

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 01.09.2020
Принята к печати 15.09.2020

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, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: dimprsh@icloud.com

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-4-108-118

Использование метода проточной цитофлуориметрии для верификации диагноза X-сцепленного лимфопролиферативного синдрома 1-го и 2-го типов

Д.Е. Першин, В.А. Ведмедская, М.С. Фадеева, И.С. Владимиров, Е.А. Кулаковская, А.А. Роппельт, А.М. Киева, Е.В. Райкина, Ю.А. Родина, М.А. Масчан, А.Ю. Щербина

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

X-сцепленный лимфопролиферативный синдром (ХЛП) – жизнеугрожающее иммунодефицитное состояние, характеризующееся гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом, лимфопролиферацией и гипогаммаглобулинемией. Наиболее частыми формами являются ХЛП 1-го (ХЛП1) и 2-го (ХЛП2) типов. В основе данных состояний лежат мутации в генах *SH2D1A* или *BIRC4/XIAP*, кодирующие белки SAP и XIAP соответственно. Ранняя постановка диагноза дает возможность не только своевременно скорректировать терапию и избежать развития тяжелых состояний, но и начать подготовку к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В данной статье описана разработка надежного и быстрого метода лабораторной диагностики ХЛП1 и ХЛП2, основанного 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 89 пациентов с подозрением на ХЛП в возрасте от 2 месяцев до 18 лет, обследованных в период с июля 2016 г. по февраль 2020 г. Снижение внутриклеточной экспрессии SAP было выявлено у 9 пациентов, XIAP – у 10 больных, диагноз был подтвержден выявлением мутации в генах *SH2D1A* и *XIAP* соответственно. Также были обнаружены отклонения от нормы в экспрессии соответствующих белков у матерей данных пациентов, являвшихся носительницами дефектного гена. В результате анализа полученных данных были рассчитаны оптимизированные пороговые уровни значений экспрессии белков SAP и XIAP в Т-лимфоцитах (50% и 80% соответственно) и NK-лимфоцитах (45% и 75% соответственно). Чувствительность и специфичность данного метода составили 100% для каждого исследуемого белка. Разработанная в данном исследовании методика оценки внутриклеточной экспрессии белков SAP и XIAP с помощью проточной цитофлуориметрии у пациентов с подозрением на ХЛП1 или ХЛП2 позволяет проводить высокоточную диагностику этих заболеваний в короткие сроки.

Ключевые слова: первичный иммунодефицит, проточная цитометрия, X-сцепленный лимфопролиферативный синдром, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, ген *SH2D1A*, ген *XIAP*, *iNKT*, белок SAP, белок XIAP

Першин Д.Е. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020; 19 (4): 108–118.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-4-108-118

Verification of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 and 2 using a flow cytometry method

D.E. Pershin, V.A. Vedmedskaya, M.S. Fadeeva, I.S. Vladimirov, E.A. Kulakovskaya, A.A. Roppelt, A.M. Kieva, E.V. Raykina, Yu.A. Rodina, M.A. Maschan, A.Yu. Shcherbina

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

X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) is a life-threatening primary immunodeficiency, characterized by hemophagocytic lymphohistiocytosis, lymphoproliferation and hypogammaglobulinemia. The most frequent forms of XLP – XLP1 and XLP2 – are caused by mutations of the *SH2D1A* and *BIRC4/XIAP* genes, coding for SAP and XIAP proteins, respectively. Early diagnosis is important as it allows to prevent severe complications by introducing specific therapy and proceed to hematopoietic stem cell transplantation. Here we describe validation of precise and fast flow cytometry-based method of XLP1 and XLP2 laboratory diagnostics. This study is supported by the Independent Ethics Committee and approved by the Academic Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology. 89 patients from 2 months to 18 years of age seen at our Center from July 2016 to February 2020 with symptoms suspicious of XLP were included in the study. Decrease of SAP intracellular expression was found in 9 patients, and XIAP – in 10 patients. In all of them XLP diagnosis was confirmed by detection of *SH2D1A* or *XIAP* mutations, respectively. Female mutations carries from the families of these patients demonstrated abnormal expression of respective proteins. Analysis of the data allowed to calculate the optimized cut-off numbers for the SAP and XIAP expression, which was 50% and 80% in T lymphocytes (respectively) and 45% and 75% in NK lymphocytes (respectively). Specificity and sensitivity of the method was 100% for both proteins. Therefore the method of assessment of SAP and XIAP intracellular expression via flow cytometry allows fast and precise diagnostics of XLP1 and XLP2.
Key words: primary immunodeficiency, flow cytometry, X-linked lymphoproliferative syndrome, hemophagocytic lymphohistiocytosis, *SH2D1A* gene, SAP, XIAP gene, *iNKT*, SAP protein, XIAP protein

Pershin D.E., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2020; 19 (4): 108–118.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-4-108-118

Х-сцепленный лимфопролиферативный синдром (ХЛП) представляет собой группу редких первичных иммунодефицитных состояний, характеризующихся гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (ГЛГ), доброкачественной и злокачественной лимфопролиферацией, повышенной чувствительностью к вирусной инфекции Эпштейна–Барр (ЭБВ) и другими иммунологическими нарушениями [1]. На сегодняшний день подробно описаны 2 типа этого состояния: ХЛП 1-го (ХЛП1) и 2-го (ХЛП2) типов, в основе патогенеза которых лежат мутации в генах *SH2D1A* и *XIAP* соответственно [2, 3]. Для пациентов с ХЛП характерен высокий уровень смертности, в основном обусловленный развитием ГЛГ. Данное состояние наблюдается при гиперактивации Т-лимфоцитов и макрофагов, их накоплении в различных органах и тканях с нарастанием мощного системного воспалительного ответа, зачастую приводящего к летальному исходу [4, 5]. На настоящий момент трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является единственной куративной опцией для данного иммунодефицита [6–8].

Ген *SH2D1A* кодирует белок SAP (14kDa/128aa) или SLAM-ассоциированный белок, представленный преимущественно доменом Src Homology 2 (SH2) [9, 10]. Экспрессия SAP характерна преимущественно для Т- и NK-лимфоцитов, в В-лимфоцитах, макрофагах и дендритных клетках SAP отсутствует либо экспрессируется в минимальных количествах [11, 12]. Иммунологические отклонения у пациентов с ХЛП1 в основном ассоциированы с нарушением регуляции цитотоксического ответа и гуморального звена. Так, NK- и CD8 Т-лимфоциты демонстрируют нарушенный клеточно-опосредованный киллинг ЭБВ-инфицированных лимфоцитов [6, 11–13]. SAP-опосредованный сигналинг важен для развития инвариантных NKT-лимфоцитов (iNKT) – клеток с рестриктированным типом Т-клеточного рецептора ($V\alpha 24$ - $J\alpha Q$), распознающего молекулы главного комплекса гистосовместимости типа MHC Ib (CD1d). iNKT-клетки играют важную роль в развитии аутоиммунных заболеваний и в процессах распознавания опухолевых клеток. У пациентов с дефицитом SAP данная популяция резко снижена либо отсутствует [11, 12, 14]. На настоящий момент, согласно литературным данным, известно порядка 130 мутаций в гене *SH2D1A*, не имеющих четкой корреляции с клинической картиной [5, 13]. Также описаны случаи реверсивного мозаицизма в лимфоидных популяциях, восстанавливающие дикий тип гена и, как правило, экспрессию белка [5, 12, 15, 16].

