

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

**Estudio fenotípico, funcional y molecular de
inmunodeficiencias con defectos de citotoxicidad y
predisposición a infecciones virales y tumores**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Raquel Ruiz García

Director

Luis M. Allende Martínez

Madrid 2018

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Doctorado en Investigación Biomédica

Departamento de Microbiología I: Inmunología



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO FENOTÍPICO, FUNCIONAL Y MOLECULAR DE
INMUNODEFICIENCIAS CON DEFECTOS DE
CITOTOXICIDAD Y PREDISPOSICIÓN A INFECCIONES
VIRALES Y TUMORES**

Raquel Ruiz García

Madrid, 2017

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Doctorado en Investigación Biomédica (RD 99/2011)

Departamento de Microbiología I: Inmunología



TESIS DOCTORAL

Estudio fenotípico, funcional y molecular de
inmunodeficiencias con defectos de citotoxicidad y
predisposición a infecciones virales y tumores

Autor: Raquel Ruiz García

Director: Luis M. Allende Martínez

Madrid, 2017

Don Luis M. Allende Martínez, Doctor en Inmunología y Facultativo especialista en Inmunología del Hospital Universitario 12 de Octubre,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “Estudio fenotípico, funcional y molecular de inmunodeficiencias con defectos de citotoxicidad y predisposición a infecciones virales y tumores” ha sido realizado por Doña Raquel Ruiz García, bajo mi dirección y asesoramiento, considerando que es apto para su defensa ante tribunal y reúne las condiciones exigibles para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, extendiendo el presente certificado en Madrid,

Fdo. Dr Luis M. Allende Martínez



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Doctorado en Investigación Biomédica (RD 99/2011)

Departamento de Microbiología I: Inmunología

TESIS DOCTORAL

Estudio fenotípico, funcional y molecular de
inmunodeficiencias con defectos de citotoxicidad y
predisposición a infecciones virales y tumores

Raquel Ruiz García

Madrid, 2017

A mis padres Elena y Benito

*“Los que aseguran que es imposible, no deberían interrumpir a los que estamos
intentándolo.” - Thomas Alva Edison.*

Agradecimientos

No imagino cómo expresar en unas pocas líneas mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible de una u otra forma que hoy esté escribiendo éstas páginas, son muchas y diversas pero su contribución indispensable.

En primer lugar mi agradecimiento más sincero al Dr. Luis Allende, director del presente trabajo, gracias por tu apoyo, por tus sabios consejos, por transmitirme la pasión por las inmunodeficiencias y la inmunología, por animarme a cruzar el charco, por enseñarme lo que sé, por confiar en mi, por las charlas de los cafés a media mañana y por ser además de mi mentor, un gran compañero. ¡Gracias!

Me gustaría dar las gracias a mi tutor el Dr. José Ramón Regueiro por su supervisión y seguimiento de las actividades del doctorado durante el desarrollo de este trabajo.

Gracias a la Dra. Estela Paz por su acogida en el servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre, por permitirme desarrollar mi formación como especialista, por permitirme colaborar en numerosos proyectos y por las oportunidades que me ha brindado. Gracias a M^a José Castro por todo lo que me ha enseñado y por su apoyo incondicional, a Pablo Morales por sus grandes clases de genética, a Antonio Serrano por enseñarme el valor de los anticuerpos y permitirme colaborar en sus proyectos, a Daniel y a Esther Mancebo por sus ánimos y por enseñarme a pie de poyata infinitas técnicas.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la inestimable ayuda de mis “manchegucas” favoritas Miguela y María José, una vez “listo el pollo” y acabados los “entuetos” me toca agradecer todo lo que me habéis enseñado y ayudado. Gracias

también a Chus y Mabel por compartir conmigo mano a mano ésta última etapa. Gracias a todos y cada uno de los técnicos de laboratorio; Ángeles por su "Bienvenida", a Isabel por ser tan "mamuchi", a Marga por su ayuda con los ELISAS a Carmen por enseñarme a "leer el TOUS", a Pepe por sus magníficas historias y a Julián, José Antonio, Juncal, Elena y Pilar. Gracias a también a Rosa y Paco por estar siempre dispuestos a ayudar. A Maribel que nos acompaña cada tarde con todo el cariño e ilusión.

Mil gracias a mis "R" mayores; a Elena por abrirme el camino en esta dura empresa con su sabiduría administrativa pero sobre todo por transmitirme tanto ánimo y alegría ¡Gracias a-MICA!, a Sara por enseñarme a no perder la paciencia y por haberme acompañado en las duras y las maduras, a Paloma por ser la compañera de fatigas más perseverante que conozco y por enseñarme a volar por los aires y por supuesto a Ana a Diana y a Marta. A todos mis "R" pequeños y a mi co-R Sergio porque de ellos también he aprendido muchas cosas, gracias a Mou por su sonrisa contagiosa a Óscar por su humor, a Lola, a Marcos, a Fer, a Rocío por su cariño y muy especialmente a Elena, las Lauras, Ángel y Dani por su frescura, RT-TRTL, cariño y apoyo durante ésta última etapa.

A nuestros colaboradores; al Prof. Alberto Anel y Luis Martínez por enseñarnos tanto sobre citotoxicidad y apoptosis, a Rebeca, Eduardo, Francisco y David por enviarnos muestras de los pacientes.

A Nacho, Maite y Jesús por guiarnos con su trabajo, por transmitirnos la importancia de colaborar mano a mano y por ponernos el camino más fácil. Y por supuesto, el mayor agradecimiento a los pacientes y sus familias.

Me gustaría agradecer al Prof. Jordan Orange y a Emily Mace por su cálida acogida durante mi estancia en Houston y por la oportunidad que me brindaron al permitirme colaborar en su investigación. A Hsiang Ting, a Petra y a mi amigo Alexander por hacerme sentir como en casa estando tan lejos.

Llegar aquí hubiera sido imposible sin mi familia y amigos. Las gracias más especiales al núcleo duro madrileño; a mi sister Blanca, a Marta y a Bea por todo el cariño y apoyo que me demostráis a diario, a Ana y Alex por sacarme a desconectar, por animarme y por empujarme a continuar, a Elvis y Antonella por vuestras palabras motivantes y las horas de terraceo. A Kinda, Marouff, Tere, Roci, Lula y a Lolo nadie como vosotros ha sabido convertir tan rápido el agobio en risa al llegar a casa cada día, gracias por ser mi familia en Madrid.

A Nani, Ruth, Vivi, Alba, Luli, Laurito, Mariajo, Vicky y Blanca; desde que nuestros caminos se juntaron en Salamanca supimos que no se iban a separar a pesar de la distancia, gracias por hacerme sentir que no pasa el tiempo cada vez que nos juntamos y por demostrarme la más sincera amistad.

A mis amigas campurrianas que desde tiempos inmemoriales me muestran su incondicional apoyo y amistad y en especial a Marta por ser la mejor compañera de mochila que podría tener.

A Miguel, por entenderme sin mirarme, por sacarme la sonrisa hasta en los peores momentos, por inspirarme con su espíritu soñador y apasionado, por aguantarme, por dármelo todo sin pedir nada a cambio y por ser el pilar de mi día a día. A Ana, José Miguel y Hugo, gracias por hacerme sentir como si fuera parte de vuestra propia familia.

Por último y más importante, a mis padres y a mi hermano, que me han enseñado que el esfuerzo y el sacrificio tienen recompensa. Su entrega, determinación y pasión por darnos lo mejor que tienen es lo que nos ha hecho ser lo que somos hoy. Gracias por estar siempre a mi lado y ser mis fans número 1.

ÍNDICE	<i>Página</i>
Abreviaturas	1
Resumen	7
Summary	11
I. Introducción general	15
1. La respuesta inmune frente a virus y tumores.....	17
1.1. Principales sistemas celulares implicados: el linfocito T citotóxico	17
1.1.1. Desarrollo del linfocito T.....	17
1.1.2. Función del linfocito T citotóxico.....	20
1.1.3. Características fenotípicas del linfocito T.....	23
1.1.3.1. Marcadores de desarrollo y maduración T	23
1.1.3.2. Marcadores de activación y moléculas efectoras.....	24
1.2. Principales sistemas celulares implicados: el linfocito Natural Killer(NK).....	25
1.2.1. Desarrollo de los linfocitos NK	26
1.2.2. Función de los linfocitos NK	27
1.2.3. Características fenotípicas del linfocito NK	29
1.2.3.1. Receptores activadores y moléculas accesorias	29
1.2.3.2. Receptores inhibidores	31
1.2.3.3. Marcadores de diferenciación/madurez	31
1.3. Mecanismos de citotoxicidad celular	32
1.3.1. Citotoxicidad gránulo-dependiente	33
1.3.2. Citotoxicidad vía FAS/FASL	36
2. Inmunodeficiencias primarias	39

2.1. Clasificación	39
2.1.1. Inmunodeficiencias con susceptibilidad a infecciones víricas y tumores.....	40
2.1.1.1. Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP)	41
2.1.1.2. Inmunodeficiencia por defecto en ITK (IL-2 inducible T-cell kinase)	43
2.1.1.3. Linfocitosis hemofagocítica familiar (LHFF)	44
2.1.1.4. Síndrome Hiper IgE autosómico recesivo por defectos en DOCK8.....	47
2.1.1.5. Inmunodeficiencia por defecto en GATA2	49
2.1.1.6. Síndrome de WHIM	51
2.1.1.7. Inmunodeficiencia por alteración de la señalización de PI3Kδ... 54	
2.1.1.8. Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (SLPA)	57
II. Hipótesis y objetivos.....	61
III. Publicaciones.....	65
Capítulo I: A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8 + and natural killer cell cytotoxicity.....	67
Objetivos.....	68
Conclusiones.....	69
Publicación.....	71
Capítulo II: Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation.....	83
Objetivos.....	84

Conclusiones.....	85
Publicación.....	87
Capítulo III: Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients.....	97
Objetivos.....	98
Conclusiones.....	99
Publicación.....	101
Capítulo IV: Mutations in PI3K110 δ lead to impaired NK cell function that is partially rescued by rapamycin treatment.....	119
Objetivos.....	120
Conclusiones.....	121
Publicación.....	123
IV. Discusión.....	165
V. Conclusiones.....	187
VI. Bibliografía.....	193
VII. Anexos.....	219

ABREVIATURAS

0-9

7-AAD: 7-amino actinomicina D

A

AD: Autosómico dominante

ADA: Adenosina desaminasa

ADCC: Citotoxicidad dependiente de anticuerpo

AF: Alexa Fluor

AICD: Muerte celular inducida tras activación

AKT: Proteína quinasa B

ALPS: Síndrome linfoproliferativo autoinmune

APC: Alofococianina

APDS: Síndrome de activación de PI3K δ

AR: Autosómico recesivo

C

CCR: Receptor de quimiocinas CC

CD: Clúster de diferenciación

CFSE: Carboxi-fluoresceína succinimidil-éster

CPA: Célula presentadora de antígeno

CTL: Linfocito T citotóxico

CXCL: Ligando de quimiocinas CXC

CXCR: Receptor de quimiocinas CXC

D

DC: Célula dendrítica

DCML: Deficiencia de células dendríticas, monocitos y linfocitos.

DHR1,2: Región homóloga de DOCK 1,2

DiOC2: Diethyloxacarbocianina

DISC: Complejo de señalización de muerte inducida

DN: Doble negativo

DNA: Acido desoxirribonucleico

DOCK8: Dedicator of citokinesis 8

DP: Doble positivo

E

EBV: Virus Epstein Barr

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

ExAC: Consorcio de agregación de exomas

F

FADD: Proteína con dominio de muerte asociada a FAS

FHL: Linfocitosis histiocítica hemofagocítica familiar

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

G

GATA2: Proteína de unión a GATA 2

G-CSF: Factor estimulante de colonias granulocíticas

GDP: Guanosina difosfato

GOF: Ganancia de función

GTP: Guanosina trifosfato

GZM: Granzima

H

HIES: Síndrome hiper IgE

HSCT: Trasplante de células STEM hematopoyéticas

I

ICAM: Molécula de adhesión intercelular

IDP: Inmunodeficiencia primaria

IFN- γ : Interferón gamma

IP: Yoduro de propidio

ITK: Quinasa inducible por IL2

IVS: Secuencia interviniente

K

KIR: Killer inmunoglobulin like receptor

L

LFA: Antígeno asociado a la función de leucocitos

LHHF: Linfocitosis hemofagocítica familiar

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crónica

LOF: Pérdida de función

M

MALT: Linfocitos T asociados a mucosas

MC: Memoria central

ME: Memoria efectora

MFI: Intensidad media de fluorescencia

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

MO: Médula ósea

MTOC: Centro organizador de microtúbulos

mTOR: Diana mamífera de rapamicina

N

NK: Natural Killer

NKT: Linfocito T Natural Killer

P

PASLI: Enfermedad por mutaciones activadoras de PI3K con senescencia T, linfadenopatía e inmunodeficiencia

PBMCs: Células mononucleadas de sangre periférica

PE: Ficoeritrina

PerCP: Peridina

PHA: Fitohemaglutinina

PI3K: Fosfoinositol trifosfato quinasa

PKC: Proteína quinasa C

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato

PTEN: Fosfatasa homóloga de tensina

R

RAG1,2: Gen activador de la recombinación 1 y 2

RNA: Ácido ribonucleico

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute

RTE: Migrantes recientes del timo

S

SAP: Proteína asociada a SLAM

SCH: Síndrome de Chediak Higashi

SD: Desviación estándar

SDF: Factor derivado del estroma

SLAM: Molécula activadora de la señalización linfocitaria

SLPA: Síndrome linfoproliferativo autoinmune

SMAC: Clúster de activación supramolecular

SMD: Síndrome mielodisplásico

SPADE: spanning tree progression of density normalized events

STAT: Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción

T

TCR: Receptor de linfocitos T

TEMRA: Linfocitos T de memoria efectora que expresan RA

Th: T helper ó cooperadoras

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF

TREC: Círculos de escisión del receptor de linfocitos T

TYK2: Tirosina quinasa 2

V

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VHS-1,2: Virus Herpes simplex 1, 2

VIN: Neoplasia intraepitelial vulvar

VPH: Virus del papiloma humano

W

WASP: Proteína del síndrome Whiskott Aldrich

WHIM: Verrugas, hipogammaglobulinemia, inmunodeficiencia y mielocatexis

X

XLP: Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X

RESUMEN

Estudio fenotípico, funcional y molecular de inmunodeficiencias con defectos de citotoxicidad y predisposición a infecciones virales y tumores.

Introducción: La respuesta del sistema inmunológico frente a infecciones víricas y tumores está basada en mecanismos inespecíficos (respuesta innata) y específicos (respuesta adaptativa) y en ella intervienen numerosos mediadores solubles y celulares. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) y los linfocitos asesinos naturales (NK) pueden reconocer y destruir las células tumorales e infectadas por virus y secretar citoquinas que desempeñan un papel importante en la regulación de las funciones inmunitarias. Ambos tipos de células matan a sus objetivos por cualquiera de los dos mecanismos que requieren contacto directo con las células diana, gránulo-dependiente o mediante receptores de muerte. Mutaciones monogénicas en alguno de los componentes que participan en estos procesos impiden la correcta eliminación de patógenos y tumores en humanos produciendo inmunodeficiencia y malignidad.

Objetivos: En este estudio hemos querido profundizar en la caracterización molecular, fenotípica y funcional de pacientes con susceptibilidad a infecciones víricas y tumores y así poder aumentar el conocimiento sobre los mecanismos que provocan enfermedad así como el transcurso y evolución de la misma. Esto podría establecer relaciones genotipo-fenotipo que ayudasen a la interpretación de los datos clínicos y a la toma de decisiones clínicas acordes a cada paciente.

Resultados: en este trabajo hemos estudiado a 10 pacientes con enfermedades víricas recurrentes por virus de la familia *Herpesviridae* y con susceptibilidad a malignidad hematológica. El estudio molecular reveló mutaciones monogénicas en cuatro genes relacionados con inmunodeficiencias primarias, 1 paciente con inmunodeficiencia combinada heterocigoto compuesto para mutaciones en *DOCK8* de nueva descripción (delEx2-8, ISV17+5 G>A), 2 pacientes hermanos con SLPA y una nueva mutación homocigota en *FASLG* (C202S), 4 pacientes con defecto de GATA2 debido a mutaciones en heterocigosis que causan haploinsuficiencia de la proteína, dos de ellas no descritas previamente (p.M236Ifs325X y p.K378X) y tres pacientes hermanos con la mutación E525K en *PIK3CD* que produce ganancia de función de PI3K δ .

El paciente con mutaciones en *DOCK8* conservó parcialmente la expresión de la proteína a diferencia de los casos descritos previamente, lo que provocó alteraciones en el fenotipo clínico e inmunológico menos severas que las presentes en los pacientes con defecto completo de la proteína. Las subpoblaciones CD4⁺ presentaron distribución anormal con reducción de células naïve, sin embargo el compartimento CD8⁺ se mantuvo conservado.

Los 4 pacientes con haploinsuficiencia de GATA2 presentaron alteraciones importantes en la distribución de las poblaciones linfocitarias. Las células NK estaban muy reducidas en número con ausencia total de la población CD56^{bright} y presentaron características compatibles con NK inmaduras pero con otros rasgos propios de células maduras. Sin embargo, los cambios fenotípicos en el compartimento de linfocitos T sólo fueron observados en dos de los 4 pacientes. Fueron aquellos con mayor afectación y severidad clínica los que presentaron unos linfocitos T con elevación de

marcadores de senescencia y disminución de linfocitos naïve con el consiguiente aumento de linfocitos T de memoria y Temra.

Los 3 hermanos con mutaciones en *PIK3CD* presentaron las características clínicas e inmunológicas clásicas del síndrome APDS-1 con alteración de la maduración periférica de los linfocitos B y aumento de la senescencia de los linfocitos T. Sin embargo, la caracterización de los linfocitos NK reveló datos desconocidos hasta la fecha. Éstos presentaron una distribución de marcadores de superficie alterada respecto a los controles sanos, lo que llevó a ampliar el estudio y la cohorte de pacientes. La población CD56^{dim} mostró menor expresión de CD16 y CD122 con aumento de NKG2A mientras que la población CD56^{bright} presentó menor expresión de CD62L, CD127 y CD122.

En contraste los pacientes con defecto de FasL no presentaron alteraciones fenotípicas en los compartimentos T ni NK (datos no mostrados).

Todos los pacientes mostraron reducción de la capacidad citotóxica. Los pacientes con mutaciones en *DOCK8*, *GATA2* y *PIK3CD* presentaron defectos en la citotoxicidad gránulo-dependiente en linfocitos NK, mientras que los pacientes con mutaciones en *FALSG* mostraron un reducción importante en la citotoxicidad mediada por receptores de muerte tras estimulación tanto en linfoblastos T como en linfocitos B transformados con EBV.

Conclusiones: En este estudio hemos profundizado en la caracterización molecular, fenotípica y funcional de pacientes con susceptibilidad a infecciones víricas y tumores para así poder aumentar el conocimiento sobre los mecanismos que provocan enfermedad y poder valorar la evolución de éstas deficiencias. Hemos visto como

pacientes con mutaciones parciales en *DOCK8* presentan características clínicas e inmunológicas más leves que los pacientes con deficiencia total, los pacientes sintomáticos con defectos de *GATA2* presentan alteraciones en el compartimento T derivadas de la situación clínica, en los pacientes con ALPS la susceptibilidad a linfomas T y B puede ser debida a la falta de homeostasis de ambos compartimentos y que la cronicidad de las infecciones víricas y la malignidad presentes en los pacientes con APDS-1 puede ser debida al defecto funcional de los linfocitos NK. Además estos hallazgos han ayudado a interpretar los datos clínicos y a orientar la toma de decisiones clínicas acordes para cada paciente.

SUMMARY

Molecular, Functional and Phenotypic Characterization of Primary Immunodeficiencies with Cytotoxicity Impairment, Viral Infections and Malignancy Susceptibility.

Introduction: The response of the immune system to viral infections and tumours is based on nonspecific (innate response) and specific (adaptive response) mechanisms. In this sense, numerous soluble and cellular mediators are involved in this response. . Specifically, Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and natural killer lymphocytes (NK) can recognize and destroy tumour and virus infected cells. Moreover, cytokines which play an important role in the regulation of immune functions, are also secreted by CTLs and NK. Both types of cells are able to eliminate their targets by either mechanism that require direct contact with target cells, granule-dependent or by death receptors. In spite of being highly regulated processes, if monogenic mutations appear in some of the components involved they may prevent the correct elimination of pathogens and tumours in humans producing immunodeficiency and malignancy.

Objectives: For increasing knowledge about the mechanisms that cause immunodeficiency, as well as the course and evolution of the disease, we wanted to study the molecular, phenotypic and functional characterization of patients with susceptibility to viral infections and tumours. Consequently, being able to establish

genotype-phenotype correlations that help the interpretation of clinical data and the therapeutic management from each patient.

Results: In the present work, we studied ten patients with recurrent virus infections from the *Herpesviridae* family and with susceptibility to hematologic malignancy. Our molecular study revealed monogenic mutations in four primary immunodeficiency-related genes, one patient with combined immunodeficiency and two novel heterozygous mutations in *DOCK8* (del2-8, ISV17 + 5 G> A), two siblings with ALPS and a new homozygous mutation in *FASLG* (p.C202S), four patients with GATA2 deficiency due to heterozygous mutations in *GATA2* that cause protein haploinsufficiency, two of them not previously described (p.M236Ifs325X and p.K378X), and three siblings with the E525K gain of function mutation in *PIK3CD* which produces hyperactivation of the PI3K δ pathway.

In particular, the patient with mutations in *DOCK8* partially preserved the expression of the protein unlike the previously described cases. The mutations found in this patient caused alterations in the clinical and immunological phenotype less severe than those present in patients with complete protein defect. In addition, the CD4 + subpopulations presented abnormal distribution with reduction of naïve cells, however the CD8 + compartment was maintained.

Notably, the four patients with GATA2 haploinsufficiency presented significant alterations in the distribution of lymphocyte populations. NK cells were very reduced in number with total absence of the CD56^{bright} population and not only presented characteristics compatible with immature NK cells but also with other features characteristic of mature cells. However, phenotypic changes in the T lymphocyte

compartment were only observed in two of the four patients. Hence, they developed the greater affection and clinical severity. In accordance, elevated senescent markers, and decrease of naïve T cells with the consequent elevation of central memory, effector memory and Temra T cells were detected in these cases.

Otherwise, the three siblings with *PIK3CD* mutations presented the classic clinical and immunological features of APDS-1 syndrome with peripheral maturation impairment of B cells and increased senescent T cells. However, the phenotypic characterization of NK cells revealed data unknown to date. Thus, an altered surface markers distribution in comparison to healthy controls was observed, which led to further study a larger cohort of patients. The CD56^{dim} population showed lower expression of CD16 and CD122 with increased NKG2A whereas lower expression of CD62L, CD127 and CD122 was found in the CD56^{bright} population.

In contrast, patients with FasL defects did not present phenotypic alterations in T or NK compartments (data not shown).

In all the cases studies, reduced cytotoxic capacity was observed. Patients with *DOCK8*, *GATA2* and *PIK3CD* mutations showed defects in granulocyte-dependent killing in NK cells, whereas patients with mutations in *FALSG* developed a significant reduction in death receptor-mediated cytotoxicity after stimulation in both T-lymphoblasts and EBV-transformed B cells.

Conclusions: With the purpose to increase knowledge about the mechanisms that cause disease and to assess the evolution of immunodeficiencies with cytotoxicity impairment, viral Infections and malignancy susceptibility, we have broadly examined the molecular, phenotypic and functional characterization of patients affected. In

detail, we have concluded that patients with partial mutations in DOCK8 present milder clinical and immunological characteristics than patients with total deficiency. Notably, GATA2 deficient symptomatic patients exhibit T cell compartment alterations derived from frequent infections. Accordingly, T and B lymphomas susceptibility in ALPS could be caused from the lack of homeostasis of both compartments. Furthermore, the chronicity of viral infections and malignancy present in APDS-1 patients may be due to the functional defect of NK lymphocytes. In addition, it is important to note that these findings have helped interpreting clinical data and guided the therapeutic decisions for each patient.

I.INTRODUCCIÓN GENERAL

1. LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A VIRUS Y TUMORES

La respuesta del sistema inmunológico frente a infecciones víricas y tumores está basada en mecanismos inespecíficos (respuesta innata) y específicos (respuesta adaptativa) y en ella intervienen numerosos mediadores solubles y celulares. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) y los linfocitos asesinos naturales (NK) pueden reconocer y destruir las células tumorales e infectadas por virus y secretar citoquinas que desempeñan un papel importante en la regulación de las funciones inmunitarias.

1.1. Principales sistemas celulares implicados: El linfocito T citotóxico

Los linfocitos T proceden de células madre hematopoyéticas que tienen su origen en la médula ósea. Estos precursores migran desde la médula ósea y se dirigen al timo donde experimentan un proceso de maduración en varias etapas que pueden ser identificadas según la expresión de marcadores de membrana. La señalización a través de Notch y los factores de transcripción tipo hélice-lazo-hélice colaboran repetidamente para accionar y sostener este proceso que conduce al compromiso del linaje de los linfocitos T. El timo se compone de una corteza externa y una región interna, llamada médula. A lo largo de las etapas de maduración, los timocitos interactúan con las células estromales (no hematopoyéticas) y experimentan los procesos esquematizados a continuación en diferentes regiones (Figura 1).

1.1.1. Desarrollo de los linfocitos T

Los precursores de los linfocitos T no expresan en membrana los correceptores CD4 ni CD8 (dobles negativas) y comienzan la recombinación de los 4 segmentos del TCR ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$). La recombinación comienza en los loci δ , γ y

β , y si la expresión del TCR $\gamma\delta$ es adecuada, se logra el compromiso con el linaje de las células T con receptor $\gamma\delta$ ¹. Los linfocitos T $\gamma\delta$ permanecen sin correceptor y abandonan el timo, poblando el tejido linfoide y los epitelios. Alternativamente, se produce la recombinación β que da como resultado la expresión del β TCR, que se empareja con el receptor α (pre-T α) y forma el pre-TCR junto con CD3². El pre-TCR proporciona señales independientes de ligando a través de CD3 que inducen la co-expresión CD4 / CD8 (DP linfocitos dobles positivos). El ensamblaje del pre-TCR es seguido por la recombinación en el locus α , que, si tiene éxito, genera el $\alpha\beta$ TCR. Estas células pasarán a seleccionarse de manera ligando-dependiente. Selección positiva: sobreviven aquellas células que tengan TCR capaces de reconocer MHC-I ó MHC-II de células epiteliales del timo. Con ello se garantiza la restricción por el propio haplotipo de las células T. Las moléculas de MHC son proteínas heterodiméricas que presentan antígenos peptídicos que son reconocidos por los linfocitos T. Las células DP que unen MHC con suficiente afinidad son seleccionadas para sobrevivir (selección positiva), mientras que aquellas que no lo son se eliminan por apoptosis. La interacción entre el complejo de TCR y la molécula del MHC está restringida por la especificidad del TCR y del co-receptor de células T. El co-receptor CD4 restringe la interacción a MHC clase II y CD8 a MHC clase I. Las células DP supervivientes pierden entonces el co-receptor CD4 ó CD8 que no participa en el reconocimiento MHC. En la selección negativa se eliminan por apoptosis los linfocitos que reaccionan con demasiada afinidad con los antígenos propios presentados por las células epiteliales medulares y células presentadoras de antígeno derivadas de la médula ósea (CPA)³. La mayoría de

las células del timo darán lugar a los linfocitos T con receptor $\alpha\beta$, mientras que aproximadamente un 5% originarán los linfocitos T $\gamma\delta$. Estos procesos madurativos de selección positiva y negativa generan linfocitos T viables capaces de reconocer y responder a los antígenos peptídicos presentados por las moléculas del MHC mientras se eliminan aquellos que tienen autorreactividad. Las diferentes líneas de linfocitos T que se generan en el timo (CD4+, CD8+, Treg y NKT) migrarán posteriormente a la periferia y comenzarán la fase efectora.

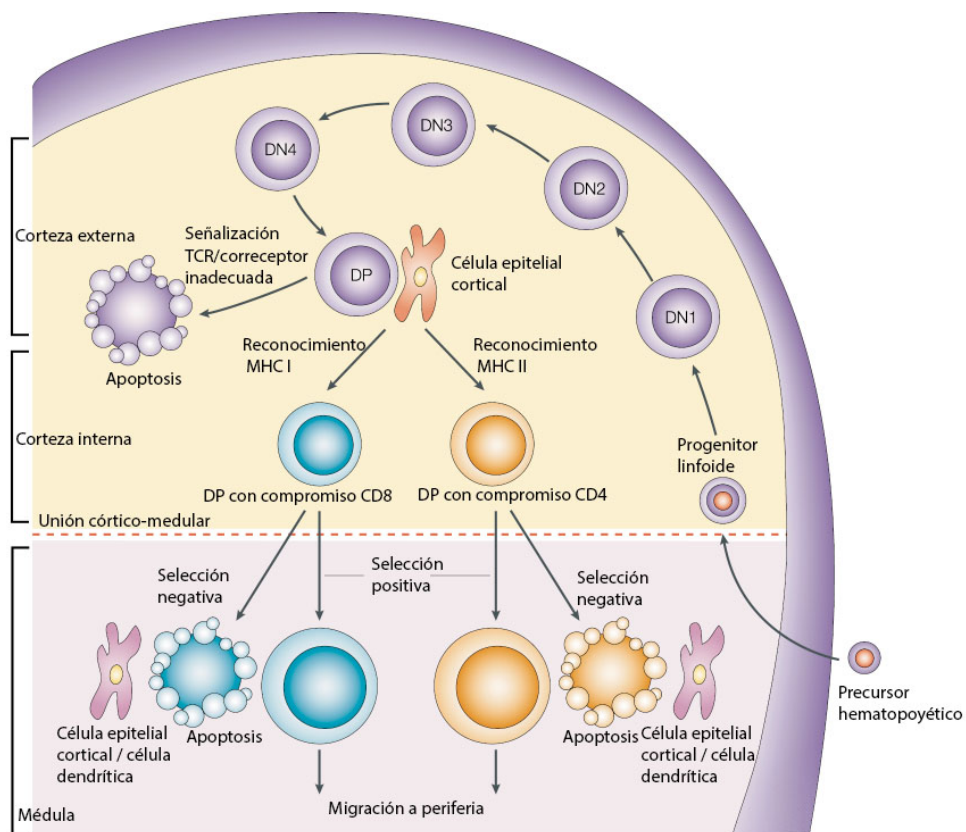


Figura 1. Esquema del desarrollo de los linfocitos T en el timo. Tomado de³.

Después de la selección positiva y la maduración funcional, los linfocitos T pierden gradualmente la expresión de CD69 y se convierten en células

CD45RA⁺ y CD45RO⁻ ⁴. Los linfocitos emigrantes tímicos recientes (RTEs) carecen de expresión de CD1a pero expresan altos niveles del complejo TCR/CD3, CD27, CD45RA y CD62L de manera similar a los linfocitos T naïve pero con la diferencia de que contienen niveles elevados de TRECs y expresan CD31 en la membrana citoplasmática.

1.1.2. Función de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos

Durante una infección, los linfocitos T CD8⁺ naïve pueden diferenciarse en múltiples tipos de células T efectoras y de memoria, que ayudan a mediar la eliminación de patógenos y proporcionan inmunidad y protección a largo plazo. Estas células pueden variar en su fenotipo, función y ubicación, y en su destino a largo plazo para poblar el repertorio de linfocitos T de memoria.

Las infecciones por virus, bacterias intracelulares y las células tumorales inducen respuestas inmunológicas tipo Th1. La respuesta de los linfocitos T frente a una infección puede dividirse en tres fases: expansión clonal, contracción de la población efectora y formación de memoria T (Figura 2). Cuando el linfocito T CD8⁺ se encuentra con el antígeno presentado por el MHC de clase I se produce una señalización a través del TCR que va a resultar en cambios que van a prolongar y fortalecer el contacto con la célula presentadora de antígeno (CPA). Posteriormente, gracias a la señal co-estimuladora que se produce a través de CD28 por el contacto con las moléculas B7 en la CPA el linfocito T se activa y comienza a proliferar⁵.

Después de la co-estimulación, la diferenciación y la proliferación de los linfocitos T depende de la IL-2 producida por las propias células activadas.

Una vez iniciado este proceso, el linfocito T CD8+ naïve se diferencia en linfocito efector que ejercerá funciones antígeno-específicas sin la necesidad de señal coestimuladora.

Las células T CD8+ efectoras ejercen su función mediante la citotoxicidad específica de antígeno restringida por MHC de clase I. Durante la diferenciación a célula efectora, las células T CD8+ expresan proteínas citotóxicas incluyendo perforina y granzimas que secretarán cuando entren en contacto con la célula diana, dando como resultado la muerte específica de la célula infectada. La molécula perforina es una proteína que hace poros en la membrana citoplasmática de la célula diana para favorecer la entrada de las granzimas que inducirán la apoptosis en éstas células. Además de la citolisis, los linfocitos T CD8+ efectores producen citoquinas proinflamatorias como IFN γ y TNF α . Los factores de transcripción que regulan la diferenciación de células T CD8+ naïve a T CD8+efectoras y T CD8+ memoria son T-box asociado a linfocitos T (T-bet) y Eomesodermina (Eomes) ambos expresados en linfocitos T y que determinan respuestas tipo Th1. ⁶.

Después de la respuesta específica de los linfocitos T CD8+ expandidos, éstos contraen la población mediante apoptosis, los que sobreviven a la muerte programada establecerán la población T CD8+ de memoria.

Éstas células de memoria poseen tres características fundamentales, rápida proliferación tras el encuentro con el antígeno, rápida adquisición de fenotipo efector y mantenimiento homeostático independiente de antígeno. Los linfocitos T CD8+ de memoria se subdividen en dos categorías, memoria central

(T_{mc}) y memoria efectora (T_{me}) y se diferencian por su capacidad proliferativa y efectora⁷(Figura 2).

Un tercer tipo de células de memoria son los linfocitos T CD8+ Temra que resultan de la continua estimulación antigénica y que poseen características de células senescentes y exhaustas.

