

Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Imunologie



Mgr. Martina Fejtková

Fenotypová a funkční charakterizace leukocytů pacientů s dysregulací imunitního systému

Phenotypic and functional characterization of leukocytes in patients with immune system dysregulation

Disertační práce

Školitel: RNDr. Veronika Kanderová, Ph.D.
Konzultant: prof. MUDr. Tomáš Kalina, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, dne

Mgr. Martina Fejtková

.....

Poděkování

V první řadě děkuji své školitelce RNDr. Veronice Kanderové, Ph.D. za podporu, trpělivost, vstřícnost a profesionalitu, kterou věnovala řešení mého postgraduálního projektu a přípravě této disertační práce, a to i na její mateřské dovolené.

Dále bych chtěla poděkovat vedoucím pracoviště CLIP - cytometrie, prof. MUDr. Ondřeji Hrušákovi Ph.D., prof. MUDr. Janu Trkovi, Ph.D., prof. MUDr. Tomáši Kalinovi, Ph.D. a všem kolegům z pracoviště CLIP, 2. LF UK a FN Motol, kteří mi poskytli profesionální pracovní prostředí a rady při řešení celé řady otázek a problémů. Dále velmi děkuji kolegům z oddělení CLIP – molekulární genetiky, zejména MUDr. Michaelovi Svatoňovi za pomoc a trpělivost při genetických analýzách a kompletaci výsledků, MUDr. Markétě Rackové za špičkovou spolupráci v laboratoři a RNDr. Karolíně Škvárové-Kramarzové, Ph.D. za velkou pomoc při navrhování projektů.

Děkuji svým kolegyním Mgr. Jitce Stančíkové, Ph.D. a RNDr. Nadě Brdičkové, Ph.D. za psychickou podporu a cenné rady při psaní manuskriptů a disertační práce.

Dále chci poděkovat všem lékařům, kteří diagnostikovali a ošetřovali námi vyšetřované pacienty, za jejich spolupráci, pomoc a cenné názory, jmenovitě především MUDr. Markétě Bloomfield, Ph.D., MUDr. Tamaře Svobodové, Ph.D., MUDr. Martině Sukové a prof. MUDr. Janu Starému, Ph.D.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem pacientům a jejich rodinám, bez nichž by projekty nemohly být realizovány. Tuto práci bych ráda dedikovala zesnulému pacientovi projektu IFNAR1 a zesulé pacientce projektu HCK, tyto vědecké objevy jsou obrovskou nadějí pro další pacienty.

Velký dík patří celé mé rodině, bez jejich podpory by tyto úspěchy nebyly možné.

Řešení projektů bylo podpořeno granty Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK) 362119 a Agentury pro zdravotnický výzkum Ministerstva zdravotnictví České republiky NV19-05-00332.

Abstrakt

Vrozené poruchy imunity (IEI; inborn errors of immunity) jsou heterogenní skupinou onemocnění imunitního systému způsobující narušení funkcí přirozené i adaptivní imunity. Každý rok jsou celosvětově objeveny nové mutace genů kódujících nejrůznější proteiny figurující v imunitním systému. V současné době počet těchto nálezů překračuje 400. (Tangye et al., 2020) V této práci jsou popsány 3 nově identifikované autoinflamatorní poruchy u pacientů s IEI.

Toll-like receptory (TLR) 7 a 8 jsou endosomální receptory přirozené imunity, kde figurují jako molekuly rozpoznávající patogeny i endogenní autoantigeny. Dysregulace receptorů TLR7 a TLR8 u myši vede k autoimunitě a zánětu, u člověka je zatím imunopatologie TLR8 a TLR7 nejasná. Identifikovali jsme X-vázanou mutaci *c.1715G>T* v genu *TLR8*, která vede k autoimunitní hemolytické anémii a autoinflamatorním projevům u dvojčat, chlapců, v důsledku dysregulace TLR8 a TLR7 odpovědi zejména myeloidních buněk (snížení hladiny proteinu TLR8, jeho zkřížené reaktivitě na ligandy TLR7 a zesílení odpovědi receptoru TLR7).

Hematopoetická kináza (HCK; hematopoietic cell kinase) patří do rodiny Src kináz a hraje roli v migraci, adhezi a degranulaci myeloidních buněk. Aktivita kináz v rámci imunitní odpovědi musí být striktně regulována. U HCK tuto regulační funkci plní inhibiční tyrosin na C-konci, který v případě, že je fosforylován, vypíná aktivitu kinázy HCK. Identifikovali jsme heterozygotní mutaci *c.1545C>A* v genu *HCK*, která vede k absenci inhibičního tyrosinu a HCK je pak konstitutivně aktivní. Onemocnění se projevuje vaskulitidou kůže a chronickým zánětem a fibrózou plic v důsledku zvýšené adheze, migrace a zánětlivé kapacity myeloidních buněk.

Podjednotka 1 receptoru pro interferon alfa (IFNAR1) je jednou z podjednotek tvořící dimer receptoru pro interferony I. typu. Signalizace interferonů I. typu hraje klíčovou roli v antivirové imunitní odpovědi a zároveň zabraňuje nadměrné zánětlivé reakci v průběhu virové infekce. Identifikovali jsme homozygotní mutaci *c.922C>T* v genu *IFNAR1* u 15 měsíčního chlapce, u kterého se projevila silná zánětlivá reakce po očkování živou oslabenou vakcínou MMR v důsledku kompletní absence proteinu IFNAR1 a nedostatečné signalizaci interferonů I. typu.

Podrobná charakterizace nových mutací v genech *TLR8*, *HCK* a *IFNAR1* rozšířila spektrum jednotek IEI se zánětlivým projevem. Tyto studie mohou napomoci identifikaci onemocnění a léčbě u podobných případů.

Klíčová slova

Vrozená porucha imunity, zánětlivé onemocnění, funkční testování, Hematopoetická kináza, Toll-like receptor 8, Receptor pro interferon alfa

Abstract

Inborn errors of immunity (IEI) are a heterogenic group of diseases of the immune system causing dysregulations of both innate and adaptive immunity. New altered immune-related genes are discovered every year, nowadays reaching over 400. (Tangye et al., 2020) Here three new autoinflammatory disorders of IEI patients are described.

Toll-like receptors (TLR) 7 and 8 are endosomal receptors in the innate immune response against external pathogens and endogenous autoantigens. A dysregulation in TLR7 and TLR8 in mice causes autoimmunity and inflammation, however, in humans, the immunopathology of TLR8 and TLR7 remains unclear. We identified a novel X-linked *c.1715G>T* mutation in *TLR8* that leads to autoimmune haemolytic anaemia and autoinflammation in male twins caused by dysregulation in TLR8 and TLR7 response especially in myeloid cells (low TLR8 protein expression, cross-reactivity of TLR8 for TLR7 ligands and enhanced TLR7 response).

Hematopoietic cell kinase (HCK) belongs to the Src family of kinases and is involved in myeloid cell migration, adhesion and degranulation. Kinase activity in the immune response must be strictly regulated. In HCK, this regulation is based on C-terminal inhibitory tyrosine, which when phosphorylated, HCK kinase activity is switched off. We identified a heterozygous mutation *c.1545C>A* in *HCK* where inhibitory tyrosine is missing and HCK is constitutively active. The main disease symptoms were cutaneous vasculitis and chronic pulmonary inflammation that progressed to fibrosis due to increased adhesion, migration and inflammatory capacity of myeloid cells.

Interferon alpha receptor subunit 1 (IFNAR1) is one of the two subunits of a dimer creating the interferon type I receptor. Type I interferon signalling plays a crucial role in antiviral immune response as well as preventing an excessive inflammatory response during viral infection. We identified a novel homozygous mutation *c.922C>T* in *IFNAR1* in a 15-month old boy who suffered a severe inflammatory reaction after live attenuated MMR vaccine administration due to a complete absence of IFNAR1 protein, therefore no interferon type I signalling in the patient.

Detailed characterization of novel mutations in *TLR8*, *HCK* and *IFNAR1* genes broadened the spectrum of IEI with autoinflammation. These studies can help in disease identification and treatment in similar cases.

Keywords

Inborn error of immunity, inflammatory disease, functional testing, Hematopoietic cell kinase, Toll-like receptor 8, Interferon alpha receptor

Seznam zkratek

ADA – adenosin deamináza

AID – *AICDA* imunodeficiency

AIHA - autoimunitní hemolytická anemie

AIRE - autoimunitní regulátor

ALPS - autoimunitní lymfoproliferativní syndrom

AP-1 - aktivační protein 1

APC – antigen prezentující buňky

APECED - chronická mukokutánní kandidóza asociovaná s autoimunitní dystrofií

ATP – adenosin trifosfát

ATRA - kyselina all-trans retinová

BCG - *Bacille Calmette Guerin*

BTK - Brutonova tyrosin kináza

CARD – protein vážící kaspázu „Caspase recruitment domain-containing protein“

CD – diferenciační klastr „Cluster of differentiation“

cDNA – cirkulární DNA

CFTR – regulátor transmembránového přechodu u cystické fibrózy

cGAS - cyklická guanosin monofosfát-adenosin syntáza

CGD - chronická granulomatózní choroba

CMC - chronická mukokutánní kandidóza

CMV - cytomegalovirus

CNS – centrální nervová soustava

CR – komplementový receptor

CVID - běžný variabilní imunodeficit

DAG - diacylglycerol

DAMP - znak asociovaný s poškozením

DC – dendritická buňka

DMSO - dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dsRNA – dvojitá RNA

EBV - Epstein-Barr virus

ELISA – imunologická metoda na principu interakce enzymu a substrátu „enzyme-linked immunosorbent assay“

EMCV - virus encefalomyokarditidy

FAK - fokální adhezivní kináza

FcγR - Fc-gama receptor

FMF - familiární středomořská horečka

GOF – mutace zvyšující funkci proteinu „Gain-of-function“

GPCR - receptor spřažený s G-proteiny „G protein-coupled receptor“

GvHD - reakce štěpu proti hostiteli „graft versus host disease“

HCK - hematopoetická Src kináza

HLA – lidský leukocytární antigen

HLH - hemofagocytující lymfocytóza

HMGB1 – amfoterin, „high mobility group box 1“

HPAEC - lidské endoteliální buňky pulmonární arterie

HSCT – transplantace hematopoetických kmenových buněk

HSV - herpes simplex virus

HUVEC - lidské endoteliální buňky pupečnickové cévy

IBD - idiopatické střevní onemocnění

ICAM-1 - intracelulární adhezivní molekula 1

IEI - vrozená porucha imunity

IFN - interferon

IFNAR1 - interferon alfa receptorová podjednotka 1

IFNAR2 - interferon alfa receptorová podjednotka 2

IFNGR - interferon gama receptor

IFNLR1 - interferon lambda receptorová podjednotka 1

Ig - imunoglobulin

IL - interleukin

IL-2RG - interleukin 2 receptor gama

ILC – přirozené lymfoidní buňky

IP3 - inositol trifosfát

IRAK - kináza asociovaná s receptorem pro IL-1

IRF9 - interferon-regulační faktor 9

ISG15 – interferonem stimulovaný gen 15

ISGF3 – faktor 3 pro interferonem stimulovaný gen

ISRE – interferonem stimulovaný transkripční faktor

ITAM - imunoreceptorový na tyrosinu založený aktivační motiv

IUIS – mezinárodní společnost pro vrozené poruchy imunity

JAK – Janus kináza

KREC – κ -deleční rekombinantní excizní kroužky

LAT - adaptorový protein pro aktivaci T-lymfocytů

LFA-1 - antigen 1 asociovaný s lymfocytární funkcí

LOF – mutace snižující funkci proteinu „Loss-of-function“

LPS - lipopolysacharid

LRR – opakování bohaté na leucin „leucine-rich repeat“

LYST – regulátor lysozomální migrace

MAC – komplex atakující membránu „Membrane attack complex“

MAPK - mitogen-aktivovaná protein kináza

MCP-1 - monocytární chemoatraktant 1

mDC – myeloidní dendritické buňky

MHC-I - hlavní histokompatibilní komplex I

MHC-II - hlavní histokompatibilní komplex II

miRNA – mikro RNA

MMR - vakcína proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám „measles, mumps, and rubella“

mRNA – messenger RNA

mTOR - cíl rapamycinu u savců „mammalian target of rapamycin“

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

NGS – sekvenování nové generace

NK – přirození zabíječi „natural killer“

NLR – NOD-like receptor

NO – oxid dusnatý

NOD2 – nukleotid vážící oligomerizační protein 2

PAMP – molekulární vzory asociované s patogeny

PCR – polymerázová řetězová reakce

pDC – plasmacytoidní dendritické buňky

PI3K - fosfatidylinositol-3-kináza

PIP2 - fosfatidylinositol

PKC – protein-kináza C

PRR – receptor rozpoznávající vzor „Pattern recognition receptor“

qPCR – kvantitativní PCR

RF – revmatoidní faktor

RNA – ribonukleová kyselina

RNP – ribonukleární protein
ROS – reaktivní kyslíkové radikály
RTK – receptor tyrosin kináza
rtPCR – real-time PCR
SAMD9 – sterilní alfa motiv protein 9 „sterile alpha motif domain-containing protein 9“
SCID – závažná kombinovaná imunodeficience
SGD - specifický deficit granul
SH – src homologie
SLE – systémový lupus erythematosus
ssRNA – jednovláknová RNA
STAT – přenašeč signálu a aktivátor transkripce „signal transducer and activator of transcription“
TBX1 – T-box transkripční faktor 1
TCR – T-buněčný receptor
TGF – transformující růstový faktor
Th – pomocný T-lymfocyt
TIR - Toll/IL-1 receptorová doména
TLR – Toll-like receptor
TNF – tumor nekrotizující faktor
TNFR – receptor pro tumor nekrotizující faktor
TRAPS - syndrom asociovaný s receptorem pro tumor-nekrotizující faktor
TREC - excizní kroužky T-buněčného receptoru
TYK - tyrosin kináza 2
VDJ – segmenty pro V (variabilitu), D (diverzitu) a J (spojení, „joining“)
WAS - Wiskottův-Aldrichův syndrom
WES – celoexomové sekvenování
WGS – celogenomové sekvenování
WT – wild type
ZAP-70 - protein kináza 70 asociovaná s zeta řetězcem
ZIKV – ZIKA virus

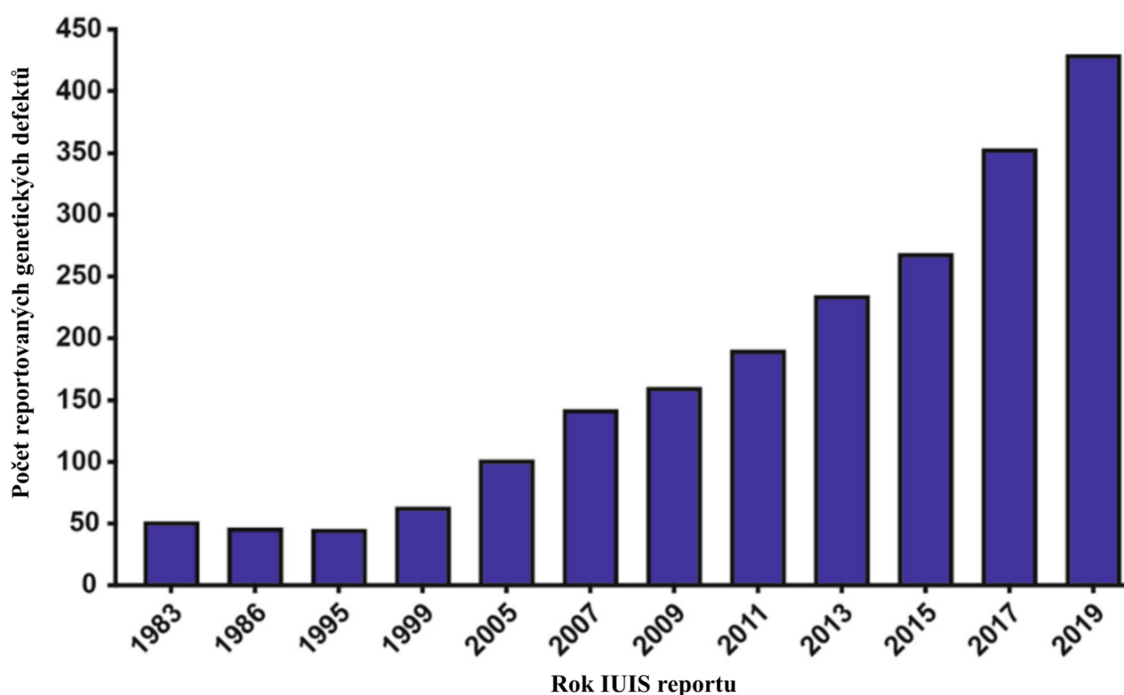
Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Seznam zkratk	6
Obsah.....	10
1. Vrozené poruchy imunity – úvod.....	11
1.1. Klasifikace IEI.....	12
I. Imunodeficity postihující buněčnou a humorální imunitu	12
II. Kombinované imunodeficity s asociovanými nebo syndromovými znaky.....	14
III. Protilátkové deficity	15
IV. Choroby s imunitní dysregulací	16
V. Poruchy počtu a funkce fagocytů	17
VI. Poruchy přirozené imunity	18
VII. Autoinflamatorní onemocnění.....	19
VIII. Komplementové imunodeficiency.....	23
IX. Selhání kostní dřeně	24
X. PID fenokopie	24
1.2. Metody vyšetřování IEI.....	24
I. Sekvenování DNA.....	25
II. TREC/KREC.....	26
III. Imunofenotypizace	26
IV. Funkční testování	27
1.3. Možnosti terapie.....	27
2. Cíle práce	29
3. Výsledky	30
3.1 Mutace <i>c.1715G>T</i> (p.G572V) v genu <i>TLR8</i>	30
3.2 Mutace <i>c.1545C>A</i> (p.Tyr515*) v genu <i>HCK</i>	39
3.3 Mutace <i>c.922C>T</i> (p.Gln308*) v genu <i>IFNARI</i>	47
4. Závěr	52
5. Souhrn	53
6. Summary	54
Použitá literatura	55
Přílohy disertační práce.....	65

1. Vrozené poruchy imunity – úvod

Vrozené poruchy imunity (Inborn Errors of Immunity, IEI) jsou heterogenní skupina poruch imunitního systému postihující mechanismy přirozené i adaptivní imunity, tedy i komplement, fagocytující buňky, T-lymfocyty i B-lymfocyty. Pacienti s IEI mohou být postiženi různě závažnou formou od pouhé vyšší náchylnosti k infekčním patogenům a nejspíváním, až po závažné dysregulace imunitního systému, které mohou vyústit v nutnost medikace a hospitalizace.

Nejzávažnější formy, mezi které patří např. těžká kombinovaná imunodeficiencie (SCID) s incidencí zhruba 1-2 na 100 000 nově narozených, mohou být smrtelné i přes léčebné zásahy. Pro tyto pacienty je zásadní novorozenecký screening (detekce excizních kroužků DNA vznikající při vývoji lymfocytů) (Dorsey & Puck, 2017) a rychlá transplantace hematopoetických kmenových buněk. Nejčetnější skupinou vrozených poruch imunity jsou protilátkové imunodeficity s více než polovinou případů IEI. Autoinflamatorní onemocnění jsou úzkou skupinou IEI, s celkovou prevalencí 1 na 50000 narozených (Tangye et al., 2020). Díky rozvoji molekulárně-genetických metod již bylo identifikováno více než 400 různých poruch imunity s identifikovanými geny, jejichž modifikace [ve smyslu aktivace, tzv. gain-of-function (GOF) nebo inhibice či kompletní absence, tzv. loss-of-function (LOF)] způsobila vážnou imunitní dysregulaci (Obr. 1).



Obr. 1 - Tendence objevování nových genů způsobujících vrozené poruchy imunity v letech 1983-2019. Data byla poskytnuta skupinou The International Union of Immunological Societies Expert Committee of Inborn Errors of Immunity (IUIS). (Upraveno z Tangye et al. 2020)

Pro praktické lékaře je důležité dobře rozpoznat varovné příznaky IEI v dětském věku pacienta a zahájit včasné laboratorní testování a případnou terapii. Prvními příznaky IEI mohou být špatné

prospívání, časté a opakující se infekce a záněty (kvasinkové infekce, virózy, meningitidy, pneumonie, a další). Dalším alarmujícím faktorem je problém s lymfatickou tkání/orgány, které mohou být zvětšené nebo naopak chybějící. V neposlední řadě IEI pacienti často v nízkém věku nepřiměřeně reagují na očkování živou oslabenou vakcínou, kdy není neobvyklé, že se očkováná choroba u pacienta rozvine. Známým příkladem je reakce na vakcínu BCG (*Bacille Calmette Guerin*), kdy se u pacienta s těžkým kombinovaným imunodeficitem (SCID) rozvinula plná forma tuberkulózy (Marciano et al., 2014). Všechny tyto faktory jsou přehledně sepsány v Tabulce 1 jako 10 varovných příznaků vrozených poruch imunity, které by měla většina dětských praktických lékařů dobře znát.

1	4 a více nových ušních infekcí v rámci jednoho roku
2	2 a více závažných infekcí dutin v rámci jednoho roku
3	2 a více měsíců na léčbě antibiotiky, s nízkým účinkem
4	2 a více pneumonií v rámci jednoho roku
5	Neschopnost dítěte přibírat na váze či normálně růst
6	Opakující se kožní či orgánové abscesy
7	Přetrvávající infekce ústní dutiny či fungální infekce kůže
8	Nutnost intravenózní antibiotické léčby infekcí
9	2 a více pokročilých infekcí včetně septikémie
10	Výskyt vrozené poruchy imunity v rodině

Tabulka 1: 10 varovných znaků vrozené poruchy imunity [zdroj ESID (Clinical Working Party)]

1.1. Klasifikace IEI

Podle chybějících, nefunkčních nebo špatně fungujících složek imunitního systému klasifikujeme IEI následovně (Bousfiha et al., 2020):

I. Imunodeficity postihující buněčnou a humorální imunitu

Funkce T-lymfocytů a často i B-lymfocytů je narušena a mohou být sníženy jejich počty.

a) Těžký kombinovaný imunodeficit, SCID

Komplikace u pacientů se SCID se objevují již časně po narození, dítě nepřibývá na váze, objevují se infekce respiračního traktu, průjemy, vyrážky a fungální infekce. Bez léčby se pacienti nedožívají více než 1 roku života (Yu et al., 2011). Lze rozlišit dvě hlavní varianty SCID, a) s T-lymfopenií (SCID T-B+) a b) s kombinací lymfopenie T a B (SCID T-B-), obě skupiny s následným rozdělením podle přítomnosti NK buněk. Mezi nejznámější SCID T- B+ NK- patří **deficit tzv. common gamma chain**, tedy společného γ řetězce skupiny cytokinových receptorů [pro IL-2 (interleukin 2), IL-4 (interleukin

4), IL-7 (interleukin 7) aj.], mezi **SCID T- B+ NK+** pak **LAT deficiency**, tedy nefunkčnost adaptorového proteinu LAT (z anglického linker for activation of T-cells), který se aktivuje při signalizaci přes T-buněčný receptor. (Bacchelli et al., 2016) Do skupiny SCID T- B- NK- pak řadíme např. **deficit ADA**, tedy absenci adenosin deaminázy, důležitého enzymu purinového metabolismu účastnícího se deaminace deoxyadenosinu. V organismu dochází k hromadění metabolitů (např. deoxyadenosinu a dATP) toxických zejména pro lymfocyty. Laboratorní nálezy často potvrzují lymfocytopenii s absencí T- i B-lymfocytů a NK buněk a nízké hladiny sérových imunoglobulinů, a s tím spojenou špatnou odpověď T-lymfocytů a specifických protilátek. Závažnost průběhu ADA deficitu koreluje s množstvím nahromaděných metabolitů. (Aiuti et al., 2009; Edwards, 1985; Flinn & Gennery, 2018)

b) Méně závažné kombinované imunodeficiency než SCID

V této skupině se vyskytují imunodeficiency se sníženými počty T- či B-lymfocytů, abnormálními hladinami imunoglobulinů a narušenou protilátkovou odpovědí. Do skupiny s nízkým počtem CD4+ T-lymfocytů patří např. **MHC-II deficit** nebo **LCK deficit**. **MHC-II** neboli hlavní histokompatibilní komplex II je molekula exprimovaná především antigen prezentujícími buňkami (dendritické buňky, makrofágy a B-lymfocyty), kde je jeho úlohou prezentovat peptidy exogenního původu CD4+ T-lymfocytům. Neschopnost zahájit CD4+T-mediovanou buněčnou a protilátkovou odpověď u MHC-II deficitu vede k opakovaným infekcím zejména gastrointestinálního traktu, respiračního ústrojí nebo vylučovací soustavy. Snížené počty CD4+ mohou být vysvětleny narušenou klonální proliferací na periférii či dozráváním v thymu (MHC-II je klíčovou molekulou pro maturaci a funkci CD4+ T-lymfocytů a jejich pozitivní selekci v thymu). Reziduální exprese MHC-II vysvětluje zachování minimálních počtů CD4+ buněk. (Grusby, et al., 1991; Klein et al., 1993) **LCK** je tyrosin kináza z rodiny Src asociovaná s T-buněčnými koreceptory CD4 a CD8 a fosforylující tyrosinová rezidua na ITAM motivech CD3 a zeta řetězců T-buněčného receptoru (TCR). ITAM neboli imunoreceptorový na tyrosinu založený aktivační motiv je dvakrát se opakující sekvence 4 aminokyselin a hraje nezastupitelnou roli v signalizaci imunoreceptorů. (Llamas-Guillén et al., 2017) Deficit nebo porucha LCK vede k poruše TCR-mediované aktivace T-lymfocytů. Pacienti trpí respiračními infekcemi, záněty a autoimunitními projevy. (Hauck et al., 2012) Další skupinou jsou onemocnění s nízkým počtem CD8+ T-lymfocytů, zapříčiněné např. **deficity MHC-I** nebo **ZAP-70**. **MHC-I** neboli hlavní histokompatibilní komplex I (nebo také HLA-I, lidský leukocytární antigen I) je druhým typem MHC, který prezentuje antigen, v tomto případě CD8+ T-lymfocytům; nachází se na většině buněk, prezentované antigeny jsou buňce vlastní nebo virové peptidy. **MHC-I deficit** může být způsoben mutacemi v genech *TAP1*, *TAP2*, jejichž produkty TAP1 a TAP2 jsou podjednotky transportéru TAP lokalizované v membráně endoplasmatického retikula. Heterodimer TAP1/TAP2 je zodpovědný za transport peptidů pro jejich prezentaci na MHC-I. Snížené počty CD8+ T-lymfocytů nebo úplná CD8+ lymfopenie jsou způsobeny narušenou pozitivní selekcí v thymu z důvodu chybějící

MHC-I antigenní prezentace. Naopak se objevují vyšší hladiny $\gamma\delta^+$ T-lymfocytů. Pacienti trpí většinou bakteriálními infekcemi, chronickým zánětem plic, granulomatózními lézemi kůže nebo vaskulitidou. Těžké virové infekce nebývají popisovány, zřejmě díky zapojení i jiných antivirových mechanismů, jako je např. humorální imunitní odpověď, stále dostatečná (i když snižená) hladina CD8⁺ T-lymfocytů nebo díky $\gamma\delta^+$ T-lymfocytům a NK buňkám. (Hanna & Etzioni, 2014; Zimmer et al., 2005) **ZAP-70** (protein kináza 70 asociovaná s zeta řetězcem) hraje nepostradatelnou roli v signalizaci T-buněčného receptoru. Deficit ZAP-70 je asociovaný s defektní T-buněčnou signalizací a proliferací, pacienti trpí opakovanými infekcemi dýchacích cest, virovými infekcemi [např. EBV (Epstein-Barr virus), CMV (Cytomegalovirus)] či kandidózou. (Llamas-Guillén et al., 2017) Do skupiny méně závažných kombinovaných imunodeficitů patří i např. **deficit kostimulačních molekul**, jako je **CD40** nebo **CD40L**. Molekula CD40 a příslušný ligand CD154 (CD40L) hrají nepostradatelnou úlohu v imunologické synapsi B-lymfocyty (exprimuje CD40) a aktivovaného T-lymfocyty (exprimuje CD40L), která je podstatná pro proliferaci a izotypový přesmyk B-lymfocytů. Jejich deficitem vzniká tzv. hyper-IgM syndrom, kdy B-lymfocyt produkuje pouze protilátky izotypu IgM; u pacientů se objevují opakované infekce dýchacích cest či sepse. (Tsai et al., 2015)

II. Kombinované imunodeficity s asociovanými nebo syndromovými znaky

Tyto imunodeficity jsou vždy charakteristické příslušným klinickým nebo imunologickým projevem. Jedním ze zástupců je **Ataxia teleangiectasia** neboli syndrom Louis-Barové. Vzniká mutací v genu *ATM*, který kóduje DNA-dependentní proteinkinázu, která signalizuje opravným mechanismům po narušení DNA. Vyznačuje se poruchami v opravném systému dvojitých zlomů DNA např. při VDJ rekombinaci při vývoji T- a B-lymfocytů, nízkými počty T-lymfocytů a sníženou hladinou imunoglobulinů izotypu IgG, IgE nebo IgA; a dále např. neurologickými problémy a zvýšenou náchylností k nádorovým onemocněním (Hoche et al., 2014). Dalším známým imunodeficitem v této skupině je **Wiskottův-Aldrichův syndrom (WAS)**. Příčina je v mutaci genu *WAS* na X-chromozomu, kódovaný protein např. kontroluje organizaci aktinového cytoskeletu a tvorbu imunologické synapse. Pacienti trpí náchylností k infekcím z důvodu špatné protilátkové odpovědi, trombocytopenií, ekzémy, objevují se i maligní nádory lymfatického systému. Transplantace kostní dřeně bývá jedinou možnou terapií (Salima et al., 2015). **Syndrom diGeorge** je způsoben delecí na chromosomu *22q11.2* a postihuje zhruba 1 z 3000 dětí, které pak trpí anomáliemi srdce, imunodeficitem, poruchou růstu a deformacemi obličeje. V deletované oblasti je více než 35 genů, což vysvětluje širokou škálu symptomů. Imunologicky nejzávažnější je delece genu *TBX1*, tedy T-box transkripčního faktoru 1. Ten zajišťuje správný vývoj arterií a thymu. Z důvodu hypoplastického nebo chybějícího thymu se pak u pacientů setkáváme s T-buněčnou lymfopenií a autoimunitními chorobami, které mohou být důsledkem snížených počtů regulačních T-lymfocytů. (Kobrynski & Sullivan, 2007) Další imunodeficity patřící do této skupiny jsou např. hyper-IgE syndromy vzniklé např. na podkladě **STAT3** (signal transducer and activator of transcription 3) **loss-of-function (LOF)** mutací nebo

deficitu receptoru pro interleukin 6 (IL-6R). STAT3 LOF se mimo zvýšené hladiny IgE projevuje také lymfopenií, eosinofilií, infekcemi stafylokoky a kandidózou. (Chandesris et al., 2012) STAT3 je transkripčním faktorem a zastává roli v signalizaci IL-6, receptorů pro interferony I. a II. typu, receptorů pro IL-12 a IL-23, tyrosin kinázových receptorů a receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Také zastává roli na sliznicích signalizací pomocí IL-22, která vede k expresi antimikrobiálních peptidů (např. lidský beta defensin 2). (Vogel et al., 2015) U **IL-6R deficitu** jsou příznaky obdobné jako u STAT3 LOF, jsou spojeny s nedostatečnou signalizací především IL-6 a s tím spojenou nízkou aktivací STAT3-závislé signalizační dráhy. (Spencer et al., 2019) U STAT3 LOF a stejně tak u IL6R deficitu je narušena produkce IL-21, který je zodpovědný za maturaci B-lymfocytů. Je popsáno, že u nezralých B-lymfocytů převažuje produkce IgE. (Mogensen, 2013; Wesemann et al., 2011)

III. Protilátkové deficity

Projevy protilátkových deficitů se začínají objevovat až kolem 1. roku života, důvodem je přítomnost IgG z mateřského mléka v organismu (kojených) dětí. Hlavními příznaky protilátkových deficitů jsou chronické záněty a opakované bakteriální infekce, laboratorně pak nalézáme snížené počty B-lymfocytů.

a) Hypogamaglobulinémie

B-lymfocyty jsou u těchto onemocnění značně sníženy nebo úplně chybí, počty prekurzorů v kostní dřeni jsou v normě. Nejznámějším protilátkovým deficitem je X-vázaná **Brutonova agamaglobulinémie**. Mutovaným genem je *BTK*, kódující Brutonovu tyrosin kinázu. Ta zajišťuje správný vývoj B-lymfocytů a zajišťuje signalizaci přes preB-buněčný receptor, který se tvoří po přestavbě segmentů těžkého řetězce. Také hraje roli v aktivaci mastocytů při signalizaci IgE receptoru. BTK fosforyluje fosfolipázu C, která následně hydrolyzuje fosfatidylinositol (PIP2) na druhé posly inositol trifosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG). Ti spouštějí řadu B-lymfocytárních signalizačních drah důležitých k jejich vývoji a aktivaci. V dnešní době se agamaglobulinémie úspěšně léčí intravenózními imunoglobuliny. (Bruton, 1952; Winkelstein et al., 2006) Do skupiny hypogamaglobulinémií patří i formy **běžného variabilního imunodeficitu (CVID)** na podkladě např. CD19 či CD21 deficitu. CD19, CD21 spolu s CD81 a CD225 tvoří komplex B-buněčného receptoru. CD19 má výběžek do cytoplasmy s tyrosin-kinázovými zbytky, zajišťuje tedy přenos signálu do buňky. CD21 je také znám jako komplementový receptor 2 (CR2) a zajišťuje vazbu komplementu, hraje tedy roli v eliminaci imunokomplexů a apoptotických buněk. Pacienti trpí hypogamaglobulinémií a opakujícími se infekcemi; podávání intravenózních imunoglobulinů je nutností od raného věku. (Wentink et al., 2015)

b) Ostatní protilátkové deficity

V této skupině se vyskytují další protilátkové deficity, patří sem poruchy s abnormálně nízkými hladinami sérových imunoglobulinů izotypu IgG a IgA, kdy hladina IgM může být v normě nebo

zvýšená. Takzvaný hyper-IgM syndrom může mít hned několik příčin, mezi nejznámější v této skupině patří **AID deficiency**, kdy je poškozen gen *AICDA* pro tvorbu aktivací indukované cytidin deaminázy, která se v B-lymfocytech germinálních center účastní izotypového přesmyku a somatické hypermutace. (Revy et al., 2000) Dále se sem řadí izotypové nebo funkční deficity, mezi které patří například **selektivní IgA deficit**, který ale může být často asymptomatický (Yel, 2010) nebo **selektivní IgM deficit**, kdy pacienti trpí častými pneumokokovými a bakteriálními infekcemi. (Gupta & Gupta, 2017)

IV. Choroby s imunitní dysregulací

Autoimunitní projevy bývají často asociovány s vrozenými poruchami imunity. Zvláštní skupinu onemocnění s imunitní dysregulací tvoří hemofagocytující lymfohistiocytóza (HLH). Dále sem patří známé syndromy jako je autoimunitní lymfoproliferativní syndrom (ALPS) nebo aktivační mutace Janus kinázy 1 [JAK1 gain-of-function (GOF)].

a) HLH

HLH neboli **hemofagocytující lymfohistiocytóza** má několik podskupin v závislosti na poškozeném genu, např. genu pro perforin či *LYST* (lysosomal-trafficking regulator), které jsou důležité pro exocytózu lytických granul CD8⁺ T-lymfocytů a NK buněk. Všeobecně se HLH projevuje hyperaktivací cytotoxických buněk (T, NK), hyperprodukcí cytokinů, typický je nález hemofagocytujících makrofágů v kostní dřeni. HLH může být primární či sekundární. Primární formy jsou způsobeny mutacemi ve výše uvedených a dalších genech. Bez rychlé léčby, tedy transplantace krvetvorných buněk, vedou rychle k multiorgánovému selhání a smrti. Mezi sekundární HLH patří například i viscerální leishmanióza, která ale není vrozenou poruchou imunity. Toto onemocnění způsobuje jednobuněčný parazit rodu *Leishmania*; v makrofázích se množí, způsobuje chronický zánět, makrofágy se aktivují a hemofagocytují. (Fatima et al., 2018; Suková et al., 2010)

b) Syndromy s autoimunitou

Hlavními skupinami syndromů s autoimunitními projevy jsou např. **autoimunitní lymfoproliferativní syndrom (ALPS)** a různá **idiopatická střevní onemocnění (IBD; inflammatory bowel disease)**. **ALPS** může být způsoben mutací jedním z několika genů kódujících důležité součásti apoptotické dráhy jako jsou kaspáza 3, kaspáza 10 nebo FAS. FAS neboli TNFRSF6 je receptor patřící do TNFR (tumor necrosis factor receptor) rodiny, jeho ligandem je FASL. Po vazbě FAS se spouští apoptotická dráha FAS⁺ buňky. (Fu et al., 2016) Při mutaci receptoru FAS dochází k narušení apoptózy, objevují se příznaky jako splenomegalie, lymfadenopatie (zvětšené lymfatické uzliny) nebo lymfomy. (Lambotte et al., 2013) Mezi **IBD** v rámci vrozených poruch imunity patří mimo jiné **deficity interleukinu 10 či jeho receptoru**. IL-10 je sekretován monocyty, makrofágy, T- a B-lymfocyty, dendritickými buňkami, epitelálními buňkami i mastocyty a má úlohu protizánětlivou, imunosupresivní, inhibuje funkci tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF α ; tumor necrosis factor

alpha) a zajišťuje homeostázu ve střevním traktu. Signalizuje přes IL-10R, aktivuje Janus kinázu 1 (JAK1) a Tyrosin kinázu 2 (TYK2). Následně dochází k fosforylaci STAT3 a expresi protizánětlivých cytokinů. (Zhu et al., 2017) Pacienti trpící IBD mívají zánětlivé projevy ve střevním traktu z důvodu nedostatečné sekrece regulačního IL-10, také se může projevit artritida, folikulitida (zánět vlasových váčků) nebo dermatitida. (Kotlarz et al., 2012)

V. Poruchy počtu a funkce fagocytů

Fagocyty buňky imunitního systému plní nezaměnitelnou roli v boji s patogeny. Jejich snížené počty nebo snížená funkce ohrožují zdraví a život pacienta neschopností zachytit infekci a nastartovat imunitní odpověď; vysoké počty nebo zvýšená schopnost fagocytózy naopak poškozují tkáň a orgány pacienta z důvodu chronického zánětu. Dvě hlavní skupiny poruch fagocytózy jsou neutropenie a funkční defekty fagocytů.

a) Neutropenie

Neutropenie je popisována jako pokles absolutního počtu neutrofilních granulocytů a má několik stádií od mírné po těžkou. Pacienti často trpí bakteriálními infekcemi ústní dutiny, gastrointestinálního traktu nebo kůže, kde neutrofilie brání vniknutí bakterií přes sliznici do organismu. Nejběžnější patogeny, které ohrožují pacienty s neutropenií, jsou *Staphylococcus aureus* a gram-negativní bakterie. Pokles počtu neutrofilních granulocytů může být způsoben poruchami genů důležitých pro zrání granulocytů, např. *ELANE* – gen pro neutrofilní elastázu, která je součástí cytoplasmatických granulí a jako serinová proteáza likviduje patogeny (Papayannopoulos et al., 2010) nebo *CEBPE* – genu pro CCAAT/enhancer vazebný protein ζ, také znám jako CRP1, který působí jako pro-apoptotický faktor a zajišťuje maturaci granulocytů; jeho porucha způsobuje defekt maturace - tzv. **specifický deficit granul** (SGD; specific granule deficiency). Tato granula obsahují myeloperoxidázu, laktoferin a transkobalamin, tedy antimikrobiální peptidy, které svou enzymatickou aktivitou zajišťují zneškodnění patogenů. (Boxer & Dale, 2002; Maaloul et al., 2016; Notarangelo, et al., 2008; Serwas et al., 2018)

b) Funkční defekty fagocytů

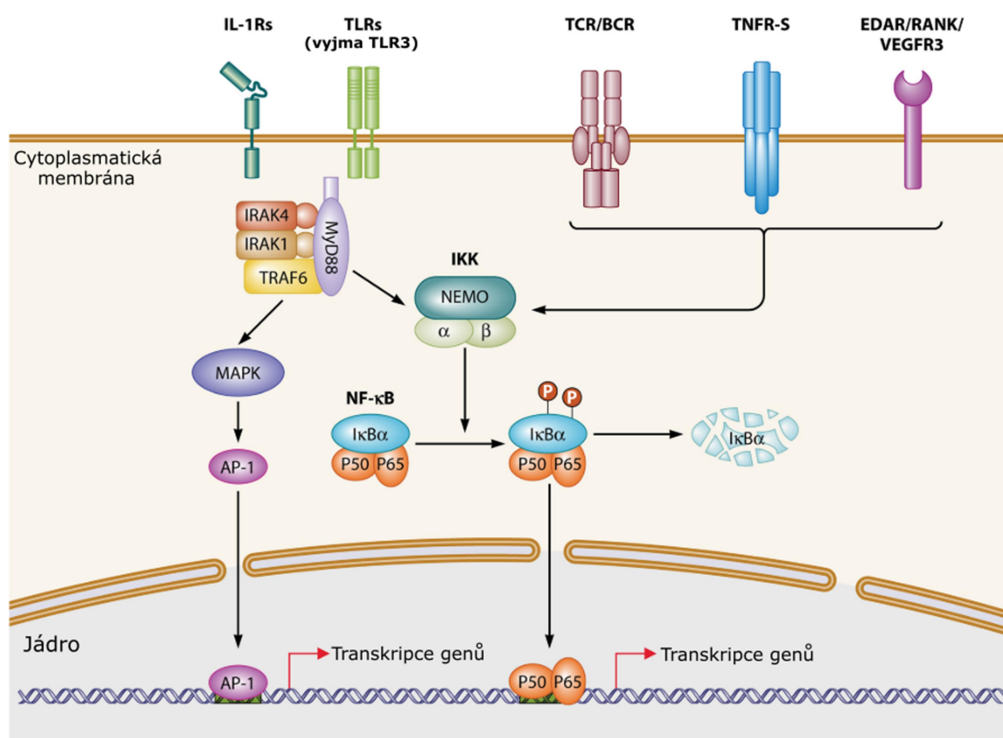
Funkční defekty jsou zpravidla způsobené změnou nebo ztrátou funkce fagocytů. Nejznámějšími zástupci jsou mutace v genu *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) způsobující **cystickou fibrózu**; a mutace v genech pro **podjednotky NADPH** (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) **oxidázy** způsobující **chronickou granulomatózní chorobu (CGD; chronic granulomatous disease)**. Gen *CFTR* kóduje protein pro chloridový kanál patřící mezi ABC transportéry. Tento kanál je v membráně epitelálních buněk zodpovědný za přenos chloridových aniontů do extracelulárního prostoru přes membránu buněk především plic, střeva a slinivky. Pacienti mají narušenou funkci slinivky břišní, dýchací obtíže, sníženou saturaci kyslíkem a v jejich potu je detekována vyšší hladina chloridu. Dnes jsou pacienti s cystickou fibrózou zpravidla schopni vést normální život, avšak

onemocnění je nevyhléditelné. Je možné zmírnit obtíže inhalační léčbou, oxygenoterapií, a pokud to věk a zdravotní stav pacienta dovoluje, může být přikročeno k transplantaci plic. (Sheppard & Welsh, 1999; Turkalj et al., 2019) U **CGD** dochází k mutaci jedné z podjednotek NADPH oxidázy fagocytujících buněk. NADPH sestává z komplexu 5 podjednotek (2 membránových a 3 cytosolických) a zajišťuje tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů. NADPH zajistí vazbu elektronů na molekulový kyslík ve fagosomu, ve kterém je pohlcený patogen eliminován. U pacientů se CGD je NADPH dysfunkční, objevují se granulomy, tvořené především nahromaděnými makrofágy, které nejsou schopny patogen eliminovat, ten zůstává nezničen uvnitř fagosomu. (Heyworth, et al., 2003; Pao et al., 2004)

VI. Poruchy přirozené imunity

a) Náchylnost k bakteriálním a parazitárním infekcím

Pokud je narušena správná funkce některé části přirozené imunity, mohou se objevovat opakující se bakteriální onemocnění a s nimi spojené abscesy, sepse, dokonce i meningitida. Velice častá bývá stafylokoková onemocnění. Mezi nejznámější poruchy této skupiny patří **deficit IRAK4** (kináza asociovaná s receptorem pro IL-1; IL-1 receptor associated kinase) nebo **deficit MyD88**. Tyto molekuly hrají nepostradatelnou roli v signalizaci Toll-like receptorů. IRAK4 je protein, který je aktivován po vazbě ligandu na receptor TLR a fosforylaci molekuly MyD88 (Obr. 2).



Obr. 2 - Schéma signalizace Toll-like receptorů; po vazbě ligandu na TLR dochází k vazbě molekuly MyD88, její fosforylaci a v kaskádě jsou dále aktivovány molekuly IRAK1 a IRAK4 spolu s TRAF6. Tento komplex spouští signální dráhu mitogen-aktivované protein kinázy (MAPK), kde následně štěpený aktivační protein 1 (AP-1) přechází do jádra a aktivuje transkripci genů pro tvorbu cytokinů. Také aktivuje dráhu NF-κB (nukleární

faktor kappa B; nuclear factor kappa B) (p50/p56) a tento komplex spouští transkripci genů pro tvorbu prozánětlivých cytokinů. (Upraveno z Picard, et al., 2011)

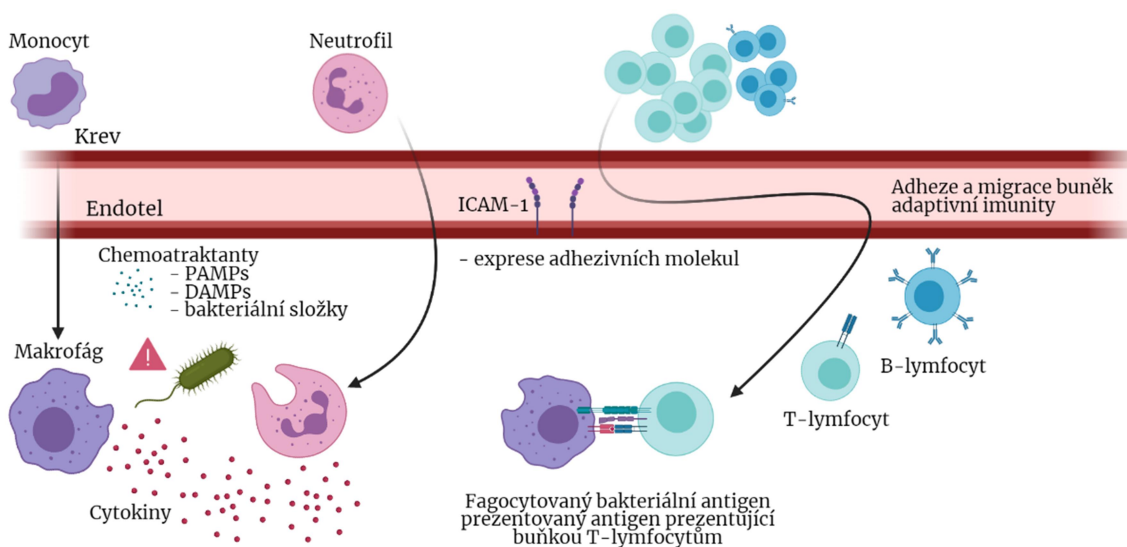
b) *Náchylnost k mykobakteriálním a virovým infekcím*

Do této skupiny náleží především pacienti s Mendelovskou náchylností k mykobakteriálním chorobám. Mendelovská dědičnost je charakterizována jediným genem zodpovědným za onemocnění, který je zděděn dominantně (k manifestaci je potřeba jedna alela) či recesivně (k manifestaci jsou potřeba obě alely genu). Vyznačuje se náchylností k mykobakteriím typu BCG (*Bacille Calmette Guerin*), tedy oslabenou variantou *Mycobacterium bovis*, dále kmeny *Salmonella* nebo netuberkulózními bakteriemi. Takový stav může být způsoben deficitem **interferon gama (IFN γ) receptoru (IFNGR1, IFNGR2 deficit)**, pacienti s tímto deficitem jsou náchylní spíše na virové patogeny a bakterie kmene *Salmonella* nebo *Listeria*. (Bustamante, et al., 2014) Podobný fenotyp jako IFNGR deficit může způsobovat i **deficit STAT1 (STAT1 loss-of-function, STAT1 LOF)**. STAT1 hraje nezastupitelnou roli v signalizaci interferonů. V případě vazby IFN γ na jeho receptor tvoří následně STAT1 homodimer a přechází do jádra buňky. Pokud je ligandem IFN α nebo IFN β , STAT1 tvoří heterodimer se STAT2 a následně komplex s interferon-regulačním faktorem 9 (IRF9) a opět přechází do buněčného jádra, kde působí jako transkripční faktor k aktivaci genů ISRE (interferon stimulation response element). (Khodarev, et al., 2012) Pokud STAT1 chybí nebo je nefunkční, je porušena tvorba výše uvedených signalizačních komplexů a tedy interferonová imunitní odpověď. Pacienti se STAT1 LOF často trpí mykobakteriálními infekcemi, kožními abscesy, kandidózou a virovými infekcemi jako je např. herpes simplex virus 1 (HSV-1) z důvodu nedostatečné reakce na interferony I. a II. typu a z nedostatku jejich produkce. Zamezení vniknutí intracelulárních patogenů do buněk a zastavení jejich dalšího šíření je tím narušeno. (Dupuis et al., 2003; Kong et al., 2010)

VII. **Autoinflamatorní onemocnění**

Autoinflamatorní onemocnění jsou relativně nově objevenou skupinou (převážně) vrozených onemocnění, kde hlavním symptomem je zánět. Protože v této disertační práci předkládám 3 nová autoinflamatorní onemocnění, schématicky popisují, co je zánět. Dle nejčastěji používané definice je zánět sled reakcí, které doprovázejí narušení homeostázy organismu a mají vést k ochraně daného místa (nebo celého organismu) proti infekci. Tyto reakce zpravidla vedou k lokalizaci zánětu a následnému hojení. Zánět může být místní nebo celkový. V případě místního zánětu registrujeme 4 základní projevy, tedy zvýšenou teplotu (calor), bolest (dolor), otok (tumor) a začervenání (rubor). Dále se zánět dělí na akutní, který po fázi utlumení a hojení končí bez následků, a chronický, kde dochází k poškozování tkáně z důvodu příliš dlouhé aktivity imunitních buněk (produkce poškozujících enzymů, cytokinů, formace granulomů) a bývá patologický. Zánět je sledem imunologických a fyziologických procesů řízených cytokiny. Na počátku je rozpoznání molekul se strukturou patogenů či jiného poškození - jsou jimi znaky asociované s patogeny (PAMPs; pathogen-associated molecular patterns) a znaky asociované s poškozením (DAMPs; damage associated

molecular patterns). Tyto signály jsou zachyceny receptory přirozené imunity, mezi které patří Toll-like receptory (TLR) nebo receptory s nukleotid-vazebnou doménou a repetitivními bohatými na leucin (NLRs; nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors). Následnou signalizací dochází k amplifikaci produkce DAMPs a prozánětlivých cytokinů, mezi které patří IL-1 β , IL-6 nebo TNF α . Tyto molekuly zajistí migraci dalších imunitních buněk (makrofágů, neutrofilních granulocytů) do místa infekce/poškození a v tento moment dochází k polarizaci adaptivní imunitní odpovědi (Obr. 3). Podle typu produkovaných cytokinů se tyto polarizace dělí dle druhu pomocných T-lymfocytů (Th1, Th2, Th17 a další), které dále regulují migraci dalších buněk. V závěrečných fázích akutního zánětu je důležité, aby včas nastoupily supresivní mechanismy [produkce IL-10, TGF β (transformující růstový faktor beta; transforming growth factor beta), migrace regulačních T-lymfocytů (Treg), exprese PD-1 (protein programované buněčné smrti; programmed cell death protein 1) a FAS/FASL] a zánět byl ukončen. Pokud tomu tak není, zánět přechází do chronického stavu a dochází k poškození okolní tkáně.