Белок XIAP принадлежит семейству ингибиторов апоптоза (IAP) и состоит из 3 BIR-доменов, убиквитин-ассоциированного домена и С-концевого RING-домена, обладающего активностью убиквитинлигазы [17]. XIAP экспрессируется всеми типами клеток, и его

экспрессия значительно увеличивается в опухолевых клетках. XIAP является мощным ингибитором запрограммированной клеточной гибели благодаря своей способности напрямую блокировать активированные формы каспаз 3, 7 и 9 [18–20]. В отличие от пациентов с ХЛП1 больные с ХЛП2 характеризуются отсутствием лимфом, более высокой вероятностью развития ГЛГ и большей предрасположенностью к воспалительным заболеваниям [3, 6, 15, 17, 18, 21, 22]. Т-лимфоциты пациентов с ХЛП2 проявляют повышенную чувствительность к апоптотическим сигналам *in vitro* [17, 23, 24]. У пациентов с дефицитом XIAP не описаны дефекты цитотоксичности или еще какие-либо иммунологические проявления, демонстрируемые пациентами с ХЛП1, подтверждая, что ХЛП1 и ХЛП2 являются различными заболеваниями.

В данной работе описан метод лабораторной диагностики, основанный на проточной цитофлуориметрии, для пациентов с подозрением на ХЛП. Быстрое выявление данного состояния позволяет своевременно скорректировать терапию и иницировать подготовку пациента к процедуре ТГСК. Данный метод позволяет усовершенствовать существующий подход в диагностике пациентов с ХЛП1 и ХЛП2 и расширить понимание патогенеза этих состояний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Пациенты

В исследование были включены пациенты, консультированные в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в период с июля 2016 г. по февраль 2020 г. в связи с наличием клинико-anamnestических данных, наблюдаемых при ХЛП. Определение экспрессии белка SAP выполнено 44 пациентам, медиана возраста составила 7 лет (от 3 месяцев до 18 лет). Определение экспрессии белка XIAP выполнено 45 пациентам, медиана возраста составила 5 лет (от 2 месяцев до 18 лет). Всем пациентам также было выполнено молекулярно-генетическое исследование генов *SH2D1A* и *XIAP*. Пациенты были разделены на 2 группы: больные, у которых были выявлены мутации в гене *SH2D1A* (9 пациентов из 8 семей, медиана возраста 8 лет (от 3 до 17 лет)) или *XIAP* (10 пациентов из 9 семей, медиана возраста 3 года (от 2 мес до 14 лет)) (таблицы 1, 2), и пациенты, у которых мутации в данных генах не выявлены, и в дальнейшем им были установлены другие диагнозы.

Оценка внутриклеточной экспрессии белков SAP или XIAP была также выполнена матерям пациентов,

являющимися носителями мутации в соответствующем гене (3 матери с мутациями в гене *SH2D1A* и 8 матерей с мутациями в гене *XIAP*). Для части пациентов с подтвержденными мутациями в генах *SH2D1A* ($n = 7$) и *XIAP* ($n = 6$) было проведено определение количества iNKT-клеток.

В исследование также вошли образцы периферической крови от условно здоровых индивидуумов в возрасте от 18 до 50 лет ($n = 93$ (SAP); $n = 71$ (XIAP)).

Оценка экспрессии белков SAP и XIAP

Образцы венозной крови с этилендиаминтетрауксусной кислотой поступили в лабораторию трансплантационной иммунологии и иммунотерапии гемобластозов НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Клетки цельной крови фиксировались и пермеабелизовались с помощью набора реагентов IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter). Затем производилось поэтапное окрашивание первичными моноклональными антителами (Purified Mouse SH2D1A (clone 1C9, Abnova), Purified Mouse Anti-XIAP (Clone 48/hLPL/XIAP, Becton Dickinson), Purified Mouse IgG2a κ Isotype Control (Clone G155-178, Becton Dickinson), Purified Mouse IgG1, κ Isotype Control (Clone X40, Becton Dickinson)), вторичными

конъюгированными с флюорохромами антителами (FITC Anti-Mouse IgG2a (Clone R19-15, Becton Dickinson), PE Rat anti-Mouse IgG1 Secondary Antibody (Clone RPA-T4, eBioscience)) и окрашивание поверхностных линейно-специфичных антигенов (CD3 PerCP (Clone SK7, Becton Dickinson), CD56 APC (Clone NCAM16.2, Becton Dickinson)).

Сбор данных проводился на проточном цитометре FACS Canto II (Becton Dickinson), для каждого образца было собрано не менее 20 000 событий в регионе лимфоцитов. Анализ данных выполнен с помощью программного обеспечения Kaluza Analysis (Beckman Coulter). Оценка экспрессии белков проводилась в регионах CD3⁺ (Т-лимфоциты) и CD56⁺ (NK-лимфоциты) в сравнении с уровнями экспрессии в контрольном образце (условно здоровый индивидуум). Для исключения неспецифического связывания использовались изотермические контрольные антитела. Долю клеток, содержащих SAP/XIAP, определяли путем постановки на гистограмме, совмещающей данные контрольного и исследуемого образцов, гейта, захватывающего < 2% клеток изотипического контроля (рисунки 1). С применением данной стратегии гейтирования в группе условно здоровых индивидуумов (SAP ($n = 71$) и XIAP ($n = 93$)) были получены референсные интер-

Таблица 1
Характеристика пациентов с ХЛП1

Table 1
General characteristics of all enrolled XLP1-patients

Пациент Patient	Возраст, годы Age, years	SAP в Т-клетках, % SAP expression T cell, %	SAP в NK- клетках, % SAP expression NK cell, %	Качественная оценка Interpretation	Генетический вариант в гене <i>SH2D1A1</i> <i>SH2D1A1</i> sequence variants	Экзон Exon	Тип варианта Mutation type	iNKT (доля среди CD3- лимфоцитов), % iNKT (of CD3 lymphocytes), %
1	8	3	1	Отсутствует Absence	c.97G>T, p.Asp33Tyr	Экзон 1 Exon 1	Миссенс Missense	0,03
2	17	10	10	Резко снижена Severely reduced	c.160T>A, p.Tyr54Asn	Экзон 2 Exon 2	Миссенс Missense	0,01
3	8	3	2	Отсутствует Absence	c.162C>A, p.Tyr54Ter	Экзон 2 Exon 2	Нонсенс Nonsense	0,01
4а	5	2	1	Отсутствует Absence	c.245dupA, p.Asn82LysfsTer22	Экзон 3 Exon 3	Дупликация/ сдвиг рамки Duplication/ frameshift mutation	0
5а	3	1	1	Отсутствует Absence	c.245dupA, p.Asn82LysfsTer22	Экзон 3 Exon 3	Дупликация/ сдвиг рамки Duplication/ frameshift mutation	0,03
6	6	2	1	Отсутствует Absence	c.287dupT, p.Pro97ThrfsTer7	Экзон 3 Exon 3	Дупликация/ сдвиг рамки Duplication/ frameshift mutation	–
7	11	2	1	Отсутствует Absence	c.293 T>C, p.Leu98Pro	Экзон 3 Exon 3	Миссенс Missense	0,01
8	13	3	6	Отсутствует Absence	c.del1ex, p.?	–	Делеция экзона 1 Deletion of exon 1	0
9	7	1	0	Отсутствует Absence	c.del1-4ex, p.?	–	Делеция гена Deletion of gene	–
Норма Threshold		> 50	> 45					0,05–1,16

Примечание. Здесь и в табл. 2: 1 – генетические варианты ХЛП указаны согласно номенклатуре Human Genome Variation Society (<http://varnomen.hgvs.org/>), транскрипты: XIAP NM_001167.3, SH2D1A NM_002351.4 (RefSeq; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>); а – обозначение пациентов из одной семьи. Notes. Here and in Table 2: 1 – genetic variants of X-linked lymphoproliferative syndrome are indicated according to the Human Genome Variation Society (<http://varnomen.hgvs.org/>), transcripts XIAP NM_001167.3, SH2D1A: NM_002351.4 (RefSeq; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>); a – indicates individuals from the same family

валы экспрессии белков SAP и XIAP. В дальнейшем нижние значения референсных интервалов для каждой клеточной популяции были приняты как дискриминирующие в предполагаемой диагностике ХЛП.