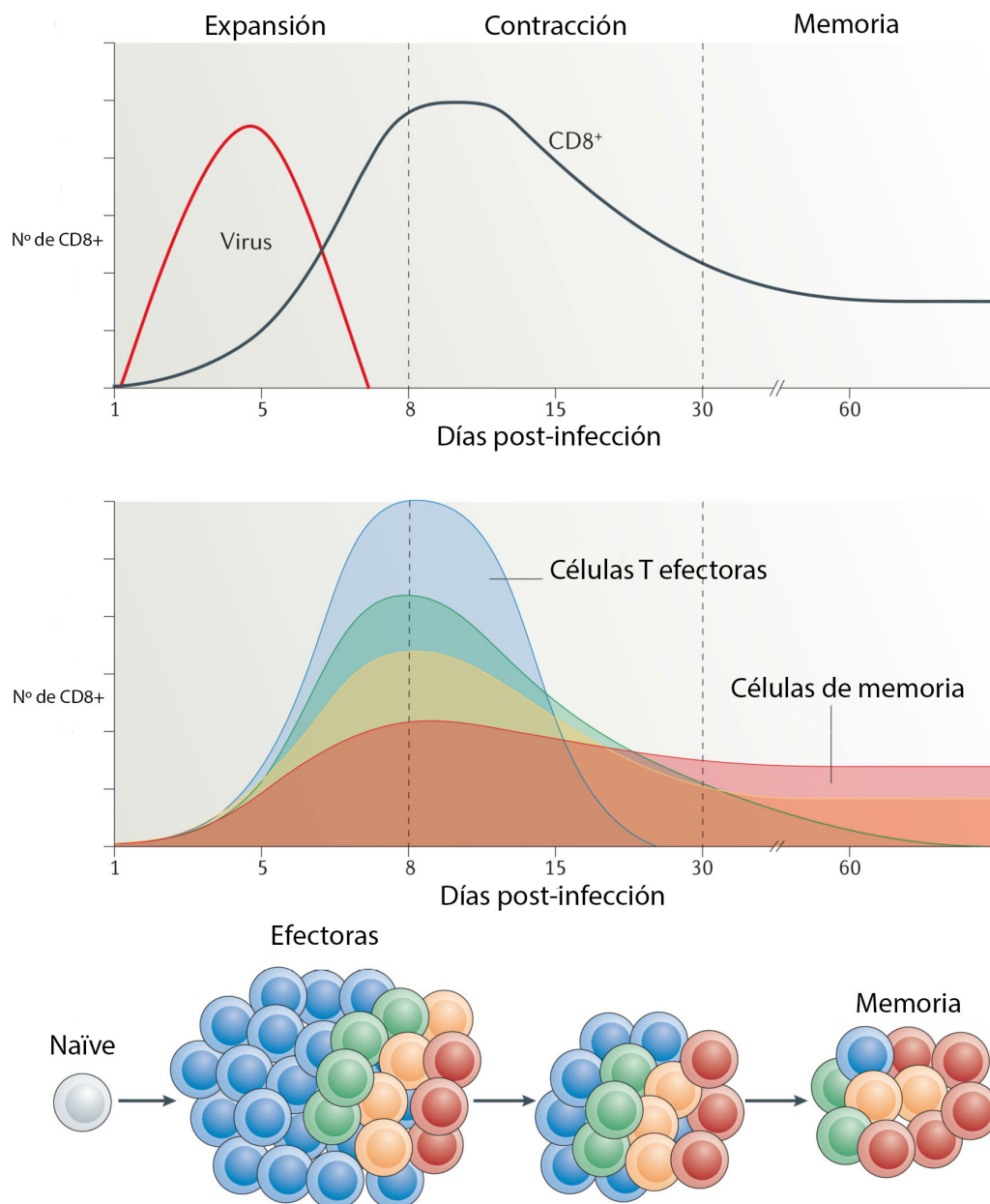


Figura 2. Cinética de la respuesta linfocitaria T CD8+. Tomado de ⁷.

1.1.3. Características fenotípicas de los linfocitos T

Los linfocitos T expresan una gran variedad de moléculas en superficie e intracitoplasmáticas que indican diferentes estadios de desarrollo, maduración y/o función. Además, algunas de estas moléculas son utilizadas como marcadores de identificación de los linfocitos T tanto en condiciones normales como patológicas.

1.1.3.1. Desarrollo y maduración T.

Tabla 1. Marcadores de desarrollo y diferenciación de linfocitos T.

Marcador	Sinónimos	Función en Linfocitos T	Ref
CD2	Receptor de eritrocitos de carnero, LFA-2, Receptor de LFA-3.	Correceptor de membrana. Molécula de adhesión fundamental para unión a células presentadoras de antígeno.	⁸
CD3	CD3 δ , γ , ϵ , ζ	Correceptor del TCR. Transducción de señales.	⁹
TCR	Receptor de linfocitos T. TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$.	Reconoce péptidos presentados por MHC. Variabilidad antigénica. Desarrollo linfocitario.	¹⁰
CD4	T4, OKT4	Correceptor del TCR. Interacciona con MHC de clase II.	⁹
CD8	OKT8 T cell antigen, P32, co-receptor de linf T	Correceptor del TCR. Interacciona con MHC de clase I.	¹¹
CD31	PECAM-1	Molécula de adhesión expresada en los linfocitos emigrantes recientes del timo.	¹²
CCR7	CD197	Receptor acoplado a proteína G relacionado con el tráfico de linfocitos hacia órganos linfoides. Expresado en T naïve y memoria central.	¹³
CD62L	Selectina L	Molécula de adhesión relacionada con el tráfico de linfocitos hacia órganos linfoides. Se expresa en linfocitos T naïve.	¹⁴
CD45	PTPRC, LCA	Tirosina fosfatasa. Posee varias isoformas, CD45RA se	¹⁵

			expresa principalmente en linfocitos T naïve y CD45RO en T de memoria.	
IL2RG	CD132, Cadena gamma	Receptor de	Maduración y proliferación de linfocitos T, B y NK. Receptor de citoquinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Interleucinas.	¹⁶
IL7RA	CD127, Receptor de	Receptor de	Forma heterodímero con CD132. Señaliza a través de STAT5 y es fundamental para el desarrollo y diferenciación de linfocitos T.	¹⁷

1.1.3.2. Marcadores de activación y moléculas efectoras.

Tabla 2. Marcadores de activación y moléculas efectoras

Marcador	Sinónimos		Función en Linfocitos T	Ref
CD27	TNFRSF7		Miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral. Molécula co-estimuladora. Une CD70. Esencial para la formación de memoria T.	¹⁸
CD28			Molécula co-estimuladora del TCR. Receptor de CD80 y CD86. Esencial para supervivencia y activación de. l linfocito T.	¹⁹
CTLA-4	CD152		Regulador supresor de la respuesta T. Se une a CD80 y CD86. Se expresa en linfocitos Treg.	²⁰
CD25	IL2-2R α		Junto con la subunidad β y γ forma el receptor de la IL-2. Se expresa en Treg y linfocitos T activados.	²¹
CD69	CLEC2C, AIM		Lectina tipo C expresada tras la activación linfocitaria en Linfocitos T y NK.	²²
HLA-DR			Antígeno MHC clase II. Se une al TCR. Expresa péptidos de 9aa. Se puede expresar en linfocitos T activados.	²³
PD-1	Programmed cell death protein 1,		Proteína reguladora de la familia del CD28/CTLA-4. Promueve tolerancia, inmunosupresor. Receptor de PD-L1	²⁴

	CD279	y PD-L2.	
CD57	Beta-1,3-glucuronil transferasa 1, NK1	Marcador de diferenciación y senescencia. Se adquiere tras la infección por CMV.	25
CD95	Fas, TNFRSF6, APO1	Citotoxicidad y apoptosis.	26,27
CD95L	Fasl, CD178, TNFSF6	Citotoxicidad y apoptosis.	26,27
Granzima A	GZMA	Presente en gránulos citotóxicos. Citotoxicidad.	28
Granzima B	GZMB	Presente en gránulos citotóxicos. Citotoxicidad.	28,29
Perforina	Citolisina	Presente en gránulos citotóxicos, hace poros en la membrana celular. Citotoxicidad.	30,31

1.2. Principales sistemas celulares implicados: El linfocito Natural Killer (NK)

Las células NK fueron identificadas por primera vez en 1975 como los linfocitos del sistema inmune innato capaces de eliminar células tumorales^{32,33}. Desde entonces se ha demostrado que las células NK son capaces no sólo de reconocer y destruir células tumorales, sino también, células "estresadas" y secretar citoquinas que participan en la formación de respuestas inmunes adaptativas. Una característica clave de las células NK reside en su capacidad para distinguir las células estresadas (como las células tumorales, células infectadas y células dañadas) de las células normales. Aunque las células NK son generalmente consideradas como componentes de la defensa inmune innata temprana, muchos procesos que originalmente estaban restringidos a la inmunidad adaptativa³⁴, como la presentación³⁵, la educación y la memoria³⁶, se sabe que también se producen en las células NK. De hecho, las células NK experimentan sofisticados procesos de adaptación que permiten ajustarse a su entorno biológico. Las células NK normalmente constituyen del 5 al 15% de linfocitos de sangre periférica³⁷,

también están presentes en la médula ósea (MO), hígado, útero, bazo y pulmones, así como en menor medida en el tejido linfoide, tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), y el timo³⁸⁻⁴⁰.

1.2.1. **Desarrollo de los linfocitos NK:**

De manera similar a los linfocitos B y T, las células NK se desarrollan a partir de un progenitor hematopoyético CD34+ residente en MO. Sin embargo, se sabe menos acerca de los sitios precisos en los que se desarrollan las células NK, observaciones recientes indican que no sólo se desarrollan en MO, sino también en ganglios linfáticos, hígado, útero, MALT y timo^{39,41}.

El desarrollo de los linfocitos NK es similar al de otros leucocitos, ocurriendo a través de una serie de etapas coordinadas de diferenciación y maduración (Figura 3) que resultan en la restricción progresiva hacia el linaje de las células NK y la adquisición de competencias funcionales específicas.⁴²

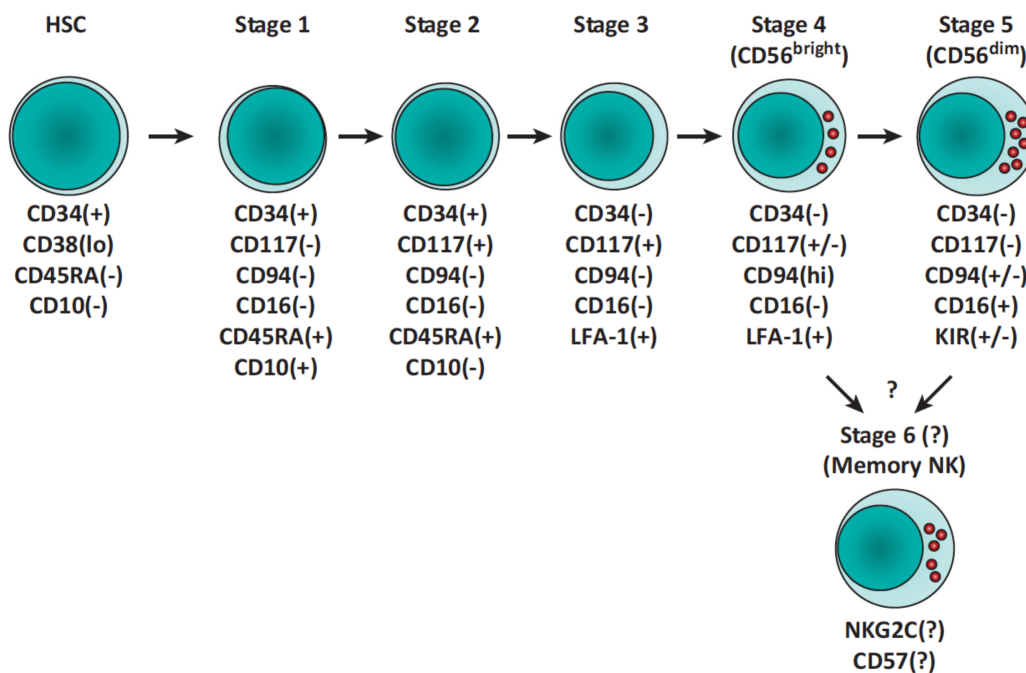


Figura 3. Representación esquemática de las etapas celulares del desarrollo de las células NK. Se muestra para cada etapa de desarrollo la expresión de cada antígeno de superficie, útil para distinguir poblaciones de NK intermediarias durante el desarrollo. La expresión se denomina '+' (expresión), '-' (sin expresión), 'hi' (expresión alta) o 'lo' (expresión baja). Tomado de ³⁹.

1.2.2. Función los linfocitos NK

Los linfocitos NK participan activamente en el control de las infecciones víricas y tumores mediante la secreción de citoquinas y la citotoxicidad celular. Además, actúan como células reguladoras en procesos inflamatorios e influyen en las respuestas inmunes adaptativas consecuentes.

La célula NK posee varios mecanismos que le permiten discriminar entre las posibles células diana y las células sanas propias (Figura 4). Para adquirir la capacidad de reconocer células diana que expresan bajos niveles de expresión de MHC de clase I (“missing self” ó reconocimiento de falta de identidad), las células NK tienen que ser educadas mediante la detección de moléculas MHC de clase I por sus receptores inhibidores afines KIRs (Killer cell immunoglobulin like receptors) ó mediante heterodímeros CD94-NKG2A en un proceso denominado “licensing” (ó de licenciatura) ⁴³.

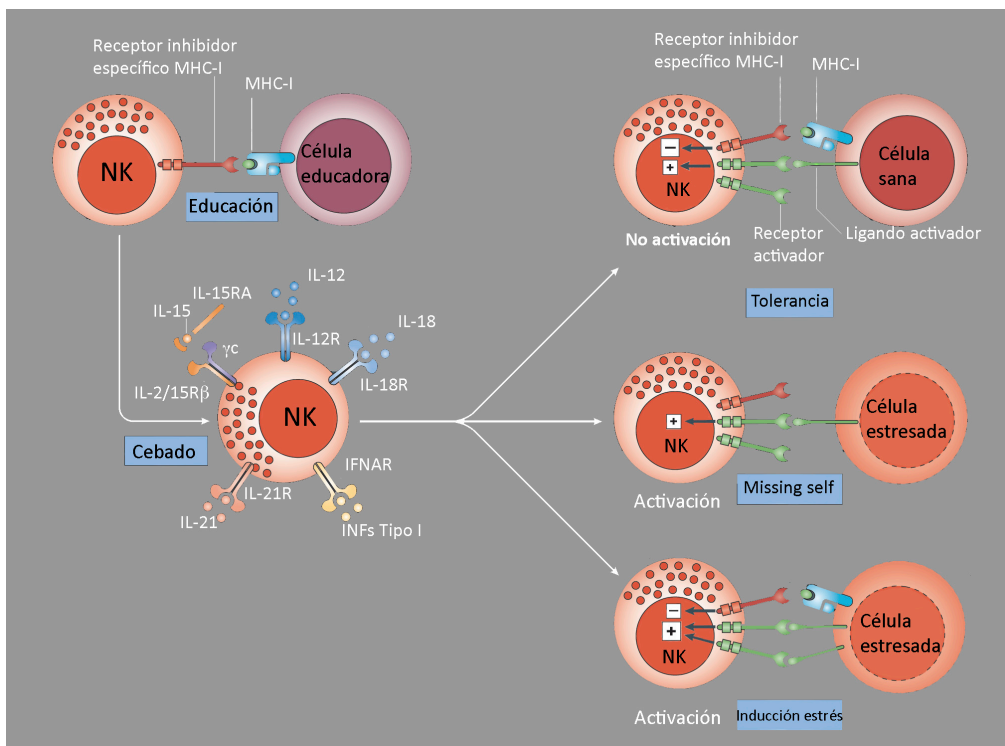


Figura 4. Reconocimiento y activación de los linfocitos NK. Adaptado de ⁴⁴.

Las células NK también se adaptan a su entorno a través del proceso de "cebado" de citoquinas, tales como IL-15 (expresada en DC), IL 18 e IL-12. La integración de diversas vías (inhibitorias y activadoras) después de la interacción con células vecinas gobierna el equilibrio dinámico que regula la activación de las células NK y determina si las células NK se activan para matar células diana y producir citoquinas (Figura 5). Generalmente se cree que el sistema inmune innato carece de la capacidad para la memoria inmunológica. Sin embargo, los hallazgos recientes muestran que algunas células NK pueden ser de larga vida y montar una respuesta de memoria robusta a haptenos o virus ⁴⁵.

Además, las células NK expresan el receptor de Fc de baja afinidad CD16 que le permite reconocer células diana opsonizadas por anticuerpos y ejercer citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo ó ADCC ^{46,47} (Figura 5).

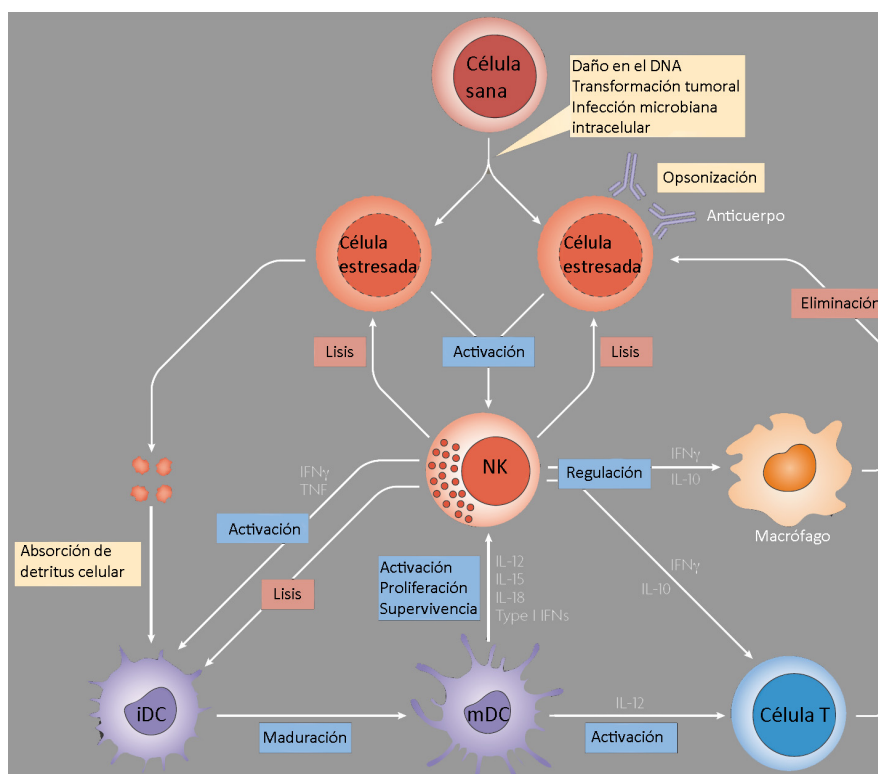


Figura 5. Funciones biológicas de la célula NK. Adaptado de ⁴⁴.

1.2.3. Características fenotípicas de los linfocitos NK

Las células NK expresan una gran variedad de moléculas en superficie e intracitoplasmáticas que indican diferentes estadios de desarrollo, maduración y/ función. Además, algunas de estas moléculas son utilizadas como marcadores de identificación de los linfocitos NK tanto en condiciones normales como en enfermedades inmunológicas.

1.2.3.1. Receptores activadores y moléculas accesorias:

Las moléculas activadoras y co-estimuladoras facilitan la función citotóxica de las células NK maduras.

Tabla 3. Moléculas accesorias y de activación NK.

Marcador	Sinónimos	Función en NK	Ref
CD2	Receptor de eritrocitos de carnero, LFA-2, Receptor de LFA-3.	Formación de nanotubos, cebado de NK inactivas, activación de ERK1/2 en la sinapsis NK.	48-50
CD8	OKT8 T cell antigen, P32, co-receptor de linf T.	Fomenta la actividad citolítica, previene AICD en NK.	51-53
CD11a	Integrina, ITGAL, LFA1 polipéptido alpha	Adhesión y polarización de gránulos	50,54,55
CD11b	Integrina, alpha-M, CR3A, MAC1A	Adhesión y degranulación	56,57
CD16	Receptor de baja afinidad IIIa de la Fc de IgG, FCGR3A	Importante en el desarrollo y función citolítica, media ADCC.	58,59
CD18	Integrin Beta2, molécula de adhesión linfocitaria, LFA1	Esencial en la unión a la célula diana y citotoxicidad	60,61
CD25	IL-2R α , Subunidad alpha del receptor de IL-2	Promueve la activación citolítica y proliferación.	62

CD94	Killer cell lectin like receptor subfamily D	Se asocia a NKG2A y NKG2C y se unen a HLA-E para formar señales inhibitoras y activadoras respectivamente.	63-65
CD215	IL-15R α	Supervivencia, desarrollo y proliferación de linfocitos T y NK.	66
CD226	DNAM1, DNAX accesory molecule.	Facilita la interacción de la célula NK con las células dendríticas. Vigilancia y citotoxicidad tumoral.-	67,68
CD244	2B4, NAIL	Receptor de la familia SLAM, ligando de CD48, estimula NK activadas por IL-2.	69,70
NKG2D	KLRK-1, KLR, CD314	Lectina tipo-C se une a MIC-A,B en la célula diana. Señaliza a través de PI3K/AKT. Citotoxicidad.	71,72
NKp30	Receptor de citotoxicidad natural 3 (NCR3)	Expresión en NK de sangre periférica, señala a través de ERK1/2, importante en producción de INF γ y contacto NK/DC	73
NKp44	Receptor de citotoxicidad natural 2 (NCR2). CD336.	Se expresa en NK activadas y media citolisis de células infectadas y tumorales. Señaliza a través de DAP12.	74
NKp46	Receptor de citotoxicidad natural 1 (NCR1).	Une hemaglutinina viral, señala la lisis de células tumorales. Favorece la apoptosis de neutrófilos junto con Fas/FasL.	75
CD95	Fas, TNFRSF6, APO1	Citotoxicidad y apoptosis.	26,27
CD95L	FasL, CD178, TNFSF6	Citotoxicidad y apoptosis.	26,27
Granzima A	GZMA	Presente en gránulos citotóxicos. Citotoxicidad.	28
Granzima B	GZMB	Presente en gránulos citotóxicos. Citotoxicidad.	28,29

Perforina	Citolisina	Presente en gránulos citotóxicos, hace poros en la membrana celular. Citotoxicidad.	30,31
------------------	------------	---	-------

1.2.3.2. Receptores inhibidores

Los linfocitos NK expresan un repertorio de receptores inhibidores que regulan su activación. Algunos de estos receptores son específicos para la unión a moléculas MHC de clase I y otras para moléculas no-MHC⁴³. Los más representativos se describen a continuación.

Tabla 4. Receptores inhibidores

Marcador	Sinónimos	Función en NK	Ref
CD158a	KIR2DL1/S1	Receptor de la familia KIR. Inhibe la función NK tras unirse a células diana que expresan HLA-C2	76
CD158b	KIR2DL2	Receptor de la familia KIR. Inhibe la función NK tras unirse a células diana que expresan HLA-C1	76
NKB1 (CD158e1)	KIR3DL1	Receptor de la familia KIR. Inhibe la función NK tras unirse a células diana que expresan HLA-A y HLA-B8	76
NKG2A	CD159a	Forma heterodímeros con CD94. Se une a la proteína MHC clase I, HLA-E.	

1.2.3.3. Marcadores de diferenciación/madurez

Tabla 5. Marcadores de diferenciación y madurez NK.

Marcador	Sinónimos	Función en NK	Ref
CD27	TNFRS7 (tumor necrosis factor receptor superfamily	Se une a CD70. Marcador de células NK inmaduras. Su expresión es regulada por IL-	77,78

	7)	15.	
CD56	NCAM	Adhesión y desarrollo.	79
CD57	Beta-1,3-glucuronil transferasa 1, NK1	Marcador de diferenciación. Se adquiere tras la infección por CMV.	25
CD117	c-kit, SCFR(stem cell factor receptor)	Se expresa en células CD56 ^{bright} , suprime la apoptosis, promueve la proliferación y producción de INF γ inducida por IL-2 en CD56 ^{bright} , promueve la proliferación en combinación con IL-2/IL-15.	80-82

1.3. Mecanismos de citotoxicidad celular:

Los linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTL) y las células Natural Killer (NK) son linfocitos efectores que comparten vías citotóxicas comunes necesarias para la defensa contra células infectadas o transformadas por virus. Ambos tipos de células matan a sus objetivos por cualquiera de los dos mecanismos que requieren contacto directo con las células diana. En la primera vía, las moléculas de los gránulos citoplasmáticos, inducen apoptosis de la célula diana por la acción conjunta de perforina y granzima²⁸. La perforina forma poros en la membrana plasmática y la granzima activa las vías de muerte celular que operan a través de la activación de cisteín-proteasas (caspasas). La segunda vía implica el acoplamiento y la agregación de receptores de muerte celular, tales como FAS (CD95) ó TNFR a sus ligandos afines, ligando de FAS (FASL) y TRAIL expresados en la membrana de las células citotóxicas que dan lugar a una apoptosis clásica dependiente de caspasas⁸³.

1.3.1. Citotoxicidad gránulo-dependiente:

El mecanismo principal de citotoxicidad mediado por linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTL) y NK requiere la exocitosis de lisosomas o gránulos a la sinapsis inmunológica entre la célula efectora y su diana.

En los CTL los gránulos se sintetizan después de la activación del linfocito tras el encuentro con un antígeno específico, sin embargo, en los linfocitos NK se forman durante el desarrollo celular. Así, las células NK están preparadas para responder rápidamente a las amenazas infecciosas y/o tumorales⁸⁴. Los principales componentes de los gránulos citotóxicos son la perforina y las granzimas A y B que tras su liberación se combinan para mediar la lisis de la célula diana⁸⁵.

Es un proceso en que están implicadas numerosas moléculas y que consta de los siguientes pasos (Figura 6):

- Formación de la sinapsis inmunológica: después del reconocimiento de la célula diana, los receptores y moléculas de activación rápidamente se distribuyen por la sinapsis formando agrupaciones supramoleculares de activación ó SMAC que se dividen en zonas concéntricas , una central (cSMAC) y otra periférica (pSMAC) en las que posteriormente se localizará la maquinaria exocítica.

Posteriormente se reorganiza el citoesqueleto de actina que rápidamente polimeriza a la periferia de la sinapsis formando un anillo de Actina-F que rodea el área central donde los gránulos serán secretados⁸⁶⁻⁸⁸. La formación de una sinapsis estable requiere la ligación

de LFA-1 e ICAM-1 además de la activación del receptor NKG2D en los linfocitos NK, y de manera similar, en los linfocitos T CD8+ se requiere la agregación del TCR y LFA-1⁸⁹. Tras la señalización, Cdc42 es activado a través de DOCK8 y junto con WASp se encargan de la correcta polimerización de la actina por el complejo Arp2/3⁹⁰.

- Polarización de los gránulos: la activación de la maquinaria citolítica se consigue gracias a una fuerte polarización celular que se consigue tras la reorganización de los microtúbulos y el citoesqueleto de actina que permite la secreción dirigida de los gránulos citotóxicos.

Los gránulos viajan a través de microtúbulos y convergen en el centro organizador de microtúbulos (MTOC) gracias a la acción del motor de dyneína⁹¹. Posteriormente, el MTOC polariza hacia la sinapsis gracias a la señalización vía gamma protein kinasa C (PKC) que desencadena la acumulación de DAG que actúa como segundo mensajero promoviendo el reclutamiento de la dyneína al complejo MTOC/Gránulos⁹².

Otra de las señales que inician la polarización del MTOC en linfocitos NK es la activación de kinasas reguladas extracelulares Erk1/2 que se fosforilan gracias a la acción de PI3K tras la activación del receptor NKG2D por su ligando⁹³.

- Secreción y lisis: Una vez los gránulos alcanzan la sinapsis se produce el acoplamiento de los mismos a la membrana plasmática gracias a la acción la proteína Rab27a. Posteriormente Munc 13-4 se encarga del cebado y fusión de las vesículas además de abrir la conformación del t-

SNARE Syntaxina 11 al retirar la proteína Munc18-2 que es necesaria para estabilizar el complejo.

Después de la polarización a la IS y antes de la desgranulación, los gránulos se acoplan a la sinapsis y se fusionan con la membrana plasmática. El acoplamiento está principalmente mediado por Munc 13-4 y Rab27a, los cuales son reclutados a los gránulos. Al interactuar con Rab27a, Munc13-4 también puede regular la interacción entre la vesícula y el receptor NSF fijado a la proteína soluble en proteínas (SNARE), requerido para la fusión de gránulos líticos con la membrana plasmática⁹⁴. Alternativamente, esto puede estar mediado por la interacción de Syntaxin 11 y Munc18-2 con R-SNAREs (tales como VAMP7) en la membrana de los gránulos⁹⁵. Entonces, el cebado ocurre como resultado de la activación mediada por Munc13-4 y de Syntaxina 11 y posterior unión de la membrana plasmática con gránulos líticos. La fusión se produce como resultado de la formación de complejos SNARE.

- Terminación: La interacción del centrosoma con la membrana plasmática es transitoria ya que éste se retrae antes de que la célula diana comience a morir y antes de que la hendidura secretora se distienda. La retracción del centrosoma se acompaña de la reorganización de la red de microtúbulos y hace que los gránulos que se han polarizado hacia el MTOC pero que todavía no se han acoplado con la membrana retrocedan con el MTOC desde el sitio de contacto. Tanto la reorganización de los microtúbulos como la retracción de los gránulos impiden el acceso adicional de los gránulos al sitio de secreción,

controlando el suministro y el direccionamiento de la secreción de gránulos líticos además de proporcionar un mecanismo para la terminación de la lisis.

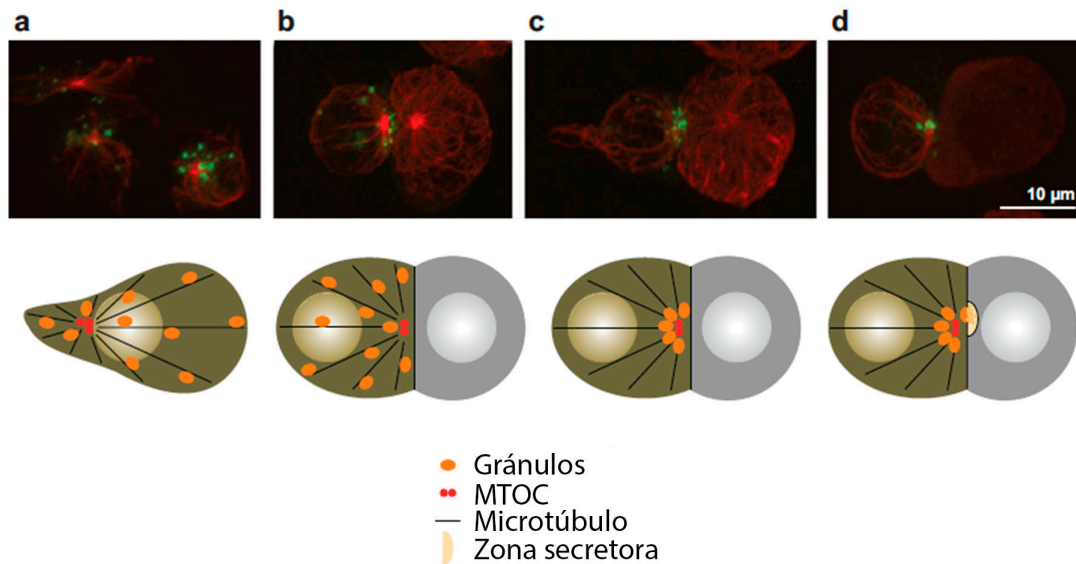


Figura 6. Representación en imágenes de la citolisis mediada por gránulos. Tomado de ⁸⁵.

1.3.2. Citotoxicidad vía FAS/FASL:

Esta vía de apoptosis extrínseca es importante para el control de los linfocitos T estimulados y en la promoción de la tolerancia a los auto-antígenos, además de ser un mecanismo homeostático de la actividad de los linfocitos T citotóxicos. Las células T efectoras y las células NK expresan FasL (CD178)⁹⁶, mientras que las células diana expresan Fas (CD95 o Apo-1), por lo que estas células son susceptibles a la apoptosis mediada por esta vía. Fas es una proteína de superficie celular que pesa 45 kDa que pertenece a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) -I. Tiene un dominio extracelular rico en cisteínas que se une a FasL, y otro dominio citoplasmático involucrado en la transducción de la señal de muerte. FasL es una molécula

expresada en células T y NK, y pesa 40 kDa. Es homóloga al factor de necrosis tumoral (TNF), y es un miembro de la superfamilia TNF de tipo TNFR-II⁹⁷. FasL se expresa constitutivamente sobre células de órganos inmunológicamente privilegiados, como el cerebro, la cámara anterior de los ojos y los testículos. En consecuencia, FasL protege estos sitios privilegiados de la acción de las células del sistema inmune, como un mecanismo regulador adicional de la auto-tolerancia. FasL se puede expresar de tres maneras: la primera formando trímeros anclados en la membrana de la superficie celular y actúa como mediador primario de la apoptosis. La segunda, FasL se ancla a microvesículas de membrana intracelular, donde se almacena hasta que se expresa en la superficie celular tras la respuesta a estímulos fisiológicos. El último corresponde a un FasL soluble, que se genera por degradación de la forma membranosa (durante los primeros minutos de expresión) debido a la actividad de una metaloproteínasa (MMP-7) cuya función es catalizar la degradación de las proteínas de la matriz extracelular^{97,98}. La molécula sFasL tiene propiedades proapoptóticas o antiapoptóticas puesto que sFasL es un homotrímero ineficiente que se une a Fas. Cuando estas moléculas interactúan, el resultado es la señalización nula sin apoptosis. Sin embargo, sFasL puede inducir la apoptosis después de su asociación o agregación con proteínas de la matriz extracelular. Además, se induce la apoptosis cuando sFasL forma tetrámeros o estructuras altamente organizadas⁹⁹.

La unión de Fas con FasL provoca la trimerización y el reclutamiento de proteínas de dominio de muerte asociadas con Fas (FADD) a través de interacciones homotípicas de dominio de muerte (Figura 7). A su vez, el

FADD trimerizado recluta procaspasa 8 ó 10, que experimentan un proceso de autoproteólisis para convertirse en caspasas activas¹⁰⁰. El ensamblaje de estos componentes da como resultado la formación de un complejo de señalización inductor de muerte (DISC), que es fundamental en la apoptosis. La caspasa 8 a su vez interactúa con las procaspasas 3, 6, o 7 y, a través de un proceso de transproteólisis, se convierten en caspasas activas.