Obr. 3 - Schéma zánětu. V místě poškození se objevují fagocytující buňky, jako jsou makrofágy nebo neutrofilní granulocyty (neutrofilny), a pohlcují patogenní částice. Zároveň vytváří cytokinové prostředí, které povolává další buňky přirozené i adaptivní imunity. Na povrchu endotelu se objevují adhezivní molekuly [např. ICAM-1 (intracelulární adhezivní molekula 1; intracellular adhesion molecule 1) nebo endoteliální mucin], které pomáhají dalším imunitním buňkám se zachytit a prostupovat endotelem do místa zánětu. Fagocytované antigeny (např. bakteriální) jsou zpracovány a prezentovány na povrchu antigen prezentujících buněk pomocným T-lymfocytům, které zahajují druhou fázi imunitní odpovědi, specifickou proti danému antigenu. V místě se objevují i B-lymfocyty, které maturují a mění se na plasmablasty produkující protilátky. (vytvořeno v BioRender.com)

Jako první se pojem „autoinflamatorní“ objevil v roce 1999 v časopise Cell, kde byl diskutován objev mutace v receptoru TNF (TNFR) způsobující periodický syndrom asociovaný s receptorem pro tumor-nekrotizující faktor (TRAPS; tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome).

(McDermott et al., 1999) Všeobecně se autoinflamatorní onemocnění vyznačují opakovanými, často ničím nepodmíněnými záněty z důvodu dysregulace složek přirozené imunity, mohou se objevovat i autoreaktivní klony T-lymfocytů. (Ciccarelli et al., 2013)

a) Systémová zánětlivá onemocnění

Systémové projevy zpravidla zahrnují více orgánů nebo soustav, a to i v případě, že se symptomy projevují převážně lokalizovaně. Jednou z hlavních skupin systémových zánětů jsou **monogenní autoinflamatorní onemocnění**, kam patří **familiární středomořská horečka (FMF; familial mediterranean fever)**. Ta je nejznámější a nejběžnější dědičnou autoinflamatorní chorobou. Bylo již objeveno přes 300 variant genů, které způsobují FMF; dědičnost je autozomálně recesivní. Způsobuje ji mutace v genu *MEFV* (mediterranean fever), který působí jako regulátor přirozené imunity a kóduje protein zodpovědný za tvorbu pyrinu. Pyrin je intracelulární receptor bakteriálních toxinů, který v odpovědi na infekci zajišťuje sestavení inflamasomu. Klinicky se FMF často projevuje opakovanými horečkami, záněty plic, kloubů, může se objevit i vyrážka a bolesti hlavy. Ve vážnějších případech se objevuje amyloidóza (ukládání proteinu amyloidu v orgánech, nejčastěji v ledvinách), kde mutovaný *MEFV* ovlivňuje jeho produkci. (Rowczenio et al., 2017; Touitou, 2001) Dále sem patří již zmiňovaný **TRAPS** vyznačující se dlouhotrvajícími horečkami a způsobený mutací v podjednotce 55 receptoru pro TNF (TNFR1A). Porucha v TNFR, respektive v signalizaci TNF, je zásadní ve funkci přirozené imunity, kdy mutované receptory nevážou TNF, hromadí se v endoplasmatickém retikulu a jsou strukturně nefunkční (dochází ke špatnému sbalení). Špatně sbalené TNFR se pak hromadí uvnitř buňky, tvoří shluky a spouští alternativní prozánětlivou signalizaci. Mezi příznaky TRAPS patří vyrážky, otoky, bolesti kloubů, záněty srdečního svalu, hrdla a sliznic. (Bulua et al., 2012; McDermott et al., 1999)

Druhou významnou skupinou systémových zánětlivých onemocnění jsou **multifaktoriální autoinflamatorní onemocnění**. Do této skupiny patří **Crohnova choroba**, chronické onemocnění gastrointestinálního traktu nejčastěji postihující tenké střevo. Symptomy se objevují i mimo střevní trakt, pacienti trpí často dermatitidami, různou mírou postižení muskuloskeletárního aparátu, nebo jaterními problémy. Z genetického hlediska nebylo dlouho jasné, co onemocnění způsobuje. Bylo však zjištěno, že mutace v proteinu NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2), dříve znám pod zkratkou CARD15 (caspase recruitment domain-containing protein 15), později také pojmenován IBD1 (inflammatory bowel disease protein 1) vede často k projevům Crohnovy choroby. Protein NOD2 je receptorem přirozené imunity (PRR; pattern recognition receptor), rozpoznává bakteriální peptidoglykany (např. muramyl dipeptid) a po jejich vazbě spouští pro-apoptickou signalizaci a NF- κ B dráhu u hematopoetických buněk, ale i u dalších typů buněk, jako např. epiteliálních buněk tenkého střeva nebo Panethových buněk. Loss-of-function mutace v proteinu NOD2 vede ke ztrátě jeho funkce, bakteriální peptidoglykany nejsou rozpoznávány a rozvíjí se Crohnova choroba. (Ha & Khalil, 2015; Rochereau et al., 2021)

b) Sterilní zánět

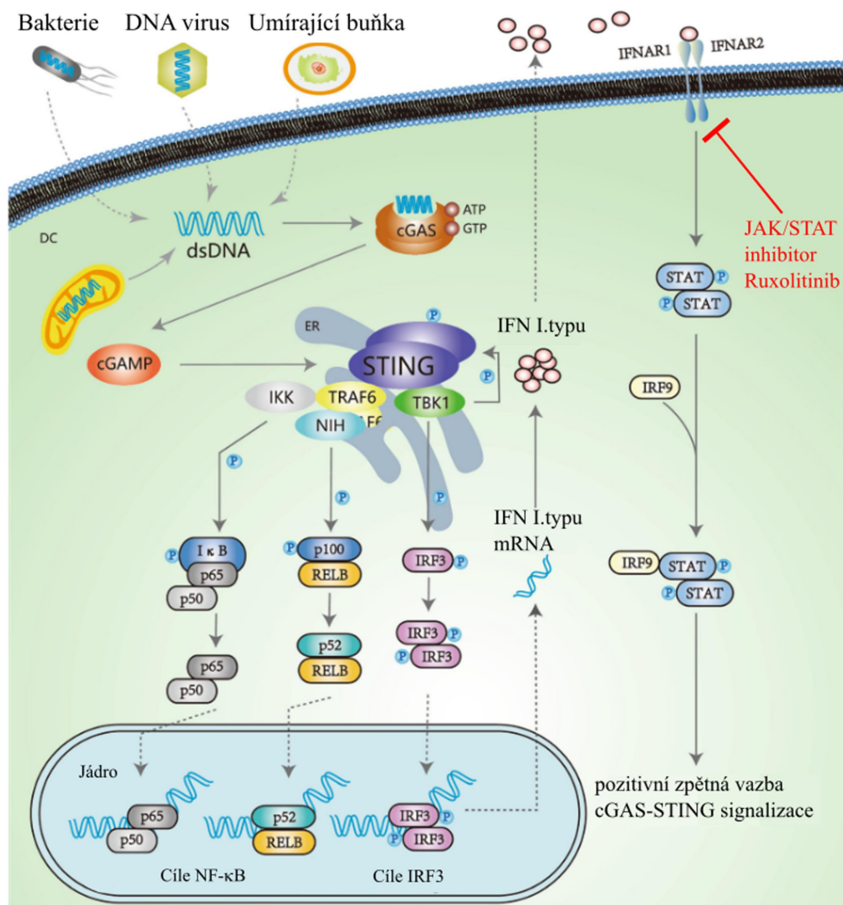
Onemocnění, která jsou způsobena sterilně vznikajícím zánětem, se objevují nejčastěji v kostech a kloubech nebo kůži. Sterilní zánět spouští poškození uvnitř tkáně, které nezpůsobil žádný patogen či cizorodá částice. Mohou to být vnitřní poranění po úrazu, infarkty myokardu, poranění ledvin, transplantace orgánu, ischemie, ale všechny tyto důvody mají společné nedostatečné zásobení krví určitého orgánu či tkáně a následnou hypoxii. Z molekulárně biologického hlediska se i u sterilního zánětu na počátku objevují spouštěče imunitní odpovědi, tentokrát pocházející z poškozených vlastních buněk, které podléhají nekróze. Do extracelulárního prostoru se dostávají molekuly, jako je HMGB1 (high mobility group box 1 neboli amphoterin), který je součástí procesu transkripce genů, nebo molekuly DNA a ATP, které následně fungují jako DAMPs. (Shen et al., 2013)

Příkladem onemocnění, kde figuruje sterilní zánět, je **cherubismus**, neboli familiární fibrózní osteodysplazie horní i dolní čelisti. Mutace se nachází v genu *SH3BP2*, ten kóduje SH3 vazebný protein 2, který figuruje především v komunikaci mezi imunitními buňkami a také v aktivaci B-lymfocytů a makrofágů. Příliš aktivní protein SH3BP2 způsobuje zánět v čelistních kostech a spouští se produkce osteoklastů. Osteoklasty spouští proces remodelace kosti a dojde k jejímu narušení. (Ueki et al., 2001)

c) Interferonopatie I. typu

Interferony I. typu, tedy IFN α a IFN β , působí především jako obrana proti virovým infekcím. Signalizace ISRE (schéma u projektu IFNAR1 - viz Obr. 19, strana 48) vede k transkripci IFN-stimulovaných genů a k aktivaci dráhy NF- κ B, která následně zajistí tvorbu prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6 nebo TNF α). Interferonopatie se vyznačuje systémovým zánětem, autoimunitou nebo imunodeficitem. Příčinou onemocnění je narušení rozpoznávání tzv. „self“ a „non-self“, kdy dochází jednak k narušení citlivosti Toll-like receptorů a zároveň dochází ke kumulaci endogenních nukleových kyselin v buňce, čímž je překročena minimální koncentrace pro aktivaci TLR.

Do této skupiny patří např. onemocnění zvané **STING** (odvozeno od stejnojmenného proteinu (STING, stimulator interferonových genů, jiným označením transmembránový protein 173). Vyznačuje se nadměrným systémovým zánětem, především kůže, plic a cévních stěn. Pacienti trpí vyrážkami, kožními lézemi, otoky, horečkami, lymfocytární infiltrací plic s následnou fibrózou a dalšími zánětlivými projevy. Laboratorně se STING vyznačuje zvýšenou erytrocytární sedimentací, zvýšenou hladinou C-reaktivního proteinu, vyskytuje se i kožní depozit IgM nebo vaskulární ukládání C3 komplementárního proteinu. Jako možnost terapie jsou testovány inhibitory Janus kináz (JAK), např. ruxolitinib, které již zaznamenaly částečné úspěchy v regulaci interferonopatie (Obr. 4). (Dobbs et al., 2015; Liu et al., 2014)



Obr. 4 – Signální kaskáda cGAS-STING. Cyklická guanosin monofosfát-adenosin syntáza (cGAS; cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase) je aktivována při vazbě na cytosolickou dvojlátkovou DNA a signalizuje směrem ke stimulatoru genů pro interferony (STING; stimulator of interferon genes). Kaskáda následně končí v jádře, kde jsou aktivovány cíle jak dráhy NF-κB, tak IRF3. Po aktivaci se tvoří interferony I. typu, které následně aktivují signalizaci JAK/STAT přes interferonový receptor (IFNAR1/IFNAR2). Zde pak působí léčivo, inhibitor ruxolitinib, a zabraňuje tak pozitivní zpětné vazbě v signalizaci a tvorbě dalších cytokinů. (Upraveno z Wang et al., 2020)

VIII. Komplementové imunodeficiency

Komplement je sadou více než 30 proteinů a je důležitou součástí přirozené imunity. Aktivace komplementu vede ke kaskádovité enzymatické reakci, kdy se štěpí jednotlivé komplementové proteiny. Na jejím konci se tvoří anafylatoxiny C3a a C5a, které působí jako chemoatraktanty pro fagocytující buňky a aktivují degranulaci mastocytů a bazofilních granulocytů. Takto aktivované bazofilní granulocyty a mastocyty produkují vasoaktivní aminy, které zajistí vasodilataci a kontrakci hladké svaloviny. Z komplementových proteinů C5b-C9 se pak tvoří komplex zvaný MAC, který se inkorporuje do plasmatické membrány defektní buňky či patogenu a vytvoří lytický pór. (Sarma & Ward, 2011) Jako příklad komplementového imunodeficitu může být **deficit C1q**, který je asociován s manifestací SLE (systémový lupus erythematosus). C1q je proteinový komplex v komplementové kaskádě, který je součástí tzv. komplexu C1. V momentě, kdy C1q naváže Fc část komplexu protilátky

a antigenu, je komplex C1 aktivován a je spuštěna klasická dráha aktivace komplementu. Úkolem C1q je takto eliminovat apoptotické buňky a cirkulující imunokomplexy, které při C1q deficitu nejsou efektivně odstraňovány. Při jejich nahromadění jsou aktivovány Th lymfocyty a spouští se tvorba autoprotilátek a rozvíjí se autoimunitní onemocnění např. SLE. (van Schaarenburg et al., 2016)

IX. Selhání kostní dřeně

Některé závažnější typy vrozených poruch imunity mohou způsobit až selhávání kostní dřeně, což vede k narušení tvorby jen části nebo kompletně všech imunitních buněk, podle míry zasažení lymfoidní nebo myeloidní vývojové linie. U diagnózy je často těžké určit, zda selhání kostní dřeně je příčinou primárního imunodeficitu nebo naopak jeho důsledkem. Známým syndromem v této skupině je **MIRAGE**, název onemocnění vznikl z výčtu symptomů, které ho provázejí (z anglického Myelodysplasia, Infection, Restriction of growth, Adrenal insufficiency, Genital phenotypes, Enteropathy). Tento syndrom je způsoben např. mutací v genu *SAMD9* (sterile alpha motif domain-containing protein 9). Detailní funkce proteinu *SAMD9* není známa, ví se však, že *SAMD9* zajišťuje kontrolu buněčné proliferace a zastává roli „tumor supresoru“. Mutace proteinu *SAMD9* způsobující onemocnění **MIRAGE** vede k narušení buněčného vývoje a růstu již v prenatálním období a způsobuje nedostatečný vývoj tkáňových struktur, např. krevních buněk nebo nadledvinek. (Hershkovitz et al., 2011; Jeffries et al., 2018)

X. PID fenokopie

Fenokopie je označení pro poruchu, která napodobuje svým fenotypem a projevy některé geneticky podmíněné onemocnění. Příkladem může být chronická mukokutánní kandidóza (CMC) asociovaná s autoimunitní dystrofií (**APECED**; autoimmune polyendocrinopathy candidiasis-ectodermal dystrophy). U pacientů s onemocněním **APECED** s CMC nalézáme autoprotilátky např. proti IL-17A nebo IL-17F, které narušují Th17 polarizovanou odpověď a tím přispívají k rozvoji CMC. **APECED** je onemocnění způsobené mutací v autoimunitním regulátoru **AIRE**, transkripčním faktoru exprimovaném v thymu, kde zajišťuje eliminaci autoreaktivních klonů T-lymfocytů. V případě mutace v **AIRE** jsou autoreaktivní T-lymfocyty zachovány a následně dochází k tvorbě autoprotilátek (anti-IL-17, anti-IL-22, anti-IFN I. typu a dalších). (Ng et al., 2010)

1.2. Metody vyšetřování IEI

Vzhledem k vysoké heterogenitě IEI onemocnění je při podezření důležité zvážit a vyšetřit všechny aspekty, které mohou pomoci ke stanovení diagnózy a případné léčby. Již po narození, pokud se objeví podezření na IEI, je nutné provést základní laboratorní vyšetření (krevní obraz, sérologii...) a v případě abnormálních hodnot přikročit k citlivějším a detailnějším metodám, při kterých lze zjistit zastoupení jednotlivých subpopulací imunitních buněk, správnost jejich tvorby a jejich funkce. K tomu slouží metody, jako jsou imunofenotypizace, novorozenecký screening TREC/KREC nebo složitější funkční testování. Tak je možné přesněji definovat, ve které části imunitního systému se dysfunkce

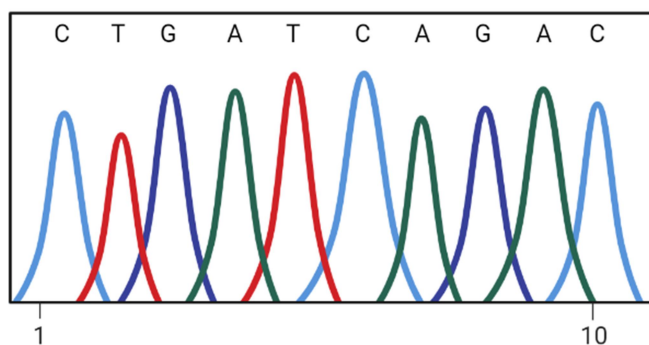
nachází. Dále je nasnadě přesně lokalizovat pozici případné mutace (či více mutací), a to pomocí sekvenování DNA.

I. Sekvenování DNA

V případě běžně známé poruchy imunity, kdy známe přibližný genotyp, je možné použít levnější a rychlejší metodu Sangerova sekvenování. Pro důkladnější evaluaci běžně se nevyskytujících IEI a kde není známa ani přibližná pozice mutace, může být využito sekvenování nové generace (NGS), nejčastěji sekvenování celého exomu (WES; whole exome sequencing) nebo celého genomu (WGS; whole genome sequencing). Tak lze odhalit mutace, které jsou pleiotropní (v jednom genu) i heterogenní (zasaženo více genů). (Locke, et al., 2014)

a) Sangerovo sekvenování

Metodou PCR (polymerázová řetězová reakce; polymerase chain reaction) je provedena sekvenační reakce pomocí primerů, směsi ribonukleotidů a fluorescenčně značených deoxyribonukleotidů. Při syntéze řetězců DNA se náhodně přidávají ribonukleotidy a deoxyribonukleotidy s fluorescenční značkou. Pokud je značka zařazena, PCR reakce se zastaví. Výsledkem je směs různě dlouhých řetězců DNA s fluorescenčním označením na konci, odlišujícím jednotlivé nukleotidy. Směs je pak elektroforeticky rozdělena na základě velikosti nasyntetizovaných řetězců DNA a podle fluorescenčního signálu, který je laserem přečtený, jsou vytvořeny chromatogramy. Schéma chromatogramu je ukázáno na Obr. 5. (Sanger, et al., 1977)



Obr. 5 - Ilustrační schéma chromatogramu Sangerova sekvenování. Na grafu se zpravidla objeví 4 barvy histogramů, podle zastoupení jednotlivých nukleotidů. Na ose x je pozice daného nukleotidu. (Vytvořeno v BioRender.com)

b) NGS

Sekvenování nové generace (NGS; next generation sequencing) je v současné době na vzestupu. Pomocí NGS je velice přesně určena pozice mutace (ta pak následně bývá u pacientů s IEI a jejich rodinných příslušníků potvrzována Sangerovou metodou). Při metodě NGS jsou miliony DNA fragmentů sekvenovány paralelně. Zásadní veličinou pro NGS je „hloubka čtení“, kdy by nejlepší volbou bylo celogenomové sekvenování (WGS). U celoexomového sekvenování (WES) mohou být

přehlednuty intronové sekvence, ve kterých se mutace také může nacházet. Z hlediska poměru ceny a kvality výsledku je však nejvíce využíváno WES. Pro interpretaci výsledků je nezbytná hluboká znalost genetiky, důkladné vyšetření pacienta i rodiny, sestavení rodokmenu, určení dědičnosti a prevalence onemocnění. Po nalezení nové varianty genu je však vždy nutné potvrdit, zda tato varianta/mutace mění funkci genového produktu nebo zabraňuje jeho vzniku, tedy prokázat kauzalitu onemocnění. (Meyts et al., 2016)

II. TREC/KREC

Excizní kroužky T-buněčného receptoru (TREC) nebo κ -deleční rekombinantní excizní kroužky (KREC) jsou zbytkové cirkulární DNA, které vznikají při genové rekombinaci T-buněčného receptoru při vývoji T-lymfocyty, respektive B-buněčného receptoru při vývoji B-lymfocytů. Díky tomuto testování z krve novorozenců je zhruba od roku 2008 možné efektivně detekovat těžký kombinovaný imunodeficit (SCID) ještě před prvními klinickými příznaky a tím zajistit včasné nasazení léčby, zařazení pacienta do pořadníku pro transplantaci kostní dřeně a kontraindikaci očkování. Princip testování TREC spočívá v detekci vyštěpovaných kroužků, které vznikají při přestavbě T-buněčného receptoru v thymu. Ty jsou produkovány zhruba 70 % T-lymfocytů, které exprimují $\alpha\beta$ TCR. Je využívána kvantitativní PCR, označována jako real-time PCR (rtPCR nebo qPCR). PCR je prováděna ze suché krevní kapky, která je odebrána na novorozeneckou screeningovou kartičku a je kvantifikován počet TREC, který poskytuje informaci o přibližném počtu naivních T-lymfocytů v periferní krvi. (Chase et al., 2011; Dorsey & Puck, 2017)

III. Imunofenotypizace

Imunofenotypizace leukocytů využívá metodu multiparametrické průtokové cytometrie. Zjišťují se počty a relativní zastoupení lymfocytárních subpopulací jako jsou T- a B-lymfocyty, monocyty, granulocyty, NK buňky, NKT buňky, folikulární dendritické buňky, ale i další, mnohem menší a obtížněji detekovatelné subpopulace, které jsou však pro imunitní systém nezbytné. Pro evaluaci IEI je imunofenotypizace zásadní metodou [často v kombinaci se složitými výzkumnými funkčními testy (viz kap. 1. 2. IV.)], kdy mohou být objeveny chybějící majoritní populace, jako jsou T-lymfocyty u SCID, B-lymfocyty u protilátkových imunodeficitů nebo menší subpopulace způsobující méně známé, často však závažné poruchy imunity. Často mohou být příčinou jen chybějící nebo málo exprimované znaky buněk, nikoliv celé populace nebo naopak může být detekována příliš vysoká exprese apoptotických receptorů a znaků, která zapříčiní nadměrné umírání buněk. (Bleesing & Fleisher, 2001) Pro správnou evaluaci všech subpopulací a znaků u suspektních poruch imunity byla v laboratořích CLIP ve spolupráci s konsorciem EuroFlow vytvořena jasná strategie a série standardizovaných testů. Konsorcium EuroFlow se stará nejen o plošné zavedení těchto standardizovaných testů v klinických laboratořích, ale i o jejich inovaci a průběžné hodnocení správnosti. (Kalina et al., 2012; Kalina et al., 2020; Van Der Burg et al., 2019)

IV. Funkční testování

Vyhledávání a optimalizace nových metod a testů přináší detailní vhled do funkcí imunity a je zásadní pro profilování pacientů s neobvyklým nebo novým fenotypem. Velkou skupinou funkčních testů je odpověď leukocytů na stimulaci (např. ve smyslu zvýšení aktivačních znaků nebo proliferace), dále sem patří reakce na léčbu, testy apoptózy či produkce cytokinů a jiných efektorových molekul. Jednou z mocných metod pro detekci přítomnosti či produkce antigenu nebo protilátky je metoda ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay), která je založena na specifické interakci antigenu a protilátky, kdy je jeden z těchto reaktantů navázán na enzym, který katalyzuje přeměnu substrátu na finálně detekovaný barevný produkt. (Albert-Vega et al., 2018) Další metodou funkčního testování s širokou škálou možností a variant je průtoková cytometrie. Touto metodou lze provést analýzu obrovského počtu buněk během krátké doby, zásadní jsou parametry rozptylu světla a emise fluorescenčního světla. Dnešní průtokové cytometry mají rozsáhlou výbavu laserů, které umožňují měření vysokého počtu parametrů (20 i více). Je tak možné velice detailně imunofenotypizovat leukocyty (většinou periferní krve, kostní dřeň aj.) konkrétního pacienta v dané fázi onemocnění či léčby. (McKinnon, 2019) Umožňuje i současnou detekci funkce buněk a odhaluje tak onemocnění jako je např. STAT1 gain-of-function nebo deficit MyD88, kdy pomocí techniky zvané single-cell phospho-flow je možné změřit míru fosforylace jednotlivých proteinů dané signální kaskády (většinou po *ex vivo* stimulaci). Podobně je možné identifikovat např. SCID, a to jak z relativních či absolutních počtů subpopulací imunitních buněk, tak na základě jejich funkce (např. exprese γ řetězce IL-2 receptoru, fosforylace STAT proteinů, či fosforylace molekuly ZAP70). (Kanegane et al., 2018) V předkládané disertační práci bylo funkční testování pomocí metod průtokové cytometrie jedním z opěrných bodů všech projektů.

1.3. Možnosti terapie

U vrozených poruch imunity neexistuje 100% kauzální léčba, o její objev se však stále pokoušejí vědci a lékaři z celého světa. V současné době jsou v léčbě IEI tři základní přístupy: neustále se rozvíjející a zdokonalující genová terapie, transplantace kostní dřeň a substituční léčba.

Genová terapie může být především pro pacienty se SCID život zachraňující léčbou v případě nenalezení vhodného dárce kostní dřeň; předchází i hrozbě odhojení štěpu, reakci štěpu proti hostiteli (GvHD; graft versus host disease) a dalším transplantačním komplikacím. Jedna z prvních genových terapií byla testována u pacientů se SCID s deficitem adenosin deaminázy (ADA). Tito pacienti jsou ve většině případů závislí na substituční terapii (viz dále), avšak genová terapie na principu cDNA nesoucí gen pro ADA zajistila u zhruba poloviny pacientů trvalou expresi ADA v části leukocytů umožňující ukončení substituční terapie. (Chan et al., 2005) Další závažnou mutací způsobující život ohrožující SCID je deficit IL-2RG; i zde se vyvinula genová terapie na bázi gama-retrovirových vektorů nesoucích gen pro IL-2R a byl zaznamenán léčebný úspěch až u 80 % testovaných pacientů.

(De Ravin et al., 2016) Genová terapie jako terapeutický přístup však stále vykazuje nízkou efektivitu a je zapotřebí další výzkum, klinické studie a nalezení nových způsobů genové editace. (Ghosh & Gaspar, 2017; Thrasher & Williams, 2017)

Transplantace kostní dřeně (HSCT; hematopoietic stem cell transplantation) je velmi úspěšnou a často aplikovanou terapií u IEI, ročně překračuje počet HSCT 50 000 na celém světě. Principem je nahrazení poškozené či nefunkční kostní dřeně pacienta štěpem kostní dřeně od zdravého dárce. Nutné je podstoupení chemoterapie či ozařování před samotným procesem pro eradikaci pacientových buněk kostní dřeně pro úspěšné osídlení zdravými dárcovskými buňkami. Hematopoetické kmenové buňky se zpravidla získávají operativně z kostní dřeně dárce. Infúze hematopoetických buněk je následně intravenózně podána příjemci. Z důvodu imunokompromitace příjemce jsou očekávány virové, bakteriální nebo kvasinkové infekce, případně komplikace způsobené toxicitou přípravné chemoterapie. Tyto komplikace mohou být řešeny preventivně (kontrola dárce, podávání antimykotik, antibiotik či vakcinace příjemce) nebo po infekci (antivirotika, antibiotika, substituční imunoglobuliny). Další hrozbou HSCT je GvHD, kdy buňky dárce reagují na tkáň hostitele. Reakci dělíme na akutní a chronickou a je zpravidla řešena imunosupresivní léčbou. (Barriga et al., 2012; Bazinet & Popradi, 2019)

Substituční léčba zahrnuje veškeré produkty nahrazující chybějící nebo nefunkční protein v organismu pacienta. Nejčastější substitucí jsou imunoglobuliny, které jsou podávány subkutánně (pod kůží) nebo intravenózně (nitrožilně). Pacienti s IEI zahrnující částečnou nebo kompletní nedostatečnost imunoglobulinů jsou na terapeutickém podávání imunoglobulinů často závislí po celý zbytek života. Mezi onemocnění vyžadující tuto léčbu patří CVID, hyper-IgM syndrom, Brutonova agamaglobulinémie a další. (Ness, 2019) Další možností je substituce chybějícího proteinu či enzymu působícího v imunitním vývoji nebo signalizaci. Nejznámější je náhrada adenosin deaminázy (ADA) u pacientů se SCID (deficit adenosin deaminázy viz 1. 1. I. a). Podáván je konjugát polyetylglykolu s ADA, který odstraňuje nahromaděný adenosin a deoxyadenosin v organismu a absolutní počty imunitních buněk narůstají. Nadměrné množství adenosinu jinak vede k hromadění dATP, který inhibuje syntézu DNA, buňky (tedy i T- a B-lymfocyty) jsou pak neschopné dělení. Dále je ADA nezbytná v degradaci purinů, které jsou toxické pro nezralé lymfocyty. (Chan et al., 2005)

2. Cíle práce

Hlavními cíli této disertační práce bylo funkčně charakterizovat nově nalezené mutace u jednotlivých pacientů s vrozenými poruchami imunity. Naším cílem bylo identifikovat a popsat charakter každé mutace, její dopady na fungování mutací postižených buněk a pokud možno navrhnout (v úzké spolupráci s ošetřujícími lékaři) vhodné léčebné postupy.

Prvním předmětem výzkumu byla X-vázaná mutace *c.1715G>T* (p.G572V) v genu *TLR8* nalezená u osmiletých jednovaječných dvojčat mužského pohlaví. Toll-like receptor 8 (TLR8) je intracelulárním receptorem antigenně nespecifické imunity.

Druhým projektem byl popis heterozygotní mutace *c.1545C>A* (p.Tyr515*) v genu *HCK*, která byla nalezena u třináctileté pacientky. Hematopoetická kináza (HCK) je klíčovou molekulou v prozánětlivé signalizaci a leukocytární migraci.

Třetím projektem byla charakterizace homozygotní mutace *c.922C>T* (p.Gln308*) v genu *IFNAR1*, která byla nalezena u ročního pacienta. Receptor pro interferony I. typu je zásadní pro signalizaci cytokinů IFN α a IFN β a zahájení protivirové obrany.

3. Výsledky

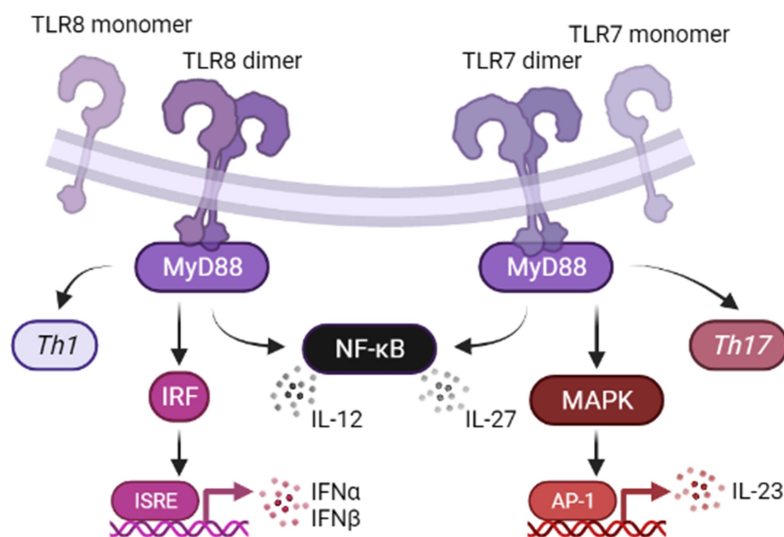
3.1 Mutace *c.1715G>T* (p.G572V) v genu *TLR8*

TOLL-LIKE RECEPTORY

Toll-like receptory (TLR) jsou nezbytnou součástí antigenně nespecifické imunity. Jsou to takzvané „pattern recognition“ receptory (PRR) rozpoznávající určité struktury patogenních (PAMPs; pathogen associated molecular patterns) i endogenních ligandů (DAMPs; danger associated molecular patterns). Lidské TLR se vyskytují jak na plasmatické membráně, tak uvnitř buňky v membráně endosomů. Vně buňky slouží jako senzory extracelulárních patogenů, patří mezi ně TLR1 (rozpoznávající struktury gram-pozitivních bakterií), TLR2 (vážící bakteriální lipoproteiny), TLR4 [vážící lipopolysacharid (LPS)], TLR5 (vážící Flagellin) a TLR6 (vážící diacylované lipoproteiny). Endosomální TLR pak registrují virové ligandy, struktury intracelulárních bakterií či endogenní částice jako jsou složky extracelulární matrix (fibronektin, fibrinogen nebo hyaluronan) nebo molekula HMGB1 (high-mobility group box 1). (Yu et al., 2010) Mezi intracelulární TLR patří TLR3 [vážící dvojvláknovou RNA (dsRNA)], TLR7 [vážící jednovláknovou RNA (ssRNA) a mikro-RNA (miRNA)], TLR8 [vážící ssRNA a endogenní (self-RNA)] a TLR9 (vážící nemetylované CpG ostrůvky DNA). Strukturálně se TLR skládají z ligand-vazebné ektodomény s repeticemi bohatými na leucin (LRR; leucine-rich repeats), transmembránové domény a cytoplasmatické Toll/IL-1 receptorové domény (TIR), která zajistí přenos signálu. V momentě vazby ligandu je nezbytná dimerizace receptoru. Dle typu receptoru se tvoří heterodimer či homodimer. (Reuven et al., 2014)

Signalizace pak směřuje na MAPK, NF- κ B a interferonovou odpověď. Obecně je TLR signalizace rozdělena podle využití adaptorových proteinů, a to buď **MyD88** nebo **TRIF**. 1) Dráha vedoucí přes adaptor MyD88 začíná tvorbou komplexu MyD88 s kinázami rodiny IRAK. Tento komplex, zvaný Myddosome, může aktivovat fosforylaci interferon regulačního faktoru (IRF; interferon regulatory factor) a postupně dojde k aktivaci transkripčních faktorů zodpovědných za produkci interferonů. Myddosome také může zapříčinit aktivaci (ubiquitinylation) proteinů TRAF a TAK1. Tímto procesem je pak spuštěna jak fosforylace proteinů z rodiny MAPK (finálně aktivující AP-1 transkripční faktory), tak aktivace IKK komplexu NF- κ B dráhy. 2) Druhá cesta vede přes adaptorový protein TRIF. Zde dochází k interakci s proteiny TRAF, následně aktivaci kinázy RIP-1 a aktivaci TAK1 komplexu. Ten pak opět spouští procesy drah MAPK a NF- κ B. (Kawasaki & Kawai, 2014) TLR7 a TLR8 tvoří homodimery a jejich signalizace je úzce spojena – u obou receptorů dochází k aktivaci MyD88- i TRIF-závislé signalizace a dle typu ligandu a vlivem mikroprostředí pak oba receptory mohou spustit signalizaci MAPK, NF- κ B i IRF (Obr. 6). (De Marcken et al., 2019) Oba receptory jsou senzory ssRNA, vyskytují se však v odlišné míře v různých buněčných subpopulacích. TLR8 nalezneme převážně v monocytech, makrofázích, myeloidních dendritických buňkách (mDC) a granulocytech, TLR7 pak více v plazmacytoidních dendritických buňkách (pDC), B-lymfocytech, ale stejně jako

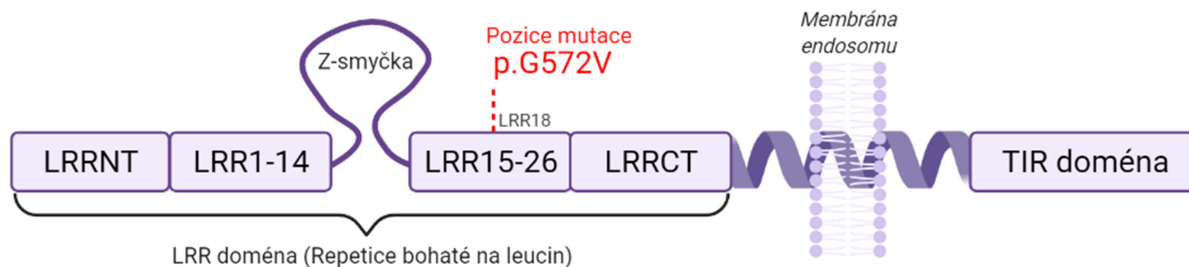
TLR8 i v monocytech a makrofázích. U TLR7 a TLR8 se také liší preference signálních drah a polarizace imunitní odpovědi. TLR8 aktivace přednostně vede na NF- κ B, k interferonové odpovědi (I. typu) a polarizuje Th1 cytokinovou produkci. U TLR7 pak převažuje aktivace MAPK dráhy a Th17 cytokinová produkce. (De Marcken et al., 2019; Eng et al., 2018; Ye et al., 2017) Na myším a buněčném modelu člověka bylo prokázáno, že **TLR8 inhibuje TLR7** a tato inhibice je založena na přímé i nepřímé fyzické interakci mezi těmito receptory. I přesto, že myší TLR8 nereaguje na ligandy lidského TLR8, stále inhibuje funkci myšího i lidského TLR7. (Wang et al., 2006a)



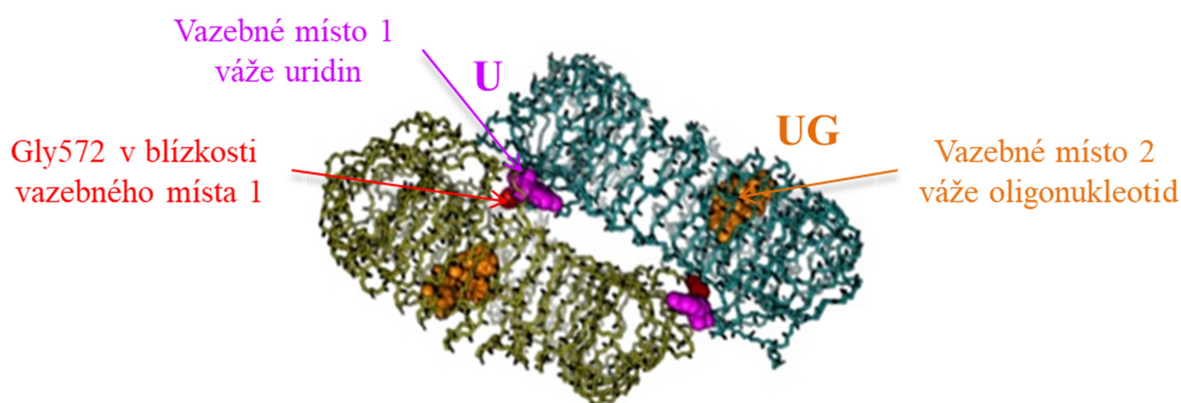
Obr. 6 – Schéma signalizace endosomálních Toll-like receptorů 7 a 8. TLR7 a TLR8 jsou orientovány svými LRR doménami dovnitř endosomu. Zde zachytávají virové a bakteriální ssRNA, případně endogenní ligandy. Pro úspěšnou aktivaci je nutná dimerizace. Následně přes MyD88 a další adaptorové proteiny probíhá signalizace směrem do buňky a dle typu ligandu vede na různé signalizační dráhy. V případě TLR7 je upřednostňována MAPK dráha, vedoucí k expresi AP-1 a polarizaci imunitní odpovědi na Th17. V případě TLR8 pak signalizace vede zejména na interferonovou odpověď a polarizaci imunitní odpovědi směrem k Th1. U obou těchto receptorů pak můžeme sledovat i aktivaci NF- κ B. (Vytvořeno v BioRender.com, Thwaites, et al., 2014)

VÝSLEDKY A DISKUSE

V této studii jsme se zabývali novou mutací u dvou chlapců, jednovaječných dvojčat. Mutace je hemizygotní, nachází se na pozici *c.1715G>T* (p.G572V) v genu *TLR8*, který je lokalizován na chromozomu X (Obr. 7 a 8) a byla zděděna po matce.



Obr. 7 – Lineární schéma Toll-like receptoru 8 s pozicí nalezené mutace. Toll-like receptor 8 se skládá z ligand-vazebné ektodomény (LRR) se Z-smyčkou, která je při dimerizaci receptoru štěpena. Dále TLR8 obsahuje transmembránovou doménu, procházející membránou endosomu a doménu TIR přenášející signál do buňky. (Vytvořeno v Biorender.com)

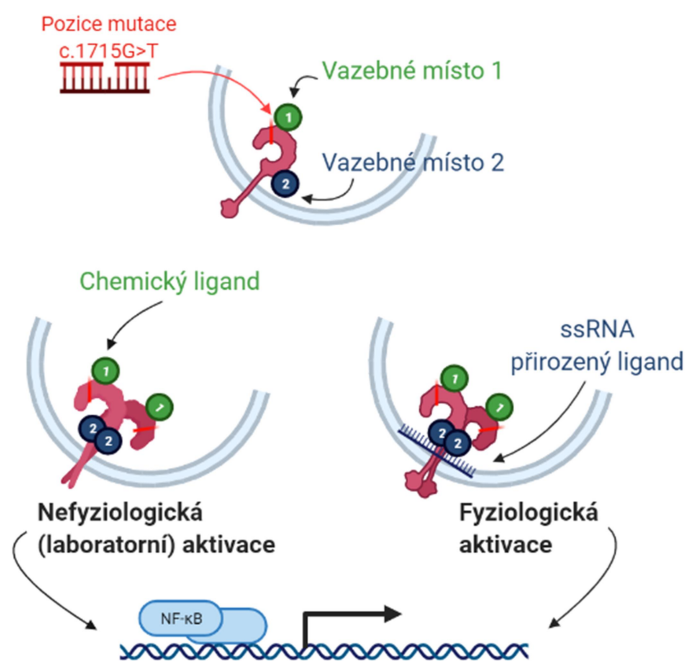


Obr. 8 – Proteinová struktura homodimeru TLR8 s pozicí nalezené mutace. Pro úspěšnou signalizaci tvoří TLR8 homodimer, který při vazbě ligandu do vazebných míst 1 a 2 projde konformační změnou. Model ukazuje ligand vazebnou doménu, kde se v blízkosti vazebného místa 1 nachází popisovaná mutace *c.1715G>T* se záměnou aminokyseliny glycine za valin p.G572V.

U obou chlapců se časně projevíly lymfoproliferativní symptomy a záněty mízních uzlin v oblasti krku a byl nasazen metotrexát (analog kyseliny listové, cytostatikum). Laboratorně byly nalezeny autoprotilátky proti červeným krvinkám, v důsledku kterých se u obou pacientů projevila závažná chronická autoimunitní hemolytická anemie (AIHA). Byl nasazen rituximab (anti-CD20) z důvodu vysoké hladiny autoprotilátek, z důvodu eliminace B-lymfocytů léčivem anti-CD20 pak byly podávány intravenózní imunoglobuliny. Dále se objevily i autoinflamatorní projevy (horečky neznámého původu, artritida a vaskulitida CNS u dvojčete B), oba pacienti trpěli i častými respiračními infekcemi, při kterých se projevy AIHA zhoršovaly. Oba pacienti prošli protizánětlivou léčbou, byl nasazen sirolimus [mTOR (cíl rapamycinu u saveců; mammalian target of rapamycin) inhibitor] a azathioprin (imunosupresivum). U dvojčete B se stav postupně zhoršoval, opakovaly se zánětlivé stavy (rozvoj artritidy) a proto bylo nasazeno anti-IL-1 terapeutikum Anakinra. Dvojče B ale následně vyvinulo i vaskulitidu CNS a byla indikována transplantace kostní dřeně z důvodu závažnosti klinického stavu. Po transplantaci bylo zaznamenáno pomalejší znovuosídlení kostní dřeně dárcovskými buňkami, došlo k reaktivaci CMV, adenoviru a EBV a byla nutná antivirová terapie.

Zhruba po 1 roce od transplantace komplikace ustoupily, dvojče B je bez známek reakce štěpu proti hostiteli a je na léčbě steroidními hormony a cyklosporinem A. U dvojčete A se vaskulitida CNS neprojevila, pacient A trpěl horečkami a panikulitidou (záněty podkožního vaziva a tuku). S přihlédnutím k vědeckým výsledkům (viz níže) u něj byla nasazena léčba hydroxychloroquinem, inhibítorem TLR7 signalizace a produkce zánětlivých cytokinů. Již po měsíci se stav pacienta A na této léčbě zlepšil natolik, že byly výrazně sníženy dávky kortikoidů. U matky dvojčat byly zaznamenány pouze mírnější autoimunitní příznaky - antifosfolipidový syndrom a revmatoidní artritida, jejichž projevy byly potlačeny steroidní léčbou. (Galli, 2014) Předpokládáme, že menší závažnost symptomů u matky mohla být způsobena náhodnou aktivací mutantní alely v jejich buňkách.