Для дальнейшего анализа данные были сгруппированы в зависимости от уровня внутриклеточной экспрессии белка в сравнении с принятыми диагностическими пороговыми значениями: образцы со сниженной экспрессией SAP ($n = 9$) и XIAP ($n = 10$) и образцы, у которых экспрессия белков SAP ($n = 35$) и XIAP ($n = 35$) в пределах нормы.

Для контроля качества преаналитического и аналитического этапов были установлены следующие условия выполнения исследования: наличие контрольного образца крови, полученного от условно здорового индивидуума; хранение и транспортировка образцов при температуре 18–25°C не более 24 ч после забора материала.

Также была проведена оценка экспрессии белков SAP и XIAP в материале 3 здоровых индивидуумов с учетом влияния таких факторов, как время и температура хранения. Дизайн эксперимента был пред-

ставлен оценкой экспрессии белков в 3 временных точках: через 4, 24 и 48 ч от момента забора периферической крови, при хранении ее при температуре +4°C и при комнатной температуре (22–25°C).

Контроль качества работы проточного цитометра производился посредством регулярной калибровки частицами CS&T (Cytometer Setup and Tracking beads, Becton Dickinson) с помощью стандартной утилиты прибора "CST", что обеспечивает стабильность и воспроизводимость исследований.

Была принята следующая качественная интерпретация уровня экспрессии: 0–10% – отсутствие белка, 11–30% – резкое снижение белка, > 30% (до установленного порогового значения) – количество белка снижено.

Оценка количества iNKT-лимфоцитов

Относительное количество iNKT-лимфоцитов определялось путем поверхностного окрашивания клеток периферической крови, для чего были использованы следующие моноклональные антитела: CD3 PerCP (Clone SK7, Becton Dickinson), Anti-

Таблица 2
Характеристика пациентов с ХЛП2

Table 2
General characteristics of all enrolled XLP2-patients

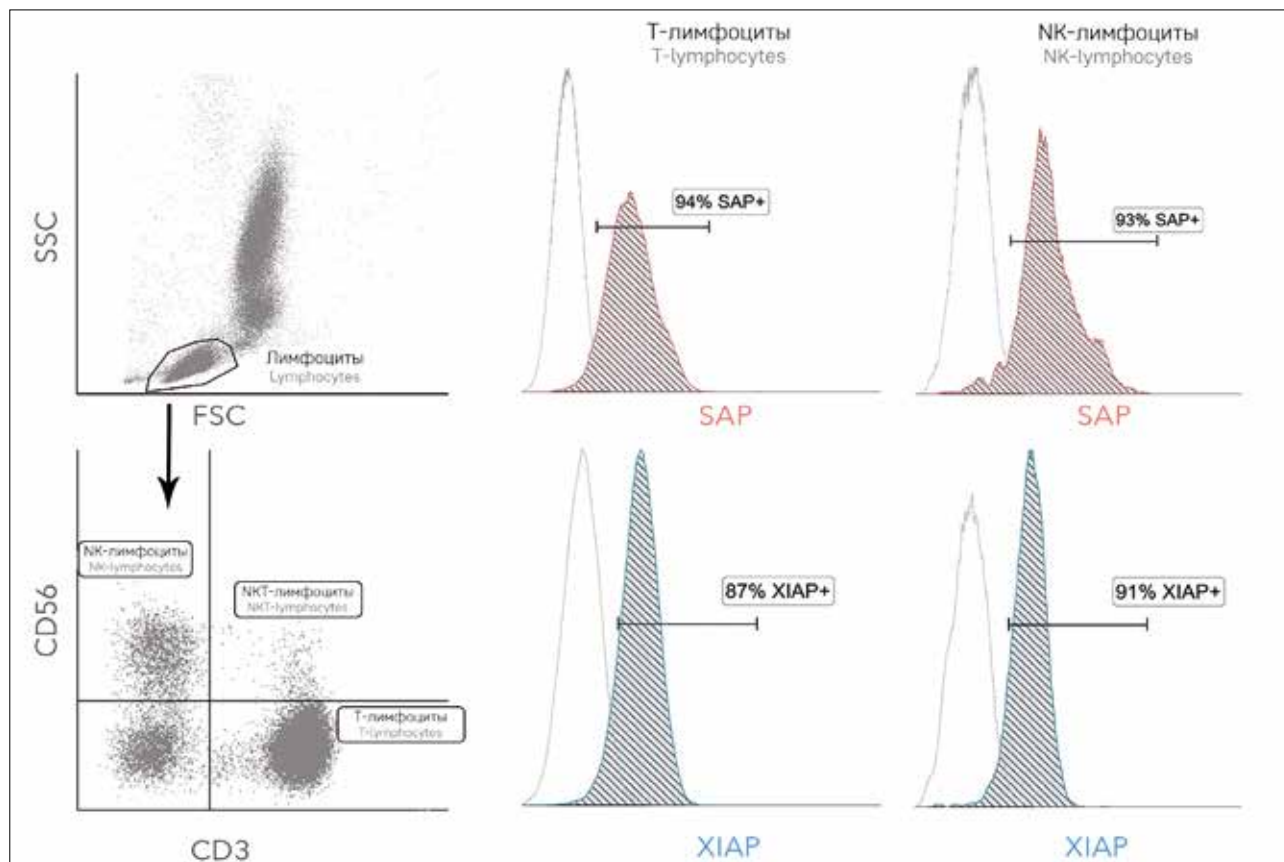
Пациент Patient	Возраст годы Age	XIAP в Т-клетках, % XIAP expression T cell, %	XIAP в НК- клетках, % XIAP expression NK cell, %	Качественная оценка Interpretation	Генетический вариант в гене XIAP1 XIAP sequence variants	Экзон Exon	Тип варианта Mutation type	iNKT (доля среди CD3- лимфоцитов), % iNKT (of CD3 lymphocytes), %
1	4 года 4 y.o.	23	18	Резко снижена Severely reduced	c.219G>A, p.Trp73Ter	Экзон 2 Exon 2	Нонсенс Nonsense	0,01
2	3 месяца 3 months	64	30	Снижена Reduced	c.389_392delACAG p.Asp130GlyfsTer11	Экзон 2 Exon 2	Делеция/сдвиг рамки Deletion/ frameshift mutation	0,05
3	2 года 2 y.o.	77	30	Снижена Reduced	c.599G>A, p.Cys200Tyr	Экзон 2 Exon 2	Миссенс Missense	–
4	3 года 3 y.o.	42	22	Снижена Reduced	c.664C>T, p.Arg222Ter	Экзон 2 Exon 2	Нонсенс Nonsense	–
5	6 месяцев 6 months	22	8	Резко снижена Severely reduced	c.1027_1030delCATT, p.His343Ter	Экзон 4 Exon 4	Делеция/сдвиг рамки Deletion/ frameshift mutation	0,04
6	6 лет 6 y.o.	3	7	Отсутствует Absence	c.1386dupT, p.Val463Cysfs*10c	Экзон 7 Exon 7	Дупликация/ сдвиг рамки Duplication/ frameshift mutation	0,18
7	6 лет 6 y.o.	29	21	Резко снижена Severely reduced	c.1391delC p.Pro464LeufsTer5	Экзон 7 Exon 7	Делеция/сдвиг рамки Deletion/ frameshift mutation	–
8	7 месяцев 7 months	2	3	Отсутствует Absence	c.del2-5, p.?	–	Делеция экзонов 2–5 Deletion of exons 2–5	0,08
9а	2 месяца 2 months	69	20	Снижена Reduced	c.del4-5ex, p.?	–	Делеция экзонов 4–5 Deletion of exons 4–5	0,04
10а	14 лет 14 y.o.	61	73	Снижена Reduced	c.del4-5ex, p.?	–	Делеция экзонов 4–5 Deletion of exons 4–5	–
Норма Threshold		> 80	> 75					0,05–1,16