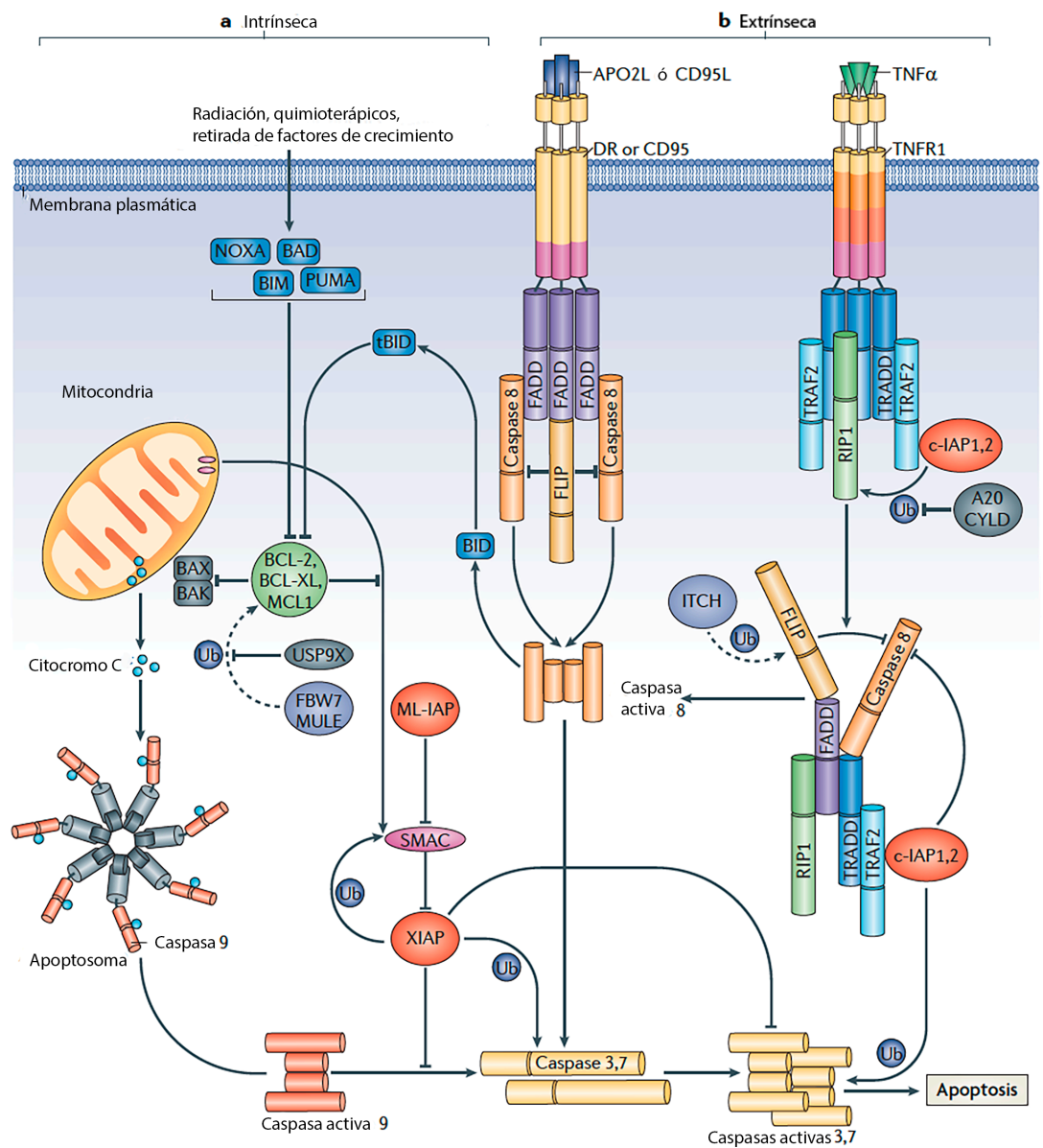


Figura 7. Vías intrínseca y extrínseca de apoptosis. Traducido de ¹⁰¹.

Finalmente, estas caspasas efectoras escinden ADN. La caspasa 8 también puede hidrolizar Bid, que causa daño a la membrana externa mitocondrial y desencadenar la liberación de citocromo-C ¹⁰². Además de FasL, otro miembro de la familia TNFR es el ligando inducido por apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), también conocido como Apo-2L. TRAIL tiene dos receptores, TRAIL-R1 (receptor de muerte 4, DR4) y TRAIL-R2 (DR5), que también pertenecen a la familia TNFR ¹⁰³. Una vez enlazados a TRAIL, estos receptores asocian proteínas FADD por su parte citoplásmica. Luego, las proteínas FADD reclutan procaspasa 8 que se activa dentro del DISC. La caspasa 8 es capaz de desencadenar el proceso de apoptosis ya sea a través de la interacción con procaspasas 3, 6, 7 o escisión de Bid, como se mencionó anteriormente.

2. INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS:

Las inmunodeficiencias primarias comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades raras producidas por defectos genéticos en uno o más componentes del sistema inmune asociadas con mayor susceptibilidad a infecciones, autoinmunidad, inflamación, alergia y en algunos casos aumento de la incidencia de malignidad ¹⁰⁴. En la actualidad se conocen más de 300 genes implicados en la patogénesis de las inmunodeficiencias primarias que potencialmente podrían afectar a alrededor de 1:1.200 personas en todo el mundo ¹⁰⁵.

2.1. Clasificación:

Las inmunodeficiencias primarias se clasifican en diferentes categorías según el componente del sistema inmune que se ve afectado ¹⁰⁶ (Figura 8).

En la actualidad hay más de 20.000 pacientes con IDP registrados en la base de datos de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID)¹⁰⁷.



Figura 8. Clasificación del registro de IDPs de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) 15 Nov. 2014. Tomado de ¹⁰⁷.

Con este trabajo hemos tenido la oportunidad de caracterizar diferentes pacientes con IDP y susceptibilidad a infecciones virales y tumores que pertenecen a las siguientes categorías: defecto de linfocitos T, desregulación, autoinmunidad y defecto de fagocitos.

2.1.1. Inmunodeficiencias con susceptibilidad a infecciones víricas y tumores:

Algunas inmunodeficiencias primarias se producen por alteraciones en genes relacionados específicamente con la defensa inmune frente a virus, alterando los mecanismos que se encargan tanto del control de la infección como del aclaramiento de los virus como EBV, VHC, VHB, VPH o el virus asociado a Sarcoma de Kaposi. Ésto contribuye a la transformación e

inmortalización celular responsable de alrededor del 10-15 % de los tumores conocidos¹⁰⁸. La incapacidad de eliminar los patógenos virales crea además un ambiente inflamatorio que promueve la supervivencia y proliferación celular. Como resultado, hay un riesgo alto de que las células que entran en división rápida contengan mutaciones oncogénicas¹⁰⁹. Existe por tanto, una fuerte asociación entre IDP con alteración celular, humoral y/o desregulación, infección por determinados virus y la predisposición a malignidad¹¹⁰.

Las IDP que se asocian con mayor frecuencia a infecciones víricas ó malignidad son las siguientes:

2.1.1.1. Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP):

Descripción clínica: también conocida como enfermedad de Duncan¹¹¹, es una IDP rara caracterizada por una triada clínica de mononucleosis infecciosa fulminante (MIF), disgammaglobulinemia y linfoma. Comúnmente estos pacientes presentan una respuesta inmune inapropiada frente a la infección por EBV caracterizada por la expansión de células B infectadas así como células T CD8+ reactivas y macrófagos activados que en ocasiones se acompaña de síndrome hemofagocítico¹¹².

Gen(es) y herencia: el síndrome XLP está producido por mutaciones en los genes *SH2D1A* (Src homology 2 domain-containing gene 1^a) y *BIRC4* que codifican para las proteínas SAP (SLAM-associated-protein) y XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) respectivamente. Ambas formas de la enfermedad son de herencia ligada al cromosoma X^{113,114}.

Función y mecanismo fisiopatológico: *SH2D1A* codifica para una proteína de 128 aminoácidos denominada SAP que interacciona como motivos

conservados de tirosina de proteínas de la familia SLAM que actúan como receptores inmunomoduladores como por ejemplo 2B4 (CD244). En humanos SAP se expresa principalmente en timocitos, linfocitos T, células NK y células NKT. Se encarga de propagar la señalización iniciada por los receptores inmunomoduladores tipo SLAM. 2B4 es fundamental en la citotoxicidad mediada por NK y T CD8+ frente a linfocitos B infectados por EBV ¹¹⁵, por lo que en pacientes con deficiencia de SAP la respuesta inmune frente a EBV se encuentra alterada (Figura 9).

Los mecanismos fisiopatológicos de la deficiencia de XIAP se desconocen por el momento. Los linfocitos de los pacientes con XLP-2 muestran mayor susceptibilidad a estímulos apoptóticos, lo que es coherente con el papel conocido de XIAP como inhibidor de caspasas ¹¹⁶. Un exceso de apoptosis linfocitaria puede agravar la infección por EBV en pacientes con defecto de XIAP.

Clasificación: Desregulación y/o autoinmunidad.

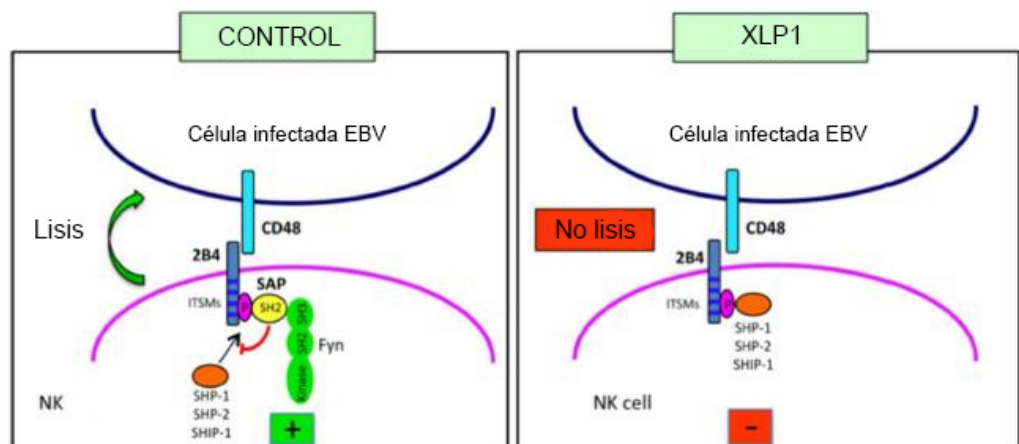


Figura 9: Representación esquemática de la sinapsis inmunológica de una célula NK de un control sano y un paciente con XLP1. Traducido de ¹¹⁷

2.1.1.2. Inmunodeficiencia por defecto en ITK (IL-2 inducible T-cell kinase):

Descripción clínica: Los pacientes con defecto en ITK presentan linfoproliferación B masiva después de la infección con virus EBV (linfadenopatías y/o hepatoesplenomegalia) e incluso linfoma de Hodgking¹¹⁸ y/o desregulación inmune que en algún caso se ha presentado con síndrome hemofagocítico¹¹⁹.

Gen(es) y herencia: *ITK*(Interleukin-2-inducible T-cell kinase) codifica para una proteína del mismo nombre presente en timocitos, linfocitos T, NKT y NK¹²⁰. Ésta enfermedad sigue un patrón de herencia autosómica recesiva.

Función y mecanismo fisiopatológico: ITK es una tirosina quinasa citoplasmática cuyo dominio homólogo a *Plekstrina* une preferentemente fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato, lo que conlleva el reclutamiento de ITK hacia la membrana plasmática. En células T, ITK se activa en respuesta al estímulo antigénico y es requerida para la correcta activación de la fosfolipasa C a través del TCR y para la posterior movilización de Ca^{2+} ¹²⁰. Por lo tanto, ITK es indispensable para la cascada de señalización del TCR implicada en funciones de desarrollo del linfocito T, diferenciación, proliferación y citotoxicidad entre otras. La respuesta inmune alterada frente a virus se atribuye a la citotoxicidad CD8+ defectuosa, a la reducción de la proliferación de linfocitos CD8+ y a la disminución de la producción de INF γ y TNF α ^{121,122}.

Clasificación: Desregulación y/o autoinmunidad.

2.1.1.3. Linfocitosis hemofagocítica familiar (LHHF):

Descripción clínica: de entre las principales manifestaciones clínicas que presentan los pacientes con LHHF se encuentran: fiebre prolongada, hepatoesplenomegalia, hemorragia, rash cutáneo, ictericia y afectación del sistema nervioso central. Los hallazgos de laboratorio más característicos son bicitopenia o pancitopenia, coagulopatía, hiperlipidemia, hipofibrinogenemia, hiperferritinemia, elevación de enzimas hepáticas, hiperbilirrubinemia, hipoalbuminemia e hiponatremia. El conjunto de estos signos y síntomas cuando cumplen determinados criterios se denomina linfocitosis hemofagocítica (LHH) ¹²³ (Ver tabla 6). Aunque no se conoce la patogenia exacta de la LHH las manifestaciones clínicas de la enfermedad se deben a la hiperactivación de los linfocitos T CD8+ y macrófagos, a la proliferación, migración e infiltración de éstas células en varios órganos y a la hipercitocinemia persistentemente elevada con predominio de citocinas proinflamatorias que conducen a la disfunción progresiva de los órganos que incluso puede conllevar a la muerte ¹²⁴.

En determinadas ocasiones en pacientes genéticamente predispuestos, este cuadro es desencadenado tras la infección por el virus Epstein Barr ¹²⁵.

Tabla 6. Criterios diagnósticos para LHH. Adaptado de ¹²³

A. Diagnóstico molecular consistente con LHHF, mutaciones en *PRF1*, *UNC13D*,

Rab27a, *STX11*, *STXBP2*, *SH2D1A* ó *BIRC4*

ó

B. 5 de los 8 criterios siguientes:

Fiebre > 38,5°C

Esplenomegalia

Citopenias (en al menos 2-3 líneas en sangre periférica)

Hipertrigliceridemia

Hemofagocitosis en médula ósea, bazo, nódulos linfáticos ó hígado

Actividad NK baja ó ausente

Ferritina elevada (>3000ng/mL)

sCD25 > 2400 U/mL

Gen(es) y herencia: aunque el fenotipo de la LHHF es bastante homogéneo son varios los genes implicados en la aparición de la enfermedad. Hay 5 tipos de LHHF según el gen afectado y se denominan con las siglas FLH1-5¹²⁶⁻¹²⁹. También se han descrito mutaciones en otros genes relacionados en la citotoxicidad de los linfocitos T y NK (Tabla 7) y que además de LHHF causan otras alteraciones, como el síndrome de Griscelli, Chediak-Higashi, Hermanski-Pudlak y el Linfoproliferativo ligado al X comentado anteriormente.

Tabla 7. Defectos genéticos que causan LHH

Gen	Enfermedad	Defecto	Herencia
Desconocida	FLH1		
<i>PRF1</i>	FLH2	Contenido de vesículas	AR
<i>UNC13D</i>	FLH3	Cebado de vesículas	AR
<i>STX11</i>	FLH4	Unión y fusión de vesículas	AR
<i>STXBP2</i>	FLH5	Unión y fusión de vesículas	AR
<i>LYST</i>	Chediak-Higashi	Mantenimiento de vesículas	AR
<i>RAB27A</i>	Griscelli 2	Acoplamiento de vesículas	AR

<i>AP3B1/AP3D1</i>	Hermansky-Pudlak 2	Tráfico de vesículas	AR
<i>SH2D1A</i>	XLP1	Señalización intracelular	Ligada al X
<i>BIRC4</i>	XLP2	Señalización intracelular	Ligada al X
OTROS: <i>CD27, MAGT1, ITK</i>			AR

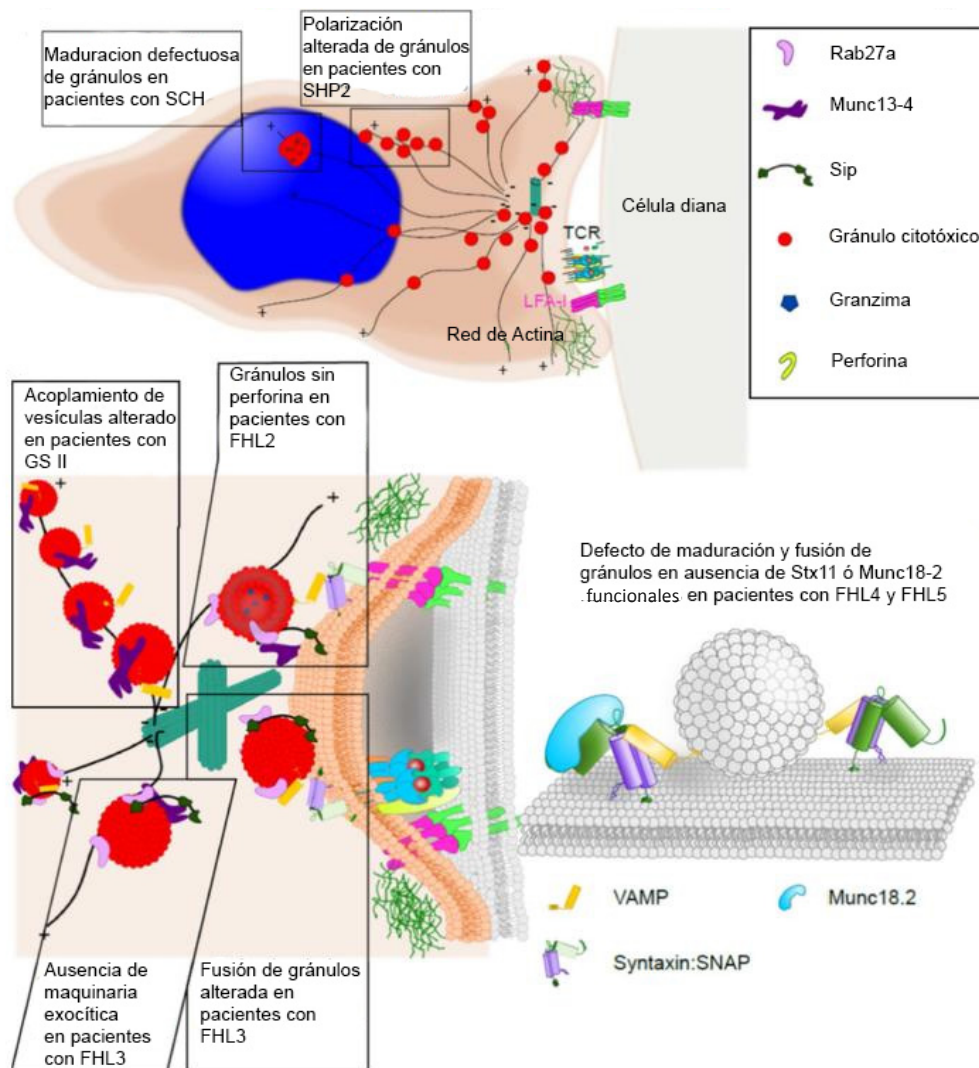


Figura 10: LHHF y la sinapsis inmunológica. Modificado de ¹¹⁷.

Función y mecanismo fisiopatológico:

Las modificaciones genéticas asociadas a LHHF pueden afectar a la vía de citotoxicidad gránulo-dependiente alterando tanto el tráfico, acoplamiento y cebado de las vesículas, así como a su fusión en la membrana plasmática(Figura10). Los macrófagos se activan y secretan cantidades excesivas de citoquinas. Además, los linfocitos NK y / o CTLs no logran eliminar los macrófagos activados por lo que ésta falta de regulación de la homeostasis produce una actividad macrofágica excesiva y niveles muy elevados de INF γ y otras citoquinas proinflamatorias que pueden causar en última instancia daño tisular que puede conducir a fallo orgánico.

Clasificación: Desregulación y/o autoinmunidad.

2.1.1.4. **Síndrome Hiper IgE autosómico recesivo por defectos en**

***DOCK8*:**

Descripción clínica: los pacientes con síndrome Hiper IgE autosómico recesivo por mutaciones en *DOCK8* sufren numerosas infecciones respiratorias con neumonías recurrentes, abscesos cutáneos, infecciones virales severas por *Molluscum contagiosum*, herpes simple, HPV y varicela Zoster que en ocasiones son parcialmente mutilantes, candidiasis, dermatitis atópica severa (a menudo colonizada por *S. aureus*), asma y alergias alimentarias ^{130,131}. También tienen mayor susceptibilidad a desarrollo de carcinoma de células escamosas y linfomas ¹³².

Estos pacientes presentan inmunodeficiencia combinada con valores elevados de IgE, IgM disminuida, respuesta a vacunas baja o ausente,

eosinofilia, ligera linfopenia con disminución de células T CD4+ y CD8+ y dificultad para generar células B de memoria y de cambio de clase. Los linfocitos T presentan mayor porcentaje de células de memoria CD45RO^{133,134} y pese a tener números normales de linfocitos NK, su función citotóxica esta disminuida¹³⁵.

Gen(es) y herencia: La mayoría de los casos de AR-HIES están producidos por mutaciones en el gen *DOCK8* (Dedicator of citokinesis 8) que pueden ser grandes deleciones en homocigosis o heterocigosis compuesta, mutaciones puntuales que causan stop prematuro, deleciones de uno ó varios exones ó alteraciones de los sitios de splicing.

Función y mecanismo fisiopatológico:

Dock8 es miembro de la familia de proteínas DOCK180 y actúa como factor intercambiador de guanina. Interacciona con el GDP y el GTP que esta unido a Cdc42 y a Rac1 convirtiendo este complejo en activo y permitiendo la interacción con WASP. WASP posteriormente se encarga de la reorganización del citoesqueleto, esencial para diversos procesos celulares como activación, migración, adhesión y formación de la sinapsis inmunológica, fundamental para el efecto citolítico de las células T y NK (Figura 11).

Clasificación: Inmunodeficiencias combinadas.

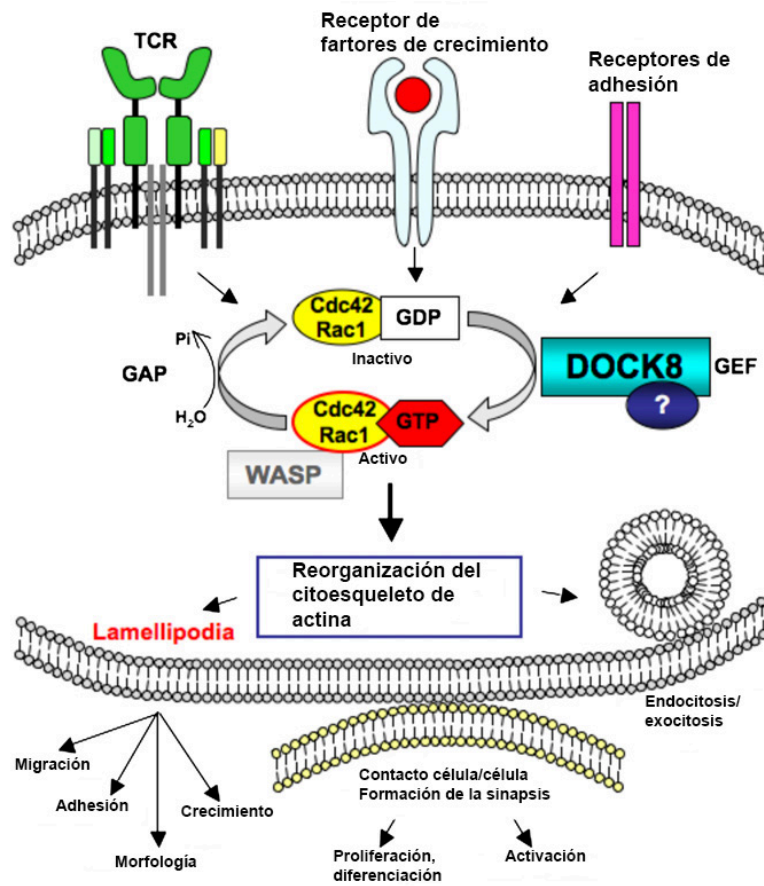


Figura 11. Representación esquemática de la función DOCK8 en el sistema inmune. Traducido ¹³⁰.

2.1.1.5. Inmunodeficiencia por defecto en *GATA2*

Manifestaciones clínicas: Mutaciones espontáneas o autosómicas dominantes en el gen *GATA2* producen una variedad de síndromes clínicos que se caracterizan principalmente por los siguientes signos y síntomas:

- Síndrome MonoMac: monocitopenia e infección por micobacterias ¹³⁶.
- Síndrome Emberger: Defecto de células dendríticas, mieloides y linfopenia de células NK acompañado de linfedema y mielodisplasia ¹³⁷.
- Leucemia/mielodisplasia familiar: LMA ó SMD con componente familiar ¹³⁸.

Estos síndromes se caracterizan por la disminución o ausencia de células dendríticas, monocitos y linfocitos B y NK y clínicamente por la recurrencia

de infecciones oportunistas por micobacterias y algunos virus, especialmente papilloma virus y herpes virus^{139,140}. Además estos pacientes tienen un incremento del riesgo de padecer procesos tumorales y defectos en el desarrollo del sistema linfático.

Gen(es) y herencia: se han detectado numerosas mutaciones en *GATA2*, deleciones, sustituciones, mutaciones en zonas reguladoras y frameshifts que producen haploinsuficiencia de la proteína. Pueden encontrarse en pacientes de manera espontánea o con herencia autosómica dominante¹³⁶.

Función y mecanismo fisiopatológico: *GATA2* es una proteína que forma parte de la familia GATA de factores de transcripción hematopoyéticos. Esta familia de factores de transcripción contienen dos dominios adyacentes de unión al DNA de tipo dedos de zinc C4 que contienen 4 residuos de cisteína. Esta familia de moléculas controla el desarrollo de una gran variedad de tejidos activando e inhibiendo la transcripción mediante la unión al DNA por reconocimiento de las secuencias consenso GATA (A/T GATA A/T). *GATA2* se expresa en células madre hematopoyéticas y es fundamental para la supervivencia, mantenimiento y proliferación de las células hematopoyéticas¹⁴¹(Figura 12). *GATA2* también participa en la formación de los vasos linfáticos y sanguíneos¹⁴². El papel patogénico de las mutaciones en *GATA2* en la manifestación de la enfermedad no se conoce completamente pero parece estar relacionado con la generación y el mantenimiento de los progenitores de los subtipos celulares afectados.

Clasificación: Defectos congénitos del número de fagocitos, de la función o de ambos.

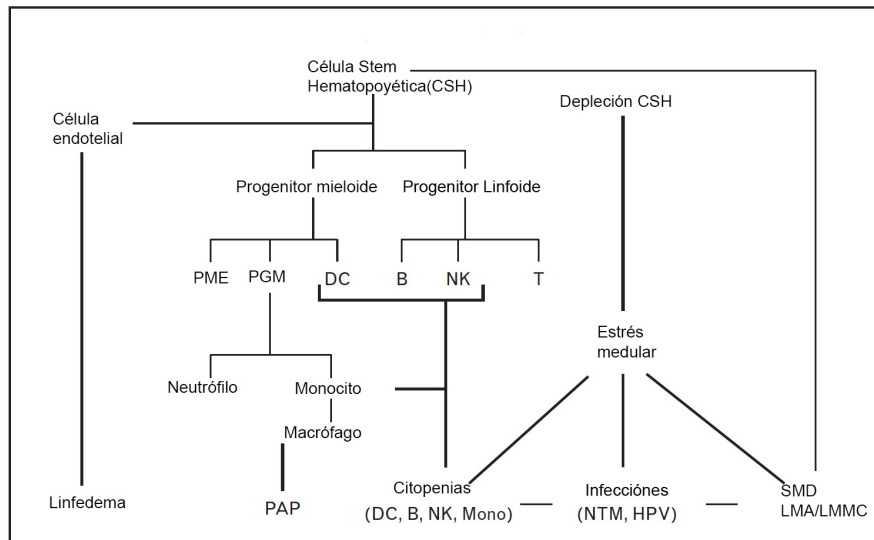


Figura 12. Efectos de la deficiencia de GATA2 en el sistema hematopoyético. Traducido de¹⁴³. PME, progenitor megacariocítico-eritroide; PGM, progenitor gránulo-monocítico; DC, célula dendrítica; PAP, proteinosis alveolar pulmonar; NTM, micobacteria no tuberculosa; HPV, virus del papilloma humano; SMD, síndrome mielodisplásico; LMA, leucemia mielóide aguda; LMMC, leucemiamielo-monocítica crónica.

2.1.1.6. Síndrome de WHIM:

Manifestaciones clínicas: El síndrome de WHIM es una enfermedad congénita rara que produce inmunodeficiencia. Su nombre proviene de las principales características clínicas asociadas que son: verrugas, hipogammaglobulinemia, infecciones y mielocatexis^{144,145}. Las infecciones bacterianas son recurrentes desde la infancia y comúnmente afectan al sistema respiratorio, gastrointestinal y a la piel¹⁴⁶. Responden bien a antibióticos y son de curso benigno aunque las neumonías recurrentes pueden resultar en bronquiectasias e infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa*. Aunque las infecciones bacterianas recurrentes son comunes,

la principal afectación clínica que sufren estos pacientes es la infección por el virus del papiloma humano (VPH) . Aparecen numerosas verrugas en manos, pies y tronco, y condiloma acuminado genital que puede ser displásico ó neoplásico. Los carcinomas relacionados con la infección VPH son una causa importante de morbilidad. También se ha observado un incremento de la susceptibilidad a virus herpes ¹⁴⁷. Los principales hallazgos de laboratorio son: neutropenia, con hiper celularidad en médula ósea (MO) debido a la incapacidad de ésta de liberar los neutrófilos maduros (mielocatexis), linfopenia de células T y B con descenso de células B de cambio de clase e hipogammaglobulinemia principalmente IgG ¹⁴⁸.

Gen(es) y herencia: el síndrome de WHIM es causado por mutaciones autosómicas dominantes de ganancia de función en el gen *CXCR4* que codifica para el receptor de quimioquinas del mismo nombre. Las mutaciones que se han descrito afectan a la porción c-terminal citoplasmática del receptor ¹⁴⁹.

Función y mecanismo fisiopatológico:

CXCR4 es un receptor acoplado a proteína G que une selectivamente al factor derivado de células estromales 1 (SDF-1 ó CXCL12). Mutaciones en *CXCR4* interrumpen la señalización mediada por SDF-1 debido a la pérdida de sitios de fosforilación en el receptor.

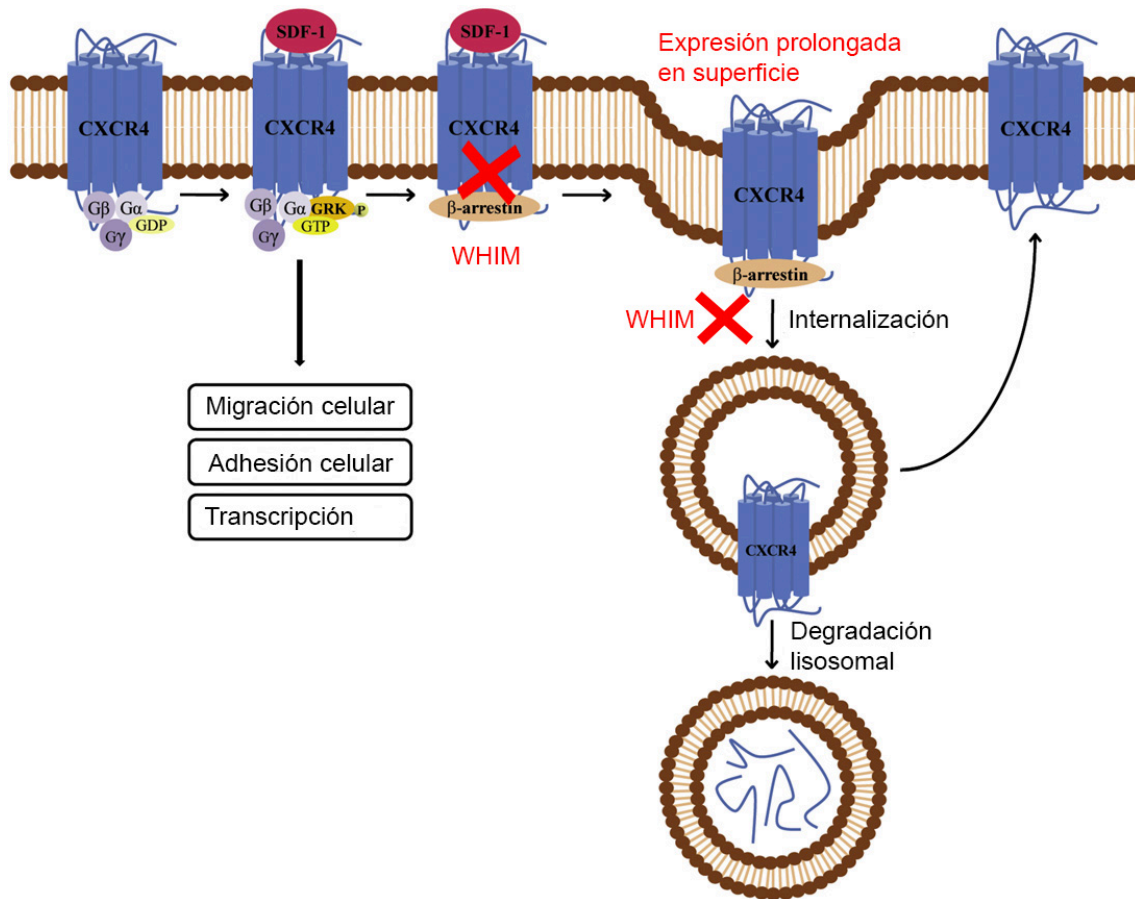


Figura 13. Función y regulación de la señalización CXCR4. Modificado de ¹¹⁰.

Estos sitios son fosforilados por las proteínas G y son diana de beta arrestinas que secuestran al receptor en vesículas endocíticas resultando en la desensibilización del receptor al ligando y la posterior degradación lisosomal de éste ¹⁵⁰. Los leucocitos que expresan el CXCR4 truncado muestran una unión quimiotáctica aumentada a SDF-1 lo que impide su tráfico hacia la circulación periférica (Figura 13). El aumento de susceptibilidad a VPH parece debido a que las células de la dermis infectadas por VPH tienen aumento de expresión de SDF-1 por lo que CXCR4 es upregulado lo que puede ser un factor facilitador de la infección por VPH. Además otro factor que puede contribuir es la disminución del

número y función de las células mieloides y de células dendríticas plasmocitoides¹⁵¹.

