of dephosphorylation. Higher luciferase activity was detected after IFN- γ stimulus from U3C cell line transfected with plasmid carrying novel mutation by Luciferase reporter assay compared to wild-type plasmid which is confirmed the fact of gain-of-function.

In the present work, we identified a novel and previously not described intronic mutation in siblings with siblings; the mother and maternal grandmother were heterozygous

for this mutation. The *SH2D1A* relative expression was completely missing in the patient, and was decreased in the mother compared to healthy control. Expression of the SAP protein was not detected by Western blot or flow cytometry from the sample of patient, decreased protein expression was detected from the sample of the mother, indicating she is a carrier.

These results show the mutation occurred on *STAT1* gene has enhances the function of STAT1, leading to the inhibition of IL-17 + T cell differentiation. The low percentage of IL-17+ T cells increases the patient's susceptibility to *Candida* infections.

The consequence of *SH2D1A* gene mutation showed no SAP protein expression was found thereby the cytotoxicity of EBV-infected B cells by NK and CD8 + T cells was diminished contributing to the severe phenotype XLP.

11 IRODALOMJEGYZÉK

Abusleme L, Moutsopoulos NM. IL-17; overview and role in oral immunity and microbiome. *Oral Dis*. 2016. doi: 10.1111/odi.12598. [Epub ahead of print]

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(4):735-46; quiz 747-8.

Al Rushood M, McCusker C, Mazer B, Alizadehfar R, Grimbacher B, Depner M, Ben-Shoshan M. Autosomal dominant cases of chronic mucocutaneous candidiasis segregates with mutations of signal transducer and activator of transcription 1, but not of Toll-like receptor 3. *J Pediatr*. 2013;163(1):277-9.

Aldave JC, Cachay E, Núñez L, Chunga A, Murillo S, Cypowjy S, Bustamante J, Puel A, Casanova JL, Koo A. A 1-year-old girl with a gain-of-function STAT1 mutation treated with hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Immunol*. 2013;33(8):1273-5.

Al-Mousa H, Abouelhoda M, Monies DM, Al-Tassan N, Al-Ghoniaim A, Al-Saud B, Al-Dhekri H, Arnaout R, Al-Muhsen S, Ades N, Elshorbaji S, Al Gazlan S, Sheikh F, Dasouki M, El-Baik L, Elamin T, Jaber A, Kheir O, El-Kalioby M, Subhani S, Al Idrissi E, Al-Zahrani M, Alhelale M, Alnader N, Al-Otaibi A, Kattan R, Al Abdelrahman K, Al Breacan MM, Bin Humaid FS, Wakil SM, Alzayer F, Al-Dusery H, Faquih T, Al-Hissi S, Meyer BF, Hawwari A. Unbiased targeted next-generation sequencing molecular approach for primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(6):1780-7.

Al-Muhsen S, Casanova JL. The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(6):1043-51.

An YF, Luo XB, Yang X, Wang J, Li L, Zhao XD. Clinical and molecular characteristics of Chinese patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(11):2043-7.

Azizi G, Simhag A, El Rouby NM, Mirshafiey A. Th22 Cells Contribution in Immunopathogenesis of Rheumatic Diseases. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2015;14(3):246-54.

Banninger G, Reich NC. STAT2 nuclear trafficking. *J Biol Chem.* 2004;279(38):39199-206.

Begitt A, Meyer T, van Rossum M, Vinkemeier U. Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(19):10418-23.

Boisson-Dupuis S, Kong XF, Okada S, Cypowyj S, Puel A, Abel L, Casanova JL. Inborn errors of human STAT1: allelic heterogeneity governs the diversity of immunological and infectious phenotypes. *Curr Opin Immunol.* 2012; 24(4):364-78.

Boles KS, Mathew PA. Molecular cloning of CS1, a novel human natural killer cell receptor belonging to the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily. *Immunogenetics.* 2001;52:302-307

Booth C, Gilmour KC, Veys P, Gennery AR, Slatter MA, Chapel H, Heath PT, Steward CG, Smith O, O'Meara A, Kerrigan H, Mahlaoui N, Cavazzana-Calvo M, Fischer A, Moshous D, Blanche S, Pachlopnik Schmid J, Latour S, de Saint-Basile G, Albert M, Notheis G, Rieber N, Strahm B, Ritterbusch H, Lankester A, Hartwig NG, Meyts I, Plebani A, Soresina A, Finocchi A, Pignata C, Cirillo E, Bonanomi S, Peters C, Kalwak K, Pasic S, Sedlacek P, Jazbec J, Kanegane H, Nichols KE, Hanson IC, Kapoor N, Haddad E, Cowan M, Choo S, Smart J, Arkwright PD, Gaspar HB. X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management and outcome of the disease. *Blood.* 2011;117(1):53-62.

Bottino C, Falco M, Parolini S, Marcenaro E, Augugliaro R, Sivori S, Landi E, Biassoni R, Notarangelo LD, Moretta L, Moretta A. NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med.* 2001;194(3):235-46.

Bouchon A, Cella M, Grierson HL, Cohen JI, Colonna M. Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol.* 2001;167:5517-5521

Bourgeois C, Majer O, Frohner IE, Tierney L, Kuchler K. Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting. *Curr Opin Microbiol.* 2010;13(4):401-8.

Brandau O, Schuster V, Weiss M, Hellebrand H, Fink FM, Kreczy A, Friedrich W, Strahm B, Niemeyer C, Belohradsky BH, Meindl A. 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(13):2407-13.

Brown MH, Boles K, van der Merwe PA, Kumar V, Mathew PA, Barclay AN. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med.* 1998;188(11):2083-90.

Canales L, Middlemas RO, III, Louro JM, South MA. Immunological observations in chronic mucocutaneous candidiasis. *Lancet* 1969; 2(7620):567-71. Note: Originally Volume II.

Cannons JL, Yu LJ, Hill B, Mijares LA, Dombroski D, Nichols KE, Antonellis A, Koretzky GA, Gardner K, Schwartzberg PL. SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappaB1. *Immunity.* 2004;21(5):693-706.

Casanova JL, Holland SM, Notarangelo LD. Inborn errors of human JAKs and STATs. *Immunity.* 2012;36(4):515-28.

Chang MT, Schwam ZG, Hajek MA, Paskhover B, Judson BL. Severe epistaxis due to aberrant vasculature in a patient with STAT-1 mutation. *Head Neck.* 2016; 38(3):E68-70.

Chapgier A, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E, Vogt G, Feinberg J, Prochnicka-Chalufour A, Casrouge A, Yang K, Soudais C, Fieschi C, Santos OF, Bustamante J, Picard C, de Beaucoudrey L, Emile JF, Arkwright PD, Schreiber RD, Rolinck-Werninghaus C, Rosen-Wolff A, Magdorf K, Roesler J, Casanova JL. Novel STAT1 alleles in otherwise healthy patients with mycobacterial disease. *PLoS Genet.* 2006; 2(8):e131.

Chellapandian D, Krueger J, Schechter T, Gassas A, Weitzman S, Naqvi A, Ali M. Successful Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in XIAP Deficiency Using Reduced-Intensity Conditioning. *Pediatr Blood Cancer.* 2016;63(2):355-7.

Chellapandian D, Das R, Zelle K, Wiener SJ, Zhao H, Teachey DT, Nichols KE; EBV-HLH Rituximab Study Group. Treatment of Epstein Barr virus-induced haemophagocytic lymphohistiocytosis with rituximab-containing chemo-immunotherapeutic regimens. *Br J Haematol.* 2013;162(3):376-82.

Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE Jr, Kuriyan J. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*. 1998;93(5):827-39.

Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol*. 2007;19(6):400-8.

Coci EG, Maetzig T, Zychlinski D, Rothe M, Suerth JD, Klein C, Schambach A. Novel self-inactivating vectors for reconstitution of Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Gene Ther*. 2015;15(3):245-54.

Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature*. 1995;376(6537):260-3.

Coffey AJ, Brooksbank RA, Brandau O, Oohashi T, Howell GR, Bye JM, Cahn AP, Durham J, Heath P, Wray P, Pavitt R, Wilkinson J, Leversha M, Huckle E, Shaw-Smith CJ, Dunham A, Rhodes S, Schuster V, Porta G, Yin L, Serafini P, Sylla B, Zollo M, Franco B, Bolino A, Seri M, Lanyi A, Davis JR, Webster D, Harris A, Lenoir G, de St Basile G, Jones A, Behloradsky BH, Achatz H, Murken J, Fassler R, Sumegi J, Romeo G, Vaudin M, Ross MT, Meindl A, Bentley DR. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet*. 1998; 20(2):129-35.

Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000;343(7):481-92.

Cooper MA, Pommering TL, Korányi K. Primary immunodeficiencies. *Am Fam Physician*. 2003;68(10):2001-8.

Cypowyj S, Picard C, Maródi L, Casanova JL, Puel A. Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. *Eur J Immunol*. 2012; 42(9):2246-54.

Dambuzá IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr Opin Immunol*. 2015;32:21-7.

Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994;264(5164):1415-21.

Davidson D, Shi X, Zhang S, Wang H, Nemer M, Ono N, Ohno S, Yanagi Y, Veillette A. Genetic evidence linking SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product, to Src-related kinase FynT in T(H)2 cytokine regulation. *Immunity*. 2004;21(5):707-17.

de la Fuente MA, Pizcueta P, Nadal M, Bosch J, Engel P. CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. *Blood*. 1997; 90:2398-2405

de la Fuente MA, Tovar V, Pizcueta P, Nadal M, Bosch J, Engel P. Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of the mouse homologue of CD84, a member of the CD2 family of cell surface molecules. *Immunogenetics*. 1999; 49:249-255

De Luca A, Zelante T, D'Angelo C, Zagarella S, Fallarino F, Spreca A, Iannitti RG, Bonifazi P, Renauld JC, Bistoni F, Puccetti P, Romani L. IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol*. 2010;3(4):361-73.

Debeljak M, Podkrajsek KT, Aplenc R, Jazbec J. X-linked lymphoproliferative disease with a novel SH2D1A gene mutation. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50(1):187.

Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene*. 2000;19(21):2628-37.

Decker T, Lew DJ, Mirkovitch J, Darnell JE Jr. Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *EMBO J*. 1991;10(4):927-32.

Deeg HJ, Lum LG, Sanders J, Levy GJ, Sullivan KM, Beatty P, Thomas ED, Storb R. Severe aplastic anemia associated with chronic mucocutaneous candidiasis. Immunologic and hematologic reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation*. 1986;41(5):583-6.

den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet*. 2001;109(1):121-4.

Depner M, Fuchs S, Raabe J, Frede N, Glocker C, Doffinger R, Gkrania-Klotsas E, Kumararatne D, Atkinson TP, Schroeder HW Jr, Niehues T, Dückers G, Stray-Pedersen A, Baumann U, Schmidt R, Franco JL, Orrego J, Ben-Shoshan M, McCusker C, Jacob CM, Carneiro-Sampaio M, Devlin LA, Edgar JD, Henderson P, Russell RK, Skytte AB, Seneviratne SL, Wanders J, Stauss H, Meyts I, Moens L, Jesenak M, Kobbe R, Borte S, Borte M, Wright DA, Hagin D, Torgerson TR, Grimbacher B. The Extended Clinical Phenotype of 26 Patients with Chronic Mucocutaneous Candidiasis due to Gain-of-Function Mutations in STAT1. *J Clin Immunol*. 2016; 36(1):73-84.

Dhalla F, Fox H, Davenport EE, Sadler R, Anzilotti C, van Schouwenburg PA, Ferry B, Chapel H, Knight JC, Patel SY. Chronic mucocutaneous candidiasis: characterization of a family with STAT-1 gain-of-function and development of an ex-vivo assay for Th17 deficiency of diagnostic utility. *Clin Exp Immunol*. 2016; 184(2):216-27.

Díaz-Jiménez DF, Pérez-García LA, Martínez-Álvarez JM, Mora-Montes HE. Role of the fungal cell wall in pathogenesis and antifungal resistance. *Curr Fungal Infect Rep.* 2012; 6:275–82.

Dong Z, Cruz-Munoz ME, Zhong MC, Chen R, Latour S, Veillette A. Essential function for SAP family adaptors in the surveillance of hematopoietic cells by natural killer cells. *Nat Immunol.* 2009;10(9):973-80.

Dotta L, Scomodoni O, Padoan R, Timpano S, Plebani A, Soresina A, Lougaris V, Concolino D, Nicoletti A, Giardino G, Licari A, Marseglia G, Pignata C, Tamassia N, Facchetti F, Vairo D, Badolato R. Clinical heterogeneity of dominant chronic mucocutaneous candidiasis disease: presenting as treatment-resistant candidiasis and chronic lung disease. *Clin Immunol.* 2016; 164:1-9.

Dupré L, Andolfi G, Tangye SG, Clementi R, Locatelli F, Aricò M, Aiuti A, Roncarolo MG. SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against EBV-infected cells. *Blood.* 2005; 105(11):4383-9.

Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, Thomassin N, Rosenzweig S, Harris J, Holland SM, Schreiber RD, Casanova JL. Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science.* 2001;293(5528):300-3.

Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S, Yang K, Chapgier A, Eidenschenk C, Eid P, Al Ghonaium A, Tufenkeji H, Frayha H, Al-Gazlan S, Al-Rayes H, Schreiber RD, Gresser I, Casanova JL. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet.* 2003;33(3):388-91.

Edgar JD. T cell immunodeficiency. *J Clin Pathol.* 2008; 61(9):988-93.

Eissmann P, Beauchamp L, Wooters J, Tilton JC, Long EO, Watzl C. Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood.* 2005;105(12):4722-9.

Eissmann P, Watzl C. Molecular analysis of NTB-A signaling: a role for EAT-2 in NTB-A-mediated activation of human NK cells. *J Immunol.* 2006;177(5):3170-7.

Engelhardt KR, Grimbacher B. Mendelian traits causing susceptibility to mucocutaneous fungal infections in human subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(2):294-305;

Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet.* 1964;1(7335):702-3.

Erdei A, Sármay G, Prechl J. Immunológia. Medicina Könyvkiadó Zrt. 2012

Eyerich S, Wagener J, Wenzel V, Scarponi C, Pennino D, Albanesi C, Schaller M, Behrendt H, Ring J, Schmidt-Weber CB, Cavani A, Mempel M, Traidl-Hoffmann C, Eyerich K. IL-22 and TNF- α represent a key cytokine combination for epidermal integrity during infection with *Candida albicans*. *Eur J Immunol*. 2011;41(7):1894-901.

Fagerlund R, Mélen K, Kinnunen L, Julkunen I. Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *J Biol Chem*. 2002; 277(33):30072-8.