Objevená mutace na pozici *c.1715G>T* (p.G572V), která v proteinu TLR8 vede k nahrazení glycinu za aminokyselinu valin na pozici 572, se nachází v blízkosti prvního vazebného místa receptoru (Tanji et al., 2016; Tanji et al., 2013) (viz Obr. 6 a 7) a mohla by ovlivnit aktivitu či specifitu receptoru. Chemické ligandy, komerčně dostupné k aktivaci TLR8, se z hlediska struktury receptoru váží pouze na vazebné místo 1, které se nachází v blízkosti nalezené mutace a samy tím spouští aktivaci receptoru TLR8. (Tanji et al., 2013) Oproti tomu ligand bližší přirozenému zdroji, bakteriální či virové ssRNA, komerčně dostupný ssRNA40, vyžaduje, stejně jako přirozený zdroj, k efektivní aktivaci receptoru vazbu na dvě jeho vazebná místa, tedy vazebné místo 1 i 2 (Obr. 9). (Hu et al., 2018; Larange et al., 2009; Tanji et al., 2015; Z. Zhang et al., 2018)



Obr. 9 – Schéma vazebných míst Toll-like receptoru 8 a interakce s ligandy. Chemické ligandy jako např. TL8-506 se vážou pouze do vazebného místa 1 a aktivují signalizaci receptoru. Ligandy napodobující

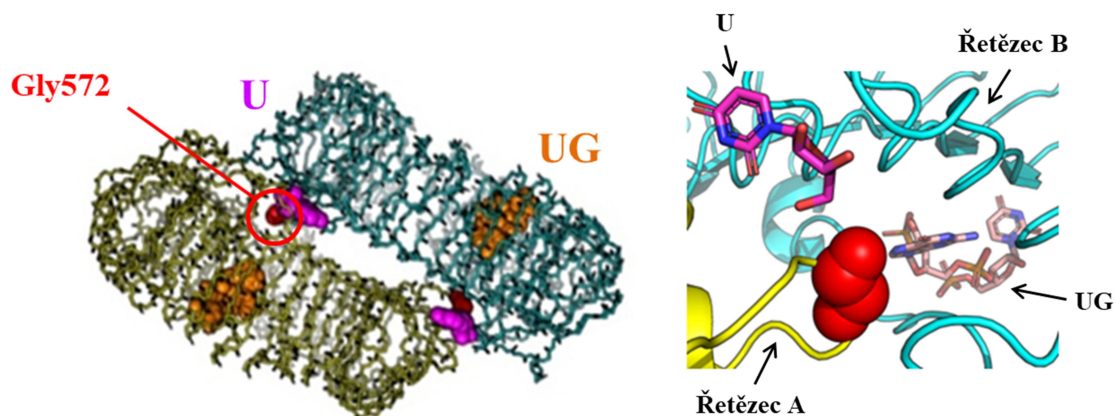
přirozeně se vyskytující jednořetězcovou RNA, jako např. ssRNA40, vyžadují vazbu do vazebného místa 1 a 2 zároveň pro plnou aktivaci receptoru. (Vytvořeno v BioRender.com, Zhang et al., 2018)

Regulace aktivity TLR7 a TLR8

Dysregulace TLR7 a TLR8 receptorů popisují myší studie. Bylo např. prokázáno, že TLR8 deficit vede k hyperaktivaci TLR7 v dendritických buňkách v důsledku zvýšené exprese TLR7, i přesto, že myší TLR7 a TLR8 mohou vázat a reagovat na jiné ligandy, než homology těchto receptorů u člověka. Tato skutečnost ukazuje, že TLR8 ovlivňuje aktivitu a expresi TLR7. Dále bylo prokázáno, že deficit TLR8 vede k aktivaci autoreaktivních B-lymfocytů v marginální zóně sleziny z důvodu zvýšené exprese TLR7. Autoreaktivní klony pak následně vedou u myší k rozvoji systémového autoimunitního onemocnění systémový lupus erythematosus (SLE). (Demaria et al., 2010; Desnues et al., 2014; Lau et al., 2005) U člověka je však dysbalance TLR8 a TLR7 nedostatečně prozkoumána. Wang et al. prokazuje na modelových buněčných liniích, že TLR7 a TLR8 jsou aktivovány selektivně a TLR8 fyzicky inhibuje TLR7. Dále různé ligandy selektivně aktivují TLR7, TLR8 či oba receptory zejména v závislosti na koncentraci těchto ligandů. Zásadní je také nepřímá interakce - vzájemné antagonistické působení produktů signalizačních kaskád receptorů TLR7 a TLR8. Signalizace TLR8 přes MAPK dráhu inhibuje TLR7-mediovanou produkci IL-12 v dendritických buňkách. Produkty TLR7 signalizace v monocytech také inhibují TLR8-mediovanou signalizaci interferonů I. typu a polarizují spíše Th17 odpověď. (Larange et al., 2009; Wang et al., 2006a)

Experimentální design

Protože se mutace p.G572V nachází v blízkosti vazebného místa 1 na TLR8, předpokládali jsme, že může změnit aktivitu receptoru (vazba ligandu může způsobit změny v signalizaci) a tím může být pozměněn i vzájemný vliv TLR7 a TLR8. Je známo, že fyziologická aktivace TLR8 je zprostředkována vazbou uridinu (U) do vazebného místa 1, u TLR7 je v tomto vazebném místě guanin (G) (Obr. 10). Do vazebného místa 2 se váže oligonukleotid u obou receptorů. Po indukované mutaci vazebného místa 1 bylo pozorováno, že vazba a selektivita ligandů TLR7 a TLR8 byla změněna. Mutací změněný TLR8 získával vlastnosti TLR7 a preferoval vazbu G, případně TLR7-specifického chemického ligandu [GS-9620 (Vesatolimod)] do vazebného místa 1. (Zhang et al., 2018) Bylo tedy možné očekávat i změnu specifity mutovaného TLR8 (p.G572V) s mutací v blízkosti vazebného místa 1.

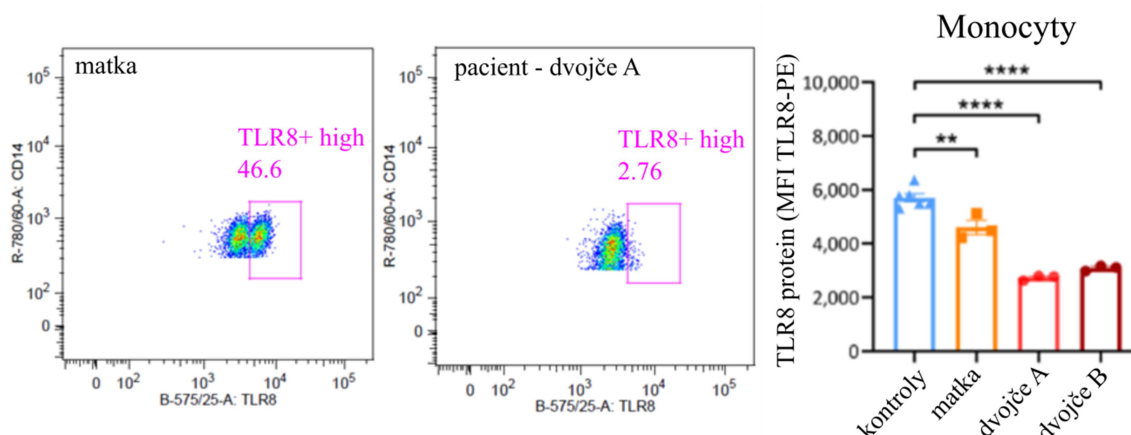


Obr. 10 – Vazba uridinu ve vazebném místě 1 u TLR8. Schéma ukazuje dimer TLR8 při fyziologické aktivaci pomocí ssRNA, kdy je vyžadována vazba ligandu do obou vazebných míst 1 a 2 (U a UG). Červeně je v detailu vyznačena aminokyselina glycin na pozici 572, která je u pacientů zaměněna za valin. (Upraveno z Fejtкова et al., 2022)

Nejnovější studie o TLR8 a lidských imunodeficitech popsala i jiné mutace v TLR8 (p.P432L, p.F494L a p.G572D), které vykazovaly tzv. gain-of-function (GOF), tedy zvýšenou aktivaci NF- κ B po stimulaci ligandem TLR8, a to jak v buněčné linii transientně exprimující pouze transfekovaný TLR8 (Human HEK-Blue™ Null), tak v buňkách konstitutivně exprimujících TLR7 společně s transientně vloženým konstruktem TLR8 (Human HEK-Blue™ TLR7) a dokonce i v primárních monocyttech a fibroblastech. (Aluri et al., 2021) Aktivitu námi popsané mutované varianty TLR8 (p.G572V) jsme testovali ve stejných buněčných liniích jako Aluri et al., 2021 - v Human HEK-Blue™ Null1 a v HEK-Blue™ TLR7 (Invivogen) s transientně vloženými konstrukty TLR8-WT [pro zdravý (wild-type) TLR8] a TLR8-G572V (pro mutovaný TLR8) a sledovali aktivitu NF- κ B. V případě linií HEK-Blue™ Null1 jsme u TLR8-WT varianty pozorovali reakci pouze po stimulaci ligandem pro TLR8, TL8-506. TLR8-G572V pos buňky ale vykazovaly GOF aktivitu nejen při stimulaci TL8-506, ale i při stimulaci ligandy Imiquimod a Vesatolimod (GS-9620), které jsou popisovány jako specifické pro TLR7 (Patinote et al., 2020). Stejná reakce byla patrná i po stimulaci ligandem Gardiquimod, který je schopen aktivace obou receptorů, v nižších koncentracích je TLR7 specifický, ve vysokých koncentracích (>3 mg/ml) pak aktivuje i TLR8. (De Marcken et al., 2019; Riddler et al., 2021) Tato data naznačují zkříženou reaktivitu mutovaného TLR8-G572V k TLR7 ligandům, podobně jako v publikaci Zhang et al. 2018. Následně jsme v linii HEK-Blue™ TLR7+ exprimující oba receptory pozorovali inhibici TLR7 aktivace zdravým TLR8 (TLR8-WT). U buněk s mutovaným TLR8-G572V byla ale tato inhibice TLR7 signalizace signifikantně snížena.

Další testy proběhly *ex vivo* na primárních vzorcích periferní krve pacientů. Překvapivě byla v buňkách pacientů (v monocyttech a granulocytech) nalezena dvakrát nižší hladina proteinu TLR8 v porovnání s monocyty a granulocyty zdravých kontrolních osob. U matky pak byl objeven zajímavý fenomén: byly nalezeny dvě oddělené populace monocytů a granulocytů, každá s rozdílnou hladinou

proteinu TLR8. Buňky s vyšší hladinou byly srovnatelné s kontrolní populací zdravého dárce, buňky s nižší hladinou odpovídaly buňkám obou pacientů. Předpokládáme, že tento fakt se u matky projevuje z důvodu náhodné inaktivace chromozomu X nesoucí mutaci (Obr. 11).



Obr. 11 – Oddělené populace monocytů podle hladiny proteinu TLR8 u matky. Monocyty s vyšší expresí TLR8 (TLR8+ high) byly srovnatelné s monocytami zdravých kontrolních osob. Monocyty s nižší expresí TLR8 pak vykazovaly podobnou míru exprese jako u obou pacientů. U obou pacientů nebyly TLR8+ high monocyty nalezeny. Zcela vpravo je kvantifikace TLR8 exprese detekovaná protilátkou TLR8-PE v monocytech.

Hladina mRNA *TLR8* u matky a pacientů nebyla signifikantně snížena v porovnání s mRNA *TLR8* zdravých dárců (detekováno v monocytech), předpokládali jsme tedy spíše nestabilitu mutovaného proteinu TLR8. Do buněčné linie HEK293 byly transientně transfekovány konstrukty TLR8-WT a TLR8-G572V a byl proveden test stability vložených proteinů pomocí cykloheximidového testu. Cykloheximid zablokuje posun ribozomu při proteosyntéze a tím ji zastaví. Je pak možné v čase pozorovat a měřit množství zbývajícího proteinu v buňce. (Kao et al., 2015) Ukázalo se, že mutovaný protein TLR8-G572V je degradován rychleji než TLR8-WT.

Na základě nízké hladiny proteinu TLR8 v buňkách pacientů a výsledků z HEK-BlueTM TLR7+ linie předpokládáme nižší schopnost mutovaného TLR8 inhibovat TLR7 (Wang et al., 2006a), čímž se může přesunout rovnováha mezi TLR8 a TLR7 ve prospěch TLR7. Tato nerovnováha pak může být ještě umocněna zkříženou reaktivitou mutovaného TLR8 k ligandům TLR7.

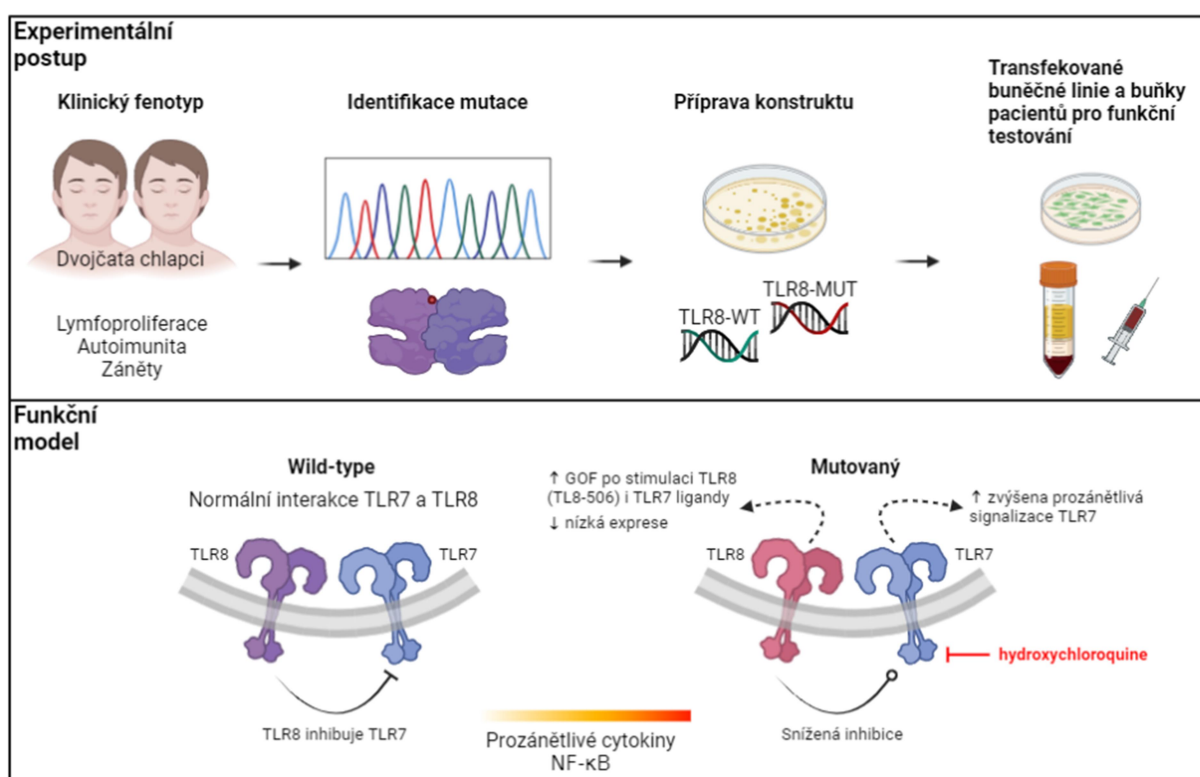
V buněčných modelech způsobovala selektivní aktivace TLR7 zvýšenou aktivaci NF- κ B a produkci prozánětlivých cytokinů (IL-12, TNF α). (Wang et al., 2006) U myši s inaktivovaným *TLR8* se vyvinula splenomegalie a autoimunitní projevy jako např. SLE a byla zaznamenána spontánní aktivace dendritických buněk a T-lymfocytů s inaktivovaným *TLR8*. Signalizaci přejímal receptor TLR7, jehož exprese i aktivita byla díky nefunkčnímu TLR8 zvýšena. Stejně tak byla pozorována vyšší produkce prozánětlivých cytokinů, především IL-6. (Desnues et al., 2014)

I v monocytech obou pacientů se zvyšovala aktivace NF- κ B a produkce prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6, TNF α) v porovnání s monocyty zdravých kontrolních osob po stimulaci ligandy TLR7 [GS-9620 (Vesatolimod), Imiquimod a Gardiquimod (<3 mg/ml)]. Primární buňky tedy reagovaly analogicky k buněčným liniím Human HEK-Blue.

TLR8 a TLR7 neváží pouze virovou či bakteriální ssRNA, ale také autoantigeny (např. sérový marker/ribonukleární protein (Sm/RNP), ribonukleární proteinový komplex malých ssRNA (Ro/SS-A) a další). Zajímavé je, že narušená tolerance autoantigenů a jejich rozpoznávání endogenními Toll-like receptory přispívá k patologickému fenotypu SLE u člověka, který je spojen s projevy velmi podobnými symptomům obou námi popisovaných dvojčat (autoprotilátkami-mediovaná AIHA, horečky, vaskulitida CNS). (Bundhun et al., 2017; Lee et al., 2008) Narušená spolupráce TLR7 a TLR8 také může měnit aktivitu antigen prezentujících buněk (APC), ve kterých se oba TLR exprimují. Tyto APC mohou dále podpořit proliferaci T-lymfocytů, mezi kterými se mohou vyskytovat i autoreaktivní klonů. (Tran et al., 2015) U obou pacientů jsme našli oligoklonalitu v T-lymfocytech. V případě přítomnosti autoreaktivních T-lymfocytů by pak tyto mohly podporovat produkci autoprotilátek tím, že kontaktem aktivují autoreaktivní B-lymfocyty. Tato skutečnost by vysvětlovala nález vysokých hladin autoprotilátek u obou pacientů [např. revmatoidní faktor (RF)]. V této souvislosti Lau et al. na MyD88-deficitním myším modelu ukazuje, že aktivita TLR7 zvyšuje riziko aktivace autoreaktivních klonů B-lymfocytů v marginální zóně sleziny. Dysregulace TLR7 a TLR8 popsána Demaria et al. v další myší studii také způsobuje vyšší produkci autoprotilátek z důvodu zvýšené signalizace přes TLR7 a způsobuje glomerulonefritidu. (Demaria et al., 2010) Nejnověji popisuje podobný fenotyp Vinuesa et al., 2021 u 5 pacientů se SLE způsobeném TLR7 GOF mutací, kde TLR7 GOF např. způsobuje zvýšenou aktivaci NF- κ B v makrofázích, ale i nadměrné přežívání B-lymfocytů germinálních center. (Vinuesa et al., 2021) Autoinflamatorní i autoimunitní projevy u obou pacientů tedy mohly být způsobeny narušeným vztahem mezi TLR7 a mutovaným TLR8, kdy je TLR7 aktivita nedostatečně tlumena, případně změnou afinity mutovaného TLR8 k ligandům TLR7. (Demaria et al., 2010; Itoh et al., 2011; Wang et al., 2006b; Zhang et al., 2018)

Shrnutí

V předkládané studii popisujeme nově nalezenou mutaci v *TLR8 c.1715G>T* vedoucí k částečnému proteinovému deficitu TLR8 a k dysregulaci TLR7 a TLR8 signalizace. Byl prokázán vliv *c.1715G>T* mutace *TLR8* na hyperaktivitu NF-κB a produkci prozánětlivých cytokinů (v primárních monocytech a v modelových buněčných liniích) a ukázalo se, že mutovaný TLR8-G572V a) méně inhibuje aktivitu TLR7 v porovnání s wild-type TLR8 a b) dochází ke zkřížené reaktivitě mutovaného TLR8-G572V k TLR7 ligandům (Obr. 12). Vzhledem k fenotypu onemocnění [autoimunitní (AIHA) a autoinflamatorní komplikace (horečky neznámého původu, gastrointestinální postižení, artritida, CNS vaskulitida aj.)] bylo navrženo jeho zařazení mezi vrozené poruchy imunity s autoinflamatorními projevy.

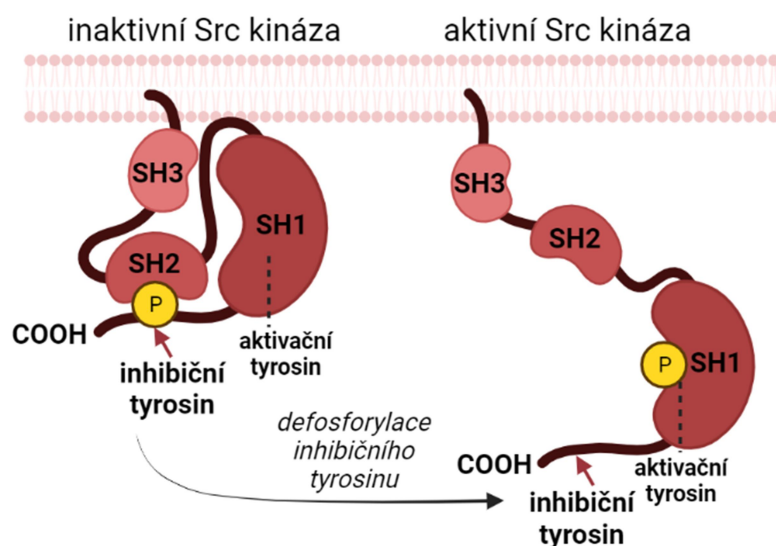


Obr. 12 – Grafický abstrakt. Mutace *c.1715G>T* v *TLR8* vede k částečnému proteinovému deficitu TLR8 a dysregulaci TLR7 a TLR8 signalizace. Dvojčata trpí lymfoproliferací, autoimunitními a zánětlivými projevy. Mutace se vyskytuje v blízkosti vazebného místa 1 receptoru TLR8. Ve funkčním modelu má mutovaný TLR8 nižší proteinovou hladinu a sníženou schopnost inhibice TLR7 oproti wild-type TLR8. TLR7 signalizace je zvýšená, zvyšuje se produkce prozánětlivých cytokinů. Inhibitor TLR7 hydroxychloroquine klinicky vedl ke zlepšení symptomů u takto léčeného dvojčete. (Vytvořeno v Biorender.com)

3.2 Mutace *c.1545C>A* (p.Tyr515*) v genu *HCK*

SRC KINÁZY

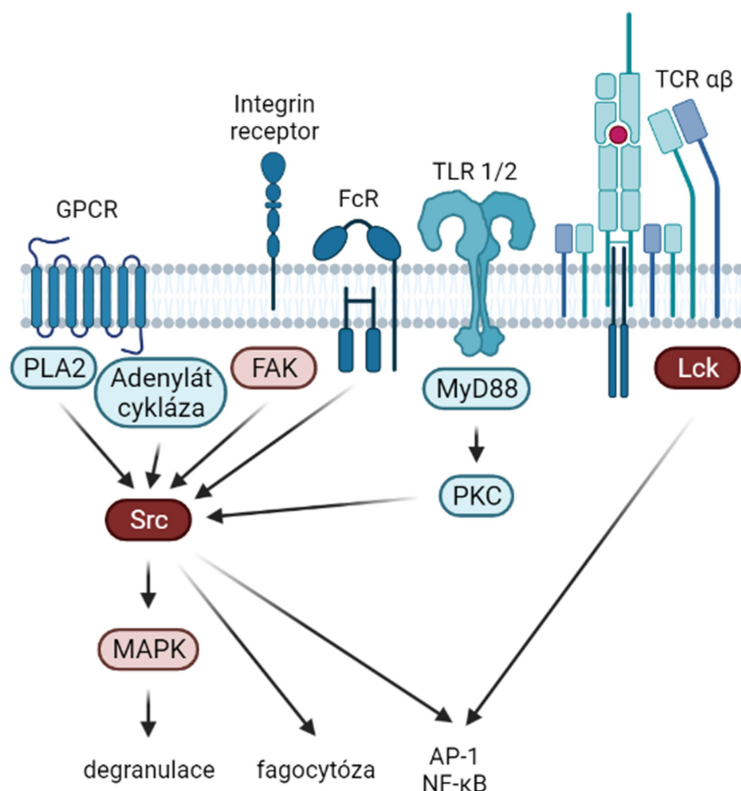
Rodina Src kináz je skupina enzymů figurující v buněčné signalizaci. Interagují s mnoha proteiny signálních kaskád, u kterých modifikují jejich tyrosinové zbytky pomocí fosforylace. Do rodiny Src kináz patří Src, Lck, Hck, Fyn, Blk, Fgr, Yes a Yrk. Typická Src kináza se skládá z N-koncového segmentu, SH3 a SH2 (Src homology) domén, tyrosin-kinázové domény SH1 a C-terminálního segmentu. C-terminální segment nese inhibiční fosforylační místo (v kináze Src na pozici Y527). Fosforylace inhibičního tyrosinu spouští sbalení SH2 a SH3 domény do neaktivní konformace Src kinázy (Obr. 13). (Boggon & Eck, 2004)



Obr. 13 – Kináza z rodiny Src v aktivní a inaktivní formě. Kináza se skládá ze 3 domén: SH1, SH2 a SH3. Na C-konci, v blízkosti domény SH1, se nachází inhibiční tyrosin, který je v neaktivním stavu fosforylován a je navázán do aktivního místa domény SH2. Pro aktivaci Src kinázy musí být fosforylace na inhibičním tyrosinu odstráněna a aktivní místo domény SH2 je tím přístupné pro vazbu na cílový protein. (Vytvořeno v BioRender.com; Boggon & Eck, 2004)

Src kinázy figurují v mnoha signalizačních procesech leukocytů. Tyto kinázy podporují produkci růstových faktorů v leukocytech, ale i v dalších typech buněk (např. endoteliální buňky, jaterní buňky), buněčnou proliferaci přes signalizaci receptorových tyrosin-kináz (RTK), buněčnou adhezi především u monocytů a makrofágů, či diapedézu a migraci neutrofilních granulocytů do místa zánětu. Proces migrace je zajištěn interakcí adhezivních molekul, jako jsou selektiny (na endoteliálních buňkách) nebo integriny (téměř na všech typech buněk), které jsou díky Src signalizaci exprimovány ve vyšší míře. (Byeon et al., 2012) Neutrofilní granulocyty pomocí receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR; G protein-coupled receptors) a signalizace přes Src rozpoznávají chemický gradient

chemoatraktantů a migrují do centra zánětu, kde zahajují fagocytózu a degranulaci pro eliminaci infekce (Obr. 14).



Obr. 14 – Obecné schéma s ukázkovou signalizací přes rodinu Src kináz. Src, jako jedna z nejčastějších kináz z této rodiny, figuruje hned v několika signalizačních drahách, mezi které patří signalizace receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR), kde signalizace vede přes fosfolipázu A2 či přes adenylát cyklázu a přes Src kinázu dále na MAPK. V klíčovém signalizačním uzlu Src se setkávají i dráhy vedoucí od integrinového receptoru [zprostředkované fokální adhezi kinázou (FAK)], Fc receptoru či Toll-like receptoru [přes adaptor MyD88 a protein kinázu C (PKC)]. Zásadní roli hraje kináza Lck v signalizaci T-buněčného receptoru (TCR), jejíž signalizaci spouští důležité proliferační a diferenační procesy v T-lymfocytu. (Vytvořeno v Biorender.com; Byeon et al., 2012)

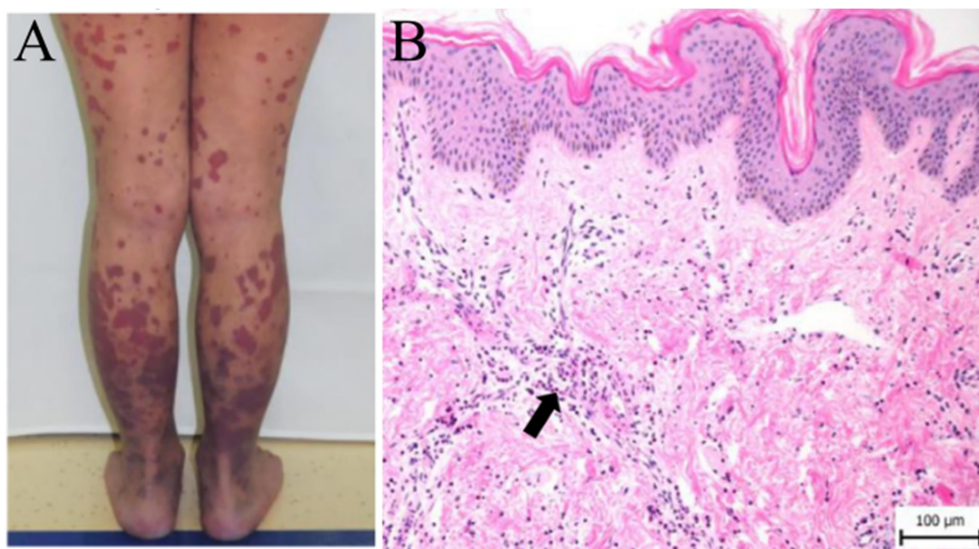
Src kinázy také regulují apoptózu, podle typu ligandu buněčnou smrt inhibují či podněcují. (Korade-Mirnic & Corey, 2000; Rozengurt, 2007)

Src kináza hematopoetických buněk (HCK; hematopoietic cell kinase) je exprimována především v monocitech a granulocytech. Má zásadní roli v buněčné proliferaci, adhezi a cytokinové produkci. Je aktivována vazbou LPS na TLR4, vazbou cytokinů IL-2, IL-6, GM-CSF na jejich receptory, vazbou Fc části opsonizujících protilátek na Fc receptory či vazbou β2 integrinů k jejich ligandům (např. ICAM-1). Je známo, že u určitých typů leukémií i pevných nádorů je její aktivita zvýšena a podporuje degradaci extracelulární matrix pro růst nádoru pomocí tvorby podosomů (výběžky rozpínajících se buněk, které překonávají buněčnou bariéru). (Poh et al., 2015) Je také klíčovým regulátorem alternativní aktivace monocytů a makrofágů, kterou tyto buňky procházejí především při alergické

reakci či odpovědi na parazitární infekci pod vlivem Th2 cytokinů jako je IL-4 nebo IL-13. (Bhattacharjee et al., 2011) HCK dále také u monocytů a granulocytů zajišťuje jejich migraci přes endotel do tkání: buněčná adheze a migrace přes cévní stěnu je díky signalizaci HCK aktivována a po průchodu buněk do tkání a migraci po chemickém gradientu do místa zánětu pak HCK signalizace vede k produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS; reactive oxygen species). (Ernst et al., 2002; Mazzi et al., 2015; Medina et al., 2015)

VÝSLEDKY A DISKUSE

V projektu o mutaci v genu pro HCK jsme se zabývali závažným onemocněním u pacientky, u které se první příznaky projeví krátko po narození. Již po porodu se objevily kožní léze na končetinách, obličeji a krku, které byly prvně залечены antibiotiky. Během prvních měsíců života se ale tyto kožní obtíže znovu objevily a přetrvávaly [biopsie kůže odhalila infiltraci neutrofilních a eozinofilních granulocytů a makrofágů v endotelu cév (Obr. 15)] a přidaly se i opakované infekce horních cest dýchacích.

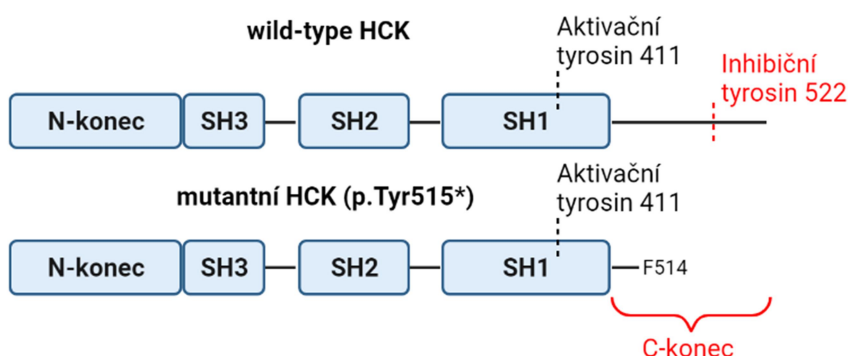


Obr. 15 – Kožní nálezy u pacientky. A) Postižení kůže na dolních končetinách ve věku 8 let. B) Perivaskulární infiltrace monocytů a makrofágů (šipka), výsledky kožní biopsie (barvení hematoxylin-eosin).

U pacientky byly dále zaznamenány anemické stavy, hepatosplenomegalie a chronické krvácení do plic. V plicích byl pravidelně detekován leukocytární infiltrát, postupně se rozvíjela plicní fibróza.

Po 13 letech nepříliš úspěšné intenzivní léčby kortikosteroidy odhalilo celoxomové sekvenování novou heterozygotní mutaci *c.1545C>A* v genu *HCK*, lokalizovanou v proteinu na pozici p.Tyr515. Tato pozice mutace nasvědčovala hyperaktivaci HCK z důvodu vzniku nového stop kodónu, kdy předčasné ukončení transkripce vede ke vzniku kratší formy HCK s chybějícími 12 aminokyselinami na C-konci proteinu **včetně inhibičního tyrosinu** (Obr. 16). (Poh et al., 2015) Pomocí hmotnostní

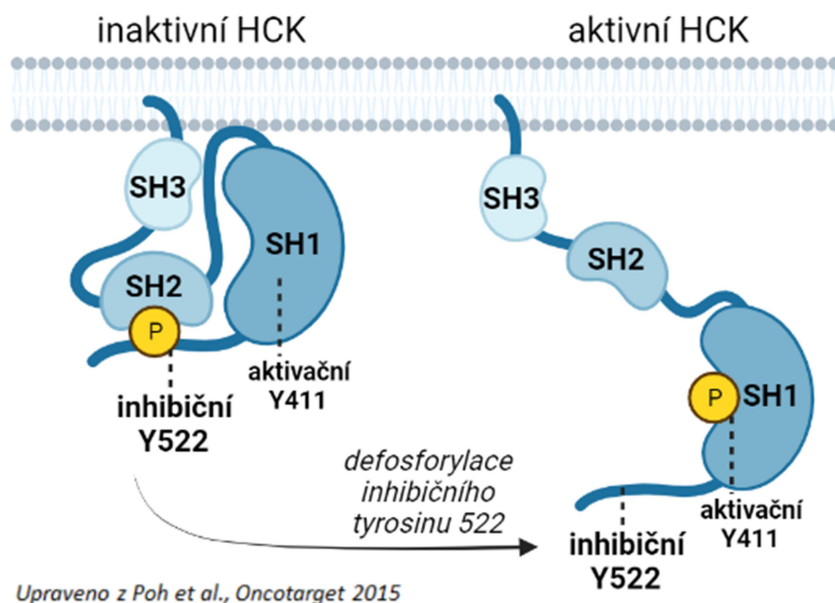
spektrometrie jsme skutečně odhalili přítomnost zkrácené (mutované) i nezkrácené (zdravé, wild-type) formy HCK v leukocytech pacientky; v leukocytech zdravých kontrolních osob se vyskytovala pouze zdravá nezkrácená forma HCK. Jediný dostupný model podobně aktivační formy Hck a klinické důsledky z ní plynoucí popsal Ernst et al., 2002 na myších. Tento homozygotní myší model Hck^{F/F} byl vytvořen záměnou inhibičního tyrosinu za fenylalanin na C-konci Hck kinázy. Myši s takto upravenou Hck trpěly závažnými plicními projevy - nadměrnou leukocytární infiltrací s následnou fibrózou. Projevila se i citlivost Hck^{F/F} myši vůči stimulaci LPS projevující se systémovým zánětem. Byla také prokázána vyšší produkce prozánětlivých cytokinů z makrofágů a plicních epitelů a u makrofágů také zvýšená schopnost fagocytózy. Tyto symptomy do velké míry korelovaly s klinickými příznaky pacientky s mutací *c.1545C>A* v *HCK*.



Obr. 16 - Lineární schéma wild-type HCK a mutované formy HCK. U wild-type formy je vyznačena pozice inhibičního tyrosinu 522. U mutované formy je protein předčasně ukončen na tyrosinu 514 a chybí C-terminální oblast 12 aminokyselin včetně inhibičního tyrosinu 522. (Vytvořeno v BioRender.com)

Regulace aktivity HCK

Src kináza HCK je aktivována fosforylací na aktivačním tyrosinu 411 v kinázové doméně SH1 a inhibována fosforylací na inhibičním tyrosinu 522 na C-konci proteinu. Inhibiční Tyr522 po své fosforylaci interaguje s doménou SH2 kinázy a inhibuje její aktivitu (Obr. 17). (Boggon & Eck, 2004; Lerner et al., 2005; Parsons & Parsons, 2004; Poh et al., 2015; Porter et al., 2000)



Obr. 17 - Schéma aktivace a inaktivace Src kinázy HCK. Inaktivní HCK je fosforylována na tyrosinu 522, který je součástí C-konce. Díky fosforylaci blokuje aktivační místo v doméně SH2. Pro aktivaci HCK je nutné defosforylovat inhibiční tyrosin 522 pro uvolnění vazebného místa v doméně SH2 (pomocí fosfatázy), následně je fosforylován aktivační tyrosin 411 v doméně SH1 a HCK se stává aktivní. (Vytvořeno v Biorender.com; Poh et al., 2015)

Experimentální design

Funkci mutované formy HCK jsme testovali na buněčných modelech: linii HEK293T, monocytární linii THP-01 a promyelocytární linii HL-60 [linie HL-60 byla pro účely experimentů diferencována do granulocytárního typu pomocí dimethylsulfoxidu (DMSO) a/nebo kyseliny all-trans retinové (ATRA)], ve kterých jsme dosáhli transientní (lipofekcí) nebo stabilní (lentivirovým vektorem) exprese wild-type (nezkrácené) nebo mutované (zkrácené) formy HCK.

Při transientní expresi mutované HCK (HCK-MUT) a wild-type HCK (HCK-WT) v buněčné linii HEK293T byla zaznamenána zvýšená kinázová aktivita HCK-MUT, která hyperfosforylovala její cílový protein – paxillin. Paxilin je cytoskeletární protein, který zprostředkovává migraci makrofágů pomocí změn v cytoskeletární stavbě. (Achuthan et al., 2006; Ernst et al., 2002; Turner, 1998)

Experimenty se stabilní expresí HCK dále ukázaly zvýšenou bazální fosforylaci celkového tyrosinu a aktivačního tyrosinu Src kinázy u buněk s HCK-MUT v porovnání s HCK-WT. Linie THP-01 s HCK-MUT také exprimovala zvýšené množství kostimulačních molekul CD40 a CD86 a diferenciačního znaku monocytů CD14, a to jak bazálně, tak po stimulaci přes Toll-like receptor 4 [TLR4, pomocí lipopolysacharidu (LPS)] a přes Fc-gama receptor (FcγR, pomocí imunokomplexů), které aktivují HCK, podobně jako ve studiích Mazzi et al. 2015 a Poh et al., 2015, kde bylo na myších modelech ukázáno, že HCK reguluje LPS-indukovanou aktivaci monocytů a makrofágů. Linie HL-60,

diferencovaná do neutrofilních granulocytů (Berges et al., 2005; Tasseff et al., 2017), dále vykazovala zvýšenou produkci reaktivních kyslíkových radikálů (ROS; reactive oxygen species) bazálně a po stimulaci pomocí TNF α a *Escherichia coli*, které aktivují HCK (Poh et al., 2015), u buněk s HCK-MUT v porovnání s HCK-WT.

HCK je důležitou regulační molekulou buněčné adheze a migrace, nezbytnou např. k efektivní migraci makrofágů do místa infekce. (Medina et al., 2015) Mezibuněčný kontakt nezbytný pro migraci z krevního oběhu do tkáně je zprostředkován párem adhezivních molekul. Mezi adhezivní molekuly se řadí jak konstitutivně exprimované, tak indukované (exprimované až po signálu, ve vhodném prostředí apod.). Hlavní skupiny adhezivních molekul jsou muciny, lektiny a integriny. Integriny se skládají ze 2 podjednotek, alfa a beta, které nekovalentně asociují. Integriny rozdělujeme na dvě skupiny podle těchto podjednotek - na β 1 a β 2 integriny. β 1 váže složky extracelulární matrix. β 2 jsou leukocytární integriny se společnou β 2 podjednotkou CD18. Tato podjednotka tvoří dimer s CD11a [integrin LFA-1 (antigen 1 asociovaný s lymfocytární funkcí; lymphocyte function-associated antigen 1)], s CD11b (komplementový receptor CR3) nebo s CD11c (komplementový receptor CR4). (Fagerholm et al., 2019) Linie se stabilní expresí HCK-MUT vykazovaly vyšší expresi β 2 integrinů a to jak bazálně, tak po stimulaci přes aktivátory HCK - TLR4 a Fc γ R. (Poh et al., 2015) Následně jsme otestovali i vazbu β 2 integrinů k jejich ligandu ICAM-1, která byla také zvýšena v buňkách s HCK-MUT v porovnání s HCK-WT. ICAM-1 je exprimován endoteliálními buňkami a díky této vazbě přecházejí leukocyty z krve do tkáně. (Smith et al., 1989; Volmering et al., 2016)

V myších modelech ve studiích Ernst et al., Medina et al. a Mócsai et al. byla prokázána role HCK v produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů [např. IL-1 β , IL-1 α , TNF α , IL-6, IL-12, MCP-1 (monocytární chemoatraktant 1; monocyte chemoattractant protein-1)] a v migraci aktivovaných leukocytů do plic po stimulaci LPS. (Ernst et al., 2002; Mazzi et al., 2015; Mócsai et al., 1999) Proto jsme dále testovali i transendoteliální migraci buněk THP-01 po aktivaci pomocí LPS do prostředí s IL-8 a MCP-1. Linie THP-01 s HCK-MUT vykazovaly vyšší migraci než linie s HCK-WT. Pro důkaz vlivu mutované HCK na produkci prozánětlivých cytokinů jsme dále linie THP-01 stimulovali LPS a kultivovali na povrchu 2 typů endoteliálních buněk [a) lidské endoteliální buňky pupečnickové cévy (HUVEC; human umbilical vein endothelial cells) a b) lidské endoteliální buňky pulmonární arterie (HPAEC; human pulmonary artery endothelial cells)]. Linie THP-01 s HCK-MUT produkovala po kontaktu s endotelem zvýšená množství cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF α v porovnání s linií s HCK-WT. Výše uvedená *in vitro* data reflektovala nálezy v monocytech pacientky.

V monocytech pacientky byla potvrzena zvýšená fosforylace aktivačního tyrosinu 411 imunoprecipitované HCK a zvýšená exprese β 2 integrinů v porovnání s monocyty zdravých dárců; v plazmě pacientky byly nalezeny zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů v porovnání s plazmami zdravých kontrolních osob. Na základě všech získaných výsledků tedy předpokládáme, že příliš aktivní mutovaná HCK zvyšuje chemotaxi/transendoteliální migraci a produkci cytokinů z HCK+

leukocytů i u pacientky a tím způsobuje zánětlivou infiltraci plic a kůže podobně jako ve výše uvedených myších modelech. (Ernst et al., 2002; Mazzi et al., 2015; Moon et al., 2010)

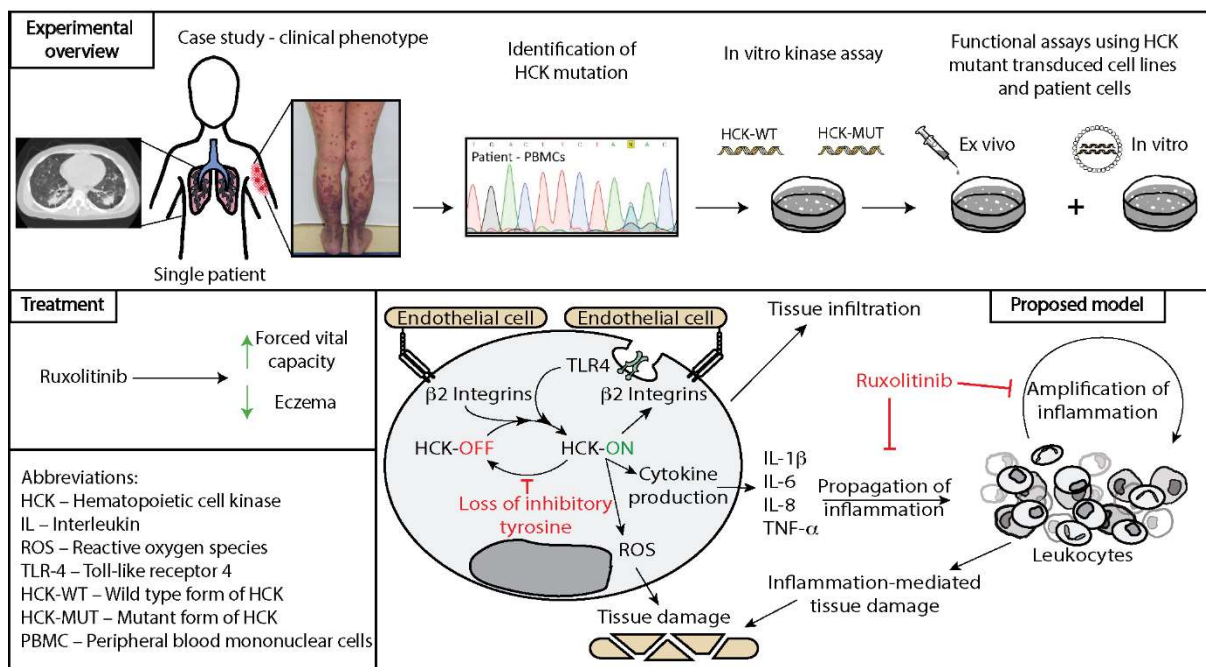
Zajímavé bylo zjištění, že hladina proteinu HCK byla v leukocytech pacientky nižší než v leukocytech kontrolních osob, přestože byla její HCK celkově hyperaktivní. Testovali jsme tedy mRNA (možnost nonsense-mediated RNA decay však byla vyloučena, hladina mRNA wild-type i mutované formy *HCK* byla srovnatelná) a rychlost degradace proteinu HCK v linii THP-01 po inhibici proteosyntézy pomocí cykloheximidu. Tímto experimentálním zastavením translace se nám podařilo prokázat, že protein HCK-MUT degraduje rychleji v porovnání s proteinem HCK-WT. Přesto ani tato regulace hladiny hyperaktivní formy HCK nezabránila klinické manifestaci onemocnění. (Kao et al., 2015)

Pozorované důsledky hyperaktivní HCK [vyšší tyrosinová fosforylace, zvýšená aktivace HCK substrátu paxillinu, hyperprodukce prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , TNF α , IL-6) a ROS, zvýšená schopnost chemotaxe a transendoteliální migrace spolu s vyšší expresí β 2 integrinů a nižší exprese HCK proteinu] korelovaly s nálezy u experimentálního myšího modelu Hck^{F/F} se záměnou inhibičního tyrosinu za fenylalanin na C-konci Hck kinázy ve studii Ernst et al. (Ernst et al., 2002) Závažné zánětlivé projevy se však u pacientky projeví, přestože její mutace byla heterozygotní, na rozdíl od homozygotního modelu Hck^{F/F}. Dodatečnými experimenty v součinnosti s prof. Ernstem se ale ukázalo, že homozygotní Hck^{F/F} i heterozygotní Hck^{F/Y} myši vykazují podobné hodnoty zvýšené fosforylace aktivačního tyrosinu Hck v buňkách sleziny v porovnání se zdravými myšmi. Tato skutečnost naznačuje, že i mutace pouze jedné z alel může způsobit podobný fenotyp jako u homozygotního modelu.

Vzhledem k roli HCK jako důležitého proteinu hematopoetických buněk je nasnadě léčba transplantací kostní dřeně (HSCT; hematopoietic stem cell transplantation). Závažný zdravotní stav pacientky v době nálezu mutace však neumožňoval podstoupení HSCT. Bylo tedy přistoupeno k cílené protizánětlivé léčbě pomocí ruxolitinibu (inhibitoru JAK/STAT signalizace), která byla v čase monitorována, podobně jako dlouholetá léčba kortikoidy. Ruxolitinib částečně potlačil autoinflamatorní postižení v plicích a kůži. Vzhledem k jeho působení mimo přímou signalizaci HCK ale nedokázala inhibice JAK/STAT průběh onemocnění zcela zastavit. Specifický inhibitor HCK kinázy není v současné době klinicky dostupný a léčba inhibitorem BCR-ABL kinázy a Src kináz dasatinibem nebyla dlouhodobě použita kvůli jejímu popisovanému vedlejšímu účinku – možným výpotkům do plic. Pacientka v 17 letech onemocnění podlehla.

Shrnutí

V této studii popisujeme onemocnění u pacientky s novou mutací *c.1545C>A* v hematopoietické kináze HCK z rodiny Src. Kináza HCK má zásadní funkci v adhezi a migraci leukocytů do tkání a v rozvoji zánětu. Mutace *c.1545C>A* má charakter gain-of-function z důvodu konstitutivní aktivity HCK v důsledku vzniku předčasného stop kodónu a absence inhibičního tyrosinu 411. *In vitro* jsme prokázali vliv mutované formy HCK na zvýšení aktivity a migrace exprimujících buněk (vyšší expresi $\beta 2$ integrinů, zvýšení transendoteliální migrace) a na prozánětlivou aktivitu těchto buněk (vyšší produkci prozánětlivých cytokinů IL-1 β , TNF α a IL-6, vyšší produkci ROS); tyto vlastnosti mohou vysvětlovat klinické projevy – leukocytární infiltraci a vaskulitidu plic a kůže (Obr. 18). Onemocnění bylo navrženo na zařazení do skupiny vrozených poruch imunity s autoinflamatorními projevy.

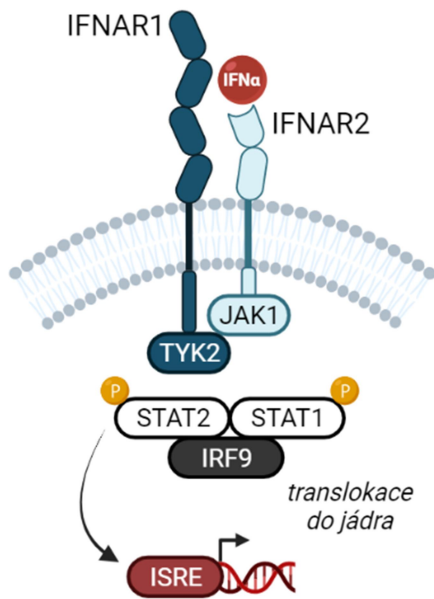


Obr. 18 - Grafický abstrakt publikace Kanderova, Svobodova, Borna et al. (Kanderova et al., 2021) (ponechán v originále v anglickém jazyce). Mutace *c.1545C>A* má charakter gain-of-function z důvodu konstitutivní aktivity HCK v důsledku vzniku předčasného stop kodónu a absence inhibičního tyrosinu 411. *In vitro* byl prokázán vliv mutované HCK na zvýšení aktivity a migrace leukocytů a jejich prozánětlivé aktivity [produkce cytokinů (IL-1 β , TNF α , IL-6) a ROS], které se mohou odrážet v klinických projevech pacientky – leukocytární infiltraci a vaskulitidě plic a kůže. Léčba ruxolitinibem potlačila zánětlivé projevy pouze částečně.