Clasificación: Defectos de la inmunidad Innata.

2.1.1.7. Inmunodeficiencia por alteración de la señalización de PI3Kδ

Manifestaciones clínicas: Los pacientes con mutaciones de ganancia o pérdida de función en la vía de activación de PI3K sufren infecciones sinopulmonares bacterianas recurrentes, en ocasiones con bronquiectasias asociadas, linfadenopatía, esplenomegalia y fenómenos autoinmunes como anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune y viremia EBV y CMV. De entre las principales características inmunológicas destaca la hipogammaglobulinemia (en ocasiones acompañada de elevación de IgM), descenso de células T naïve y de memoria central con un aumento de linfocitos T efectores senescentes.

Gen(es) y herencia: *PIK3R1* y *PIK3CD* codifican para las dos subunidades de la PI3Kδ, p85α (subunidad reguladora) y p110δ (subunidad catalítica) respectivamente. Las mutaciones que producen pérdida de función (LOF) son muy poco frecuentes y con herencia autosómica recesiva tanto en *PIK3R1* y *PIK3CD*^{152,153}. Mutaciones en heterocigosis que afectan al splicing del exón 11 de *PIK3R1* producen ganancia de función (GOF) de PI3Kδ debido a la delección del mismo con la consiguiente eliminación del sitio de unión a la subunidad catalítica (p110δ)^{154,155}. Las mutaciones en heterocigosis en *PIK3CD* afectan a la actividad tirosina quinasa de la proteína aumentando la actividad catalítica y la consiguiente GOF^{156,157}.

Mutaciones en heterocigosis en el gen *PTEN* que causan pérdida de función en PTEN (Phosphatase and tensin homolog) también pueden causar clínica similar acompañada de síndrome de Cowden¹⁵⁸.

Función y mecanismo fisiopatológico :

Las proteínas kinasas de Clase IA como PI3K δ se activan tras el reclutamiento a los receptores tirosina quinasa asociados a la membrana plasmática. La subunidad reguladora p85 α estabiliza la subunidad catalítica p110 δ a través de la unión constitutiva del dominio p85 α SH2 al dominio ABD de p110 δ (Figura 14). La unión de los dominios p85 α SH2 a residuos fosforilados con tirosina sobre un receptor activado libera los contactos inhibitorios entre los dominios p85 α SH2 y los dominios p110 δ C2 helicoidal y quinasa, de tal manera que se libera la subunidad catalítica p110 δ y se activa la cascada de señalización PI3K-AKT-mTOR. Las mutaciones de GOF en PIK3R1 y PIK3CD aumentan la actividad quinasa interfiriendo con las interacciones inhibitorias entre la p85 α reguladora y la subunidad catalítica p110 δ (Δ Ex11 en p85 α y N334K, C416R y E525K en p110 δ), o aumentando la afinidad de p110 δ a la membrana plasmática (E1021K)¹⁵⁷. En linfocitos B se suprime la transcripción de genes asociados a FOXO1 como RAG, IKAROS ó CD62L interrumpiendo la reorganización V(D)J, el desarrollo de los linfocitos B ó el “homing” a los ganglios linfáticos. También se promueve la proliferación de linfocitos B por aumento de la actividad mTOR. En linfocitos T la alteración del metabolismo contribuye al desarrollo de fenotipo efector promovido por la alteración mTOR con una reducción importante de los linfocitos T naïve, disminución de la secreción de

citoquinas y aumento de la apoptosis tras la estimulación del TCR. La afectación NK en humanos no se ha estudiado pero en ratones la alteración de la señalización PI3K δ produce defecto en la activación de kinasas implicadas en la citotoxicidad y secreción de INF γ .⁹³

Clasificación: Deficiencia de anticuerpos.

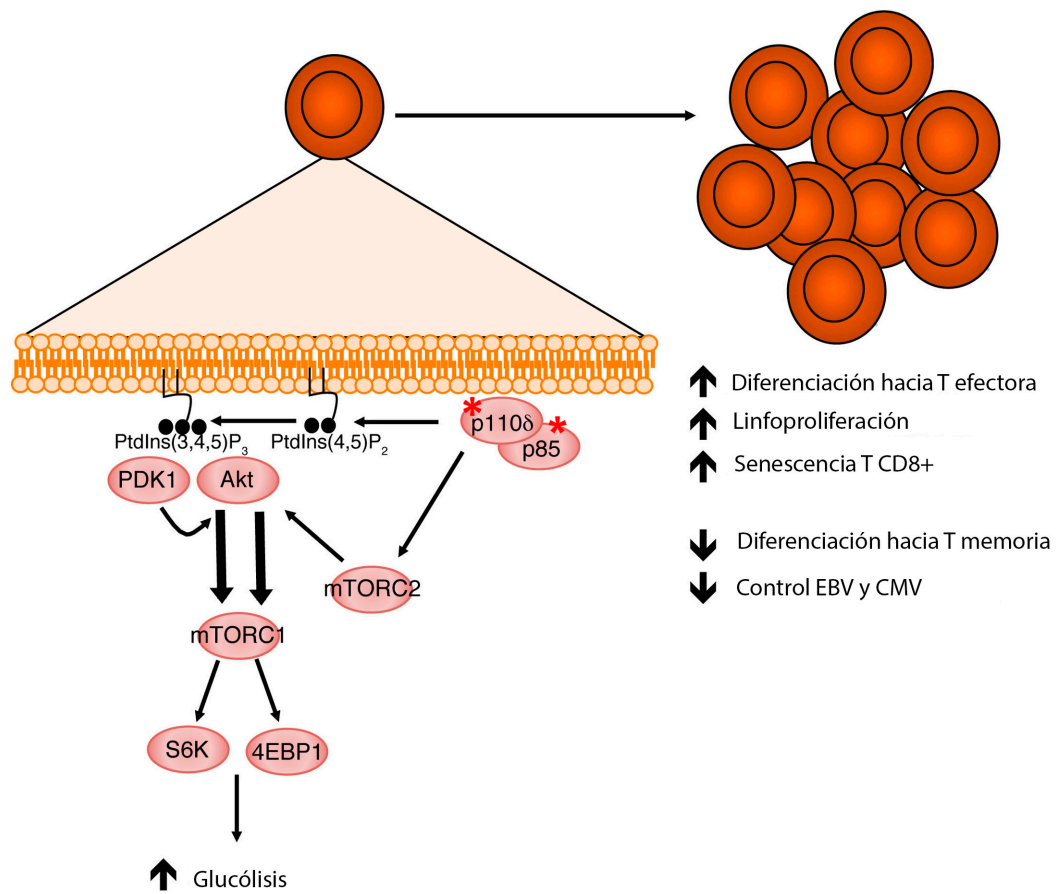


Figura 14. Modelo propuesto para el efecto de las mutaciones de GOF en *PIK3CD*. Tomado de ¹⁵⁷.

2.1.1.8. Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (SLPA)

Manifestaciones clínicas: los pacientes con síndrome linfoproliferativo autoinmune padecen linfoproliferación policlonal no maligna a edad temprana con adenopatías y hepato-esplenomegalia que se asocia con un aumento de la susceptibilidad a padecer enfermedades oncológicas como linfoma y que suele ir acompañada por citopenias de carácter autoinmune.¹⁵⁹ Estos pacientes presentan un aumento de células T dobles negativas (CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-), hipergammaglobulinemia IgG e IgA, citopénias, elevación de IL-10, sFASL e IL-18 plasmáticas, aumento de vitamina B12 sérica y presencia de autoanticuerpos. El diagnóstico definitivo se basa en la presencia de ambos criterios requeridos más uno accesorio de los que se exponen en la tabla 8¹⁶⁰. Los pacientes con SLPA tienen elevado riesgo de padecer linfomas malignos, 50 veces por encima de la población general para desarrollar linfoma de Hodgkin y 14 veces más riesgo para linfoma no Hodgkin.

Tabla 8. Criterios revisados para el diagnóstico de SLPA¹⁶⁰

Requeridos

1. Linfadenopatía crónica no infecciosa y no maligna ó esplenomegalia ó ambas (>6 meses)
2. Elevación de células T dobles negativas (DN) CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8- ($\geq 1.5\%$ del total de linfocitos ó $\geq 2.5\%$ del total de linfocitos CD3+)

Accesorios

Primarios

1. Apoptosis linfocitaria defectuosa (en 2 ensayos separados en el tiempo)

2. Mutaciones somáticas ó germinales en *FAS*, *FASLG*, ó *CASP10*

Secundarios

1. Elevación de sFASL plasmático (>200pg/mL) ó elevación de niveles de IL-10 en plasma (>20pg/mL) ó elevación en plasma ó suero de vitamina B12 (>1500ng/mL) ó elevación de IL-18 (>500pg/mL)

2. Hallazgo inmunohistológicos típicos

3. Citopenias autoinmunes (anemia hemolítica, trombocitopenia ó neutropenia) e hipergammaglobulinemia (policlonal)

3. Historia familiar de proliferación no infecciosa/maligna con o sin Autoinmunidad

Gen(es) y herencia:

El SLPA puede ser causado por mutaciones germinales o somáticas o ambas en Fas o por mutaciones en Caspasa10 y Fas ligando. El 62% de los pacientes presentan mutaciones germinales en *FAS* que pueden encontrarse a lo largo de todo el gen y la mayoría se localizan en el dominio intracelular de la proteína ^{161,162}. La mayoría de las mutaciones son en heterocigosis y se transmiten de manera autosómica dominante produciendo un efecto dominante negativo en la vía FAS ¹⁶³. La segunda causa más frecuente son las mutaciones somáticas en *FAS* en las que sólo se ve afectada una pequeña proporción de células linfocitarias como son los linfocitos T dobles negativos ¹⁶⁴. Una pequeña proporción de pacientes presentan mutaciones en *CASP10* y *FASLG* cuyo fenotipo clínico es indistinguible de otros pacientes con SLPA. ^{165,166} (Tabla 9). Sólo un par de

pacientes tienen mutaciones en *FASLG* en heterocigosis que no presentan SLPA y desarrollan Lupus eritematoso sistémico ¹⁶⁷.

Tabla 9. Clasificación del síndrome linfoproliferativo autoinmune y otros desórdenes relacionados con SLPA

Enfermedad	Gen	Defecto	Herencia
SLPA-FAS	<i>FAS</i>	Mutaciones en línea germinal	AD/AR
SLPA-sFAS	<i>FAS</i>	Mutaciones en línea somática (DN)	Somáticas
SLPA-FASLG	<i>FASLG</i>	Mutaciones en línea germinal	AD/AR
SLPA-CASP10	<i>CASP10</i>	Mutaciones en línea germinal	AD
SLPA-U	Desconocido	-	-
Otras relacionados con SLPA	<i>CASP8</i> <i>NRAS</i> <i>KRAS</i>	Mutaciones germinales <i>CASP8</i> y somáticas en <i>Kras</i> y <i>Nras</i>	AR/somáticas

Función y mecanismo fisiopatológico:

El fenotipo del SLPA resulta de la alteración de la apoptosis linfocitaria mediada por el eje FAS/FASL, esta vía regula la homeostasis linfocitaria eliminando linfocitos autorreactivos y senescentes (Figura 15). Como consecuencia, los defectos en esta vía permiten la expansión de poblaciones linfocitarias antígeno específicas que en ocasiones pueden ser autorreactivas y producir autoinmunidad ó colaborar en la transformación maligna de éstas células contribuyendo al desarrollo de linfomas.

Clasificación: Desregulación y/o autoinmunidad.

Defectos de Apoptosis

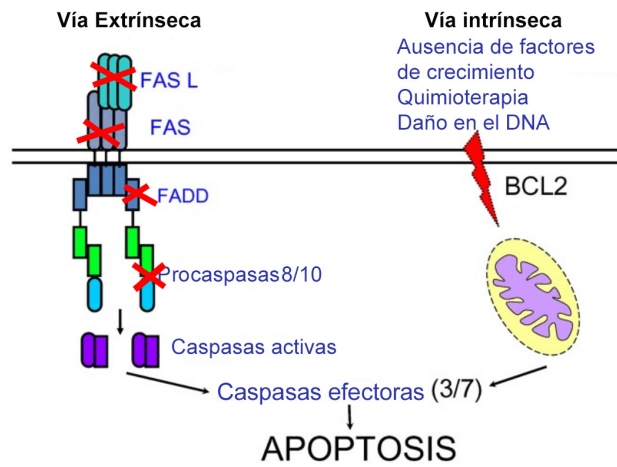


Figura 15. Diagrama esquemático de la vía de apoptosis extrínseca e intrínseca. Tomado de ¹⁶⁸.

II. OBJETIVOS GENERALES

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) comprenden un grupo de trastornos genéticos asociados con una mayor susceptibilidad a infecciones y, en ciertos casos, una mayor incidencia de malignidad. Pese a que la respuesta inmunológica frente a virus y tumores mediada por células citotóxicas en individuos inmunocompetentes es bien conocida, en pacientes con mutaciones puntuales en genes relacionados con el sistema inmunológico todavía no se conocen muchos de los mecanismos que generan inmunodeficiencia así como las implicaciones y consecuencias que tienen sobre el sistema inmunológico. El objetivo global de ésta Tesis es el estudio fenotípico, funcional y molecular de inmunodeficiencias con defectos de citotoxicidad y predisposición a infecciones virales y tumores.

1. Identificar molecularmente el defecto genético causante de inmunodeficiencia en pacientes con susceptibilidad a infecciones víricas y predisposición a padecer tumores mediante secuenciación directa o técnicas de secuenciación masiva de ADN.
2. Estudiar cómo y en qué medida afecta la alteración molecular en los genes causantes de inmunodeficiencia a la expresión génica y proteica de los mismos.
3. Evaluar la implicación del defecto molecular en el desarrollo, maduración, actividad, reconocimiento celular y senescencia de los linfocitos T CD8+ citotóxicos y Natural Killer (NK) mediante el análisis de marcadores de superficie e intracitoplasmáticos.

4. Analizar la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ mediante el estudio de degranulación y citotoxicidad sobre dianas celulares específicas ó mediante el estudio de muerte celular inducida tras activación (AICD).

5. Estudiar la actividad citotóxica de los linfocitos NK mediante el análisis de la degranulación y citotoxicidad sobre dianas tumorales específicas o mediante citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC).

6. Evaluar la correlación entre genotipo/fenotipo. Las diferencias en el fenotipo inmunológico contribuyen en la identificación y agrupación de pacientes con grados de afectación clínica diferente pese a que el defecto molecular sea compartido, esto puede ayudar a tomar decisiones clínicas y terapéuticas acordes a cada grupo de pacientes.

7. Estudiar el efecto de las terapias farmacológicas sobre la función citotóxica y su correlación clínica.

III. PUBLICACIONES

CAPÍTULO I:

A case of partial dedicator of cytokines 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8 + and natural killer cell cytotoxicity.

Autores: Raquel Ruiz-García, Sara Lermo-Rojo, Luis Martínez-Lostao, Esther Mancebo, Sergio Mora-Díaz, Estela Paz-Artal, Jesús Ruiz-Contreras, Alberto Anel, Luis I. González-Granado, Luis M. Allende.

Journal of Allergy and Clinical Immunology 2014; 134(1):218-221.e7

DOI: 10.1016/j.jaci.2014.01.023

	Página
Objetivos:.....	68
Conclusiones:.....	69
Publicación:.....	71

El síndrome Hiper IgE (HIES) es una inmunodeficiencia primaria caracterizada por infecciones recurrentes que afectan predominantemente a piel y sistema respiratorio, eccema crónico, niveles elevados de IgE en suero y eosinofilia. Se han descrito tres genes implicados en su patogénesis con 2 patrones de herencia diferentes. El síndrome autosómico dominante (AD) causado por mutaciones en *STAT3* y el síndrome autosómico recesivo (AR) causado por mutaciones en *DOCK8*, *TYK2* y *PGM3*.

Los pacientes con HIES AR por mutaciones en *DOCK8* se caracterizan clínicamente por la predisposición a infecciones virales y fúngicas severas, infecciones sinopulmonares, alergias, dermatitis atópica severa y susceptibilidad a desarrollar cáncer. La deficiencia de *DOCK8* afecta tanto a la inmunidad innata como adaptativa y produce inmunodeficiencia combinada.

Objetivos:

1. Identificar molecularmente el defecto genético causante de inmunodeficiencia en un paciente con HIES con clínica no severa.
2. Estudiar cómo y en que medida afecta la alteración molecular en el gen *DOCK8* a la expresión génica y proteica del mismo.
3. Debido a que los pacientes con deficiencia de *DOCK8* padecen infecciones víricas y fúngicas recurrentes y son susceptibles a desarrollar cáncer, se estudia si la función y las características fenotípicas de los principales sistemas celulares implicados en la defensa frente a virus y tumores: las células T citotóxicas y los linfocitos NK.

4. Establecer correlación genotipo/fenotipo. Las diferencias en el fenotipo inmunológico contribuyen en la identificación y agrupación de pacientes con grados de afectación inmunológica variable y así poder tomar decisiones clínicas y terapéuticas acordes para cada tipo de paciente.

Conclusiones:

1. Se describe el primer caso de inmunodeficiencia primaria combinada por defecto parcial de la proteína DOCK8 en un paciente con HIES moderado en el que se identifican 2 mutaciones en heterocigosis no descritas previamente.
2. Las alteraciones moleculares en el gen *DOCK8* en éste paciente producen un defecto parcial debido a la presencia de transcritos normales ya que la mutación de splicing que afecta al exón 17 no altera por completo la expresión normal de éste alelo.
3. Los linfocitos T citotóxicos y NK no son capaces de ejercer citotoxicidad de manera efectiva sobre las células diana específicas. Además los linfocitos T CD4 de memoria se encuentran elevados respecto a controles sanos y son más susceptibles de morir por apoptosis y muerte celular inducida tras activación, lo que puede explicar la linfopenia CD4+ en sangre periférica. El paciente presenta un repertorio periférico de linfocitos T ligeramente sesgado. Los linfocitos NK con capacidad citotóxica están ligeramente disminuidos respecto a controles sanos.
4. Al contrario que los pacientes con defecto total de *DOCK8*, el paciente presenta un fenotipo T CD8 conservado y sin expresión de marcadores relacionados con

células exhaustas. El defecto parcial correlaciona con la clínica más leve que presenta el paciente en comparación con los pacientes que tienen defecto total de DOCK8. La identificación del defecto molecular y la evaluación de la afectación inmunológica del paciente ha ayudado al manejo clínico y terapéutico del mismo.

^dthe Department of Pediatrics, King Abdulaziz Medical City, Jeddah, Saudi Arabia; ^ethe Department of Medicine, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom; and ^fthe Molecular Immunology Unit, Institute of Child Health, University College London, London, United Kingdom. E-mail: siobhan.burns@ucl.ac.uk. Or: sn262@cam.ac.uk.

*These authors contributed equally to this work.

This work was supported by the Higher Education Funding Council for England (to S.O.B.), The Wellcome Trust (grant no. 095198/Z/10/Z to S.N. and grant no. 090233/Z/09/Z to A.J.T.), The European Research Council (Starting grant 260477 to S.N.), the European Union (FP7 collaborative grant 261441 PEVNET project to S.N.), the National Institute for Health Research Cambridge Biomedical Research Centre (to S.N. and R.D.), Great Ormond Street Hospital Children's Charity (to H.B.G. and F.H.), the National Institute for Health Research Great Ormond Street Hospital Biomedical Research Centre (to K.C.G.), and the National Institute for Health Research University College London Hospitals Biomedical Research Centre (to S.O.B.).

Disclosure of potential conflict of interest: S. O. Burns has received research support from the Higher Education Funding Council for England and the National Institute for Health Research University College London Hospitals Biomedical Research Centre. A. M. Jones has received an honorarium from CSL-Behring for a lecture on subcutaneous immunoglobulin therapy and has received travel support from CSL-Behring for the 2013 AAAAI meeting. S. Nejentsev has received research support from the Wellcome Trust, the European Research Council, and the National Institute for Health Research. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

REFERENCES

- Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol* 2011;12:695-708.
- Doffinger R, Smahi A, Bessia C, Geissmann F, Feinberg J, Durandy A, et al. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat Genet* 2001;27:277-85.
- Filipe-Santos O, Bustamante J, Haverkamp MH, Vinolo E, Ku CL, Puel A, et al. X-linked susceptibility to mycobacteria is caused by mutations in NEMO impairing CD40-dependent IL-12 production. *J Exp Med* 2006;203:1745-59.
- Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, Doffinger R, Cancrini C, Bonnet M, et al. A hypermorphic IkappaBalpha mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J Clin Invest* 2003;112:1108-15.
- Picard C, Casanova JL, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IkappaBalpha deficiency. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:490-7.
- Lahtela J, Nousiainen HO, Stefanovic V, Tallila J, Viskari H, Karikoski R, et al. Mutant CHUK and severe fetal encasement malformation. *N Engl J Med* 2010;363:1631-7.
- Alangari AA, Al-Zamil F, Al-Mazrou A, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Awadallah S, et al. Treatment of disseminated mycobacterial infection with high-dose IFN-gamma in a patient with IL-12Rbeta1 deficiency. *Clin Dev Immunol* 2011;2011:691956.
- Pannicke U, Baumann B, Fuchs S, Rensing-Ehl K, Holzmann K, Henneke P, et al. A novel SCID due to an IKKBK defect. *J Clin Immunol* 2012;32:S381-2.
- Li Q, Van AD, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science* 1999;284:321-5.
- Tanaka M, Fuentes ME, Yamaguchi K, Durnin MH, Dalrymple SA, Hardy KL, et al. Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity* 1999;10:421-9.
- Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, et al. The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* 1999;189:1839-45.
- Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV. IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 1997;278:866-9.
- Samaniego S, Marcu KB. IKKbeta in myeloid cells controls the host response to lethal and sublethal Francisella tularensis LVS infection. *PLoS One* 2013;8:e54124.
- Pasparakis M, Courtois G, Hafner M, Schmidt-Supprian M, Nenci A, Toksoy A, et al. TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 2002;417:861-6.
- Pasparakis M. Role of NF-kappaB in epithelial biology. *Immunol Rev* 2012;246:346-58.

Available online March 27, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1093>

A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8⁺ and natural killer cell cytotoxicity

To the Editor:

Hyper-IgE syndrome (HIES) is a primary immunodeficiency characterized by recurrent infections predominantly involving the skin and lungs, chronic eczema, high serum IgE levels, and eosinophilia. HIES has diverse modes of inheritance. Autosomal-dominant HIES (Mendelian Inheritance in Man [MIM] no. 147060) is caused by mutations in the signal transducer and activator of transcription 3 gene. Most cases of autosomal-recessive HIES are caused by mutations in the gene encoding the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) (MIM no. 243700). DOCK8 deficiency is characterized clinically by recurrent viral, fungal, and sinopulmonary infections.¹⁻⁴ These patients also have severe atopic dermatitis, allergies, and an increased likelihood of developing cancer. DOCK8 deficiency affects both innate and adaptive immunity and causes combined immunodeficiency.

We present a patient who fulfilled clinical and immunological parameters for HIES (see the Case report section in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Mutations in the signal transducer and activator of transcription 3 gene were ruled out. At this stage, a DOCK8 deficiency was suspected. Using comparative genome hybridization, a heterozygous deletion of exons 2 to 8 was identified in the *DOCK8* gene (see Fig E1, A, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Sequence analysis also demonstrated a heterozygous G > A mutation at position +5 in the 5' splice donor site of intron 17 (IVS17+5 G>A) deleting the exon 17 (Genbank KC736820). This alteration corresponded to a deletion in the conserved DHR1 domain of the protein (Fig E1, B and C) and was absent in 50 healthy donors. Some normal *DOCK8* transcripts were present, indicating that the exon 17 splicing mutation did not abrogate normal processing of this allele (Fig E1, D). *DOCK8* transcript expression was lower in the patient than in controls in PBMCs, as well as CD4⁺ and natural killer (NK) cells (Fig E1, E); however, the DOCK8 protein was clearly detected in the patient by Western blot, albeit at reduced levels. On the basis of these findings, we conclude that this is a new case of partial DOCK8 deficiency (Fig E1, F).

Abnormalities in the T-cell compartment have been described in classical DOCK8 deficiency,²⁻⁴ and we decided to assess the impact of a partial DOCK8 deficiency on T-cell phenotype and function. Our patient showed defective thymopoiesis with an absence of T-cell receptor rearrangement excision circles, reduced recent thymic emigrants, a restricted T-cell repertoire, and decreased naive CD4⁺ T cells in PBMCs (Table I; see Fig E2, A, B, and C, and Fig E3, A, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Furthermore, there was an increase in plasma levels of IL-7 (Table I), which could reflect a compensatory attempt to boost the expansion of recent thymic emigrants cells to overcome the depletion of peripheral CD4⁺ T cells. Interestingly, in spite of naive CD4⁺ T-cell lymphopenia, the patient's T-cell proliferation was unaffected and similar to that in controls (Fig E3, B). This could be related to the nonexhausted phenotype showed by the patient, with normal levels of T-effector memory CD45RA (TEMRA) CD8⁺ T cells (Fig E3, A), in contrast to classical loss-of-function/expression of DOCK8 in patients

TABLE I. Immunologic features of the patient

Parameter	Normal range	Patient
Lymphocyte count (no./ μ L) and phenotype (%)	1200-3000	888*
T cells		
CD3 ⁺ (μ L)	850-2250	603*
CD4 ⁺ (μ L)	500-1450	375*
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ (naive) (%)	25-72	15*
CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ^{+/-} (memory) (%)	28-68	82*
CD8 ⁺ (μ L)	160-950	208
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺ (naive) (%)	28-61	35
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁺ (central memory) (%)	1-10	19*
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻ (effector memory) (%)	5-36	23
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻ (TEMRA) (%)	15-45	18
Activated T cells		
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (%)	0-10	14*
CD4 ⁺ CD45RO ⁺ HLA-DR ⁺ (%)	3-10	19*
CD8 ⁺ CD45RO ⁺ HLA-DR ⁺ (%)	5-14	6
NK cells		
CD3 ⁻ CD56 ⁺ (μ L)	60-500	54*
iNKT Cells CD3 ⁺ CD56 ⁺ V β 11 ⁺ V α 24 (%)	0.01-1.80	0.0*
B cells		
CD19 ⁺ (μ L)	100-500	194
CD19 ⁺ CD27 ⁺ (%)	12-35	8*
CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁻ (naive) (%)	57-84	88*
CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ (marginal) (%)	4-12	3*
CD19 ⁺ IgD ⁻ CD27 ⁺ (switched) (%)	7-25	5*
T-cell proliferation (cpm)		
PHA	>50,000	102,864
Anti-CD3	>9,000	30,212
Anti-CD3+Anti-CD28	>80,000	151,548
Serum immunoglobulins		
IgG ⁺ (mg/dL)	700-1600	1130
IgA (mg/dL)	70-400	490*
IgM (mg/dL)	40-230	11*
IgE (IU/mL)	5-165	86
Specific antibodies		
IgG vs <i>Haemophilus</i> (mg/dL)	>4 \times prevalue	Absent*
IgG vs <i>Pneumococcus</i> (mg/dL)	>5.40	2.93*
IgG2 vs <i>Pneumococcus</i> (mg/dL)	>2.14	2.0*
IgG vs tetanus toxoid (IU/mL)	>0.15	2.1
Serum IL-7 (pg/mL)	0.66-9.24	26*
TRECs (/ug DNA)	3806	<40*
IL-17 \ddagger (pg/mL)	200-700	413
Eosinophils (\times 1000 μ L)	0.0-0.5	0.2

IGIV, Intravenous immunoglobulin; TREC, T-cell receptor rearrangement excision circle.

*Altered values in the patient.

\dagger IVIG replacement therapy.

\ddagger IL-17 levels in supernatants from PBMCs cultured 5 d with anti-CD3+anti-CD28.

presenting an exhausted phenotype with high levels of TEMRA CD8⁺ T cells impairing lymphocyte proliferation. The exhausted phenotype could be associated with replicative senescence resulting from continuous antigen stimulation as seen in repeated viral infections.⁴

CD8⁺ T-cell subsets were further assessed for the expression of several molecules that change during differentiation from naive to effector cells.^{5,6} The patient's CD8⁺ T cells showed dysregulated expression of some of these markers. CD28, CD127, and CD27 expression on TEMRA CD8⁺ T cells was higher than that seen in normal controls ($P < .01$). In contrast, these molecules were

expressed at lower levels in classical DOCK8 patients than in normal controls⁴ (Fig 1, A). Furthermore, the percentage of cells expressing CD57 and cytoplasmic perforin in CD8⁺ and in TEMRA CD8⁺ T-cells subset was much lower than in other classical DOCK8 patients⁴ and even lower than that in controls ($P < .05$) (Fig 1, B and C). That is, our patient's TEMRA CD8⁺ T cells showed an abnormal effector phenotype. In addition, the levels of antiviral cytokines (IFN- γ and TNF- α) produced by his PBMCs were also comparable with those of controls (data not shown). The increase in activated memory CD4⁺ T cells in the patient (Table I) suggested that these cells could be more sensitive to activation-induced cell death. In fact, his CD4⁺ and CD8⁺ T cells were more sensitive to Fas-induced apoptosis. Concomitant stimulation with PHA also induced more cell death (see Fig E4, A, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Interestingly, the patient's CD95 expression in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells was higher than levels seen in the controls (Fig E4, B). The differences in CD95 expression mainly affected naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells (mean \pm SD, 42.8 \pm 14.1 vs 10.2 \pm 5.1 in controls, $P = .03$, and 48.9 \pm 23.5 vs 5.8 \pm 5.6 in controls, $P = .02$, respectively) (Fig E4, C). These differences were much greater for all markers tested after anti-CD3 stimulation (Fig E4, B). The higher apoptosis and elevated expression of activated markers could reflect a phenotype with sustained activation, in which naive cells also exhibit features of early activation. Functionally, the degranulation of the patient's CD8⁺ T cells using R69 target cells and anti-CD3 mAb was lower with respect to controls, but these differences were not statistically significant. In addition, patient's CD8⁺ T cells were significantly less effective at killing R69 target cells than those from controls contrasting with the intact cytotoxicity in classical DOCK8 patients³ (Fig 1, D).

NK cells from DOCK8 patients did not polarize their lytic machinery because of impaired synaptic F-actin accumulation at the NK cell synapse, which is essential for cytotoxicity.⁷ In this case, NK lymphocytes have been gradually declining over the life of the patient (data not shown). Furthermore, there is an imbalance between CD56dimCD16^{+/-}CD3⁻ (cytotoxic function) and CD56bright CD16^{+/-}CD3⁻ (regulatory function) in the patient's NK subsets compared with controls (see Fig E5, A, in this article's Online Repository at www.jacionline.org). We also performed phenotypic characterization of NK cells, and, specifically, surface CD16 and cytoplasmic perforin expression were significantly lower in his NK cells than in those of controls (see Table E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org; also see Fig E5, B). Overall, stimulation of NK cells with K562 cells resulted in NK-cell activation characterized by the upregulation of CD16, CD25, and CD69. The patient's NK cells showed lower mean fluorescence intensity for CD16 and CD69 than did controls' NK cells (Fig E5, B). Furthermore, his NK degranulation and cytotoxicity were significantly lower than in controls (Fig E5, C and D), in agreement with a recent report.⁷

In summary, we describe a new case of partial DOCK8 deficiency that presents a nonexhausted phenotype of CD8⁺ T cells likely due to a milder clinical phenotype without life-threatening infections. The altered effector phenotype and impaired CD8 and NK cytotoxicity in this patient are probably related to the essential role of DOCK8 in the regulation of actin dynamics and formation of the immunological synapse, which is required for T-cell activation and acquisition of

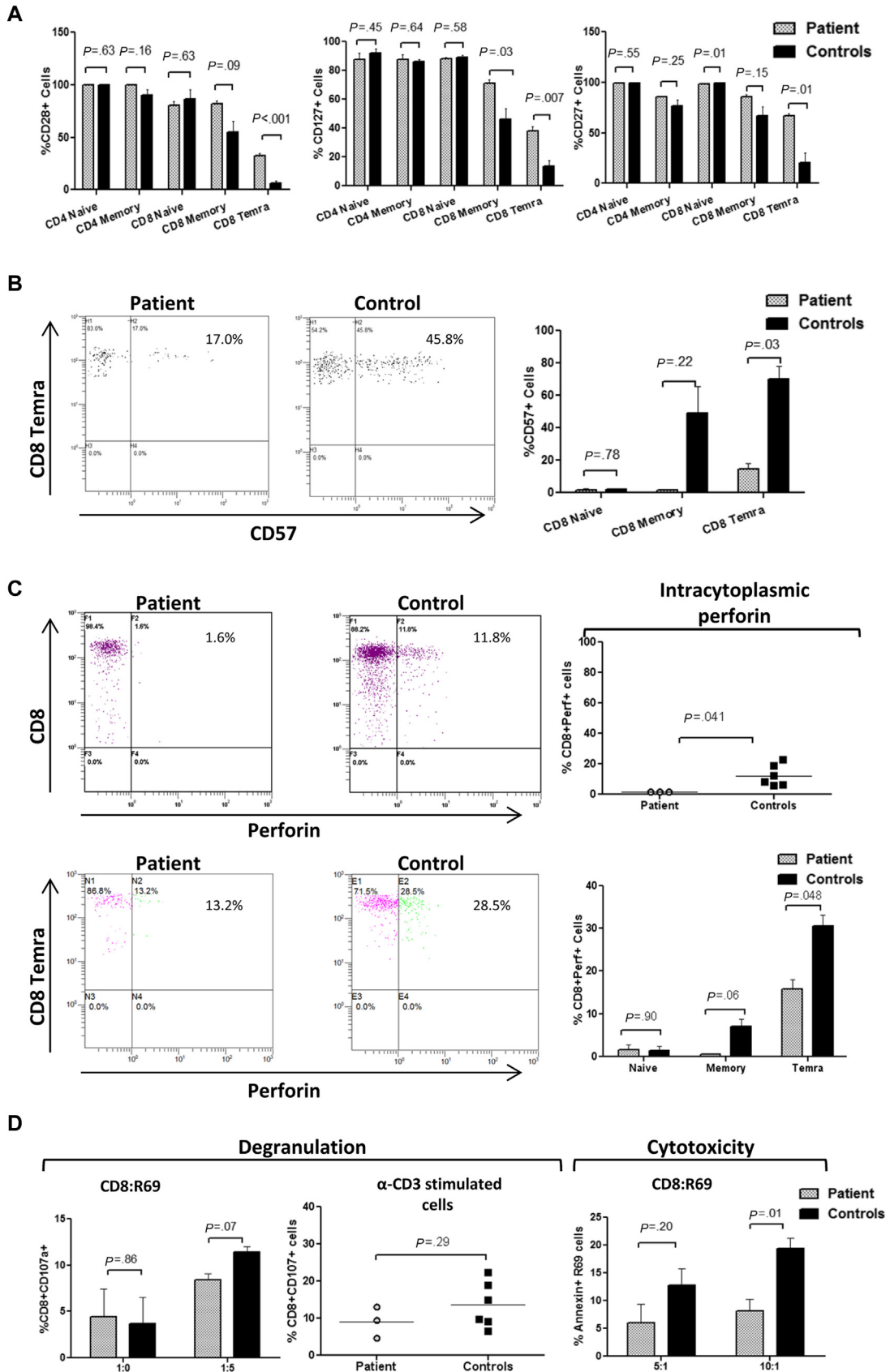


FIG 1. CD4⁺ and CD8⁺ phenotype and functional assays. **A**, Expression of CD28, CD127, and CD27 molecules on CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets (mean \pm SD of 2 independent experiments). **B** and **C**, Dot plots

effector functions.^{7,8} In contrast, there are other DOCK8 deficiencies defined as profound combined immunodeficiency by the classical loss-of-function/expression of DOCK8 that present an exhausted T-cell phenotype with increased susceptibility to viral infections and a compromised immunosurveillance. Overall, it would be advisable to study DOCK8 patients in depth characterizing the protein expression, phenotype, and immune functions to be able to establish genotype-phenotype correlations.

