

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-2-141-151

Разработка метода диагностики синдрома Вискотта–Олдрича путем оценки экспрессии белка WASP с использованием проточной цитофлуориметрии

Д.Е. Першин, О.Б. Лодоева, М.С. Фадеева, И.В. Мерсиянова, А.Л. Хорева, И.С. Владимиров, К.А. Воронин, В.В. Бриллиантова, Т.В. Варламова, В.А. Ведмедская, Ю.А. Родина, Е.В. Райкина, М.А. Масчан, А.Ю. Щербина

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Синдром Вискотта–Олдрича (СВО) является редким X-сцепленным первичным иммунодефицитом, характеризующимся микротромбоцитопенией, экземой, частыми инфекционными эпизодами, повышенным риском аутоиммунных проявлений и злокачественных новообразований. «Золотым стандартом» диагностики этого заболевания является выявление мутации в гене WAS. Данный ген кодирует белок WASP, являющийся регулятором цитоскелета и участвующий в передаче множества внутриклеточных сигналов. В настоящий момент отсутствует быстрый и надежный метод, позволяющий в кратчайшие сроки установить диагноз СВО. Ранняя диагностика у пациентов с подозрением на СВО позволяет не только своевременно инициировать поиск донора и начать подготовку к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), но также избежать развития тяжелых, жизнеугрожающих состояний в ожидании генетического подтверждения диагноза путем использования патогенетической терапии. На сегодняшний день проточная цитофлуориметрия является одним из ведущих лабораторных методов, позволяющих в течение нескольких часов получить информацию об экспрессии в клетках того или иного белка. В данной работе описана разработка надежной и быстрой лабораторной методики для диагностики СВО, основанной на проточной цитофлуориметрии. Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. В исследование были включены 46 пациентов с подозрением на СВО в возрасте от 2 месяцев до 17 лет, обследованных в период с января 2018 г. по январь 2020 г. Из них у 35 человек диагноз был подтвержден выявлением дефекта гена WAS. В данной работе было рассчитано нормальное пороговое значение индекса экспрессии WASP, составляющее 7,07, показано, что чувствительность и специфичность данного метода в диагностике СВО составляют 100% и 93,1% соответственно, отмечена отрицательная корреляция тяжести СВО и индекса экспрессии белка WASP ($r = -0,63$). Также показана практическая значимость метода для определения линейного химеризма у пациентов с СВО после ТГСК. Метод оценки внутриклеточной экспрессии белка WASP с помощью проточной цитофлуориметрии у пациентов с подозрением на СВО является быстрым, высокочувствительным и высокоспецифичным, что позволяет максимально ускорить диагностику этого заболевания.

Ключевые слова: синдром Вискотта–Олдрича, экспрессия белка WASP, проточная цитофлуориметрия, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, химеризм

Першин Д.Е. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020; 19 (2): 141–151.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-2-141-151

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 02.04.2020

Принята к печати 06.05.2020

Контактная информация:

Першин Дмитрий Евгеньевич, младший научный сотрудник, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1. E-mail: dimprsh@icloud.com

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPhOI»

Received 02.04.2020

Accepted 06.05.2020

Development of flow cytometry assay for Wiskott–Aldrich syndrome diagnosis by WASP protein evaluation

D.E. Pershin, O.B. Lodoeva, M.S. Fadeeva, I.V. Mersiyanova, A.L. Khoreva, I.S. Vladimirov, K.A. Voronin, V.V. Brilliantova, T.V. Varlamova, V.A. Vedmedskaya, Yu.A. Rodina, E.V. Raykina, M.A. Maschan, A.Yu. Shcherbina

Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

Correspondence:

Dmitry E. Pershin, Junior Researcher,
Doctor of Medical Laboratory,
Laboratory of Hematopoietic stem cell
transplantation and Immunotherapy,
Dmitry Rogachev National Medical
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology, Immunology, Ministry
of Healthcare of Russian Federation.
Address: Russia, 117997, Moscow,
Samoy Mashela st., 1
E-mail: dimprsh@icloud.com

Wiskott–Aldrich syndrome (WAS) is a rare X-linked primary immunodeficiency characterized by microplatelet thrombocytopenia, eczema, frequent infections and an increased risk of autoimmune disorders and malignant neoplasms. Mutation detection in WAS gene is the gold standard for diagnosis of this disorder. This gene encodes a WASP protein, which works as regulator of cell cytoskeleton and is involved in the transmission of many intracellular signals. Nowadays there is no rapid and reliable method that allows to confirm WAS in a short period of time. Early detection of WAS in patients enables initiation of a donor search and preparation for the HSCT procedure. It also helps to avoid the development of severe and life-threatening conditions during waiting for genetic confirmation of the diagnosis by using pathogenetic therapy. Currently flow cytometry is one of the leading laboratory methods that permits to get the information about the expression of a protein in several hours. The study below describes rapid and reliable based on flow cytometry assay for WAS diagnosis. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. The study included 46 patients with suspected WAS from 2 months to 17 years old. Patients were examined from January 2018 to January 2020. WAS gene defect was confirmed in 35 patients. It was calculated that normal threshold value for WASP expression is 7.07 with sensitivity and specificity 100% and 93.1% respectively. Besides negative correlation between WASP expression index and WAS clinical severity was shown ($r = -0.63$). This flow cytometry assay can be used for chimerism detection in WAS patients after HSCT. The flow cytometry assay for WASP protein evaluation is rapid, highly sensitive and highly specific. It allows to speed up diagnosis of this disorder.

Key words: Wiskott–Aldrich syndrome, immune deficiency, Wiskott–Aldrich syndrome protein, diagnostic assay, flow cytometry, hematopoietic stem cell transplantation, chimerism

Pershin D.E., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2020; 19 (2): 141–151.

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-2-141-151

Синдром Вискотта–Олдрича (СВО; Wiskott–Aldrich syndrome, WAS) – это редкое X-сцепленное заболевание, в основе которого лежат мутации в гене WAS [1, 2]. Продуктом его экспрессии является белок WASP, участвующий во множестве процессов, таких как трафик внутриклеточных структур, межклеточное взаимодействие, трансдукция внутриклеточных сигналов и др. [3–5]. Данный белок представлен 502 аминокислотными остатками, синтезируется клетками гемопоэтического ряда и находится преимущественно в цитоплазме клетки с градиентным увеличением его по направлению к мембране [6]. В структуре самого белка WASP можно выделить несколько функционально важных доменов: N-концевой WASP-гомологичный домен 1, расположенный за ним Basic Region, далее GTPase-связывающий домен, регион Polyproline-rich и C-концевой Verprolin homology/Central region/Acid region (VCA) домен [4, 7, 8]. Пациенты с мутацией в гене WAS характеризуются разной степенью выраженности типичных симптомов: микроформной тромбоцитопенией, частыми инфекционными эпизодами, нарушением специфического антителообразования, аутоиммунными проявлениями, экземой и повышенной частотой онкологических заболеваний. Согласно литературным данным, гетерогенность клинического фенотипа может быть обусловлена типом и локализацией мутации по отношению к основным функциональным доменам белка. Миссенс-мутации в экзонах 1–4, как правило, приводят к более легкому течению заболевания, вплоть до изолированной тромбоцитопении, так называемой X-сцепленной тромбоцитопении (ХСТ). Вероятно,

это связано с возможностью реализации части функций белка при этих мутациях [9]. Данные пациенты имеют более благоприятный прогноз течения заболевания, и проведение трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) для них зачастую является предметом дискуссии, в то время как пациенты с развернутой клиникой СВО нуждаются в проведении данной процедуры в кратчайшие сроки [1, 10]. Таким образом, возможность раннего прогнозирования тяжести СВО имеет важное клиническое значение.