Рисунок 1

Стратегия гейтирования лимфоцитов (дот-плоты) и экспрессия белков SAP и XIAP (гистограммы) в Т- и NK-лимфоцитах. Серая открытая гистограмма отражает изотип-контроль, цветная – экспрессию белка в лимфоцитах здорового индивидуума

Figure 1

Healthy individual T- and NK-lymphocyte gating strategy and histograms of SAP and XIAP expression levels in both cell populations. Unshaded histograms represent isotype controls



iNKT (IgG1) PE (Clone 6B11, Becton Dickinson), IgG1 PE (Clone MOPC-21, Becton Dickinson), CD45 FITC (Clone J33, eBioscience), CD161 APC (Clone DX12, Becton Dickinson). Исследование было выполнено для 7 пациентов с ХЛП1 и 6 больных с ХЛП2, а также для группы условно здоровых доноров ($n = 35$).

Статистическая обработка данных

Нами были рассчитаны референсные интервалы экспрессии белков и относительного количества iNKT-лимфоцитов (на основе 2,5 и 97,5 перцентилей) для следующих когорт: условно здоровые индивидуумы, пациенты с подтвержденным ХЛП и больные, не имеющие мутаций в генах *SH2D1A* и *XIAP*. Для выявления статистически значимых различий содержания iNKT в когортах пациентов с ХЛП и условно здоровых доноров использован U-критерий Манна-Уитни. В дальнейшем проведен ROC-анализ для определения оптимизированного порогового диагностического значения в целях увеличения чувствительности и специфичности теста для каждого белка в каждой отдельной клеточной популяции. Для ROC-анализа использовались данные 8 пациентов с ХЛП1 и 9 больных с ХЛП2 (в парах сиблингов случайным

образом исключался один из них). Обработка данных проводилась при помощи программного обеспечения PRISM 7 (GraphPad Software).

Молекулярно-генетический анализ

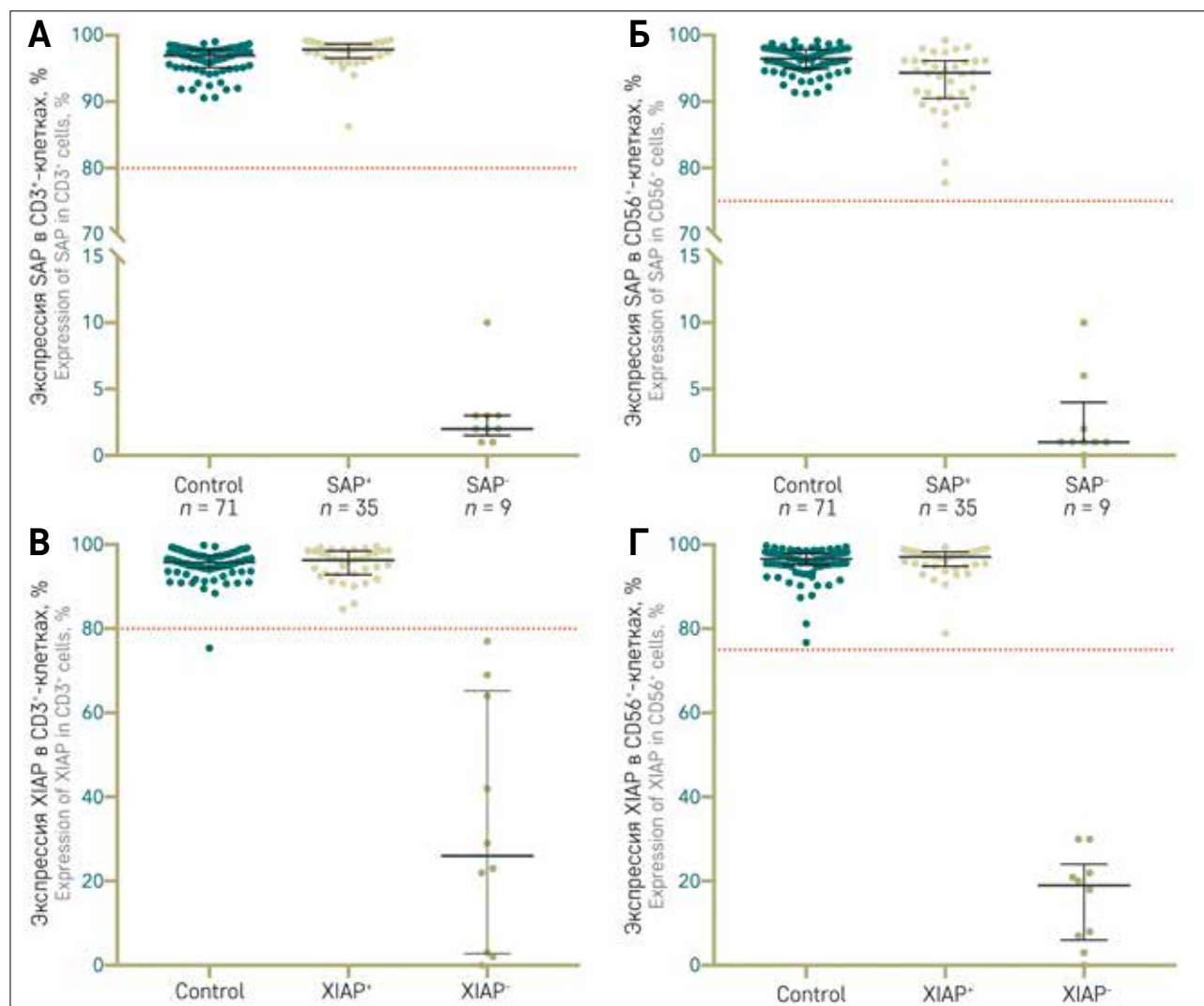
Геномная ДНК была выделена из периферической крови с использованием набора «ДНК-сорб В» (ИнтерЛабСервис, Россия) или с помощью автоматических станций NorDiag (Норвегия) и QIASymphony SP/AS (Германия). Все кодирующие экзоны генов *SH2D1A* и *XIAP* с прилегающими к ним участками интронов (в пределах минимум 25 пар оснований от границ экзона) были амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием по Сэнгеру с использованием набора реагентов BigDye Terminator v3.1 и автоматического секвенатора ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США). Полученные результаты сравнивали с геномной последовательностью генов *SH2D1A* и *XIAP*, представленной в референсном геноме человека (chrX: 124,346,563-124,373,160 и 123,859,724-123,913,979 соответственно). Для нескольких пациентов поиск мутаций проводился методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) на платформе NextSeq

Рисунок 2

Экспрессия белков SAP и XIAP среди Т- (CD3⁺) и NK- (CD56⁺) лимфоцитов в группах пациентов и здоровых доноров. Точечные дот-плоты (медиана с межквартильным интервалом), демонстрирующие распределение значений экспрессии белков SAP и XIAP среди когорты здоровых индивидуумов (control), среди пациентов с подозрением на ХЛП и не подтвержденным в дальнейшем диагнозом (SAP⁺ и XIAP⁺) и среди пациентов с подтвержденным ХЛП (SAP⁻ и XIAP⁻). Красная пунктирная линия отображает оптимизированное пороговое значение экспрессии