We thank Professor José Ramón Regueiro for critical reading of the article, Maite Fernández for her care of the patient, and Míguela Menchén and María José Díaz-Madroñero for their technical assistance.

Raquel Ruiz-García, BS^a
Sara Lermo-Rojo, BS^a
Luis Martínez-Lostao, MD, PhD^b
Esther Mancebo, PhD^{a,c}
Sergio Mora-Díaz, BS^a
Estela Paz-Artal, MD, PhD^{a,c}
Jesús Ruiz-Contreras, MD, PhD^{c,d}
Alberto Anel, PhD^b
Luis I. González-Granado, MD^{c,d}
Luis M. Allende, PhD^{a,c}

From ^aServicio de Inmunología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ^bDepartamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain; ^cInstituto de Investigación I+12, Madrid, Spain; and ^dUnidad de Inmunodeficiencias, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain. E-mail: lallende.hdoc@salud.madrid.org.

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (grant no. P111/1591 to L.M.A.) and Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (grant no. SAF2010-15341 to A.A.).

Disclosure of potential conflict of interest: L. Allende has received research support from Fondo de Investigaciones Sanitarias. A. Anel has received research support from the Ministerio de Economía y Competitividad. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

REFERENCES

1. Renner ED, Puck JM, Holland SM, Schmitt M, Weiss M, Frosch M, et al. Autosomal recessive hyperimmunoglobulin E syndrome: a distinct disease entity. *J Pediatr* 2004;144:93-9.
2. Engelhardt KR, McGhee S, Winkler S, Sassi A, Woelner C, Lopez-Herrera G, et al. Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1289-302.
3. Zhang Q, Davis JC, Lamborn IT, Freeman AF, Jing H, Favreau AJ, et al. Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations. *N Engl J Med* 2009;361:2046-55.
4. Randall KL, Chan SS, Ma CS, Fung I, Mei Y, Yabas M, et al. DOCK8 deficiency impairs CD8 T cell survival and function in humans and mice. *J Exp Med* 2011; 208:2305-20.
5. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood* 2003;101:2711-20.
6. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* 2008;73: 975-83.

7. Mizesko MC, Banerjee PP, Monaco-Shawver L, Mace EM, Bernal WE, Sawalle-Belohradsky J, et al. Defective actin accumulation impairs human natural killer cell function in patients with dedicator of cytokinesis 8 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:840-8.
8. Ham H, Guerrier S, Kim J, Schoon RA, Anderson EL, Hamann MJ, et al. Dedicator of cytokinesis 8 interacts with talin and Wiskott-Aldrich syndrome protein to regulate NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 2013;190:3661-9.
9. Bernardo I, Mancebo E, Aguiló I, Anel A, Allende LM, Guerra-Vales JM, et al. Phenotypic and functional evaluation of CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T cells in human CD8 immunodeficiency. *Haematologica* 2011;96:1195-203.

Available online March 14, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.01.023>

Flow cytometry diagnosis of dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) deficiency

To the Editor:

Biallelic mutations in the dedicator of cytokinesis 8 (*DOCK8*) gene cause autosomal-recessive hyper-IgE syndrome, a combined immunodeficiency characterized by sinopulmonary infections, skin and systemic viral infections, eczema, and food allergy. *DOCK8* deficiency can lead to early death from infection and malignancy.^{1,2} The disease is curable by hematopoietic cell transplantation (HCT).³⁻⁵ Thus, it is important to ascertain the diagnosis of *DOCK8* deficiency to institute early treatment.

The vast majority of *DOCK8*-deficient patients lack *DOCK8* expression and many have deletions in the *DOCK8* gene.^{1,2} Confirmation of the diagnosis has relied on immunoblotting of blood cell lysates and/or gene sequencing, techniques that are not routinely available. We present here a flow cytometry assay that could facilitate the diagnosis of *DOCK8* deficiency, detection of carrier status, and investigation of lineage-specific *DOCK8* expression following HCT.

The pedigrees of patients studied are shown in [Fig E1](#) and their mutations in [Table E1](#) (see Online Repository at www.jacionline.org). All studies were obtained after informed consent and approval of the Boston Children's Hospital Institutional Review Board. Intracellular staining for *DOCK8* was performed on mononuclear cells from peripheral blood or bone marrow (BM) using the CytoFix/CytoPerm kit (BD Biosciences, San Jose, Calif), mouse monoclonal anti-*DOCK8* (clone G-2, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tex, raised against amino acids 119-277), mouse IgG₁ isotype control (Biolegend, San Diego, Calif), and fluorescein isothiocyanate-conjugated rat anti-mouse IgG₁ (Biolegend). Expression was calculated as the difference in mean fluorescence intensity (Δ MFI) between cells stained with anti-*DOCK8* antibody and isotype control; the results were analyzed as a percentage of Δ MFI of healthy control assayed on the same day or in aggregate compared with the average of all healthy controls (see the [Methods](#) section in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

Expression of *DOCK8* could be detected by flow cytometry in subsets of normal peripheral blood and in CD34⁺ BM cells ([Fig 1](#), A). *DOCK8* could not be detected by flow cytometry in T cells,

of CD57 and perforin expression on TEMRA CD8⁺ T-cell subset. Columns show the expression of CD57 and perforin in naive, memory, and TEMRA CD8⁺ T cells (mean \pm SD of 2 independent experiments). **D**, Degranulation of CD8⁺ T cells: CD107a surface expression in CD8⁺ T cells after 6 hours of incubation in the presence (ratio 1:5) (E:T) or absence (ratio 1:0) of R69 target cells. Furthermore, PBMCs were stimulated with anti-CD3 mAb for 2 hours and degranulation was evaluated as indicated above. Cytotoxicity of CD8⁺ T cells: the results represented the percentage of R69 cells positive for annexinV-FITC staining, as described by Bernardo et al.⁹ Columns show the mean \pm SD of 2 independent experiments. Statistical comparisons were performed with unpaired Student *t* tests, with significance defined as a *P* < .05. FITC, Fluorescein isothiocyanate.

CASE REPORT

The child of nonconsanguineous parents, he was a healthy, full-term infant. During his first year of life, he was diagnosed with bronchial asthma and atopic dermatitis. At 4 years, he had severe varicella and was later diagnosed with egg allergy. Since then, he has had several episodes of pneumonia, which led to bilateral bronchiectasis and mild-to-moderate obstructive lung disease. He has also had recurrent acute otitis media and mild *Molluscum contagiosum* around the penis. At 8 years, multiple and confluent flat warts appeared on his upper chest, shoulders, and groin. Intravenous immunoglobulin therapy was begun at age 9 years, which

seemed to reduce the incidence of sinopulmonary infections. Currently aged 20 years, he also has a history of *Candida albicans* infection, recurrent angular cheilitis, chronic onychomycosis, and epidermodysplasia verruciformis. Immunologic assessment revealed moderate lymphopenia with decreases in CD4⁺ (mean \pm SD, 365 \pm 118/uL since 7 years old), NK and switched memory B-cell levels. IgG and IgM were persistently low and IgA high. Immunization with *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* induced low levels of antibodies and no response, respectively (Table I).

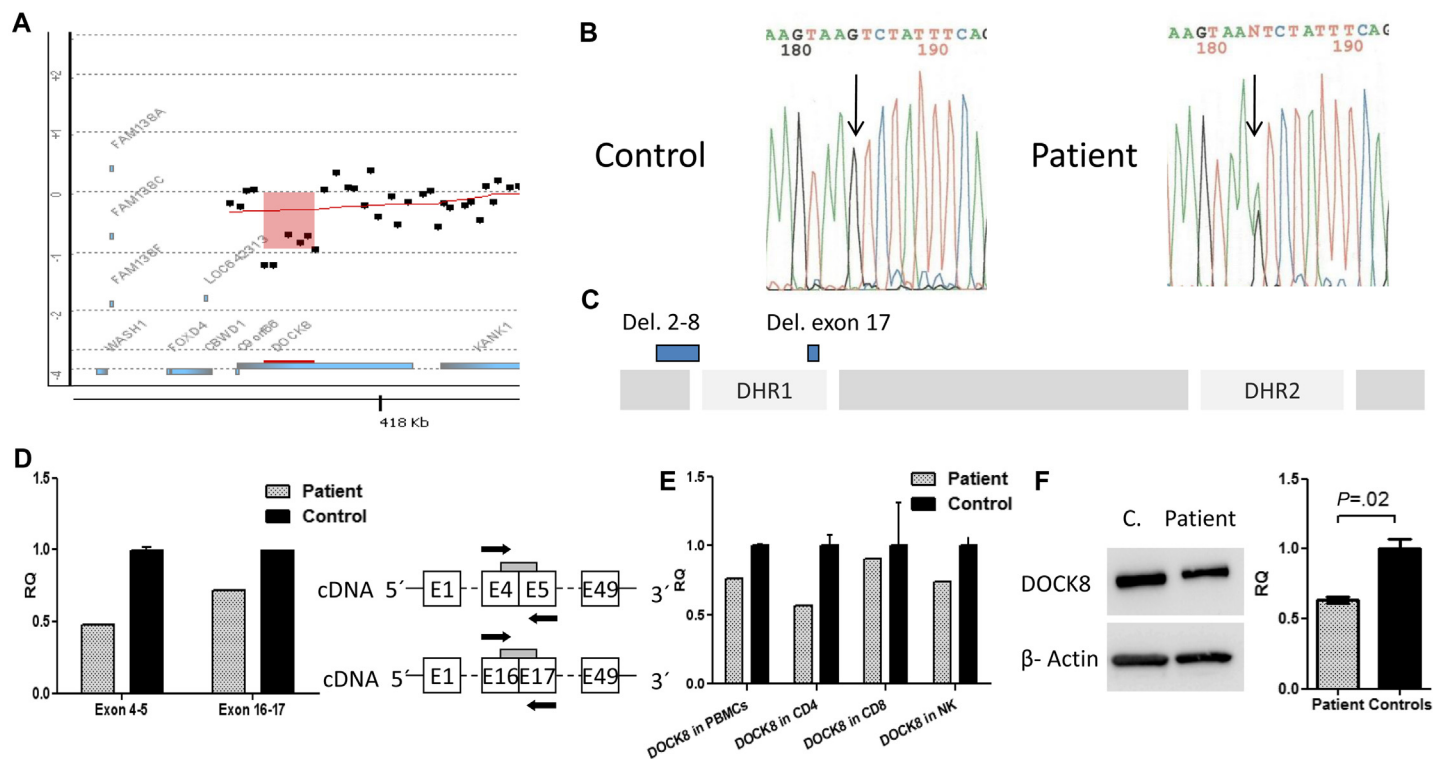


FIG E1. Molecular analyses in *DOCK8* patient. **A**, CGH array showed copy number abnormalities consistent with heterozygous subtelomeric deletion of 9p (red square) spanning exons 2 to 8. **B**, DNA sequencing detected a heterozygous mutation (IVS17+5 G>A) in *DOCK8* gene of the patient. **C**, Schematic diagram of the *DOCK8* protein and the location of patient's mutations. **D**, *DOCK8* transcript levels from the patient's PBMCs relative to healthy controls. Quantitative RT-PCR was used with exonic primers and a specific probe. When specific primers for the amplification of exons 4 and 5 (representative of exons 2-8 deletion allele in the patient) were used, controls were found to have 2 copies (RQ = 1) and the patient only 1 (RQ = 0.5) corresponding to the allele with the exon 17 deletion. When specific primers for the amplification of exons 16 and 17 (representative of exon 17 deletion allele in the patient) were used, controls also presented 2 copies (RQ = 1), while the patient presented more than 1 (RQ = 0.7), corresponding to the allele with exons 2 to 8 deletion (RQ = 0.5) and some normally spliced transcripts of the exon 17 allele (RQ = 0.2). *GAPDH* was used as the endogenous gene control. Data from 1 experiment using 3 healthy donors. **E**, Patient *DOCK8* gene expression levels in PBMCs, CD4⁺, CD8⁺, and NK cells are shown as relative expression with respect to that in normal cells, which is normalized to 1. Data from 1 experiment using 3 healthy donors. **F**, Partial *DOCK8* expression in the patient's PBMCs. Western blot of *DOCK8* and β -actin protein expression from a healthy control and the patient. Densitometric analysis of relative *DOCK8* expression (*DOCK8*/ β -actin) \pm SD in 2 independent experiments is shown. Statistical analysis was performed with unpaired Student *t* tests, with significance defined as *P* < .05. Zhang et al³ presented other case of partial *DOCK8* expression among the 11 cases they described. *DHR1*, *DOCK* homology region 1; *DHR2*, *DOCK* homology region 2; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

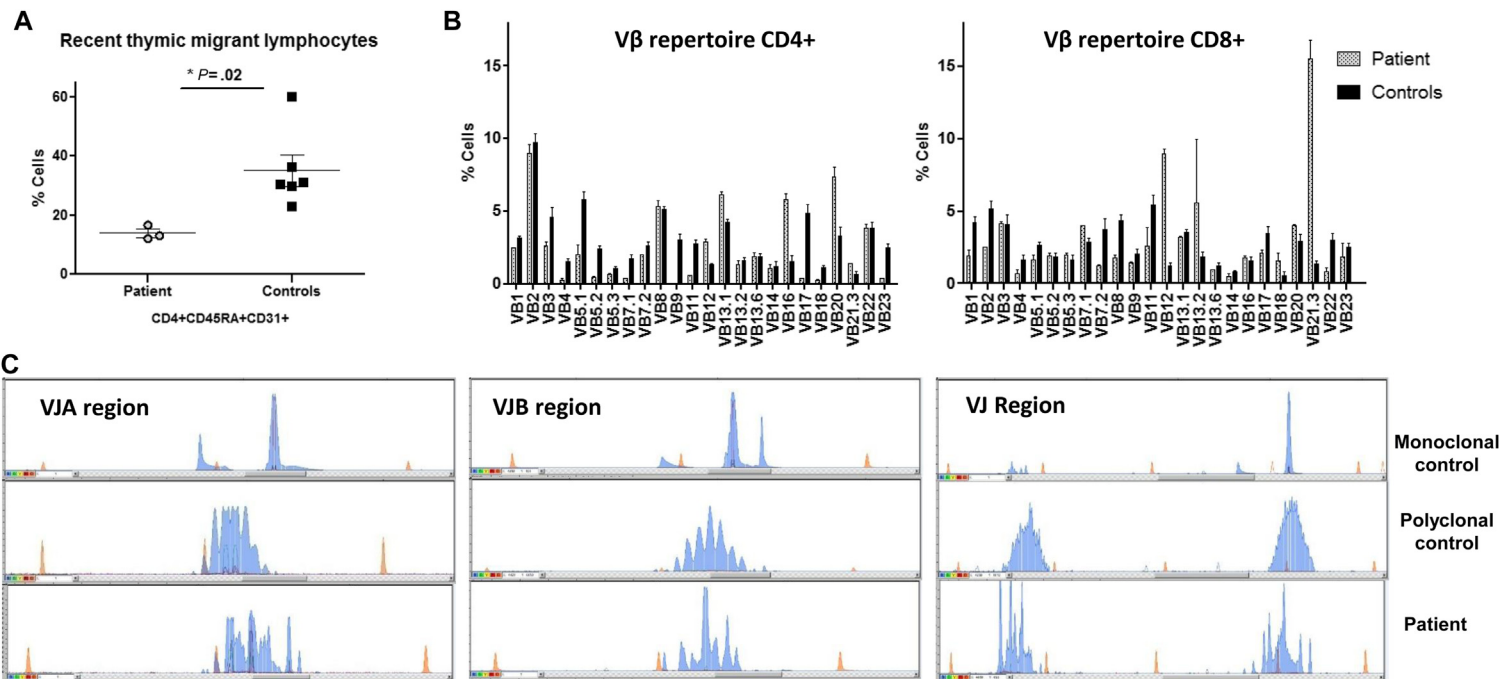


FIG E2. Thymic function. **A**, Recent thymic emigrant lymphocytes measured as $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$ in the patient (*circles*) and in 6 age-matched controls (*squares*). Statistical analysis was performed with unpaired Student *t* tests, with significance defined as $P < .05$. **B**, TCR β repertoire was determined by flow cytometry in gated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells from PBMCs of the patient (tested twice) and in 10 age-matched controls. **C**, Genomic *TCR V β J β* rearrangements were amplified in the patient using 2 different primer sets (VBJB-A and VBJB-B) and compared with a normal (polyclonal) control and 2 tumor T-cell lines (monoclonal Jurkat or MOLT3) in the 240 to 280 bp range. Control T lymphocytes were polyclonal and thus showed a Gaussian fragment distribution (polyclonal control in the figure). T lymphoid tumors such as Jurkat or MOLT3 are monoclonal and thus yield a single major peak (monoclonal control in the figure). The results for the DOCK8 patient showed few peaks and did not follow a Gaussian distribution.

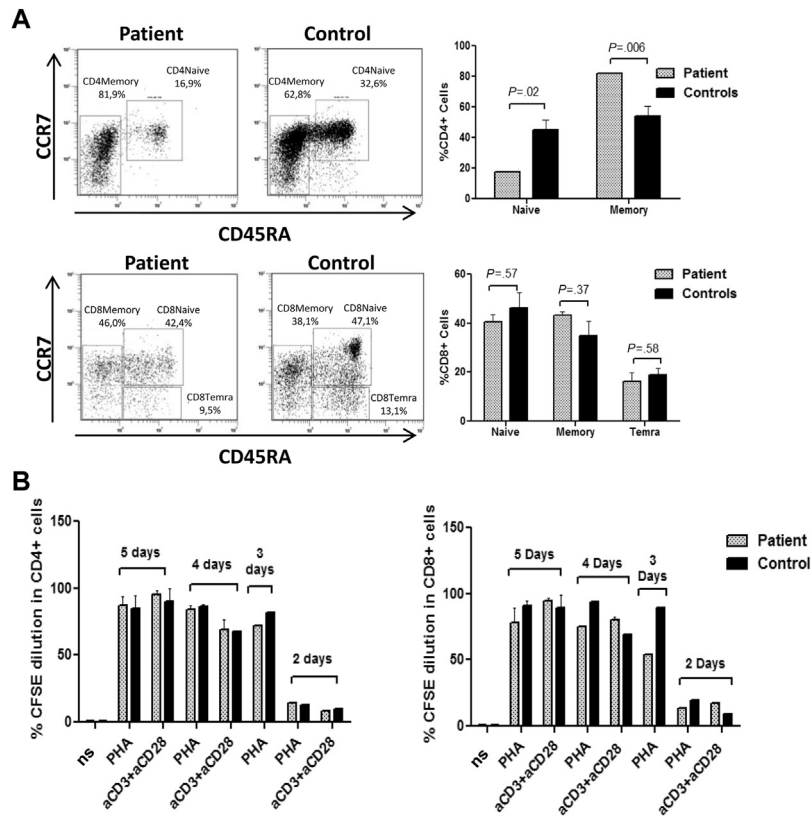


FIG E3. T-cell phenotype and function. **A**, Representative dot plots of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets (mean ± SD of 4 independent experiments). **B**, Lymphoproliferative capacity. PBMCs from the patient and controls were labeled with CFSE and were either nonstimulated (*ns*) or stimulated with PHA or anti-CD3 + anti-CD28 mAb. After 2, 3, 4, and 5 days of incubation, the percentage of CFSE dilution was depicted in gated CD4⁺ and CD8⁺ T cells (tested once for 2 and 3 days and twice for 4 and 5 days of stimulation). *CFSE*, Carboxyfluorescein succinimidyl ester.

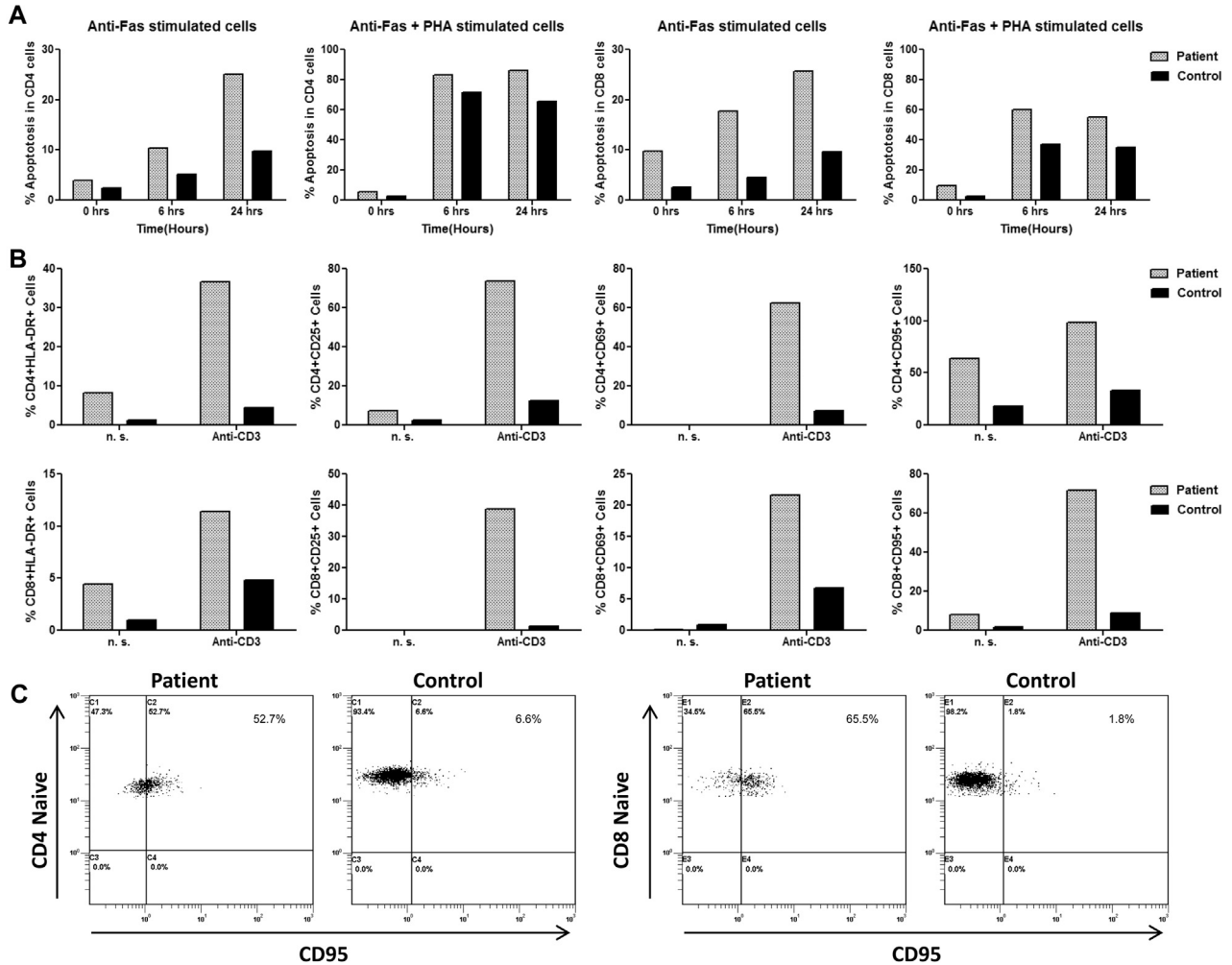


FIG E4. Higher expression of CD95 (Fas) correlated with higher sensitivity to Fas-induced apoptosis. **A**, PBMCs were either untreated (0 hour) or treated with agonist anti-Fas mAb alone or with anti-Fas mAb plus PHA, as indicated, for 6 or 24 hours. The percentage of apoptotic cells was measured by annexin V labeling in gated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **B**, PBMCs were not stimulated (*ns*) or stimulated with immobilized anti-CD3 mAb (clone UCHT1) (anti-CD3) for 24 hours. The expression of several activation surface markers, including CD95, was assessed in gated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **C**, Expression of CD95 in CD4⁺ and CD8⁺ naive T-cell subset. The results shown in this figure are from 1 of 2 experiments performed.

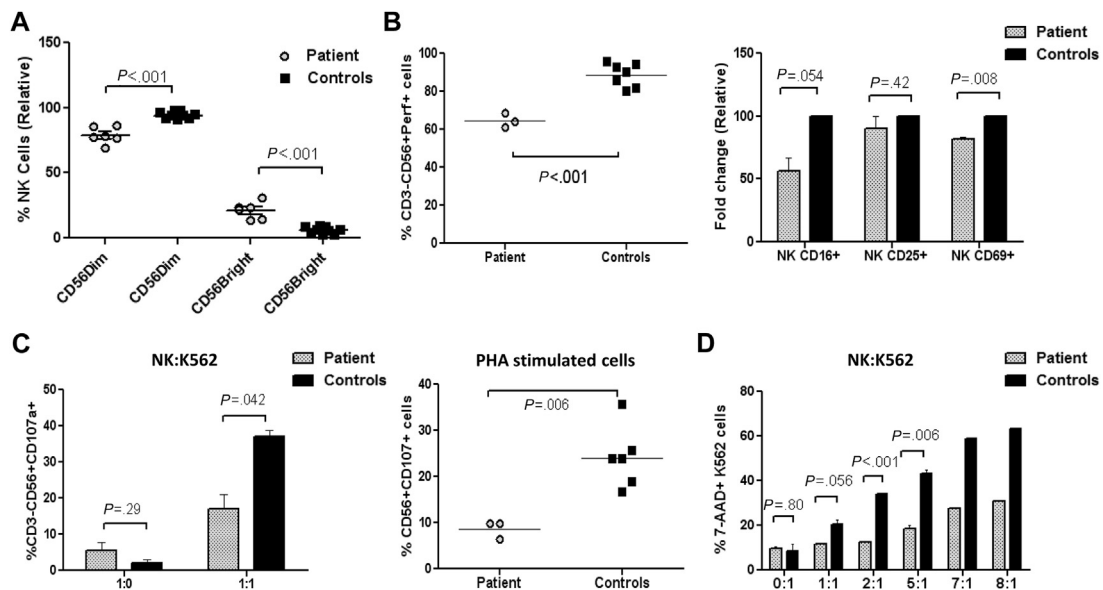


FIG E5. NK phenotype and functional assays. **A**, Relative differences between NK-cell subsets of the patient compared with healthy controls. **B**, Percentage of cells expressing perforin in NK cells (*left panel*). NK cells were stimulated overnight with K562 cells (or without K562) and mean fluorescence intensity for CD16, CD25, and CD69 expression was calculated. The columns represent fold change in the patient relative to the control. Data are representative of 2 independent experiments (*right panel*). **C**, Degranulation of NK cells: CD107a surface expression in NK cells after 6 hours of incubation in the presence (ratio 1:1) (E:T) or absence (ratio 1:0) of K562 target cells. Columns show the mean \pm SD of 2 independent experiments. Furthermore, PBMCs were stimulated with PHA for 2 hours and degranulation was evaluated as indicated above. **D**, Cytotoxicity of NK cells: the results show the percentage of K562 cells incorporating 7-AAD (mean \pm SD of 2 independent experiments, ratios 7:1 and 8:1 were only tested once). Statistical comparisons were performed with unpaired Student *t* tests, with significance defined as $P < .05$.

TABLE E1. Expression of NK markers in the DOCK8 patient and healthy controls

	Patient	Controls	P value
CD16	74.1 ± 2.5	93.4 ± 0.4	.008
CD25	1 ± 0.9	1.3 ± 0.8	NS
CD69	8.9 ± 4.5	14.8 ± 15.8	NS
DNAM-1	94.8 ± 1.1	96.0 ± 3.7	NS
CD11b	99.0 ± 0.4	99.8 ± 0.1	NS
NKp44	8.6 ± 3.4	2.4 ± 0.5	NS
NKG2D	96.7*	99.1 ± 0.21	—
NKp46	95.8 ± 2.6	97.2 ± 2.4	NS
NKp30	92.8 ± 4.2	95.7 ± 2.6	NS

Data are expressed as mean ± SD and represent the percentage of NK cells staining positive for each molecule. All tests were repeated twice unless indicated otherwise.

NS, Not significant.

*Tested only once.

CAPÍTULO II:

Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation.

Raquel Ruiz-García, Sergio Mora, Gema Lozano-Sánchez, Luis Martínez-Lostao, Estela Paz-Artal, Jesús Ruiz-Contreras, Alberto Anel, Luis Ignacio Gonzalez-Granado, David Moreno-Perez, Luis M. Allende.

***Pediatric Research* 2015; 78 (6): 603-608**

DOI: 10.1038/pr.2015.170

	Página
Objetivos:.....	84
Conclusiones:.....	85
Publicación:.....	87

El Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (ALPS) es una inmunodeficiencia primaria de desregulación del sistema inmunológico caracterizada clínicamente por linfoproliferación crónica no maligna, no infecciosa, manifestaciones autoinmunes y susceptibilidad a neoplasias malignas. Inmunológicamente los pacientes presentan expansión de células T doble negativas (DNT) y elevación de otros biomarcadores en sangre periférica. La mayoría de los casos de ALPS son causados por mutaciones en línea germinal o somática en el gen que codifica para FAS, sin embargo el ALPS producido por mutaciones en *FASLG* es muy infrecuente (hasta la publicación de este trabajo sólo se habían descrito 5 pacientes) En este trabajo presentamos el caso de un paciente con ALPS debido a una nueva mutación homocigótica del gen *FASLG* (ALPS-*FASLG*) y el primer caso de aparición de linfoma en otra paciente con ALPS-*FASLG* previamente descrita por nuestro grupo (del-Rey *et al*; 2006). Además, los modelos humanos de deficiencia en *FASLG* suponen una herramienta fundamental para el estudio de los mecanismos básicos implicados en la apoptosis y citotoxicidad celular.

Objetivos:

1. Identificar molecularmente el defecto genético causante de inmunodeficiencia en un paciente con síndrome linfoproliferativo autoinmune.
2. Estudiar cómo y en que medida afecta la alteración genética encontrada en *FASLG* a la expresión génica y proteica.
3. Comprobar funcionalmente el defecto molecular encontrado sobre líneas celulares modificadas con *FASLG* mutado y wild type.
4. Debido a que los procesos de malignización de los pacientes con ALPS comúnmente afectan a línea B decidimos estudiar la apoptosis y AICD sobre líneas celulares de linfocitos B transformadas con EBV en pacientes y controles.

Conclusiones:

1. Se describe un nuevo caso de inmunodeficiencia primaria por defecto de FASL debido a una mutación en *FASLG* no descrita previamente. Además, se reporta en otra paciente previamente descrita con ALPS-FASLG el primer caso de linfoma.
2. La expresión génica y protéica de FasL se encuentra conservada en el paciente, sin embargo, la fracción soluble es indetectable.
3. La citotoxicidad mediada por el eje Fas / FasL está muy disminuida, probablemente debido a que la mutación encontrada en *FASLG* da lugar a una proteína no funcional. Paralelamente, los pacientes mostraron una reducción parcial de la AICD en linfoblastos T.
4. De manera similar pero en menor medida se observa que los linfocitos B de los pacientes con deficiencia de FASL no realizan una correcta AICD demostrando el papel de FASL en el mantenimiento, homeostasis y terminación de la respuesta inmune en los linfocitos B.

Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel *FASLG* mutation

Raquel Ruiz-García¹, Sergio Mora¹, Gema Lozano-Sánchez², Luis Martínez-Lostao³, Estela Paz-Artal^{1,4,5}, Jesús Ruiz-Contreras^{4,6}, Alberto Anel³, Luis I. González-Granado^{4,6}, David Moreno-Pérez² and Luis M. Allende^{1,4}

BACKGROUND: Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) is a primary immunodeficiency characterized by chronic lymphoproliferation, autoimmune manifestations, expansion of double-negative T-cells, and susceptibility to malignancies. Most cases of ALPS are caused by germline or somatic *FAS* mutations. We report the case of an ALPS patient due to a novel homozygous Fasligand gene mutation (ALPS-FASLG).

METHODS: ALPS biomarkers were measured and *FASLG* mutation was identified. Functional characterization was carried out based on activation-induced cell death (AICD) and cytotoxicity assays.

RESULTS: This report describes the cases of a patient who presented a severe form of ALPS-FASLG, and his brother who had died due to complications related to ALPS. Moreover, in another family, we present the first case of lymphoma in a patient with ALPS-FASLG. Functional studies showed defective Fasligand-mediated apoptosis, cytotoxicity, and AICD in T-cell blasts. Otherwise, expression of the *FASLG* gene and corresponding protein was normal, but the shedding of the Fasligand was impaired in T-cells. Additionally, analyzing Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B-cells, our results indicate impaired AICD in ALPS-FASLG patients.