Farinelli G, Capo V, Scaramuzza S, Aiuti A. Lentiviral vectors for the treatment of primary immunodeficiencies. *J Inher Metab Dis*. 2014;37(4):525-33.

Filipe-Santos O, Bustamante J, Chagnier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, Jouanguy E, Boisson-Dupuis S, Fieschi C, Picard C, Casanova JL. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol*. 2006;18(6):347-61.

Filipovich AH, Zhang K, Snow AL, Marsh RA. X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins? *Blood*. 2010;116(18):3398-408.

Fisher RC, Thorley-Lawson DA. Characterization of the Epstein-Barr virusinducible gene encoding the human leukocyte adhesion and activation antigen BLAST-1 (CD48). *Mol Cell Biol*. 1991;11:1614-1623.

Frans G, Moens L, Schaballie H, Van Eyck L, Borgers H, Wuyts M, Dillaerts D, Vermeulen E, Dooley J, Grimbacher B, Cant A, Declerck D, Peumans M, Renard M, De Boeck K, Hoffman I, François I, Liston A, Claessens F, Bossuyt X, Meyts I. Gain-of-function mutations in signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1): chronic mucocutaneous candidiasis accompanied by enamel defects and delayed dental shedding. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(5):1209-13.e6.

Fraser CC, Howie D, Morra M, Qiu Y, Murphy C, Shen Q, Gutierrez-Ramos JC, Coyle A, Kingsbury GA, Terhorst C. Identification and characterization of SF2000 and SF2001, two new members of the immune receptor SLAM/CD2 family. *Immunogenetics*. 2002;53:843-850.

Fu XY, Schindler C, Improta T, Aebersold R, Darnell JE Jr. The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(16):7840-3.

Gaffen SL, Hernández-Santos N, Peterson AC. IL-17 signaling in host defense against *Candida albicans*. *Immunol Res*. 2011; 50(2-3):181-7.

Gale CA, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, Berman J, Hostetter MK. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science*. 1998; 279(5355):1355-8.

Gaspar HB, Sharifi R, Gilmour KC, Thrasher AJ. X-linked lymphoproliferative disease: clinical, diagnostic and molecular perspective. *Br J Haematol*. 2002;119(3):585-95.

Gérart S, Sibérel S, Martin E, Lenoir C, Aguilar C, Picard C, Lantz O, Fischer A, Latour S. Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood*. 2013;121(4):614-23.

Giardino G, Somma D, Cirillo E, Ruggiero G, Terrazzano G, Rubino V, Ursini MV, Vairo D, Badolato R, Carsetti R, Leonardi A, Puel A, Pignata C. Novel STAT1 gain-of-function mutation and suppurative infections. *Pediatr Allergy Immunol*. 2016;27(2):220-3.

Gifford CE, Weingartner E, Villanueva J, Johnson J, Zhang K, Filipovich AH, Bleesing JJ, Marsh RA. Clinical flow cytometric screening of SAP and XIAP expression accurately identifies patients with SH2D1A and XIAP/BIRC4 mutations. *Cytometry B Clin Cytom*. 2014;86(4):263-71.

Gilmour KC, Cranston T, Jones A, Davies EG, Goldblatt D, Thrasher A, Kinnon C, Nichols KE, Gaspar HB. Diagnosis of X-linked lymphoproliferative disease by analysis of SLAM-associated protein expression. *Eur J Immunol*. 2000;30(6):1691-7.

Gilmour KC, Reich NC. Signal transduction and activation of gene transcription by interferons. *Gene Expr*. 1995;5(1):1-18.

Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest*. 2004;114(10):1379-88.

Görlich D, Kutay U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999;15:607-60.

Greenlund AC, Farrar MA, Viviano BL, Schreiber RD. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J*. 1994;13(7):1591-600.

Grierson HL, Skare J, Hawk J, Pauza M, Purtilo DT. Immunoglobulin class and subclass deficiencies prior to Epstein-Barr virus infection in males with X-linked lymphoproliferative disease. *Am J Med Genet*. 1991;40(3):294-7.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6(11):1123-32

Hernández-Santos N, Gaffen SL. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 2012;11(5):425-35.

Higgins E, Al Shehri T, McAleer MA, Conlon N, Feighery C, Lilic D, Irvine AD. Use of ruxolitinib to successfully treat chronic mucocutaneous candidiasis caused by gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(2):551-3.

Hirahara K, Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Kanno Y, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010; 21(6):425-34.

Hirata O, Okada S, Tsumura M, Kagawa R, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Takihara Y, Kobayashi M. Heterozygosity for the Y701C STAT1 mutation in a multiplex kindred with multifocal osteomyelitis. *Haematologica*. 2013;98(10):1641-9.

Hogarth PM, Craig J, McKenzie IF. A monoclonal antibody detecting the Ly-9.2 (Lgp 100) cell-membrane alloantigen. *Immunogenetics*. 1980;11:65-74.

Hoh MC, Lin HP, Chan LL, Lam SK. Successful allogeneic bone marrow transplantation in severe chronic mucocutaneous candidiasis syndrome. *Bone Marrow Transplant*. 1996;18(4):797-800.

Horvath CM, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE Jr. Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol Cell Biol*. 1996;16(12):6957-64.

Ihle J. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell*. 1996;84(3):331-4.

Ives ML, Ma CS, Palendira U, Chan A, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Engelhard D, Averbuch D, Magdorf K, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Tsumura M, Kobayashi M, Uzel G, Casanova JL, Tangye SG, Deenick EK. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations underlying autosomal dominant hyper-IgE syndrome impair human CD8(+) T-cell memory formation and function. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(2):400-11.e9.

Jorizzo JL, Sams WM Jr, Jegasothy BV, Olansky AJ. Cimetidine as an immunomodulator: chronic mucocutaneous candidiasis as a model. *Ann Intern Med.* 1980;92(2 Pt 1):192-5.

Kanegane H, Yang X, Zhao M, Yamato K, Inoue M, Hamamoto K, Kobayashi C, Hosono A, Ito Y, Nakazawa Y, Terui K, Kogawa K, Ishii E, Sumazaki R, Miyawaki T. Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012;23(5):488-93.

Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114(6):1265-73; quiz 1274.

Kilic SS, Puel A, Casanova JL. Orf Infection in a Patient with Stat1 Gain-of-Function. *J Clin Immunol.* 2015; 35(1):80-3.

Kingsbury GA, Feeney LA, Nong Y, Calandra SA, Murphy CJ, Corcoran JM, Wang Y, Prabhu Das MR, Busfield SJ, Fraser CC, Villeval JL. Cloning, expression, and function of BLAME, a novel member of the CD2 family. *J Immunol.* 2001;166:5675-5680.

Kirkpatrick CH, Rich RR, Graw RG Jr, Rogentine GN. Treatment of chronic moniliasis with lymphocyte transfusions. *Lancet.* 1970;2(7672):569.

Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2008;128(11):2625-30.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:485-517.

Kumamoto CA. Inflammation and gastrointestinal Candida colonization. *Curr Opin Microbiol.* 2011; 14(4):386-91.

Kumar N, Hanks ME, Chandrasekaran P, Davis BC, Hsu AP, Van Wagoner NJ, Merlin JS, Spalding C, La Hoz RM, Holland SM, Zerbe CS, Sampaio EP. Gain-of-function signal

transducer and activator of transcription 1 (STAT1) mutation-related primary immunodeficiency is associated with disseminated mucormycosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(1):236-9.