Figure 2

Expression of SAP and XIAP in T (CD3⁺) and NK (CD56⁺) lymphocytes in patients and healthy donors. Dot plots (median with an interquartile interval) represent distribution of protein expression values in the cohort of healthy donors (control), in patients with suspected but discarded XLP (SAP⁺/XIAP⁺), and in patients with genetically verified XLP (SAP⁻/XIAP⁻). Red dotted line marks optimized protein expression threshold for patients with suspected XLP



(Illumina, США). Для пробоподготовки была использована система гибридационного обогащения библиотек SeqCap EZ (Roche, Швейцария). Клиническая значимость выявленных генетических вариантов, отличающихся от референсной последовательности, определялась на основании рекомендаций American College of Medical Genetics and Genomics [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование экспрессии SAP и XIAP в группе условно здоровых индивидуумов

Нами были рассчитаны референсные интервалы экспрессии белков SAP ($n = 71$) и XIAP ($n = 93$)

в Т- и NK-лимфоцитах в когорте здоровых индивидуумов. Значения экспрессии SAP составили 91–99% (медиана 97%) в Т-лимфоцитах и 91–99% (медиана 96%) в NK-лимфоцитах. Значения экспрессии XIAP составили 89–100% (медиана 96%) для Т-клеток и 83–99% (медиана 97%) для NK-клеток (рисунки 2, 4А, Б).

Исследование влияния различных условий хранения диагностического материала на оценку экспрессии белков SAP и XIAP

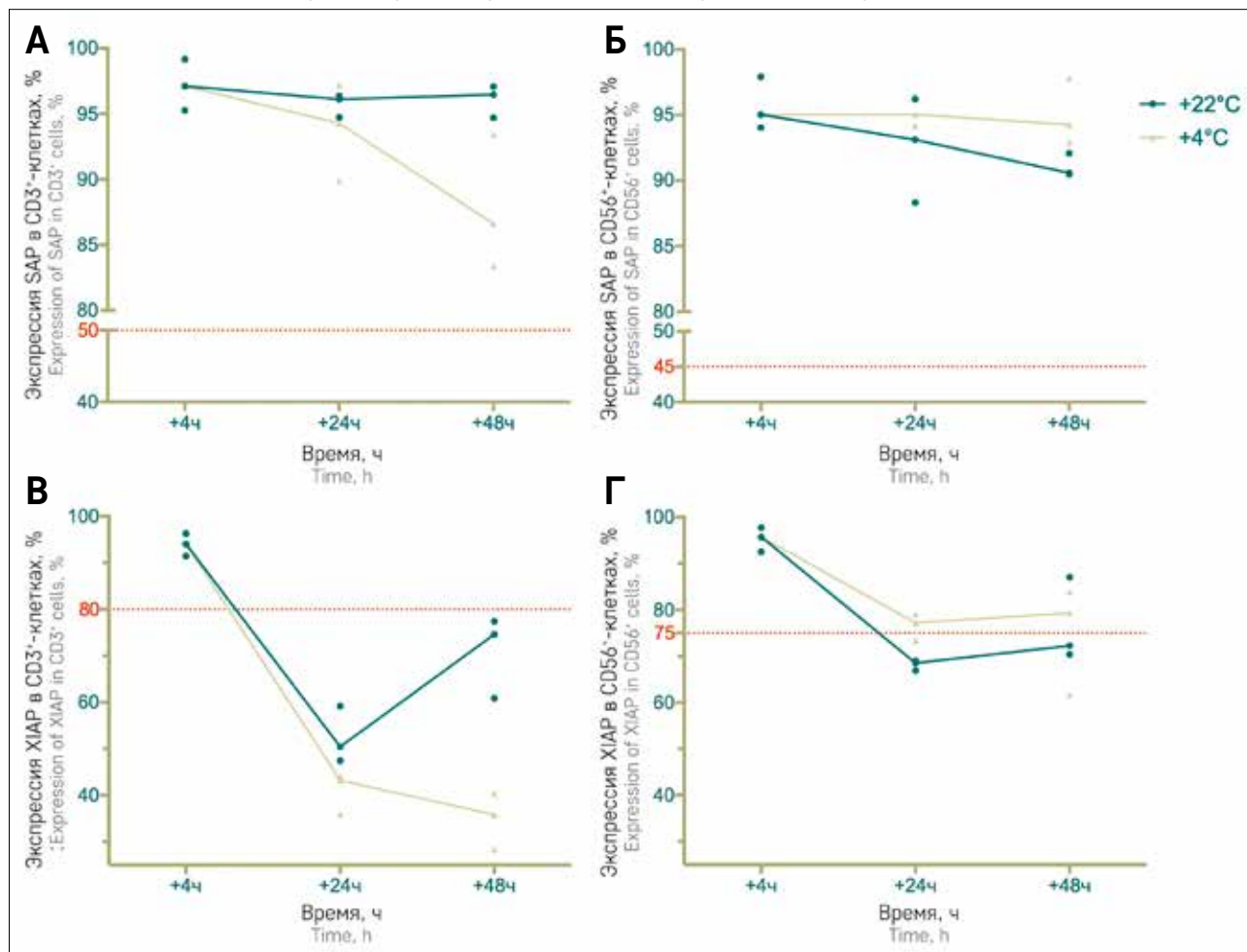
При изучении влияния условий хранения материала на стабильность определения экспрессии белка SAP было выявлено, что в течение всех 48 ч

Рисунок 3

Влияние температуры и длительности хранения материала на оценку экспрессии белков SAP и XIAP здоровых индивидуумов (+4, +24 и +48 ч). Красная пунктирная линия соответствует оптимизированному пороговому значению для диагностики пациентов с подозрением на ХЛП

Figure 3

The effect of the sample storage (time) at different temperature conditions on the measured SAP and XIAP expression in healthy donors. Red dotted line marks optimized protein expression threshold for patients with suspected XLP



как в Т-, так и в NK-лимфоцитах при любых температурных условиях экспрессия оставалась выше установленного порогового диагностического значения (медиана через 48 ч в Т-лимфоцитах – 94%; в NK-лимфоцитах – 93%) (рисунки 3А, Б). Экспрессия белка XIAP уже через 24 ч была резко снижена относительно порогового уровня как в Т- (при +4°C медиана значений составила 43%, при +22°C – 50%), так и в NK-лимфоцитах (медиана значений при 4°C составила 77% и при 22°C – 69%) (рисунки 3В, Г).

Исследование экспрессии SAP у пациентов с мутациями в гене SH2D1A

Во всех 9 образцах с подтвержденной мутацией в гене SH2D1A определялось резкое снижение SAP относительно порогового значения или отсутствие экспрессии белка (медиана 2% для Т- и 1% для NK-лимфоцитов; разброс 1–10% для Т- и 0–10% для NK-лимфоцитов) (рисунки 2, 4В).

Исследование экспрессии XIAP у пациентов с мутациями в гене XIAP

Во всех 10 образцах с подтвержденной мутацией в гене XIAP отмечалось снижение уровня экспрессии белка относительно порогового значения (медиана 36% для Т- и 21% для NK-клеток; разброс 2–77% для Т- и 3–73% для NK-лимфоцитов) (рисунки 2, 4Г).