CONCLUSION: Patients with autosomal recessive inheritance of ALPS-FASLG have a severe phenotype and a partial defect in AICD in T- and B-cell lines. The Fasligand could play a key role in immune surveillance preventing malignancy.

Clinically, patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) have nonmalignant lymphadenopathies, splenomegaly, autoimmune cytopenias, and susceptibility to malignancy (1–5). Immunological features of ALPS consist of an expanded population of double-negative (DN) T-cells (TcRαβ+CD4-CD8-), while elevated levels of circulating plasma biomarkers, including IL-10, IL-18, soluble Fas ligand (sFasL), and vitamin B12, have also been described

(6,7). ALPS patients are classified according to the underlying genetic defect (Mendelian inheritance in man (MIM) no. 601859). Most cases of ALPS are associated with germline (ALPS-FAS) or somatic (ALPS-sFAS) heterozygous *FAS* mutations or a combination of both (3,8,9). Mutations in the Fas ligand gene (*FASLG*) in ALPS (ALPS-FASLG) have only been reported in five patients, two of them with the autosomal dominant form (10,11) and three with the autosomal recessive form of the disease (12–14). Cases with clinical and immunological features of ALPS with unknown genetic defects are referred to as ALPS-U (15). In addition, the demonstration of an apoptosis defect is critical for the diagnosis of ALPS. Specifically, activation-induced cell death (AICD), a homeostatic mechanism involved in the termination of the adaptive immune response by extrinsic or intrinsic cell death pathways, is impaired in ALPS-FASLG patients (12,13,16) (see **Supplementary Table S1** online).

This report describes the cases of two Moroccan brothers (P1 and P2), born to consanguineous parents, who presented a severe form of ALPS caused by a novel homozygous *FASLG* mutation. Given that alterations in immune tolerance have been described in ALPS patients (3), we decided to assess the impact of Fas ligand (FasL) deficiency on cytotoxicity and apoptosis both in T-cell blasts and B-cell lines transformed with Epstein-Barr virus (EBV). These results are compared with those of a patient with FasL deficiency (P3) who, since previously being described by our group (12), has had a lymphoma.

RESULTS

Clinical, Immunologic, and Molecular Features of ALPS-FASLG Patients

At the age of 8 mo, P1 was admitted to hospital for persistent generalized lymphadenopathy and hepatosplenomegaly, thrombocytopenia and anemia, accompanied by intermittent fever and diarrhea. He also had upper respiratory tract infections, bronchiolitis, and pneumonia. The most prominent

¹Servicio de Inmunología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ²UGC de Pediatría, Hospital Materno-Infantil, Hospital Regional Universitario, Málaga, Spain; ³Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain; ⁴Instituto de Investigación I+12, Madrid, Spain; ⁵Facultad de Medicina, Universidad Complutense y Sección de Inmunología, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain; ⁶Unidad de Inmunodeficiencias, Departamento de Pediatría, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain. Correspondence: Luis M. Allende (luis.allende@salud.madrid.org)

Received 4 February 2015; accepted 8 June 2015; advance online publication 30 September 2015. doi:10.1038/pr.2015.170

immunological abnormalities in P1 included increased percentage and number of DN T-cells, high plasma IL-10, vitamin B12 and sCD25 levels, and hypergammaglobulinemia. However, sFasL was not detected, unlike in ALPS-FAS patients (Table 1). Mutations in the *FAS* gene were also ruled out in this patient. At this stage, ALPS-FASLG was suspected.

FASLG sequencing analysis revealed a novel homozygous G-to-C substitution at cDNA nucleotide 605 (GenBank KJ948655), which produces a nonconservative mutation C202S in exon 4 affecting the extracellular domain of the protein. The mutation was confirmed in cDNA and genomic DNA. This mutation was not found as a single nucleotide polymorphism and was absent in 100 healthy donors. We found that codon 202

is conserved in 10 species other than humans, which underlines the importance of this amino acid for proper functioning of the protein (see **Supplementary Figure S1a** online). Both parents and one sibling are heterozygous carriers, and they are healthy without any clinical evidence or history of ALPS (see **Supplementary Figure S1b** online). The patient was treated with corticosteroids and rapamycin, and this led to a remarkable and rapid reduction of the size of his spleen, liver, and lymph nodes. Lower numbers of DN T cells, normal levels of immunoglobulins, negative antinuclear antibodies, and normal platelet counts were observed after starting the treatment. He recovered from CMV pneumonitis with treatment with valganciclovir. Mild pulmonary toxicity secondary to rapamycin was suspected, and resolved after decreasing the daily dose.

His sibling, P2, previously died at 3 y of age with dramatic failure to thrive, massive hepatosplenomegaly, respiratory insufficiency, pancytopenia, and increased levels of ferritin, vitamin B12 and immunoglobulins. The *FASLG* mutation in this patient (C202S) was confirmed in genomic DNA from a postmortem sample (see **Supplementary Figure S1b** online).

P3 is an ALPS-FASLG patient, followed-up clinically for more than 19 y (12), who developed lymphoma. She complained of a 3-wk period of flu-like illness accompanied by asthenia and dizziness. On physical examination, splenomegaly was noted (8 cm below left costal margin). Blood tests were normal. Abdominal ultrasound revealed spleen enlargement (15 cm) and a heterogeneous retroperitoneal mass (18 × 7 × 8 cm) with a cystic component on its lower edge, located between left psoas muscle and ipsilateral kidney. Whole-body CT showed scattered axillary and upper mediastinal lymphadenopathies (all less than 1 cm in diameter), and abdominal lymphadenopathies located in the peripancreatic mesentery. Dimensions of the abdominal (solid and slightly hypodense) mass were 16 × 11 × 10 cm (see **Supplementary Figure S2** online). Histopathologic examination of the mass revealed atypical cells positive for CD3⁺, CD43⁺, and CD5⁺, and negative for CD4⁺, CD8⁺, CD15⁺, CD30⁺, CD56⁺, CD79α⁺, and cyclin D1⁺. Further, 40% of the blasts were positive for Ki-67. This was consistent with a diagnosis of peripheral T-cell lymphoma. She was treated with the standard chemotherapy regimen for non-Hodgkin lymphoma (CHOP), and has been asymptomatic for the last 8 y without disease flares. At the time of writing, this patient is pregnant and has no apparent lymphoproliferative or autoimmune phenomena. We conclude that, as in ALPS-FAS patients, clinical follow-up in ALPS-FASLG patients is warranted due to the risk of malignant lymphoproliferative disorders.

Impaired FasL-Mediated Cytotoxicity

To explore whether the FasL in P1 had lost its cytotoxic activity, cytotoxicity assays were performed using phytohemagglutinin (PHA)-activated T-cell blasts from P1, P3, and two healthy controls. T-cell blasts from P1 (like those from P3) caused less cytolysis of Jurkat cells than T-cell blasts from controls, suggesting that the FasL from P1 was inactive (**Figure 1a**).

To explore FasL functional activity in P1, full-length cDNA alleles (*FASLG* wild-type from a healthy control and mutant

Table 1. Immunological features of patient P1

	Normal range	Patient
Lymphocyte count (no./μl) and phenotype (%)	3,000–8,000	5,634
T-cells		
CD3+ (/ μ l)	1,800–5,500	4,844
TCRαβ (%)	55–75	83
TCRγδ (%)	0–7	1
Double-negative T-cells (%)	0–4	8
CD4+ (/ μ l)	1,000–3,800	2,707
CD8+ (/ μ l)	500–1,800	1,698
Activated T-cells		
CD3+HLA-DR+ (%)	0–10	14
NK cells		
CD3-CD56+ (/ μ l)	100–1,000	169
iNKT Cells CD3+CD56+Vβ11+Va24 (%)	0.01–1.80	1.1
B-cells		
CD19+ (/ μ l)	800–2,200	507
CD19+CD27+ (%)	12–35	4.1
CD19+IgD+CD27-(naive) (%)	57–84	90.1
CD19+IgD+CD27+(marginal) (%)	4–12	1.3
CD19+ IgD-CD27+(switched) (%)	7–25	3
Serum immunoglobulins		
IgG (mg/dl)	330–1,160	2,640
Ig A (mg/dl)	10–100	158
Ig M (mg/dl)	40–170	220
Specific antibodies		
IgG vs. tetanus toxoid (IU/ml)	>0.15	1.42
ALPS biomarkers		
IL-10 (pg/ml)	0–20	98
sCD25 (pg/ml)	0–1,900	19,360
sFasL (pg/ml)	0–250	0
Vitamin B12 (pg/ml)	200–753	>2,000
Autoimmunity		
Antinuclear antibodies		+(1/160)

ALPS, autoimmune lymphoproliferative syndrome; sFasL, soluble Fas ligand.

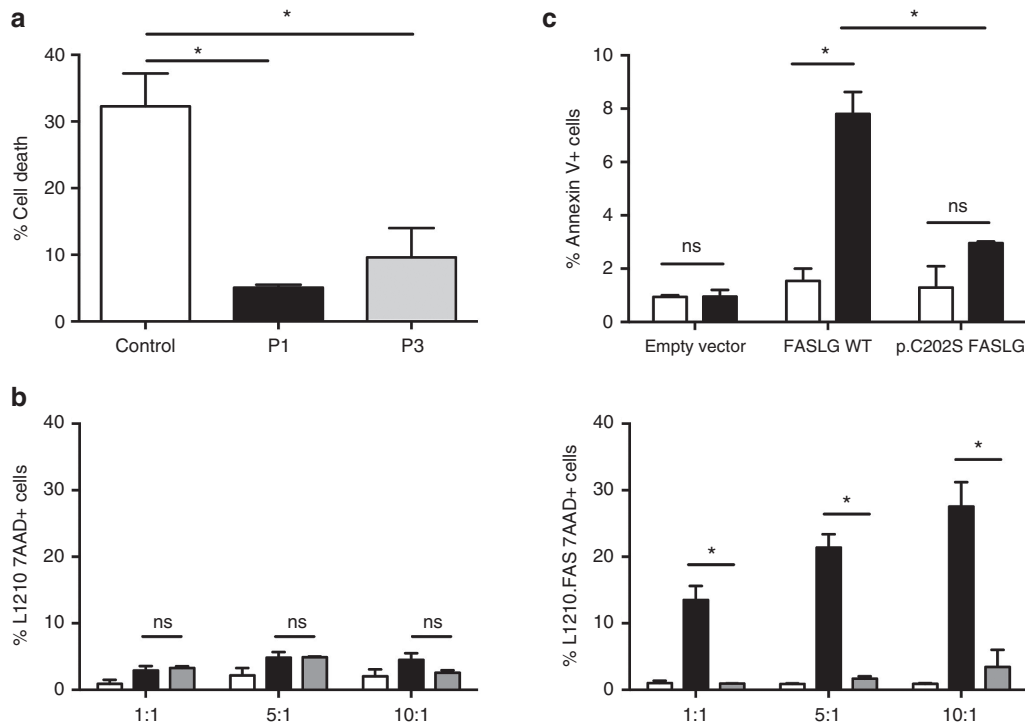


Figure 1. Functional studies of Fas/FasL-mediated cytotoxicity. (a) The graph represents the cytotoxicity of T-cell blasts from healthy controls ($n = 2$) and patients P1 and P3 on CFSE-stained Jurkat cells. (b) H293T cells were transfected with an empty vector (□), an expression vector containing the wild-type *FASLG* allele (■) or the mutated *FASLG* allele from patient P1 (▒). Forty-eight hours after transfection, H293T cells were tested against CFSE-stained L1210 (left panel) and L1210.FAS (right panel) target cells at different effector:target ratios (as shown) in 6-h cytotoxicity assays. (c) Supernatants from the cultures assessed as indicated in (b) were collected and tested on L1210 (□) and L1210.FAS (■) target cells. Columns represent the mean \pm SD of two independent experiments. Statistical comparisons were performed with unpaired Student's *t*-tests, and an asterisk indicates significance: * $P < 0.05$.

from P1) were cloned into the pIRES2dsRED2 expression vector. These clones were then transfected into the effector cells (H293T) and cytotoxicity assays were performed using L1210. Fas and L1210 cells as targets. As shown by 7-AAD staining, H293T cells transfected with wild-type *FASLG* clearly induce death of L1210.Fas cells. In contrast, H293T cells transfected with mutant *FASLG* did not induce death in L1210.Fas target cells at effector:target (E:T) ratios of 1:1, 5:1, or 10:1. As a control, it was confirmed that no significant cytotoxicity was observed in Fas-negative L1210 cells under the same conditions (Figure 1b).

Additionally, the cytotoxic activity of FasL released on exosomes in H293T-transfected cells was measured in the supernatants using L1210.Fas cells as targets and L1210 cells as a negative control. Results showed that supernatants from the wild-type *FASLG* H293T-transfected cells induced a higher rate of death in L1210.Fas cells than supernatants from the mutant *FASLG* cells (Figure 1c).

FasL Expression Analysis

To rule out that the defective Fas-mediated cytotoxicity in T-cell blasts from P1 was caused by a low level of FasL expression, we analyzed expression of the *FASLG* gene and corresponding protein. The mRNA expression level, measured by RT-PCR analysis, was similar in P1 and in healthy controls, indicating that the *FASLG* mutation did not abrogate normal

processing of the gene (Figure 2a). Additionally, the FasL protein was clearly detected in P1 T-cell blasts by western blot and the level of the protein was comparable to that in healthy controls (Figure 2b). Immunophenotypic analysis of both surface and cytoplasmic FasL expression of CD4⁺ and CD8⁺ T cells found comparable levels in P1, P3, and the healthy controls (data not shown). However, sFasL was not detectable in either plasma or cell supernatants of activated peripheral blood mononucleated cells (anti-CD3+anti-CD28 and PHA) from P1 and P3, unlike in those from healthy controls. These results indicate that the *FASLG* mutation in these patients inhibited the shedding of the sFasL protein (Figure 2c).

Decreased Activation-Induced Cell Death

The Fas/FasL pathway was evaluated using functional apoptosis assays. T-cell blasts from P1 showed normal Fas-mediated apoptosis when it was induced by an agonistic anti-Fas antibody (Apo1.3) (Figure 3a). However, we observed a partial reduction in AICD in T-cell blasts from P1 at all doses of PHA. T-cell blasts from a Fas-deficient patient (ALPS-FAS) were also used, and these showed impaired Fas-mediated apoptosis and conserved AICD. The AICD results in P1 were comparable with those previously observed in ALPS-FASLG patients (12,13) (see Supplementary Table S1 online) (Figure 3b).

However, our study indicates for the first time impaired AICD in ALPS-FASLG patients (P1 and P3) using EBV-transformed

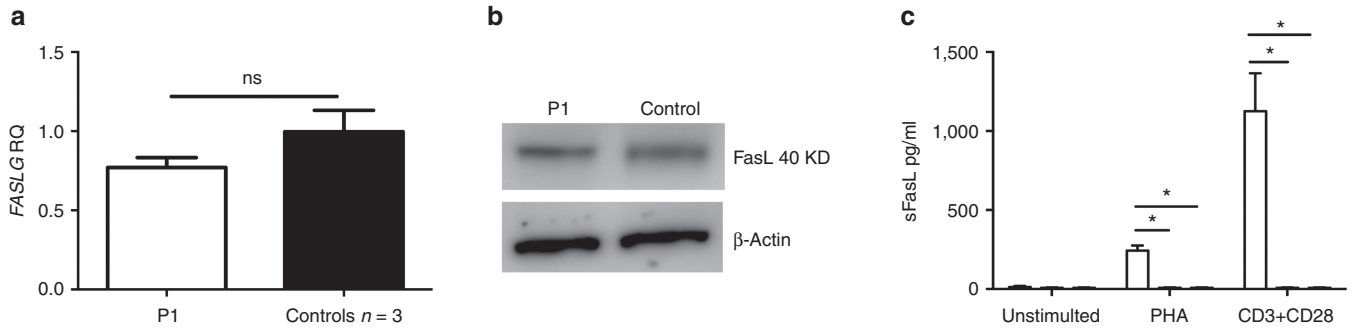


Figure 2. Expression of FasL. (a) *FASLG* gene expression in T-cell blasts from patient P1 and three healthy controls. (b) Western blot of FasL and β -actin protein expression from a healthy control and the patient. (c) Peripheral-blood mononuclear cells from controls (□), P1 (■) and P3 (▨) were stimulated as indicated, after 72 h, cell-free supernatants were harvested and sFasL measured as described in the Methods. Columns represent the mean \pm SD of two independent experiments. Statistical comparisons were performed with unpaired Student's *t*-tests, and an asterisk indicates significance: **P* < 0.05.

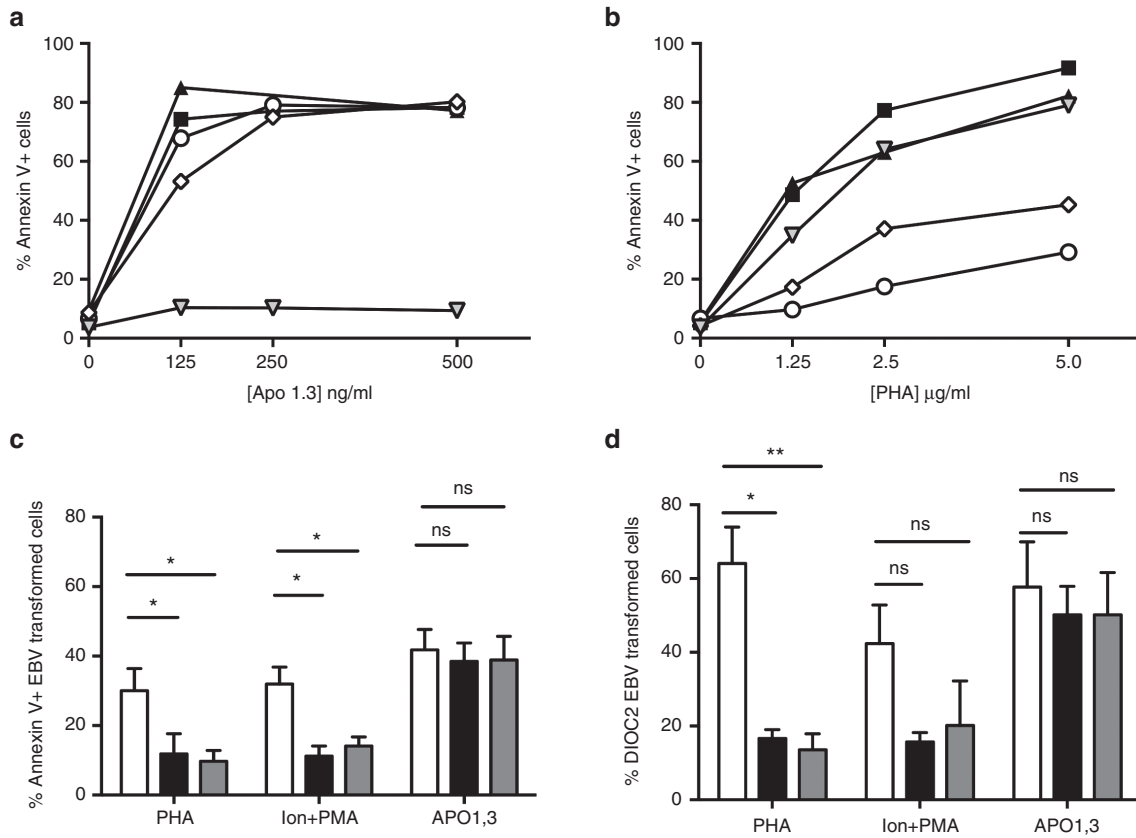


Figure 3. Fas-induced apoptosis and activation-induced cell death (AICD) in T-cell blasts and in EBV-transformed B-cells from patients P1 and P3. (a) Fas-mediated apoptosis was induced in T-cell blasts from ALPS-FASLG patients (P1 ○ and P3 ◇), two healthy controls (■ (▲) and an ALPS-FAS patient (▼), using different concentrations of anti-Fas mAb. (b) phytohemagglutinin (PHA)-mediated AICD was induced in T-cell blasts from controls, ALPS-FASLG and ALPS-FAS patients using different concentrations of PHA. (c) Apoptosis and (d) loss of mitochondrial membrane potential were assessed in EBV-transformed B-cells from two controls (□) and ALPS-FASLG patients (P1 ■ and P3 ▨) using PHA, ionomycin (Ion) + PMA and anti-Fas mAb (500 ng/ml). Columns show the mean \pm SD of three independent experiments. Statistical comparisons were performed with unpaired Student's *t*-tests, with significance indicated by asterisks (**P* < 0.05, ***P* < 0.01), and ns, no statistical significance.

B cells. We did not observe significant differences between the patients and controls in Fas-mediated apoptosis using Apo1.3, but when B-cell lines were re-stimulated with PHA or with ionomycin + PMA, a partial reduction in AICD was also observed in P1 and P3 (Figure 3c,d). The expression of FasL was barely detectable in the EBV-transformed cell lines from

the patients and controls (data not shown); however, the AICD defect was partial in ALPS-FASLG patients. These results could indicate that a Fas-FasL-independent pathway accounts for the partial cell death of FasL-deficient EBV-transformed cell lines from the patients, as has been previously described for FasL-deficient T-cells (results shown above and in refs. ^{12,13}).

DISCUSSION

The present work describes two brothers with a novel homozygous *FASLG* mutation (605G>C), affecting the extracellular domain of the *FASLG* gene and causing a severe form of ALPS. The absence of clinical symptoms in their heterozygous parents and brother suggests autosomal recessive inheritance of this Fas ligand deficiency (see **Supplementary Figure S1b** online). Fas/FasL-mediated cytotoxicity was severely impaired in P1, probably due to the mutation found in *FASLG* giving rise to a nonfunctional protein. Additionally, expression of the *FASLG* gene and corresponding protein was conserved, but sFasL was not detected, suggesting that the *FASLG* mutation in these patients inhibits shedding of the sFasL protein (**Figures 1** and **2**).

The results confirm a partial reduction in AICD in both T-cell blasts and EBV-transformed B-cell lines (**Figure 3**), demonstrating that the impact of the mutations on AICD is very similar and showing that other pathways are acting in AICD induction, as previously described in other ALPS-FASLG and ALPS-FAS patients (12,13,17,18). It is remarkable to observe this difference in AICD in EBV-transformed B-cell lines, given that the percentage of cells that express FasL is low (no more than 10%, data not shown) both in B-cells from the controls and from the patients. This could indicate that the main mechanism of Fas/FasL-mediated AICD in these cells, as observed previously by our group in human T-cell blasts (19), is mediated by the release of FasL on the surface of exosomes, inducing not only the suicide of the same exosome-releasing cells, but also the fratricide of neighboring Fas-expressing cells.

It is likely that the differential impact of *FAS* and *FASLG* mutations on AICD is attributable to this type of cell death being conserved in heterozygous ALPS-FAS patients, while it is partially impaired in homozygous ALPS-FAS and ALPS-FASLG patients (12,17,18). The complete absence of Fas signaling in the latter groups, patients with the homozygous forms of the syndrome, causes a defect in AICD that can be detected *in vitro*. However, in heterozygous ALPS-FAS patients, it seems that other Fas-independent mechanisms are playing a role in AICD and able to compensate for the defect, no differences being detected *in vitro*.

One of these Fas-independent mechanisms could be the perforin/granzyme pathway, especially relevant for CD8⁺ T-cells, the role of this pathway to AICD becoming relatively more important in the absence of a contribution from the Fas/FasL pathway (17). In spite of this possible partial compensation, the absence of Fas/FasL-mediated regulation results in severe disease, especially massive lymphoproliferation and an increased risk of lymphoma. In fact, we report here the development of a T-cell lymphoma by P3 (12,18). To our knowledge, this is the first reported case of lymphoma in a patient with ALPS-FASLG. The risk of Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas in families with ALPS-FAS syndrome has been estimated to be respectively 149 times and 61 times greater than expected, with the majority of lymphomas being of B-cell lineage (89%) (5).

In summary, we describe a new case of ALPS-FASLG with a severe clinical phenotype, in addition to alterations in

cytotoxicity and apoptosis. Although FasL deficiency is rare, this case represents the sixth patient described and the fourth with autosomal recessive inheritance (see **Supplementary Table S1** online). Additionally, this study is the first to demonstrate defective AICD in EBV-transformed B-cells from ALPS-FASLG patients, results suggesting that the link between the partial defect in AICD in T- and B-cells in ALPS-FASLG patients and lymphoma merits further investigation.

METHODS

Patients

The study was approved by the clinical ethics committee of Hospital Universitario 12 de Octubre (Spain). Blood samples were obtained from the patients, their relatives, and healthy controls after they had given written informed consent in agreement with the principles of the Declaration of Helsinki.

ALPS Biomarkers

Proportions of DN T cells were determined in total blood samples by flow cytometry using a Navios Cytometer (Beckman Coulter, Madrid, Spain). Mouse anti-human monoclonal antibodies were used to identify this population: anti-TCR $\alpha\beta$ -FITC, anti-TCR $\gamma\delta$ -PE, anti-CD3-PerCP5.5 (BD Biosciences, Madrid, Spain), anti-CD8-PeCy7, anti-CD4-APC, and anti-CD45-APC-Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter). Activated T-cells and B-cell phenotype were also tested in the ALPS-FASLG patient. Mouse anti-human monoclonal antibodies were used to identify these populations: anti-HLA-DR-PE, anti-CD3-PerCP5.5, anti-IgD-PE (BD Biosciences), anti-CD19-FITC, and anti-CD27-PC5 (Beckman Coulter).

Plasma levels of IL-10 (Bender MedSystems, LabClinics, Madrid, Spain), sCD25 and sFasL (R&D Systems, Vitro, Madrid, Spain) and vitamin B12 (Beckman Coulter) were measured in duplicate by enzyme-linked immunosorbent assay. Serum immunoglobulin levels (IgG, IgA, IgM) were measured by nephelometry (Beckman Coulter).

Cells and Cell Culture

Human peripheral-blood mononuclear cells were obtained from the blood of patients and healthy donors by Ficoll separation. T-cell blasts were generated from these cells by PHA stimulation (20 ng/ml) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) in the presence of IL-2 (100 IU/ml) (Roche, Madrid, Spain), as described elsewhere (12). EBV-transformed B-cell lines derived from patients and normal donors were maintained in RPMI 1640 with 20% fetal calf serum, 2 mmol/l L-glutamine, penicillin 100 U/ml and 100 μ g/ml streptomycin (Sigma-Aldrich) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. Jurkat cells (clone E6-1, derived from a T-cell acute leukemia, ATCC TIB-152) and HEK-293T cells (derived from a human embryonic kidney cell line, ATCC CRL-3216) were also used for cytotoxicity experiments.

Molecular Genetics

Mutation analysis of *FAS* and *FASL* genes was performed as described elsewhere (12).

Cytotoxicity Assays

Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) staining of Jurkat, L1210 and L1210.Fas cells allows us to gate target cells in flow cytometry analysis and quantify cell death using 7-aminoactinomycin D (7AAD) staining exclusively in the target cell population. For FasL-induced cytotoxicity, 6-d-old T-cell blasts from P1, P3, and two healthy controls were tested for toxicity to Jurkat cells. We used an effector:target ratio of 2:1 in an overnight cytotoxicity assay and the results represent the percentage of Jurkat CFSE⁺ (Life Technologies, Madrid, Spain) cells positive for 7AAD staining (Immunostep, Salamanca, Spain).

Constructs were created and transfection was performed as described elsewhere (12). Control H293T cells, or H293T cells transfected with either the wild type or the mutant FasL constructs, were also used as effectors in cytotoxicity assays. Transfection efficiency, based on microscopic evaluation of DsRed2 expression, varied from 25 to 30%. No significant differences in transfection efficiency

were found between the wild-type and the mutant construct. Cells were tested at different effector:target ratios against CFSE-stained Fas-transfected murine L1210 cells (L1210.Fas) or against CFSE-untransfected L1210 cells negative for Fas expression (L1210) in 6-h assays. The results represent the percentage of L1210.Fas- or L1210-CFSE+ cells positive for 7AAD staining.

Bioactive FasL is released to the supernatant by human cells in the form of whole, nonproteolyzed protein, associated with a particulate fraction characterized as exosomes that contain FasL on their surface (19). Accordingly, supernatants from the cultures indicated above were collected and tested for toxicity on L1210.Fas and L1210. Cell death was measured using annexin V-FITC staining (Immunostep).

FASLG Expression

Total RNA was isolated from T-cell blasts with the RNeasy plus mini kit (Qiagen, Madrid, Spain). One microgram of total cellular RNA was reverse transcribed using a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Gene expression was analyzed by real-time PCR using a TaqMan Fast Universal PCR Master Mix and Taqman probes (FASLG: Hs00181225_m1) (Life Technologies) in accordance with the manufacturer's instruction. GAPDH was used as the endogenous control, and the level of expression of FASLG was quantitatively measured relative to that in three different donors without the mutation.

Cell lysates (RIPA buffer, Sigma-Aldrich; protease inhibitor cocktail, Thermo Scientific, Madrid, Spain) were prepared from T-cell blasts. Cell lysates were resolved on 4 to 20% precast polyacrylamide gel (Biorad, Madrid, Spain). Proteins were blotted on a nitrocellulose membrane and probed with anti-FasL (Clone NOK-1, BD Biosciences) or anti- β -actin (Sigma-Aldrich) antibodies.

Peripheral-blood mononuclear cells (1×10^5) from P1, P3, and a healthy control were stimulated for 72 h with PHA (200 ng/ml) (Sigma-Aldrich), plate-bound anti-CD3 (10 μ g/ml) and soluble anti-CD28 (2 μ g/ml) (BD Biosciences) or left unstimulated. Supernatants were collected and sFasL levels were measured in duplicate by enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Vitro, Madrid, Spain).

To analyze FasL expression of T-cells and EBV-transformed B-cells, 1×10^5 cells were stained for FACS analysis with anti-human FasL-PE mAb (clone NOK-1; Miltenyi Biotec, Madrid, Spain)

Apoptosis and AICD

T-cell blasts (1×10^5 cells) from P1, P3, and healthy controls were cultured with different concentrations of anti-Fas mAb (125, 250, 500 ng/ml) (Clon Apo1.3; Enzo Life Sciences, Madrid, Spain) and PHA (1.25, 2.5, and 5 μ g/ml) (Sigma-Aldrich). After overnight incubation, apoptotic cells were detected by flow cytometry using annexin V-FITC.

EBV-transformed B-cells were aliquoted in triplicate into 96-well plates and cultured with PHA (5 μ g/ml), ionomycin (1.25 μ g/ml) plus phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, 100 ng/ml) (Sigma-Aldrich) and anti-Fas (Apo1.3, 500 ng/ml). After 16 h, apoptosis and loss of mitochondrial transmembrane potential were evaluated by flow cytometry using annexin V-FITC and DiOC2 staining (Life Technologies), respectively.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/pr>

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Miguela Menchén, and María José Díaz-Madroñero for their technical assistance, and Ana Victoria Marin for providing supernatant of EBV-producing B95-8 cells.

STATEMENT OF FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS-P111/1591) to L.M.A., Fundación Mutua Madrileña (FMM-2011/0090) to E.P.A. and Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2010-15341) to A.A. The project has been co-financed with FEDER funds.

Disclosures: The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr* 1967;70:891–9.
- Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995;81:935–46.
- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995;268:1347–9.
- Neven B, Magerus-Chatinet A, Florin B, et al. A survey of 90 patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome related to TNFRSF6 mutation. *Blood* 2011;118:4798–807.
- Price S, Shaw PA, Seitz A, et al. Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood* 2014;123:1989–99.
- Magerus-Chatinet A, Stolzenberg MC, Loffredo MS, et al. FAS-L, IL-10, and double-negative CD4- CD8- TCR alpha/beta+ T cells are reliable markers of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function. *Blood* 2009;113:3027–30.
- Caminha I, Fleisher TA, Hornung RL, et al. Using biomarkers to predict the presence of Fas mutations in patients with features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:946–949.e6.
- Holzlova E, Vonarbourg C, Stolzenberg MC, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Engl J Med* 2004;351:1409–18.
- Magerus-Chatinet A, Neven B, Stolzenberg MC, et al. Onset of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in humans as a consequence of genetic defect accumulation. *J Clin Invest* 2011;121:106–12.
- Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 1996;98:1107–13.
- Bi LL, Pan G, Atkinson TP, et al. Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib. *BMC Med Genet* 2007;8:41.
- Del-Rey M, Ruiz-Contreras J, Bosque A, et al. A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* 2006;108:1306–12.
- Magerus-Chatinet A, Stolzenberg MC, Lanzarotti N, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a homozygous null FAS ligand (FASLG) mutation. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:486–90.
- Nabhani S, Hönscheid A, Oommen PT, et al. A novel homozygous Fas ligand mutation leads to early protein truncation, abrogation of death receptor and reverse signaling and a severe form of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol* 2014;155:231–7.
- Oliveira JB, Blesing JJ, Dianzani U, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood* 2010;116:e35–40.
- Brenner D, Krammer PH, Arnold R. Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:52–64.
- Mateo V, Ménager M, de Saint-Basile G, et al. Perforin-dependent apoptosis functionally compensates Fas deficiency in activation-induced cell death of human T lymphocytes. *Blood* 2007;110:4285–92.
- Bosque A, Aguiló JI, Alava MA, et al. The induction of Bim expression in human T-cell blasts is dependent on nonapoptotic Fas/CD95 signaling. *Blood* 2007;109:1627–35.
- Martínez-Lorenzo MJ, Anel A, Gamen S, et al. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* 1999;163:1274–81.

Supplemental Table S1. Comparison of biological features of patients with ALPS-FASLG.

Family	Mutation	Exon	Protein	Fas-induced apoptosis	AICD	Double-negative T cells	Inheritance	Clinical manifestations	Ref.
1	M158-E185del	4	ND	ND	Diminished	Normal	AD	SLE and lymphadenopathy	10
2	R156G	4	Normal	Normal	ND	Normal	AD	ALPS	11
3	A247E	4	Normal	Normal	Diminished	Increased	AR	ALPS	12
4	F87fsX95	1	Absent	Normal	Diminished	Increased	AR	ALPS	13
5	A69fsX138	1	Absent	Normal	ND	Increased	AR	ALPS	14
6	C202S	4	Normal	Normal	Diminished	Increased	AR	ALPS	Present work

AICD, activation-induced cell death; AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; ND, not determined; SLE, Systemic lupus erythematosus.