3.3 Mutace *c.922C>T* (p.Gln308*) v genu *IFNAR1*

INTERFERONY

Interferony (IFN) patří do skupiny cytokinů, mediátorů imunitní odpovědi. Rozdělujeme je do 3 základních tříd. **Interferony III. typu** jsou nejpozději objevenou skupinou interferonů. Stejně jako ostatní skupiny hrají roli v antivirové obraně, zástupcem je IFN λ . IFN III. typu působí především v první linii imunitní odpovědi, zejména v epitelích a jejich receptorem je dimer složený ze dvou podjednotek - receptorové podjednotky 1 (IFNLR1; interferon lambda receptor subunit 1) a beta podjednotky receptoru pro IL-10 (IL-10RB; interleukin 10 receptor beta subunit). (Zhou et al., 2018) **Interferony II. typu** reprezentuje IFN γ a je produkován především NK buňkami (z anglického natural killer) a buňkami ILC1 (z anglického innate lymphoid cells type 1) v průběhu protivirové obrany. IFN γ společně s IL-12, IL-15 a IL-18 spouští produkci IFN γ u NK buněk přes vazbu na receptor pro interferon gama (IFNGR). Signalizace následně vede k aktivaci JAK1 a JAK2 molekul a fosforylaci STAT1. Alternativní signalizační dráha pak vede na aktivaci STAT4 nebo Erk1/2. Hlavním účelem působení IFN γ je zastavení virové replikace, zvýšení produkce oxidu dusnatého (NO) a polarizace Th1 imunitní odpovědi. IFN γ také podporuje expresi MHC II a zrání dendritických buněk. (Lee & Ashkar, 2018) **Interferony I. typu**, podobně jako skupiny II a III, indukují antivirovou obranu pomocí signalizace vedoucí k expresi molekul zabraňující virové replikaci. Hlavními zástupci jsou IFN α a IFN β , ale celkově obsahuje skupina interferonů I. typu 13 zástupců. (Pestka, 1997) Působí autokrinně, parakrinně i endokrinně a jejich signalizace je spuštěna po rozpoznání virové struktury pomocí receptorů antigenně nespecifické imunity (PRR; pattern recognition receptor). Receptorem interferonů I. typu je dimer složený z podjednotek IFNAR1 (interferon alfa receptorová podjednotka 1) a IFNAR2 (interferon alfa receptorová podjednotka 2). Po vazbě IFN I. typu dochází k endocytóze receptoru s ligandem a aktivaci asociovaných tyrosin kináz TYK2 a JAK1. Kaskáda pokračuje fosforylací STAT1 a STAT2, které následně tvoří komplex s proteinem IRF9 neboli ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3). Tento komplex pak přechází do buněčného jádra, kde spouští transkripci IFN-stimulovaných genů, ISRE (interferon stimulated response elements) (Obr. 19). Alternativně, také může docházet k fosforylaci a dimerizaci proteinů STAT3, STAT4 a STAT5 a signální dráha následně vede k indukci mitogen-aktivované protein kinázy (MAPK) nebo fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K). (Lee & Ashkar, 2018)



Obr. 19 – Schéma signalizace receptoru pro IFN I. typu. Receptor se skládá ze 2 podjednotek, IFNAR1 a IFNAR2. Ty asociují s tyrosin kinázami TYK2 a JAK1. Po vazbě ligandu dochází k endocytóze receptoru a fosforylaci STAT2 a STAT1, které tvoří dimer. Následně je navázán i protein IRF9 a celý komplex přechází do buněčného jádra, kde startuje transkripci příslušných genů ISRE. (Vytvořeno v BioRender.com; Bravo García-Morato et al., 2019; Schneider et al., 2014)

VÝSLEDKY A DISKUSE

V tomto projektu popisujeme homozygotní mutaci *c.922C>T* v genu *IFNAR1* nalezenou u 15 měsíčního chlapce, u kterého byla zaznamenána závažná reakce po vakcinaci vakcínou MMR (vakcína proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám; measles, mumps, and rubella). Tato živá oslabená vakcína vyvolala u chlapce zánět a závažné autoinflatorní projevy - hemofagocytující lymfohistiocytózu (HLH) a encefalopatii, kterým nakonec podlehl. HLH může být diagnostikována jako primární (familiární HLH), která je dědičným typem, nebo sekundární - získaná. Sekundární HLH se zpravidla vyvine v důsledku silné aktivace imunitního systému, např. v souvislosti se závažnou infekcí. Nejčastěji je diagnostikována u imunokompromitovaných jedinců s virovou infekcí. Diagnostická kritéria pro potvrzení HLH vyvinula společnost Histiocyte Society poprvé v roce 1991, v roce 2004 byla obohacena. Kritéria zahrnují symptomy, které se musí u pacienta vyskytovat po určité době a v definované míře, aby HLH mohla být potvrzena - mezi ty patří např. dlouhotrvající horečka, splenomegalie, cytopenie a další. Pacient *c.922C>T* splňoval 5 z 8 kritérií pro HLH. (Henter et al., 2007)

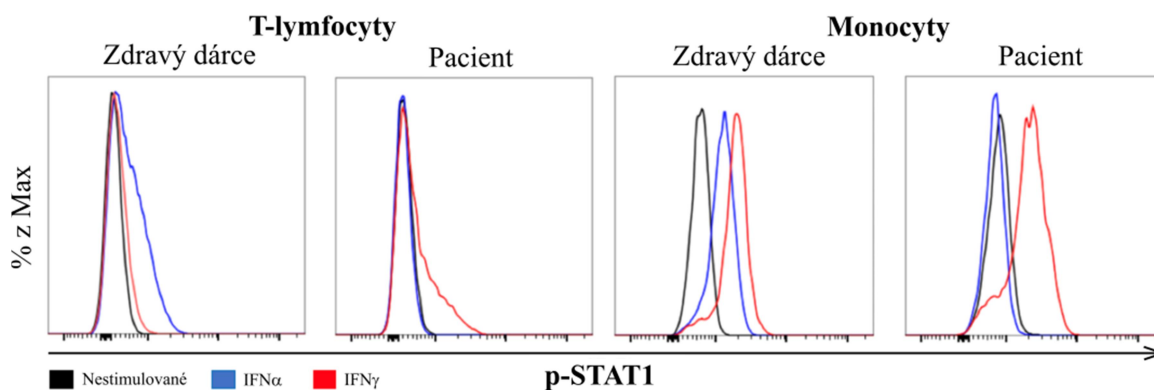
Pomocí celoxomového sekvenování DNA z buněk periferní krve pacienta byla objevena nová homozygotní mutace *c.922C>T* v genu *IFNAR1*, vedoucí ke vzniku nového stop kodónu v extracelulární doméně proteinu IFNAR1 na pozici p.Gln308*. Imunofenotypizace leukocytů

prokázala snížené počty B-lymfocytů a dendritických buněk a naopak zvýšené počty T-lymfocytů a monocytů v periferní krvi.

HLH byla hlavním klinickým projevem i u pacientů s jinými mutacemi v molekulách zasahujících do interferonové signalizace, např. u pacientů s deficitem IFNAR2, STAT2 nebo IRF9. Sekundární HLH se u těchto pacientů vyvinula v důsledku nekontrolované aktivace imunitního systému, která byla spuštěna infekcí, u každého pacienta jiného původu, společným jmenovatelem byla vakcinace živou oslabenou vakcínou. (Alosaimi et al., 2019; Bravo García-Morato et al., 2019; Hambleton et al., 2013; Pairo-Castineira et al., 2021) Laboratorní testy ale množící se virus vakcíny u našeho pacienta neodhalily, podobný nálezn byl ale již popsán i u pacientů s deficitem STAT1 (Burns et al., 2016) a STAT2 se zánětlivým imunofenotypem. (Shahni et al., 2015) Narozdíl od nich a našeho pacienta bylo zaznamenáno množení viru z vakcíny spalniček či v jiném případě příušnic u pacientů s jinou mutací STAT2. (Alosaimi et al., 2019)

Experimentální design

Jak již bylo vysvětleno v úvodu projektu, signalizace IFN α vede přes signalizační molekuly JAK1, STAT1 a STAT2, které vedou signál pro transkripci ISRE. V laboratoři CLIP – cytometrie jsme tedy testovali aktivaci (fosforylaci) molekul STAT po stimulaci interferony v plné periferní krvi pacienta. V leukocytech pacienta nebyla fosforylace detekovaných molekul přítomna bazálně ani po stimulaci pomocí IFN α 2b, na rozdíl od leukocytů zdravých dárců. Na kontrolní stimulaci pomocí IFN γ ale buňky pacienta reagovaly, podobně jako buňky zdravých kontrol (Obr. 20).

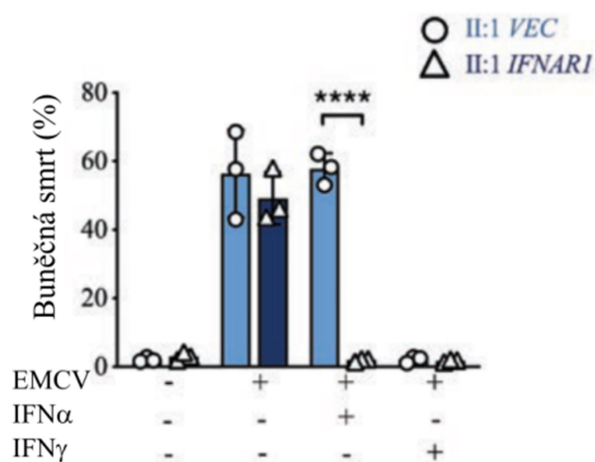


Obr. 20 – Tzv. single-cell phospho-flow analýza potvrzující poruchu odpovědi na IFN α . Osa X ukazuje intenzitu fluorescence fosforylovaného (p) STAT1 (pSTAT1 Tyr701). V T-lymfocytech a monocytech pacienta je odpověď na IFN α (modře) na úrovni nestimulovaných buněk (černě), odpověď na IFN γ (červeně) je zachována. U buněk zdravé kontrolní osoby byla odpověď na IFN α detekována.

Po zjištění poruchy signalizace IFN α v leukocytech pacienta bylo provedeno několik experimentů odhalujících poruchu antivirové odpovědi jiného dostupného typu patientských buněk (fibroblastů). Použity byly virus encefalomyokarditidy (EMCV) a virus Zika (ZIKV). Fibroblasty pacienta, které

byly v prostředí IFN α stimulovány těmito viry, byly v porovnání s fibroblasty zdravých dárců náchylné na infekci. Buňky pro tyto testy byly inkubovány v médiu obsahující EMCV nebo ZIKV a jejich náchylnost na infekci byla stanovena pomocí metody „cell viability assay“ výpočtem procenta mrtvých buněk. Po přidání IFN γ do média se pak ale antivirová obrana u buněk pacienta obnovila. Potvrzujícím faktem narušení signalizace IFN α byla i detekce virového proteinu ZIKV ENV a naopak absence proteinu stimulovaného interferonem I. typu - ISG15 (interferon-stimulated gene 15) pomocí imunoblotu ve fibroblastech pacienta před podáním IFN γ .

Ve fibroblastech pacienta nebyl následně protilátkami detekován žádný protein IFNAR1 - tato skutečnost ukazovala na kompletní proteinový deficit této receptorové podjednotky. Jako definitivní důkaz kompletního deficitu IFNAR1 byly fibroblasty pacienta pomocí lentivirové transdukce obohaceny o wild-type (zdravý) IFNAR1; signalizace a odpověď na IFN α se tímto krokem obnovila (Obr. 21).



Obr. 21 – Po transdukci wild-type IFNAR1 do fibroblastů pacienta (II:1 *IFNAR1*) byla obnovena obrana buněk proti viru encefalomyokarditidy (EMCV) v porovnání s transdukci prázdného vektoru (II:1 *VEC*). Osa X představuje procento mrtvých fibroblastů obohacených o gen *IFNAR1* či transdukované prázdným vektorem po inkubaci v médiu obsahující příslušný virus. Detekce proběhla metodou cell viability assay na fluorescenčním mikroskopu.

Nedostatečná odpověď na IFN I. typu ve spojení s deficitem podjednotky receptoru IFNAR1 způsobená jinou než námi nalezenou mutací byla nalezena v homozygotní formě již u 2 dětí (Hernandez et al., 2019). Taktéž byla popsána ve spojitosti s deficitem druhé podjednotky receptoru, IFNAR2. (Duncan et al., 2015) U všech těchto pacientů byly zaznamenány nepřiměřené reakce na živé oslabené vakcíny ve formě pomnožení daného (vakcinovaného) viru a rozsáhlého zánětu, HLH však nebyla diagnostikována.

Vzhledem k dlouhodobě probíhající pandemii Covid-19 hrají tyto studie důležitou spojnicí vlivu IFN I. typu na imunitní odpověď proti virovým infekcím, např. typu SARS-CoV-2. IFN α a IFN β zpomalují

zánět nejen blokáci virové replikace, ale také regulací a polarizací cytokinové produkce; dochází k produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou IFN β , IL-6, TNF α nebo IL12, k aktivaci cytotoxických mechanismů T-lymfocytů a programované buněčné smrti napadených buněk. (Duncan et al., 2020; Hernandez et al., 2019; Liu et al., 2011; Reboldi et al., 2014) Ve spojitosti s vývojem epidemie SARS-Cov-2 se ukázalo, že část pacientů, jejichž průběh onemocnění Covid-19 byl život ohrožující, trpěla jednou z variant deficitu IFNAR1, IFNAR2, případně IRF. Jednalo se o vzácné genové varianty, které vedly k loss-of-function mutaci zmiňovaných proteinů. Je proto možné, že více pacientů s těžkým průběhem pneumonie doprovázející Covid-19 mělo neobjevenou mutaci v jednom z genů související s odpovědí IFN I. typu. (Zhang et al., 2020)

Shrnutí

Studie IFNAR1 popisuje novou mutaci *c.922C>T* v genu pro alfa podjednotku receptoru pro IFN I. typu u 15 měsíčního chlapce. Tato tzv. „nonsense“ mutace vedla ke vzniku nového stop kodónu v extracelulární doméně proteinu IFNAR1 a k absenci receptorové podjednotky IFNAR1 - tedy i k absenci receptorové signalizace IFNAR1 v organismu pacienta. Interferony I. typu hrají zásadní roli v prevenci nadměrné zánětlivé reakce a v případě absence signalizace IFN α a IFN β může nastat závažná zánětlivá reakce při virové infekci nebo i po očkování živou oslabenou virovou vakcínou.

4. Závěr

Vrozené poruchy imunity (IEI; inborn errors of immunity) jsou v současné době často diskutovaným imunologickým tématem v medicíně. Díky rozvoji NGS je možné nalézt mutace v genomu, které jsou příčinou rozličných onemocnění spojených s imunitním systémem. Objevené mutace pak otevírají nové možnosti v cílené nebo podpůrné léčbě pro řadu pacientů s IEI. U mnoha nových mutací je však jejich funkční vliv stále neznámý a i přesto, že klinická praxe má k dispozici mnoho diagnostických metod pro testování, jako je analýza TREC/KREC (Froňková et al., 2014) či rozšířená imunofenotypizace leukocytů (Kalina et al., 2020), charakter mutace musí být definován důkladněji pomocí výzkumných metod, které nemohou být rutinně využívány napříč laboratořemi. Toto personalizované kompletní funkční testování bylo využito pro charakterizaci mutací v rámci projektů této disertační práce, tedy pro definování mutací v genech *TLR8* (*c.1715G>T*), *HCK* (*c.1545C>A*) a *IFNARI* (*c.922C>T*). Využité funkční testy byly vytvořeny a optimalizovány přímo pro účely popisovaných projektů a mohou být přínosem pro diagnostiku dalších klinických případů v laboratořích CLIP i mimo ně. Identifikovali a popsali jsme charakter každé mutace, její funkční dopady na chování mutací postižených buněk a ve spolupráci s ošetřujícími lékaři u vybraných pacientů navrhli léčebný postup pomocí cílených inhibitorů a léčbu v čase monitorovali. V prvním projektu popisujeme novou **hemizygotní mutaci *c.1715G>T* (p.G572V) v genu *TLR8*** u rodiny se závažnými autoimunitními a autoinflamatorními komplikacemi. Mutace *c.1715G>T* způsobuje částečný deficit proteinu TLR8, zkříženou reaktivitu mutovaného TLR8 k ligandům TLR7 a jeho neschopnost úspěšně blokovat aktivaci TLR7, což vede k dysregulaci TLR7/TLR8 receptorové odpovědi ve prospěch TLR7. Navržená léčba antagonistou TLR7, hydroxychloroquinem, vedla u takto léčeného pacienta k výraznému zlepšení zdravotního stavu. Ve druhém projektu popisujeme novou **heterozygotní mutaci *c.1545C>A* (p.Tyr515*) v genu *HCK*** u pacientky se závažným autoinflamatorním postižením plic a kůže. Mutace *c.1545C>A* způsobuje nadměrnou migrační a zánětlivou aktivitu myeloidních imunitních buněk, která vede k chronickému zánětu s projevy vaskulitidy kůže a plic a k rozvoji plicní fibrózy. Léčba ruxolitinibem, inhibitorem signalizace JAK/STAT, částečně potlačila zánětlivé symptomy, vzhledem k nespecifičnosti této léčby ke kauzální mutaci a k pozdní identifikaci příčiny onemocnění však neměla výrazný dlouhodobý efekt. Obě onemocnění navrhujeme zařadit na seznam nových autoinflamatorních jednotek IEI. Ve třetím projektu popisujeme novou **homozygotní mutaci *c.922C>T* (p.Gln308*) v genu *IFNARI***. Mutace *c.922C>T* způsobuje kompletní proteinový deficit řetězce alfa receptoru pro interferony I. typu u chlapce, u kterého se projevil fatální systémový zánět splňující diagnostická kritéria pro hemofagocytující lymfohistiocytózu, pravděpodobně zapříčiněný vakcinací živou oslabenou vakcínou MMR.

5. Souhrn

V této disertační práci je popsána funkční charakterizace tří nově nalezených genových mutací způsobujících vrozené poruchy imunity se zánětlivými projevy. Identifikovali jsme a popsali charakter každé mutace a jejich dopady na fungování mutací postižených buněk; ve dvou případech byla navržena ve spolupráci s ošetřujícími lékaři cílená léčba. V prvním projektu popisujeme novou mutaci v Toll-like receptoru 8 (*TLR8 c.1715G>T*) u dvojčat s imunitně podmíněnou anémií a zánětlivými symptomy. Zjistili jsme vliv *c.1715G>T* mutace v *TLR8* na částečný proteinový deficit *TLR8* a narušení signalizace *TLR8* a *TLR7*. Mutací změněný *TLR8* hůře potlačoval aktivitu *TLR7* ve srovnání se zdravým *TLR8* a zkrříženě reagoval na ligandy *TLR7*, což vedlo ke zvýšené signalizaci *NF-κB* a produkci prozánětlivých cytokinů z myeloidních imunitních buněk. Ve druhém projektu popisujeme novou mutaci v Hematopoetické kináze (*HCK c.1545C>A*) u pacientky se zánětlivou leukocytární infiltrací kůže a plic. Zjistili jsme vliv mutace *c.1545C>A* na zvýšenou aktivitu *HCK* a dále zvýšenou adhezivitu, migraci a prozánětlivou kapacitu mutací změněných myeloidních imunitních buněk. Navrhujeme zařazení obou onemocnění mezi vrozené poruchy imunity se zánětlivými (autoinflamatorními) projevy. Ve třetím projektu popisujeme novou mutaci v receptoru pro interferon alfa (*IFNAR1 c.922C>T*) u pacienta se systémovým zánětem vyvolaným očkováním živou oslabenou virovou vakcínou MMR. Mutace zavádí nový stop kodón do proteinu *IFNAR1* a vede k absenci receptorové podjednotky *IFNAR1*, tedy i k absenci receptorové signalizace pro interferony I. typu (*IFNα* a *IFNβ*). V případě absence signalizace těchto interferonů hrozí přílišná zánětlivá reakce při virové infekci nebo při očkování živou oslabenou virovou vakcínou. Využité funkční testy byly vyoptymalizovány speciálně pro účely těchto projektů a mohou být přínosem pro diagnostiku dalších podobných případů.

6. Summary

In this dissertation thesis, we describe the functional characterization of three novel genetic mutations causing inborn errors of immunity with autoinflammation. We identified and described the character of each mutation and its consequences in the affected cells; in 2 cases we suggested a targeted treatment in cooperation with medical practitioners. In the first project, we described a novel mutation in Toll-like receptor 8 (*TLR8 c.1715G>T*) in male twins with immune-mediated anaemia and inflammation. We determined the effect of *c.1715G>T* mutation TLR8 as a partial TLR8 protein deficiency and impairment in TLR7 and TLR8 signalling. Mutant TLR8 inhibited TLR7 activity less than the healthy TLR8 and it cross-reacted with TLR7 ligands, which led to increased NF- κ B activity and production of proinflammatory cytokines from myeloid cells. In the second project, we described a novel mutation in Hematopoietic cell kinase (*HCK c.1545C>A*) in a patient with inflammatory leukocytic lung and skin infiltration. We determined the effect of *c.1545C>A* mutation as HCK hyperactivity and increased adhesion, migration and pro-inflammatory capacity of myeloid cells expressing mutant HCK. We suggested the inclusion of both diseases into classification of inborn errors of immunity with autoinflammation. In the third project, we described a novel mutation in Interferon alpha receptor (*IFNAR1 c.922C>T*) in a patient with systemic inflammation caused by a live attenuated MMR vaccine. The mutation introduced a new stop codon in the IFNAR1 protein and leads to the absence of the IFNAR1 receptor subunit, therefore the total absence of the interferon type I. (IFN α and IFN β) receptor signalling. Missing IFN type I. signalling increases a risk of an abnormal inflammatory reaction to a viral infection or to vaccination with a live attenuated vaccine. All used functional tests were optimized specially for the purposes of these projects and can be beneficial in diagnostics of the similar cases.

Použitá literatura

- Achuthan, A., Elsegood, C., Masendycz, P., Hamilton, J. A., & Scholz, G. M. (2006). CpG DNA enhances macrophage cell spreading by promoting the Src-family kinase-mediated phosphorylation of paxillin. *Cellular Signalling*, *18*(12), 2252–2261. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.05.007>
- Aiuti, A., Cattaneo, F., Galimberti, S., Benninghoff, U., Cassani, B., Callegaro, L., ... Roncarolo, M.-G. (2009). Gene Therapy for Immunodeficiency Due to Adenosine Deaminase Deficiency. *The New England Journal of Medicine*, *360*(5), 123–134. Retrieved from <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa0900212?articleTools=true>
- Albert-Vega, C., Tawfik, D. M., Trouillet-Assant, S., Vachot, L., Mallet, F., & Textoris, J. (2018). Immune functional assays, from custom to standardized tests for precision medicine. *Frontiers in Immunology*, *9*(OCT), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02367>
- Alosaimi, M. F., Maciag, M. C., Platt, C. D., Geha, R. S., Chou, J., & Bartnikas, L. M. (2019). A novel variant in STAT2 presenting with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *144*(2), 611–613. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.05.008>
- Aluri, J., Bach, A., Kaviani, S., Chiquetto Paracatu, L., Kitcharoensakkul, M., Walkiewicz, M. A., ... Cooper, M. A. (2021). Immunodeficiency and bone marrow failure with mosaic and germline TLR8 gain of function. *Blood*, *137*(18), 2450–2462. <https://doi.org/10.1182/blood.2020009620>
- Bacchelli, C., Moretti, F. A., Carmo, M., Adams, S., Stanescu, H. C., Pearce, K., ... Gaspar, B. H. (2016). Mutations in LAT lead to a novel form of severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.*, *139*(2), 634–642.
- Barriga, F., Ramírez, P., Wietstruck, A., & Rojas, N. (2012). Hematopoietic stem cell transplantation: Clinical use and perspectives. *Biological Research*, *45*(3), 307–316. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000300012>
- Bazinet, A., & Popradi, G. (2019). A general practitioner's guide to hematopoietic stem-cell transplantation. *Current Oncology*, *26*(3), 187–191. <https://doi.org/10.3747/co.26.5033>
- Berges, C., Naujokat, C., Tinapp, S., Wiczorek, H., Höh, A., Sadeghi, M., ... Daniel, V. (2005). A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *333*(3), 896–907. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.171>
- Bhattacharjee, A., Pal, S., Feldman, G. M., & Cathcart, M. K. (2011). Hck is a key regulator of gene expression in alternatively activated human monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(42), 36709–36723. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.291492>
- Bleesing, J. J. H., & Fleisher, T. A. (2001). Jack J. H. Bleesing and Thomas A. Fleisher. *Cytometry L*, *2*(2).
- Boggon, T. J., & Eck, M. J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*, *23*(48 REV. ISS. 7), 7918–7927. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208081>
- Bousfiha, A., Jeddane, L., Picard, C., Al-Herz, W., Ailal, F., Chatila, T., ... Tangye, S. G. (2020). Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *Journal of Clinical Immunology*, *40*(1), 66–81.
- Boxer, L., & Dale, D. C. (2002). Neutropenia: Causes and consequences. *Seminars in Hematology*, *39*(2), 75–81. <https://doi.org/10.1053/shem.2002.31911>
- Bravo García-Morato, M., Calvo Apalategi, A., Bravo-Gallego, L. Y., Blázquez Moreno, A., Simón-Fuentes, M., Garmendia, J. V., ... Rodríguez Pena, R. (2019). Impaired control of multiple viral infections in a family with complete IRF9 deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *144*(1), 309-312.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.02.019>
- BRUTON, O. C. (1952). Agammaglobulinemia. *Pediatrics*, *9*(6), 722–728.
- Bulua, A. C., Mogul, D. B., Aksentijevich, I., Singh, H., He, D. Y., Muenz, L. R., ... Hull, K. M. (2012). Efficacy of etanercept in the tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: A prospective, open-label, dose-escalation study. *Arthritis and Rheumatism*, *64*(3), 908–913.

<https://doi.org/10.1002/art.33416>

- Bundhun, P. K., Kumari, A., & Huang, F. (2017). Differences in clinical features observed between childhood-onset versus adult-onset systemic lupus erythematosus. *Medicine (United States)*, *96*(37). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000008086>
- Burns, C., Cheung, A., Stark, Z., Choo, S., Downie, L., White, S., ... Cole, T. (2016). A novel presentation of homozygous loss-of-function STAT-1 mutation in an infant with hyperinflammation—A case report and review of the literature. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, *4*(4), 777–779. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2016.02.015>
- Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Abel, L., & Casanova, J. L. (2014). Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- γ immunity. *Seminars in Immunology*, *26*(6), 454–470. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.008>
- Byeon, S. E., Yi, Y. S., Oh, J., Yoo, B. C., Hong, S., & Cho, J. Y. (2012). The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators of Inflammation*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/512926>
- Chan, B., Wara, D., Bastian, J., Hershfield, M. S., Bohnsack, J., Azen, C. G., ... Kohn, D. B. (2005). Long-term efficacy of enzyme replacement therapy for Adenosine deaminase (ADA)-deficient Severe Combined Immunodeficiency (SCID). *Clinical Immunology*, *117*(2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.07.006>
- Chandesris, M. O., Melki, I., Natividad, A., Puel, A., Fieschi, C., Yun, L., ... Picard, C. (2012). Autosomal dominant STAT3 deficiency and hyper-IgE syndrome: Molecular, cellular, and clinical features from a french national survey. *Medicine (United States)*, *91*(4), 1–19. <https://doi.org/10.1097/MD.0b013e31825f95b9>
- Chase, N. M., Verbsky, J. W., & Routes, J. M. (2011). Newborn screening for SCID: Three years of experience. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1238*(1), 99–105. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06241.x>
- Ciccarelli, F., Martinis, M., & Ginaldi, L. (2013). An Update on Autoinflammatory Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, *21*(3), 261–269. <https://doi.org/10.2174/09298673113206660303>
- De Marcken, M., Dhaliwal, K., Danielsen, A. C., Gautron, A. S., & Dominguez-Villar, M. (2019). TLR7 and TLR8 activate distinct pathways in monocytes during RNA virus infection. *Science Signaling*, *12*(605), 1–19. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw1347>
- De Ravin, S. S., Wu, X., Moir, S., Anaya-O'Brien, S., Kwatema, N., Littel, P., ... Kardava, L. (2016). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Science Translational Medicine*, *8*(335), 335ra57. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad8856>
- Demaria, O., Pagni, P. P., Traub, S., Gassart, A. de, Branzk, N., Murphy, A. J., ... Alexopoulou, L. (2010). TLR8 deficiency leads to autoimmunity in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(September), 3651–3662. <https://doi.org/10.1172/JCI42081DS1>
- Desnues, B., Beatriz Macedo, A., Roussel-Queval, A., Bonnardel, J., Henri, S., Demaria, O., & Alexopoulou, L. (2014). TLR8 on dendritic cells and TLR9 on B cells restrain TLR7-mediated spontaneous autoimmunity in C57BL/6 mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(4), 1497–1502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314121111>
- Dobbs, N., Burnaevskiy, N., Chen, D., Gonugunta, V. K., Alto, N. M., & Yan, N. (2015). STING activation by translocation from the ER is associated with infection and autoinflammatory disease. *Cell Host Microbe*, *18*(2), 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.014.Chronic>
- Dorsey, M., & Puck, J. (2017). Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in the US: Current Status and Approach to Management. *Int J Neonatal Screen*, *3*(2). <https://doi.org/10.3390/ijns3020015>
- Duncan, C. J. A., Mohamad, S. M. B., Young, D. F., Skelton, A. J., Leahy, T. R., Munday, D. C., ... Hambleton, S. (2015). Human IFNAR2 deficiency: lessons for antiviral immunity Europe PMC Funders Group. *Sci Transl Med*, *7*(307), 307–154. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac4227.Human>
- Duncan, C. J. A., Randall, R. E., & Hambleton, S. (2020). Genetic Lesions of Type I Interferon Signalling in Human Antiviral Immunity. *Trends in Genetics*, *xx*(1726), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.08.017>

- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Zaid Al-Mohsen, I., Al-Jumaah, S., ... Casanova, J. L. (2003). Impaired response to interferon- α/β and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nature Genetics*, 33(3), 388–391. <https://doi.org/10.1038/ng1097>
- Edwards, N. L. (1985). Immunodeficiencies associated with errors in purine metabolism. *Medical Clinics of North America*, 69(3), 505–518. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(16\)31029-x](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(16)31029-x)
- Eng, H. L., Hsu, Y. Y., & Lin, T. M. (2018). Differences in TLR7/8 activation between monocytes and macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497(1), 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.079>
- Ernst, M., Inglese, M., Scholz, G. M., Harder, K. W., Clay, F. J., Bozinovski, S., ... Dunn, A. R. (2002). Constitutive Activation of the Src Family Kinase Hck Results in Spontaneous Pulmonary Inflammation and an Enhanced Innate Immune Response. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(5), 589–604. <https://doi.org/10.1084/jem.20020873>
- Fagerholm, S. C., Guenther, C., Asens, M. L., Savinko, T., & Uotila, L. M. (2019). Beta2-Integins and interacting proteins in leukocyte trafficking, immune suppression, and immunodeficiency disease. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00254>
- Fatima, Z., Amina, K., Tariq, U., & Sohail, M. S. (2018). Hemophagocytic lymphohistiocytosis: A case series. *Cureus*, 10(4), e2545. <https://doi.org/10.7759/cureus.2545>
- Fejtkova, M., Sukova, M., Hlozkova, K., Skvarova Kramarzova, K., Rackova, M., Jakubec, D., ... Kanderova, V. (2022). TLR8/TLR7 dysregulation due to a novel TLR8 mutation causes severe autoimmune hemolytic anemia and autoinflammation in identical twins. *American Journal of Hematology*, 97(3), 338–351. <https://doi.org/10.1002/ajh.26452>
- Flinn, A. M., & Gennery, A. R. (2018). Adenosine deaminase deficiency: A review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1), 5–11. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0807-5>
- Froňková, E., Klopcer, A., Svatoň, M., Nováková, M., Kotrová, M., Kayserová, J., ... Šedivá, A. (2014). The TREC/KREC assay for the diagnosis and monitoring of patients with DiGeorge syndrome. *PLoS ONE*, 9(12), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114514>
- Fu, Q., Fu, T.-M., Cruz, A. C., Sengupta, P., Thomas, S. K., Wang, S., ... Chou, J. J. (2016). Structural Basis and Functional Role of Intramembrane Trimerization of the Fas/CD95 Death Receptor. *Mol Cell*, 61(4), 602–613. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.009>
- Galli, M. (2014). Treatment of the antiphospholipid syndrome. *Autoimmunity Highlights*, 5(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13317-013-0056-5>
- Ghosh, S., & Gaspar, B. H. (2017). Gene Therapy Approaches to Immunodeficiency. *Hematol Oncol Clin North Am.*, 5(31), 823–834. <https://doi.org/10.13841/j.cnki.jxsj.2013.01.021>
- Grusby, M. J., Johnson, R. S., Papaioannou, V. E., & Glimcher, L. H. (1991). Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science*, 253(5026), 1417–1420. <https://doi.org/10.1126/science.1910207>
- Gupta, S., & Gupta, A. (2017). Selective IgM deficiency-An underestimated primary immunodeficiency. *Frontiers in Immunology*, 8(SEP), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01056>
- Ha, F., & Khalil, H. (2015). Crohn's disease: A clinical update. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 8(6), 352–359. <https://doi.org/10.1177/1756283X15592585>
- Hambleton, S., Goodbourn, S., Young, D. F., Dickinson, P., Mohamad, S. M. B., Valappil, M., ... Randall, R. E. (2013). STAT2 deficiency and susceptibility to viral illness in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(8), 3053–3058. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220098110>
- Hanna, S., & Etzioni, A. (2014). MHC class I and II deficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(2), 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.06.001>
- Hauck, F., Randriamampita, C., Martin, E., Gerart, S., Lambert, N., Lim, A., ... Picard, C. (2012). Primary T-cell immunodeficiency with immunodysregulation caused by autosomal recessive LCK deficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(5). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.029>

- Henter, J.-I., Horne, A., Aricó, M., Egeler, R. M., Filipovich, A. H., Imashuku, S., ... Janka, G. (2007). The British Childhood Cancer Survivor Study: Objectives, methods, population structure, response rates and initial descriptive information. *Pediatric Blood & Cancer*, *48*(5), 124–131. <https://doi.org/10.1002/pbc>
- Hernandez, N., Bucciol, G., Moens, L., Le Pen, J., Shahrooei, M., Goudouris, E., ... Bossuyt, X. (2019). Inherited IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse reaction to measles and yellow fever live vaccines. *Journal of Experimental Medicine*, *216*(9), 2057–2070. <https://doi.org/10.1084/jem.20182295>
- Hershkovitz, D., Gross, Y., Nahum, S., Yehezkel, S., Sarig, O., Uitto, J., & Sprecher, E. (2011). Functional characterization of SAMD9, a protein deficient in normophosphatemic familial tumoral calcinosis. *Journal of Investigative Dermatology*, *131*(3), 662–669. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.387>
- Heyworth, P. G., Cross, A. R., & Curnutte, J. T. (2003). Chronic granulomatous disease. *Current Opinion in Immunology*, *15*(5), 578–584. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00109-2)
- Hoche, F., Frankenberg, E., Rambow, J., Theis, M., Harding, J. A., Qirshi, M., ... Kieslich, M. (2014). Cognitive phenotype in ataxia-telangiectasia. *Pediatric Neurology*, *51*(3), 297–310. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.04.027>
- Hu, T., Suter, S. R., Mumbleau, M. M., & Beal, P. A. (2018). TLR8 activation and inhibition by guanosine analogs in RNA: Importance of functional groups and chain length. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *26*(1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.020>
- Itoh, H., Tatematsu, M., Watanabe, A., Iwano, K., Funami, K., Seya, T., & Matsumoto, M. (2011). UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling. *PLoS ONE*, *6*(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028500>
- Jeffries, L., Shima, H., Ji, W., Panisello-Manterola, D., McGrath, J., Bird, L. M., ... Lakhani, S. (2018). A novel SAMD9 mutation causing MIRAGE syndrome: An expansion and review of phenotype, dysmorphology, and natural history. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *176*(2), 415–420. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38557>
- Kalina, T., Flores-Montero, J., Van Der Velden, V. H. J., Martin-Ayuso, M., Böttcher, S., Ritgen, M., ... Orfao, A. (2012). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, *26*(9), 1986–2010. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.122>
- Kalina, Tomas, Bakardjieva, M., Blom, M., Perez-Andres, M., Barendregt, B., Kanderová, V., ... van der Burg, M. (2020). EuroFlow Standardized Approach to Diagnostic Immunophenotyping of Severe PID in Newborns and Young Children. *Frontiers in Immunology*, *11*(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00371>
- Kanderova, V., Svobodova, T., Borna, S., Fejtкова, M., Martinu, V., Paderova, J., ... Lebl, J. (2021). Early-onset pulmonary and cutaneous vasculitis driven by constitutively active SRC-family kinase HCK. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.07.046>
- Kanegane, H., Hoshino, A., Okano, T., Yasumi, T., Wada, T., Takada, H., ... Morio, T. (2018). Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Allergology International*, *67*(1), 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.06.003>
- Kao, S.-H., Wang, W.-L., Chen, C.-Y., Chang, Y.-L., Wu, Y.-Y., Wang, Y.-T., ... Yang, P.-C. (2015). Analysis of Protein Stability by the Cycloheximide Chase Assay. *Bio-Protocol*, *5*(1), 1–5. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1374>
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, *5*(SEP), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- Khodarev, N. N., Roizman, B., & Weichselbaum, R. R. (2012). Molecular pathways: Interferon/Stat1 pathway: Role in the tumor resistance to genotoxic stress and aggressive growth. *Clinical Cancer Research*, *18*(11), 3015–3021. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3225>
- Klein, C., Lisowska-Groszpiere, B., LeDeist, F., Fischer, A., & Griscelli, C. (1993). Major histocompatibility complex class II deficiency: Clinical manifestations, immunologic features, and outcome. *The Journal of Pediatrics*, *123*(6), 921–928. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)80388-9](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)80388-9)

- Kobrynski, L. J., & Sullivan, K. E. (2007). Velocardiofacial syndrome, DiGeorge syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*, *370*(9596), 1443–1452. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61601-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61601-8)
- Kong, X. F., Ciancanelli, M., Al-Hajjar, S., Alsina, L., Zumwalt, T., Bustamante, J., ... Boisson-Dupuis, S. (2010). A novel form of human STAT1 deficiency impairing early but not late responses to interferons. *Blood*, *116*(26), 5896–5906. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-280586>.
- Korade-Mirnic, Ž., & Corey, S. J. (2000). Src kinase-mediated signaling in leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, *68*(5), 603–613. <https://doi.org/https://doi.org/10.1189/jlb.68.5.603>
- Kotlarz, D., Beier, R., Murugan, D., Diestelhorst, J., Jensen, O., Boztug, K., ... Klein, C. (2012). Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: Implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology*, *143*(2), 347–355. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.04.045>
- Lambotte, O., Neven, B., Galicier, L., Magerus-Chatinet, A., Schleinitz, N., Hermine, O., ... Rieux-Laucat, F. (2013). Diagnosis of autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by FAS deficiency in adults. *Haematologica*, *98*(3), 389–392. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.067488>
- Larange, A., Antonios, D., Pallardy, M., & Kerdine-Romer, S. (2009). TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *Journal of Leukocyte Biology*, *85*(4), 673–683. <https://doi.org/10.1189/jlb.0808504>
- Lau, C. M., Broughton, C., Tabor, A. S., Akira, S., Flavell, R. A., Mamula, M. J., ... Marshak-Rothstein, A. (2005). RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(9), 1171–1177. <https://doi.org/10.1084/jem.20050630>
- Lee, A. J., & Ashkar, A. A. (2018). The dual nature of type I and type II interferons. *Frontiers in Immunology*, *9*(SEP), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02061>
- Lee, P. Y., Kumagai, Y., Li, Y., Takeuchi, O., Yoshida, H., Weinstein, J., ... Reeves, W. H. (2008). TLR7-dependent and FcγR-independent production of type I interferon in experimental mouse lupus. *Journal of Experimental Medicine*, *205*(13), 2995–3006. <https://doi.org/10.1084/jem.20080462>
- Lerner, E. C., Tribble, R. P., Schiavone, A. P., Hochrein, J. M., Engen, J. R., & Smithgall, T. E. (2005). Activation of the Src family kinase Hck without SH3-linker release. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(49), 40832–40837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508782200>
- Liu, L., Okada, S., Kong, X.-F., Kreins, A. Y., Cypowyj, S., Abhyankar, A., ... Casanova, J.-L. (2011). Gain-of-function human *STAT1* mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(8), 1635–1648. <https://doi.org/10.1084/jem.20110958>
- Liu, Y., Jesus, A. A., Marrero, B., Yang, D., Ramsey, S. E., Montealegre Sanchez, G. A., ... Goldbach-Mansky, R. (2014). Activated STING in a Vascular and Pulmonary Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *371*(6), 507–518. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1312625>
- Llamas-Guillén, B. A., Pastor, N., López-Herrera, G., González-Serrano, M. E., Valenzuela-Vázquez, L., Bravo-Adame, M. E., ... Cruz-Munoz, M. E. (2017). Two novel mutations in ZAP70 gene that result in human immunodeficiency. *Clinical Immunology*, *183*(17), 1521–6616. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.09.005>
- Locke, B. A., Dasu, T., & Verbsky, J. W. (2014). Laboratory diagnosis of primary immunodeficiencies. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, *46*(2), 154–168. <https://doi.org/10.1007/s12016-014-8412-4>
- Maaloul, I., Talmoudi, J., Chabchoub, I., Ayadi, L., Kamoun, T. H., Boudawara, T., ... Hachicha, M. (2016). Chediak-Higashi syndrome presenting in accelerated phase: A case report and literature review. *Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy*, *9*(2), 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2015.07.002>
- Marciano, B. E., Huang, C.-Y., Joshi, G., Rezaei, N., Carvalho, B. C., Allwood, Z., ... Rosenzweig, S. D. (2014). BCG vaccination in SCID patients: complications, risks and vaccination policies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *133*(4), 1134–1141. <https://doi.org/10.1097/MCA.000000000000178>. Endothelial
- Mazzi, P., Caveggon, E., Lapinet-Vera, J. A., Lowell, C. A., & Berton, G. (2015). The Src-Family Kinases Hck and Fgr Regulate Early Lipopolysaccharide-Induced Myeloid Cell Recruitment into the Lung and Their

- Ability To Secrete Chemokines. *The Journal of Immunology*, 195(5), 2383–2395.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402011>
- McDermott, M. F., Aksentijevich, I., Galon, J., McDermott, E. M., William Ogunkolade, B., Centola, M., ... Kastner, D. L. (1999). Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell*, 97(1), 133–144.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80721-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80721-7)
- McKinnon, K. M. (2019). Flow cytometry: an overview. *Curr Protoc Immunol.*, 5(120), 56–61.
https://doi.org/10.1007/978-94-017-0623-0_1
- Medina, I., Cougoule, C., Drechsler, M., Bermudez, B., Koenen, R. R., Sluimer, J., ... Biessen, E. A. L. (2015). Hck/Fgr Kinase Deficiency Reduces Plaque Growth and Stability by Blunting Monocyte Recruitment and Intraplaque Motility. *Circulation*, 132(6), 490–501.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012316>
- Meyts, I., Bosch, B., Bolze, A., Boisson, B., Itan, Y., Belkadi, A., ... Moens, L. (2016). Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. *J Allergy Clin Immunol.*, 138(4), 957–969.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.003>
- Mócsai, A., Ligeti, E., Lowell, C. A., & Berton, G. (1999). Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(2), 1120–1126. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916742>
- Mogensen, T. (2013). STAT3 and the Hyper-IgE syndrome: Clinical presentation, genetic origin, pathogenesis, novel findings and remaining uncertainties. *Jak-Stat*, 2(2), e23435–e23435.
<https://doi.org/10.4161/jkst.23435>
- Moon, C., Park, H. J., Choi, Y. H., Park, E. M., Castranova, V., & Kang, J. L. (2010). Pulmonary inflammation after intraperitoneal administration of ultrafine titanium dioxide (TiO₂) at rest or in lungs primed with lipopolysaccharide. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 73(5–6), 396–409. <https://doi.org/10.1080/15287390903486543>
- Ness, S. (2019). Intravenous and Subcutaneous Immunoglobulin Treatment Options. *Am J Manag Care*, (June), S98–S104. Retrieved from www.ajmc.com
- Ng, W. F., Von Delwig, A., Carmichael, A. J., Arkwright, P. D., Abinun, M., Cant, A. J., ... Lilic, D. (2010). Impaired TH17 responses in patients with chronic mucocutaneous candidiasis with and without autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(5), 1006–1015.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.08.027>
- Notarangelo, L. D., Roifman, C. M., & Giliani, S. (2008). Cartilage-hair hypoplasia: Molecular basis and heterogeneity of the immunological phenotype. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 8(6), 534–539. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e328310fe7d>
- Pairo-Castineira, E., Clohisey, S., Klaric, L., Bretherick, A. D., Rawlik, K., Pasko, D., ... Baillie, J. K. (2021). Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature*, 591(7848), 92–98.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-03065-y>
- Pao, M., Wiggs, E. A., Anastacio, M. M., Hyun, J., DeCarlo, E. S., Miller, J. T., ... Holland, S. M. (2004). Cognitive Function in Patients with Chronic Granulomatous Disease: A Preliminary Report. *Psychosomatics*, 45(3), 230–234. <https://doi.org/10.1176/appi.psy.45.3.230>
- Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 191(3), 677–691. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>
- Parsons, S. J., & Parsons, J. T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*, 23(48 REV. ISS. 7), 7906–7909. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208160>
- Patinote, C., Bou, N., Moarbess, G., & Cirnat, N. (2020). *Agonist and antagonist ligands of toll-like receptors 7 and 8: Ingenious tools for therapeutic purposes*. (January).
- Pestka, S. (1997). The human interferon-alpha species and hybrid proteins. *Seminars in Oncology*, 24(3 Suppl 9), S9-4-S9-17.