Несмотря на достаточно выраженный клинический фенотип заболевания, СВО иногда трудно дифференцировать от других состояний, сопровождающихся тромбоцитопенией, и зачастую состояние пациента трактуется как иммунная тромбоцитопения, что может привести к неправильному лечению и отсрочке ТГСК [11].

На настоящий момент «золотым стандартом» диагностики СВО является обнаружение мутации в гене WAS. Однако часто клиническая значимость ранее не описанных мутаций может быть неясна и требовать дополнительного подтверждения. Как правило, генетические методы обследования требуют большого количества времени, а их интерпретация и формирование окончательного результата могут занимать от 2 до 4 нед. Кроме того, в редких случаях описаны патогенные мутации, которые не выявляются стандартными методами молекулярно-генетической диагностики, такими как секвенирование по Сэнгеру или высокопроизводительное секвенирование экзона/таргетной панели генов: мутации, локализованные в некодирующих областях гена (глубоко в интронах или в регуляторных элементах),

протяженные делеции в гетерозиготном состоянии, инверсии части гена и др. [12–14]. В таких случаях молекулярно-генетическая диагностика дает ложно-отрицательный результат. Поэтому дополнительные лабораторные тесты необходимы, так как они позволяют составить целостную картину об экспрессии и функциональной активности белка. Проточная цитометрия является одним из наиболее эффективных методов для скринингового исследования экспрессии различного рода белков, в частности WASP, у пациентов с подозрением на СВО [3, 15–18]. Кроме того, в литературе неоднократно упоминалось, что уровень экспрессии внутриклеточного белка WASP у пациентов с СВО может быть решающим фактором в

прогнозировании клинического исхода и определении клинического фенотипа СВО/ХСТ, в то время как корреляция генотипа с фенотипом СВО дискуссионна [9, 19, 20].

На данный момент в мире нет четких лабораторных рекомендаций относительно стандартизации исследования экспрессии белка WASP, определяемой с помощью проточной цитофлуориметрии, в связи с рядом причин: отсутствие единообразного подхода к методике оценки экспрессии белка, сложности, связанные с вариабельной экспрессией среди здоровых индивидуумов, относительно быстрая деградация белка в процессе транспортировки материала и т. д.

Таблица 1

Клиническая и молекулярно-генетическая характеристика исследуемой группы пациентов

Table 1

Clinical and genetic features of the patients in the study

Пациент Patient	Возраст Age	Генетический вариант WAS ¹ WAS sequence variants ¹	Экзон/ интрон Exon/ Intron	Тип варианта Mutation type	Клиническая значимость варианта ² Sequence variant clinical significance ²	Клинический фенотип Clinical phenotype	WI	Оценка тяжести, баллы Clinical score
1a	3 года 3 y.o.	c.4A>T, p.Ser2Cys	Экзон 1 Exon 1	Миссенс Missense	Неясная значимость* Uncertain significance*	СВО WAS	0,82	2
2a	13 лет 13 y.o.	c.4A>T, p.Ser2Cys	Экзон 1 Exon 1	Миссенс Missense	Неясная значимость* Uncertain significance*	СВО WAS	0,96	5
3a	17 лет 17 y.o.	c.4A>T, p.Ser2Cys	Экзон 1 Exon 1	Миссенс Missense	Неясная значимость* Uncertain significance*	СВО WAS	0,79	5
4a	16 лет 16 y.o.	c.4A>T, p.Ser2Cys	Экзон 1 Exon 1	Миссенс Missense	Неясная значимость* Uncertain significance*	СВО WAS	0,83	4
5	2 года 2 y.o.	c.11dupG, p.Met6AsnfsTer32	Экзон 1 Exon 1	Дупликация/ сдвиг рамки Duplication/ Frameshift mutation	Патогенный Pathogenic	СВО WAS	0,50	4
6	13 месяцев 13 months	c.37C>T, p.Arg13Ter	Экзон 1 Exon 1	Нонсенс Nonsense	Патогенный Pathogenic	СВО WAS	0,54	6
7	2 года 2 y.o.	c.121C>T, p.Arg41Ter	Экзон 1 Exon 1	Нонсенс Nonsense	Патогенный Pathogenic	СВО WAS	0,27	5
8	2 года 2 y.o.	c.134C>T, p.Thr45Met	Экзон 2 Exon 2	Миссенс Missense	Патогенный Pathogenic	СВО WAS	0,79	2
9	16 месяцев 16 months	c.134C>T, p.Thr45Met	Экзон 2 Exon 2	Миссенс Missense	Патогенный Pathogenic	СВО (ХСТ) WAS (XLT)	3,10	3
10	10 лет 10 y.o.	c.143C>T, p.Thr48Ile	Экзон 2 Exon 2	Миссенс Missense	Патогенный Pathogenic	СВО WAS	0,86	6
11	18 месяцев 18 months	c.167C>T, p.Ala56Val	Экзон 2 Exon 2	Миссенс Missense	Патогенный Pathogenic	СВО (ХСТ) WAS (XLT)	2,92	3
12b	18 лет 18 y.o.	c.223G>A, p.Val75Met	Экзон 2 Exon 2	Миссенс Missense	Патогенный Pathogenic	СВО (ХСТ) WAS (XLT)	1,95	5
13b	10 лет 10 y.o.	c.223G>A, p.Val75Met	Экзон 2 Exon 2	Миссенс Missense	Патогенный Pathogenic	СВО (ХСТ) WAS (XLT)	2,24	5
14	15 месяцев 15 months	c.223G>A, p.Val75Met	Экзон 2 Exon 2	Миссенс Missense	Патогенный Pathogenic	СВО (ХСТ) WAS (XLT)	1,62	4
15	2 года 2 y.o.	c.256C>T, p.Arg86Cys	Экзон 2 Exon 2	Миссенс Missense	Патогенный Pathogenic	СВО WAS	1,50	2
16	3 года 3 y.o.	c.265G>A, p.Gly89Ser	Экзон 2 Exon 2	Миссенс Missense	Неясная значимость* Uncertain significance*	СВО WAS	5,36	1
17	3 года 3 y.o.	c.269T>A, p.Leu90His	Экзон 2 Exon 2	Миссенс Missense	Неясная значимость* Uncertain significance*	СВО (ХСТ) WAS (XLT)	3,36	3
18	6 месяцев 6 months	c.314T>C, p.Leu105Pro	Экзон 3 Exon 3	Миссенс Missense	Патогенный Pathogenic	СВО WAS	1,40	5
19	7 месяцев 7 months	c.383T>G, p.Phe128Cys	Экзон 4 Exon 4	Миссенс Missense	Вероятно патогенный* Likely pathogenic*	СВО WAS	0,16	7
20с	8 лет 8 y.o.	c.413G>A, p.Arg138Gln	Экзон 4 Exon 4	Миссенс Missense	Вероятно нейтральный* Likely benign*	СВО (ХСТ) WAS (XLT)	15,60	4
21с	6 лет 6 y.o.	c.413G>A, p.Arg138Gln	Экзон 4 Exon 4	Миссенс Missense	Вероятно нейтральный* Likely benign*	СВО (ХСТ) WAS (XLT)	14,70	1