Lankester AC, Visser LF, Hartwig NG, Bredius RG, Gaspar HB, van der Burg M, van Tol MJ, Gross TG, Egeler RM. Allogeneic stem cell transplantation in X-linked lymphoproliferative disease: two cases in one family and review of the literature. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36(2):99-105.

Lanternier F, Cypowyj S, Picard C, Bustamante J, Lortholary O, Casanova JL, Puel A. Primary immunodeficiencies underlying fungal infections. *Curr Opin Pediatr.* 2013;25(6):736-47.

Latchman Y, McKay PF, Reiser H. Identification of the 2B4 molecule as a counter-receptor for CD48. *J Immunol.* 1998;161(11):5809-12.

Latour S, Gish G, Helgason CD, Humphries RK, Pawson T, Veillette A. Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product. *Nat Immunol.* 2001;2(8):681-90.

Latour S, Roncagalli R, Chen R, Bakinowski M, Shi X, Schwartzberg PL, Davidson D, Veillette A. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol.* 2003a;5(2):149-54.

Latour S, Veillette A. Molecular and immunological basis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev.* 2003b;192:212-24.

Latour S. Natural killer T cells and X-linked lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2007;7(6):510-4.

Lee PP, Mao H, Yang W, Chan KW, Ho MH, Lee TL, Chan JF, Woo PC, Tu W, Lau YL. *Penicillium marneffei* infection and impaired IFN- γ immunity in humans with autosomal-dominant gain-of-phosphorylation STAT1 mutations. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(3):894-6.e5.

Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:293-322.

Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(9):651-62.

Li X, Leung S, Kerr IM, Stark GR. Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. *Mol Cell Biol.* 1997;17(4):2048-56.

Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ. The Molecular Pathology of Primary Immunodeficiencies. *J Mol Diagn.* 2004; 6(2): 59–83.

Lindsten T, Seeley JK, Ballow M, Sakamoto K, St Onge S, Yetz J, Aman P, Purtilo DT. Immune deficiency in the X-linked lymphoproliferative syndrome. II. Immunoregulatory T cell defects. *J Immunol.* 1982;129(6):2536-40.

Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowyj S, Abhyankar A, Toubiana J, Itan Y, Audry M, Nitschke P, Masson C, Toth B, Flatot J, Migaud M, Chrabieh M, Kochetkov T, Bolze A, Borghesi A, Toulon A, Hiller J, Eyerich S, Eyerich K, Gulácsy V, Chernyshova L, Chernyshov V, Bondarenko A, Grimaldo RM, Blancas-Galicia L, Beas IM, Roesler J, Magdorf K, Engelhard D, Thumerelle C, Burgel PR, Hoernes M, Drexel B, Seger R, Kusuma T, Jansson AF, Sawalle-Belohradsky J, Belohradsky B, Jouanguy E, Bustamante J, Bué M, Karin N, Wildbaum G, Bodemer C, Lortholary O, Fischer A, Blanche S, Al-Muhsen S, Reichenbach J, Kobayashi M, Rosales FE, Lozano CT, Kilic SS, Oleastro M, Etzioni A, Traidl-Hoffmann C, Renner ED, Abel L, Picard C, Maródi L, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med.* 2011; 208(8):1635-48.

Liu Y, Yang B, Zhou M, Li L, Zhou H, Zhang J, Chen H, Wu C. Memory IL-22-producing CD4⁺ T cells specific for *Candida albicans* are present in humans. *Eur J Immunol.* 2009;39(6):1472-9.

Lu Z, Liu R, Huang E, Chu Y. MicroRNAs: New regulators of IL-22. *Cell Immunol.* 2016;304-305:1-8.

Ma CS, Hare NJ, Nichols KE, Dupré L, Andolfi G, Roncarolo MG, Adelstein S, Hodgkin PD, Tangye SG. Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4⁺ T cells. *J Clin Invest.* 2005;115(4):1049-59.

Ma CS, Pittaluga S, Avery DT, Hare NJ, Maric I, Klion AD, Nichols KE, Tangye SG. Selective generation of functional somatically mutated IgM⁺CD27⁺, but not Ig isotype-switched, memory B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Clin Invest.* 2006;116(2):322-33.

- Malbran A, Belmonte L, Ruibal-Ares B, Baré P, Massud I, Parodi C, Felippo M, Hodinka R, Haines K, Nichols KE, de Bracco MM. Loss of circulating CD27+ memory B cells and CCR4+ T cells occurring in association with elevated EBV loads in XLP patients surviving primary EBV infection. *Blood*. 2004;103(5):1625-31.
- Mao X, Ren Z, Parker GN, Sondermann H, Pastorello MA, Wang W, McMurray JS, Demeler B, Darnell JE Jr, Chen X. Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell*. 2005;17(6):761-71.
- Maródi L, Cypowj S, Casanova J, Puel A. The Role of Human IL-17 Immunity in Fungal Disease. *Curr Fungal Infect Rep*. 2013; 7(2): 132-7.
- Maródi L, Cypowj S, Tóth B, Chernyshova L, Puel A, Casanova JL. Molecular mechanisms of mucocutaneous immunity against *Candida* and *Staphylococcus* species. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 130(5):1019-27.
- Maródi L, Korchak HM, Johnston RB Jr. Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 1991;146(8):2783-9.
- Maródi L, Notarangelo LD. Immunological and genetic bases of new primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(11):851-61.
- Maródi L, Schreiber S, Anderson DC, MacDermott RP, Korchak HM, Johnston RB Jr. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J Clin Invest*. 1993;91(6):2596-601.
- Maródi L. Local and systemic host defense mechanisms against *Candida*: immunopathology of candidal infections. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16(8):795-801.
- Marsh RA, Bleesing JJ, Chandrakasan S, Jordan MB, Davies SM, Filipovich AH. Reduced-intensity conditioning hematopoietic cell transplantation is an effective treatment for patients with SLAM-associated protein deficiency/X-linked lymphoproliferative disease type 1. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(10):1641-5.
- Marsh RA, Bleesing JJ, Filipovich AH. Flow cytometric measurement of SLAM-associated protein and X-linked inhibitor of apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2013a;979:189-97.

Marsh RA, Bleesing JJ, Filipovich AH. Using flow cytometry to screen patients for X-linked lymphoproliferative disease due to SAP deficiency and XIAP deficiency. *J Immunol Methods*. 2010a;362(1-2):1-9.

Marsh RA, Madden L, Kitchen BJ, Mody R, McClimon B, Jordan MB, Bleesing JJ, Zhang K, Filipovich AH. XIAP deficiency: a unique primary immunodeficiency best classified as X-linked familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and not as X-linked lymphoproliferative disease. *Blood*. 2010b;116(7):1079-82.

Marsh RA, Rao K, Satwani P, Lehmsberg K, Müller I, Li D, Kim MO, Fischer A, Latour S, Sedlacek P, Barlogis V, Hamamoto K, Kanegane H, Milanovich S, Margolis DA, Dimmock D, Casper J, Douglas DN, Amrolia PJ, Veys P, Kumar AR, Jordan MB, Bleesing JJ, Filipovich AH. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for XIAP deficiency: an international survey reveals poor outcomes. *Blood*. 2013b;121(6):877-83.

Marsh RA, Villanueva J, Kim MO, Zhang K, Marmer D, Risma KA, Jordan MB, Bleesing JJ, Filipovich AH. Patients with X-linked lymphoproliferative disease due to BIRC4 mutation have normal invariant natural killer T-cell populations. *Clin Immunol*. 2009b;132(1):116-23.