- Picard, C., Casanova, J. L., & Puel, A. (2011). Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or κ Ba deficiency. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3), 490–497. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-11>
- Poh, A. R., O'Donoghue, R. J. J., & Ernst, M. (2015). Hematopoietic cell kinase (HCK) as a therapeutic target in immune and cancer cells. *Oncotarget*, 6(18), 15752–15771. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4199>
- Porter, M., Schindler, T., Kuriyan, J., & Miller, W. T. (2000). Reciprocal regulation of Hck activity by phosphorylation of Tyr527 and Tyr416: Effect of introducing a high affinity intramolecular SH2 ligand. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2721–2726. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2721>
- Reboldi, A., Dang, E. V., McDonald, J. G., Liang, G., Russell, D. W., & Cyster, J. G. (2014). 25-hydroxycholesterol suppresses interleukin-1-driven inflammation downstream of type I interferon. *Science*, 345(6197), 679–684. <https://doi.org/10.1126/science.1254790>
- Reuven, E. M., Fink, A., & Shai, Y. (2014). Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: Lessons from the TLR family. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(6), 1586–1593. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2014.01.020>
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., ... Durandy, A. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*, 102(5), 565–575. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00079-9)
- Riddler, S. A., Para, M., Benson, C. A., Mills, A., Ramgopal, M., DeJesus, E., ... SenGupta, D. (2021). Vesatolimod, a toll-like receptor 7 agonist, induces immune activation in virally suppressed adults with HIV-1. *Clinical Infectious Diseases*, 72(11), 815–824.
- Rochereau, N., Roblin, X., Michaud, E., Gayet, R., Chanut, B., Jospin, F., ... Paul, S. (2021). NOD2 deficiency increases retrograde transport of secretory IgA complexes in Crohn's disease. *Nature Communications*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20348-0>
- Rowczenio, D. M., Iancu, D. S., Trojer, H., Gilbertson, J. A., Gillmore, J. D., Wechalekar, A. D., ... Lachmann, H. J. (2017). Autosomal dominant familial Mediterranean fever in Northern European Caucasians associated with deletion of p.M694 residue-A case series and genetic exploration. *Rheumatology (United Kingdom)*, 56(2), 209–213. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew058>
- Rozengurt, E. (2007). Mitogenic Signaling Pathways Induced by G Protein-Coupled Receptors. *Journal Cellular Physiology*, 213(May), 589–602. <https://doi.org/10.1002/JCP>
- Salima, H.-B. A., Gaspar, H. B., Blondeau, J., Caccavelli, L., Charrier, S., Buckland, K., ... Cavazzana, M. (2015). Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. *JAMA*, 313(15), 1550–1563. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.3253>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). The role and use of progestogens. *Biochemistry*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1097/00006250-199004001-00013>
- Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell and Tissue Research*, 343(1), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-stimulated genes: A complex web of host defenses. *Annual Review of Immunology*, 32(3), 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Serwas, N. K., Huemer, J., Dieckmann, R., Mejstrikova, E., Garncarz, W., Litzman, J., ... Boztug, K. (2018). CEBPE-mutant specific granule deficiency correlates with aberrant granule organization and substantial proteome alterations in neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00588>
- Shahni, R., Cale, C. M., Anderson, G., Osellame, L. D., Hambleton, S., Jacques, T. S., ... Rahman, S. (2015). Signal transducer and activator of transcription 2 deficiency is a novel disorder of mitochondrial fission. *Brain*, 138(10), 2834–2846. <https://doi.org/10.1093/brain/awv182>
- Shen, H., Kreisel, D., & Goldstein, D. R. (2013). Processes of Sterile Inflammation. *The Journal of Immunology*, 191(6), 2857–2863. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301539>
- Sheppard, D. N., & Welsh, M. J. (1999). Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiological Reviews*, 79(1 SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.S23>

- Smith, C. W., Marlin, S. D., Rothlein, R., Toman, C., & Anderson, D. C. (1989). Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intracellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 83(6), 2008–2017. <https://doi.org/10.1172/JCI114111>
- Spencer, S., Bal, S. K., Egner, W., Allen, H. L., Raza, S. I., Ma, C. A., ... Thaventhiran, J. E. D. (2019). Loss of the interleukin-6 receptor causes immunodeficiency, atopy, and abnormal inflammatory responses. *Journal of Experimental Medicine*, 216(9), 1986–1998. <https://doi.org/10.1084/jem.20190344>
- Suková, M., Mejstříková, E., Vodičková, E., Špišek, R., Formánková, R., Sumerauer, D., ... Starý, J. (2010). Hemofagocytující lymfohistiocytóza. *Vnitřní Lékařství*, 56(Suppl 2), 157–169.
- Tangye, S. G., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Chatila, T., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., ... Sullivan, K. E. (2020). Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *Journal of Clinical Immunology*, 40(1), 24–64. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00737-x>
- Tanji, H., Ohto, U., Motoi, Y., Shibata, T., Miyake, K., & Shimizu, T. (2016). Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-like receptor 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(11), 3012–3017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516000113>
- Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Miyake, K., & Shimizu, T. (2013). Structural reorganization of the toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science*, 339(6126), 1426–1429. <https://doi.org/10.1126/science.1229159>
- Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., ... Shimizu, T. (2015). Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(2), 109–116. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2943>
- Tasseff, R., Jensen, H. A., Congleton, J., Dai, D., Rogers, K. V., Sagar, A., ... Varner, J. D. (2017). An Effective Model of the Retinoic Acid Induced HL-60 Differentiation Program. *Scientific Reports*, 7(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14523-5>
- Thrasher, A. J., & Williams, D. A. (2017). Evolving Gene Therapy in Primary Immunodeficiency. *Molecular Therapy*, 25(5), 1132–1141. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.018>
- Thwaites, R., Chamberlain, G., & Sacre, S. (2014). Emerging role of endosomal toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology*, 5(JAN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00001>
- Toutou, I. (2001). The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *European Journal of Human Genetics*, 9(7), 473–483. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200658>
- Tran, N. L., Manzin-Lorenzi, C., & Santiago-Raber, M. L. (2015). Toll-like receptor 8 deletion accelerates autoimmunity in a mouse model of lupus through a Toll-like receptor 7-dependent mechanism. *Immunology*, 145(1), 60–70. <https://doi.org/10.1111/imm.12426>
- Tsai, H. Y., Yu, H. H., Chien, Y. H., Chu, K. H., Lau, Y. L., Lee, J. H., ... Yang, Y. H. (2015). X-linked hyper-IgM syndrome with CD40LG mutation: Two case reports and literature review in Taiwanese patients. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 48(1), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.07.004>
- Turkalj, M., Matišić, V., Šimić, A., Juginović, A., Erceg, D., Drinković, D. T., ... Primorac, D. (2019). Cystic fibrosis presentation in del. F508 and P. Tyr109Glyfs compound heterozygote CFTR state: A case report. *Croatian Medical Journal*, 60(3), 246–249. <https://doi.org/10.3325/cmj.2019.60.246>
- Turner, C. E. (1998). Molecules in focus Paxillin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31(9), 891–894. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00040-0)
- Ueki, Y., Tiziani, V., Santanna, C., Fukai, N., Maulik, C., Garfinkle, J., ... Reichenberger, E. (2001). Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nature Genetics*, 28(2), 125–126. <https://doi.org/10.1038/88832>
- Van Der Burg, M., Kalina, T., Perez-Andres, M., Vlkova, M., Lopez-Granados, E., Blanco, E., ... Van Dongen, J. J. M. (2019). The EuroFlow PID orientation tube for flow cytometric diagnostic screening of primary immunodeficiencies of the lymphoid system. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 1–11.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00246>

- van Schaarenburg, R. A., Magro-Checa, C., Bakker, J. A., Teng, Y. K. O., Bajema, I. M., Huizinga, T. W., ... Trouw, L. A. (2016). C1q Deficiency and Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in Immunology*, 7(December), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00647>
- Vinuesa, C., Brown, G., Canete, P., Ellyard, J., Bassett, K., Turnbull, C., ... Cook, M. (2021). Monogenic autoimmunity caused by TLR7 gain-of-function. *Nature Portfolio Journal*, 1–13.
- Vogel, T. P., Milner, J. D., & Cooper, M. A. (2015). The Ying and Yang of STAT3 in Human Disease. *J Clin Immunol*, 35(7), 615–623. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0187-8>.The
- Volmering, S., Block, H., Boras, M., A. Lowell, C., & Zarbock, A. (2016). The Neutrophil Btk Signalosome Regulates Integrin Activation during Sterile Inflammation. *Immunity*, 44(1), 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.011>.The
- Wang, J., Shao, Y., Bennett, T. A., Shankar, R. A., Wightman, P. D., & Reddy, L. G. (2006a). The functional effects of physical interactions among toll-like receptors 7, 8, and 9. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37427–37434. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605311200>
- Wang, J., Shao, Y., Bennett, T. A., Shankar, R. A., Wightman, P. D., & Reddy, L. G. (2006b). The functional effects of physical interactions among toll-like receptors 7, 8, and 9. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37427–37434. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605311200>
- Wang, Y., Luo, J., Alu, A., Han, X., Wei, Y., & Wei, X. (2020). CGAS-STING pathway in cancer biotherapy. *Molecular Cancer*, 19(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01247-w>
- Wentink, M. W. J., Lambeck, A. J. A., van Zelm, M. C., Simons, E., van Dongen, J. J. M., Ijspeert, H., ... van der Burg, M. (2015). CD21 and CD19 deficiency: Two defects in the same complex leading to different disease modalities. *Clinical Immunology*, 161(2), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.08.010>
- Wesemann, D. R., Magee, J. M., Boboila, C., Calado, D. P., Gallagher, M. P., Portuguese, A. J., ... Alt, F. W. (2011). Immature B cells preferentially switch to IgE with increased direct S_μ to S_ε recombination. *Journal of Experimental Medicine*, 208(13), 2733–2746. <https://doi.org/10.1084/jem.20111155>
- Winkelstein, J. A., Marino, M. C., Lederman, H. M., Jones, S. M., Sullivan, K., Burks, A. W., ... Ochs, H. D. (2006). X-linked agammaglobulinemia: Report on a United States registry of 201 patients. *Medicine*, 85(4), 193–202. <https://doi.org/10.1097/01.md.0000229482.27398.ad>
- Ye, J., Wang, Y., Liu, X., Opejin, A., Hsueh, E. C., Luo, H., ... Peng, G. (2017). Toll-like Receptor 7 signaling regulates Th17 cells and autoimmunity: novel potential for autoimmune therapy. *J Immunol.*, 199(3), 941–954. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601890>.Toll-like
- Yel, L. (2010). Selective IgA Deficiency. *Journal of Clinical Immunology*, 30(1), 10–16. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9357-x>
- Yu, G. P., Nadeau, K. C., Berk, D. R., de Saint Basile, G., Lambert, N., Knapnougel, P., ... Cowan, M. J. (2011). Genotype, phenotype, and outcomes of nine patients with T-B+NK+ SCID. *Pediatric Transplantation*, 15(7), 733–741. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2011.01563.x>
- Yu, L., Wang, L., & Chen, S. (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(11), 2592–2603. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x>
- Zhang, Q., Liu, Z., Moncada-Velez, M., Chen, J., Ogishi, M., Bigio, B., ... Zhang, X. (2020). Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, 370(6515). <https://doi.org/10.1126/science.abd4570>
- Zhang, Z., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Sato, R., ... Shimizu, T. (2018). Structural Analyses of Toll-like Receptor 7 Reveal Detailed RNA Sequence Specificity and Recognition Mechanism of Agonistic Ligands. *Cell Reports*, 25(12), 3371–3381.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.081>
- Zhou, J. H., Wang, Y. N., Chang, Q. Y., Ma, P., Hu, Y., & Cao, X. (2018). Type III interferons in viral infection and antiviral immunity. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(1), 173–185. <https://doi.org/10.1159/000495172>

Zhu, L., Shi, T., Zhong, C., Wang, Y., Chang, M., & Liu, X. (2017). IL-10 and IL-10 Receptor Mutations in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Research, 10*(2), 65–69. <https://doi.org/10.14740/gr740w>

Zimmer, J., Andrès, E., Donato, L., Hanau, D., Hentges, F., & de la Salle, H. (2005). Clinical and immunological aspects of HLA class I deficiency. *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians, 98*(10), 719–727. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hci112>

TLR8/TLR7 dysregulation due to a novel *TLR8* mutation causes severe autoimmune hemolytic anemia and autoinflammation in identical twins

Martina Fejtikova¹  | Martina Sukova² | Katerina Hlozkova¹ |
Karolina Skvarova Kramarzova¹  | Marketa Rackova¹  | David Jakubec^{3,4} |
Marina Bakardjjeva¹  | Marketa Bloomfield^{5,6}  | Adam Klopperk⁶  |
Zuzana Parackova⁶  | Anna Sediva⁶  | Jahnvi Aluri⁷ | Michaela Novakova¹  |
Tomas Kalina¹  | Eva Fronkova¹ | Ondrej Hrusak¹ | Hana Malcova⁸ |
Petr Sedlacek² | Zuzana Liba⁹ | Martin Kudr⁹ | Jan Stary² | Megan A. Cooper⁷ |
Michael Svaton¹  | Veronika Kanderova¹ 

¹CLIP - Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Paediatric Haematology and Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

²Department of Paediatric Haematology and Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

³Bioinformatics Group, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

⁴Department of Software Engineering, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Prague, Czech Republic

⁵Department of Paediatrics, First Faculty of Medicine, Charles University and Thomayer University Hospital, Prague, Czech Republic

⁶Department of Immunology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

⁷Division of Rheumatology/Immunology, Department of Pediatrics, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA

⁸Department of Paediatric and Adult Rheumatology, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

⁹Department of Paediatric Neurology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Correspondence

Veronika Kanderova and Michael Svaton, CLIP - Childhood Leukemia Investigation Prague, Department of Pediatric Hematology and Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, V Uvalu 84, 15006, Prague 5, Czech Republic.
Email: veronika.kanderova@lfmotol.cuni.cz (V. K.) and michael.svaton@lfmotol.cuni.cz (M. S.)

Funding information

This work was supported by grants obtained from the Ministry of Health of the Czech Republic no. NV18-05-00162, NV18-07-00430 and NV19-05-00332, Charles University projects PRIMUS/19/MED/04 and GA UK 362119, European Regional Development Fund projects CZ.2.16/3.1.00/

Abstract

Our study presents a novel germline c.1715G>T (p.G572V) mutation in the gene encoding Toll-like receptor 8 (*TLR8*) causing an autoimmune and autoinflammatory disorder in a family with monozygotic male twins, who suffer from severe autoimmune hemolytic anemia worsening with infections, and autoinflammation presenting as fevers, enteritis, arthritis, and CNS vasculitis. The pathogenicity of the mutation was confirmed by in vitro assays on transfected cell lines and primary cells. The p. G572V mutation causes impaired stability of the TLR8 protein, cross-reactivity to TLR7 ligands and reduced ability of TLR8 to attenuate TLR7 signaling. This imbalance toward TLR7-dependent signaling leads to increased pro-inflammatory responses, such as nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and production of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF α . This unique *TLR8* mutation with partial TLR8 protein loss and hyperinflammatory phenotype mediated by TLR7 ligands represents a novel

Michael Svaton and Veronika Kanderova contributed equally to this work.

24505 and CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000729, the Jeffrey Modell Foundation and the St. Louis Children's Hospital Foundation. Institutional support was provided from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic project for the conceptual development of research organization - University Hospital Motol 00064203

inborn error of immunity with childhood-onset and a good response to TLR7 inhibition.

1 | INTRODUCTION

The innate immune system serves as the first line of defense against infection. It employs pattern recognition receptors (PRRs) that recognize evolutionarily conserved molecular structures of microorganisms. Toll-like receptors (TLRs), a family of PRRs, are a group of single-spanning membrane proteins found on the surface or in endosomes of immune cells. Defects in TLR signaling pathways described in IRAK4 or MyD88 deficiencies are associated with bacterial susceptibility and impaired inflammatory responses to infection.¹ Conversely, gain-of-function in TLR8 leads to hyperresponsiveness to TLR8 ligands, hyperproduction of inflammatory cytokines, neutropenia and bone marrow failure.² The phylogenetically related endosomal TLR8 and TLR7 both detect viral and bacterial single-stranded (ss)RNA.^{3,4} TLR8 is predominantly expressed in monocytes/macrophages, myeloid dendritic cells (mDCs), and granulocytes, whereas TLR7 in plasmacytoid dendritic cells (pDCs), B-cells, and monocytes/macrophages.^{5,6} The stimulation of TLRs generally activates NF- κ B, mitogen-activated protein-kinases (MAPK), and interferon (IFN) response factors, which subsequently trigger the transcription of inflammatory cytokines, chemokines and costimulatory molecules.³ The signaling pathways downstream of TLR8 and TLR7 vary in different cell types. In monocytes, TLR8 activation promotes a strong NF- κ B activation, type I IFN response and the production of Th1 polarizing cytokines, whereas TLR7 preferentially activates MAPK signaling and the production of Th17 polarizing cytokines. Interestingly, TLR7 inhibits TLR8-mediated type I IFN response.⁷ Consistently, during the maturation of DCs, TLR8 and TLR7 negatively regulate each other.⁸ A direct or indirect intraendosomal physical interaction of TLR8 and TLR7 is suggested to play a role in balancing these inflammatory outcomes.⁹ Interestingly, because of their high homology, mutations near the ligand-binding site 1 of TLR8 can increase selectivity to TLR7-specific ligands.¹⁰

In addition to external pathogens, TLRs respond to endogenous ligands, such as the self-RNA within anti-ribonucleoprotein autoantibodies that drive systemic lupus erythematosus (SLE)¹¹ or rheumatoid arthritis¹² in mice. Interestingly, overexpression of human TLR8¹³ or murine TLR7^{14,15} is sufficient to drive autoimmune inflammation in mice; and murine TLR8 deficiency also leads to autoimmunity and autoinflammation by increasing TLR7-dependent responses.^{16,17} Here, we present the first report of human partial TLR8 protein deficiency combined with TLR8/TLR7 dysregulation underlying severe autoimmune and inflammatory phenotypes.

2 | METHODS

2.1 | Whole exome sequencing

Sequencing libraries were prepared from DNA isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of one of the patients using the SureSelect Human All Exon V6+UTRs kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and sequenced on the NextSeq 500 Instrument (Illumina, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. Resulting reads were aligned to the hg19 human reference genome with BWA.¹⁸ Variant calling was performed with VarScan2¹⁹ and samtools,²⁰ and variant annotation and filtering was done in Ingenuity[®] Variant Analysis (QIAGEN, Hilden, Germany) with a custom panel of potential candidate genes. No other potentially pathogenic mutations were identified from the Whole Exome Sequencing data in neither *TLR8*, *TLR7* nor any other known primary immunodeficiency (PID)-related genes.²¹ No pathogenic variants in the *TLR8* gene have been reported in the ClinVar database at the time of this study. Other patients with *TLR8* gene mutations were identified via the GeneMatcher database,²² and a collaboration that led to the publication of the gain-of-function cases by Aluri et al.² was established. The gnomAD database reports eight individuals who are hemizygous for a putative loss-of-function variant without confirmation of these variant calls or information on their phenotypes.

2.2 | Sanger sequencing

DNA was isolated from PBMCs of both siblings and their parents and used for PCR amplification of the p.G572 surrounding area of the *TLR8* gene using the forward 5'-GCAATGCTCAAGTGTTAAGTGGGA and the reverse 5'-TACCAGGGACTTGCTTCCAG primers. The expression of both alleles in mother's cells was confirmed using the cDNA obtained from sorted monocytes as described below with the forward 5'-GCTCTTACTGAATTGTCCGACTTG and the reverse 5'-GCAACTCGAGACGAGGAAACT primers. The amplicons were sequenced using BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, CA) on 3730 DNA Analyzer (Thermo Fischer Scientific) according to manufacturer's instructions.

2.3 | Cell sorting

Monocytes were isolated on an FACS Aria III sorter (BD Biosciences [BD], San Jose, CA) based on Forward Scatter (FSC), Side Scatter

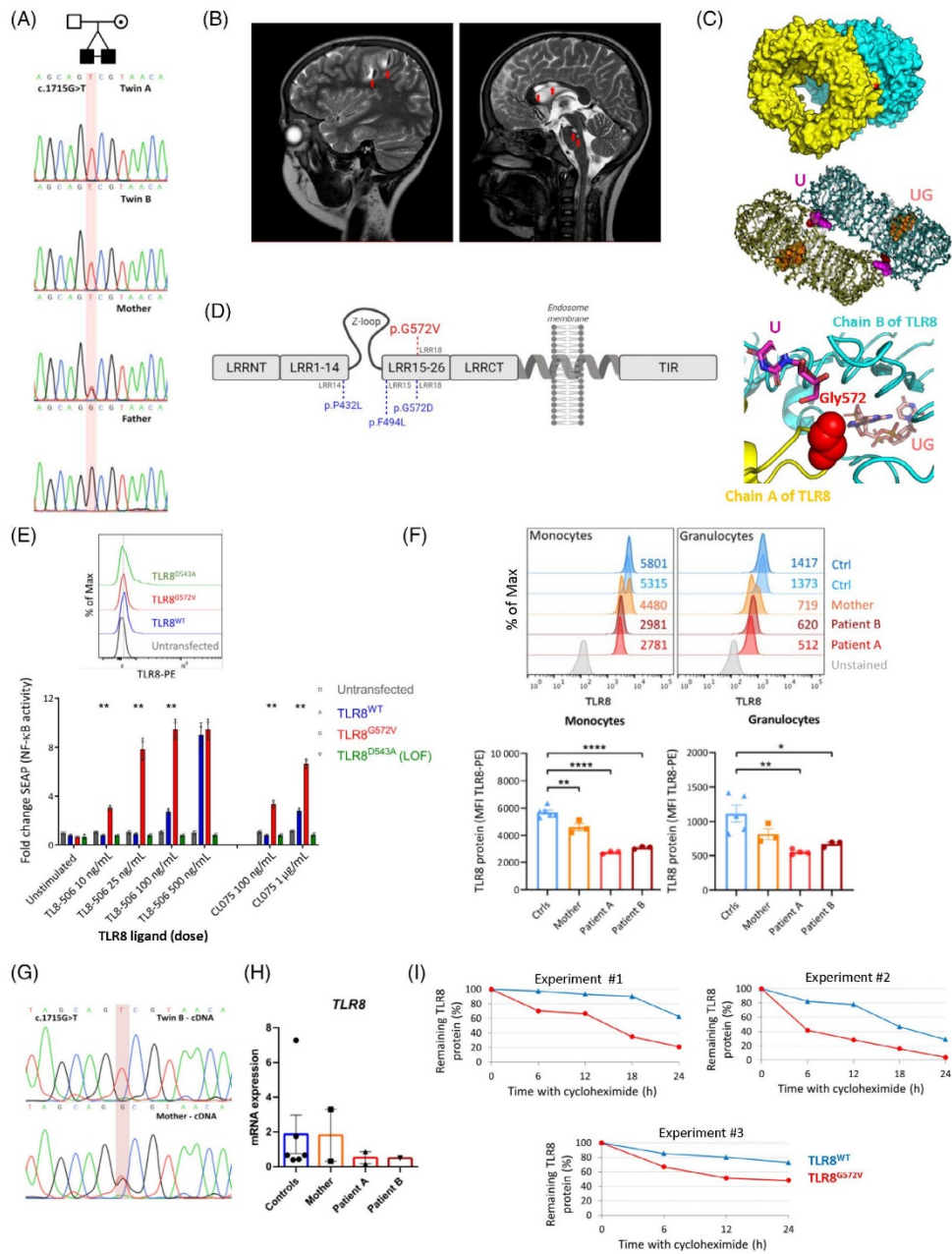


FIGURE 1 Legend on next page.

(SSC), CD45-Pacific Blue, and CD14-APC (Exbio, Vestec, Czech Republic) from the peripheral blood of both patients, their mother and healthy controls. T-cell subpopulations were sorted according to FSC, SSC and TCR $\alpha\beta$ +CD4+CD127+CD25-(non-Treg) (or CD8+) CCR7+CD45RO- (naive T-cells), TCR $\alpha\beta$ +CD4+CD127+CD25-(non-Treg) (or CD8+) CCR7+CD45RO+ (central memory T-cells), TCR $\alpha\beta$ +CD4+CD127+CD25-(non-Treg) (or CD8+) CCR7-CD45RO+ (effector memory T-cells), TCR $\alpha\beta$ +CD4+CD127+CD25-(non-Treg) (or CD8+) CCR7-CD45RO- (terminally differentiated T-cells), TCR $\alpha\beta$ +CD4+CD127dim/-CD25+ (Treg), TCR $\alpha\beta$ +CD8+CD45RO-CCR7+CD127+CD95+ (stem cell memory T-cells), and TCR $\alpha\beta$ +CD4+CD127+CD25-(non-Treg)CD45RO+CXCR5+ (follicular helper T-cells) using TCR $\alpha\beta$ -APC, CCR7-PE-Cy7, and CD8-APC-Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter [BC], Miami, FL), CD4-Alexa Fluor 700 and CD45RO-FITC (Exbio), CD127-PE-CF594, CD25-PE, and CXCR5-Brilliant Violet (BV) 421 (BD), and PD-1-BV605, CD95-BV510, and HLA-DR-PerCP-Cy5.5 (Biolegend, San Diego, CA).

2.4 | T-cell receptor β repertoire sequencing

DNA was isolated from the above listed T-cell subpopulations with the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) and used for the preparation of sequencing libraries according to the EuroClonality-NGS working group protocol for the complete TRB-VJ gene rearrangements.²³ Final libraries were sequenced on the MiSeq instrument (Illumina) according to the manufacturer's instructions, and the data were analyzed using the ARResT/Interrogate application.²⁴ Only clonotypes with productive TRB-VJ rearrangements were selected and filtered based on their frequency in all reads obtained from each sample.

2.5 | TLR8 and TLR7 mRNA quantification

Total RNA was isolated from specific cell populations sorted from PBMCs using the FACS Aria III (BD) using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and transcribed to cDNA by an iScript kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Gene expression levels of TLR7 and TLR8 were determined using TaqMan Gene Expression Assays for TLR7 (Hs00152971_m1), TLR8

(Hs00152972_m1), and the GAPDH (Hs99999905_m1) gene that was used for normalization; the qPCR reactions were performed on the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (all Thermo Fisher Scientific). The gene expression was normalized to GAPDH control gene expression in three healthy donors using the delta-delta Ct method.

2.6 | Cell lines

HEK293 and HEK293T cell lines were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics/antimycotics (all from Thermo Fisher Scientific).

2.7 | Plasmids

Plasmids encoding the mutant TLR8 (TLR8^{G572V} or TLR8^{D543A}) were prepared from the TLR8^{WT} construct (pUNO1-hTLR08b, NM_138636, InvivoGen, San Diego, CA) by site-directed mutagenesis (QuikChangeTM II XL Site-Directed Mutagenesis kit, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) using the primer pairs 5'-TAAATCTAGATGATGTTACGACTGCTATTCTGAAATAGTGTGAA-3' and 5'-TTCACACTATTTTCAGAATA GCAGTCGTAACACATCATCTAGAATTTA-3' (for TLR8^{G572V}) or 5'-CAC TAGCATTATCAAAGGCTAGTCTATTGTTGTCAAATCC-3' and 5'-GG ATTTGACAAACAATAGACTAGCCTTTGATAATGCTAGTGCTCTTA-3' (for TLR8^{D543A}). Successful mutagenesis was confirmed by Sanger sequencing. TLR8^{D543A} served as a negative control.²

2.8 | Cycloheximide chase assay

HEK293 and HEK293T cells were seeded in 6-well plates and transfected 24 h later with 4 μ g of TLR8^{WT} or TLR8^{G572V} plasmid using Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. After 48 h, proteosynthesis was inhibited using 50 μ g/mL cycloheximide (Sigma Aldrich, Merck). TLR8 protein level

FIGURE 1 TLR8 c.1715G>T mutation and partial TLR8 protein deficiency. A pedigree of the family and Sanger sequencing of the DNA (A). Large frontoparietal hemorrhagic lesions (red arrows) with smaller posts ischemic lesions in the brain stem and corpus callosum (smaller arrows) (B). TLR8 dimer from side view (PDB 3W3G16, G572 in red, top), structure of the liganded TLR8 dimer (middle) and detail of the interaction between G572 (in red) and the ssRNA40 degradation products (bottom)—uridine in ligand binding site 1 and UG dinucleotide in ligand binding site 2, PDB 4R08317 (C).²⁶ Linear diagram of TLR8 containing an N-terminal domain (LRRNT), a leucine-rich repeat (LRR) ligand recognition domain connected with the Z-loop between LRR 14 and 15, a C-terminal domain (LRRCT), a transmembrane domain anchoring TLR8 to the endosomal membrane and a Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain for signal transduction. Published mutations in LRR14, LRR15 and LRR18 are depicted in blue,² and the novel G572V mutation in LRR18 is in red (D). NF- κ B transcriptional activity of TLR8^{WT}- and TLR8^{G572V}-containing HEK cells upon TL8-506/CL075 stimulation (E). Basal TLR8 protein levels (F). Sanger sequencing of the monocyte cDNA (G). The relative expression of TLR8 mRNA (H). Enhanced degradation of mutant TLR8^{G572V} protein compared to TLR8^{WT} (I). Data acquired in two (H) and three (E, F, I) independent experiments, the results are expressed as the mean \pm SEM. Histograms show representative data, MFI in numbers. * $p < .05$, ** $p < .005$, *** $p < .0001$ (unpaired t -test). Protein structures visualized using PyMOL 2.3.0

TABLE 1 Genetics and clinical characteristics

Patient	Patient A	Patient B
Sex	Male	Male
Current age (years)	11	11
Genetic variant		
Chromosome	X	X
Position (hg19)	12938874	12938874
Gene symbol	TLR8	TLR8
Transcript change	c.1715G>T	c.1715G>T
Transcript	NM_138636	NM_138636
Protein Change	p.G572V	p.G572V
Inheritance	Inherited from mother	Inherited from mother
CADD	25	
PolyPhen2	0.999	
SIFT	0	
PhyloP	6.07	
gnomAD AF	Not present	
Clinical manifestation		
Age of onset	1.5 years	7 months
Primary manifestation	Noninfectious cervical lymphadenopathy with xathogranuloma, acute AIHA (6 years)	Transient red cell aplasia acute AIHA (2.5 years)
Chronic AIHA	Yes (positive for anti-red blood cell antibodies, C3d fragments and cold agglutinins)	
Coombs testing	Positive (high)	
Thrombocytopenia	Transient during a flare of AIHA	No
Platelet antibody	No	No
Neutropenia	No	No
Episodes of pancytopenia	No	No
Lymphadenopathy	Yes	Yes
Hepatosplenomegaly	Yes	Yes
GI disease	Recurrent noninfectious enteritis	IBD-like disease, biliary obstruction during hemolysis
Lung disease	No	No
Mouth sores	Mild episodes	Mild episodes
Tracheal/larynx sx	URTIs	URTIs
Hypogammaglobulinemia	Often lower IgG (correlating with CRP–infections)	Often lower IgG (correlating with CRP, SAA–infections)
Infections	HHV6, varicella and recurrent shingles, URTIs, <i>Salmonella enteritis</i> , <i>Clostridium enterocolitis</i>	URTIs, <i>Salmonella enteritis</i> , shingles
Skin and joints	Erythema nodosum	Erythema nodosum, polyarthritis
CNS	No symptoms or MRI findings	Multifocal ischemia characterized as SV-cPACNS with hemorrhagic transformation of ischemic stroke (11 years)
Therapy (duration)		
Corticosteroids	Since 6 years continuous PRD 0.2–2.5 mg/kg/day + methylprednisolone	Since 6 years continuous PRD 0.3–2.5 mg/kg/day + methylprednisolone
Other immunosuppression	Azathioprine (3–5 years)	
IVIg	HD-IVIg 2 × (7 years) + post rituximab substitution	
Rituximab	5 × 375 mg/m ² (8 years)	

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Patient	Patient A	Patient B
mTOR inhibition	Sirolimus—target levels of 10 µg/L (from 8 years)	
NSAIDs	–	Ibuprofen 1–2× daily (from 10 years)
anti-IL-1	–	Anakinra 100 mg daily (from 9 years)
Methotrexate	–	15 mg s.c. weekly (from 10 years)
Hydroxychloroquine	200 mg daily (from 12 years)	–
Supportive therapy	PPI, vit. D, anti-hypertensive therapy, antihistamines	PPI, TMP/SMX, zoledronate, vit. D, calcium, anti-hypertensive therapy
HSCT	–	MUD-HSCT (11 years)
T-cell clonality (highly abundant clones)		
Effector memory CD4+		CSVDTGTVYNEQFF (32.71%)
Effector memory CD8+	CASRDGKEVLEFF (6.25%)	CASSGLNTEAFF (31.85%); CSARDRDTEAFF (6.07%)

Note: Characterization of the newly identified variant with selected annotation by VEP and an overview of the clinical course of the disease in both twins, including the therapies, with their respective start and duration. Expanded T-cell clones exceeding 5% of all sequenced reads in the selected T-cell subpopulations displayed with their AA CDR3 sequence and their relative abundance.

was detected upon 6, 12, 18, and 24 h inhibition w/wo cycloheximide using flow cytometry.

2.9 | Activity of the TLR8^{G572V} variant

Human HEK-Blue Null1 cells (InvivoGen) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, normocin (50 µg/mL), and zeocin (100 µg/mL) (all from InvivoGen). NF-κB transcriptional activity was tested by the QUANTI-BLUE assay (InvivoGen). The HEK-Blue Null1 cell line was transfected with either TLR8^{WT} or TLR8^{G572V} (or TLR8^{D543A}) plasmids by transient transfection (Lipofectamine; Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Forty-eight hours post-transfection, the cells were seeded in a 96-well plate at a density of 30 000 cells/well and stimulated with 500 ng/mL or 1 µg/mL CL307, 100 ng/mL or 1 µg/mL CL075; 10, 25, 50, 100, or 500 ng/mL TL8-506; 5, 10, or 25 µg/mL imiquimod, 0.1 or 0.5 µg/mL gardiquimod (all from InvivoGen), and 100, 200, or 500 nM GS-9620 (Vesatolimod, MedChemExpress, Suite Q, Monmouth Junction, NJ) for 24 h. Then, 50 µL of the supernatant from each well was transferred to a 96-well plate with 150 µL of QUANTI-Blue solution (InvivoGen). The plate was incubated at 37°C for 1 h, and the secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) levels were determined by reading the plate with a spectrophotometer at 650 nm. Untransfected HEK-Blue Null1 cells served as a negative control for TLR8 activation, as these cells are nonresponsive to TLR8 ligands. Fold-change was calculated by normalizing individual data to the unstimulated O.D. of the untransfected well. Similarly, Human HEK-Blue TLR7 cells (InvivoGen) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, normocin (50 µg/mL), blasticidin (10 µg/mL), and zeocin (100 µg/mL) (all from InvivoGen). NF-κB transcriptional activity was tested using the QUANTI-BLUE assay (InvivoGen). The HEK-Blue TLR7 cell line was transfected by either TLR8^{WT} or TLR8^{G572V} plasmids, seeded in a 96-well plate 48 h

post-transfection and stimulated with the same ligands and doses as HEK-Blue Null1. The plate was incubated at 37°C for 1 h, and SEAP levels were determined by reading the plate with a spectrophotometer at 650 nm.

2.10 | Western blotting

Cells were lysed for 30 min on ice in lysis buffer (1% lauryl maltoside (Calbiochem, Merck), 20 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM iodoacetamide, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, and 2 mM EDTA (all from Sigma-Aldrich, Merck) containing 100× diluted Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem, Merck). The protein concentration was adjusted to a final concentration of 1 mg/mL using a bicinchoninic acid assay kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). Proteins were separated on SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA). Membranes were blocked at 8°C overnight in phosphate buffered saline (PBS) containing 7.5% low fat bovine milk and 0.05% Tween 20. Primary antibodies against TLR8 (clone D3Z6J, Cell Signaling Technologies) and β-actin (clone AC-74, Sigma-Aldrich, Merck) were used with peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and SuperSignal West Pico/Femto Chemiluminescent Substrates (Thermo Fisher Scientific). Signals were detected using a MINI HD6 scanner (UVITEC, Cambridge, UK) and analyzed with ImageJ software. TLR8 expression levels were normalized to those of β-actin.

2.11 | Immunophenotyping

Immunophenotyping of lymphocyte subpopulations was performed using the following antibody-fluorochrome conjugates: CD4-BV510, IgM-BV510, CD45RA-BV510, CD27-BV421, CD62L-BV421, CD8-FITC,

TABLE 2 Immunological findings

Cell population	Patient A	Patient B	Age-matched reference values
Leukocytes (cells/ μ L)	14 500	20 400	4500–14 500
Lymphocytes (cells/ μ L)	3720	6793	1300–7500
Neutrophils (cells/ μ L)	9490	11 444	1900–9700
Monocytes (cells/ μ L)	980	1958	0–1300
Eosinophils (cells/ μ L)	10	102	0–1000
Erythrocytes (cells/ μ L)	2 660 000	3 600 000	4 000 000–5 200 000
CD3+ T-cells (% lymphocytes; cells/ μ L)	84; 3125	86; 5842	60–76; 1200–2600
CD3+ CD4+ T-cells (% lymphocytes; cells/ μ L)	37; 1376	32; 2174	31–47; 650–1500
CD3+ CD8+ T-cells (% lymphocytes; cells/ μ L)	41; 1525	46; 3125	18–35; 370–1100
NK cells (% lymphocytes; cells/ μ L) (CD3-CD16+56+)	0.8; 29	1.2; 82	4–17; 100–480
Regulatory T-cells (% CD3+ T-cells) (CD4+CD25+CD127dim to -)	2.29	2.35	2.29–6.49
Naïve CD4+ (% CD4+ T-cells) (CD3+CD4+CD45RA+CD27+)	67	66	46–99
Central memory CD4+ (% CD4+ T-cells) (CD3+CD4+CD45RA-CD27+)	31	31	0.35–100
Effector memory CD4+ (% CD4+ T-cells) (CD3+CD4+CD45RA-CD27-)	1.8	1.6	0.27–18
Terminally diff. CD4 (% CD4+ T-cells) CD3+CD4+CD45RA+CD27-	0.2	0.1	0.0031–1.8
Th1 (% CD3+4+ T-cells) (CXCR3+CCR6-)	10.7	16.4	13.4–25.5
Th2 (% CD3+4+ T-cells) (CXCR3-CCR6-CCR4+CRTH2+)	0.23	0.37	0.19–1.33
Th17 (% CD3+4+ T-cells) (CXCR3-CCR6+)	5.82	5.83	3.53–12
Naïve CD8+ (% CD8+ T-cells) (CD3+CD8+CD45RA+CD27+)	80	83	16–100
Central memory CD8+ (% CD8+ T-cells) (CD3+CD8+CD45RA-CD27+)	4.1	3.7	1–6
Effector memory CD8+ (% CD8+ T-cells) (CD3+CD8+CD45RA-CD27-)	3.4	2	5–100
Terminally diff. CD8+ (% CD8+ T-cells) (CD3+CD8+CD45RA+CD27-)	10	9.5	15–41
% HLA-DR/CD3+CD4+ T-cells	3.4	3	N/A
% HLA-DR/CD3+CD8+ T-cells	8	6	N/A
Double negative CD4-CD8-T-cells (% TCR α cells)	3.9	4.3	<3.5
CD19+ B-cells (% lymphocytes; cells/ μ L)	9.6; 357	8.1; 550	13–27; 270–860
Naïve (% B-cells) (CD19+CD27-IgD+)	75	61	47.3–77
Transitionals (% B-cells) (CD19+CD27-CD24+ +CD38++)	19	6.4	4.6–8.3
Switched memory (% B-cells) (CD19+CD27+IgD-)	8.8	15	10.9–30.4
Marginal zone-like (% B-cells) (CD19+CD27+IgD+)	11	19	5.2–20.4
Plasmablasts (% B-cells) (CD19+CD27++CD38++)	0.1	1.1	0.6–5.3
CD21low (% B-cells) (CD19+CD21lowCD38low)	3.6	3.6	2.3–10
pDC (% leukocytes)	0.019	0.012	0.028–0.61
pDC (% DC)	8.18	6.63	9.59–58.8
mDC (% leukocytes)	0.16	0.11	0.057–0.34
mDC (% DC)	69	61.6	8.26–60

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

Cell population	Patient A	Patient B	Age-matched reference values
Immunoglobulins			
IgG (g/l)	7.68	8.27	7.05–11.9
IgA (g/l)	2.6	2.84	0.79–1.37
IgM (g/l)	5.3	3.75	0.47–1.73
Autoantibodies			
ANA (IgG, IgM, IgA)	Mildly positive in IgG	Negative	
ENA	Negative	Negative	
ANCA	Negative	Negative	
ds-DNA	Negative	Negative	
RF (IgG) (IU/mL)	31.1	33.6	0–22
RF (IgA) (IU/mL)	6.8	4	0–22
RF (IgM) (IU/mL)	>100	>100	0–22
Anti-tropomyosin	Positive in titer 1:320	Positive in titer 1:160	
Anti-endomysium (IgG, IgA)	Negative	Negative	
ASCA IgG (U/mL)	15.13	17.93	0–10
ASCA IgA (U/mL)	5.21	5.91	0–10
CIC (arb.units)	187	118	10–46
CRP (mg/L)	15.6	1.8	0–8

Note: Peripheral blood analyses from the time of first admission to the hemato-oncologic department (8 years of age). Bold numbers—values below the reference limit; Italic numbers—values above the reference limit.

IgD-FITC, CD5-PE, CD28-PerCP-Cy5.5, IgM-PerCP-Cy5.5, IgD-PerCP-Cy5.5, and HLA-DR-PerCP-Cy5.5 (Biolegend), CD38-FITC, CD16-PE, CD56-PE, CD4-PerCP-Cy5.5, TCR $\gamma\delta$ -PE-Cy7, CD3-APC, CD21-APC, and CD45-APC-H7 (BD), CD19-PE-Cy7, CD24-APC Alexa750, and CD8-APC-Alexa750 (BC), CD45RO-FITC and CD31-PE (Exbio), and CCR7-PE (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), Th1, Th2 and Th17 cells were determined using CD3-Alexa Fluor 700 (Exbio), CD8-V500 and CD45RA-APC-H7 (BD), CD4-BV650, CCR7-APC, CXCR3-PE, CCR6-BV605, CRTH2-FITC, and CCR4-BV421 (BioLegend), and Tregs using CD3-APC-H7, CD25-PE, and CD127-PE-CF594 (BD), CD4-Alexa Fluor 700 and CD19-APC (Exbio), and CD14-PE-Cy7 (BC). The immunophenotype of the DCs was detected using CD45-Pacific Blue (Dako, Glostrup, Denmark), CD3-FITC, CD16-FITC, CD19-FITC, CD20-FITC, CD56-FITC, CD14-PE-Dy594, and CD11c-APC (Exbio), HLA-DR-PE-Cy7 (BD), CD123-PE (Thermo Fisher Scientific), and subpopulations of monocytes with CD66c-FITC, CD13-PE, and CD33-PE-Cy7 (BC), HLA-DR-PerCP-Cy5.5 and CD11b-BV786 (Biolegend), CD45-APC-H7, IREM-2 (CD300e)-APC, CD15-V500 (BD), and CD16-Alexa Fluor 700 and CD14-Pacific Blue (Exbio). Data were collected with Canto II, Lyric, Aria II, or Aria III flow cytometers and analyzed with FlowJo software (BD).

2.12 | Intracellular staining

Whole blood samples or HEK293/T cells were fixed in 4% formaldehyde at room temperature for 10 min, permeabilized in 0.1% Triton X-100 in a water bath (37°C) for 15 min and frozen to –20°C in 10%

glycerol in FBS (all from Thermo Fisher Scientific). After thawing, the samples were washed in PBS. TLR8 expression was detected using TLR8-PE (clone S16018A, Biolegend) and TLR7 expression was detected using TLR7-PE antibody (clone 533 707, R&D Systems, Minneapolis, MN) in lymphocytes, monocytes, or granulocytes (identified by FSC, SSC, CD14-APC-H7 (BD), and CD4-BV421 (Biolegend)) or in HEK293/T cells. PBMC from patients and HCs were isolated using a Ficoll-Paque gradient (GE Healthcare, Chicago, IL), resuspended in RPMI 1640 (Lonza, Basel, Switzerland) complemented with 10% FBS and antibiotics (Thermo Fisher Scientific) and stimulated using gardiquimod (0.5 μ g/mL), imiquimod (10 μ g/mL), TL8-506 (25 ng/mL), or ssRNA40/LyoVec™ (5 μ g/mL, all from InvivoGen). After 5, 15, or 30 min in a water bath (37°C), the cells were fixed in 4% formaldehyde and permeabilized in 0.1% Triton X-100, and intracellular signaling was detected using anti-phospho-NF- κ B p65 (Ser536)-Alexa Fluor 647 or PE (93H1, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) in CD45+CD14+ monocytes (CD45-APC-H7 from BD and CD14-PB or PE from Exbio). The data were collected with an LSR II or Celesta flow cytometer and analyzed with FlowJo software (BD).

2.13 | Extracellular cytokine production

The Human Inflammatory Cytokine Kit (BD) was used for the detection of IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-10, and IL-12p70 in supernatants and patients' and healthy controls' plasma samples according to the manufacturer's instructions. The samples were acquired using a

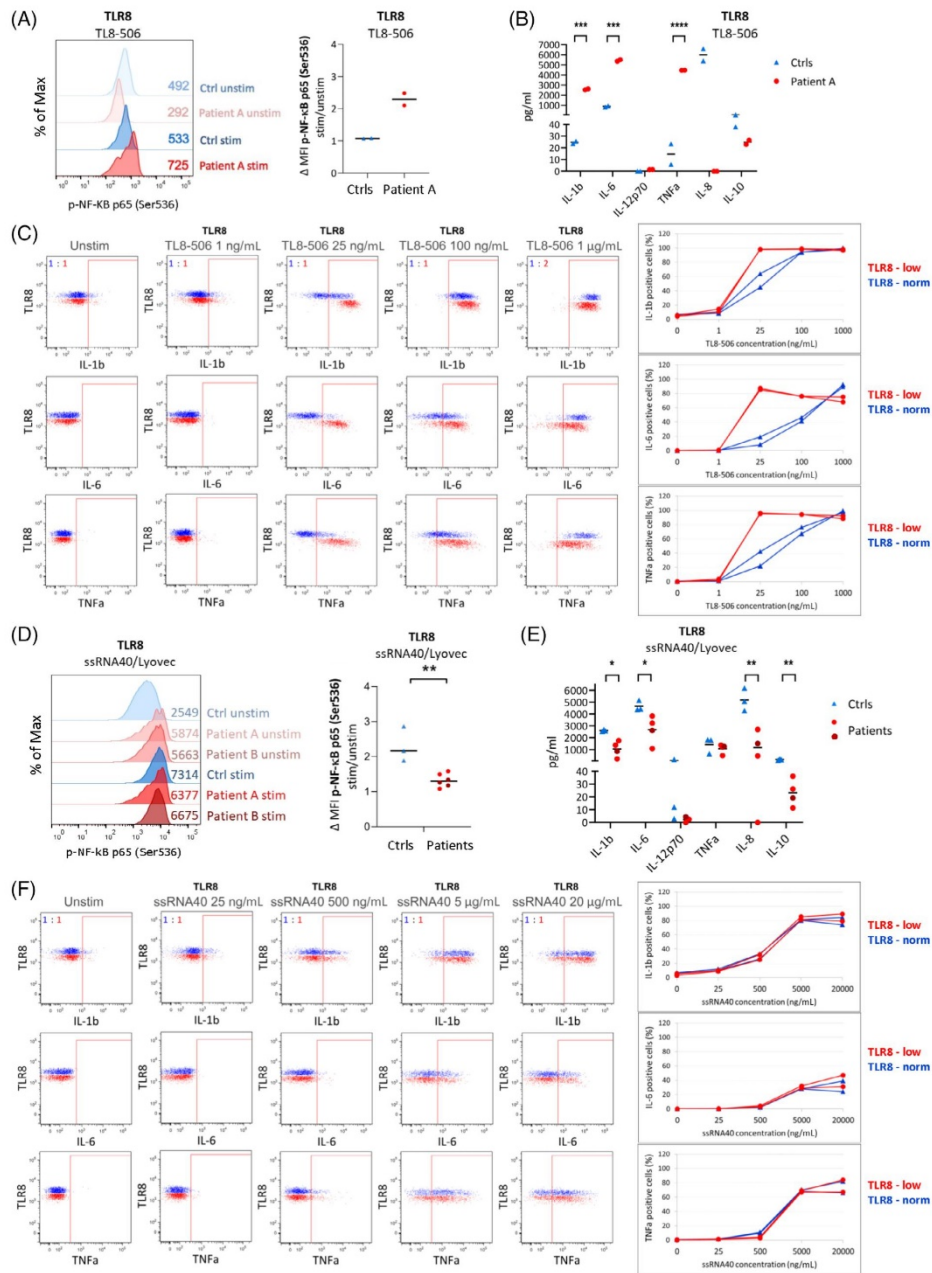


FIGURE 2 Legend on next page.

Celesta flow cytometer and analyzed with FlowJo software (BD). The Human Total IL-18/IL-1F4 Quantikine ELISA Kit (cat. DL180, R&D Systems), Human IFN γ Quantikine ELISA Kit (cat. DIF50, R&D Systems), and IFN Alpha ELISA Kit (cat. 41110-1, PBL Assay Science, Piscataway, NJ) were used for the detection of IL-18, IFN γ and IFN α respectively. The absorbance was measured at 450 nm and analyzed with a VERSAmax Tunable Microplate Reader with the appropriate SoftMaxPro software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

2.14 | Intracellular cytokine production

Whole blood was withdrawn into ammonium heparin collection tubes and diluted 1:1 with RPMI 1640 (Lonza) complemented with 10% FBS and antibiotics (Thermo Fisher Scientific). To test for cytokine expression in TLR8-positive and TLR8-low monocytes, 100 μ L samples were stimulated using gardiquimod (0.025–0.5 μ g/mL), imiquimod (0.025–10 μ g/mL), GS-9620 (50–1000 nM), ssRNA40/LyoVec™ (0.025–20 μ g/mL), or TL8-506 (1–1000 ng/mL) for 6–8 h in 37°C along with brefeldin A (50 μ g/mL, Sigma Aldrich, Merck). The surface markers were stained with HLA-DR-BV570 (Biolegend) and CD16-FITC (BC), the samples were fixed in 4% formaldehyde, permeabilized in 0.1% Triton X-100 and intracellular markers were detected using CD14-Pacific Blue or CD11c-Pacific Blue, and Lineage (CD3,19,20,56, CCR3)-FITC (Exbio), CD14-BV711, HLA-DR-BV605, TLR8-PE, IL-6-PE-Cy7, and IL-1 β -Alexa Fluor 647 (Biolegend), and TNF α -Alexa Fluor 700, CD123-PE-Cy5.5, and CD45-APC-H7 (BD). Data were collected with an LSR II flow cytometer and Aurora spectral cytometer (Cytek Biosciences, Fremont, CA) and analyzed with FlowJo software (BD).

2.15 | Statistical analysis

Unpaired t-test for single comparison was used; p-value less than .05 was considered significant.