22	14 лет 14 y.o.	c.442dupA, p.Arg148LysfsTer21	Экзон 4 Exon 4	Дупликация/ сдвиг рамки Duplication/ Frameshift mutation	Патогенный Pathogenic	CBO WAS	0,84	5
23	6 месяцев 6 months	c.775delG, p.Asp259ThrfsTer2	Экзон 8 Exon 8	Делеция/сдвиг рамки Deletion/ Frameshift mutation	Вероятно патогенный* Likely pathogenic*	CBO WAS	0,38	6
24	3 месяца 3 months	c.1058_106delCACC, p.Pro353GlnfsTer91	Экзон 10 Exon 10	Делеция/сдвиг рамки Deletion/ Frameshift mutation	Вероятно патогенный* Likely pathogenic*	CBO WAS	0,16	8
25	15 лет 15 y.o.	c.1073delG, Gly358AspfsTer87	Экзон 10 Exon 10	Делеция/сдвиг рамки Deletion/ Frameshift mutation	Вероятно патогенный* Likely pathogenic*	CBO WAS	1,60	5
26	2 месяца 2 months	c.1031delC, p.Pro344LeufsTer101	Экзон 10 Exon 10	Делеция/сдвиг рамки Deletion/ Frameshift mutation	Патогенный Pathogenic	CBO WAS	0,18	4
27d	3 месяца 3 months	c.1430G>A, p.Arg477Lys	Экзон 11 Exon 11	Миссенс Missense	Неясная значимость Uncertain significance	CBO (XCT) WAS (XLT)	18,74	1
28d	4 года 4 y.o.	c.1430G>A, p.Arg477Lys	Экзон 11 Exon 11	Миссенс Missense	Неясная значимость Uncertain significance	CBO (XCT) WAS (XLT)	19,53	4
29	6 месяцев 6 months	c.274-1G>A, p.(?)	Инtron 2 Intron 2	Сайт сплайсинга Splice site	Патогенный Pathogenic	CBO (XCT) WAS (XLT)	0,57	3
30	4 года 4 y.o.	c.274-2dupA, p.(?)	Инtron 2 Intron 2	Регион сайта сплайсинга Splice site	Неясная значимость* Uncertain significance*	CBO WAS	1,46	5
31 ⁹	2 года 2 y.o.	c.273+2T>C, p.(?)	Инtron 2 Intron 2	Сайт сплайсинга Splice site	Патогенный Pathogenic	CBO WAS	0,39	11
32	14 лет 14 y.o.	c.559+5G>A, p.(?)	Инtron 6 Intron 6	Регион сайта сплайсинга Splice site	Патогенный Pathogenic	CBO WAS	0,90	4
33	2 года 2 y.o.	c.777+1G>T, p.(?)	8 инtron Intron 8	Сайт сплайсинга Splice site	Вероятно патогенный* Likely pathogenic*	CBO WAS	0,27	7
34	3 месяца 3 months	c.777+1G>A, p.(?)	Инtron 8 Intron 8	Сайт сплайсинга Splice site	Патогенный Pathogenic	CBO WAS	0,37	7
35	3 года 3 y.o.	c.777+3_777+6delGAGT, p.(?)	Инtron 8 Intron 8	Регион сайта сплайсинга Splice site	Вероятно патогенный Likely pathogenic	CBO WAS	0,47	8

Примечание. ¹ – генетические варианты WAS указаны согласно номенклатуре Human Genome Variation Society (<http://varnomen.hgvs.org/>), по транскрипту NM_000377.2 (RefSeq; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>); ² – оценка клинической значимости генетических вариантов дана согласно рекомендациям American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG; (PubMed ID: 25741868)); ⁹ – пациент женского пола; a/b/c/d – обозначения пациентов из одной семьи; * – генетический вариант, ранее не опубликованный в научной медицинской литературе.

Notes: ¹ – sequence variants in WAS gene defined according to Human Genome Variation Society nomenclature (<http://varnomen.hgvs.org/>), by transcript NM_000377.2 (RefSeq; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>); ² – clinical significance assessment of sequence variants was made according to American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) recommendations (PubMed ID: 25741868); ⁹ – patient is a female; a/b/c/d – indicates individuals from the same family; * – Unpublished sequence variant; XLT – X-linked thrombocytopenia.

Рисунок 1

Локализация мутаций у пациентов с СВО, описанных в данном исследовании, на протяжении гена WAS

Прямоугольники схематически представляют экзоны гена, линии между ними – интроны. Каждый символ представляет отдельного индивидуума с мутацией WAS, сиблинги объединены дополнительной линией. Заполненные символы обозначают ранее не опубликованные генетические варианты

Figure 1

A schematic illustration of WAS gene mutations described in current research. Rectangles represent exons, lines between them are introns

Each symbol represents single individual with WAS mutation, siblings joined by additional line. Filled symbols represent unpublished sequence variants