Исследование экспрессии SAP и XIAP у пациентов без мутаций в генах SH2D1A и XIAP соответственно

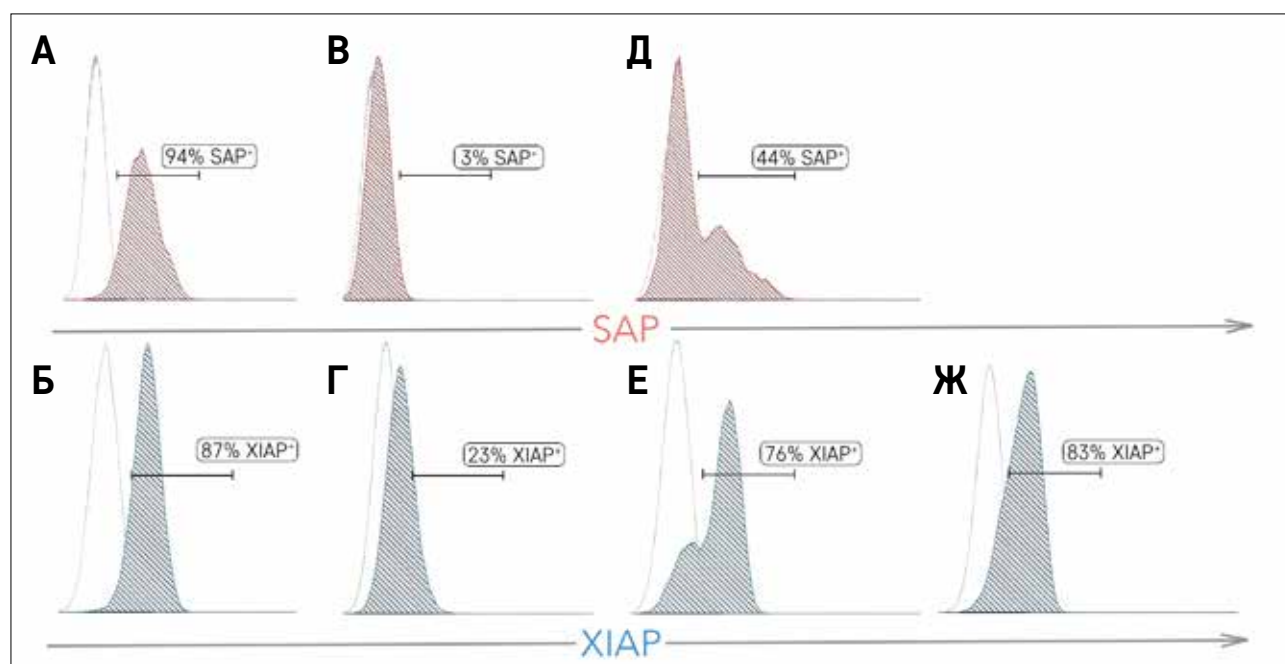
При оценке экспрессии белка SAP и XIAP в группе пациентов, не имеющих мутаций, значения для Т- и NK-лимфоцитов находились выше установленных пороговых значений и не имели отличий от группы условно здоровых индивидуумов. Медиана экспрессии SAP для Т-клеток составила 98%, разброс 86–99%; медиана для NK-клеток – 94%, разброс 78–99%. Экспрессия XIAP: медиана 96%, разброс 85–100%

Рисунок 4

Стратегия гейтирования лимфоцитов (дот-плоты) и экспрессия белков SAP и XIAP (гистограммы) в Т- и NK-лимфоцитах. Серая открытая гистограмма отражает изотип-контроль, цветная – экспрессию белка в лимфоцитах здорового индивидуума. Экспрессия белков SAP и XIAP в норме и при ХЛП: А – вариант экспрессии белка SAP здорового индивидуума; Б – вариант экспрессии белка XIAP здорового индивидуума; В – отсутствующая экспрессия SAP при наличии клинической картины ХЛП и мутации в гене *SH2D1A*; Г – резко сниженная экспрессия XIAP при наличии клинической картины ХЛП и мутации в гене *XIAP*; Д – бимодальное распределение экспрессии белка SAP в Т-лимфоцитах матери, являющейся подтвержденным носителем мутации в гене *SH2D1A*; Е – бимодальное распределение экспрессии белка XIAP в Т-лимфоцитах матери, являющейся подтвержденным носителем мутации в гене *XIAP*; Ж – картина сглаженности экспрессии белка XIAP в Т-лимфоцитах матери, являющейся подтвержденным носителем мутации в гене *XIAP*

Figure 4

Examples of different SAP/XIAP expression patterns (in T-lymphocytes) in healthy donors and XLP patients. А – healthy donor SAP expression; Б – healthy donor XIAP expression; В – absence of SAP expression in a patient with the clinical picture of XLP and confirmed mutation in the *SH2D1A* gene; Г – sharply reduced expression of XIAP in a patient with the clinical picture of XLP and a confirmed mutation in the *XIAP* gene; Д – bimodal distribution of T-lymphocytes SAP expression in confirmed *SH2D1A* mutation carrier; Е – bimodal distribution of T-lymphocytes XIAP expression in confirmed *XIAP* gene mutation carrier; Ж – smooth expression of the XIAP protein in T lymphocytes of a woman who is a confirmed carrier of the mutation in the *XIAP* gene



для Т-клеток; медиана 97%, разброс 79–99% для NK-клеток (рисунок 2).

Получение оптимизированного порогового значения уровня экспрессии для белков SAP и XIAP

Нами был произведен ROC-анализ данных больных с подтвержденными ХЛП1 и ХЛП2 и пациентов, не имеющих мутаций в генах *SH2D1A* и *XIAP*, позволивший получить оптимизированные пороговые значения экспрессии SAP – 50% для Т- и 45% для NK-лимфоцитов, со 100% показателями чувствительности и специфичности. Оптимизированные значения для XIAP составили 80% для Т- и 75% для NK-лимфоцитов, также со 100% показателями чувствительности и специфичности.

Исследование количества iNKT-лимфоцитов в группе условно здоровых индивидуумов и у пациентов с ХЛП1 и ХЛП2

Для получения референсного интервала процентного содержания iNKT-лимфоцитов нами

была исследована периферическая кровь 35 условно здоровых индивидуумов (0,05–1,16% iNKT среди Т-лимфоцитов). У всех пациентов с мутациями в гене *SH2D1A* выявили значительное снижение количества клеток данной популяции с медианой 0,01% (разброс 0–0,03%; $p < 0,0001$). У 3/6 пациентов, имеющих мутацию в гене *XIAP*, также выявили отклонения ниже порогового значения; в целом медиана значений для всех 6 пациентов составила 0,05% (разброс 0,01–0,18%; $p < 0,0002$) (рисунок 5).

Исследование экспрессии SAP и XIAP у матерей-носительниц мутаций в генах *SH2D1A* и *XIAP* соответственно

Нами была исследована экспрессия белков SAP и XIAP матерей пациентов, являющихся носительницами мутаций соответствующих генов. У 3 женщин с мутациями в гене *SH2D1A* наблюдалась бимодальная экспрессия распределения SAP (рисунок 4Д), медиана экспрессии SAP в Т-клетках составила 44% (разброс 28–65%), в NK-лимфоцитах – 71% (разброс 20–73%).