3 | RESULTS

We report a family with two male monozygotic twins who inherited a novel missense mutation c.1715G>T in the *TLR8* gene located on the X chromosome from their mother (Figure 1A); both siblings developed

severe chronic AIHA with lymphoproliferative and progressive auto-inflammatory disease. Their disease manifested as corticoid-dependent AIHA at the age of 6 and 2.5 years (in twin A and B, respectively), refractory to second (Intravenous Immunoglobulins, IVIG) and third (azathioprine) line of therapeutics. The bouts of AIHA were induced by frequent respiratory and gastrointestinal infections (e.g., salmonellosis) and, eventually, also by fevers of unknown origin with elevated laboratory markers of inflammation. Both twins were referred to hemato-oncologic department at the age of 8 years, presenting with marked hepatosplenomegaly and cervical lymphadenopathy. The AIHA activity was characterized by high titers of anti-erythrocyte antibodies (IgG in twin A; IgM and IgG in twin B), C3d complement fragments and cold agglutinins (genetic characterization, extended clinical features and results of T-cell repertoire sequencing are summarized in Table 1, blood analyses in Table 2). In attempts to control the AIHA, rituximab (4 \times 375 mg/m²), followed by sirolimus were used in both patients, which enabled partial steroid detraction. Twin B, however, continued to suffer attacks of fever and developed autoinflammatory organ symptoms (polyarthritis, IBD-like enteropathy, and erythema nodosum). Anti-IL-1 (Anakinra), and eventually, methotrexate were added to his therapy. Despite the combined anti-inflammatory treatment, multifocal CNS vasculitis suddenly manifested with acute hemiparesis and aphasia due to the CNS hemorrhage at the age of 11 years (Figure 1B). This life-threatening event prompted the indication of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from a matched unrelated donor after a myeloablative conditioning regimen. The post-transplant course was complicated by slow immunological reconstitution, reactivation of cytomegalovirus, adenovirus and EBV requiring prolonged antiviral therapy and thrombocytopenia corrected by eltrombopag. One year after HSCT, complete donor chimerism was achieved and no signs of graft-versus-host disease were present on tapering doses of steroids and cyclosporine A. Twin A continued to experience attacks of fever with panniculitis despite combined corticosteroid and sirolimus treatment. Therefore, hydroxychloroquine was added to the therapeutic regimen, resulting in marked clinical improvement after 1 month, enabling gradual cessation of corticosteroid therapy. Interestingly, the patients' mother has a history of polyarthritis and steroid-sensitive antiphospholipid syndrome.

TLR8 forms a homodimer that undergoes a conformation change upon ligand binding activating its downstream signaling. The c.1715G>T mutation leads to a substitution of glycine with valine at position 572 (p.G572V) in leucine-rich repeat (LRR) 18 in proximity to the first ligand-binding site^{25–27} (Figure 1C,D) and could, therefore, affect the TLR8 activity.

FIGURE 2 The response of patients' cells to diverse TLR8 ligands. Phosphorylation (p-) of NF- κ B p65 (Ser536) in monocytes (A) and production of pro-inflammatory cytokines from PBMCs upon stimulation with chemical TLR8 ligand TL8-506 (25 ng/mL) (B). Production of proinflammatory cytokines from mother's TLR8-low and TLR8-norm (healthy) cells upon stimulation with chemical TLR8 ligand TL8-506 (C). Phosphorylation of NF- κ B p65 (Ser536) in monocytes (D) and production of pro-inflammatory cytokines from PBMC upon stimulation with TLR8 ligand ssRNA40/Lyovec (5 μ g/mL) (E). Production of proinflammatory cytokines from mother's TLR8-low and TLR8-nom (healthy) cells upon stimulation with TLR8 ligand ssRNA40/Lyovec (F). Data acquired in two (A, B, C, F) and three (D, E) independent experiments, mean \pm SEM. Histograms and dot plots show representative data, the gates indicate positivity for respective cytokine according to unstimulated state, MFI in numbers. *p < .05, **p < .005 (unpaired t-test)

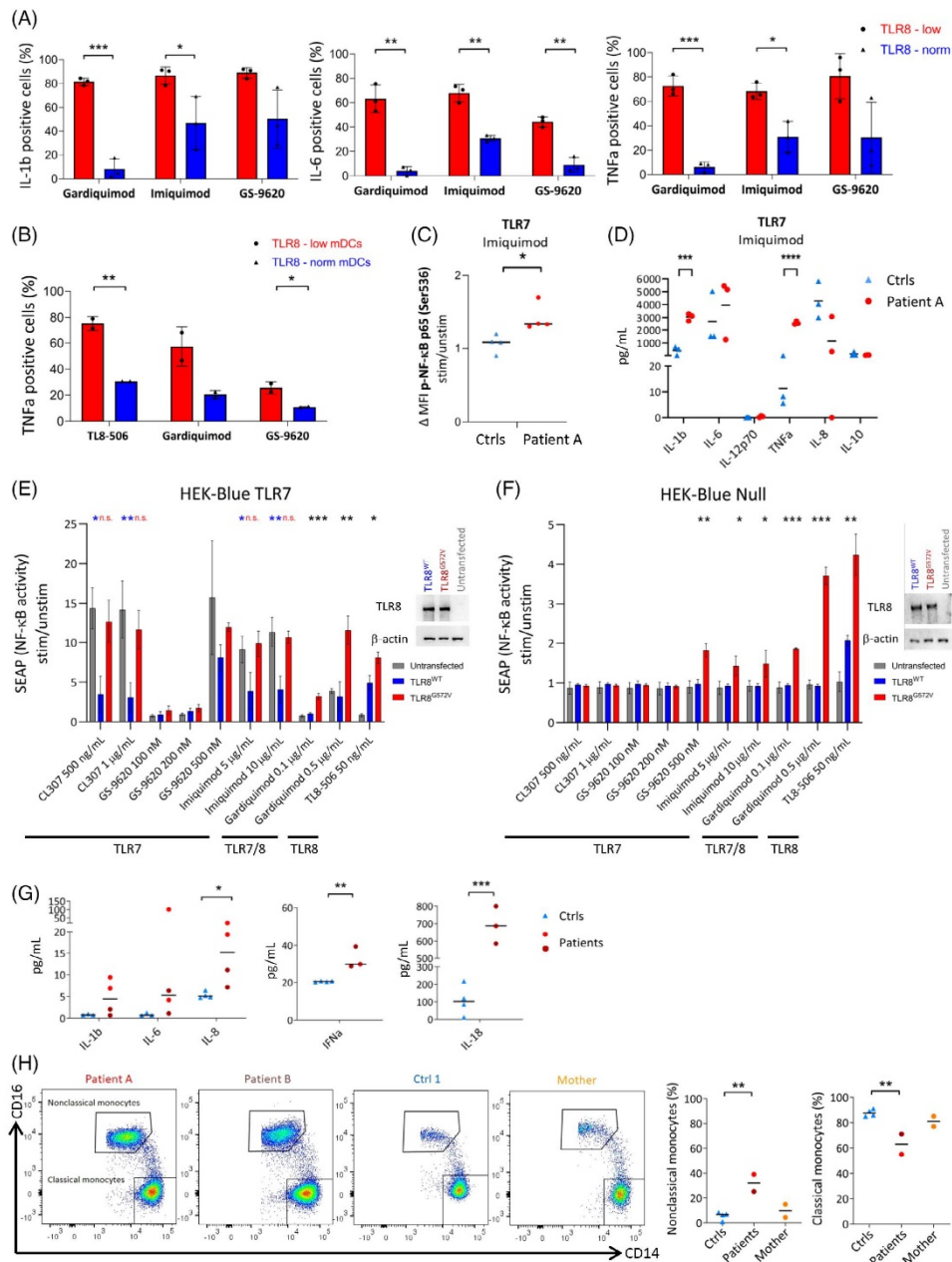


FIGURE 3 Legend on next page.

Once the wild-type TLR8 (TLR8^{WT}) and mutant TLR8 (TLR8^{G572V}) were transiently expressed in HEK-Blue TLR7/8-Null cells and stimulated with base analogs TL8-506 and CL075, TLR8^{G572V} showed increased NF- κ B transcriptional activity compared to TLR8^{WT} (Figure 1E). However, TLR8 protein levels were half that of the healthy controls in the patients' cells (Figure 1F). An unexpected observation was made in the mother, whose cells could be separated into two populations based on TLR8 protein levels; a higher one (as controls) and a lower one (as the patients), due to random inactivation of the X chromosome bearing the c.1715G>T mutation (Figure 1F,G). We speculated that mRNA level or protein stability could be affected by the mutation. The TLR8 mRNA levels were not significantly different in sorted monocytes of both twins compared to healthy controls (Figure 1H). However, upon transient transfection of TLR8^{WT} and TLR8^{G572V} into HEK293/T cells and stopping the proteosynthesis with cycloheximide, the mutant TLR8^{G572V} protein was degraded more rapidly compared to TLR8^{WT} (Figure 1I). Intriguingly, various TLR8 ligands elicited different responses. Chemical compounds, such as TL8-506 or CL075, bind only at site 1, enabling strong non-physiological TLR8 activation.²⁷ Stimulation with TL8-506 increased phospho- (p)-NF- κ B and proinflammatory cytokine production in the patients' peripheral blood mononuclear cells (PBMCs, Figure 2A,B) and, consistently, in the mother's TLR8-low monocytes compared to her TLR8-norm monocytes (Figure 2C). However, ssRNA40 (which better mimics viral/bacterial RNA and requires two binding sites to physiologically activate TLR8²⁶) did not trigger this hyperactivation (Figure 2D–F). Moreover, both the patients' and the mother's TLR8-low cells responded more to TLR7 ligands. We observed increased production of the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF α by the mother's TLR8-low monocytes (Figure 3A) (similarly by her TLR8-low mDCs, Figure 3B) as well as enhanced p-NF- κ B in the patients' monocytes (Figure 3C) and cytokine production in the patients' PBMCs (Figure 3D). Of note, TLR7 gene, and basal TLR7 mRNA/protein levels were not affected. This suggests that mutant TLR8^{G572V} could impair the interaction with TLR7^{9,28} and skew the TLR8^{G572V}/TLR7 balance towards TLR7,⁹ manifesting as a TLR7-dependent autoinflammatory phenotype. As expected, transient co-expression of TLR8^{G572V} or TLR8^{WT} with TLR7 in HEK-Blue TLR8-TLR7+ cells led to attenuation of TLR7 signaling in TLR8^{WT}-transfected cells,^{7,9} but not in TLR8^{G572V}-transfected cells (Figure 3E). Moreover, TLR8^{G572V} cross-reacted to diverse TLR7 ligands in comparison to TLR8^{WT} in HEK-Blue TLR8-TLR7- cells (Figure 3F).

The dysregulation of TLR7 and TLR8 is well described in murine models where TLR8 deficiency causes TLR7-driven autoantibody production and glomerulonephritis¹⁶; structural studies also showed that TLR8 mutations near ligand binding site 1 skewed the affinity to TLR7 ligands¹⁰; however, little is known about these phenomena in humans. In this study, the patients presented with a partial TLR8 protein deficiency, with mutant TLR8^{G572V} that did not impair TLR7 signaling and cross-responded to diverse TLR7 ligands. This imbalance between mutant TLR8^{G572V} and TLR7 introduced a bias towards TLR7-dependent pro-inflammatory signaling. The successful use of hydroxychloroquine in twin A indirectly supports our findings.

Since TLR8 and TLR7 act in a balance to recognize ssRNA of external pathogens as well as endogenous ssRNA within immune complexes,^{11,12} their imbalance may lead to pathological responses to microbes and drive autoinflammation. Indeed, both twins suffered from frequent enteritis and fevers and their AIHA worsened with infections. We found increased levels of multiple pro-inflammatory cytokines, type I interferons (Figure 3G), and increased counts of pro-inflammatory nonclassical monocytes²⁹ in their peripheral blood (Figure 3H).

4 | DISCUSSION

The disparity in the disease severity between twin A and B is intriguing. It may be explained by different spectrum of pathogens encountered by the siblings, which may have revealed diverse autoantigens driving the severity of autoinflammatory phenomena. Interestingly, the disturbed recognition of autoantigens (self-nucleic acids) by endosomal TLRs contributes to the pathogenesis of SLE,¹¹ which may present with corresponding clinical features to those of our patients (AIHA, fevers, arthritis, and CNS vasculitis).³⁰ Both twins also had high plasma levels of autoantibodies, and increased double-negative TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-T-cells (Table 2), which are associated with autoimmunity. The development of autoimmunity can be intrinsic and/or extrinsic. Regulatory T-cells could be affected directly by TLR8 mutation³¹ or indirectly by an inflammatory environment.³² Moreover, dys-regulated TLRs can affect the activity of antigen-presenting cells similar to a murine model of SLE with TLR8 deficiency and thus drive T-cell proliferation.³³ Hypothetically, the activated T-cells might also include autoreactive clones, which would subsequently activate autoreactive B-cells. Interestingly, both patients presented with

FIGURE 3 Imbalance in activation induced by TLR7 agonists in patients' cells and cellular models, and inflammatory phenotypes in patients' peripheral blood. Production of proinflammatory cytokines from mother's TLR8-low and TLR8-norm (healthy) monocytes (A) and mDCs (B) upon stimulation with TLR7 ligands Imiquimod (10 μ g/mL) and GS-9620 (Vesatolimod, 500 nM), or TLR7/8 ligand Gardiquimod (0.5 μ g/mL). Phosphorylation of NF- κ B p65 (Ser536) in monocytes (C) and production of pro-inflammatory cytokines from PBMC upon stimulation with TLR7 ligand Imiquimod (10 μ g/mL) (D). Impaired inhibitory effect of mutant TLR8^{G572V} on TLR7 signaling compared to TLR8^{WT}. Black asterisks indicate significance between TLR8^{WT} and mutant TLR8^{G572V}; blue asterisks indicate significance between untransfected cells and TLR8^{WT}-transfected cells; comparison between untransfected cells and TLR8^{G572V}-transfected cells is in red (E). TLR8^{G572V} gain-of-function upon TLR8 stimulation (TL8-506) and upon TLR7 stimulation (GS-9620, Imiquimod) (F). Cytokine levels in patients' and controls' peripheral blood plasmas (G). Enriched nonclassical monocytes (CD45+CD66c-CD13+HLA-DR+IREM-2+CD14dimCD16+) in patients' monocytes pool (H). Data acquired in three (A, C, D, E, F, G) and two (B, H) independent experiments, mean \pm SEM. Histograms, dot plots and WB show representative data. * p < .05, ** p < .005, *** p < .0005, **** p < .0001 (unpaired t -test)

oligoclonality and expanded clonotypes within their effector T-cells subsets (Table 1). In summary, we show the first human partial TLR8 protein deficiency, which manifests as complex autoimmune and autoinflammatory phenotypes. The mutation causes TLR8 cross-reactivity to TLR7 ligands and leads to dysregulation of TLR8 and TLR7 responses. Finally, we propose the inclusion of partial TLR8 protein deficiency with TLR8/TLR7 dysregulation in the classification of Inborn Errors of Immunity.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was performed in accordance with the recommendations of the Second Faculty of Medicine Ethics Committee Guidelines and the Declaration of Helsinki. We are especially grateful to the patients and their parents for giving us consent to perform all research activities associated with the disease and to publish the results. We also kindly acknowledge Nermina Saucier, Katerina Rejlava, and Pavel Semerak for their technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare that they have no competing interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Martina Fejtikova and Veronika Kanderova designed, performed, and analyzed the ex vivo and in vitro experiments and immunophenotyping. Martina Sukova cared for the patients and provided clinical data. Michael Svaton and Eva Fronkova designed, performed, and analyzed the genetic tests. David Jakubec performed structural analyses. Jahnvi Aluri, Katerina Hlozkova, and Karolina Skvarova Kramarzova designed the in vitro cellular model and performed and analyzed the in vitro experiments. Michaela Novakova, Adam Klocperk, Zuzana Parackova, and Anna Sediva contributed to the immunological characterization of the patients and analyzed the ex vivo experiments. Marketa Rackova and Marina Bakardjeva performed in vitro and ex vivo experiments. Tomas Kalina, Marketa Bloomfield, and Ondrej Hrusak supervised the study, reviewed the manuscript and provided comments. Martina Sukova, Petr Sedlacek, Hana Malcova, Zuzana Liba, Martin Kudr, and Jan Stary provided medical care, critically reviewed the manuscript and provided comments. Veronika Kanderova, Michael Svaton, and Megan A. Cooper designed the project and supervised the research. Martina Fejtikova, Veronika Kanderova, and Michael Svaton wrote the manuscript. All of the authors provided critical input and agreed to this publication.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

ORCID

Martina Fejtikova <https://orcid.org/0000-0002-6417-4486>

Karolina Skvarova Kramarzova <https://orcid.org/0000-0003-4860-7453>

Marketa Rackova <https://orcid.org/0000-0002-2991-8873>

Marina Bakardjeva <https://orcid.org/0000-0002-5919-6306>

Marketa Bloomfield <https://orcid.org/0000-0001-5330-9341>

Adam Klocperk <https://orcid.org/0000-0002-1526-4557>

Zuzana Parackova <https://orcid.org/0000-0002-2398-532X>

Anna Sediva <https://orcid.org/0000-0001-7730-2304>

Michaela Novakova <https://orcid.org/0000-0003-2964-5956>

Tomas Kalina <https://orcid.org/0000-0003-4475-2872>

Michael Svaton <https://orcid.org/0000-0003-2966-3687>

Veronika Kanderova <https://orcid.org/0000-0001-8513-1066>

REFERENCES

- Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, et al. Clinical features and outcome of patients with Irak-4 and MyD88 deficiency. *Medicine*. 2010; 89(6):403-425. doi:10.1097/MD.0b013e3181fd8ec3
- Aluri J, Bach A, Kaviany S, et al. Immunodeficiency and bone marrow failure with mosaic and germline TLR8 gain of function. *Blood*. 2021; 137(18):2450-2462. doi:10.1182/blood.2020009620
- Farrugia M, Baron B. The role of toll-like receptors in autoimmune diseases through failure of the self-recognition mechanism. *Int J Inflam*. 2017;2017:1-12. doi:10.1155/2017/8391230
- Eigenbrod T, Pelka K, Latz E, Kreikemeyer B, Dalpke AH. TLR8 senses bacterial RNA in human monocytes and plays a nonredundant role for recognition of streptococcus pyogenes. *J Immunol*. 2015;195(3): 1092-1099. doi:10.4049/jimmunol.1403173
- Bender AT, Tzvetkov E, Pereira A, et al. TLR7 and TLR8 differentially activate the IRF and NF- κ B pathways in specific cell types to promote inflammation. *ImmunoHorizons*. 2020;4(2):93-107. doi:10.4049/immunoHorizons.2000002
- Asano T, Boisson B, Onodi F, et al. X-linked recessive TLR7 deficiency in ~1% of men under 60 years old with life-threatening COVID-19. *Sci Immunol*. 2021;6(62). doi:10.1126/sciimmunol.abl4348
- de Marcken M, Dhaliwal K, Danielsen AC, Gautron AS, Dominguez-Villar M. TLR7 and TLR8 activate distinct pathways in monocytes during RNA virus infection. *Sci Signal*. 2019;12(605):eaaw1347. doi: 10.1126/scisignal.aaw1347
- Larange A, Antonios D, Pallardy M, Kerdine-Romer S. TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *J Leukoc Biol*. 2009;85(4):673-683. doi:10.1189/jlb.08.08504
- Wang J, Shao Y, Bennett TA, Shankar RA, Wightman PD, Reddy LG. The functional effects of physical interactions among toll-like receptors 7, 8, and 9. *J Biol Chem*. 2006;281(49):37427-37434. doi: 10.1074/jbc.M605311200
- Zhang Z, Ohto U, Shibata T, et al. Structural analyses of toll-like receptor 7 reveal detailed RNA sequence specificity and recognition mechanism of agonistic ligands. *Cell Rep*. 2018;25(12):3371-3381.e5. doi:10.1016/j.celrep.2018.11.081
- Lee PY, Kumagai Y, Li Y, et al. TLR7-dependent and Fc γ R-independent production of type I interferon in experimental mouse lupus. *J Exp med*. 2008;205(13):2995-3006. doi:10.1084/jem.20080462
- Hoffmann MH, Skriner K, Herman S, et al. Nucleic acid-stimulated antigen-presenting cells trigger T cells to induce disease in a rat transfer model of inflammatory arthritis. *J Autoimmun*. 2011;36(3-4):288-300. doi:10.1016/j.jaut.2011.02.007
- Guiducci C, Gong M, Cepika A-M, et al. RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. *J Exp med*. 2013; 210(13):2903-2919. doi:10.1084/jem.20131044
- Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, et al. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity*. 2007;27(5):801-810. doi:10.1016/j.immuni.2007.09.009
- Fairhurst A, Hwang S, Wang A, et al. Yaa autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7. *Eur J Immunol*. 2008;38(7): 1971-1978. doi:10.1002/eji.200838138

16. Demaria O, Pagni PP, Traub S, et al. TLR8 deficiency leads to autoimmunity in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(10):3651-3662. doi:10.1172/JCI42081
17. Desnues B, Macedo AB, Roussel-Queval A, et al. TLR8 on dendritic cells and TLR9 on B cells restrain TLR7-mediated spontaneous autoimmunity in C57BL/6 mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(4):1497-1502. doi:10.1073/pnas.1314121111
18. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324
19. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res*. 2012;22(3):568-576. doi:10.1101/gr.129684.111
20. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079. doi:10.1093/bioinformatics/btp352
21. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, et al. Human inborn errors of immunity: 2019 update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol*. 2020;40(1):24-64. doi:10.1007/s10875-019-00737-x
22. Sobreira N, Schietecatte F, Valle D, Hamosh A. GeneMatcher: A Matching Tool for Connecting Investigators with an Interest in the Same Gene. *Human Mutation*. 2015;36(10):928-930. doi:10.1002/humu.22844
23. Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, et al. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia*. 2019;33(9):2241-2253. doi:10.1038/s41375-019-0496-7
24. Bystry V, Reigl T, Krejci A, et al. ARResT/interrogate: an interactive immunoprofiler for IG/TR NGS data. *Bioinformatics*. 2016;33(3):435-437. doi:10.1093/bioinformatics/btw634
25. Tanji H, Ohto U, Motoi Y, Shibata T, Miyake K, Shimizu T. Auto-inhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of toll-like receptor 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(11):3012-3017. doi:10.1073/pnas.1516000113
26. Tanji H, Ohto U, Shibata T, et al. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22(2):109-115. doi:10.1038/nsmb.2943
27. Tanji H, Ohto U, Shibata T, Miyake K, Shimizu T. Structural reorganization of the toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science*. 2013;339(6126):1426-1429. doi:10.1126/science.1229159
28. Itoh H, Tatematsu M, Watanabe A, et al. UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling. *PLoS One*. 2011;6(12):e28500. doi:10.1371/journal.pone.0028500
29. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-classical monocytes display inflammatory features: validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. *Sci Rep*. 2015;5(July):1-14. doi:10.1038/srep13886
30. Bundhun PK, Kumari A, Huang F. Differences in clinical features observed between childhood-onset versus adult-onset systemic lupus erythematosus. *Medicine*. 2017;96(37):e8086. doi:10.1097/MD.00000000000008086
31. Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, et al. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science*. 2005;309(5739):1380-1384. doi:10.1126/science.1113401
32. La Cava A. Tregs are regulated by cytokines: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2008;8(1):83-87. doi:10.1016/j.autrev.2008.08.002
33. Tran NL, Manzin-Lorenzi C, Santiago-Raber ML. Toll-like receptor 8 deletion accelerates autoimmunity in a mouse model of lupus through a toll-like receptor 7-dependent mechanism. *Immunology*. 2015;145(1):60-70. doi:10.1111/imm.12426

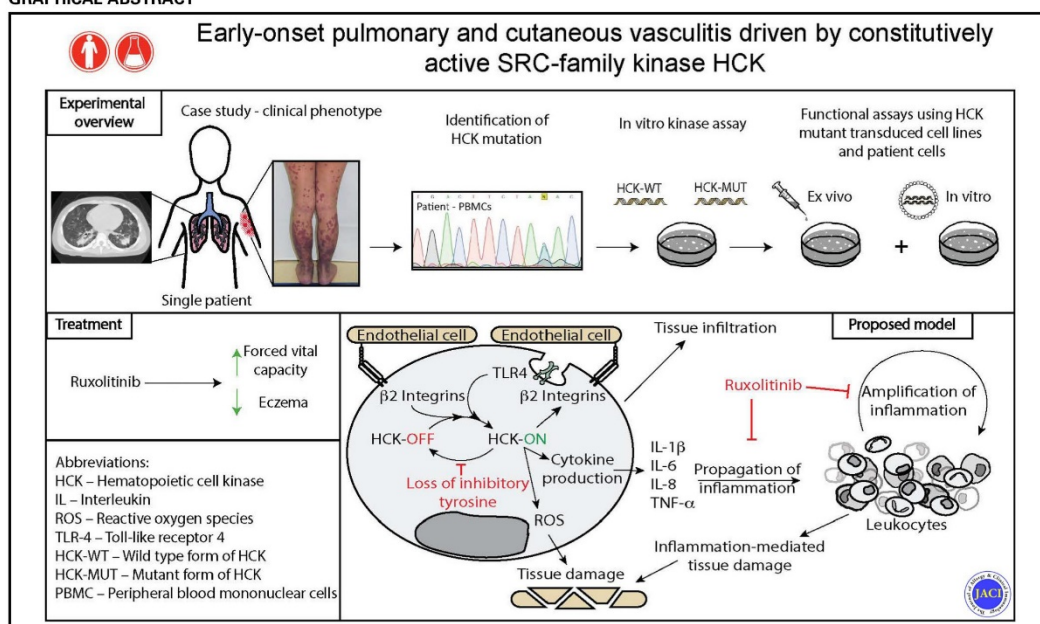
How to cite this article: Fejtкова M, Sukova M, Hložková K, et al. TLR8/TLR7 dysregulation due to a novel TLR8 mutation causes severe autoimmune hemolytic anemia and autoinflammation in identical twins. *Am J Hematol*. 2022;1-14. doi:10.1002/ajh.26452

Brief report

Early-onset pulmonary and cutaneous vasculitis driven by constitutively active SRC-family kinase HCK

Veronika Kanderova, PhD,^{a*} Tamara Svobodova, MD, PhD,^{b*} Simon Borna, PhD,^{c*} Martina Fejtikova, MSc,^a Vendula Martinu, MD, PhD,^b Jana Paderova, PhD,^d Michael Svaton, MD,^a Jarmila Kralova, PhD,^e Eva Fronkova, MD, PhD,^a Adam Kloperk, MD, PhD,^g Stepanka Pruhova, MD, PhD,^b Min Ae Lee-Kirsch, MD,^f Ludmila Hornofova, MD,^g Miroslav Koblizek, MD,^g Petr Novak, PhD,^h Olga Zimmermannova, MD, PhD,^a Zuzana Parackova, PhD,^e Anna Sediva, MD, PhD,^g Tomas Kalina, MD, PhD,^a Ales Janda, MD, PhD,ⁱ Jana Kayserova, MD, PhD,^j Marcela Dvorakova, MD,^k Milan Macek, MD, PhD,^d Petr Pohunek, MD, PhD,^b Petr Sedlacek, MD, PhD,^a Ashleigh Poh, PhD,^{l,m} Matthias Ernst, PhD,^{l,m} Tomas Brdicka, PhD,^o Ondrej Hrusak, MD, PhD,^{a,†} and Jan Lebl, MD, PhD^{b,‡}
 Prague and Vestec, Czech Republic; Dresden and Ulm, Germany; and Melbourne, Australia

GRAPHICAL ABSTRACT



From ^aCLIP-Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Pediatric Haematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, and University Hospital Motol, Prague; ^bthe Department of Pediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, and University Hospital Motol, Prague; ^cthe Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Prague; ^dthe Department of Biology and Medical Genetics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, and University Hospital Motol, Prague; ^ethe Department of Immunology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, and University Hospital Motol, Prague; ^fMolecular Pediatrics, University Hospital Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Dresden; ^gthe Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, and University Hospital Motol, Prague; ^hthe Biotechnology and Biomedicine Center of the Academy of Sciences and Charles University, Institute of

Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Vestec; ⁱthe Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, University Medical Center Ulm, Ulm; ^jthe Department of Pediatrics, Horovice Hospital, Horovice; ^kthe Department of Radiology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, and University Hospital Motol, Prague; ^lthe School of Cancer Medicine, La Trobe University, Melbourne; and ^mthe Olivia Newton-John Cancer Research Institute, Melbourne.

*These authors contributed equally to this work.

‡These authors jointly directed this work.

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (grant no. NV19-05-00332). E.F. and M.S. were supported by grant number PRIMUS/17/MED/11, and S.B. and M.F. were supported by the Charles University Grant Agency (grant nos. GAUK 1034216 and 362119). S.B., J.K., and T.B. were supported by

Background: Inborn errors of immunity are genetic disorders characterized by various degrees of immune dysregulation that can manifest as immune deficiency, autoimmunity, or autoinflammation. The routine use of next-generation sequencing in the clinic has facilitated the identification of an ever-increasing number of inborn errors of immunity, revealing the roles of immunologically important genes in human pathologies. However, despite this progress, treatment is still extremely challenging.

Objective: We sought to report a new monogenic autoinflammatory disorder caused by a *de novo* activating mutation, p.Tyr515*, in hematopoietic cell kinase (HCK). The disease is characterized by cutaneous vasculitis and chronic pulmonary inflammation that progresses to fibrosis.

Methods: Whole-exome sequencing, Sanger sequencing, mass spectrometry, and western blotting were performed to identify and characterize the pathogenic *HCK* mutation. Dysregulation of mutant *HCK* was confirmed *ex vivo* in primary cells and *in vitro* in transduced cell lines.

Results: Mutant *HCK* lacking the C-terminal inhibitory tyrosine Tyr522 exhibited increased kinase activity and enhanced myeloid cell priming, migration and effector functions, such as production of the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α , and production of reactive oxygen species. These aberrant functions were reflected by inflammatory leukocyte infiltration of the lungs and skin. Moreover, an overview of the clinical course of the disease, including therapies, provides evidence for the therapeutic efficacy of the Janus kinase 1/2 inhibitor ruxolitinib in inflammatory lung disease.

Conclusions: We propose *HCK*-driven pulmonary and cutaneous vasculitis as a novel autoinflammatory disorder of inborn errors of immunity. (J Allergy Clin Immunol 2021;■■■:■■■-■■■.)

Key words: SRC-family kinase, hematopoietic cell kinase, inborn error of immunity, pulmonary hemorrhage, cutaneous vasculitis, autoinflammation, inflammatory cytokines, reactive oxygen species, ruxolitinib

INTRODUCTION

To minimize the negative side effects of inflammation, immune cell signal transduction requires precise regulation. Many crucial leukocyte signaling molecules contain molecular switches that control their activity and prevent inappropriate proinflammatory

institutional funding from the Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences (grant no. RVO 68378050). P.N. was supported by institutional funding from the Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences (grant no. RVO 61388971) and the Ministry of Education of the Czech Republic (MEYS, program "NPU II," project LQ1604). M.A.L.-K. was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (German Research Foundation, grant no. 369799452/404459235). The research facilities at the 2nd Faculty of Medicine, Charles University, and University Hospital Motol were supported by projects for the conceptual development of research organization (grant nos. 00064203 and LO1604), and the infrastructure was supported by grant number CZ.2.16/3.1.00/24505. We also acknowledge the Flow Cytometry and Light Microscopy Core Facility, IMG CAS, Prague, Czech Republic, supported by MEYS (grant nos. LM2018129 and CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001775), OPPK (grant no. CZ.2.16/3.1.00/21547), and MEYS (grant no. LO1419), for its support with flow cytometric analysis and sorting, and we acknowledge the Centre of Molecular Structure Core Facility at BIOCEV, a structural mass spectrometry facility funded by the European Regional Development Funds (grant no. CZ.1.05/1.1.00/02.0109

Abbreviations used

CD: Cluster of differentiation
HCK: Hematopoietic cell kinase
MUT: Mutant
p: Phosphorylated
SFK: SRC-family kinase
Tyr: Tyrosine
WT: Wild-type

signaling from causing tissue damage. In SRC-family kinase (SFK) members, this switch relies on the C-terminal tyrosine, the phosphorylation of which promotes acquisition of an auto-inhibited conformation with downregulation of kinase activity.^{1,2} The essential role of the C-terminal tyrosine has been demonstrated in a murine model in which the inhibitory tyrosine of the SFK hematopoietic cell kinase (HCK) was substituted with phenylalanine (Hck^{F/F}). These mice exhibited enhanced *HCK* activity, myeloid cell priming, migration, and cytokine production and spontaneously developed lung pathology characterized by mononuclear and eosinophilic cell infiltration, resulting in pulmonary inflammation and fibrosis.³ Here, we describe the first patient with a *de novo* mutation in *HCK* leading to loss of the inhibitory tyrosine (Tyr)522 and causing myeloid cell activation; the patient developed pulmonary inflammation and, in contrast to murine models, also developed cutaneous vasculitis. Our findings enable the translation of the knowledge obtained from the murine model to human biology, underline the central role of *HCK* in proinflammatory processes associated with human lung pathology, and shed new light on previous findings demonstrating an association of *HCK* polymorphisms and expression with chronic obstructive pulmonary disease.^{4,5} Moreover, we provide a rationale for the treatment of pulmonary inflammation with *HCK* inhibitors, which are being developed for cancer therapy.^{6,7} Because these drugs are not approved for clinical use, we sought alternative therapeutic approaches. Among them, treatment with the Janus kinase 1/2 inhibitor ruxolitinib was the most beneficial and partially stabilized the patient's lung functions.

For detailed methods, please see the [Methods](#) section in this article's Online Repository at www.jacionline.org.

RESULTS AND DISCUSSION

We report a 17-year-old female patient from a healthy family. Her disease manifested 5 hours after birth, with petechial skin

BIOCEV) and supported by the Czech Infrastructure for Integrative Structural Biology (grant no. LM2018127 CIISB for CMS BIOCEV funded by MEYS CR), for its support with mass spectrometry analysis.

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication January 15, 2021; revised July 22, 2021; accepted for publication July 30, 2021.

Corresponding author: Ondrej Hrusak, MD, PhD, Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, and University Hospital Motol, V Uvalu 84, 15006, Prague 5, Czech Republic. E-mail: ondrej.hrusak@lfmotol.cuni.cz
0091-6749/\$36.00

© 2021 Published by Elsevier Inc. on behalf of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.07.046>

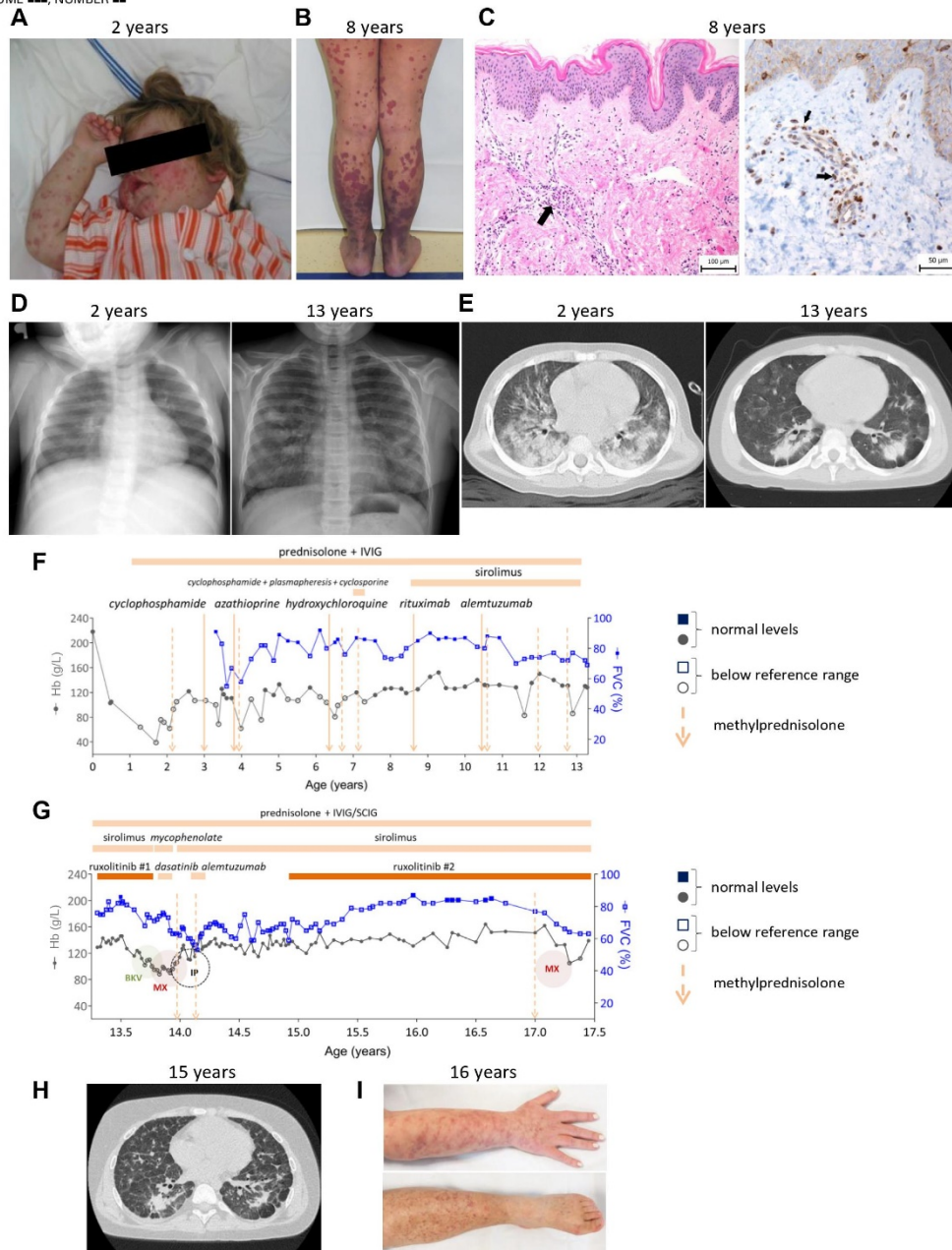


FIG 1. Clinical manifestation and the effect of targeted therapy. **A** and **B**, Skin involvement on the face and limbs. **C**, Skin biopsy showing dermis with perivascular infiltration (arrow) composed mainly of neutrophils and macrophages and their spread to the interstitium; hematoxylin-eosin, 200 \times (left). Macrophages in the inflammatory infiltrate in dermis (arrows) are positive for total phosphotyrosine (brown). The epithelium shows weak positivity for total phosphotyrosine; immunohistochemical detection, antibody clone P-Tyr-01, 400 \times (right). **D**, Chest X-ray showing evolving interstitial disease. **E**, CT scan of the lungs revealing ground-glass opacities and incipient consolidative changes. Time course of medications (**F**) before and (**G**) after identification of the *HCK c.1545C>A* mutation. **H**, Lung CT scan showing ground-glass opacities and diffuse interlobular septal thickening. **I**, Skin involvement on the limbs during the second ruxolitinib administration. *BKV*, BK virus; *CT*, computed tomography; *FVC* (blue), forced vital capacity (% for the given height category; normal values, 84-110); *Hb* (gray), hemoglobin; *IP*, interstitial pneumonia; *MX*, *Mycobacterium xenopi*.

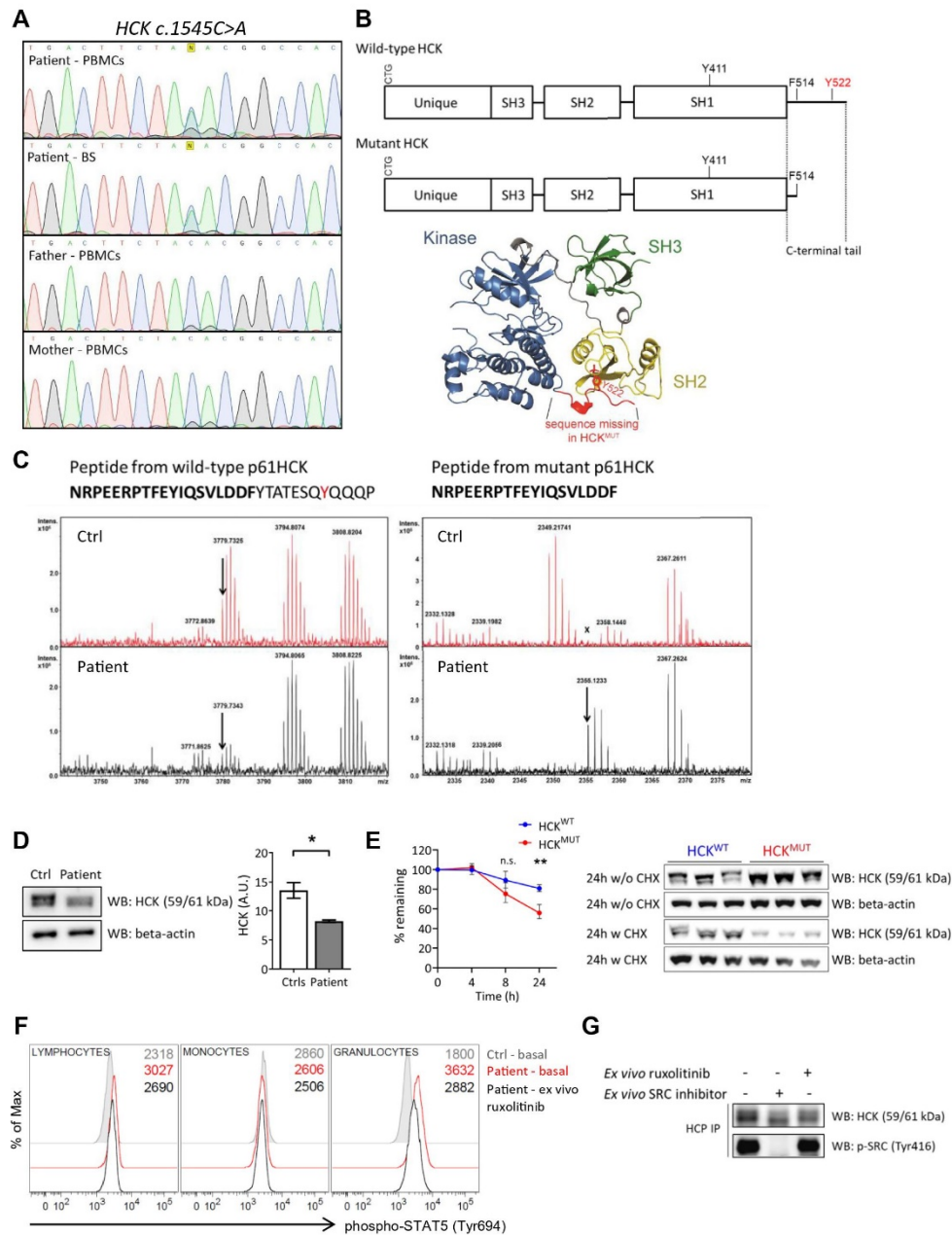


FIG 2. Identification of the *HCK c.1545C>A* mutation. **A**, Sanger sequencing confirmation of the heterozygous *HCK c.1545C>A* mutation. **B**, (*top*) Scheme showing the wild-type and mutant p61HCK proteins (adapted from Poh et al¹⁸) and (*bottom*) the structure of HCK in the autoinhibited conformation (Protein Data Bank 1AD5⁵) generated using PyMol. **C**, Mass spectra of p61HCK isolated from leukocytes from the patient (black) and a healthy control (red). A truncated peptide lacking 12 amino acids, including the inhibitory tyrosine

lesions on the limbs, cheeks, and neck, which disappeared after antibiotic treatment. During her infancy, skin lesions recurred during upper respiratory tract infections and gradually developed into persistent purpura (Fig 1, A and B). Skin biopsies revealed vasculitis with perivascular infiltrates composed mainly of neutrophils and macrophages, and positivity of macrophages for tyrosine phosphorylation (Fig 1, C). From 6 months, the patient experienced recurrent episodes of severe anemia. Hepatosplenomegaly was first reported at age 21 months. At age 2 years, alveolar bleeding was confirmed via bronchoscopy, whereas chest X-ray and computed tomography scans revealed bilateral lung parenchymal infiltration (Fig 1, D) and incipient consolidative changes in both lungs (Fig 1, E). Lung biopsy (not shown) confirmed the occurrence of acute alveolar hemorrhage syndrome with numerous hemosiderin-laden macrophages, which was associated with minor capillaritis, interstitial infiltration of neutrophils, and fibrinous exudate within airspaces. Each therapeutic intervention (Fig 1, F) was followed by only temporary improvement. Moreover, adverse effects of immunosuppression appeared, including cytomegalovirus pneumonia, obesity, and hypertension. Persistent alveolar bleeding with recurrent exacerbations led to severe progression of the patient's restrictive ventilation disorder; nocturnal ventilation support with oxygen became essential. At age 13 years, after exclusion of the interferon signature, whole-exome and Sanger sequencing revealed an undescribed heterozygous mutation, *c.1545C>A* (p.Tyr515*), in the *HCK* gene (Fig 2, A),^{8,9} which was predicted to result in hyperactivation of HCK. No inhibitor specific for HCK is currently clinically available. As an alternative, we resorted to ruxolitinib, which was effective in treatment of another inflammatory lung disease.¹⁰ Ruxolitinib reduced activation of signal transducer and activator of transcription 5 in the patient's cells independently of HCK, which we used to monitor treatment efficacy (Fig 2, F and G). Administration of ruxolitinib (Fig 1, G) led to improvement of pulmonary functions and amelioration of skin symptoms. However, after 3 months of therapy, pulmonary function deteriorated. Infection with polyomavirus subtype BK (*BK virus*) and with *Mycobacterium xenopi* was detected in bronchoalveolar lavage fluid. Ruxolitinib was discontinued. Further deterioration manifested as interstitial pneumonia. After 1.5 years, when the moderate restrictive ventilation disorder persisted (lung computed tomography revealed chronic posthemorrhagic interstitial changes and the onset of fibrosis; Fig 1, H) and the cutaneous vasculitis was aggravated, ruxolitinib was reintroduced, leading to repeated stabilization of pulmonary function and mild improvement of skin lesions (Fig 1, I). Interestingly, the long-lasting hepatosplenomegaly was resolved. Nevertheless, infection with *M xenopi* reappeared after 27 months of therapy, leading to pulmonary deterioration with all-day oxygen dependence (Fig 1, G), and the patient eventually died from respiratory failure.

The *HCK* mutation *c.1545C>A* leads to a premature stop codon (p.Tyr515*) that is predicted to produce a truncated protein lacking 12 amino acids at the C-terminus⁸ (Fig 2, B). Mass

spectrometry detected both the wild-type (*HCK*^{WT}) and mutant *HCK* (*HCK*^{MUT}) proteins in the patient's peripheral blood leukocytes (Fig 2, C). Intriguingly, similar to that in *Hck*^{F/F} mice, total *HCK* expression was lower in patient cells than in healthy controls due to enhanced degradation of the *HCK*^{MUT} protein (Fig 2, D and E). *HCK* function is controlled by phosphorylation of 2 important tyrosines. The activating tyrosine (Tyr411) is located within the kinase domain, and its autophosphorylation enhances kinase activity. The inhibitory tyrosine (Tyr522) is located in the C-terminal tail; upon phosphorylation, it interacts with the SH2 domain of the same molecule, and this intramolecular interaction inhibits kinase activity^{3,8,11,12} (Fig 2, B). In contrast to *HCK*^{WT}, *HCK*^{MUT} (which lacks the C-terminal tail including Tyr522) transiently expressed in HEK293T cells exhibited increased kinase activity, as detected as hyperphosphorylation in whole-cell lysates (Fig 3, A) and hyperphosphorylation of the cotransfected Myc-tagged *HCK* substrate paxillin similar to findings in *Hck*^{F/F} mice³ (Fig 3, B). Consistent with increased *HCK*^{MUT} activity, the patient's cells showed increased phosphorylation of activating Tyr411 (Fig 3, C). The consequence of *HCK*^{MUT} expression on intracellular signaling was further investigated in monocytic THP-1 (Fig 3, D) and granulocytic HL-60 (Fig 4, A) cells lentivirally transduced with either *HCK*^{WT} or *HCK*^{MUT}. Basal total tyrosine phosphorylation and basal phosphorylation of SFK-activating tyrosine (Tyr416) were significantly increased in *HCK*^{MUT} compared with *HCK*^{WT} cells (Fig 3, D; Fig 4, A). Moreover, in THP-1 cells, *HCK*^{MUT} further enhanced the expression of the myeloid activation markers cluster of differentiation (CD)40, CD86, and CD14, a marker of monocyte/macrophage differentiation, both at basal levels and upon stimulation with *HCK* activators (the infectious agent LPS [Toll-like receptor 4 ligand] or aggregated IgG [FcγR ligand])⁸ (Fig 3, E-G). CD40 was also overexpressed on the patient's monocytes (Fig 3, H). In HL-60-derived neutrophils, *HCK*^{MUT} drove both spontaneous and TNF-α- or live *Escherichia coli*-induced hyperproduction of reactive oxygen species (Fig 4, B), reminiscent of excessive TNF-α-induced superoxide production in *Hck*^{F/F} mice.³ In human cell lines and in murine models, *HCK* has been shown to regulate integrin expression and integrin-dependent processes, such as adhesion, migration, and degranulation,¹³⁻¹⁷ as well as LPS-induced inflammatory cytokine and chemokine secretion and myeloid cell migration into the lungs.^{3,18} We hypothesized that hyperactive *HCK*^{MUT} induced chemotaxis and inflammatory cytokine production, which may have ultimately resulted in the lung infiltration and inflammation observed in the patient. Indeed, *HCK*^{MUT} cells showed increased expression of the β2 integrin family molecules CD11a, CD11b, CD11c, and CD18 both at basal levels (Fig 5, A) and on Toll-like receptor 4 or FcγR stimulation (Fig 5, B and C). They also exhibited increased adhesion to the ligand intercellular adhesion molecule-1 (Fig 5, D), which is naturally expressed on the endothelium.¹⁹ Interestingly, the β2 integrin CD11b/CD18 was overexpressed in the patient's cells compared with healthy controls,

(right), was detected only in the patient. D, *HCK* expression in PBMCs. E, Enhanced degradation of *HCK*^{MUT} protein compared with *HCK*^{WT} protein in cycloheximide (CHX)-treated THP-1 cells. F, Phosphorylation of STAT5 (Tyr694) in leukocytes and its inhibition by ruxolitinib *ex vivo*. The mean fluorescence intensity (MFI) values are presented as numbers. G, *Ex vivo* effects of ruxolitinib and the SRC inhibitor dasatinib on activating tyrosine phosphorylation of *HCK* in the patient's PBMCs. The *HCK* signal intensities were normalized to those of beta-actin, and the data were acquired in 3 independent experiments (Fig 2, E). BC, Buccal swab; Ctrl, control; n.s., not significant; STAT5, signal transducer and activator of transcription. ***P* < .005 (unpaired *t* test).