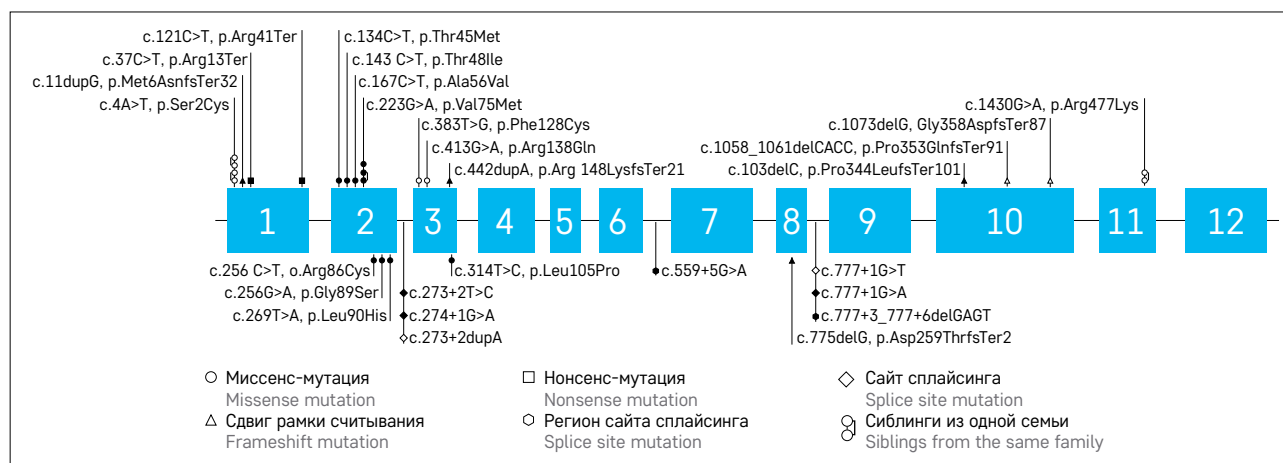


Таблица 2

Балльная шкала оценки тяжести течения заболевания у пациентов с СВО

Table 2

Scoring system to define clinical severity of the disease in WAS patients

Аутоиммунные проявления Autoimmunity	Онкология Malignancy	Иммунодефицит Immunodeficiency		Тромбоцитопения Thrombocytopenia	Экзема Eczema
		инфекционные осложнения infections	оппортунистические инфекции opportunistic infections		
Аутоиммунный процесс – хронический процесс, плохо отвечающий на моноиммуносупрессивную терапию Chronic autoimmune process that poorly responds to monosuppressive therapy	Лимфома, МДС, ОЛЛ, МПЗ в возрасте до 2 лет Lymphoma, MDS, ALL, MPD under 2 years of age	Сепсис/менингит в анамнезе Sepsis/meningitis in past medical history	Генерализованный инфекционный процесс, требующий постоянного нахождения пациента на специфической терапии Generalized infection with permanent specific therapy	Тромбоцитопения любой выраженности с жизнеугрожающими кровотечениями (кровотечения ЖКТ, интракраниальные кровоизлияния и др.) Life-threatening bleeding due to any thrombocytopenia severity (Gastrointestinal bleeding, intracranial bleeding, etc.)	Экзема – хронический процесс, требуется длительное применение системных ГКС Chronic eczema with a long-term corticosteroids using
Аутоиммунный процесс – хронический процесс, отвечающий на иммуносупрессивную терапию Chronic autoimmune process that responds to immunosuppressive therapy	Лимфома, МДС, ОЛЛ, МПЗ в возрасте от 2 до 9 лет Lymphoma, MDS, ALL, MPD at the age of 2–9 years old	Рецидивирующие гнойные отиты, пневмонии и другие бактериальные инфекции в анамнезе Recurrent otitis, pneumonia, and other bacterial infections in past medical history	Наличие оппортунистической инфекции с клиническими признаками, отвечающей на специфическую терапию Specific therapy responsive opportunistic infection	$< 20 \times 10^{12}/\text{мл}$, жизнеугрожающие кровотечения (эпистаксис, экхимозы, петехиальная сыпь) $< 20 \times 10^{12}/\text{мл}$, life-threatening bleeding (nosebleed, ecchymoses, petechiae)	Экзема – интермиттирующий характер, требуется эпизодическое применение системных ГКС Intermittent eczema with an occasional corticosteroids using
Аутоиммунный процесс – саморазрешившийся эпизод в анамнезе Autoimmune process – prior self-resolved episode	Лимфома, МДС, ОЛЛ, МПЗ в возрасте после 9 лет Lymphoma, MDS, ALL, MPD at the age of 9 years and older	Отсутствие тяжелых бактериальных эпизодов, CD3-лимфопения $< 1000/\text{мкл}$, дисгаммаглобулинемия/нарушенная специфичность антител Lack of severe bacterial infections, CD3-lymphopenia $< 1000/\text{mL}$, dysgammaglobulinemia/alteration of antibody specificity	Наличие оппортунистической инфекции с минимальными признаками (локальный БЦЖит, ЦМВ-виремия, кандидоз промежности и др.) Opportunistic infections with a minimal clinical features (local BCG abscess, CMV-viremia, candidiasis etc.)	$> 20 \times 10^{12}/\text{мл}$, без выраженного геморрагического синдрома $> 20 \times 10^{12}/\text{мл}$ without severe hemorrhagic syndrome	Экзема – интермиттирующий характер, требуется топическая терапия Intermittent eczema with topical corticosteroids using

Примечание. МДС – миелодиспластический синдром; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; МПЗ – миелоэритропролиферативные заболевания; ГКС – глюкокортикостероиды; ЦМВ-виремия – виремия, вызванная цитомегаловирусом; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт.

Note. MDS – myelodysplastic syndrome; ALL – acute lymphoblastic leukemia; MPD – myeloproliferative disorders; CMV-viremia – viremia caused by cytomegalovirus.

Цель данной работы: разработка надежного и высокопроизводительного лабораторного протокола полуколичественной оценки внутриклеточной экспрессии белка WASP лимфоцитами периферической крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Пациенты. Нами были проанализированы данные 46 пациентов, чьи образцы венозной крови поступили в лабораторию трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в период с января 2018 г. по январь 2020 г. В исследование были включены только образцы пациентов, у которых в дальнейшем было проведено молекулярно-генетическое исследование гена WAS. Все пациенты имели клинко-анамнестиче-

ские данные, схожие с картиной, наблюдаемой при СВО. Все образцы были разделены на 2 группы: пациенты, у которых были в дальнейшем найдены мутации в гене WAS (35 пациентов из 29 семей, *таблица 1, рисунок 1*), и больные, у которых таких мутаций не было ($n = 11$), у них в дальнейшем были подтверждены другие состояния. Медиана возраста в 1-й группе составила 27 месяцев (2 месяца – 17 лет), 34 обследованных были мужского пола (согласно данным об X-сцепленном характере заболевания). У 1 пациентки в дальнейшем выявлена неравномерная инактивация X-хромосомы. Медиана возраста во 2-й группе была 22 месяца (2 месяца – 12 лет), в нее вошли только лица мужского пола. Кроме того, в исследование вошли 64 здоровых добровольца в возрасте от 18 до 50 лет.

Шкала тяжести СВО. Для более детальной оценки фенотипа нами была разработана расширенная шкала оценки тяжести состояния пациентов с СВО, основанная на оригинальной балльной классификации O. Zhu и соавт. [21], учитывающая выра-

женность тромбоцитопении и геморрагического синдрома, экземы, частоту и тяжесть инфекционных осложнений, аутоиммунных процессов и развитие опухолей (таблица 2).

Оценка экспрессии белка WASP. Образцы крови были собраны в пробирки с EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) и проанализированы в течение 24 ч после венепункции. Для контроля качества преаналитического и аналитического этапов в каждое исследование включали дополнительный образец крови, полученный от здорового индивидуума. Забор крови здорового индивидуума и пациента производили в одно и то же время, образцы хранились и транспортировались при одинаковых условиях (не более 24 ч от момента забора, при температуре 18–25°C).

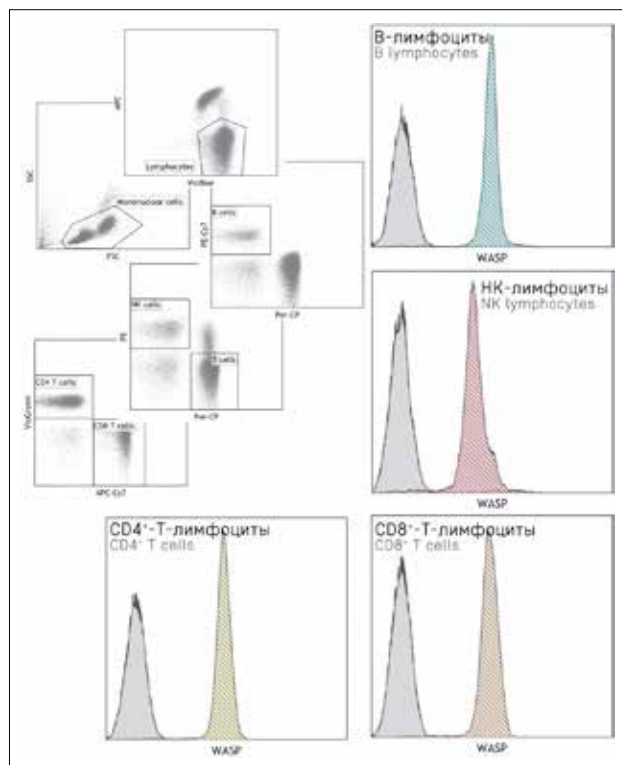
Основные этапы пробоподготовки включали: выделение мононуклеарных клеток периферической крови методом центрифугирования в градиенте плотности (Lymphocytes Separation Media, Capricorn Scientific), фиксацию и пермеабиллизацию реагентами Cell Fixation & Permeabilization Kit (Flow Cytometry, Abcam). Далее проводилась окраска

Рисунок 2

Стратегия гейтирования лимфоцитов (дот-плоты) и экспрессия белка WASP (гистограммы) в различных субпопуляциях лимфоцитов
Серая гистограмма отражает изотип-контроль, цветная – экспрессию белка в лимфоцитах здорового индивидуума