Практически все (6/8) носители мутации в гене *XIAP* имели пограничные значения экспрессии белка при картине сглаженного в отрицательную зону пика, предполагающего наличие 2 популяций клеток – с нормальной и сниженной экспрессией белка. Оставшиеся 2 из 8 матерей имели бимодальное распределение. Во всей группе медиана экспрессии белка в Т-клетках составила 82% (разброс 75–91%), в НК-лимфоцитах – 80% (разброс 72–89%) (рисунки 4Е, Ж).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

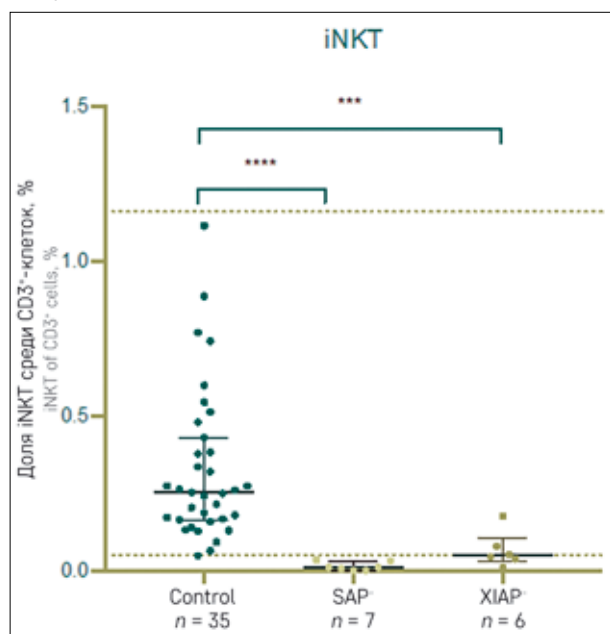
ХЛП1 и ХЛП2 – редкие первичные иммунодефицитные состояния, часто осложняющиеся ГЛГ, требующим интенсивной иммуносупрессивной терапии, при отсутствии которой данное состояние приводит к летальному исходу. В связи с этим нами была поставлена цель по разработке лабораторного метода, позволяющего быстро и точно диагностиро-

Рисунок 5

Процентное количество iNKT-клеток среди Т- ($CD3^+$) лимфоцитов в группах пациентов с ХЛП и здоровых доноров. Точечные дот-плоты (медиана с интерквартильным интервалом), демонстрирующие распределение значений iNKT среди когорты здоровых индивидуумов (control) и у пациентов с ХЛП (SAP^- и $XIAP^-$). Серым на графике обозначен интервал соответствующий должностному количеству iNKT. Значение $p \leq 0,05$ принято за статистически значимое: * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$, **** – $p \leq 0,0001$

Figure 5

The percentage of iNKT cells among T ($CD3^+$) lymphocytes in XLP patients and healthy donors. Dot plots (median with an interquartile interval) represent distribution of iNKT percentage in the cohort of healthy donors (control) and in patients with genetically verified XLP ($SAP^-/XIAP^-$). The gray area marks normal range of iNKT cells. P values were calculated with Mann-Whitney U-test, $p \leq 0.05$ is taken as statistically significant: * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$, *** – $p \leq 0.001$, **** – $p \leq 0.0001$



вать ХЛП. В нашем исследовании мы описали 9 пациентов с ХЛП1/дефицитом *SAP* и 10 больных с ХЛП2/дефицитом *XIAP*, имеющих мутации в генах *SH2D1A* и *XIAP* соответственно. У всех пациентов наблюдалось снижение экспрессии в сравнении с контрольной группой здоровых индивидуумов и группой больных, не имеющих мутаций в генах *SH2D1A* и *XIAP*, но имеющих клинические проявления, схожие с ХЛП.

В нашей работе 8 из 9 пациентов с ХЛП1 имели полное отсутствие экспрессии белка, что согласуется с литературными данными [15, 22]. Надежность метода подтверждается высокими значениями чувствительности и специфичности, рассчитанными с помощью ROC-анализа. Пациенты с ХЛП2 в подавляющем большинстве случаев имели остаточную экспрессию *XIAP*, о чем свидетельствуют медианные значения экспрессии 36% и 21% в Т- и НК-лимфоцитах соответственно. Согласно ROC-анализу метод диагностики пациентов с ХЛП2 также имеет высокие значения чувствительности и специфичности, несмотря на то, что в нашем исследовании лишь 1 пациент демонстрировал полное отсутствие экспрессии *XIAP*.

Основываясь на вышеупомянутых данных об остаточной экспрессии *XIAP* у пациентов с ХЛП2, а также данных, полученных при анализе влияния условий хранения материала, следует более аккуратно подходить к оценке экспрессии белка вследствие ухудшения его детекции при хранении образца более 12 ч. Детекция экспрессии белка *SAP* имела меньшую зависимость от условий хранения образца: даже по истечении 48 ч детектируемый уровень экспрессии был выше оптимизированного порогового значения.

В сравнении с традиционными подходами к детекции белков, основанными на методе Вестерн-блоттинга, метод проточной цитофлуориметрии позволяет не только в более короткие сроки получить результат, но также требует меньшего количества материала и может дать более детальную информацию об уровне экспрессии белков в отдельно взятой популяции лимфоцитов [3, 14]. Данное преимущество можно использовать в оценке клеточного химеризма у пациентов с ХЛП, перенесших процедуру ТГСК [15]. Определение линейной специфичности также может быть полезно при наличии у пациента реверсивного мозаицизма, достаточно часто встречающегося среди носителей мутаций в гене *SH2D1A* [12, 15, 16, 26]. В нашем исследовании пациентов с такого рода феноменом встретить не удалось.

Некоторые методики, нацеленные на оценку экспрессии белка *SAP*, предлагают предварительную активацию клеток с помощью различных стимуляторов [6, 16]. На основании нашего опыта можно заключить, что отсутствие дополнительного этапа, усложняющего и увеличивающего стоимость иссле-

дования, не влияет на диагностику пациентов с ХЛП.

Согласно результатам проведенной работы, экспрессия белков SAP и XIAP находится на различных уровнях в Т- и NK-лимфоцитах, что, по-видимому, связано с различным функциональным состоянием клеток. В связи с этим линейная оценка экспрессии одновременно в нескольких клеточных популяциях дает преимущество при интерпретации результата в сложных и неоднозначных ситуациях. Примером может служить отсутствие целой популяции клеток или пограничное значение экспрессии в отдельной клеточной линии. Так, часто можно наблюдать отсутствие NK-лимфоцитов у пациентов, находящихся в острой фазе ГЛГ (собственные неопубликованные данные), в связи с чем комбинированный подход в линейной оценке представляет определенные преимущества.

У большинства образцов от пациентов с ХЛП2 наблюдалась остаточная экспрессия белка, что, по-видимому, связано со специфичностью моноклонального антитела, используемого в данном исследовании. Большинство мутаций XIAP располагалось в начале гена и имело выраженное повреждающее действие на белок (нонсенс, делеции целых экзонов), что косвенно может свидетельствовать о том, что специфичность антитела, используемого в данном исследовании, нацелена на область N-конца структуры XIAP. Исследование экспрессии на большей выборке пациентов позволит оценить корреляцию между типом мутации и профилем экспрессии.

Женщины-носительницы мутантного гена *SH2D1A* или XIAP, как правило, имели бимодальное распределение экспрессии соответствующих белков. Данный факт был продемонстрирован в нашей работе: все носители мутаций имели либо характерную специфичную картину бимодальности, либо сохраняли некоторую тенденцию к ней, проявляющуюся в виде сглаженности положительного пика, уходящего в отрицательную зону. Особенно наглядно это проявлялось у носителей мутаций в гене XIAP. По-видимому, картина превалирования лимфоидной популяции, несущей нормальное количество белка XIAP, является результатом селекции клона лимфоцитов, происходящей на этапе циркуляции в периферическом кровяном русле.

iNKT-лимфоциты представляют собой минорную популяцию клеток, распознающую гликофинголипидные антигены в составе молекулы CD1d [11, 12, 14]. Количественные дефекты данной популяции в большинстве случаев описаны в составе ХЛП1 [21, 27], хотя имеются редкие работы, демонстрирующие снижение данной популяции и среди пациентов с мутацией в гене XIAP [17, 28]. Более того,