Marsh RA, Villanueva J, Zhang K, Snow AL, Su HC, Madden L, Mody R, Kitchen B, Marmer D, Jordan MB, Risma KA, Filipovich AH, Bleesing JJ. A rapid flow cytometric screening test for X-linked lymphoproliferative disease due to XIAP deficiency. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009a;76(5):334-44.

Martinez-Martinez L, Martinez-Saavedra MT, Fuentes-Prior P, Barnadas M, Rubiales MV, Noda J, Badell I, Rodríguez-Gallego C, de la Calle-Martin O. A novel gain-of-function STAT1 mutation resulting in basal phosphorylation of STAT1 and increased distal IFN- γ -mediated responses in chronic mucocutaneous candidiasis. *Mol Immunol*. 2015; 68(2 Pt C):597-605.

Mathew PA, Garni-Wagner BA, Land K, Takashima A, Stoneman E, Bennett M, Kumar V. Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol*. 1993;151:5328-5337.

Mathieson BJ, Sharrow SO, Bottomly K, Fowlkes BJ. Ly 9, an alloantigenic marker of lymphocyte differentiation. *J Immunol*. 1980;125:2127-2136.

McBride KM, Banninger G, McDonald C, Reich NC. Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin- α . *EMBO J.* 2002;21(7):1754-63.

McBride KM, McDonald C, Reich NC. Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J.* 2000;19(22):6196-206.

McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity.* 2008; 28(4):445-53.

McKendry R, John J, Flavell D, Müller M, Kerr IM, Stark GR. High-frequency mutagenesis of human cells and characterization of a mutant unresponsive to both alpha and gamma interferons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(24):11455-9.

Mekki N, Ben-Mustapha I, Liu L, Boussofara L, Okada S, Cypowyj S, Ghariani N, Saidi W, Denguezli M, Casanova JL, Puel A, Barbouche MR. IL-17 T cells' defective differentiation in vitro despite normal range ex vivo in chronic mucocutaneous candidiasis due to STAT1 mutation. *J Invest Dermatol.* 2014; 134(4):1155-7.

Mertens C, Zhong M, Krishnaraj R, Zou W, Chen X, Darnell JE Jr. Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev.* 2006;20(24):3372-81.

Meyer T, Begitt A, Lödige I, van Rossum M, Vinkemeier U. Constitutive and IFN- γ -induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J.* 2002; 21(3):344-54.

Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J Leukoc Biol.* 2014; 95(4):667-76.

Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):240-73.

Morra M, Simarro-Grande M, Martin M, Chen AS, Lanyi A, Silander O, Calpe S, Davis J, Pawson T, Eck MJ, Sumegi J, Engel P, Li SC, Terhorst C. Characterization of SH2D1A missense mutations identified in X-linked lymphoproliferative disease patients. *J Biol Chem.* 2001;276(39):36809-16.

Mowen K, David M. Regulation of STAT1 nuclear export by Jak1. *Mol Cell Biol.* 2000;20(19):7273-81.

Mowen KA, Tang J, Zhu W, Schurter BT, Shuai K, Herschman HR, David M. Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α /beta-induced transcription. *Cell.* 2001;104(5):731-41.

Mössner R, Diering N, Bader O, Forkel S, Overbeck T, Gross U, Grimbacher B, Schön MP, Buhl T. Ruxolitinib Induces Interleukin 17 and Ameliorates Chronic Mucocutaneous Candidiasis Caused by STAT1 Gain-of-Function Mutation. *Clin Infect Dis.* 2016;62(7):951-3.

Mroczek EC, Seemayer TA, Grierson HL, Markin RS, Linder J, Brichacek B, Purtilo DT. Thymic lesions in fatal infectious mononucleosis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1987;43(2):243-55.

Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol.* 2007; 178(5):2623-9.

Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect.* 2011; 13(12-13):963-76.

Nagy N, Klein E. Deficiency of the proapoptotic SAP function in X-linked lymphoproliferative disease aggravates Epstein-Barr virus (EBV) induced mononucleosis and promotes lymphoma development. *Immunol Lett.* 2010;130(1-2):13-8.

Nagy N, Matskova L, Kis LL, Hellman U, Klein G, Klein E. The proapoptotic function of SAP provides a clue to the clinical picture of X-linked lymphoproliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(29):11966-71.

Nelson DL, Terhorst C. X-linked lymphoproliferative syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2000;122(3):291-5.

Ness-Schwickerath KJ, Jin C, Morita CT. Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human V γ 2V δ 2 T cells. *J Immunol.* 2010; 184(12):7268-80.

Netea MG, Maródi L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol.* 2010;31(9):346-53.

Nichols KE, Harkin DP, Levitz S, Krainer M, Kolquist KA, Genovese C, Bernard A, Ferguson M, Zuo L, Snyder E, Buckler AJ, Wise C, Ashley J, Lovett M, Valentine MB, Look

AT, Gerald W, Housman DE, Haber DA. Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(23):13765-70.

Nichols KE, Hom J, Gong SY, Ganguly A, Ma CS, Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL, Koretzky GA, Stein PL. Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med*. 2005a;11(3):340-5.

Nichols KE, Ma CS, Cannons JL, Schwartzberg PL, Tangye SG. Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*. 2005b;203:180-99.

Pachlopnik Schmid J, Canioni D, Moshous D, Touzot F, Mahlaoui N, Hauck F, Kanegane H, Lopez-Granados E, Mejstrikova E, Pellier I, Galicier L, Galambrun C, Barlogis V, Bordigoni P, Fourmaintraux A, Hamidou M, Dabadie A, Le Deist F, Haerynck F, Ouachée-Chardin M, Rohrlich P, Stephan JL, Lenoir C, Rigaud S, Lambert N, Milili M, Schiff C, Chapel H, Picard C, de Saint Basile G, Blanche S, Fischer A, Latour S. Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood*. 2011;117(5):1522-9.

Parolini S, Bottino C, Falco M, Augugliaro R, Giliani S, Franceschini R, Ochs HD, Wolf H, Bonnefoy JY, Biassoni R, Moretta L, Notarangelo LD, Moretta A. X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med*. 2000;192(3):337-46.

Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, Yeaman MR, Welch WH, Ibrahim AS, Edwards JE Jr, Filler SG. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol*. 2007; 5(3):e64.

Pilz A, Ramsauer K, Heidari H, Leitges M, Kovarik P, Decker T. Phosphorylation of the Stat1 transactivating domain is required for the response to type I interferons. *EMBO Rep*. 2003;4(4):368-73.

Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, Migaud M, Israel L, Chrabieh M, Audry M, Gumbleton M, Toulon A, Bodemer C, El-Baghdadi J, Whitters M, Paradis T, Brooks J, Collins M, Wolfman NM, Al-Muhsen S, Galicchio M, Abel L, Picard C, Casanova JL. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science*. 2011; 332(6025):65-8.

Puel A, Cypowyj S, Maródi L, Abel L, Picard C, Casanova JL. Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012; 12(6):616-22.

Puel A, Picard C, Cypowyj S, Lilic D, Abel L, Casanova JL. Inborn errors of mucocutaneous immunity to *Candida albicans* in humans: a role for IL-17 cytokines? *Curr Opin Immunol*. 2010; 22(4):467-74.

Purtilo DT, Cassel CK, Yang JP, Harper R. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet*. 1975;1(7913):935-40.

Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*. 2000;19(21):2619-27.