Figure 2

Lymphocytes gating strategy (dot-plots) and WASP expression (histograms) in different lymphocyte subpopulations
Grey histogram – isotype control, colored histogram – protein expression in healthy individual lymphocytes



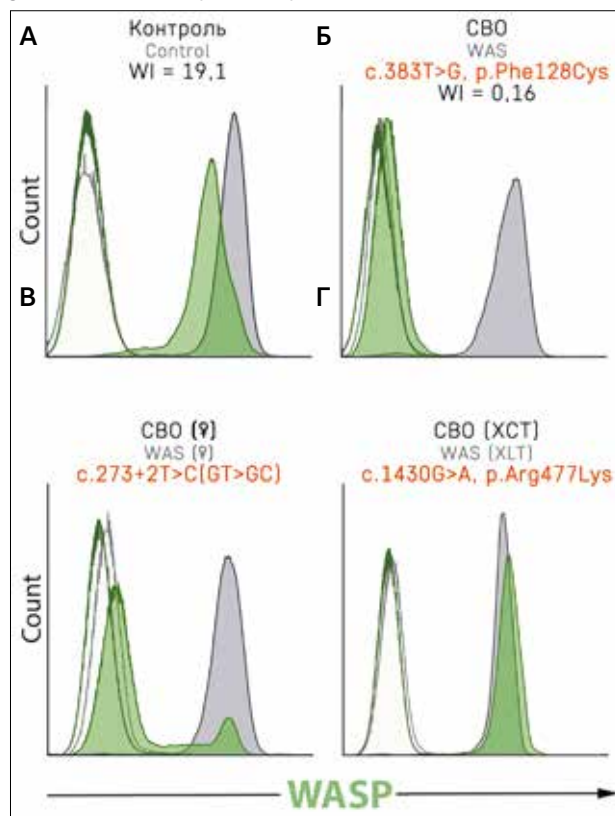
моноклональными антителами: Mouse Anti-Human IgG CD45 PerCP (Clone 2D1, Becton Dickinson), Mouse Anti-Human CD14 IgG V450 (MφP9, Becton Dickinson), Rabbit Anti-Human WASP IgG pure (Clone EP2541Y, Abcam), Rabbit IgG pure (Clone EPR25A, Abcam), Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor® 488 (polyclonal, Abcam). Для части образцов была применена более детализированная оценка – линейно-специфичное определение экспрессии WASP с использованием Recombinant human IgG CD45 VioBlue (Clone REA747, Miltenyi Biotec), Mouse Anti-Human IgG CD16 PE (Clone B73.1, Becton Dickinson), Mouse Anti-Human IgG CD56 PE (Clone NCAM16.2, Becton Dickinson), Mouse Anti-Human IgG CD3 PerCp (Clone SK7, Becton Dickinson), Mouse Anti-Human IgG CD19 PC-7 (Clone J4.119, Beckman Coulter), Mouse Anti-Human IgG CD14 APC (MφP9, Becton Dickinson), Recombinant human IgG CD8 APC-Vio770 (Clone REA734, Miltenyi

Рисунок 3

Экспрессия белка WASP в норме и при СВО
А – вариант экспрессии белка WASP здорового индивидуума; Б – резко сниженная/отсутствующая экспрессия WASP при наличии клинической картины СВО и мутации в гене WAS; В – бимодальная экспрессия WASP у пациентки №31; Г – нормальная экспрессия WASP при наличии клинической картины СВО и гипоморфной мутации в гене WAS (пациент №28d)

Figure 3

WASP expression in WAS patient and in healthy individual
A – WASP expression in healthy individual; Б – WASP expression is markedly reduced/absent (clinical features and WAS gene mutation are present); В – bimodal WASP expression in the female patient (patient №31); Г – normal WASP expression (clinical features and hypomorphic WAS gene mutation are present, patient №28d)



Biotec), Recombinant human IgG CD4 Vio Green (Clone REA623, Miltenyi Biotec). Анализ образцов проводили на проточном цитометре FACS Canto II (Becton Dickinson). Для каждого образца было собрано не менее 20 000 событий в регионе лимфоцитов. При анализе данных использовали программное обеспечение Kaluza Analysis (Beckman Coulter) согласно стратегии гейтирования, указанной на рисунке 2. Исследование экспрессии белка WASP было проведено в популяции лимфоцитов периферической крови. Оценку производили на основании полученных значений geoMFI по каналу флуоресценции соответствующему анти-WASP и изотипическому контрольному антителу. Полученные значения были взяты в расчет индекса экспрессии белка WASP (WASP Index, WI) согласно следующей формуле:

$WI = \frac{\text{geoMFI (образца, окрашенного анти-WASP)}}{\text{geoMFI (образца, окрашенного изотипическим анти-телом)}}/100$.

Экспрессия WASP классифицировалась как нормальная в случае нахождения значения WI выше установленного порогового показателя (рисунк 3А, Б).

Для части пациентов был применен более детализированный подход, заключающийся в оценке линейно-специфичной экспрессии, а именно в CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ (Т-лимфоцитах), CD19⁺ (В-лимфоцитах) и CD56⁺ (NK-лимфоцитах). К такому типу оценки прибегали в случае обнаружения бимодальной/нетипичной экспрессии белка, в основном встречавшейся у пациентов, перенесших ТГСК.

При оценке влияния условий хранения материала на экспрессию белка WASP часть образцов держали

в лабораторном холодильнике при температуре 4°C, другую часть – при комнатной температуре 21–24°C.

Статистическая обработка данных. Нами были рассчитаны референсные интервалы (на основе 2,5 и 97,5 перцентилей) WI для следующих когорт: здоровые индивидуумы, пациенты с подтвержденным СВО и больные, не имеющие мутаций в гене WAS. В дальнейшем проведен ROC-анализ для определения оптимального порогового значения WI с целью максимизировать чувствительность и специфичность теста. Для ROC-анализа использовали данные, за исключением сиблингов, выбор наблюдения проводили случайным образом. Оценку корреляции экспрессии WI и тяжести клинического состояния проводили при помощи ранговой оценки Спирмена. Обработку данных осуществляли при помощи программного обеспечения PRISM 6 (GraphPad Software).

Молекулярно-генетический анализ. Геномная ДНК была выделена из периферической крови с использованием набора «ДНК-сорб-В» (ИнтерЛаб-Сервис, Россия) или с помощью автоматической станции NorDiag (Норвегия). Все кодирующие экзоны гена WAS и прилегающие к ним участки интронов (в пределах минимум 25 пар оснований от границ экзона) были амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием по Сэнгеру с использованием набора реагентов BigDye Terminator v1.1 и автоматического секвенатора ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США). Полученные результаты сравнивали с геномной последовательностью гена WAS, представленной в референсном геноме человека