существуют работы, опровергающие связь ХЛП2 и снижения iNKT-лимфоцитов [17, 29]. В нашем исследовании оценка iNKT-клеток продемонстрировала себя самостоятельным методом диагностики пациентов с подозрением на ХЛП. Учитывая малочисленность данной клеточной популяции у здоровых людей, при оценке iNKT необходимо строго соблюдать преаналитический и аналитический этапы. Известно, что данная популяция более чувствительна к апоптозу [17, 28] в связи с чем материал, подвергшийся длительному хранению, не должен подлежать анализу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами представлен лабораторный метод, позволяющий проводить скрининг пациентов при подозрении на дефицит белков SAP и XIAP. Экспрессия белков в обязательном порядке должна быть исследована у пациентов с подозрением на ХЛП, особенно если речь идет о пациенте мужского пола, развившего состояние ЭБВ-ассоциированного ГЛГ и имеющего отягощенный семейный анамнез. Наличие быстрого диагностического метода позволяет в кратчайшие сроки начать корректную терапию и инициировать подготовку к жизненно необходимой процедуре ТГСК. Учитывая наличие мутаций, при которых сохраняются нормальные уровни экспрессии белков, секвенирование генов *SH2D1A* или XIAP на настоящий момент остается «золотым стандартом». Однако предложенная методика может помочь в интерпретации результатов секвенирования, поскольку она предлагает инструмент оценки верификации экспрессии белка, в особенности когда речь идет о новых или ранее не упоминавшихся генетических вариантах.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Pershin D.E. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6148-7209>
Vedmedskaya V.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7247-4844>
Fadeeva M.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6553-2505>
Vladimirov I.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1435-665X>
Roppelt A.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5132-1267>
Kieva A.M. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2467-2840>
Raykina E.M. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7634-2053>
Rodina Yu.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9857-4456>
Maschan M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1735-0093>
Shcherbina A.Yu. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3113-4939>

Литература

- Ochs H.D., Smith C.I.E., Puck J.M. Primary Immunodeficiency diseases. Third Edition. New York: Oxford University Press; 2016.
- Sullivan K.E., Stiehm E.R. Stiehm's Immune Deficiencies: Inborn Errors of Immunity. Second edition. Elsevier, United Kingdom; 2020
- Роппельт А.А., Юхачева Д.В., Мякова Н.В., Смирнова Н.В., Скворцова Ю.В., Варламова Т.В. и др. X-сцепленный лимфопролиферативный синдром 1-го и 2-го типов. Вопросы гематологии/онкологии и иммунологии в педиатрии 2016; 15 (1): 17–26.
- Booth C., Gilmour K.C., Veys P., Gennery A.R., Slatter M.A., Chapel H. et al. X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management and outcome of the disease. *Blood* 2011; 117 (1): 53–62. DOI:10.1182/blood-2010-06-284935
- Xu T., Zhao Q., Li W., Chen X., Xue X., Chen Z., et al. X-linked lymphoproliferative syndrome in mainland China: review of clinical, genetic, and immunological characteristic. *Eur J Pediatr* 2020; 179 (2): 327–38. DOI: 10.1007/s00431-019-03512-7
- Pachlopnik Schmid J., Canioni D., Moshous D., Touzot F., Mahtaloui N., Hauck F., et al. Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood* 2011; 117 (5): 1522–9. DOI: 10.1182/blood-2010-07-298372
- Масчан М.А., Новичкова Г.А. Гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз. Вопросы современной педиатрии 2009; 8 (3).
- Yang X., Miyawaki T., Kanegane H. SAP and XIAP deficiency in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Int* 2012; 54 (4): 447–54. DOI: 10.1111/j.1442-200X.2012.03683.x
- Coffey A.J., Brooksbank R.A., Brandau O., Oohashi T., Howell G.R., Bye J.M., et al. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* 1998; 20 (2): 129–35. DOI:10.1038/2424
- Sayos J., Wu C., Morra M., Wang N., Zhang X., Allen D., et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998; 395 (6701): 462–9. DOI:10.1038/2668
- Veillette A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* 2006; 6 (1): 56–66.
- Wu N., Veillette A. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr Opin Immunol* 2016; 38: 45–51. DOI: 10.1016/j.coi.2015.11.003
- Panchal N., Booth C., Cannons J.L., Schwartzberg P.L. X-Linked Lymphoproliferative Disease Type 1: A Clinical and Molecular Perspective. *Front Immunol* 2018; 9: 666. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00666
- Rezaei N., Mahmoudi E., Aghamohammadi A., Das R., Nichols K. X-linked lymphoproliferative syndrome: a genetic condition typified by the triad of infection, immunodeficiency and lymphoma. *Br J Haematol* 2011; 152 (1): 13–30. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08442.x
- Furukawa H., Tohma S., Kitazawa H., Komori H., Nose M., Ono M. Role of SLAM-associated protein in the pathogenesis of autoimmune diseases and immunological disorders. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010; 58 (1): 37–44. DOI: 10.1007/s00005-009-0060-7
- Zhao M., Kanegane H., Kobayashi C., Nakazawa Y., Ishii E., Kasai M., et al. Early and rapid detection of X-linked lymphoproliferative syndrome with SH2D1A mutations by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2011; 80 (1): 8–13. DOI: 10.1002/cyto.b.20552
- Rigaud S., Fondanèche M.C., Lambert N., Pasquier B., Mateo V., Soulas P., et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 2006; 444 (7115): 110–4.
- Latour S., Aguilar C. XIAP deficiency syndrome in humans. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 39: 115–23. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.01.015
- Galbán S., Duckett C.S. XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death Differ* 2010; 17 (1): 54–60. DOI: 10.1038/cdd.2009.81
- Ammann S., Elling R., Gyrd-Hansen M., Dücker G., Bredius R., Burns S.O., et al. A new functional assay for the diagnosis of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) deficiency. *Clin Exp Immunol* 2014; 176 (3): 394–400. DOI: 10.1111/cei.12306
- Aguilar C., Latour S. X-linked inhibitor of apoptosis protein deficiency: more than an X-linked lymphoproliferative syndrome. *J Clin Immunol* 2015; 35 (4): 331–8. DOI:10.1007/s10875-015-0141-9
- Filipovich A.H., Zhang K., Snow A.L., Marsh R.A. X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins? *Blood* 2010; 116 (18): 3398–408. DOI: 10.1182/blood-2010-03-275909
- Marsh R.A., Madden L., Kitchen B.J., Mody R., McClimon B., Jordan M.B., et al. XIAP deficiency: a unique primary immunodeficiency best classified as X-linked familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and not as X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* 2010; 116 (7): 1079–82. DOI:10.1182/blood-2010-01-256099
- Parackova Z., Milota T., Vrabcová P., Smetanova J., Svaton M., Freiburger T., et al. Novel XIAP mutation causing enhanced spontaneous apoptosis and disturbed NOD2 signalling in a patient with atypical adult-onset Crohn's disease. *Cell Death Dis* 2020; 11 (6): 430. DOI: 10.1038/s41419-020-2652-4
- Richards S., Aziz N., Duncavage E.J., Kulkarni S., Lindeman N.I., 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
- An Y.F., Luo X.B., Yang X., Wang J., Li L., Zhao X.D. Clinical and molecular characteristics of Chinese patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61 (11): 2043–7. DOI: 10.1002/pbc.25126
- Tangye S.G. XLP: clinical features and molecular etiology due to mutations in SH2D1A encoding SAP. *J Clin Immunol* 2014; 34 (7): 772–9. DOI: 10.1007/s10875-014-0083-7
- Dziadzio M., Ammann S., Canning C., Boyle F., Hassan A., Cale C., et al. Symptomatic males and female carriers in a large Caucasian kindred with XIAP deficiency. *J Clin Immunol* 2015; 35 (5): 439–44. DOI: 10.1007/s10875-015-0166-0
- Marsh R.A., Villanueva J., Kim M.O., Zhang K., Marmer D., Risma K.A. Patients with X-Linked Lymphoproliferative Disease due to BIRC4 Mutation Have Normal Invariant Natural Killer T-Cell Populations. *Clin Immunol* 2009; 132 (1): 116–23. DOI: 10.1016/j.clim.2009.03.517