Figure S1. Alignment of FasL and familial cases of ALPS-FASLG. (a) Alignment of FasL protein in different species indicating the highly conserved amino acid C202. (b)

Family pedigree of the patients with ALPS-FASLG

S1

A

GB_KJ948655	165	TYGIVLLSGVYKKGGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSSNN-LPLSHKVYMRNSKYPQDLVMMEGKM	229	Patient
NP_000630	165	TYGIVLLSGVYKKGGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNN-LPLSHKVYMRNSKYPQDLVMMEGKM	229	Homo sapiens
XP_524967	166	TYGIVLLSGVYKKGGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNN-LPLSHKVYMRNSKYPQDLVMMEGKM	228	Pan troglodytes
NP_001028010	166	TYGIVLLSGVYKKGGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNN-LPLSHKVYMRNSKYPQDLVMMEGKM	228	Macaca mulatta
NP_001271479	166	TYGIVLLSGVYKKGGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNN-LPLSHKVYMRNSKYPQDLVMMEGKM	228	Macaca fascicularis
NP_001009352	166	TYGIALVSGVYKKGGGLVINDTGMVYFVYSKVYFRGQSCNN-QPLNHKVYMRNSKYPQDLVMMEGKM	228	Felis catus
NP_001274082	172	TYGIALVSGVYKKGGGLVINDTGLYFVYSKVYFRGQSCNN-KPLNHKVYMRNSKYPQDLMLMEGKI	234	Canis lupus familiaris
NP_001092329	161	TYGIALVSGVYKKGGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNN-QPLSHKVYMRNSKYPQDLVMMEGKM	225	Bos taurus
NP_034307	163	TYGTALISGVYKKGGGLVINETGLYFVYSKVYFRGQSCNN-QPLNHKVYMRNSKYPEDLVLMEEKR	227	Mus musculus
NP_037040	162	TYGTALISGVYKKGGGLVINEAGLYFVYSKVYFRGQSCNS-QPLSHKVYMRNSKYPEDLVLMEEKR	226	Rattus norvegicus
NP_001026730	137	VSGHAFTSGIQYRDQGLVINETGLYFVYSNVLEFRGRHCDN-EVLTHVYKRNPAKPSGSHVLMEDKR	201	Gallus gallus
NP_001036166	148	NHGDAFTDGVKKTGGGLQVNETGLYFVYSRVEFLSHTCKTfDLSLAHKISLKRNGN-SQIIMEDNIE	214	Danio rerio

B

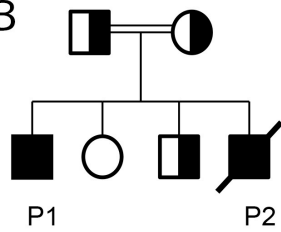
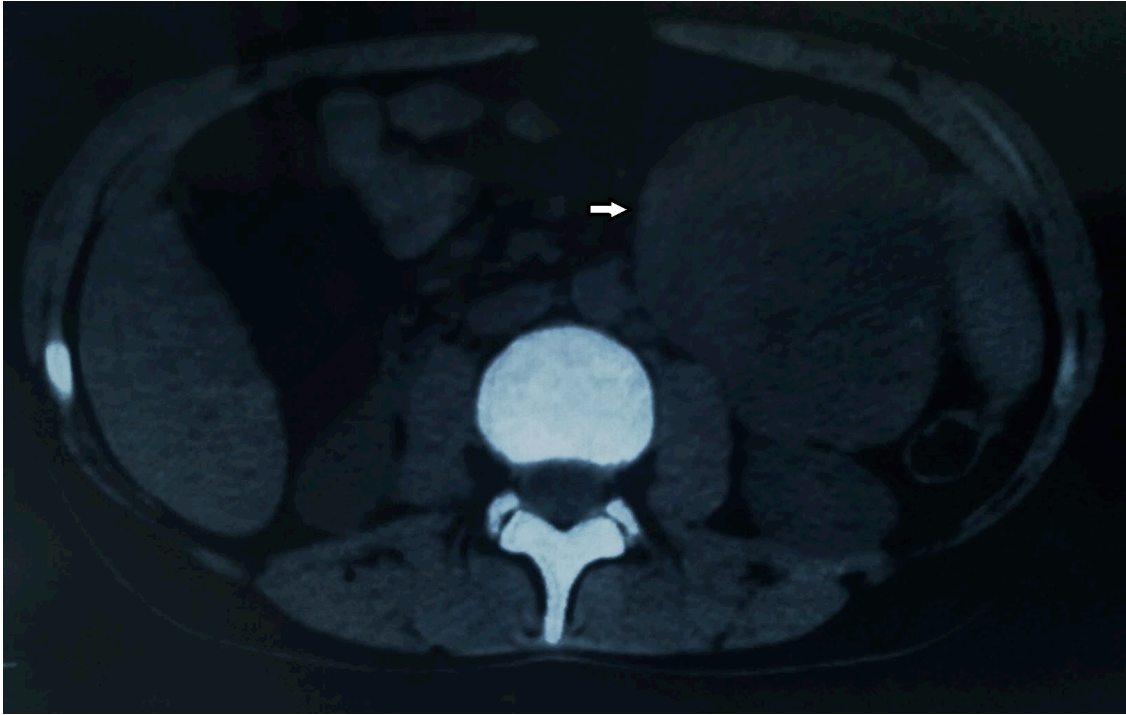


Figure S2. Abdominal CT scan showing a left retroperitoneal mass.

S2



CAPÍTULO III:

Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients

Raquel Ruiz-García, Carmen Rodríguez-Vigil, Francisco M. Marco, Fernando Gallego-Bustos, María José Castro-Panete, Laura Díez-Alonso, Carlos Muñoz-Ruiz, Jesús Ruiz-Contreras, Estela Paz-Artal, Luis Ignacio González-Granado, Luis M. Allende

***Frontiers Immunology* 2017; 8 (802):1-9**

DOI: 0.3389/fimmu.2017.00802

	Página
Objetivos:.....	98
Conclusiones:.....	99
Publicación:.....	101

La deficiencia de GATA2 es una enfermedad poco frecuente de reciente descripción (2011) que afecta a la hematopoyesis, al sistema linfático y al sistema inmunológico. Es causada por mutaciones en el gen *GATA2* (GATA binding protein 2), bien heterocigotas espontáneas o autosómicas dominantes. GATA2 es un factor de transcripción de tipo “dedo de zinc” esencial para la hematopoyesis embrionaria y definitiva, así como la angiogénesis linfática. Mutaciones en línea germinal en éste gen predisponen a padecer diversos fenotipos clínicos como síndrome de Emberger, síndrome “MonoMAC”, síndrome mielodisplásico (SMD) y leucemia mieloide aguda (LMA) e infecciones virales y micobacterianas graves que en ocasiones asocian también con linfedema, sordera e insuficiencia medular o neutropenia. El fenotipo inmunológico se caracteriza por deficiencia de células dendríticas, monocitos y linfocitos B y NK.

Objetivos:

1. Identificar molecularmente el defecto genético causante de inmunodeficiencia primaria en 4 pacientes con clínica heterogénea y alteraciones inmunológicas compatibles con defecto de GATA2.
2. Analizar mediante citometría de flujo la expresión de determinados marcadores que cambian durante la diferenciación de célula T Naïve a célula T efectora y estudiar una posible correlación de los hallazgos con la clínica de los pacientes.
3. Estudiar mediante citometría de flujo la expresión en superficie e intracelular de determinadas moléculas que cambian durante el desarrollo, diferenciación y activación de las células NK y determinar la posible correlación con la clínica de los pacientes.

4. Estudiar la función de los linfocitos Natural Killer en el paciente y controles sanos mediante el estudio de la muerte celular ejercida sobre células diana específicas.

Conclusiones:

1. Se identifican 4 mutaciones diferentes en el gen *GATA2* en los 4 pacientes estudiados, de las cuales, 2 no se encontraban descritas previamente.
2. A medida que el score clínico aumenta los pacientes presentan un compartimento T con características de memoria efectora y elevación de marcadores de activación y senescencia. Esto sugiere que este fenotipo es adquirido en respuesta a una estimulación antigénica prolongada debida a infecciones de repetición, lo que podría ser utilizado junto con el score clínico para clasificar a los pacientes.
3. El compartimento NK de los pacientes con defecto de *GATA2* presenta elevación de marcadores de inmadurez y no se observan variaciones entre los pacientes con diferente actividad clínica lo que podría indicar un origen intrínseco del defecto funcional.



Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients

Raquel Ruiz-García^{1,2*}, Carmen Rodríguez-Vigil³, Francisco Manuel Marco⁴, Fernando Gallego-Bustos¹, María José Castro-Panete^{1,2}, Laura Diez-Alonso¹, Carlos Muñoz-Ruiz⁴, Jesús Ruiz-Contreras^{2,5}, Estela Paz-Artal^{1,2,6,7}, Luis Ignacio González-Granado^{2,5†} and Luis Miguel Allende^{1,2†}

¹Servicio de Inmunología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, ²Instituto de Investigación I+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, ³Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain, ⁴Sección de Inmunología, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain, ⁵Unidad de Inmunodeficiencias, Servicio de Pediatría, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, ⁶Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, ⁷Sección de Inmunología, Universidad de San Pablo CEU, Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Guzide Aksu,
Ege University, Turkey

Reviewed by:

Elham Hossny,
Ain Shams University, Egypt
George Makedonas,
Baylor College of Medicine,
United States

*Correspondence:

Raquel Ruiz-García
ruizrg@salud.madrid.org

†Luis Ignacio González-Granado and
Luis Miguel Allende contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Primary Immunodeficiencies,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 06 April 2017

Accepted: 26 June 2017

Published: 12 July 2017

Citation:

Ruiz-García R, Rodríguez-Vigil C, Marco FM, Gallego-Bustos F, Castro-Panete MJ, Diez-Alonso L, Muñoz-Ruiz C, Ruiz-Contreras J, Paz-Artal E, González-Granado LI and Allende LM (2017) Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients. *Front. Immunol.* 8:802. doi: 10.3389/fimmu.2017.00802

GATA binding protein 2 (GATA2) deficiency is a rare disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity caused by spontaneous or autosomal dominant mutations in the *GATA2* gene. Clinical manifestations range from neutropenia, lymphedema, deafness, to severe viral and mycobacterial infections, bone marrow failure, and acute myeloid leukemia. Patients also present with monocytopenia, dendritic cell, B- and natural killer (NK)-cell deficiency. We studied the T-cell and NK-cell compartments of four *GATA2*-deficient patients to assess if changes in these lymphocyte populations could be correlated with clinical phenotype. Patients with more severe clinical complications demonstrated a senescent T-cell phenotype whereas patients with lower clinical score had undetectable changes relative to controls. In contrast, patients' NK-cells demonstrated an immature/activated phenotype that did not correlate with clinical score, suggesting an intrinsic NK-cell defect. These studies will help us to determine the contribution of T- and NK-cell dysregulation to the clinical phenotype of *GATA2* patients, and may help to establish the most accurate therapeutic options for these patients. Asymptomatic patients may be taken into consideration for hematopoietic stem cell transplantation when dysregulation of T-cell and NK-cell compartment is present.

Keywords: primary immunodeficiency, GATA binding protein 2, T-cell, natural killer-cell, myelodysplastic syndrome

INTRODUCTION

Spontaneous or autosomal dominant heterozygous mutations in *GATA2* cause haploinsufficiency of the transcription factor GATA binding protein 2 (GATA2) (1). *GATA2* is a zinc finger transcription factor essential for embryonic and definitive hematopoiesis as well as lymphatic angiogenesis (2). Germline mutations in *GATA2* predispose patients to familial myelodysplastic syndrome (MDS), acute

Abbreviations: MDS, myelodysplastic syndrome; AML, acute myeloid leukemia; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; GATA2, GATA binding protein 2; VIN, vulvar intraepithelial neoplasia; CFSE, 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester; PI, propidium iodide; RAG1,2, recombination activating gene 1,2; CMV, cytomegalovirus; NK, natural killer.

myeloid leukemia (AML) (3), “MonoMAC” syndrome of monocytopenia with predisposition to non-tuberculous mycobacterial infection (4, 5), Emberger syndrome (1), deafness, lymphedema, and the syndrome of dendritic cells (DCs), monocytes, and B and natural killer (NK) lymphoid deficiency (“DCML deficiency”) (6).

The most common immunologic feature in GATA2-deficient patients is a B-cell lymphopenia, but with all maturation subsets present (7), they also have reduced numbers of monocytes and there are no circulating DCs. Furthermore, NK cells are diminished or partially absent with specific loss of the CD56^{bright} subset (8, 9) and T cells are elevated in percentage but sometimes with reduced absolute counts due to overall lymphopenia (7). CD4⁺ lymphocytopenia (10) with reduced numbers of naïve T cells and an accumulation of CD8⁺ TEMRA have also been observed (9).

GATA binding protein 2 haploinsufficiency is caused by many different types of mutations, ranging from non-sense (stop codons and deletions), missense (amino acid substitutions), regulatory (intronic changes leading to monoallelic expression) to large deletions (11, 12). Interestingly, there is not an absolute correlation between genotype and phenotype in GATA2 deficiency, and patients with the same mutations may exhibit different clinical features ranging from isolated neutropenia or lymphedema to MDS, AML, or severe viral infections (10).

We report four GATA2-deficient patients with different clinical phenotypes. In order to better understand the genetic, immunologic, and clinical spectrum of GATA2 disease, we have performed phenotyping and functional analysis of T and NK cells in patients with both novel and previously described mutations. We observed dysregulation in both T- and NK-cell compartments that, in the case of T cells, correlated directly with a higher clinical score. This extends our previous understanding of GATA2 deficiency by defining T-cell defects in patients with severe clinical disease.

MATERIALS AND METHODS

Blood Samples

The study was approved by the clinical ethics committee of Hospital Universitario 12 de Octubre (Spain). Blood samples were obtained from the patients, their relatives, and healthy controls after they had given written informed consent in agreement with the principles of the Declaration of Helsinki. Patients or their parents/guardians gave written consent to publish the case reports.

DNA Sequencing

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). *GATA2* was directly sequenced in patients P1, P2, and P4 using specific primers and conditions described in Table S1 in Supplementary Material. The *GATA2* mutation in P3 was identified by targeted sequencing with an in-house designed panel of 192 genes involved in PID (Ampliseq, Life Technologies) and confirmed by Sanger sequencing.

Flow Cytometry

Immunophenotyping was performed on peripheral blood for the identification of T, B, and NK cells. Intracytoplasmic staining of cytotoxic granules in CD8 and NK cells was performed using FACSlysing and PermII buffers (BD Bioscience, Madrid, Spain). Analysis of NK-cell surface markers in GATA2-deficient patients was done in ≥ 200 NK cells per patient. Conjugated anti-human monoclonal antibodies are listed in Table S2 in Supplementary Material. Flow cytometry data were collected using a Beckman Coulter Navios cytometer and analyzed with Kaluza 1.5a software (Beckman Coulter, Madrid, Spain).

NK-Cell Cytotoxicity Assays

NK-cell cytotoxic function was tested as described in Ref. (13). Briefly, peripheral blood mononuclear cells were co-cultured with 5(6)-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE) labeled K562 erythroleukemia cells at different ratios for 4 h in the presence or absence of exogenous IL-2. Dead cells were measured as CFSE+PI+K562 cells. The percentage of specific lysis was calculated in all cases according to the formula: % specific lysis = [(experimental – spontaneous)/(maximum release – spontaneous release)] \times 100.

Statistics

Statistical analysis was performed using Prism 6.0 (GraphPad). Two-tailed Student's *t*-test with Welch's correction when variances were significantly different was applied. The results were considered significant when *P*-values were <0.05 (*), <0.01 (**), <0.001 (***)).

RESULTS

Patients: Case Reports, Genetics, and Immunological Features

Patient 1 is a 12-year old female that was diagnosed in a routine work-up for neutropenia. Monocytopenia, B, and NK lymphopenia (Table 1) were highly suggestive of GATA2 deficiency. Sanger sequencing revealed a heterozygous non-sense mutation in *GATA2* (c.1009C>T; p.R337X) (1). Initial bone marrow aspirate at the age of 12 years (age of presentation) was performed and was normocellular. However, a subsequent bone marrow evaluation (age 14) showed hypoplasia and myelodysplasia (normal immunophenotype and cytogenetic analysis). Blood or platelet transfusions have not been required and she is awaiting hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from an unrelated donor. Despite B- and NK-cell lymphopenia, her T-cell compartment showed normal percentages of CD4 and CD8 T cells and normal absolute lymphocyte counts.

Patient 2 is a 27-year old male whose clinical features were described in Ref. (14). He had suffered severe complications related to GATA2 deficiency: an extensive vesicular rash, later confirmed positive for HSV-2 by viral culture, that began on his left toe and spread to affect the entire surface of his left lower extremity, accompanied by a stable moderate lymphedema in his left leg. In addition to anemia and neutropenia, immunophenotyping revealed B- and NK-cell lymphopenia with the absence

TABLE 1 | Immunologic features of the patients.

Variables	Normal range children	Normal range adults	P1 (12 years)	P2 (26 years)	P3 (11 years)	P4 (32 years)
Neutrophils (n°/μL)	1,800–7,600	1,800–7,400	1,800	6,600	800	6,310
Monocytes (n°/μL)	200–900	300–900	16	7	250	217
Lymphocyte (n°/μL)	1,500–4,000	1,200–3,000	3,169	679	913	2,188
T cells						
CD3 ⁺ (n°/μL)	800–2,600	850–2,250	3,106	638	880	2,168
CD4 ⁺ (n°/μL)	600–1,500	500–1,450	1,648	285	240	905
CD8 ⁺ (n°/μL)	250–1,000	160–950	1,458	319	492	1,206
DN T cells CD3 ⁺ TCRαβ ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ (%)	0–4	0–4	0.3	0.6	2.7	0.4
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD31 ⁺ (%)	44–60	20–44	63	31	16	NA
T-cell proliferation						
PHA (cpm)	>50,000	>50,000	NA	NA	45,441	NA
Anti-CD3 (cpm)	>2,000	>9,000	NA	NA	14,337	NA
PMA + ionomycin (cpm)	>60,000	>60,000	NA	NA	84,411	NA
NK cells						
CD3 ⁻ CD56 ⁺ (n°/μL)	80–600	60–500	16	4	8	1
NKT cells						
CD3 ⁺ CD56 ⁺ (n°/μL)	40–115	35–85	253	109	621	525
B cells						
CD19 ⁺ (n°/μL)	200–700	100–500	48	34	21	18
CD19 ⁺ CD27 ⁺ (%)	7–19	11.8–34.7	36	71.3	24	62
CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁻ (naive) (%)	75–89	57.4–83.9	NA	15.3	50.6	25
CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ (marginal zone) (%)	2.5–7	4–11.8	NA	18.4	16.5	31.9
CD19 ⁺ IgD ⁻ CD27 ⁺ (switching) (%)	4.5–13	6.3–24.9	NA	52.5	16.2	28.7
CD19 ⁺ CD21 low (%)	3.3–9.5	3.36–9.53	14.3	NA	12	20.7
CD19 ⁺ CD38 ⁺ IgM ⁺ (transitionals) (%)	1–9	1–9	NA	NA	7.8	0.5
CD19 ⁺ CD38 ⁺ IgM ⁻ (plasmablasts) (%)	0–2.5	0–2.5	NA	NA	2.5	6
Dendritic cells CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ CD123 ⁺ (%)	0.5–1	0.5–1	0.0	0.0	0.0	0.0
Serum immunoglobulins (mg/dL)						
IgG (mg/dL)	600–1,230	700–1,600	1,040	2,070	643	2,580
IgA (mg/dL)	30–200	70–400	64	588	43	415
IgM (mg/dL)	50–200	40–230	73	207	98	218
Specific antibodies						
IgG vs pneumococcus (mg/dL)	>5.40	>5.40	NA	NA	10.4	NA
IgG2 vs pneumococcus (mg/dL)	>2.14	>2.14	NA	NA	2.88	NA
IgG vs tetanus toxoid (IU/mL)	>0.15	>0.15	0.40	NA	0.88	NA
Cytogenetics			46,XX	46,XY	+8	NA
Mutations			R337X	M236Ifs325X	K378X	T354M
			<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	<i>de novo</i>	AD
Clinical score			0	0	2	3

of DCs (Table 1). *GATA2* Sanger sequencing identified a novel heterozygous mutation (c.708delC) that disrupts the correct transcription of the protein leading to a premature stop codon at the amino acid 325 (p.M236Ifs325X) (14). He is currently awaiting HSCT in stable condition, receiving G-CSF twice a week and daily valacyclovir prophylaxis to minimize herpes simplex virus infection or infection recurrence.

Patient 3 is an 8-year old girl with deafness requiring a hearing aid, since age 2. She had recurrent pneumonia radiologically confirmed (at least three episodes required hospital admission). After azithromycin treatment was started respiratory infections decreased. Despite normal respiratory function tests at the age of 10, bilateral bronchiectasis and air trapping were present in a lung CT performed at that time. Physical examination revealed only mild lymphedema in her left leg. She started growth hormone therapy at the age of 9, with subsequent response to

hormone replacement. She presented with lymphopenia with low naïve CD4 and CD8 T cells, impaired proliferation to PHA, elevation of TCRγδ T cells, and very low B and NK cells (Table 1). At this point, a combined immunodeficiency was suspected. ADA, RAG1, and RAG2 deficiency were excluded by Sanger sequencing. Finally, she was included in a targeted sequencing panel for PID. Gene variant analysis revealed an exonic nucleotide substitution in *GATA2* (c.1132A>T), not found in ExAC or 1,000 genomes database, that was predicted to cause a premature stop codon (p.K378X). Sanger sequencing confirmed these data. Despite normal bone marrow aspirate by optical microscopy and immunophenotyping, cytogenetic analysis revealed an abnormal karyotype 47, XX, +8 (57%, 21 cells) and hyperdiploidy of more than 80 chromosomes (24%, 21 cells) (Table 1). She underwent HSCT from a fully matched sibling donor at the age of 13.

Patient 4 is a 37-year old woman referred from the Dermatology department for evaluation of genital and axillary warts refractory to treatment, extensive vulvar intraepithelial neoplasia grade III on labia majora, and persistent lymphedema of the vulva, combined with chronic anemia and thrombocytopenia due to bone marrow failure. The clinical history of the patient included bone marrow aplasia discovered at 14 years, after an episode of typhoid fever; chronic lung disease of unknown origin, that required surgical resection of the lower lobe of the left lung for bronchiectasis at 18 years; cytomegalovirus (CMV) pneumonia at age 23 requiring ICU admission for 15 days. She currently smokes and receives chronic treatment with inhaled bronchodilators. She has a substantial family history: one sister deceased at 35 years due to disseminated infection by *Mycobacterium avium* complex; her sister also had persistent warts and suffered a blood disorder similar to the patient. Their father died at 32 years of acute leukemia (DNA samples were not available). There were no other affected family members. *GATA2* sequencing identified a nucleotide substitution (c.1061C>T) leading to p. T354M [described in Ref. (3)].

We clustered these four patients based on clinical complications to obtain the clinical score described in Ref. (9) in order to explore possible correlations between immunologic phenotype and clinical features (see **Table 1**; Table S3 in Supplementary Material). NK, B, and DC deficiency was observed in all four patients as well as impaired NK-cell cytotoxicity (**Table 1**; Figure S1 in Supplementary Material). Although B-cell numbers were globally decreased, the proportion of naïve, switched memory, and marginal zone B subpopulations were preserved.

T-Cell Compartment Composition Exhibits Distinct Features in Accordance with Clinical Score

Abnormalities in T cells have been described in patients with *GATA2* deficiency (9). Here, we wanted to assess the impact of mutations in *GATA2* on T-cell phenotypes and correlate these findings with the clinical presentations of our patients. Peripheral blood CD3⁺ T-cell numbers and TCRV β repertoire (data not shown) were studied by flow cytometry in *GATA2*-deficient patients and the data were comparable with age-matched controls (**Table 1**). However, the ratio of CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ and CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ subpopulations was imbalanced in P1–3, and CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells represented more than 15% of CD3⁺ T cells (controls 4.82 \pm 1.99) (**Figure 1A**). In particular, P3 had a substantial increase in TCR $\gamma\delta$ ⁺ that reached 56.4 \pm 9.1 of total CD3⁺ T cells. P4 had proportions of both subpopulations similar to those of healthy donors.

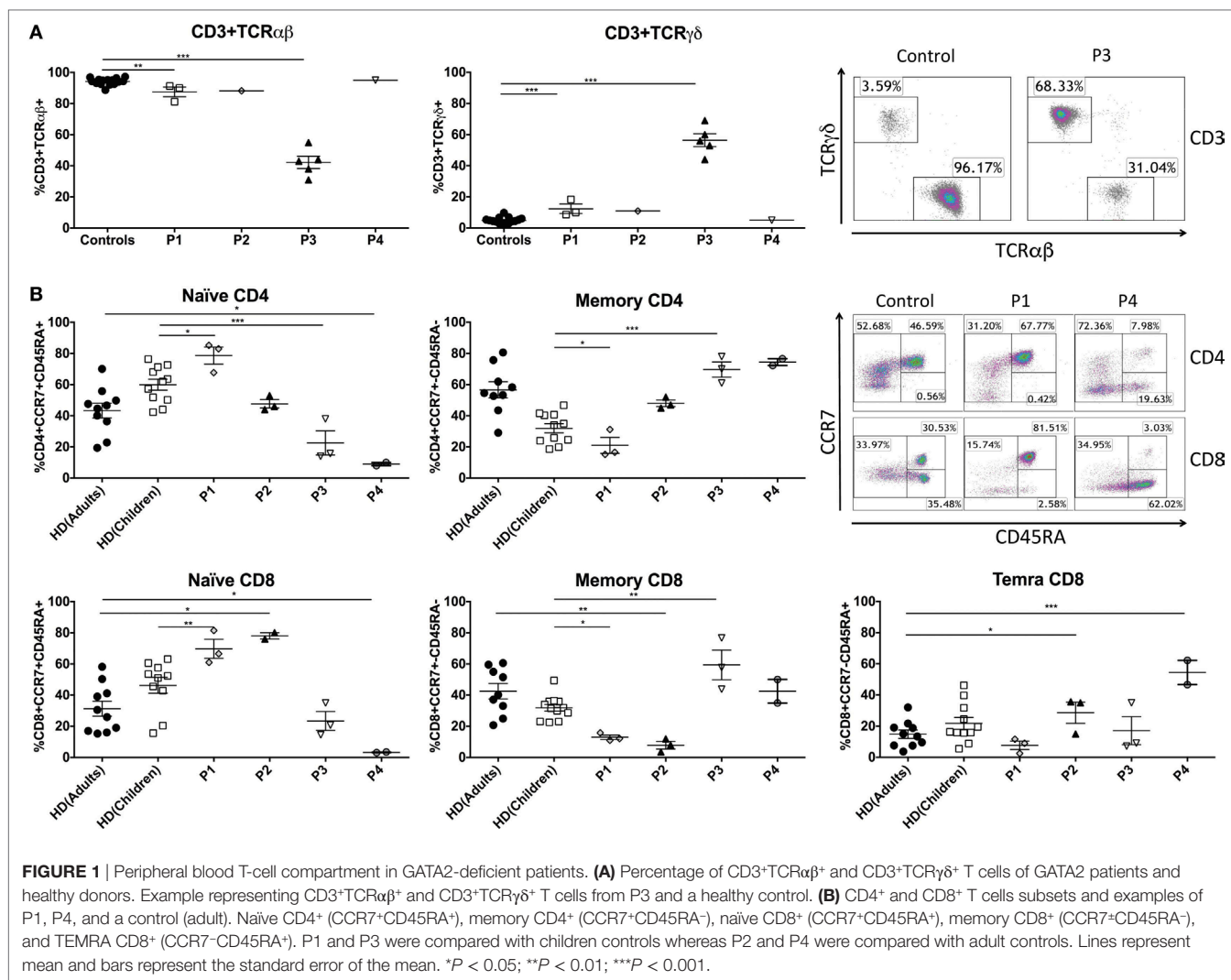
P1 and P2, the patients with fewer clinical complications and a clinical score of 0, presented normal subpopulations of CD4 and CD8 T cells compared with controls. The percentages of naïve CD4 (CD4⁺CCR7⁺CD45RA⁺), memory CD4 (CD4⁺CCR7⁻CD45RA⁻), naïve CD8 (CD8⁺CCR7⁺CD45RA⁺), memory CD8 (CD8⁺CCR7⁻CD45RA⁻), and TEMRA CD8 (CD8⁺CCR7⁻CD45RA⁺) T cells were within the range of age-matched related donors. Indeed, P1 had significantly higher levels of naïve CD4 (P1 80.66 \pm 6.04%, control children 59.96 \pm 11.72%) and naïve CD8 T cells (P1 66.86 \pm 6.00%, control children 46.26 \pm 16.16%). In contrast, P3 and P4, clinically scored

as 2 and 3, respectively, exhibited a profound decrease in naïve T CD4 (P3 22.56 \pm 13.39%, control children 59.96 \pm 11.72%; P4 8.47 \pm 2.56%, control adults 42.95 \pm 15.75%) and naïve T CD8 populations (P3 23.40 \pm 10.51%, control children 46.26 \pm 16.16%; P4 3.25 \pm 0.29%, control adults 31.33 \pm 16.27%) with a corresponding increase in memory CD4 T cells in both patients (P3 69.66 \pm 8.50%, control children 31.92 \pm 9.75%; P4 74.79 \pm 2.53%, control adults 57.12 \pm 16.52%). The reduction in naïve CD8 T cells led to an elevation of memory CD8 T cells in P3 (P3 59.40 \pm 15.51%, control children 31.64 \pm 7.85%) whereas in P4, the patient with higher clinical score, TEMRA CD8 T cells were increased compared with controls (P4 54.43 \pm 10.98%, control adults 14.83 \pm 8.39%) (**Figure 1B**).

In order to better understand the T-cell phenotype in these patients, we studied several molecules that change during differentiation from naïve to effector cells. The reduction of the naïve T-cell compartment in patients 3 and 4 was accompanied by the expression of senescence markers on the surface of these cells. Naïve T CD4 cells of P3 and P4 showed significantly increased percentages of CD95 (P3 61.21 \pm 14.44%, control children 6.20 \pm 8.50%; P4 22.25 \pm 3.54%, control adults 4.79 \pm 2.29%) with loss of CD27 (P3 91.26%, control children 99.81 \pm 0.30%; P4 90.19 \pm 0.61%, control adults 99.77 \pm 0.38%). Similar results were found in naïve CD8 T cells, where P3 and P4 showed increased levels of CD95 (P3 18.44 \pm 7.60%, control children 2.72 \pm 2.42%; P4 10.04 \pm 0.50%, control adults 3.01 \pm 2.78%) and decreased expression of CD27 (P4 80.67 \pm 4.78%, control adults 99.89 \pm 0.10%). Total CD4⁺ T cells expressed significantly higher levels of CD57 in P3 and P4 (P3 11.00 \pm 2.82%, control children 2.30 \pm 1.79%; P4 13.57 \pm 0.81%, control adults 3.18 \pm 3.51%). CD57 expression was also elevated in CD8 T cells from P4 (26.24 \pm 3.41%, control adults 17.70 \pm 13.90%). In contrast, there was no differential expression of the CD27, CD28, CD127, CD57, and CD95 surface markers in P1 and P2 T cells (**Figure 2**). Intracytoplasmic staining of cytotoxic granules in CD8 T-cell revealed reduced expression of granzyme B in P1–3, and normal values in P4. Although granzyme B expression was impaired in these patients, perforin and granzyme A staining was normal compared with healthy controls (Figure S1A in Supplementary Material). These results suggest that patients with a more severe clinical presentation of *GATA2* deficiency have decreased naïve T-cell populations with a corresponding increase in terminally differentiated T cells.

GATA2 Patients Displayed an Immature/Activated NK-Cell Phenotype and Expansion of NKT Cells

To determine the effect of *GATA2* deficiency on NK-cell function and phenotype, we performed K562 target cell lysis assays and FACS phenotyping. NK-cell cytolytic function was abolished in all four patients (Figure S1B in Supplementary Material). Moreover, percentage and absolute counts of NK cells (CD3⁺CD56⁺) were markedly decreased (**Figure 3A**) with a seemingly total absence of the CD56^{bright} subset as previously described (8). In addition, the NKT population (CD3⁺CD56⁺) was significantly increased in all patients (15). Patient 3 exhibited an extremely elevated

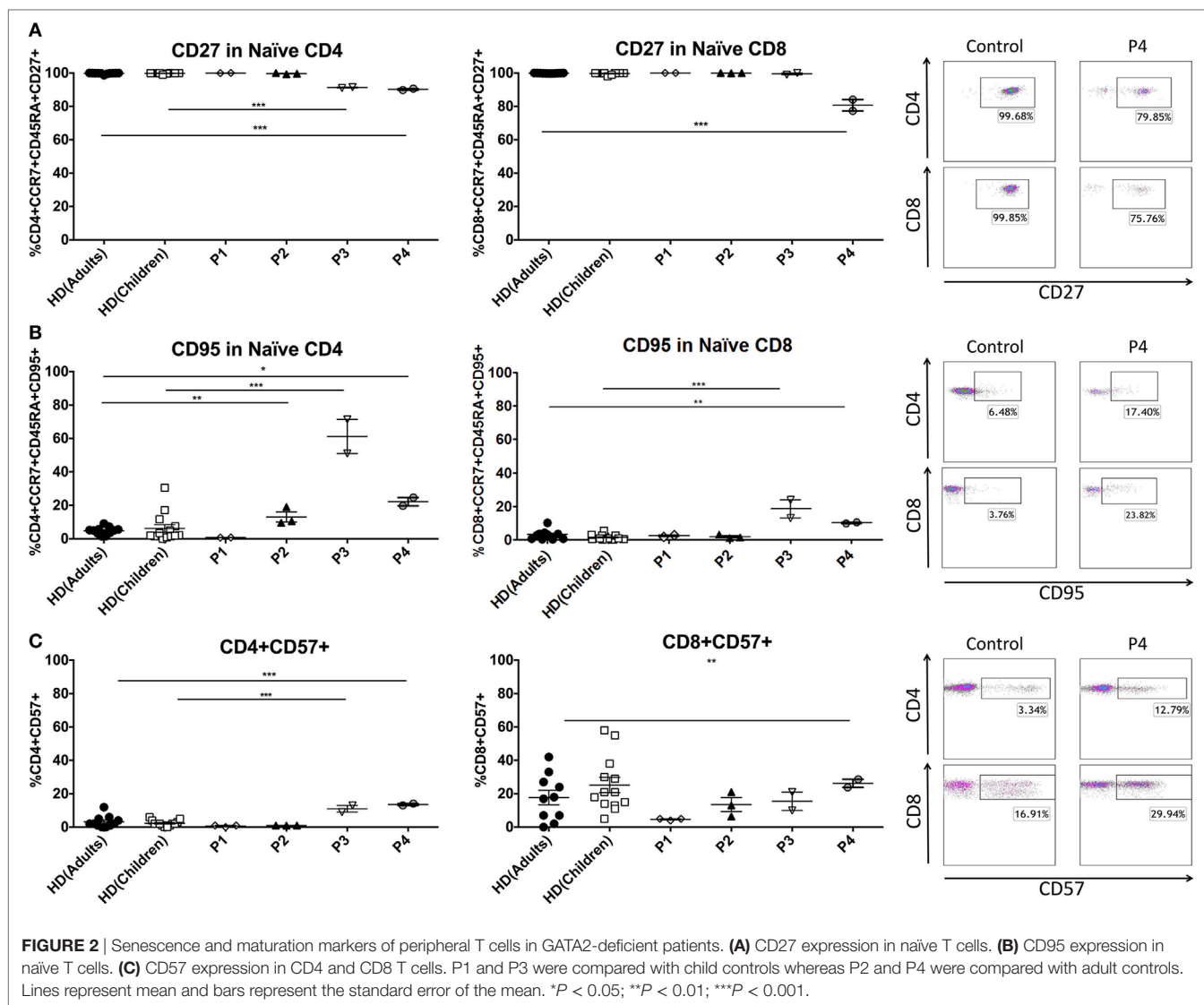


percentage of NKT cells, with an NKT frequency of $68.26 \pm 11.15\%$ of total CD45⁺ lymphocytes (**Figure 3B**). To further study both NK- and NKT-cell phenotype in these patients, we analyzed a repertoire of 14 surface markers and 3 intracytoplasmic molecules involved in cytotoxicity (see Tables S4, S5, and Figure S2 in Supplementary Material). Our panels included markers that indicate various stages of differentiation/maturation (CD27, CD57, PER1, GZMA, GZMB), activation/accessory receptors (CD25, CD69, CD2, CD8, CD16, DNAM1, NKG2D, Nkp44, Nkp46), and cell adhesion molecules (CD11a, CD11b, CD18).