Рисунок 4

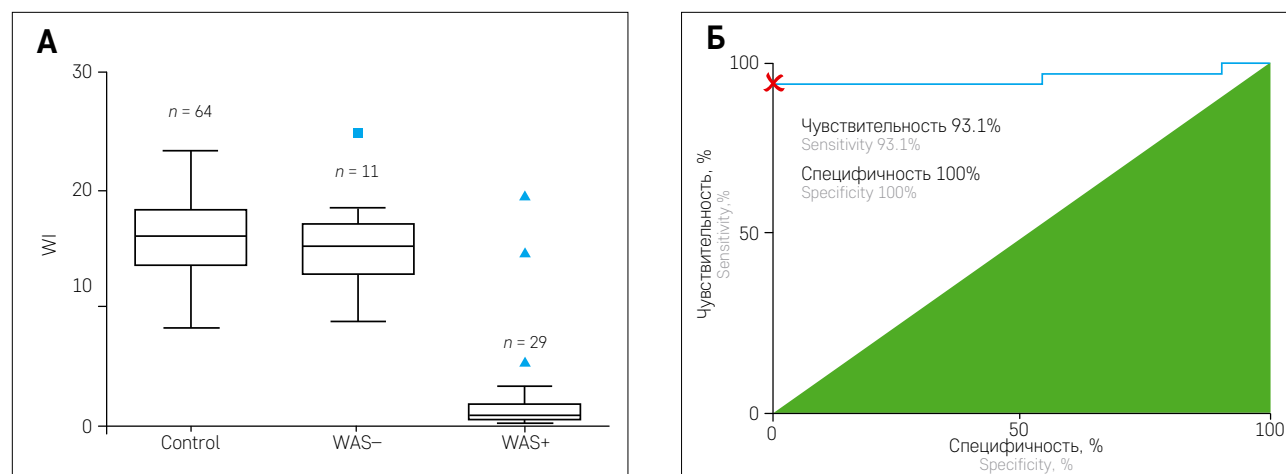
WI в группах пациентов и здоровых доноров, а также графическое изображение чувствительности и специфичности метода

А – бокс-плоты, демонстрирующие распределение значений WI среди когорты здоровых индивидуумов (контроль), среди пациентов с подозрением на СВО, и не подтвержденным в дальнейшем диагнозом (WAS–) и среди пациентов с СВО (WAS+); Б – график ROC-анализа с указанием значения (красный крест) оптимального соотношения чувствительности и специфичности

Figure 4

WI in patients and in healthy individuals; sensitivity and specificity graphical depiction

А – box-plots demonstrated WI distribution within healthy cohort (Control), within patients with suspected but not confirmed WAS (WAS–), within WAS patients (WAS+); Б – ROC curve analysis demonstrates optimal value of sensitivity and specificity (red cross)



(NC_000023.11:48683753-48691427). Для нескольких пациентов поиск мутаций проводили методом высокопроизводительного секвенирования (next generation sequencing, NGS) на платформе NextSeq (Illumina, США). Для пробоподготовки была использована система гибридационного обогащения библиотек SeqCap EZ (Roche, Швейцария) для таргетной панели генов «Иммунологическая». Последующая верификация найденных вариантов, а также исследование родственных пациентов проводили с помощью секвенирования по Сэнгеру. Клиническая значимость выявленных генетических вариантов, отличающихся от референсной последовательности, определялась на основании рекомендаций American College of Medical Genetics and Genomics [22]. Оценку популяционных частот найденных вариантов проводили на основании данных в базе gnomAD (The Genome Aggregation Database, <https://gnomad.broadinstitute.org/>).

Оценка клеточного химеризма. Химеризм определяли в клетках CD3⁺, выделенных методом магнитной сепарации на магнитных частицах Daynabeads (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, США) из образцов периферической крови. ДНК для проведения анализа была выделена с помощью комплекта реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» в соответствии с протоколом производителя. Дальнейший анализ проводили методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени с использованием реактивов для ПЦР (ООО «Центр медицинской генетики», Россия) и

специально подобранных праймеров, специфичных к участкам ДНК с полиморфизмами Insertion/Deletion («Евроген», «Синтол», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование экспрессии WASP у здоровых индивидуумов. Нами был рассчитан референсный интервал WI в когорте здоровых индивидуумов, который составил 8,64–23,2 (медиана 16,06; разброс: 8,26–23,31). Его нижнее значение было принято как дискриминирующее в предполагаемой диагностике пациентов с СВО (рисунок 4А).

Исследование стабильности WI при различных условиях хранения диагностического материала. Нами была проведена оценка стабильности значения WI материала здоровых индивидуумов с учетом влияния таких факторов преаналитического этапа, как время и температура хранения. В результате была получена информация о более стабильных значениях WI при условии транспортировки в период до 24 ч при температуре 18–25°C, не допуская излишнего охлаждения образца (рисунок 5).

Исследование экспрессии WASP у пациентов с мутациями в гене WAS. Из 35 образцов с подтвержденной мутацией в гене WAS в 31 случае обнаружено снижение WI относительно порогового значения (медиана 0,83; разброс: 0,16–5,36). Исключение составили образцы 4 пациентов (2 пары сиблингов из 2 неродственных семей) с мутациями с.1430G>A, p.Arg477Lys (рисунок 3Г) и с.413G>A, p.Arg138Gln. Значения WI этих образцов находились в пределах нормальных значений (медиана 17,17; разброс: 14,7–19,53).

Исследование экспрессии WASP у пациентов без мутаций в гене WAS. При оценке экспрессии белка WASP в группе из 11 пациентов, не имеющих мутаций в гене WAS, WI находился выше установленного порогового значения (медиана 15,16; разброс: 8,78–24,81).

Получение оптимизированного порогового диагностического значения WI. Нами был произведен ROC-анализ WI пациентов с подтвержденным СВО и больных, не имеющих мутаций в гене WAS, позволивший получить оптимизированное пороговое диагностическое значение индекса окрашивания 7,07 с высокими показателями чувствительности и специфичности: 93,1% и 100% соответственно (рисунок 4Б).

Оценка корреляции экспрессии белка WASP и тяжести течения заболевания у пациентов с СВО. Нами было обнаружено, что среди 35 пациентов с диагнозом СВО между тяжестью заболевания, рассчитанной при помощи вышеописанной балльной системы (медиана 5, разброс: 1–11), и WI (медиана 0,86, разброс: 0,16–19,53) существует отрицательная

Рисунок 5

Влияние температуры и длительности хранения материала на экспрессию белка WASP здоровых индивидуумов (+4, +24 и +48 ч)
Красная пунктирная линия соответствует оптимизированному пороговому значению для диагностики пациентов с подозрением на СВО

Figure 5

Impact of temperature and storage duration on WASP expression in healthy individuals (+4h, +24h, +48h)
Red dotted line represents optimal threshold value for diagnostics of patients with suspected WAS

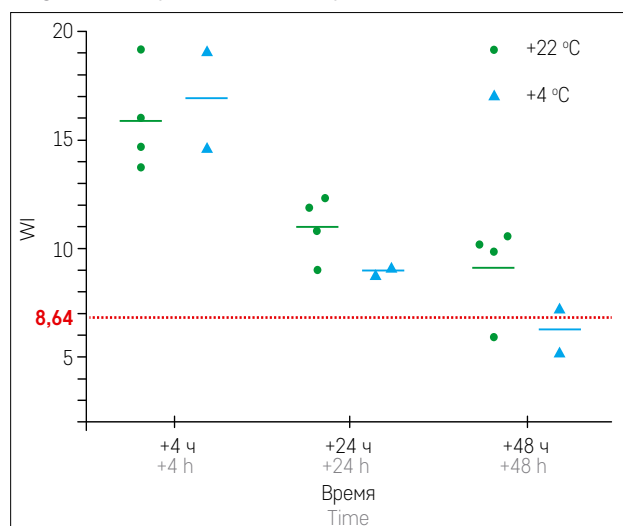


Таблица 3

Сравнение экспрессии WASP по описанному в исследовании протоколу и данных о химеризме (ПЦР) в Т-лимфоцитах периферической крови у пациентов с СВО после ТГСК

Table 3

Comparison of WASP chimerism data between PCR and flow cytometry methods in WAS patients after HSCT

Пациент Patient	Экспрессия WASP Т-лимфоцитами WASP expression in T cells	Клеточный химеризм в Т-лимфоцитах (ПЦР) T cell chimerism (PCR)
1	Снижена в 20% Decreased in 20%	16,5% клеток реципиента 16.5% recipient cells
2	Снижена в 26% Decreased in 26%	20% клеток реципиента 20% recipient cells
3	В норме Normal	Не менее 99% донорских клеток >99% donor cells
4	В норме Normal	Не менее 99% донорских клеток >99% donor cells

Note. HSCT – hematopoietic stem cells transplantation; PCR – polymerase chain reaction.