Recher M, Fried AJ, Massaad MJ, Kim HY, Rizzini M, Frugoni F, Walter JE, Mathew D, Eibel H, Hess C, Giliani S, Umetsu DT, Notarangelo LD, Geha RS. Intronic SH2D1A mutation with impaired SAP expression and agammaglobulinemia. *Clin Immunol*. 2013;146(2):84-9.

Reich NC, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(8):602-12.

Reich NC. STAT dynamics. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(5-6):511-8.

Reich NC. STATs get their move on. *JAKSTAT*. 2013;2(4):e27080.

Rigaud S, Fondanèche MC, Lambert N, Pasquier B, Mateo V, Soulas P, Galicier L, Le Deist F, Rieux-Laucat F, Revy P, Fischer A, de Saint Basile G, Latour S. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature*. 2006;444(7115):110-4.

Romani L, Bistoni F, Puccetti P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6(4):338-43.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):275-88.

Romberg N, Morbach H, Lawrence MG, Kim S, Kang I, Holland SM, Milner JD, Meffre E. Gain-of-function STAT1 mutations are associated with PD-L1 overexpression and a defect in B-cell survival. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(6):1691-3.

Roncagalli R, Taylor JE, Zhang S, Shi X, Chen R, Cruz-Munoz ME, Yin L, Latour S, Veillette A. Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat Immunol*. 2005;6(10):1002-10.

Sampaio EP, Hsu AP, Pechacek J, Bax HI, Dias DL, Paulson ML, Chandrasekaran P, Rosen LB, Carvalho DS, Ding L, Vinh DC, Browne SK, Datta S, Milner JD, Kuhns DB, Long Priel DA, Sadat MA, Shiloh M, De Marco B, Alvares M, Gillman JW, Ramarathnam V, de la Morena M, Bezrodnik L, Moreira I, Uzel G, Johnson D, Spalding C, Zerbe CS, Wiley H, Greenberg DE, Hoover SE, Rosenzweig SD, Galgiani JN, Holland SM. Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutations and disseminated coccidioidomycosis and histoplasmosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013; 131(6):1624-34.

Sampaio EP. Novel STAT1 GOF mutation affecting protein sumoylation. *J Clin Immunol.* 2016a; 36:300. (Meeting abstract).

Sampaio EP. STAT1 GOF mutation in the SH2 domain. *J Clin Immunol.* 2016b; 36:332. (Meeting abstract).

Sams WM Jr, Jorizzo JL, Snyderman R, Jegasothy BV, Ward FE, Weiner M, Wilson JG, Yount WJ, Dillard SB. Chronic mucocutaneous candidiasis. Immunologic studies of three generations of a single family. *Am J Med.* 1979;67(6):948-59.

Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, van Schaik S, Notarangelo L, Geha R, Roncarolo MG, Oettgen H, De Vries JE, Aversa G, Terhorst C. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature.* 1998;395(6701):462-9.

Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JE Jr. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science.* 1992; 257(5071):809-13.

Schindler C, Strehlow I. Cytokines and STAT signaling. *Adv Pharmacol.* 2000;47:113-74.

Seemayer TA, Gross TG, Egeler RM, Pirruccello SJ, Davis JR, Kelly CM, Okano M, Lanyi A, Sumegi J. X-linked lymphoproliferative disease: twenty-five years after the discovery. *Pediatr Res.* 1995;38(4):471-8.

Shahar E, Kriboy N, Pollack S. White cell enhancement in the treatment of severe candidosis. *Lancet.* 1995;346(8980):974-5.

Sharfe N, Nahum A, Newell A, Dadi H, Ngan B, Pereira SL, Herbrick JA, Roifman CM. Fatal combined immunodeficiency associated with heterozygous mutation in STAT1. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133(3):807-17.

Sharifi R, Sinclair JC, Gilmour KC, Arkwright PD, Kinnon C, Thrasher AJ, Gaspar HB. SAP mediates specific cytotoxic T-cell functions in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood*. 2004;103(10):3821-7.

Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE Jr. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*. 1994;76(5):821-8.

Shuai K, Liao J, Song MM. Enhancement of antiproliferative activity of gamma interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4932-41.

Shuai K. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res*. 2006;16(2):196-202.

Sivori S, Parolini S, Falco M, Marcenaro E, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol*. 2000;30:787-793

Snow AL, Marsh RA, Krummey SM, Roehrs P, Young LR, Zhang K, van Hoff J, Dhar D, Nichols KE, Filipovich AH, Su HC, Bleesing JJ, Lenardo MJ. Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *J Clin Invest*. 2009;119(10):2976-89.

Sobh A, Chou J, Schneider L, Geha RS, Massaad MJ. Chronic mucocutaneous candidiasis associated with an SH2 domain gain-of-function mutation that enhances STAT1 phosphorylation. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):297-9.

Soltész B, Tóth B, Sarkadi AK, Erdős M, Maródi L. The Evolving View of IL-17-Mediated Immunity in Defense Against Mucocutaneous Candidiasis in Humans. *Int Rev Immunol*. 2015; 34(4):348-63.

Soltész B, Tóth B, Shabashova N, Bondarenko A, Okada S, Cypowyj S, Abhyankar A, Csorba G, Taskó S, Sarkadi AK, Méhes L, Rozsival P, Neumann D, Chernyshova L, Tulassay Z, Puel A, Casanova JL, Sediva A, Litzman J, Maródi L. New and recurrent gain-of-function STAT1 mutations in patients with chronic mucocutaneous candidiasis from Eastern and Central Europe. *J Med Genet*. 2013; 50(9):567-78.

Speckmann C, Rohr J, and Ehl S. Genetic disorders of immunoregulation. In: *Primary immunodeficiency diseases: definition, diagnosis and management* (ed. by N. Rezaei N,

Aghamohammadi A, and Notarangelo LD), 2008;1:167–194. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.

Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science*. 1999; 283(5407):1535-8.

Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19(3):281-6.

Strahm B, Rittweiler K, Duffner U, Brandau O, Orłowska-Volk M, Karajannis MA, Stadt UZ, Tiemann M, Reiter A, Brandis M, Meindl A, Niemeyer CM. Recurrent B-cell non-Hodgkin's lymphoma in two brothers with X-linked lymphoproliferative disease without evidence for Epstein-Barr virus infection. *Br J Haematol*. 2000;108(2):377-382.

Strehlow I, Schindler C. Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *J Biol Chem*. 1998;273(43):28049-56.

Sumaya CV, Ench Y. Epstein-Barr virus mononucleosis in children. I. Clinical and general laboratory findings. *Pediatrics* 1985;75:1003-1010.

Sumazaki R, Kanegane H, Osaki M, Fukushima T, Tsuchida M, Matsukura H, Shinozaki K, Kimura H, Matsui A, Miyawaki T. SH2D1A mutations in Japanese males with severe Epstein-Barr virus--associated illnesses. *Blood*. 2001;98(4):1268-70.

Sumegi J, Huang D, Lanyi A, Davis JD, Seemayer TA, Maeda A, Klein G, Seri M, Wakiguchi H, Purtilo DT, Gross TG. 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(9):3118-25.

Sumegi J, Seemayer TA, Huang D, Davis JR, Morra M, Gross TG, Yin L, Romco G, Klein E, Terhorst C, Lanyi A. A spectrum of mutations in SH2D1A that causes X-linked lymphoproliferative disease and other Epstein-Barr virus-associated illnesses. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(6):1189-201.

Swain SL, McKinsty KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4⁺ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(2):136-48.