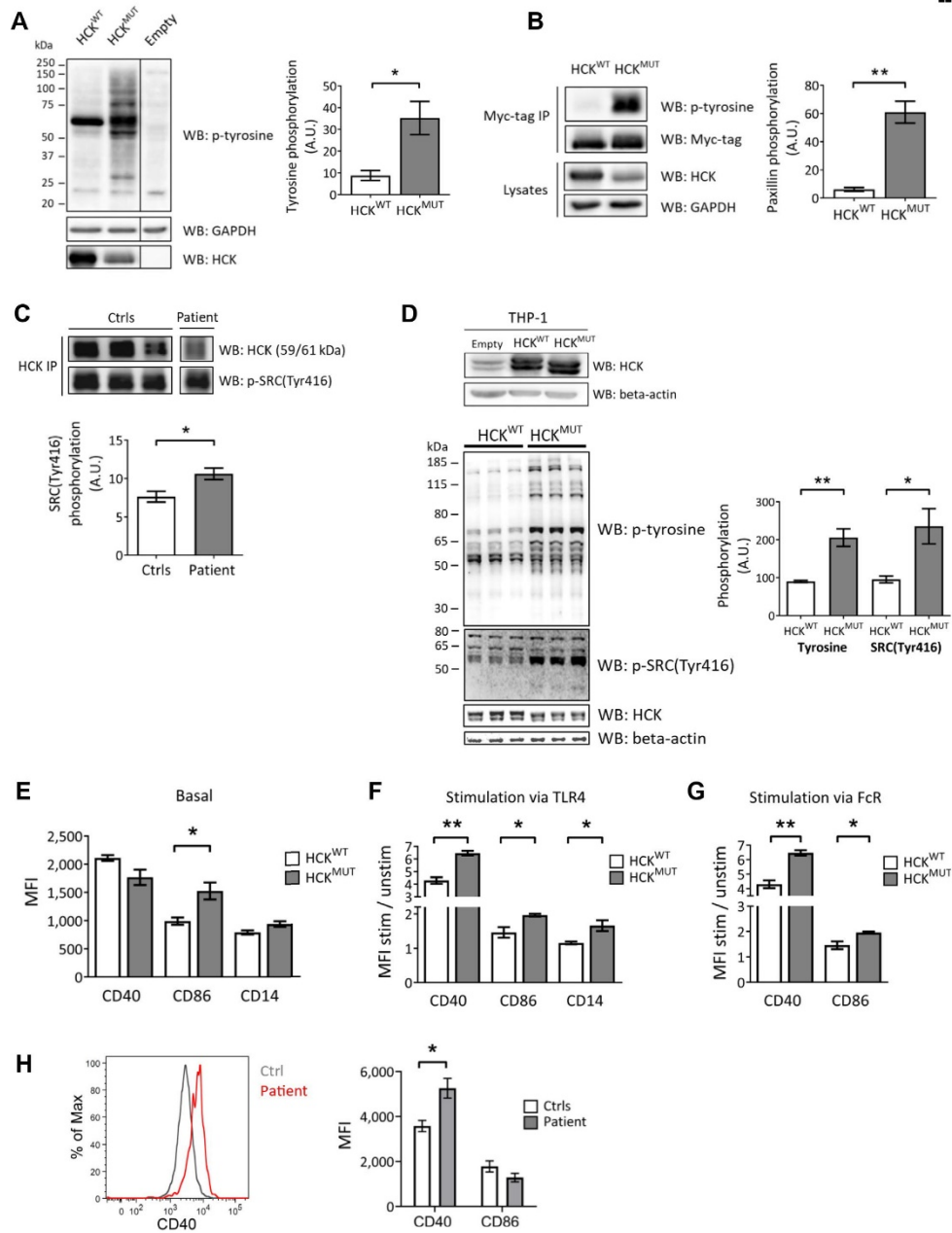


FIG 3. Activity of HCK^{MUT} with p.Tyr515*. Tyrosine phosphorylation of whole-cell lysates (A) and phosphorylation of the cotransfected c-Myc-tagged substrate of HCK, paxillin (B), in HEK293FT cells transiently expressing HCK^{MUT} and HCK^{WT}. Expression and phosphorylation of HCK in the patient's PBMCs (C). HCK expression (top) and tyrosine phosphorylation/SFK-activating tyrosine 416 phosphorylation (bottom) in whole-cell lysates of THP-1 cells stably expressing HCK^{MUT} and HCK^{WT} or nontransduced (empty) cells (D). CD40, CD86, and CD14 expression at basal levels (E) and upon TLR4 or Fc γ R stimulation (F and G) in THP-1 cells stably expressing HCK^{MUT} and HCK^{WT}. CD40 and CD86 on the patient's monocytes (H). Western blots (WBs) and histograms showing representative data. The WB signal intensities were normalized to those of HCK and GAPDH (Fig 3, A); HCK, GAPDH, and c-Myc (Fig 3, B); HCK (Fig 3, C); and beta-actin (Fig 3, D). Ctrl, Control; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; MFI, median fluorescence intensity; Stim, stimulated; unstim, unstimulated; TLR, Toll-like receptor. The data were acquired in 3 to 4 independent experiments and are expressed as the mean \pm SEM. * P < .05, ** P < .005 (unpaired t test).

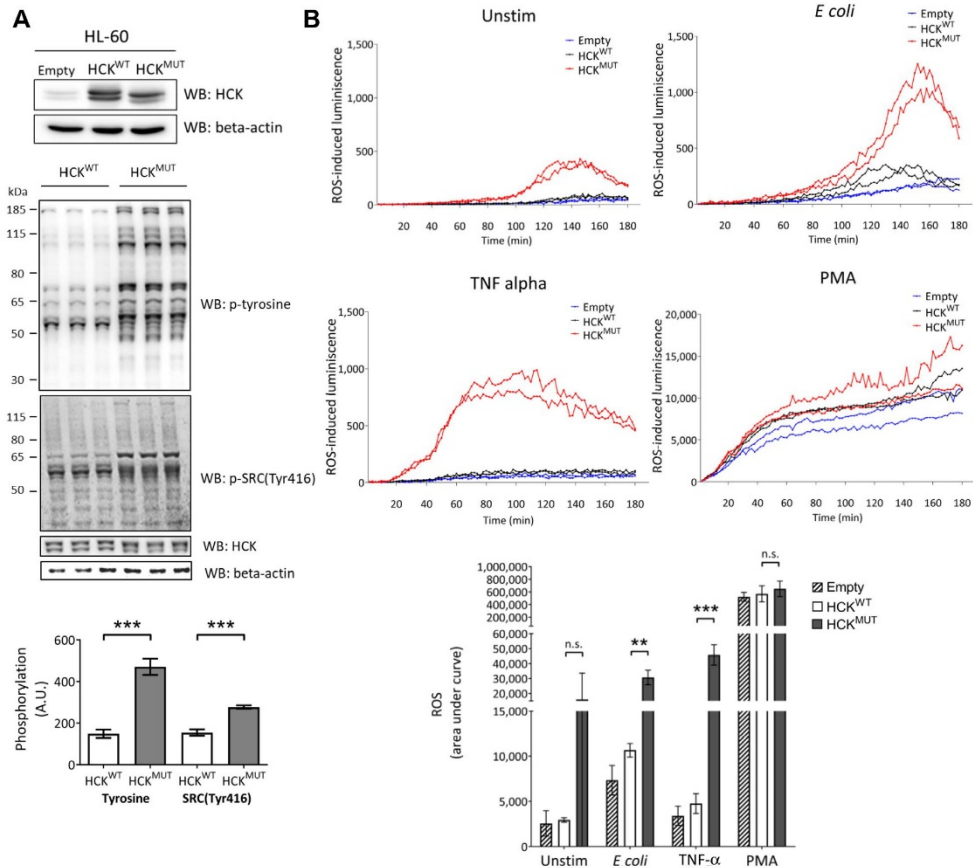


FIG 4. A, Inflammatory phenotype of p.Tyr515* HCK-expressing granulocytic cells. HCK expression (*top*), and tyrosine phosphorylation and SFK-activating tyrosine 416 phosphorylation (*bottom*) in whole-cell lysates of HL-60 cells stably expressing HCK^{MUT} and HCK^{WT} or nontransduced (empty) cells. **B**, Production of reactive oxygen species (ROS) from neutrophil-differentiated HL-60 cells stably expressing HCK^{MUT} and HCK^{WT} or nontransduced (empty) cells. Western blot results (signal intensities normalized to those of beta-actin), line charts, and histograms showing representative data. The data were acquired in 2 independent experiments and are expressed as the mean \pm SEM. *MFI*, Median intensity fluorescence; *n.s.*, not significant; *PMA*, phorbol 12-myristate 13-acetate; *Unstim*, unstimulated. ** $P < .005$, *** $P < .0005$ (unpaired *t* test).

which is similar to that noted for the case with chronic obstructive pulmonary disease and HCK overexpression⁴ (Fig 5, *E*). Furthermore, we observed enhanced chemotaxis and transendothelial migration of LPS-activated HCK^{MUT} cells toward IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1, which was consistent with the enhanced LPS-induced migration of neutrophils in Hck^{F/F} mice³ (Fig 5, *F* and *G*). Finally, LPS-activated HCK^{MUT} cells produced more inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α than HCK^{WT} cells (Fig 5, *H*); interestingly, production of IL-6, TNF- α , and the chemotactic factor IL-8 was enhanced by coculture on the endothelial layer (Fig 5, *I* and *J*). Increased IL-6 and IL-8 levels were also detected in the patient's peripheral blood plasma (Fig 5, *K*).

Collectively, the myeloid cell infiltration of the lungs and skin and the *in vitro*-demonstrated gain-of-function HCK mutation

suggest that HCK^{MUT}-driven activation of myeloid cells and their excessive migratory and inflammatory capacity induces chronic inflammation of the skin, lungs, liver, and spleen and causes progression of the main clinical symptoms: cutaneous vasculitis, pulmonary inflammation, and hepatosplenomegaly with subsequent anemia. The severe inflammatory phenotype manifests in a heterozygous state in the patient, which differs from the homozygous state of Hck^{F/F} mice.³ Nevertheless, splenocytes from homozygous Hck^{F/F} and heterozygous Hck^{F/Y} mice³ show similar increases in activating Hck tyrosine phosphorylation (Fig 5, *L*), suggesting that even a single mutant allele can cause similar dysregulation at the level of the total Hck pool as observed for homozygosity. However, the phenotype of Hck^{F/Y} mice has not been completely investigated to date.

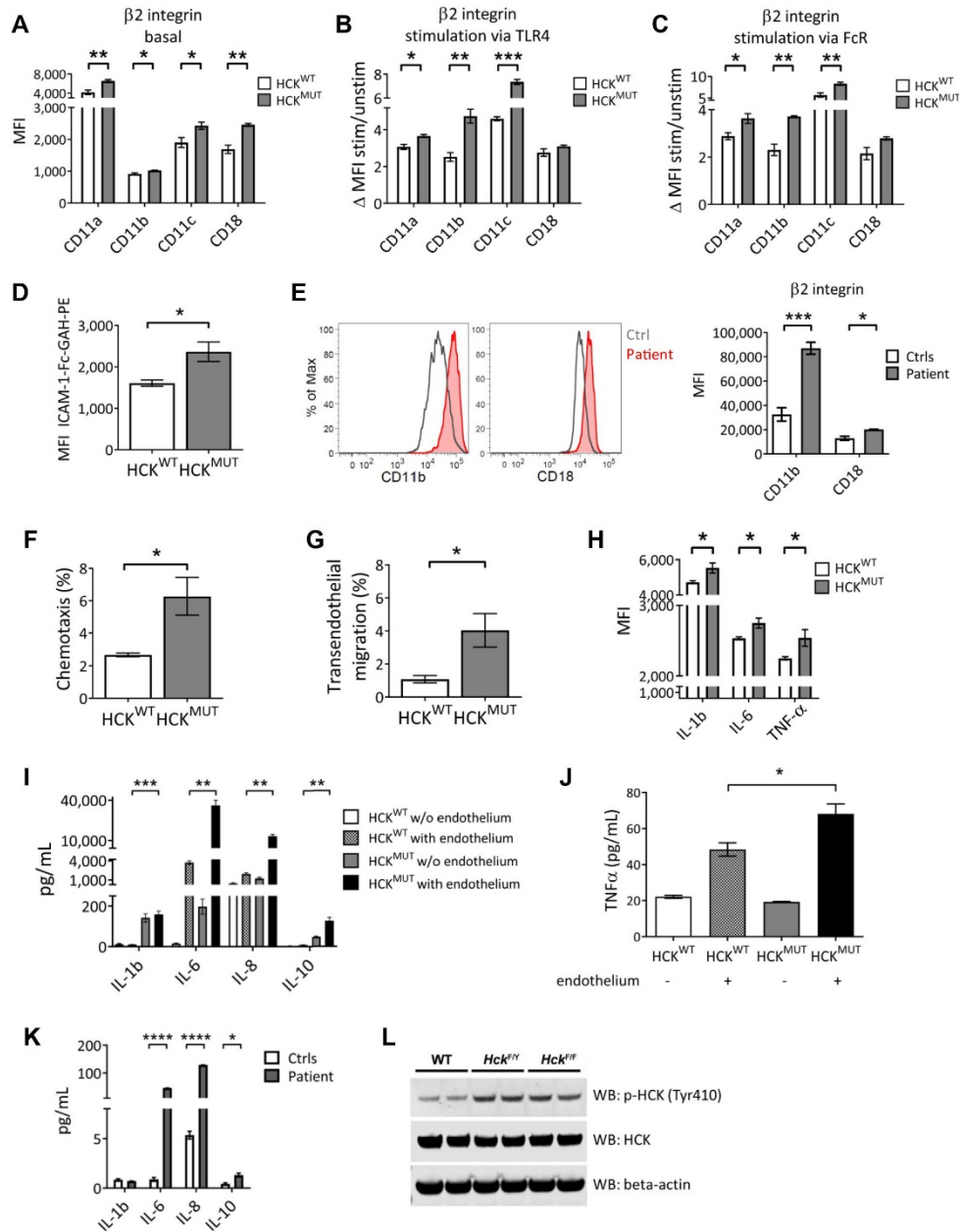


FIG 5. Promigratory and proinflammatory phenotype of p.Tyr515* HCK-expressing monocytic cells. Expression of the $\beta 2$ integrins CD11a, CD11b, CD11c, and CD18 in THP-1 cells stably expressing HCK^{MUT} and HCK^{WT} at basal levels (A) and upon stimulation via TLR4 (B) or Fc γ R (C). Increased affinity of these cells for ICAM-1 (D). Beta 2 integrin CD11b/CD18 expressed on monocytes from the patient (n = 6) and healthy controls (n = 5, E). Chemotaxis and transendothelial migration in LPS-activated THP-1 HCK^{MUT} and THP-1 HCK^{WT} cells (F and G). Intracellular detection of cytokines in LPS-activated THP-1 HCK^{MUT} and THP-1 HCK^{WT} cells (H). Production of cytokines and chemokines by LPS-activated THP-1 HCK^{MUT} and THP-1 HCK^{WT} cells cultured on human pulmonary artery endothelial cells (I) or human umbilical vein endothelial cells (J)

Given that HCK is primarily a hematopoietic molecule,¹ hematopoietic stem cell transplantation represents a plausible treatment for the disease. Unfortunately, because of the late definitive diagnosis, the patient's clinical condition precluded her from undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Ruxolitinib partially suppressed the proinflammatory features of the disease, improved the pulmonary function, ameliorated hepatosplenomegaly, and slightly ameliorated the cutaneous vasculitis. Our data provide evidence for effective off-label treatment of lung inflammation with ruxolitinib. This finding may be helpful for the treatment of other lung pathologies as suggested for a case of juvenile idiopathic arthritis associated with lung pathology²⁰ or for short-term treatment of coronavirus disease 2019.²¹ Nevertheless, from a long-term perspective, it is essential to balance the control of autoinflammation and the development of infection.^{22,23}

In summary, our study demonstrates a critical role for HCK in inflammation control in humans, identifies early-onset pulmonary and cutaneous vasculitis due to hyperactivation of HCK as a novel autoinflammatory disorder,²⁴ encourages the continuation of efforts to develop drugs targeting HCK,^{6,7} and suggests their potential application in the treatment of lung pathologies.

We dedicate this study to the patient. The study was carried out in accordance with the recommendations of the 2nd Faculty of Medicine Ethics Committee Guidelines and the Declaration of Helsinki. We are especially grateful to the patient and her family for providing consent for all activities associated with research of the disease and publication of the results. We also thank Vojtech Zak Leischner for providing icons, which we adapted for our use.

Clinical implications: Constitutively active HCK enhances integrin-ligand binding, chemotaxis, and reactive oxygen species and cytokine production in human myeloid cells. The corresponding disease is characterized by inflammatory skin and lung infiltration.

REFERENCES

- Quintrell N, Lebo R, Varmus H, Bishop JM, Pettenati MJ, Le Beau MM, et al. Identification of a human gene (HCK) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic cells. *Mol Cell Biol* 1987;7:2267-75.
- Boggon TJ, Eck MJ. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 2004;23:7918-27.
- Ernst M, Inglesse M, Scholz GM, Harder KW, Clay FJ, Bozinovski S, et al. Constitutive activation of the Src family kinase Hck results in spontaneous pulmonary inflammation and an enhanced innate immune response. *J Exp Med* 2002;196:589-604.
- Yanagisawa S, Sugiura H, Yokoyama T, Yamagata T, Ichikawa T, Akamatsu K, et al. The possible role of hematopoietic cell kinase in the pathophysiology of COPD. *Chest* 2009;135:94-101.
- Zhang X, Mahmudi-Azer S, Connett JE, Anthonisen NR, He JQ, Paré PD, et al. Association of Hck genetic polymorphisms with gene expression and COPD. *Hum Genet* 2007;120:681-90.
- Dorman HR, Close D, Wingert BM, Camacho CJ, Johnston PA, Smithgall TE. Discovery of non-peptide small molecule allosteric modulators of the Src-family kinase, Hck. *Front Chem* 2019;7:1-12.
- Roversi F, Pericole F, Machado-Neto J, da Silva Santos Duarte A, Longhini A, Corrocher F, et al. Hematopoietic cell kinase (HCK) is a potential therapeutic target for dysplastic and leukemic cells due to integration of erythropoietin/P13K pathway and regulation of erythropoiesis: HCK in erythropoietin/P13K pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017;1863:450-61.
- Poh AR, Donoghue RJO, Ernst M. Hematopoietic cell kinase (HCK) as a therapeutic target in immune and cancer cells. *Oncotarget* 2015;6:15752-71.
- Sicheri F, Moarefi I, Kuriyan J. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 1997;385:602-9.
- Frémont ML, Rodero MP, Jeremiah N, Belot A, Jeziorski E, Duffy D, et al. Efficacy of the Janus kinase 1/2 inhibitor ruxolitinib in the treatment of vasculopathy associated with TMEM173-activating mutations in 3 children. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:1752-5.
- Porter M, Schindler T, Kuriyan J, Miller WT. Reciprocal regulation of Hck activity by phosphorylation of Tyr 527 and Tyr 416. *J Biol Chem* 2000;275:2721-6.
- Lerner EC, Tribble RP, Schiavone AP, Hochrein JM, Engen JR, Smithgall TE. Activation of the Src family kinase Hck without SH3-linker release. *J Biol Chem* 2005;280:40832-7.
- Suen PW, Ilic D, Cavegion E, Berton G, Damsky CH, Lowell CA. Impaired integrin-mediated signal transduction, altered cytoskeletal structure and reduced motility in Hck / Fgr deficient macrophages. *J Cell Sci* 1999;112:4067-78.
- Medina I, Cougoule C, Drechsler M, Bermudez B, Koenen RR, Sluimer J, et al. Hck/Fgr kinase deficiency reduces plaque growth and stability by blunting monocyte recruitment and intraplaque motility. *Circulation* 2015;132:490-501.
- Tang RH, Law SKA, Tan SM. Selective recruitment of src family kinase Hck by leukocyte integrin $\alpha M\beta 2$ but not $\alpha L\beta 2$ or $\alpha X\beta 2$. *FEBS Lett* 2006;580:4435-42.
- Giagulli C, Ottoboni L, Cavegion E, Rossi B, Lowell C, Constantin G, et al. The Src family kinases Hck and Fgr are dispensable for inside-out, chemoattractant-induced signaling regulating $\beta 2$ integrin affinity and valency in neutrophils, but are required for $\beta 2$ integrin-mediated outside-in signaling involved in sustained adhesion. *J Immunol* 2006;177:604-11.
- Mócsai A, Ligeti E, Lowell CA, Berton G. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol* 1999;162:1120-6.
- Mazzi P, Cavegion E, Lapinet-Vera JA, Lowell CA, Berton G. The Src-family kinases Hck and Fgr regulate early lipopolysaccharide-induced myeloid cell recruitment into the lung and their ability to secrete chemokines. *J Immunol* 2015;195:2383-95.
- Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intracellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 1989;83:2008-17.
- Bader-Meunier B, Hadjouchel A, Berteloot L, Polivka L, Béziat V, Casanova JL, et al. Effectiveness and safety of ruxolitinib for the treatment of refractory systemic idiopathic juvenile arthritis like associated with interstitial lung disease: a case report. *Ann Rheum Dis* 2020:1-2.
- La Rosée F, Bremer HC, Gehrke I, Kehr A, Hochhaus A, Birndt S, et al. The Janus kinase 1/2 inhibitor ruxolitinib in COVID-19 with severe systemic hyperinflammation. *Leukemia* 2020;34:1805-15.
- Elli EM, Baraté C, Mendicino F, Palandri F, Palumbo GA. Mechanisms underlying the anti-inflammatory and immunosuppressive activity of ruxolitinib. *Front Oncol* 2019;9:1-10.
- Forbes LR, Vogel TP, Cooper MA, Castro-Wagner J, Schussler E, Weinacht KG, et al. Jakinibs for the treatment of immune dysregulation in patients with gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) or STAT3 mutations. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142:1665-9.
- Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, et al. Human inborn errors of immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol* 2020;40:24-64.

← measured in culture supernatants. Cytokine concentration in the patient's peripheral blood plasma (n = 3) compared with the plasma of healthy controls (n = 4, K). Equally increased phosphorylation of Hck-activating tyrosine levels in spleen lysates from the heterozygous Hck^{F/Y} and homozygous Hck^{F/F} mice (L). *Ctrl*, Control; *ICAM-1*, intercellular adhesion molecule-1; *MFI*, median intensity fluorescence; *stim*, stimulated; *TLR*, Toll-like receptor; *unstim*, unstimulated. The data were acquired in 3 to 4 independent experiments and are expressed as mean \pm SEM. **P* < .05, ***P* < .005, ****P* < .0005, *****P* < .0001 (unpaired *t* test or Mann-Whitney *U* test [Fig 5, H]).

METHODS**DNA and RNA isolation, whole-exome, amplicon, and Sanger sequencing**

DNA was extracted from whole blood using an AutoGen Flex STAR (AutoGen, Holliston, Mass) according to the manufacturer's instructions. DNA libraries for next-generation sequencing were prepared with a Sure-Select Focused Exome Enrichment Kit (Agilent, Santa Clara, Calif) for the proband and her parents, and sequencing was performed in a HiSeq 2500 System (Illumina, San Diego, Calif). Next-generation sequencing reads were aligned to the human reference genome (GRCh37) with Burrows-Wheeler Aligner⁵¹ and processed via an *in-house*-developed pipeline according to the Genome Analysis Tool Kit⁵² best practice guidelines. Variants were annotated and filtered with Illumina VariantStudio software 3.0 (Illumina), and trio analysis was performed to evaluate the parental origin of particular variants. Potential causal variants were evaluated on the basis of patient's phenotype, previously published observations, the population frequency of the variants (ExAC), and the impact of the variants as predicted *in silico*. *HCK c.1545C>A* variant was not previously reported in the gnomAD or ENSEMBL databases and was predicted to be damaging. No other rare pathogenic or likely pathogenic variants were identified in genes connected with inborn errors of immunity.⁵³ Sanger sequencing was performed in an AB3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass) to confirm segregation of the identified variant in the DNA of the proband and her parents as well as in DNA isolated from the proband's buccal swab to exclude mosaicism in cells of hematopoietic origin. RNA was isolated from PBMCs using TRIzol (Thermo Fisher Scientific), and cDNA was transcribed using iScript Supermix (Bio-Rad, Hercules, Calif). A specific forward primer (5'-GATCCCTTACCAGGGATGTC) spanning the exon 13-14 junction and reverse primer (5'-TCATGGCTGCTGTGGTACTG) with barcoded adapters based on the TruSight Amplicon Panels sequence (Illumina) were used for PCR library preparation from the cDNA and amplicon sequencing to confirm the expression of both the wild-type and mutant alleles/mRNAs in the proband's PBMCs (not shown).

HCK immunoprecipitation and SDS-PAGE

Lysates were prepared from the patient's peripheral blood cells (treated w/wo 1 μ M dasatinib; Selleckchem, Houston, Tex; 30 minutes, 37°C) and healthy donors' peripheral blood cells as previously described.⁵⁴ The protein concentration was adjusted to a final concentration of 1 mg/mL using a BCA kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher). The anti-HCK antibody (E117F, Cell Signaling Technologies, Danvers, Mass) was added to the cell lysates at a final concentration of 1 μ g/mL, and the lysates were incubated with rotation for 2 hours at 4°C. Next, G protein-coupled Sepharose beads (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) were added, and the samples were incubated on a carousel overnight at 4°C. The samples were washed 3 times in PBS supplemented with 0.05% Tween 20, the supernatants were discarded, and the pellets were heated in reducing Laemmli sample buffer (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany) for 5 minutes at 98°C. The samples were centrifuged, and the supernatants were separated on BOLT 4-12% Bis-Tris Plus gels (Thermo Fisher). Gels were prefixed in a solution containing 50% methanol, 10% acetic acid (both from Sigma-Aldrich, Merck), and 40% distilled water for 30 minutes at room temperature and stained in the above solution supplemented with 0.25% Coomassie Blue R-250 (Thermo Fisher) for 4 hours at room temperature until a uniform blue color was attained. Destaining was performed in 5% methanol, 7.5% acetic acid, and 87.5% distilled water for 24 hours until a transparent background was attained.

Mass spectrometry analysis

Protein bands were excised from the gel, cut into small pieces, and decolorized several times in a sonic bath at 60°C with 0.1 mol/L 4-ethylmorpholine acetate (pH 8.1) in 50% acetonitrile (ACN). After complete destaining, proteins were reduced with 50 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine in 0.1 mol/L 4-ethylmorpholine acetate (pH 8.1) for 5 minutes at 80°C

and alkylated with 50 mM iodoacetamide in 0.1 mol/L 4-ethylmorpholine acetate (pH 8.1) for 30 minutes in the dark at room temperature. Then, the gel was washed with water and ACN and was partially dried using a SpeedVac concentrator (Savant, Holbrook, NY). Finally, the gel was reconstituted with cleavage buffer containing 0.01% 2-mercaptoethanol, 0.05 mol/L 4-ethylmorpholine acetate (pH 8.1), 10% ACN, and sequencing grade trypsin (Promega, 10 ng/ μ L). Digestion was carried out overnight at 37°C, and the resulting peptides were extracted with 30% ACN/0.1% trifluoroacetic acid and analyzed by mass spectrometry. Mass spectra were acquired in positive ion mode in a MALDI-FTMS solarix (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a 15 T superconducting magnet and SmartBeam laser. The acquisition mass range was *m/z* 250-4000, and 2 million data points were collected. The instrument was externally calibrated using the PepMix II peptide standard (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), which results in a typical mass accuracy of less than 2 ppm. A saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% ACN/0.2% trifluoroacetic acid was used as the MALDI matrix. A 1 μ L aliquot of the matrix solution was mixed on the target with 1 μ L of the sample, and the droplet was allowed to dry at ambient temperature. After analysis, mass spectra were apodized using sine apodization with one zero fill. Mass spectra were interpreted using the DataAnalysis version 4.4 and BioTools 3.2 software packages (Bruker Daltonics, Billerica, Mass). Proteins were identified by peptide mass fingerprinting using the search algorithm MASCOT (Matrix Science). The mass error tolerance was set to 2 ppm, and carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine were selected as the fixed and variable modifications, respectively. Mass data were searched against the human SwissProt database.

Cell lines

THP-1 and HL-60 cells were purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) and cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640; Lonza, Basel, Switzerland) and Iscove's modified Dulbecco's medium (Lonza), respectively, at 37°C in 5% CO₂. HEK293FT cells (obtained from Invitrogen, Thermo Fisher) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Thermo Fisher) at 37°C in 5% CO₂. All media were supplemented with 10% FBS and antibiotics (Thermo Fisher). Human umbilical vein endothelial cells were obtained from the American Type Culture Collection, and human pulmonary artery endothelial cells were obtained from Sigma-Aldrich, Merck. Both types of endothelial cells were cultured in endothelial cell growth medium (Cell applications, Sigma-Aldrich, Merck).

DNA construct generation, transfection, and transduction

Generation of the pHIV-huHCKwt-IRES-EGFP and pHIV-huHCKmut-IRES-EGFP constructs. The coding sequence of human HCK was amplified by PCR from cDNA prepared by reverse transcription (RevertAid, Fermentas, Thermo Fisher) of RNA from peripheral blood cells. PCR products obtained with the forward primer 5'-ATAGTTAACGGAGCACATCAGAGGCTTAGAGG and the reverse primer 5'-ATAAGATCTTCATGGCTGCTGTGGTACTGGC were digested with the restriction enzymes HpaI and BglII and were then ligated into the HpaI- and BamHI-digested pHIV-EGFP lentiviral vector (Addgene plasmid no. 21373).

Generation of the MSCV-Paxillin-Myc-Tag, MSCV-huHCKwt-IRES-Thy1.1, and MSCV-huHCKmut-IRES-Thy1.1 constructs. The coding sequences of *huHCKwt* and *huHCKmut* were amplified by PCR from cDNA prepared by reverse transcription (RevertAid, Fermentas, Thermo Fisher) of RNA from the patient's or healthy donor's peripheral blood cells using the HCK forward primer 5'-ATACTC-GAGGCCACCATGGGGTGCATGAAGTCCAAGTTCC for both WT and mutant HCK and the reverse primer 5'-ATAGAATTCTCATGGCTGCT GTTGGTACTGGC for WT HCK or 5'-ATAGAATTC TTAGAAGTCATC-CAGCACACTCTGG for mutant HCK. The paxillin-Myc sequence was amplified by PCR using a 2-step procedure. In the first step, the forward primer 5'-AAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGGACGACCTCGACGCCCTGC

and the reverse primer 5'-TATGAATTCCTAGCAGAAGAGCTTGAG-GAAGCAG were used. The product was purified and subjected to further amplification with the forward primer 5'-ATACTCGAGGCCACCATG-GAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAG and the same reverse primer used in the first step. All PCR products were digested with the restriction enzymes XhoI and EcoRI and subsequently ligated into the MSCV-IRES-Thy1.1 retroviral vector¹⁵ (Clontech, Mountain View, Calif).

Retrovirus preparation and infection. HEK293FT cells were plated in 8 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2% FBS in a 10-cm dish and transfected with 2 mL of reduced-serum Opti-MEM medium (Invitrogen, Thermo Fisher) containing 60 µg of linear polyethylenimine (MW 25,000, Polysciences, Asia Pacific), 6 µg of pHIV-EGFP (containing WT or mutant HCK), 6 µg of pLP1, 6 µg of pLP2, and 6 µg of pLP/VSVG plasmid (Invitrogen, Thermo Fisher). Virus-containing supernatant was collected, concentrated with Amicon Ultra centrifugal filters with a molecular weight cutoff of 100 kDa (Merck), and frozen or used immediately for infection of cells. THP-1 or HL-60 cells were centrifuged with concentrated virus supplemented with polybrene (4 µg/mL; Sigma-Aldrich, Merck) at 1250g for 90 minutes at 30°C and were then incubated for another 8 hours at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂. Infected cells were sorted on the basis of EGFP reporter fluorescence in a FACS Influx (BD Biosciences, San Jose, Calif).

Kinase activity assay. For cell-based kinase activity assays, we adapted a previously described procedure.¹⁶ HEK293FT cells were transfected with MSCV-huHCKwt-IRES-Thy1.1, MSCV-huHCKmut-IRES-Thy1.1, or empty vector, alone or in combination with the MSCV-Paxillin-Myc construct, using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Thermo Fisher) according to the manufacturer's instructions. After 48 hours, the cells were washed, resuspended in PBS, lysed in SDS-PAGE sample buffer, and subjected to sonication and heating (97°C for 2 minutes). The samples were analyzed by immunoblotting with antiphosphotyrosine (clone 4G10, Upstate Biotechnology, Thermo Fisher) and control antibodies (anti-HCK [clone E117F, Cell Signaling Technologies] and anti-GAPDH [polyclonal, Sigma-Aldrich, Merck]). For immunoprecipitation assays, HEK293FT cells cotransfected with MSCV-huHCKwt-IRES-Thy1.1 or MSCV-huHCKmut-IRES-Thy1.1 and MSCV-Paxillin-Myc were washed with PBS and lysed for 30 minutes on ice in lysis buffer (1% lauryl maltoside [Calbiochem, Merck], 20 mM Tris [pH 7.5], 100 mM NaCl, 5 mM iodoacetamide, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, and 2 mM EDTA [all from Sigma-Aldrich, Merck]) containing 100× diluted Protease Inhibitor Cocktail Set III [Calbiochem, Merck]. Postnuclear supernatants were subjected to immunoprecipitation with an anti-Myc antibody (clone 9B11, Cell Signaling Technologies) and Protein A/G Plus agarose beads (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tex) and were then immunoblotted with antiphosphotyrosine and control (anti-HCK and anti-GAPDH) antibodies. Immunoreactions were detected by luminol-enhanced chemiluminescence and visualized in an Azure C300 imaging system. Band densities were quantified with Aida Image Analyzer v.5 software (Elysia, Angleur, Belgium). Expression levels were normalized to those of HCK and GAPDH.

Western blotting. Cells were lysed as previously described,¹⁴ and the protein concentration was adjusted to a final concentration of 1 mg/mL using a BCA kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher). Proteins were separated on SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, Calif). Membranes were blocked at 8°C overnight in PBS containing 7.5% low-fat bovine milk and 0.05% Tween 20. Primary antibodies against phosphotyrosine (clone P-Tyr-01, Exbio, Vestec, Czech Republic), beta-actin (clone AC-74, Sigma-Aldrich, Merck), phospho-SRC (Tyr416, polyclonal), and HCK (clone E117F, both from Cell Signaling Technologies) were used with peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa) and SuperSignal West Pico/Femto Chemiluminescent Substrates (Thermo Fisher). Signals were detected in a MINI HD6 scanner (UVITEC, Cambridge, UK) or a C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, Lincoln, Neb) and analyzed with ImageJ software. Expression levels were normalized to those of HCK and beta-actin. Protein lysates from spleens of C57BL/6 WT, Hck^{F/Y}, and Hck^{F/F} mice¹⁷ were prepared as previously described and resolved on 10% SDS-polyacrylamide gels.¹⁸ Following dry transfer, PVDF membranes were blocked for 1 hour

in Intercept Blocking Buffer (LI-COR Biosciences) and incubated overnight in phosphorylated HCK antibody (polyclonal #61055, Abcam, Cambridge, UK) or total HCK antibody (polyclonal #N-30, Santa Cruz) at 4°C. The next day, blots were incubated with fluorescent-conjugated secondary antibodies (Vector Laboratories, Burlingame, Calif) for 1 hour. Signals were detected using the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Beta-actin was used as a loading control.

Cycloheximide chase assay. A proteosynthesis was inhibited using 50 µg/mL cycloheximide (Sigma-Aldrich, Merck) in lentivirally transduced THP-1 cells containing the wild-type HCK or the mutant HCK as described above. HCK and beta-actin protein levels were detected on 4-, 8-, and 24-hour inhibition w/o cycloheximide using western blotting.

Immunophenotyping. Antibodies against the following molecules were used to detect the expression of integrins in the tested cell lines: CD11b-PE (clone ICRF44) and CD11c-PE (clone S-HCL-3, both from BD Biosciences); CD11a-APC (clone MEM-25), CD11b-activation epitope (clone CBRM1/5) and CD18-APC (clone MEM-48, all from Exbio); Fc receptors—CD16-PE (clone LNK16, Exbio), CD64-PE-Cy7 (clone 22, Beckman Coulter, Miami, Fla), and CD32-APC (clone FLI8.26, BD Biosciences); and other activation and differentiation markers—CD40-PE (clone HI40a), CD86-APC (clone BU63), and CD14-Pacific Blue (clone MEM-15, all from Exbio). Samples were evaluated in LSR II and Celesta flow cytometers and analyzed using FlowJo software (BD Biosciences).

Single-cell phospho-flow cytometry. Detection of intracellular phosphorylated markers was performed as previously described.¹⁹ Samples of whole peripheral blood (100 µL; treated w/o 1 µM ruxolitinib [Selleckchem]; 30 minutes, 37°C) were fixed with 4% formaldehyde (Thermo Fisher) for 10 minutes at 25°C. Erythrocytes were lysed in 0.1% Triton X-100 (diluted in Ca²⁺- and Mg²⁺-free PBS, Lonza) for 15 minutes at 37°C, and leukocytes were permeabilized with 80% ice-cold methanol on ice for 30 minutes. Cell subsets were discriminated using anti-CD45-APC-H7 (clone 2D1, BD Biosciences), anti-CD14-Brilliant Violet 605 (clone 63D3, BioLegend), anti-CD3-PerCP-Cy5.5 (clone UCHT1, Exbio), and anti-CD19-PE-Cy7 (clone J3-119, Beckman Coulter) antibodies, and intracellular signals were detected using anti-phospho-STAT5(Tyr694)-PE or anti-phospho-STAT5(Tyr694)-PerCP-Cy5.5 (clone 47/Stat5(pY694)), anti-Erk1/2(pT202/pY204)-Brilliant Violet 421 (clone 20A), anti-phospho-STAT1(Tyr701)-Alexa Fluor 647 (clone 4a), and anti-phospho-STAT3(Tyr705)-Alexa Fluor 488 (clone 4P-STAT3) antibodies (all from BD Biosciences). Samples were evaluated in an LSR II cytometer and analyzed with FlowJo software (BD Biosciences). For the second monitoring of ruxolitinib efficiency, whole blood was stimulated with recombinant human IFN-α 1 protein (IFN-α, Active, 0.5 µg/mL, Abcam, Cambridge, UK) for 15 minutes at 37°C.

Ligand-complex-based adhesion assay. THP-1 cells were prestimulated with 1 µg/mL LPS (Sigma-Aldrich, Merck) for 6 hours, the stimulant was removed by washing, and the cells were cultured for an additional 48 hours. Binding of CD11b/CD18 to its ligand intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and binding of CD49d/CD29 to its ligand vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) was assessed using a ligand-complex-based adhesion assay as previously described.¹⁰ Cells were seeded in 96-well plates at a concentration of 3 × 10⁶ cells/mL. ICAM-1/Fc or VCAM-1/Fc (6.25 µL of 100 µg/mL ICAM-1/Fc or VCAM-1/Fc) was incubated with 2 µL of R-PE-conjugated AffiniPure F(ab)₂ fragment goat antihuman IgG for 30 minutes at 4°C. ICAM-1/Fc-F(ab)₂-R-PE or VCAM-1/Fc-F(ab)₂-R-PE complexes (8.25 µL) were added to 41.65 µL of cell suspension (1.25 × 10⁵ cells). After 30 minutes at 4°C, 50 µL of the suspension was transferred into flow cytometry tubes with 500 µL of warm (37°C) 4% formaldehyde. After 5 minutes, fixation was terminated by the addition of ice-cold PBS (3 mL). Samples were washed, evaluated in an LSR II flow cytometer, and analyzed using FlowJo software (BD Biosciences).

Chemotaxis and transendothelial migration assays. THP-1 cells were prestimulated with 1 µg/mL LPS (Sigma-Aldrich, Merck) for 6 hours, the stimulant was removed by washing, and the cells were cultured for an additional 48 hours. Two hundred microliters of LPS-primed THP-1 cells in serum-free RPMI 1640 (concentration 1 × 10⁶ cells/mL) were seeded in the upper chamber of a transwell insert (24-well, 3 µm pore size; Corning,

NY). Monocyte chemoattractant protein-1 (20 ng/mL) in combination with IL-8 (10 ng/mL) (both from Sigma-Aldrich, Merck) diluted in 600 μ L of serum-free RPMI 1640 was added to the lower chamber. For the transendothelial migration assay, transwell inserts were preincubated overnight with 10,000 human umbilical vein endothelial cells per well. The THP-1 cells were then allowed to migrate for 4.5 hours. The number of GFP⁺ cells that migrated across the membrane into the lower chamber was counted using an LSR II flow cytometer.

Intracellular cytokine production assay. THP-1 cells were prestimulated with 1 μ g/mL LPS (Sigma-Aldrich, Merck) for 6 hours, the stimulant was removed by washing, and the cells were cultured for an additional 48 hours. Five hours before culture was terminated, brefeldin A (Sigma-Aldrich, Merck; 10 μ g/mL) was added to the cells. Finally, the cells were fixed and permeabilized with FACS lysing solution/FACS Perm 2 (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Anti-IL-1 β -Alexa Fluor 647, anti-IL-6-PE-Cy7, and anti-TNF- α -Alexa Fluor 700 antibodies (all from Biolegend, San Diego, Calif) were used to stain intracellular cytokines. The samples were evaluated in an LSR II flow cytometer and analyzed using FlowJo software (BD Biosciences).

Extracellular cytokine production assay. THP-1 cells were prestimulated with 1 μ g/mL LPS (Sigma-Aldrich Merck) for 6 hours, the stimulant was removed by washing, and the cells were cultured for an additional 48 hours. Subsequently, 2×10^5 cells were added to each well containing a monolayer of confluent human umbilical vein endothelial cells or human pulmonary artery endothelial cells in a 24-well tissue culture plate and incubated for 24 or 72 hours. The supernatants were harvested, and the levels of cytokines (TNF- α or IL-1 β , IL-8, IL-6, IL-10, IL-12p70, and TNF- α) were measured via ELISA (TNF- α , Thermo Fisher) or a Cytometric Bead Array (Human Inflammatory Cytokine Kit, BD Biosciences) assay according to the manufacturers' instructions. For ELISAs, the absorbance was measured at 450 nm using a VERSAmax Tunable Microplate Reader with appropriate SoftMaxPro software (Molecular Devices, San Jose, Calif). The Cytometric Bead Array beads were evaluated in an LSR II flow cytometer and analyzed using FlowJo software (BD Biosciences).

Reactive oxygen species detection. HL-60 cells were differentiated by incubation with 1 μ M all-trans retinoic acid and 1% dimethyl sulfoxide (both from Sigma-Aldrich Merck) for 5 to 7 days. Reactive oxygen species production was measured by an enhanced chemiluminescence assay as previously described.^{E11} Cells (0.5 or 1×10^6 cells per well) were seeded in a black 96-well plate (SPL Life Sciences, Korea) in Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with 0.2% FBS and allowed to rest for 30 minutes at 37°C in 5% CO₂. Next, luminol (final concentration, 100 μ M) and the stimulant (100 ng/mL TNF- α [Peprotech, Rocky Hill, NJ], *Escherichia coli* at an OD₆₀₀ of ~0.15, or 100 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate [Sigma-Aldrich Merck]) were added. Reactive oxygen species-induced luminescence was immediately quantified at 37°C

in a Perkin-Elmer Envision plate reader. Each well was scanned in 2-minute intervals for 2.5 hours.

Targeted therapy. Ruxolitinib therapy was initiated when the patient was aged 13 years and 3 months via a protocol derived from the treatment schedule used for chronic myeloid leukemia (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/202192b1.pdf). The dose was gradually increased to 40 mg per day. After confirmation of *BKV* infection, the dose was reduced to 20 mg per day. For the second administration, the dose was reduced to 15 mg to 10 mg per day.

Statistical analysis. Data are presented as the mean \pm SEM values. An unpaired Student *t* test and/or the Mann-Whitney *U* test were used, and a *P* value of less than .05 was considered significant.

REFERENCES

- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009;25:1754-60.
- DePristo M, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 2011;43:491-8.
- Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, et al. Human inborn errors of immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol* 2020;40:24-64.
- Kanderova V, Kuzilkova D, Stuchly J, Vaskova M, Brdicka T, Fiser K, et al. High-resolution antibody array analysis of childhood acute leukemia cells. *Mol Cell Proteom* 2016;15:1246-61.
- Welm BE, Dijkgraaf G, Bledau AS, Welm AL, Werb Z. Lentiviral transduction of mammary stem cells for analysis of gene function during development and cancer. *Cell Stem Cell* 2008;2:90-102.
- Brdicka T, Kadlecik TA, Roose JP, Pastuszak AW, Weiss A. Intramolecular regulatory switch in ZAP-70: analogy with receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 2005;25:4924-33.
- Ernst M, Inglese M, Scholz GM, Harder KW, Clay FJ, Bozinovski S, et al. Constitutive activation of the Src family kinase Hck results in spontaneous pulmonary inflammation and an enhanced innate immune response. *J Exp Med* 2002;196:589-604.
- Poh AR, Love CG, Masson F, Preaudet A, Tsui C, Whitehead L, et al. Inhibition of hematopoietic cell kinase activity suppresses myeloid cell-mediated colon cancer progression. *Cancer Cell* 2017;31:563-75.
- Bloomfield M, Kanderova V, Parackova Z, Vrabцова P, Svatoň M, Fronkova E, et al. Utility of ruxolitinib in a child with chronic mucocutaneous candidiasis caused by a novel STAT1 gain-of-function mutation. *J Clin Immunol* 2018;38:589-601.
- Kanderova V, Hrusak O, Kalina T. Aberrantly expressed CEACAM6 is involved in the signaling leading to apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. *Exp Hematol* 2010;38:653-60.
- Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, Katsumoto TR, Ma J, Wolf AJ, et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a "phagocytic synapse." *Nature* 2011;472:471-5.

A Novel Case of Homozygous Interferon Alpha/Beta Receptor Alpha Chain (IFNAR1) Deficiency With Hemophagocytic Lymphohistiocytosis

Florian Gothe,^{1,2,a} Catherine F. Hatton,^{1,a} Linh Truong,¹ Zofia Klimova,³ Veronika Kanderova,⁴ Martina Fejtkova,⁴ Angela Grainger,¹ Venetia Bigley,^{1,5} Joanna Perthen,⁶ Dipayan Mitra,⁶ Ales Janda,⁷ Eva Fronkova,⁴ Dusana Moravcikova,³ Sophie Hambleton^{1,8} and Christopher J. A. Duncan^{1,9}

¹Immunity and Inflammation Theme, Translational and Clinical Research Institute, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK, ²Department of Pediatrics, Dr. von Hauner Children's Hospital, University Hospital, Ludwig-Maximilians-Universität Munich, Munich, Germany, ³Banská Bystrica Children's University Hospital, Banská Bystrica, Slovakia, ⁴Department of Paediatric Haematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, ⁵Northern Centre for Bone Marrow Transplant, Freeman Hospital, Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust, Newcastle upon Tyne, UK, ⁶Department of Neuroradiology, Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust, Newcastle upon Tyne, UK, ⁷Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, University Medical Center Ulm, Germany, ⁸Children's Immunology Service, Great North Children's Hospital, Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust, Newcastle upon Tyne, UK, and ⁹Infection and Tropical Medicine, Royal Victoria Infirmary, Newcastle upon Tyne Hospitals NHS Foundation Trust, Newcastle upon Tyne, UK.

We present a case of complete deficiency of the interferon alpha/beta receptor alpha chain (IFNAR1) in a child with fatal systemic hyperinflammation, apparently provoked by live-attenuated viral vaccination. Such pathologic hyperinflammation, fulfilling criteria for hemophagocytic lymphohistiocytosis, is an emerging phenotype accompanying inborn errors of type I interferon immunity.

Keywords. IFNAR1; type I interferon; HLH; inborn error of immunity.

Type I interferons (including IFN- β and 13 IFN- α subtypes) signal via a single ubiquitously expressed receptor composed of low- and high-affinity subunits, IFNAR1 and IFNAR2. Type I IFNs appear critical to mammalian antiviral immunity, based on extensive studies of *Ifnar1*-deficient mice, but their precise role in humans was hitherto uncertain [1]. Our discovery of complete human IFNAR2 deficiency in a child with fatal viral disease secondary to live-attenuated measles mumps and rubella (MMR) vaccination implied an essential antiviral function [2].