корреляция ($r = -0,63$; 95% доверительный интервал: $-0,799 \sim -0,365$; $p = < 0,0001$).

Исследование экспрессии белка WASP у пациентов с СВО, перенесших ТГСК. Нами была оценена экспрессия WASP у 4 пациентов с СВО, перенесших ТГСК и имеющих различный уровень клеточного химеризма. Два пациента имели смешанный химеризм в Т-клетках 20% и 26% (доля WASP/low среди клеток CD3⁺), в то время как метод ПЦР демонстрировал 16,5% и 20% соответственно. У 2 пациентов с полным донорским химеризмом в $> 99\%$ CD3⁺-лимфоцитов экспрессия белка была в пределах должного уровня (таблица 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

СВО, как и любое иммунодефицитное состояние, требует скорейшей верификации диагноза до развития таких тяжелых последствий, как массивные кровотечения, тяжелые инфекционные эпизоды и онкологические заболевания. В связи с этим нами была поставлена цель разработки и валидации лабораторного метода, позволяющего быстро и точно диагностировать пациентов с СВО. Разработанная нами методика оценки экспрессии белка WASP с помощью проточной цитофлуориметрии показала высокую чувствительность и специфичность метода, позволив выявить преобладающее большинство пациентов с диагнозом СВО. Однако WI у 2 пар сиблингов был выше порогового диагностического значения, что не позволяло подтвердить им диагноз СВО данным методом. В одной семье была обнаружена миссенс-мутация в экзоне 11 – это замена нуклеотида 1430G>A, приводящая к замене аминокислоты p.Arg477Lys в С-концевом домене, необходимом для взаимодействия с актином; миссенс-мутации в этом домене обычно не влияют на стабильность белка

WASP [11]. Данный генетический вариант был ранее описан в литературе у 1 пациента, имеющего только мягко протекающую тромбоцитопению, но функциональный анализ мутации и оценка экспрессии белка у него не проводились [23]. У второй пары сиблингов, имевших нормальный уровень экспрессии WASP, была выявлена замена нуклеотида c.413G>A, приводящая к замене аминокислоты p.Arg138Gln. Данный аллель имеет популяционную частоту 0,00094 среди европейцев нефинского происхождения, причем всего в базе данных gnomAD зарегистрированы 27 здоровых доноров-мужчин в возрасте от 30 до 80 лет, гомизоготных по этому варианту. Присутствующая в норме в позиции 138 аминокислота аргинин химически мало отличается от выявленной у нашего пациента аминокислоты глутамин. Все эти аргументы заставляли нас трактовать замену p.Arg138Gln как гипоморфную. Пациенты с ХСТ и нормальной экспрессией WASP были описаны и ранее [24], хотя истинную частоту этого феномена оценить пока не представляется возможным в связи с небольшим числом опубликованных наблюдений. Остальная когорта исследованных нами пациентов демонстрировала сниженные показатели WI. При значениях WI < 1 экспрессия белка WASP трактовалась как отсутствующая/резко сниженная.

Необходимо отметить, что нами учитывалась специфичность моноклонального антитела, используемого в методе. Антитело было специфично к С-концевому участку белка (области VCA-домена) без учета особенностей аутоингибированной или активной формы белка. В связи с этим большинство вариантов синтезируемых мутантных белков в теории должны быть доступны для оценки данной методикой.

Проточная цитофлуориметрия не является методом, позволяющим количественно оценить содержание внутриклеточного белка. И все же принцип действия, лежащий в его основе, позволяет судить о его относительном количестве. Таким образом, преимуществом данной методики является возможность полуколичественного определения экспрессии белка WASP на основании значения WI. В настоящий момент в литературе фигурирует множество работ, условно описывающих количество белка в виде его присутствия/отсутствия либо наличия укороченной формы [9, 19, 20]. Наша методика с использованием количественного индекса позволяет проводить более широкий сравнительный анализ различных характеристик пациентов с СВО. Так, на основании значений оценки тяжести состояния и WI была обнаружена отрицательная корреляция между тяжестью состояния пациента и величиной WI. Данная информация может помочь врачу составить целостную картину состояния пациента,

особенно когда вопрос касается прогнозируемой тяжести состояния или определения интенсивности терапии.

Разработанная методика применима не только для идентификации пациентов с СВО и ранней оценки степени тяжести заболевания, но может быть полезна в подтверждении приживления донорских гемопоэтических стволовых клеток у пациентов, перенесших процедуру ТГСК. Описанная нами методика позволяет изолированно оценивать экспрессию WASP в различных популяциях лимфоцитов. Так, при сравнении результатов линейно-специфической экспрессии белка WASP (проточная цитофлуориметрия) и линейного химеризма Т-лимфоцитов (магнитная клеточная сепарация с последующей ПЦР в реальном времени) были получены сопоставимые результаты. Использование данной методики у пациентов с ТГСК позволяет получить информацию о состоянии клеточного химеризма в более короткие сроки и со свойственной проточной цитофлуориметрии пластичностью оценки клеточного популяционного состава.

Хотелось бы отметить пользу данного лабораторного метода в диагностике нетипичных и сложных клинических случаев. Нами был исследован образец крови пациентки, имеющей достаточно тяжелую клиническую картину СВО, у которой в гене WAS была обнаружена гетерозиготная мутация в сайте сплайсинга (с.273+2Т>С). У этой пациентки было выявлено отклонение в уровне экспрессии белка WASP, проявляющееся в виде картины бимодального распределения экспрессии (рисунки 3В). В настоящее время имеется ряд публикаций, описывающих СВО у пациентов женского пола с мутациями в гене WAS и преимущественной инактивацией X-хромосомы с нормальной копией гена [25–27]. Подобные редкие случаи проявления у пациентов женского пола X-сцепленных рецессивных заболеваний описаны в связи с феноменом неравновесной инактивации X-хромосомы [28, 29].

Учитывая особенности сроков и условий хранения материала, используемого в проточной цитофлуориметрии, нами была проведена оценка стабильности определения экспрессии белка WASP с учетом влияния внешних факторов преаналитического этапа. По итогам этой оценки мы смогли определить оптимальные условия транспортировки материала для качественного выполнения теста.