Szolnoky M, Tóth B, Soltész B, Pistár Zs, Okada S. A chronicus mucocutan candidiasis (CMC) 2016. (A közlemény publikálás alatt.)

Tabata Y, Villanueva J, Lee SM, Zhang K, Kanegane H, Miyawaki T, Sumegi J, Filipovich AH. Rapid detection of intracellular SH2D1A protein in cytotoxic lymphocytes from patients with X-linked lymphoproliferative disease and their family members. *Blood*. 2005;105(8):3066-71.

Takezaki S, Yamada M, Kato M, Park MJ, Maruyama K, Yamazaki Y, Chida N, Ohara O, Kobayashi I, Ariga T. Chronic mucocutaneous candidiasis caused by a gain-of-function mutation in the STAT1 DNA-binding domain. *J Immunol*. 2012;189(3):1521-6.

Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:623-55.

ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M, Shuai K. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*. 2002;22(16):5662-8.

Thorley-Lawson DA, Schooley RT, Bhan AK, Nadler LM. Epstein-Barr virus superinduces a new human B cell differentiation antigen (B-LAST 1) expressed on transformed lymphoblasts. *Cell*. 1982;30(2):415-25.

Thorpe ES, Handley HE. Chronic tetany and chronic mycelial stomatitis in a child aged four and one-half years. *Am J Dis Child*. 1929; 38(2):328-338.

Tóth B, Méhes L, Taskó S, Szalai Z, Tulassay Z, Cypowyj S, Casanova JL, Puel A, Maródi L. Herpes in STAT1 gain-of-function mutation [corrected]. *Lancet*. 2012; 379(9835):2500.

Tóth B, Soltész B, Gyimesi E, Csorba G, Veres Á, Lányi Á, Kovács G, Maródi L, Erdős M. Severe XLP Phenotype Caused by a Novel Intronic Mutation in the SH2D1A Gene. *J Clin Immunol*. 2015;35(1):26-31.

Toubiana J, Okada S, Hiller J, Oleastro M, Lagos Gomez M, Aldave Becerra JC, Ouachée-Chardin M, Fouyssac F, Girisha KM, Etzioni A, Van Montfrans J, Camcioglu Y, Kerns LA, Belohradsky B, Blanche S, Bousfiha A, Rodriguez-Gallego C, Meyts I, Kisand K, Reichenbach J, Renner ED, Rosenzweig S, Grimbacher B, van de Veerdonk FL, Traidl-Hoffmann C, Picard C, Marodi L, Morio T, Kobayashi M, Lilic D, Milner JD, Holland S, Casanova JL, Puel A; International STAT1 Gain-of-Function Study Group. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype. *Blood*. 2016;127(25):3154-64.

Trottestam H, Beutel K, Meeths M, Carlsen N, Heilmann C, Pasić S, Webb D, Hasle H, Henter JI. Treatment of the X-linked lymphoproliferative, Griscelli and Chédiak-Higashi syndromes by HLH directed therapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;52(2):268-72.

Uzel G, Sampaio EP, Lawrence MG, Hsu AP, Hackett M, Dorsey MJ, Noel RJ, Verbsky JW, Freeman AF, Janssen E, Bonilla FA, Pechacek J, Chandrasekaran P, Browne SK, Agharahami A, Gharib AM, Mannurita SC, Yim JJ, Gambineri E, Torgerson T, Tran DQ, Milner JD, Holland SM. Dominant gain-of-function STAT1 mutations in FOXP3 wild-type immune dysregulation-polyendocrinopathy-enteropathy-X-linked-like syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 131(6):1611-23.

Valdez PA, Wang H, Seshasayee D, van Lookeren Campagne M, Gurney A, Lee WP, Grewal IS. NTB-A, a new activating receptor in T cells that regulates autoimmune disease. *J Biol Chem*. 2004;279(18):18662-9.

van de Veerdonk FL, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, Koenen HJ, Cheng SC, Joosten I, van den Berg WB, Williams DL, van der Meer JW, Joosten LA, Netea MG. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 2009;5(4):329-40.

van de Veerdonk FL, Plantinga TS, Hoischen A, Smeekens SP, Joosten LA, Gilissen C, Arts P, Rosentul DC, Carmichael AJ, Smits-van der Graaf CA, Kullberg BJ, van der Meer JW, Lilic D, Veltman JA, Netea MG. STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med*. 2011; 365(1):54-61.

Veillette A, Zhang S, Shi X, Dong Z, Davidson D, Zhong MC. SAP expression in T cells, not in B cells, is required for humoral immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(4):1273-8.

Veillette A. SAP: a molecular switch regulating the immune response through a unique signaling mechanism. *Eur J Immunol*. 2003;33(5):1141-4.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24(2):179-89

Vignais ML, Sadowski HB, Watling D, Rogers NC, Gilman M. Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Mol Cell Biol*. 1996;16(4):1759-69.

Wells RS, Higgs JM, Macdonald A, Valdimarsson H, Holt PJ. Familial chronic mucocutaneous candidiasis. *J Med Genet*. 1972; 9(3):302-10.

Wen Z, Zhong Z, Darnell JE Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*. 1995;82(2):241-50.

Wente SR, Rout MP. The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(10):a000562.

Wildbaum G, Shahar E, Katz R, Karin N, Etzioni A, Pollack S. Continuous G-CSF therapy for isolated chronic mucocutaneous candidiasis: complete clinical remission with restoration of IL-17 secretion. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):761-4.

Williams DW, Jordan RP, Wei XQ, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, Lewis MA. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J Oral Microbiol*. 2013;5.

Wojciak JM, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. Structural basis for recruitment of CBP/p300 coactivators by STAT1 and STAT2 transactivation domains. *EMBO J*. 2009;28(7):948-58.

Wong YW, Williams AF, Kingsmore SF, Seldin MF. Structure, expression, and genetic linkage of the mouse BCM1 (OX45 or Blast-1) antigen. Evidence for genetic duplication giving rise to the BCM1 region on mouse chromosome 1 and the CD2/LFA3 region on mouse chromosome 3. *J Exp Med*. 1990;171:2115-2130

Wu C, Nguyen KB, Pien GC, Wang N, Gullo C, Howie D, Sosa MR, Edwards MJ, Borrow P, Satoskar AR, Sharpe AH, Biron CA, Terhorst C. SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells. *Nat Immunol*. 2001;2(5):410-4.

Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, Morio T, Onodera M, Ueki M, Watanabe N, Takada H, Takezaki S, Chida N, Kobayashi I, Ariga T. Two novel gain-of-function mutations of STAT1 responsible for chronic mucocutaneous candidiasis disease: impaired production of IL-17A and IL-22, and the presence of anti-IL-17F autoantibody. *J Immunol*. 2014; 193(10):4880-7.

Yang E, Henriksen MA, Schaefer O, Zakharova N, Darnell JE Jr. Dissociation time from DNA determines transcriptional function in a STAT1 linker mutant. *J Biol Chem*. 2002;277(16):13455-62.

Yang X, Miyawaki T, Kanegane H. SAP and XIAP deficiency in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Int*. 2012a;54(4):447-54.

Yang X, Wada T, Imadome K, Nishida N, Mukai T, Fujiwara M, Kawashima H, Kato F, Fujiwara S, Yachie A, Zhao X, Miyawaki T, Kanegane H. Characterization of Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in two

patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 and type 2. *Herpesviridae*. 2012b;3(1):1.