Received 8 June 2020; editorial decision 7 November 2020; published online 30 November 2020.

^aFG, C.F.H., and L.T. contributed equally.

Correspondence: C. Duncan, Translational and Clinical Research Institute, Immunity and Inflammation Theme, Faculty of Medical Sciences, Rm M3.119, 3rd Fl, Leech Bldg, Newcastle University Medical School, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH UK (christopher.duncan@ncl.ac.uk).

Clinical Infectious Diseases® 2020;XX(XX):1-4

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. DOI: 10.1093/cid/ciaa1790

It was nevertheless striking that the proband displayed no overt viral susceptibility prior to MMR exposure. This phenotype of disease provoked by challenge with systemic live-attenuated viral vaccination was seen in 2 patients with IFNAR1 deficiency, both similarly healthy until vaccination [3]. However, the recent identification of *IFNAR1* variants in 2 patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) highlights the additional importance of type I IFNs in immunity to naturally acquired viruses [4].

In this study, we investigated a previously well 15-month-old boy who developed severe illness following MMR vaccination, comprising progressive and ultimately fatal hyperinflammation meeting diagnostic criteria for hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH; see case summary, Figure 1A, Supplementary Table E1). Analysis of serum (Supplementary Table E2) and cerebrospinal fluid (Supplementary Table E3) did not yield evidence of vaccine-strain viral replication, nor was an alternative infectious etiology identified, other than low-level Epstein-Barr virus (EBV) reactivation. Detailed immune phenotyping showed monocytosis and T-cell lymphocytosis, with low numbers of B cells and cDC1 (Supplementary Figure E1, Supplementary Table E4). Despite aggressive antiviral, immunomodulatory therapy, and intravenous immunoglobulins (IVIG), he developed encephalopathy with abnormal neuroimaging and succumbed suddenly approximately 6 months after presentation (Supplementary Figure E2-E4). Rapid diagnostic whole exome sequencing revealed a novel homozygous nonsense variant (c.922C>T) in *IFNAR1*, introducing a premature stop codon in the third extracellular domain of IFNAR1 protein (p.Gln308Ter, Figure 1B). This variant was absent from the GnomAD database and predicted to be deleterious by in silico tools (Supplementary Table E5). No protein product was detected when probing primary dermal fibroblast lysates with N-terminal (Figure 1C) or C-terminal IFNAR1 antibody (Supplementary Figure E5), indicative of complete IFNAR1 deficiency. Scrutiny of a comprehensive panel of genes linked to inborn errors of immunity within the patient's exome data revealed no additional candidate disease-causing variants.

Upon ligand binding, the ternary complex of IFNAR1-IFNAR2 initiates an intracellular signaling cascade in which reciprocal transphosphorylation of the receptor-associated kinases JAK1 and TYK2 is followed by phosphorylation of the signal transducers and activators of transcription STAT1 and STAT2. The majority of the transcriptional response to IFN- $\alpha\beta$ is attributable to the heterotrimer formed of phosphorylated STAT1 and STAT2 together with IRF9. This complex, known as interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3), translocates to the nucleus where it interacts with interferon-sensitive response

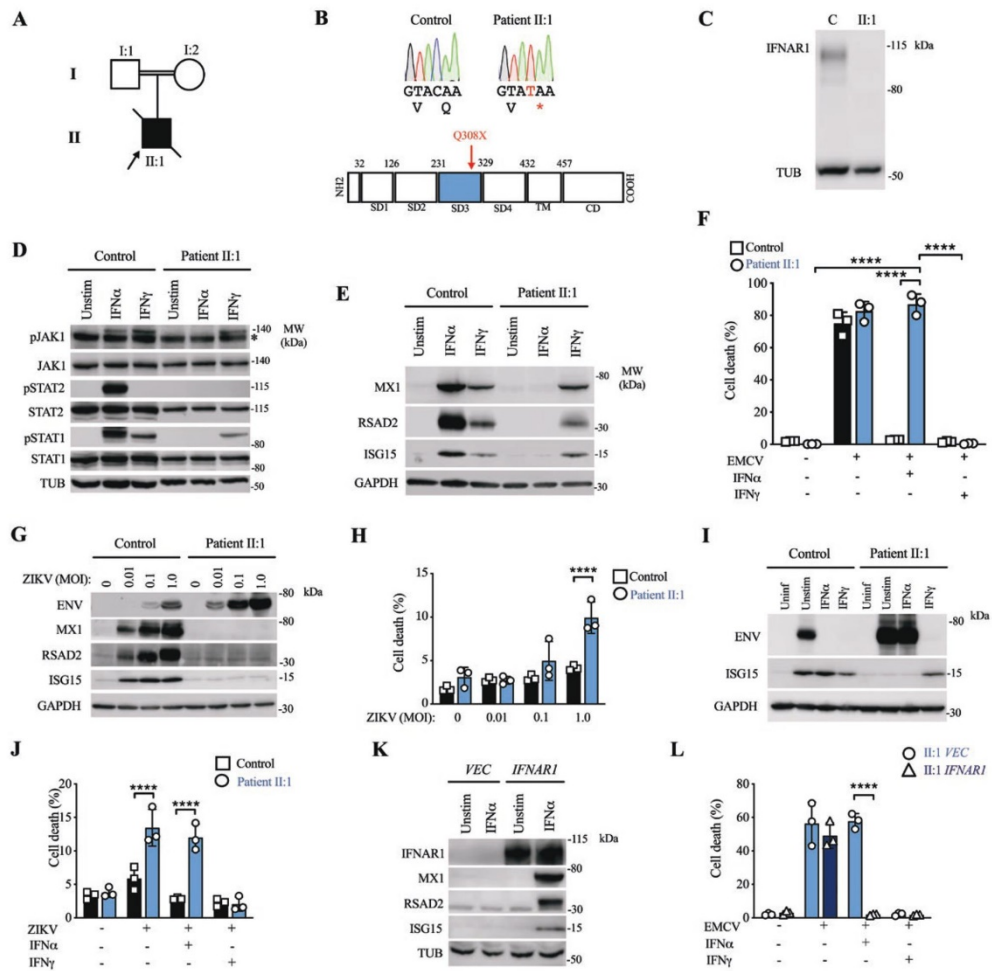


Figure 1. A, Pedigree. B, Sanger sequencing confirmation of variant with IFNAR1 protein domains. C, IFNAR1 deficiency (immunoblot). D, Signaling by IFN- α 2b or IFN- γ (1000 IU/mL, 30 m, immunoblot). E, ISG induction by IFN- α 2b or IFN- γ (1000 IU/mL, 16 h, immunoblot). F, EMCV cytopathicity protection assay. G, ZIKV envelope (ENV), ISG15, RSAD2, and MX1 expression (immunoblot) in fibroblasts (H) ZIKV cytopathicity assay. Protection against ZIKV by IFN- α 2b or IFN- γ (MOI 1.0, 1000 IU/mL, 24 h) by (I) immunoblot and (J) viability assay. Complementation with *IFNAR1* but not empty vector (*VEC*) restores (K) ISG induction by IFN- α 2b (1000 IU/mL, 16 h, immunoblot) and (L) IFN- α 2b-mediated protection against EMCV. All experiments repeated $n = 3$ times in II:1 and control primary fibroblasts. Mean \pm SD. **** $P < .001$, 2-way ANOVA with Tukey's post-test. *nonspecific band. Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; EMCV, encephalomyocarditis virus; IFN, interferon; IFNAR1, interferon alpha/beta receptor alpha chain; ISG, interferon-stimulated gene; MOI, multiplicity of infection; ZIKV, Zika virus.

elements (ISREs) to activate the transcription of a large number of interferon-stimulated genes (ISGs). A fraction of the phospho-STAT1 instead homodimerizes to form the IFN- γ activation factor (GAF), agonizing a distinct but overlapping set of genes bearing IFN- γ activation sites (GAS), more typically associated with type II IFN (IFN- γ) signaling. The predicted effect of IFNAR1 deficiency is to prevent signaling and

downstream functional responses to IFN- α but leave intact responses to IFN- γ .

Consistent with this prediction, phosphorylation of JAK1 and its downstream targets STAT1 and STAT2 was undetectable in IFNAR1-deficient patient fibroblasts exposed to IFN- α 2b for 30 minutes, as revealed by immunoblotting of whole cell lysates, whereas phosphorylation of JAK1 and STAT1 upon

exposure to IFN- γ was preserved (Figure 1D). The same pattern was observed by analysis of STAT1 phosphorylation in patient lymphocytes and monocytes by phospho-flow cytometry (Supplementary Figure E6). Accordingly, immunoblotting revealed failure to induce ISG protein products in IFNAR1-deficient patient fibroblasts exposed overnight to IFN- α 2b despite intact responses to IFN- γ (Figure 1E). To address the functional impact, we challenged cells with the picornavirus encephalomyocarditis virus (EMCV). In this experiment, fibroblasts were pretreated with IFN- α 2b or IFN- γ overnight prior to infection, at a dose that was previously determined to prevent cytopathic effect (CPE) in control cells, and then examined at 24 hours postinfection. IFNAR1-deficient cells were susceptible to CPE despite IFN- α 2b exposure, but were rescued by IFN- γ treatment, confirming a specific defect of IFN- α β -mediated antiviral immunity (Figure 1F).

To extend and confirm these findings, we infected cells with the flavivirus Zika virus (ZIKV) at different multiplicities of infection, examining expression of viral envelope protein and ISGs by immunoblot at 48 hours postinfection (Figure 1G). In patient cells, we saw excessive viral protein expression (Supplementary Figure E7), accompanied by the failure to induce expression of ISG15, RSAD2, and MX1, reflecting a defect of IFNAR-mediated antiviral resistance and correlated with susceptibility to viral cytotoxicity (Figure 1H). Treatment of patient cells with exogenous IFN- γ but not IFN- α 2b prevented ZIKV infection (Figure 1I) and CPE (Figure 1J).

To prove definitively that the loss of IFNAR1 was responsible, we complemented patient fibroblast cells with full-length human *IFNAR1* delivered by lentiviral transduction. Lentiviral transduction of *IFNAR1* in patient fibroblasts, but not empty vector, restored induction of ISGs (Figure 1K) and formation of an antiviral state in response to IFN- α 2b (Figure 1L), thereby confirming the genotype-phenotype association.

We report a new case of complete IFNAR1 deficiency, complementing a recent report of homozygous IFNAR1 deficiency in 2 unrelated children [3]. In all 3 of these cases and similar to IFNAR2-deficient patients [2], viral susceptibility became apparent only following inoculation with live-attenuated viral vaccines. At first sight, this contrasts with the broader susceptibility of STAT2- or IRF9-deficient patients [5–7] to viruses naturally encountered at mucosal surfaces, which might be explicable in terms of functional redundancy between type I and type III IFNs at the mucosa [1]. However, the recent discovery of 2 further cases of IFNAR1 deficiency among persons with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) implies that, for SARS-CoV-2 at least, type I IFNs can play a defining role in the host response to natural pathogens [4]. This conclusion is further supported by the detection of neutralizing antibodies against type I but not type III IFNs in 10% of severe COVID-19 cases [4], as well as a genome-wide association signal with *IFNAR2* in an independent cohort [8].

Our case expands the phenotypic spectrum of IFNAR1 deficiency to include HLH-like hyperinflammation, previously noted in IFNAR2 deficiency and increasingly recognized in other defects of IFN- α β immunity such as STAT2 or IRF9 defects [7, 9]. Defining the pathomechanism of hyperinflammation in this context, particularly its relationship to dysregulated inflammatory signaling and/or viral replication, is an important area for future work. Despite the temporal association with vaccination, our case was notable for the absence of detectable vaccine-strain dissemination. A similar picture has been observed in some STAT1- and STAT2-deficient patients with hyperinflammation [12, 11]. Although we could not exclude a contribution of low-level EBV reactivation, sterile autoinflammation has emerged as a distinct clinical phenotype in defects of IFN- α β signaling [7]. This suggests a more complex mechanism involving the loss of IFN- α β regulation [1]. On the face of it this is paradoxical, because uncontrolled IFN- α β signaling is itself associated with HLH-like sterile inflammation [12]. Yet IFN- α β also negatively regulates various cytokine pathways, including interleukin (IL)-1 β [13] and IL-17 [14]. Immunomodulatory properties of IFN- β are exploited in therapy for immune-mediated diseases such as multiple sclerosis. The partial clinical response to corticosteroids and IL-1 β blockade in our case lends some support to the hypothesis that loss of IFN- α β signaling contributes to disordered immune network activity. In the context of viral disease, it appears that a correctly calibrated IFN- α β response is necessary to prevent immunopathology. This is the “goldilocks” principle of immune homeostasis, where both inadequate and excessive activity contributes to disease.

Hyperinflammation is central to the pathogenesis of severe COVID-19, as demonstrated by the clinical effectiveness of corticosteroids. Our novel case of IFNAR1 deficiency reveals a potential role for IFN- α β in preventing hyperinflammation, not simply through direct control of viral replication [2, 3] but possibly also via its immunoregulatory action toward other cytokines. The loss of both aspects of IFN- α β function might contribute to the susceptibility of patients with *IFNAR1* defects to severe COVID-19 [4, 9]. Understanding the cellular and molecular links between defective IFN- α β signaling and pathogenic inflammation will be critical in guiding therapy for severe viral disease.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Clinical Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Note

Potential conflicts of interest. F. G. received funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GO2955/1-1) as well as the Bubble Foundation. C. F. H. is funded by a Medical Research Council (MRC) studentship (MR/N013840/1). V. K., E. E., and M. E. are funded by the Ministry of Health

of the Czech Republic (NV19-05-00332). S. H. and C. J. A. D. are funded by the Wellcome Trust (207556/Z/17/Z and 211153/Z/18/Z, respectively). All other authors have no potential conflicts. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

1. Duncan CJA, Randall RE, Hambleton S. Genetic lesions of type I interferon signalling in human antiviral immunity. *Trends Genet* **2020**; xx:1–13.
2. Duncan CJA, Mohamad SMB, Young DF, et al. Human IFNAR2 deficiency: lessons for antiviral immunity. *Sci Transl Med* **2015**; 7:307ra154.
3. Hernandez N, Buccioli G, Moens L, et al. Inherited IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse reaction to measles and yellow fever live vaccines. *J Exp Med* **2019**; 216:2057–70.
4. Zhang Q, Bastard P, Liu Z. Inborn errors of type I IFN immunity with life-threatening COVID-19. *Science* **2020**; 21:1–9.
5. Hambleton S, Goodbourn S, Young DF, et al. STAT2 deficiency and susceptibility to viral illness in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**; 110:3053–8.
6. Hernandez N, Melki I, Jing H, et al. Life-threatening influenza pneumonitis in a child with inherited IRF9 deficiency. *J Exp Med* **2018**; 215:2567–85.
7. Bravo Garcia-Morato M, Calvo Apalategi A, Bravo-Gallego LY, et al. Impaired control of multiple viral infections in a family with complete IRF9 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* **2019**; 144:309–312.e10.
8. Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *medRxiv* **2020**; doi: 10.1101/2020.09.24.20200048.
9. Alosaimi MF, Maciag MC, Platt CD, Geha RS, Chou J, Bartnikas LM. A novel variant in STAT2 presenting with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Allergy Clin Immunol* **2019**; 144:611–613.e3.
10. Burns C, Cheung A, Stark Z, et al. A novel presentation of homozygous loss-of-function STAT-1 mutation in an infant with hyperinflammation: a case report and review of the literature. *J Allergy Clin Immunol Pract* **2016**; 4:777–9.
11. Shahni R, Cale CM, Anderson G, et al. Signal transducer and activator of transcription 2 deficiency is a novel disorder of mitochondrial fission. *Brain* **2015**; 138:2834–46.
12. Duncan CJA, Thompson BJ, Chen R, et al. Severe type I interferonopathy and unrestrained interferon signaling due to a homozygous germline mutation in STAT2. *Sci Immunol* **2019**; 4. doi: 10.1126/sciimmunol.aav7501.
13. Reboldi A, Dang EV, McDonald JG, Liang G, Russell DW, Cyster JG. Inflammation. 25-Hydroxycholesterol suppresses interleukin-1-driven inflammation downstream of type I interferon. *Science* **2014**; 345:679–84.
14. Liu L, Okada S, Kong XF, et al. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med* **2011**; 208:1635–48.

Supplementary Methods

Ethics statement and consent

This study was performed in accordance with the principles of the Helsinki declaration. Parental consent was obtained for genetic testing. Ethical approval for studies on patient fibroblasts was granted by the NRES Committee North East - Newcastle & North Tyneside 1 (Ref: 16/NE/0002).

Whole exome sequencing

Whole exome sequencing of DNA extracted from whole blood of the proband and downstream variant analysis was performed as previously described (1). Sanger sequencing to confirm the variant was undertaken according to standard methods (primer sequences available on request). Parental DNA was not available for segregation studies.

In silico prediction tools

PhastCons is a method to determine the grade of conservation of a given nucleotide, given as a score from 0-1 (2). MutationTaster uses values which are precomputed and offered by UCSC (3). The Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) score is a tool for integrating conservation and deleteriousness predictions (4).

Cells, cytokines, immunoblotting

Dermal fibroblasts from patient II:1 and three healthy controls were obtained by standard methods and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented by 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin (DMEM-10). Human recombinant IFN α 2b (Intron-A, Schering-Plough, USA) and IFN γ (Immunikin, Boehringer Ingelheim, Germany) were used at 1000 IU/mL. Immunoblotting was carried out as previously described (5).

Antibody	Host	Dilution	Source	Code
IFNAR1 (N-terminal)	Rabbit	1:200	Abcam	ab124764

IFNAR1 (C-terminal)	Rabbit	1:200	Abcam	ab45172
RSAD2	Rabbit	1:1000	CST	13996
ISG15	Rabbit	1:1000	CST	2743
STAT2	Mouse	1:2000	SCB	sc-1668
pSTAT2	Rabbit	1:2000	CST	8841
STAT1	Rabbit	1:1000	CST	9172
pSTAT1	Rabbit	1:1000	CST	7649
JAK1	Rabbit	1:500	CST	3344
pJAK1	Rabbit	1:500	CST	74129
MxA	Rabbit	1:1000	SCB	sc-50509
Zika Envelope	Mouse	1:5000	BioFront Tech	BF-1176-56
α -tubulin	Mouse	1:10,000	CST	3873
GAPDH	Rabbit	1:10,000	CST	5174
Anti-rabbit HRP- conjugated	Goat	Various	CST	7074
Anti-mouse HRP-conjugated	Horse	Various	CST	7076

CST = Cell Signalling Technologies; SCB = Santa-Cruz Biotechnology.

Trucount analysis

Peripheral blood absolute cell counts were obtained using TruCount™ tubes (BD Biosciences) with 200µl whole blood, stained with a surface antibody cocktail for 30 mins at room temperature before dilution in 900µl red cell lysis buffer. Analysis was performed with an LSRFortessa X-20 (BD Biosciences) running BD FACSDIVA™ 8.0.1 software and data processed with FlowJo 10.6.2 (Tree Star, Inc.) and Graphpad Prism 8.4.1.

Antigen	Fluorochrome	Clone	Manufacturer
BTLA	PECF594	J168-540	BD
CD123	BUV395	7G3	BD
CD14	BV650	M5E2	Biologend
CD16	BV510	3G8	BD/Biologend
CD163	BV711	GHI/61	Biologend
CD19	PERCPCy5.5	SJ25C1	BD
CD1c	PE-Cy7	L161	Biologend
CD2	BV421	RPA-2.10	Biologend
CD3	FITC/AF700	SK7(Leu4)	BD/Biologend
CD303	BV605	201A	Biologend
CD304	BV605	12C2/U21-1283	Biologend/BD
CD34	APCCy7	581	Biologend
CD4	PE	SK3 (Leu3a)	BD
CD45	AF700	HI30	Biologend
CD5	BUV730	UCHT2	BD
CD56	APC	NCAM16.2	BD
CD8	APC-Cy7	SK1	BD
CD88	PERCPCy5.5	S5/1	Biologend
Clec9A	APC	8F9	Biologend
HLA-DR	BV785	L243	Biologend

BD = BD Biosciences

Phosflow

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patient and healthy transport control were stimulated with IFN α (0.5 μ g/ml, Abcam, Cambridge, UK) or IFN γ (0.5 μ g/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN) for 15 or 30 min at 37°C and intracellular signaling was arrested using 4% formaldehyde for 10 min at

room temperature. Erythrocytes were lysed using 0.1% Triton X-100 for 15 min at 37°C and the leukocytes were permeabilized using 80% ice-cold methanol. B- and T-lymphocytes and monocytes were discriminated according to CD45-APC-H7 (BD Biosciences, San Jose, CA), CD19-PE-Cy7 (Beckman Coulter, Miami, FL), CD3-PerCP-Cy5.5 (Exbio, Vestec, Czech Republic) and CD14-Brilliant Violet 605 (Biolegend, San Diego, CA), and phosphorylated STAT1 (Tyr701) (BD Biosciences). Data were acquired with LSRII flow cytometer and analyzed with FlowJo software (BD Biosciences).

Virus infections

Primary human dermal fibroblasts were infected with encephalomyocarditis virus (kindly provided by D. Young and R. Randall, St Andrew's University, UK) at 10^5 pfu/mL for 24 hours or with Zika virus strain H/FP/2013 (kindly provided by W. James, University of Oxford, UK) at multiplicity of infection (MOI) = 1.0 (for IFN treatment experiments) or MOI = 1.0 to 0.01. At 2 hours post infection, the inoculum was removed and replaced with fresh medium (DMEM-10), with or without IFN treatment as indicated, for 48 hours prior to imaging analysis or lysis with RIPA buffer (150 mM sodium chloride, 50 mM Tris pH 8, 1% triton X-100, 0.5% sodium dodecyl sulphate) supplemented with phosphatase inhibitor (Roche), 1mM sodium orthovanadate, 10mM sodium fluoride, 10% dithiothreitol (Sigma-Aldrich) and 25% NuPAGE LDS sample buffer (ThermoFisher).

Cell viability assay

After dermal fibroblast monolayers were treated as stated, the medium was removed and replaced with live cell imaging solution (ThermoFisher) containing 2 drops per mL of propidium iodide and Hoechst. Plates were then incubated for 15 minutes at 37°C and 5% CO₂ before being imaged using an EVOS FL fluorescence microscope (ThermoFisher). Image analysis was performed using a bespoke pipeline developed in CellProfiler (Broad institute) to calculate the percentage of dead cells in each condition (Hanrath et al, manuscript in preparation). All experiments were performed in technical duplicate and the average value of n=4 images per well was used for analysis. All experiments were performed at least three times.

Lentiviral cloning, viral production and complementation

The destination vector IFNAR1_pCSdest was a kind gift of R. Reeves (Johns Hopkins University, Baltimore, USA). The *IFNAR1* insert was cloned into the Gateway® pDONR207 entry vector (ThermoFisher) using BP clonase (ThermoFisher) and its sequence was confirmed by Sanger-sequencing. It was further inserted into the pLenti-EF1a-GATEWAY-RSV-Puromycin-GFP (AMS Biotechnology, UK) vector using LR clonase (ThermoFisher). Lentiviruses were produced by co-transfection of psPAX2, pCMV-VSV-G and lentiviral transfer plasmid in HEK293FT cells (ThermoFisher) using polyethylenimine (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK). Virus-containing supernatants were harvested at 48 h post-transfection, filtered (0.45 µm sterile filter) and concentrated 100-fold with Lenti-X™ Concentrator (TaKaRa, Shiga, Japan) according to manufacturer's instructions. Cells were spinoculated in 6-well plates (1.5 h, 2000 rpm), with target or null control viral particles in a total volume of 0.5 mL DMEM-10 containing hexadimethrine bromide (Polybrene, 6 mg/mL, Sigma-Aldrich). Cells were rested in virus-containing medium for 4 hrs then incubated in fresh DMEM-10 until 48 h, when they were subjected to selection with 0.75 mg/mL puromycin (Gibco). Antibiotic-containing medium was refreshed every 72 h.

Statistical analysis

All experiments were repeated a minimum of n=3 times with multiple control lines. The mean of technical replicates for each experiment was used for data analysis. Data were analysed using Prism version 8.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) by two-way ANOVA with Tukey's post-test correction for multiple comparisons. Adjusted alpha < 0.05 was considered statistically significant.

Case Summary

The patient, a 15-month-old boy of consanguineous parentage, presented with fever up to 40°C and transient exanthem five days after the first dose of measles, mumps, rubella (MMR) vaccination. He had been born at term, had no past history other than mild laryngeal stenosis and had received prior routine childhood vaccinations without incident (not including prior live-viral vaccines). Family history revealed two unexplained deaths of infants in his grandparent's generation. Examination revealed tonsillitis and clindamycin was initiated. A pharyngeal swab taken at this first presentation was positive for Epstein-Barr virus (EBV) by PCR and metizoprinol/isoprinosine (100 mg/kg/day) was added. Over the following ten days the boy suffered from recurrent fever and deterioration of his clinical condition resulted in hospital referral. On admission, generalised lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, oedema and a salmon pink exanthem on the trunk were noted. Radiologic evaluation revealed polyserositis with cardiac and pleural effusion as well as ascites. Initial laboratory results showed increased C-reactive protein (94 mg/L) and interleukin-6 (77.9 ng/L) levels as well as thrombocytopenia. Additional laboratory abnormalities, including low fibrinogen, elevated triglycerides as well as high ferritin and elevated soluble CD25, supported the diagnosis of haemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) (Table E1). Bone marrow aspirate revealed macrophage activation but no haemophagocytosis. Investigation for bacterial and viral infection in CSF (Table E3) and blood (Table E4), including PCR testing for CMV, HSV-1/2 and VZV, borrelia, measles, mumps and rubella, was negative. Serology showed IgM against Parvo B19, of uncertain significance, and IgG was reactive against EBV (IgM not detected), consistent with previous exposure to EBV. PCR testing revealed low-level EBV positivity in blood (283 IU/mL) but was otherwise negative. Additional IgG against HSV, VZV and CMV without corresponding IgM positivity was noted, whereas baseline serology was negative for HIV, HBV, HCV, Toxocara and Toxoplasma. He was treated with antivirals (aciclovir 250 mg/m²) and for presumed HLH with corticosteroids, cyclosporin A and anakinra (10 mg/kg/day) with additional IVIG (0.4 mg/kg/day). Substantial clinical improvement was seen within two days, with resolution of fever and substantial improvement in laboratory results (Figure E4). Genetic testing for variants in primary HLH genes was negative.

However, fever recurred a few days later although he was not at this point unwell. Lymphopenia and monocytosis were noted alongside kidney injury, accompanying high serum-levels of cyclosporin A, which was discontinued (day 15). Screening for infectious agents in blood was again indicative of low-level EBV reactivation (PCR 1773 IU/mL). Despite treatment escalation with famaciclovir (12.5 mg/kg/day) in addition to acyclovir (500 mg/m²) and IVIG (0.4 mg/kg/day), the patient developed a progressive systemic inflammatory response syndrome with respiratory failure. Mechanical ventilation was necessary for five days before a stepwise improvement of the boy's condition was achieved over several weeks, during which time prednisolone and anakinra were weaned down. At this point, genetic testing by whole exome sequencing was undertaken, identifying a nonsense mutation in *IFNARI*. The boy was discharged on antibacterial, antiviral and antifungal prophylaxis, regular IVIG administrations were commenced and prednisolone and anakinra were subsequently stopped (day 53).

Two weeks later the patient was readmitted with fever, generalized seizures, hyponatraemia and treatment-refractory hypertension (day 67). Screening for viral disease in blood (day 77) and cerebrospinal fluid (day 81) was again negative for viruses including measles, mumps and rubella although EBV viremia had still been detected a week earlier (PCR 3480 IU/mL at day 70). Cranial MRI revealed symmetric, bilaterally distributed high T2 signal within the parieto-occipital white matter (Figure E2A-D). Additionally, a diffusion restriction in the left hippocampus (Figure E2E) and a generalized cerebral atrophy were noted. On the same day, elevated CSF protein (950 mg/L) was detected. On follow-up scanning six weeks later (day 122), when the patient was still ventilation-dependent and unconscious, the posterior white matter signal changes had resolved (Figure E3). However, the cerebral atrophy worsened between the scans, with further generalized loss of volume specifically in the left medial temporal lobe. Whereas the posterior white matter changes and their resolution over time alone raise the possibility of posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES), the involvement of the left hippocampus advocates for an inflammatory or infective aetiology. The dose of IVIG was increased (2 g/kg/day). However, limited neurological improvement was observed and he was transferred at the request of his parents to the local hospital, where he sadly died of sudden cardiorespiratory failure at the age of 21 months.

The aetiology of HLH in this case was unclear. There was clearly a temporal association with MMR administration, however the absence of detection of MMR viruses in CSF or serum argued against MMR dissemination as the cause. EBV reactivation may have been a factor in driving HLH, however this remained at relatively low levels. It is also possible that an additional unidentified infection may have contributed. However, in retrospect, the correlation between clinical disease activity and inflammatory markers (including CRP and IL6), and the initial response to corticosteroid and anakinra, suggested an inflammatory component.

2004 Criteria	Patient II:1
Clinical criteria	
Fever	Yes
Splenomegaly	Yes
Laboratory criteria	
Cytopenia	Yes
Fibrinogen < 1.5g/L	Yes (0.9 g/L)
Triglycerides > 265 mg/dL	Yes (331.8 mg/dL)
Ferritin > 500 ng/mL	Yes (1840 ng/mL)
sCD25 > 2400 U/mL	Yes (5840 U/mL)
Histopathological criteria	
Haemophagocytosis	No

Table E1. HLH diagnostic criteria according to HLH-2004 guidelines. A score of $\geq 5/8$ supports HLH.

	Day -8	Day 6	Day 19	Day 28	Day 46	Day 70	Day 77
EBV	IgM - IgG + PCR -	PCR + 283 IU/mL	PCR + 1773 IU/mL	PCR + 4347 IU/mL	PCR + 551 IU/mL	PCR + 3480 IU/mL	IgM - IgG + PCR -
HSV	IgM - IgG + PCR-						IgM - IgG + PCR -
VZV	IgM - IgG + PCR -						IgM - IgG + PCR -
CMV	IgM - IgG + PCR -						IgM - IgG + PCR -
Parvo B19	IgM + IgG -				IgM + IgG -		
Measles	IgM - IgG - PCR -						IgM + IgG + PCR -
Mumps	IgM - IgG - PCR -						IgM + IgG - PCR -
Rubella	IgM - IgG - PCR -						IgM - IgG - PCR -

Table E2. Virologic assessment in blood. Day -8 refers to tests performed in an outpatient setting prior to hospital admission.

	Normal range	Day 6	Day 81	Day 131
Cell count	Less than 15	3 (lymphocytes)	10 (mostly lymphocytes)	6 (lymphocytes)
Glucose [mmol/L]	2.47-4.12	3.59	4.25	4.05
Lactate [mmol/L]	1.1-2.8	1.12	1.16	1.12
Protein [mg/L]	150-450	180	950	567
Multiplex PCR [HSV, VZV, EBV, CMV, measles, rubella and mumps]	Negative	Negative	Negative	Negative
Antibodies [Borrelia]	Negative	Negative	Negative	Negative

Table E3. Analysis of cerebrospinal fluid. Multiplex PCR and serology tested for HSV, VZV, EBV, CMV, borrelia, measles, rubella and mumps.

Parameter	Value	Normal range
Total lymphocytes	1030	1600-6700
CD3+ CD4+	5080	1000-4600
CD3+ CD8+	1670	400-2100
CD3- CD19+	2690	600-2700
CD3- CD56+	240	200-1200
IgG (g/L)	4.03	2.75-10
IgM (g/L)	3.39	0.85-1.18
IgA (g/L)	0.43	0.1-0.77
IgE (IU/mL)	23.2	<60
Tetanus (mg/L)	0.21 mg/L	>0.15
Diphtheria (mg/L)	0.11 mg/L	>0.1
Haemophilus (IU/mL)	1.14 IU/mL	>1.0
Pneumococcus (IU/mL)	9.97 IU/mL	>20

Table E4. Diagnostic investigation results.

PhastCons	MutTaster	CADD
0.57 (0-1)	Disease-causing	35 (Max. 36)

Table E5. In silico predictions of deleteriousness of c.922C>T *IFNAR1* variant.

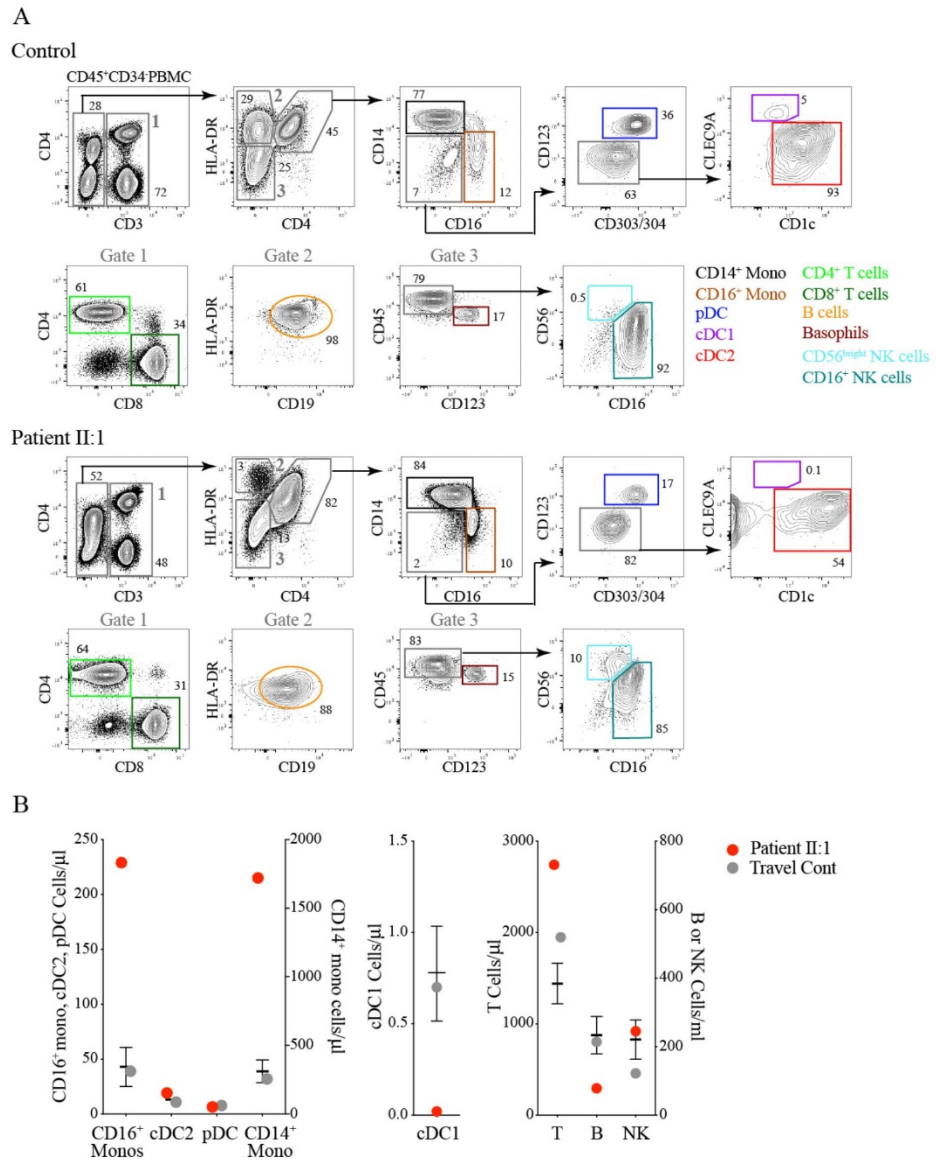


Figure E1. Absolute cell counts from whole blood of the proband during acute illness (second admission) and a healthy control (data from a single experiment). (A). Flow cytometric analysis of Trucount™ cell quantification and phenotyping from whole blood identified CD4⁺ and CD8⁺ CD3⁺ T cells (Gate 1 and light or dark green gates, respectively), HLA-DR⁺CD4⁺CD19⁺ B cells (Gate 2 and

orange gate), HLA-DR⁺CD4⁺CD123⁺CD45^{low} basophils (Gate 3 and burgundy gate), CD56^{bright} and CD16⁺ NK cells (Gate 3 and turquoise and teal gates, respectively), HLA-DR⁺CD4⁺CD14⁺ monocytes (black gate), CD16⁺ monocytes (brown), CD123⁺CD303/4⁺ pDC, CLEC9A⁺ cDC1 (purple) and CD1c⁺ cDC2 (red). Gated populations quantified as percent of parent gate.

(B). Summary histograms show the absolute monocyte, dendritic cell and lymphocyte subset counts from the proband (red dots) and a healthy travel control (gray dots). Bars represent mean + 95% CI of n=18 healthy controls.

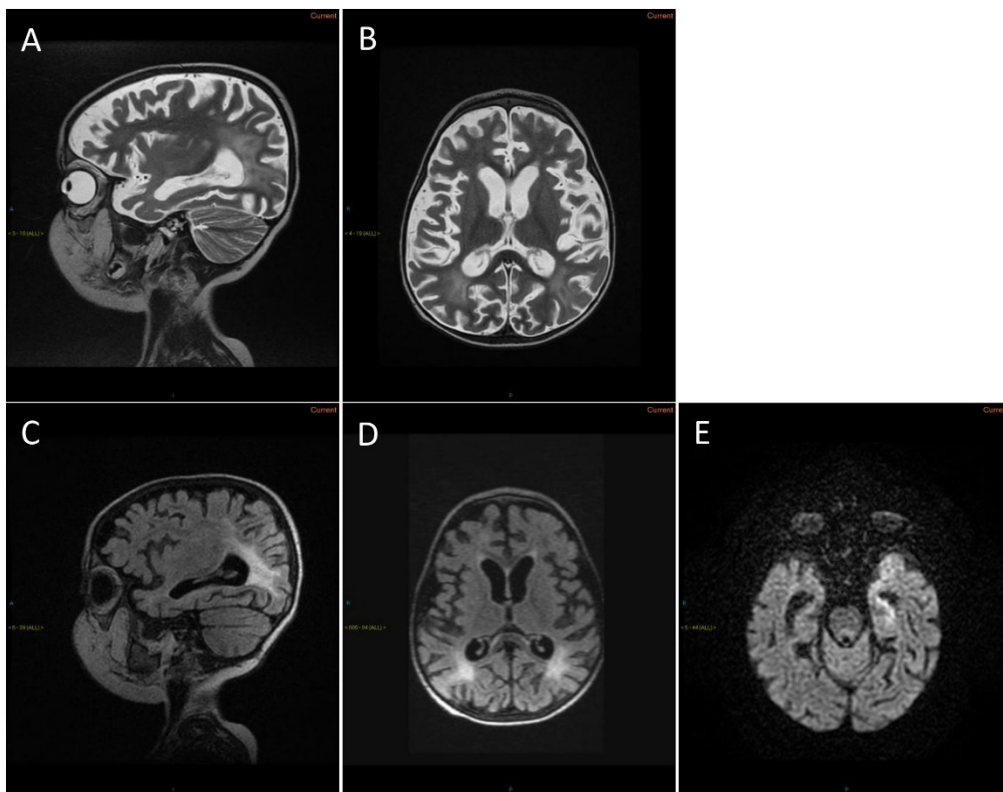


Figure E2. First magnetic resonance imaging performed on day 81. (A) sagittal T2, (B) axial T2, (C) sagittal FLAIR, (D) axial FLAIR, (E) axial DWI, demonstrating symmetric, bilateral white matter

changes in the parieto-occipital region, diffusion restriction in the left hippocampus and generalized cerebral atrophy. FLAIR Fluid-attenuated inversion recovery, DWI Diffusion-weighted imaging.

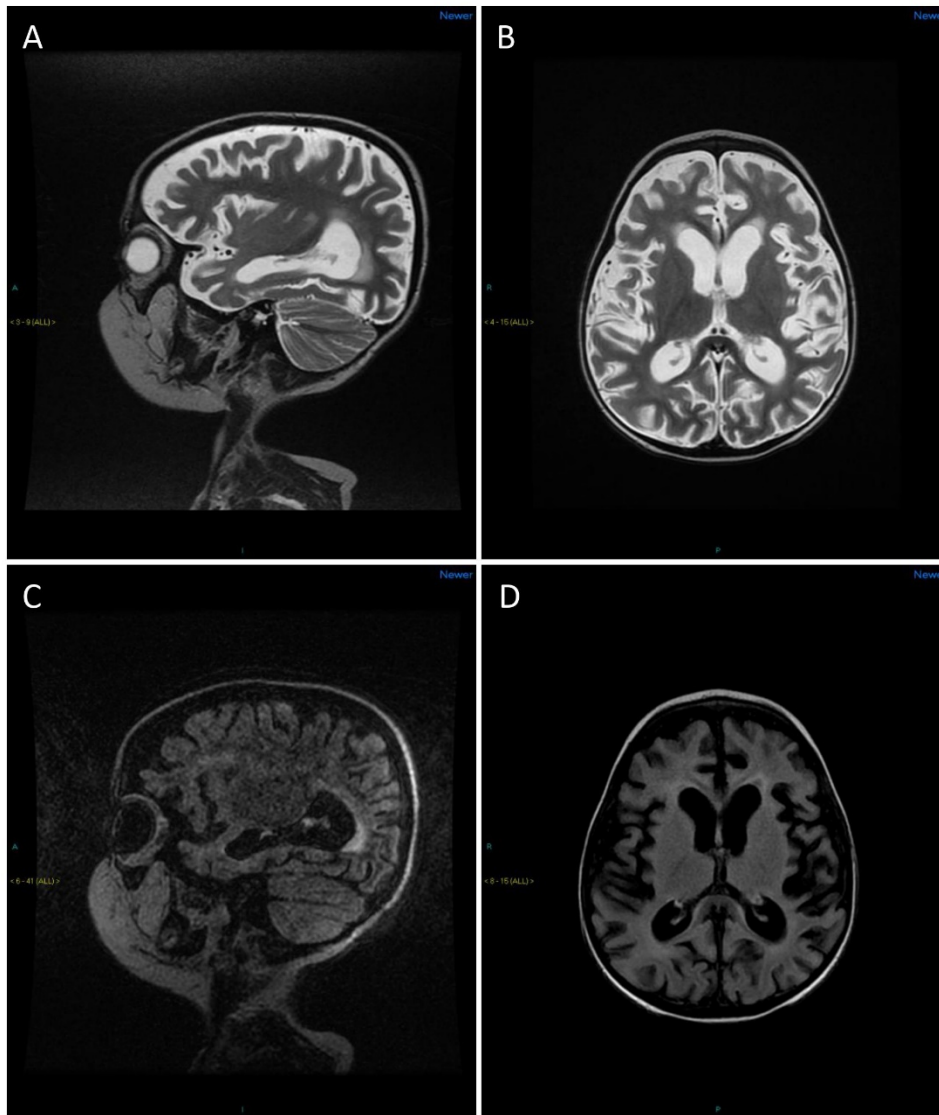


Figure E3. Follow-up magnetic resonance imaging performed on day 122. (A) sagittal T2, (B) axial T2, (C) sagittal FLAIR, (D) axial FLAIR, showing improvement in the white matter changes but

worsened generalized cerebral atrophy. FLAIR Fluid-attenuated inversion recovery, DWI Diffusion-weighted imaging.

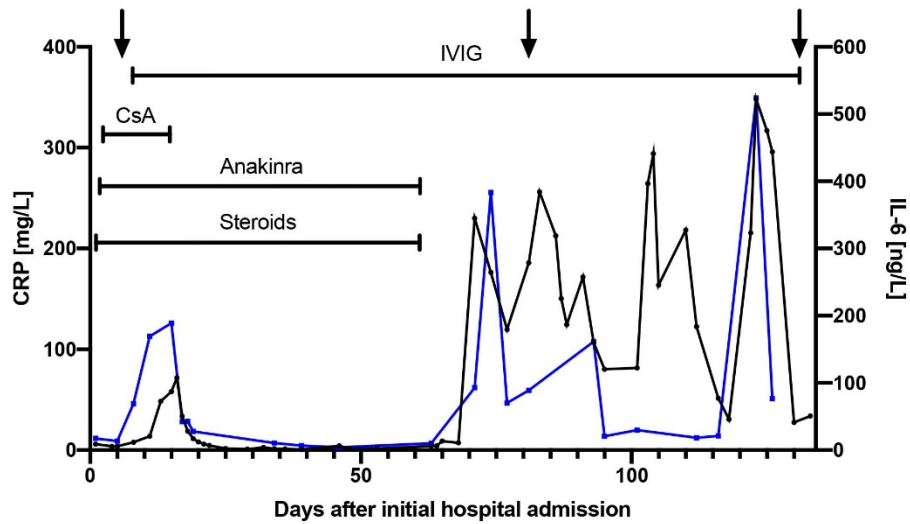


Figure E4. Course of the inflammatory markers CRP (black) and IL-6 (blue) over time alongside immunomodulatory treatment. Arrows indicate dates of lumbar punctures. CsA Cyclosporin A, IVIG intravenous immunoglobulins.

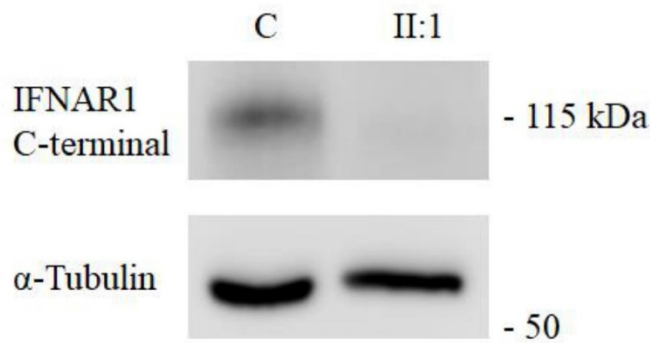


Figure E5. IFNAR1 Immunoblot using C-terminal antibody.

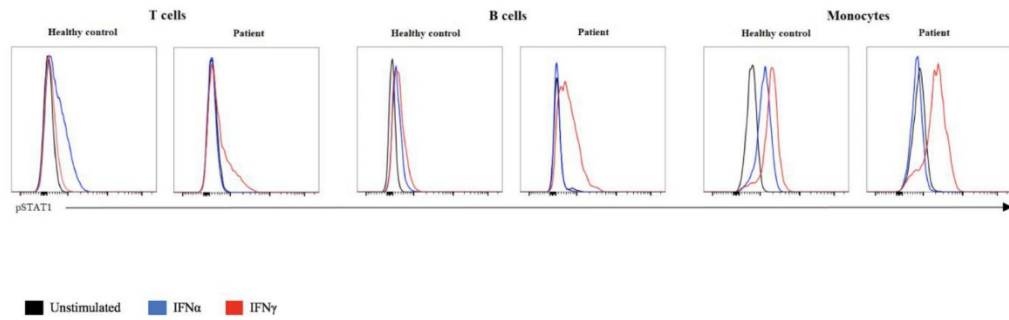


Figure E6. Phosflow analysis confirming lack of IFNAR response, as shown by pSTAT1 fluorescence intensity, in patient lymphocytes and monocytes in response to IFNs (data from a single experiment).

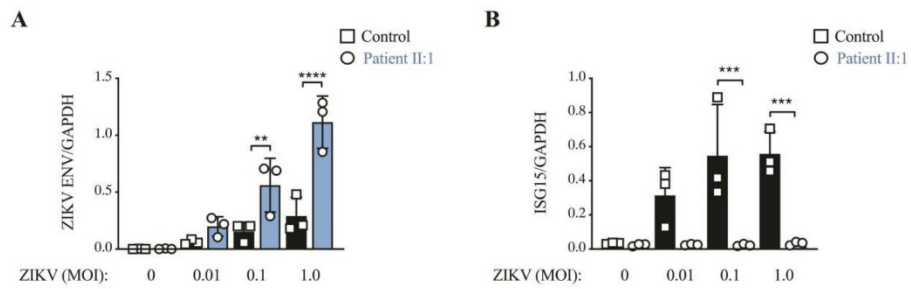


Figure E7. Densitometry analysis of immunoblots showing (A) ZIKV ENV and (B) ISG15. Mean \pm SD ** P<0.01, ***P<0.01, ****P<0.001, Two-way ANVOA with Tukey's post-test.

Supplementary references

1. Kralickova P, Milota T, Litzman J, Malkusova I, Jilek D, Petanova J, et al. CVID-Associated Tumors: Czech Nationwide Study Focused on Epidemiology, Immunology, and Genetic Background in a Cohort of Patients With CVID. *Front Immunol.* 2018;9:3135.
2. Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, Rosenbloom K, et al. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.* 2005;15(8):1034-50.
3. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods.* 2010;7(8):575-6.
4. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic acids research.* 2019;47(D1):D886-D94.
5. Duncan CJA, Thompson BJ, Chen R, Rice GI, Gothe F, Young DF, et al. Severe type I interferonopathy and unrestrained interferon signaling due to a homozygous germline mutation in STAT2. *Sci Immunol.* 2019;4(42).