Данная информация является крайне необходимой при работе с материалом, полученным из удаленных регионов Российской Федерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы оценки экспрессии белка WASP при диагностике пациентов с подозрением на СВО достаточно часто упоминаются в зарубежной литературе. Однако работ, описывающих методику, среди российских публикаций на данный момент не существует. Нами был разработан метод оценки внутриклеточной экспрессии белка WASP на основе данных достаточно крупной когорты пациентов с СВО. Хотелось бы отметить, что разработанная нами методика может являться необходимым инструментом даже после проведения генетического тестирования, позволяя дополнить имеющуюся картину в отношении патогенности найденных генетических вариантов. Таким образом, комбинированный подход в диагностике пациентов с подозрением на СВО дает возможность быстро и своевременно диагностировать данное заболевание, что особенно важно в свете того, что на настоящий момент большинство больных нуждаются в скорейшей инициации поиска донора и подготовке к процедуре ТГСК.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проведено при спонсорской поддержке благотворительного фонда «Подари жизнь» и фонда поддержки и развития в области детской гематологии, онкологии и иммунологии «Наука – Детям».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Pershin D.E. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6148-7209>
Lodoeva O.B. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2874-0014>
Fadeeva M.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6553-2505>
Mersiyanova I.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0471-2956>
Khoreva I.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8697-4206>
Vladimirov I.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1435-665X>
Voronin K.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7578-9657>
Brilliantova V.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0079-7761>
Varlamova T.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0501-8686>
Vedmedskaya V.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7247-4844>
Rodina Yu.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9857-4456>
Raykina E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7634-2053>
Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>
Shcherbina A.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3113-4939>

Литература

- Ochs H.D., Smith E.C.I., Jenifer M. Primary Immunodeficiency diseases, Third Edition; 2016.
- Buchbinder D., Nugent D.J., Fillipovich A.H. Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, current management, and emerging treatments. *Appl Clin Genet* 2014; 7: 55–66. DOI: 10.2147/TACG.S58444
- Zhang J., Shi F., Badour K., Deng Y., McGavin M.K., Siminovitch K.A. WASp verprolin homology, cofilin homology, and acidic region domain-mediated actin polymerization is required for T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (4): 2240–5.
- Badour K., Zhang J., Shi F., McGavin M.K., Rampersad V., Hardy L.A., et al. The Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Acts Downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 Adaptors to Promote Formation of the Immunological Synapse. *Immunity*. 2003; 18 (1): 141–54.
- Soderling S.H. Grab Your partner with both hands: cytoskeletal remodeling by Arp2/3 signaling. *Sci Signal* 2009; 2 (55): pe5. DOI: 10.1126/scisignal.255pe5
- Дидковский Н.А., Крынский С.А., Малашенкова И.К., Райкина Е.В., Варламова Т.В. Особенности течения синдрома Вискотта-Олдрича в зависимости от мутаций гена WASP. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2016; 15 (3): 40–5. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-3-40-45
- Cotta-de-Almeida V., Dupré L., Guipou D., Vasconcelos Z. Signal integration during T Lymphocyte Activation and Function: Lessons from the Wiskott-Aldrich Syndrome. *Front Immunol* 2015; 6: 47. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00047
- Westerberg L.S., Meelu P., Baptista M., Eston M.A., Adamovich D.A., Cotta-de-Almeida V., et al. Activating WASP mutations associated with X-linked neutropenia result in enhanced actin polymerization, altered cytoskeletal responses, and genomic instability in lymphocytes. *J Exp Med* 2010; 207 (6): 1145–52. DOI: 10.1084/jem.20091245
- Jin Y., Mazza C., Christie J.R., Giliani S., Fiorini M., Mella P., et al. Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood* 2004; 104 (13): 4010–9.
- Laberko A., Sultanova E., Gutovskaya E., Shipitsina I., Shelikhova L., Kurnikova E., et al. Mismatched related vs matched unrelated donors in TCR /CD19 - depleted HSCT for primary immunodeficiencies. *Blood* 2019; 134 (20): 1755–63. DOI: 10.1182/blood.2019001757
- Jin Y.Y., Wu J., Chen T.X., Chen J. When WAS Gene Diagnosis Is Needed: Seeking Clues Through Comparison Between Patients With Wiskott-Aldrich Syndrome and Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Front Immunol*. 2019; 10:1549. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01549
- Brigida I., Scaramuzza S., Lazarevic D., Cittaro D., Ferrua F., Leonardelli L., et al. A novel genomic inversion in Wiskott-Aldrich-associated autoinflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138 (2): 619–622.e7. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.03.007
- Lutskiy M.I., Jones L.N., Rosen F.S., Remold-O'Donnell E. An Alu-mediated deletion at Xp11.23 leading to Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Genet* 2002; 110 (5): 515–9.
- Andreu N., García-Rodríguez M., Volpini V., Frecha C., Molina I.J., Fontan G., Fillat C. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) complex mutation identified in a WAS patient results in an aberrant product at the C-terminus from two transcripts with unusual polyA signals. *J Hum Genetics* 2006; 51 (2): 92–7. DOI: 10.1007/s10038-005-0328-7
- Chiang S.C.C., Vergamini S.M., Husami A., Neumeier L., Quinn K., Ellerhorst T., et al. Screening for Wiskott-Aldrich syndrome by flow cytometry. *J Allergy and Clin Immunol* 2018; 142 (1): 333–5. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.04.017
- Kawai S., Minegishi M., Ohashi Y., Sasahara Y., Kumaki S., Konno T., et al. Flow cytometric determination of intracytoplasmic Wiskott-Aldrich syndrome protein in peripheral blood lymphocyte subpopulations. *J Immunol Methods* 2002; 260 (1–2): 195–205.
- Yamada M., Ohtsu M., Kobayashi I., Kawamura N., Kobayashi K., Ariga T., et al. Flow cytometric analysis of Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS) protein in lymphocytes from WAS patients and their familial carriers. *Blood* 1999; 93 (2): 756–7.
- Nakajima M., Yamada M., Yamaguchi K., Sakiyama Y., Oda A., Nelson D.L., et al. Possible application of flow cytometry for evaluation of the structure and functional status of WASP in peripheral blood mononuclear cells; *European J Haematol* 2009; 82 (3): 223–30. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2008.01180.x
- Shcherbina A., Rosen F.S., Remold-O'Donnell E. WASP levels in platelets and lymphocytes of Wiskott-Aldrich syndrome patients correlate with cell dysfunction. *J Immunol* 1999; 163 (11): 6314–20.
- Ochs H.D. Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein affect protein expression and dictate the clinical phenotypes. *Immunol Res* 2009; 44 (1–3): 84–8. DOI 10.1007/s12026-008-8084-3
- Zhu Q., Zhang M., Blaese R.M., Derry J.M., Junker A., Francke U., et al. The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood* 1995; 86 (10): 3797–804.
- Li M.M., Datto M., Duncavage E.J., Kulkarni S., Lindeman N., Roy S., et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017; 19 (1): 4–23. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002
- Derry J.M., Kerns J.A., Weinberg K.I., Ochs H.D., Volpini V., Estivill X., et al. WASP gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Hum Mol Genet* 1995; 4 (7): 1127–35.
- Notarangelo L.D., Mazza C., Giliani S., D'Aria C., Gandellini F., Ravelli C., et al. Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia. *Blood* 2002; 99 (6): 2268–9.
- Zhang J., Shi F., Badour K., Deng Y., McGavin M.K., Siminovitch K.A. WASp verprolin homology, cofilin homology and acidic region domain-mediated actin polymerization is required for T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (4): 2240–5.
- Parolini O., Resmann G., Haas O.A., Pawlowsky J., Gadner H., Knapp W., et al. X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. *N Engl J Med* 1998; 338 (5): 291–5.
- Lutskiy M.I., Sasahara Y., Kenney D.M., Rosen F.S., Remold-O'Donnell E. Wiskott-Aldrich syndrome in a female. *Blood* 2002; 100 (8): 2763–8.
- Andreu N., Pujol-Moix N., Martinez-Lostao L., Oset M., Muñoz-Díaz E., Estivill X., et al. Wiskott-Aldrich syndrome in a female with skewed X-chromosome inactivation. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 31 (3): 332–7.
- Van den Veyver I.B. Skewed X inactivation in X-linked disorders. *Semin Reprod Med* 2001; 19 (2): 183–91.