Yin L, Ferrand V, Lavoué MF, Hayoz D, Philippe N, Souillet G, Seri M, Giacchino R, Castagnola E, Hodgson S, Sylla BS, Romeo G. SH2D1A mutation analysis for diagnosis of XLP in typical and atypical patients. *Hum Genet*. 1999;105(5):501-5.

Yu R, Ding Y, Zhu L, Qu Y, Zhang C, Liu L, Chen L. IL-22 mediates the oral mucosal wound healing via STAT3 in keratinocytes. *Arch Oral Biol*. 2016;72:14-20.

Zelante T, Iannitti R, De Luca A, Romani L. IL-22 in antifungal immunity. *Eur J Immunol*. 2011;41(2):270-5.

Zerbe CS, Marciano BE, Katial RK, Santos CB, Adamo N, Hsu AP, Hanks ME, Darnell DN, Quezado MM, Frein C, Barnhart LA, Anderson VL, Uzel G, Freeman AF, Lisco A, Nath A, Major EO, Sampaio EP, Holland SM. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Primary Immune Deficiencies: Stat1 Gain of Function and Review of the Literature. *Clin Infect Dis*. 2016;62(8):986-94.

Zhang X, Wrzeszczynska MH, Horvath CM, Darnell JE Jr. Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1999;19(10):7138-46.

Zhong M, Henriksen MA, Takeuchi K, Schaefer O, Liu B, ten Hoeve J, Ren Z, Mao X, Chen X, Shuai K, Darnell JE Jr. Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(11):3966-71.

Zhu M, John S, Berg M, Leonard WJ. Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFN γ -mediated signaling. *Cell*. 1999;96(1):121-30.

Zhu W, Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2010;12(3):273-82.

<http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000115415>

<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>

<http://www.rcsb.org/pdb/ngl>

<http://www.uniprot.org/uniprot/P42224>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac>

12 TÁRGYSZAVAK

12.1 Key words

1. Chronic mucocutaneous candidiasis (CMC)
2. Gain-of-function mutation (GOF)
3. SH2 Domain Containing 1A (SH2D1A)
4. Signal transducer and activator of transcription (STAT)
5. Signaling lymphocytic Activation Molecule (SLAM)-Associated protein (SAP)
6. Th17 cells
7. X-linked lymphoproliferative disease (XLP)

12.2 Tárgyszavak

1. Krónikus mucocutan candidiasis (CMC)
2. Funkciónyerő mutáció (GOF)
3. SH2 Domain Containing 1A (SH2D1A)
4. Signal transducer and activator of transcription (STAT)
5. Signaling lymphocytic Activation Molecule (SLAM)-Asszociált fehérje (SAP)
6. Th17 sejtek
7. X kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség (XLP)

13 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt, hálás köszönettel tartozom Prof. Dr. Maródi László professzor úrnak, témavezetőmnek és az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszék korábbi vezetőjének, hogy támogatásával megteremtette kutatómunkám feltételeit. Köszönöm Professzor úrnak a kutatómunkám során adott sok hasznos szakmai tanácsait, útmutatásait, mindenre kiterjedő figyelmét, amely elősegítette szakmai fejlődésem és a laboratóriumi munkám.

Köszönöm Dr. Erdős Melinda egyetemi docensnek, hogy tanszékvezetőként támogatta és segítette kutatómunkám folytatását az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszéken.

Szeretném köszönetem kifejezni Lajszné Dr. Tóth Beáta, tudományos munkatársnak a kutatómunkám során kapott szakmai tanácsaiért, akihez bármikor fordulhattam kérdéseimmel a kísérletek megtervezését és kivitelezését illetően, aki segítette a laboratóriumi kutatómunkám és ezáltal nagyban hozzájárult a kísérletek eredményességéhez.

Köszönettel tartozom Dr. Gyimesi Editnek, korábbi témavezetőmnek, az áramlási citometriás kísérletek során adott szakmai tanácsaiért és segítségéért.

Köszönettel tartozom az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszék valamennyi munkatársának, külön kiemelve az Immunológiai és Molekuláris Genetika Laboratórium valamennyi korábbi dolgozóját, akik segítették a kutatómunkám: Barótáné Taskó Szilviának az ELISA mérések, Csorba Gabriellának és Pistár Zsuzsannának a molekuláris genetikai vizsgálatok során nyújtott segítségükért.

Továbbá külön köszönet illeti minden kollaborátor partnerünket, orvost és nővért. Szeretném megköszönni a külföldi orvosoknak és kutatóknak az együttműködést és a bizalmat: Dr. Nadejda Shabashova, Dr. Anastasia Bondarenko, Dr. Satoshi Okada, Dr. Sophie Cypowyj, Dr. Avinash Abhyankar, Prof. Dr. Pavel Rozsíval, Prof. Dr. David Neumann, Prof. Dr. Liudmyla Chernyshova, Prof. Dr. Jean-Laurent Casanova, Prof. Dr. Anna Sediva, Prof. Dr. Jiri Litzman, illetve külön megköszönöm Dr. Anne Puel-nek, a Descartes Egyetem kutatójának és munkatársainak a párizsi laborban eltöltött szakmai tréningen adott hasznos tanácsaikat és segítségüket. Szintén köszönet illeti a magyarországi orvosokat és kutatókat, akik hozzájárultak kutatómunkánkhoz: Dr. Sarkadi Adrien Katalin, Dr. Méhes Leonóra, Prof. Dr. Tulassay Zsolt, Dr. Lányi Árpád, és Dr. Kovács Gábor.

Szeretném megköszönni a betegeknek és a családtagjaiknak is az együttműködést.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm családom támogatását, akik minden körülmények között támogattak.



Nyilvántartási szám: DEENK/298/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Soltész Beáta
Neptun kód: KP9JNT
Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10044751

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Lajszné Tóth, B., **Soltész, B.**, Gyimesi, E., Csorba, G. É., Veres, Á., Lányi, Á., Kovács, G., Maródi, L., Erdős, M.: Severe XLP Phenotype Caused by a Novel Intronic Mutation in the SH2D1A Gene.
J. Clin. Immunol. 35 (1), 26-31, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-014-0117-1>
IF: 3.094
2. **Soltész, B.**, Tóth, B., Sarkadi, A. K., Erdős, M., Maródi, L.: The Evolving View of IL-17-Mediated Immunity in Defense Against Mucocutaneous Candidiasis in Humans.
Int. Rev. Immunol. 34 (4), 348-363, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/08830185.2015.1049345>
IF: 4.438
3. **Soltész, B.**, Lajszné Tóth, B., Shabashova, N., Bondarenko, A., Okada, S., Cypowj, S., Abhyankar, A., Csorba, G. É., Taskó, S., Sarkadi, A. K., Méhes, L., Rozsival, P., Neumann, D., Chernyshova, L., Tulassay, Z., Puel, A., Casanova, J. L., Sediva, A., Litzman, J., Maródi, L.: New and recurrent gain-of-function STAT1 mutations in patients with chronic mucocutaneous candidiasis from Eastern and Central Europe.
J. Med. Genet. 50 (9), 567-578, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101570>
IF: 5.636





További közlemények

4. Gulácsy, V., **Soltész, B.**, Petrescu, C., Bataneant, M., Gyimesi, E., Serban, M., Maródi, L., Lajszné Tóth, B.: A novel large deletion and single nucleotide insertion in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene.
Eur. J. Haematol. 95 (1), 93-98, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/ejh.12424>
IF: 2.544

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,712

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 13,168

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.11.10.