We analyzed these molecules on CD56^{dim} NK cells as they are considered the mature subset of NK cells and the CD56^{bright} subset is severely decreased in GATA2 patients. We observed an impaired differentiation/maturation profile of these cells. P1–4 expressed significantly higher proportion of CD27⁺ cells than healthy controls (**Figure 3C**), a marker associated with immaturity of both CD56^{bright} and CD56^{dim} human NK-cell subsets (16). CD57 expression was comparable with controls in P1, P3, and P4 and slightly reduced in P2. The proportion of perforin-expressing cells was reduced in P2, P3, and P4. We did

not observe differential expression of granzyme A in P1, P2, and P3, in contrast, all patients had diminished levels of granzyme B in NK cells (**Figure S1C** in Supplementary Material). The proportion of CD27-expressing NKT cells was elevated in P1, but there were no other findings of interest from our studies on NKT-cell differentiation/maturation markers (Table S5 in Supplementary Material). Additionally, while the percentage of positive cells was altered, there was no differential expression of these markers on a per-cell basis when MFI was measured on NK or NKT cells (data not shown).

Activation of NK cells was measured by expression of CD25 and CD69. P2–4 showed increased proportions of CD25 (**Figure 3D**) and CD69 expressing cells (**Figure 3E**), whereas P1 only had a slight increase in CD25 expression. The proportion of NK cells expressing other accessory molecules, including DNAM1, was decreased in all patients (**Figure 3F**). The frequency of CD16 expressing NK cells was inversely proportional to the clinical score in all patients and P4, in particular exhibited a marked decrease in CD16 expression by CD56^{dim} NK cells, while P1 presented normal levels and P2, 3 only had slight reductions



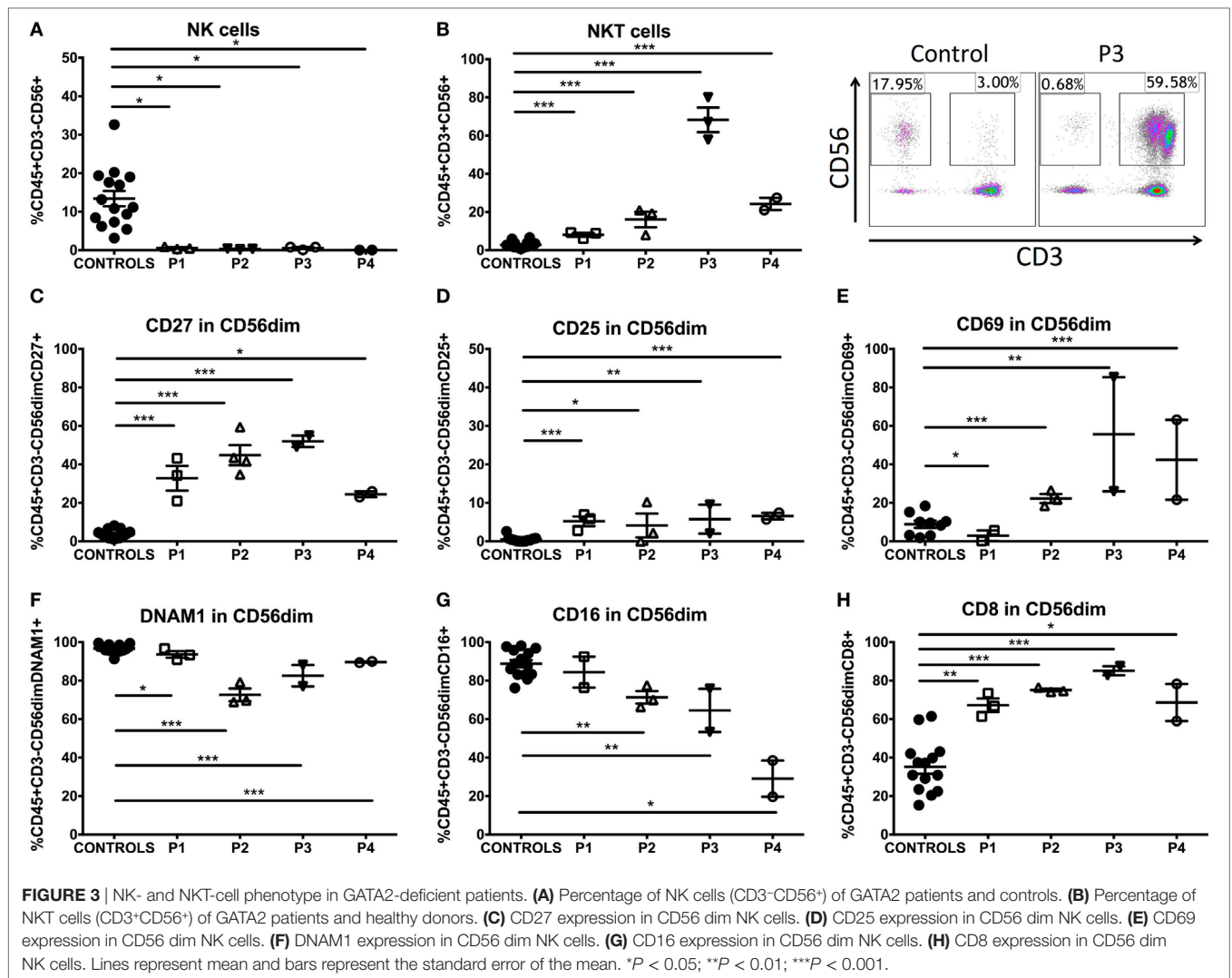
(Figure 3G; Figure S1D in Supplementary Material). Higher percentages of CD8 α^+ NK cells (Figure 3H) were observed in GATA2 patient NK cells in comparison with controls while other markers shared with T cells like CD2 were expressed normally. The expression of a range of activating receptors (NKG2D, NKp44, NKp46) was similar to healthy donors (see Table S4 in Supplementary Material). NKT cells expressed higher levels of CD69 in P2–4. CD2 expression was increased in patients P1–3 (see Table S5 in Supplementary Material). Finally, there was no differential expression of cell adhesion markers such as CD18, CD11a, and CD11b compared with healthy donors in NK or NKT cells (Tables S4 and S5 in Supplementary Material).

DISCUSSION

The GATA2 transcription factor plays a critical role in hematopoietic stem cell (HSC) maintenance and survival (17). Its absence in *Gata2*^{-/-} mice causes embryonic lethality due to a deficient

maturation of HSC to different hematopoietic lineages (18). In humans, haploinsufficiency of GATA2 caused by heterozygous spontaneous or autosomal dominant mutations causes a wide spectrum of clinical implications ranging from lymphedema, predisposition to mycobacterial, and viral infections to bone marrow failure with MDS/AML. Numerous mutations in GATA2 gene have been described as the cause of this heterogeneous disease (1–4, 6, 12, 19). Here, we present a detailed analysis of four GATA2-deficient patients, two with previously reported mutations (P1 and P4) and another two where we describe two novel mutations in GATA2, p.M236Ifs325X and p.K378X (found in patients 2 and 3, respectively). Importantly, our analysis has revealed a correlation between the altered lymphocyte development in these patients and the different clinical pictures and clinical scores.

In GATA2 syndrome, monocytes, B, NK, and DC populations are profoundly diminished or undetectable (6) and DC were essentially absent in all four of these patients, underscoring the importance of GATA2 as an essential regulator of DC



differentiation (20). Although B-cell numbers were decreased, switched memory cells were present and no apparent functional defect was detected, with all patients having correct specific responses to immunization. P2 and P3 had mild decrease of naïve CD27 B cells. Monocytes were absent in P1 and P2, suggesting that they are the two patients that best match the classic description of DCML deficiency, while P3 and P4 had close to normal monocyte numbers. In this study, three patients out of four had increased frequencies of TCR $\gamma\delta$ T cells and all had expanded NKT-cell populations. An elevation of TCR $\gamma\delta$ T cells has been observed in some combined immunodeficiencies such as recombination activating gene 1,2 deficiency (21, 22), CD3 γ , and CD3 δ (23, 24), as a consequence of CMV infection or delayed-onset combined immune deficiency with granuloma and/or autoimmunity (25–27). While the source of the defect in innate-like T cells in GATA2 deficiency is unclear, it is possible that the markedly reduced numbers of antigen presenting cells (DC, monocytes, and B cells) could produce a dysregulated increase of invariant T cells such as TCR $\gamma\delta$ and NKT cells (9).

Abnormalities in the T-cell compartment have been described in GATA2 patients previously. Dickinson and collaborators described a cohort of patients where some showed increased frequency of terminal effector CD8⁺ T cells (28, 29). In our work, naïve T cells were decreased in number and, importantly, an abnormal phenotype of those T cells was noted in those patients with more clinical complications (P3, P4), with increased expression of CD57 and CD95 in CD4 naïve cells. In contrast, P2 had normal percentages of cells expressing these markers compared with age-matched donors and P1 even had elevated naïve CCR7⁺CD45RA⁺CD8⁺ T cells. The senescent phenotype in P3 and P4 could be associated with replicative senescence resulting from continuous antigen stimulation as seen in repeated viral infections in other primary immunodeficiencies (13, 30).

Other NK-cell immunophenotyping studies in GATA2-deficient patients have shown a largely unaffected repertoire of surface markers with some alterations in molecules like CD27 and CD117 (8). Here, NK cells of GATA2 patients showed an immature/activated phenotype, with increased proportions of CD27, CD25, and CD69 and decreased perforin and DNAM1. It is intriguing that

NK cells from GATA2-deficient patients share features of both mature (CD56^{dim}, Perforin, Granzyme...) and immature cells (upregulation of CD27, CD25, and CD69 and downregulation of CD16 and DNAM1). It is tempting to speculate that these NK cells could be in an intermediate maturation stage between stage 4 and stage 5 (31) in which GATA2 plays a fundamental role (32). The lack of DCs secreting IL12 and IL15 may also be an important factor contributing to the altered NK-cell maturation and activity (33, 34). With the exception of CD16 expression, the correlation between a senescent phenotype and higher clinical score that we observed for the T-cell compartment of GATA2 patients was not observed in our analysis of NK-cell phenotype.

In summary, this study expands the knowledge of GATA2 deficiency via detailed description of the different disturbances in the T- and NK-cell compartments of GATA2-deficient patients. The T-cell alterations could be secondary changes due to recurrent infections that lead to continuous antigen stimulation, but whatever the basis of these changes it is important to note that they are associated with a higher clinical score. In contrast, GATA2 deficiency produces an intrinsic NK-cell defect that seems to be independent from clinical score. With the caveat that we have studied a relatively small cohort, and it would be interesting to analyze more GATA2 patients, our data strongly suggest that the analysis of lymphocyte subsets can provide indispensable knowledge in the symptomatic and presymptomatic stage of patients with GATA2 deficiency that could help when HSCT is being considered soon after the diagnosis.

ETHICS STATEMENT

All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the

“Comité de Ética de la Investigación, Hospital 12 de Octubre.” Patients or their parents/guardians gave written consent to publish the case reports.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RR-G performed the laboratory work for this study, and drafted the manuscript. CR-V, FM, CM-R, JR-C, and LG-G were responsible for the clinical management of the patients. FG-B, MC-P, LD-A, and EP-A collaborated in laboratory work. LA designed the study and drafted the manuscript. LG-G and LA contributed equally to this work.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Alejandra Leyva and Joaquín Martínez for monoclonal antibody sharing, Maite Fernandez, Miguela Menchén and María José Díaz-Madroñero for their technical assistance and Emily Mace and Hugh Reyburn for critical review of this article.

FUNDING

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS-PI11/1591 and FIS-PI16/2053) to LA and LG-G. The project has been co-financed with FEDER funds and PI2016/0044 to LG-G.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00802/full#supplementary-material>.

REFERENCES

- Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, Steward CG, Brice G, Woollard WJ, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet* (2011) 43(10):929–31. doi:10.1038/ng.923
- Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, Rosenfeld JA, Wildin RS, Cuellar-Rodriguez J, et al. Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood* (2012) 119(5):1283–91. doi:10.1182/blood-2011-08-374363
- Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, Wilkins EJ, Brautigan PJ, Li XC, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* (2011) 43(10):1012–7. doi:10.1038/ng.913
- Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, Calvo KR, Lemieux JE, Patel SY, et al. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood* (2011) 118(10):2653–5. doi:10.1182/blood-2011-05-356352
- Pasquet M, Bellanne-Chantelot C, Tavitian S, Prade N, Beaupain B, Larochelle O, et al. High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood* (2013) 121(5):822–9. doi:10.1182/blood-2012-08-447367
- Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, Reynard LN, Hussain R, Haniffa M, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood* (2011) 118(10):2656–8. doi:10.1182/blood-2011-06-360313
- Novakova M, Zaliouva M, Sukova M, Wlodarski M, Janda A, Fronkova E, et al. Loss of B cells and their precursors is the most constant feature of GATA-2 deficiency in childhood myelodysplastic syndrome. *Haematologica* (2016) 101(6):707–16. doi:10.3324/haematol.2015.137711
- Mace EM, Hsu AP, Monaco-Shawver L, Makedonas G, Rosen JB, Dropulic L, et al. Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56(bright) subset. *Blood* (2013) 121(14):2669–77. doi:10.1182/blood-2012-09-453969
- Dickinson RE, Milne P, Jardine L, Zandi S, Swierczek SI, McGovern N, et al. The evolution of cellular deficiency in GATA2 mutation. *Blood* (2014) 123(6):863–74. doi:10.1182/blood-2013-07-517151
- Spinner MA, Sanchez LA, Hsu AP, Shaw PA, Zerbe CS, Calvo KR, et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. *Blood* (2014) 123(6):809–21. doi:10.1182/blood-2013-07-515528
- Johnson KD, Hsu AP, Ryu MJ, Wang J, Gao X, Boyer ME, et al. Cis-element mutated in GATA2-dependent immunodeficiency governs hematopoiesis and vascular integrity. *J Clin Invest* (2012) 122(10):3692–704. doi:10.1172/JCI61623
- Hsu AP, Johnson KD, Falcone EL, Sanalkumar R, Sanchez L, Hickstein DD, et al. GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. *Blood* (2013) 121(19):S1–7. doi:10.1182/blood-2012-08-452763
- Ruiz-García R, Lermo-Rojo S, Martínez-Lostao L, Mancebo E, Mora-Díaz S, Paz-Artal E, et al. A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8(+) and natural killer cell cytotoxicity. *J Allergy Clin Immunol* (2014) 134(1):218–21. doi:10.1016/j.jaci.2014.01.023

14. Delgado-Marquez AM, Zarco C, Ruiz R, Simarro A, Vanaclocha F. Severe disseminated primary herpes simplex infection as skin manifestation of GATA2 deficiency. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (2016) 30(7):1248–50. doi:10.1111/jdv.13183
15. Maciejewski-Duval A, Meuris F, Bignon A, Aknin ML, Balabanian K, Faivre L, et al. Altered chemotactic response to CXCL12 in patients carrying GATA2 mutations. *J Leukoc Biol* (2016) 99(6):1065–76. doi:10.1189/jlb.5MA0815-388R
16. Vossen MT, Matmati M, Hertoghs KM, Baars PA, Gent MR, Leclercq G, et al. CD27 defines phenotypically and functionally different human NK cell subsets. *J Immunol* (2008) 180(6):3739–45. doi:10.4049/jimmunol.180.6.3739
17. Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* (1997) 89(10):3636–43.
18. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* (1994) 371(6494):221–6. doi:10.1038/371221a0
19. Wlodarski MW, Hirabayashi S, Pastor V, Stary J, Hasle H, Masetti R, et al. Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents. *Blood* (2016) 127(11):1387–97; quiz 518. doi:10.1182/blood-2015-09-669937
20. Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N, et al. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. *Blood* (2016) 128(4):508–18. doi:10.1182/blood-2016-02-698118
21. de Villartay JP, Lim A, Al-Mousa H, Dupont S, Dechanet-Merville J, Coumou-Gatbois E, et al. A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *J Clin Invest* (2005) 115(11):3291–9. doi:10.1172/JCI25178
22. Villa A, Sobacchi C, Notarangelo LD, Bozzi F, Abinun M, Abrahamson TG, et al. V(D)J recombination defects in lymphocytes due to RAG mutations: severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. *Blood* (2001) 97(1):81–8. doi:10.1182/blood.V97.1.81
23. Munoz-Ruiz M, Perez-Flores V, Garcillan B, Guardo AC, Mazariegos MS, Takada H, et al. Human CD3gamma, but not CD3delta, haploinsufficiency differentially impairs gammadelta versus alphabeta surface TCR expression. *BMC Immunol* (2013) 14:3. doi:10.1186/1471-2172-14-3
24. Gil J, Busto EM, Garcillan B, Chean C, Garcia-Rodriguez MC, Diaz-Alderete A, et al. A leaky mutation in CD3D differentially affects alphabeta and gammadelta T cells and leads to a Talphabeta-Tgammadelta+B+NK+ human SCID. *J Clin Invest* (2011) 121(10):3872–6. doi:10.1172/JCI44254
25. Schuetz C, Huck K, Gudowius S, Megahed M, Feyen O, Hubner B, et al. An immunodeficiency disease with RAG mutations and granulomas. *N Engl J Med* (2008) 358(19):2030–8. doi:10.1056/NEJMoa073966
26. Henderson LA, Frugoni F, Hopkins G, de Boer H, Pai SY, Lee YN, et al. Expanding the spectrum of recombination-activating gene 1 deficiency: a family with early-onset autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol* (2013) 132(4):969–71.e1–2. doi:10.1016/j.jaci.2013.06.032
27. Lee YN, Frugoni F, Dobbs K, Walter JE, Giliani S, Gennery AR, et al. A systematic analysis of recombination activity and genotype-phenotype correlation in human recombination-activating gene 1 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* (2014) 133(4):1099–108. doi:10.1016/j.jaci.2013.10.007
28. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* (2003) 101(7):2711–20. doi:10.1182/blood-2002-07-2103
29. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A* (2008) 73(11):975–83. doi:10.1002/cyto.a.20643
30. Randall KL, Chan SS, Ma CS, Fung I, Mei Y, Yabas M, et al. DOCK8 deficiency impairs CD8 T cell survival and function in humans and mice. *J Exp Med* (2011) 208(11):2305–20. doi:10.1084/jem.20110345
31. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev* (2006) 214:56–72. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x
32. Mace EM, Gunesch JT, Dixon A, Orange JS. Human NK cell development requires CD56-mediated motility and formation of the developmental synapse. *Nat Commun* (2016) 7:12171. doi:10.1038/ncomms12171
33. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force”. *Blood* (2005) 106(7):2252–8. doi:10.1182/blood-2005-03-1154
34. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* (1999) 17:189–220. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.189

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Ruiz-García, Rodríguez-Vigil, Marco, Gallego-Bustos, Castro-Panete, Diez-Alonso, Muñoz-Ruiz, Ruiz-Contreras, Paz-Artal, González-Granado and Allende. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

SUPPLEMENTARY APPENDIX

Title: Acquired senescent T cell phenotype correlates with clinical severity in GATA2 deficient patients.

Authors: Ruiz-García R.^{1,2}, Rodríguez-Vigil C.³, Marco FM.⁴, Gallego-Bustos F.¹, Castro-Panete MJ.^{1,2}, Diez-Alonso L.¹, Muñoz-Ruiz C.⁴, Ruiz-Contreras J.^{2,5}, Paz-Artal E.^{1,2,6,7}, González-Granado LI.^{2,5}, Allende LM.^{1,2}.

Supplementary Table 1. Primers used to amplify and sequence *GATA2* gene.

INTRON 5 (5'-3')	Fwd: ATCCCCGAAGTTGAGTGTCC
	Rev: AGGCTTAAATCGTTCCTGC
EXON 3 (5'-3')	Fwd: CGGGACTGGTGCTCTTTCT
	Rev: AGGAATCGAGCTGCTGAAAA
EXON 4 (5'-3')	Fwd: CTGGTTCTGGGAGTCGTGAT
	Rev: GTCTCGCTCTAATAGCCCCC
EXON 5 (5'-3')	Fwd: AGACCCTCTCGTCCCTCTTC
	Rev: GATGTCAGTTGGGGTCGTCT
EXON 6 (5'-3')	Fwd: TCCATGGTTCTGAGATGCTTT
	Rev: AGGAGGTGGAGCTGGCTAG
EXON 7 (5'-3')	Fwd: CTATGAAGGTCGGGCACAAT
	Rev: TTA CTGTGAATGTTCCCCACC

Supplementary Table 2. Monoclonal antibodies.

Antigen	Fluorochrome	Clone	Company
CCR7	FITC	150503	BD Biosciences
CD107a	PE	H4A3	BD Biosciences
CD11A	PE	25.3	Beckman Coulter
CD11B	PE	Bear1	Beckman Coulter
CD123	PE	9F5	BD Biosciences
CD127	PE	Hil-7R-M21	BD Biosciences
CD16	FITC	NKP15	BD Biosciences
CD18	FITC	L130	BD Biosciences
CD19	PE-Cy7	J4.119	Beckman Coulter
CD2	PE	S5.2	BD Biosciences
CD21	PE	B-ly4	BD Biosciences
CD25	FITC	M-A251	BD Biosciences
CD27	APC-Cy7	M-T271	BD Biosciences
CD27	PE	1A4CD27	Beckman Coulter
CD28	PE	CD28.2	BD Biosciences
CD3	APC-AF750	UCHT1	Beckman Coulter
CD3	PerCP-Cy5.5	SK7	BD Biosciences
CD38	PerCP-Cy5.5	HIT2	BD Biosciences
CD4	APC-AF750	13B8.2	Beckman Coulter
CD45	APC	2D1	BD Biosciences
CD45RA	PE-Cy7	L48	BD Biosciences
CD56	PE-Cy7	NCAM16.2	BD Biosciences
CD57	PE	NK-1	BD Biosciences
CD69	PE	TP1.55.3	Beckman Coulter
CD8	APC	SK1	BD Biosciences
CD8	FITC	SK1	BD Biosciences
CD95	FITC	DX2	BD Biosciences
CD95	PE	DX2	BD Biosciences
DNAM-1	FITC	TX25	Biolegend
GRANZIME A	PE	CB9	BD Biosciences
GRANZIME B	FITC	GB11	BD Biosciences
HLA-DR	FITC	L243	BD Biosciences
IgD	FITC	IA6-2	BD Biosciences
IgM	APC	G20-127	BD Biosciences
NKg2D	PE	1D11	Biolegend
NKp44	PE	Z231	Beckman Coulter
NKp46	PE	9E2	Biolegend
PERFORIN	FITC	δG9	BD Biosciences
TCRαβ	FITC	WT31	BD Biosciences
TCRγδ	PE	B1	BD Biosciences

Supplementary Table 3. Clinical score of patients. Described in (9).

	HPV	Mycobacterial infection	URTI	Lung	Autoimmunity	Clinical score
P1						0
P2						0
P3			+	+		2
P4	+		+	+		3

HPV (persistent infection of hands, feet, or perineum with HPV); Myco (any history of mycobacterial infection); URTI (upper respiratory tract infections, more than 3 episodes of recurrent bacterial sinusitis, otitis, or other URTI); Lung (loss of lung volume or transfer factor ,80% predicted, history of bronchiectasis, chronic bronchitis, more than one episode of pneumonia, radiologically or pathologically confirmed pulmonary alveolar proteinosis); AI (autoimmunity: arthritis, panniculitis, or autoimmune cytopenia).

Supplementary Table 4. Surface and Intracytoplasmatic markers in CD56^{dim} NK cells

	Controls		P1			P2			P3			P4		
	mean	SD	mean	sd	p value	mean	sd	p value	mean	sd	p value	mean	sd	p value
CD27	3,78	2,28	32,80	11,18	<0,0005	44,80	10,41	<0,0005	51,98	4,21	<0,0005	24,47	2,07	<0,0005
CD57	51,95	14,98	55,24	15,00	0,739	30,03	7,83	0,032	61,25	16,78	0,437	31,50	33,23	0,147
Perforin	87,31	8,09	83,60	6,75	0,461	40,75	30,76	<0,0005	67,43	15,32	0,005	5,34	5,57	<0,0005
GZMA	64,08	20,19	76,40	-	-	45,90	38,18	0,351	64,05	40,80	0,999	9,10	7,22	0,006
GZMB	69,27	11,51	33,25	29,91	0,007	14,95	2,47	<0,0005	34,50	2,96	0,002	6,78	5,95	<0,0005
CD25	0,52	0,65	5,20	2,17	<0,0005	4,12	5,37	0,015	5,76	5,32	0,001	6,56	1,20	<0,0005
CD69	3,56	3,71	18,20	18,78	0,035	34,95	13,03	<0,0005	49,06	39,82	0,002	54,23	25,45	<0,0005
CD2	64,08	18,28	65,78	7,18	0,879	63,72	16,19	0,975	51,21	7,96	0,356	73,25	20,15	0,524
CD8	35,23	13,64	67,22	6,07	0,001	75,11	1,20	<0,0005	85,14	3,34	<0,0005	68,63	13,62	0,006
CD16	88,81	7,02	84,42	11,38	0,447	71,30	5,67	0,001	64,51	15,87	0,001	29,07	13,29	<0,0005
DNAM1	96,66	2,11	93,64	2,89	0,047	72,63	5,71	<0,0005	82,56	7,86	<0,0005	89,67	0,47	<0,0005
NKg2A	1,75	2,11	1,03	0,92	0,575	8,59	5,67	0,001	7,05	6,43	0,017	21,93	29,60	0,004
NKg2D	94,82	5,92	95,79	4,74	0,794	81,10	16,93	0,020	91,89	9,21	0,543	92,42	7,71	0,609
NKp44	1,09	1,34	2,23	0,69	0,182	2,89	2,38	0,083	1,21	0,76	0,910	35,56	36,14	<0,0005
NKp46	70,08	13,09	80,28	12,64	0,237	63,72	16,04	0,471	71,16	1,64	0,911	83,81	14,58	0,190
CD11a	99,33	0,80	99,12	1,32	0,718	96,38	6,28	0,073	97,00	4,24	0,041	98,89	1,57	0,517
CD11b	99,03	0,70	97,35	1,74	0,011	88,09	4,02	<0,0005	93,95	0,08	<0,0005	97,50	3,54	0,102
CD18	99,37	0,86	99,51	0,85	0,799	99,74	0,46	0,491	99,65	0,49	0,665	100,00	0,00	0,332

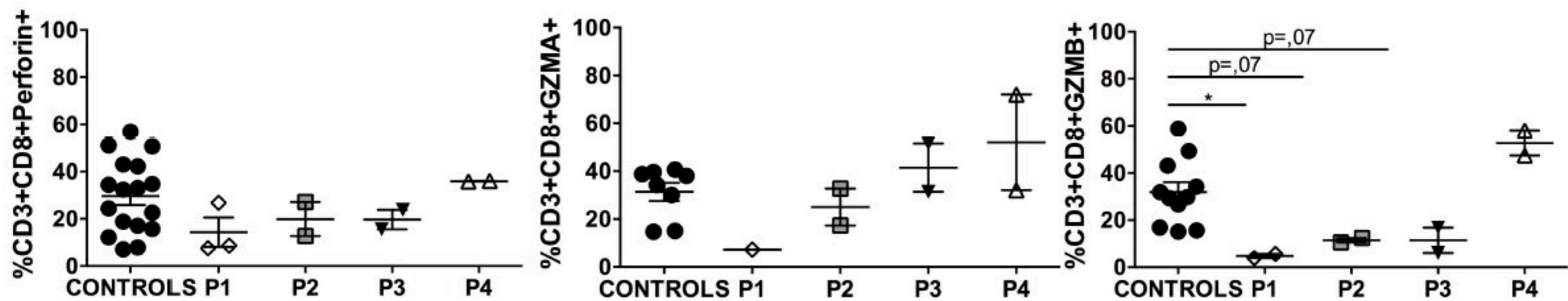
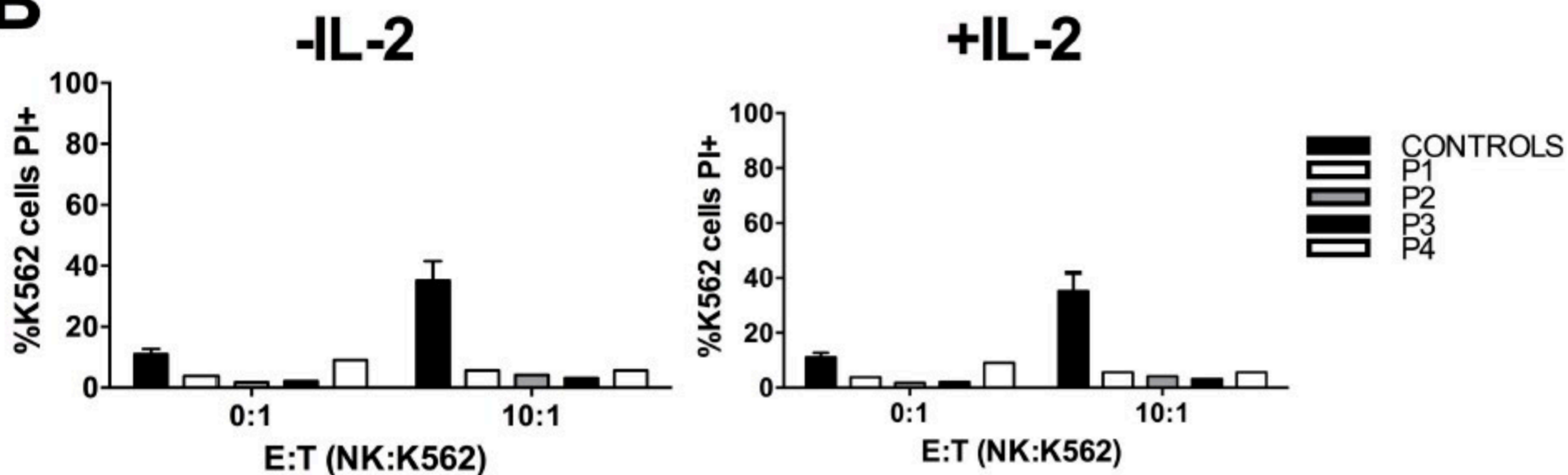
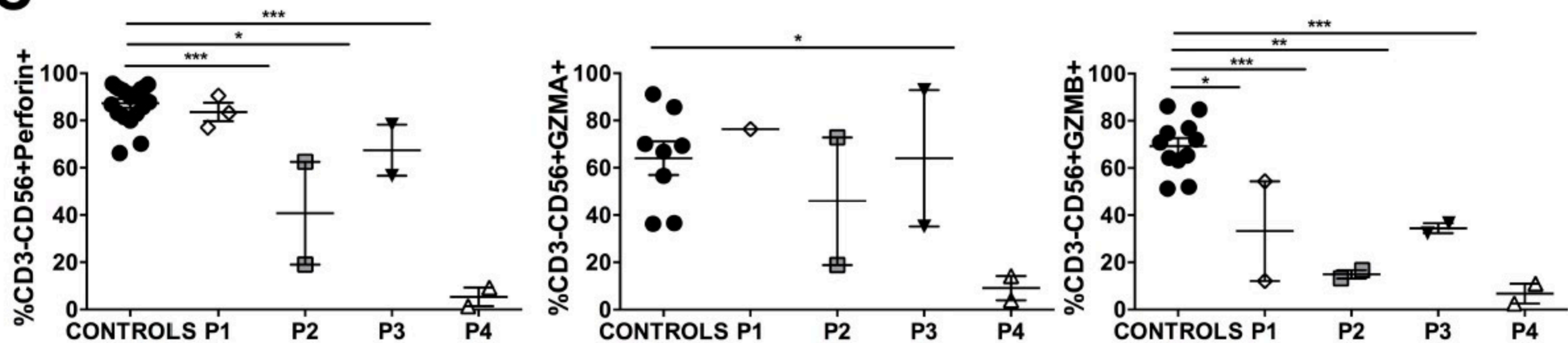
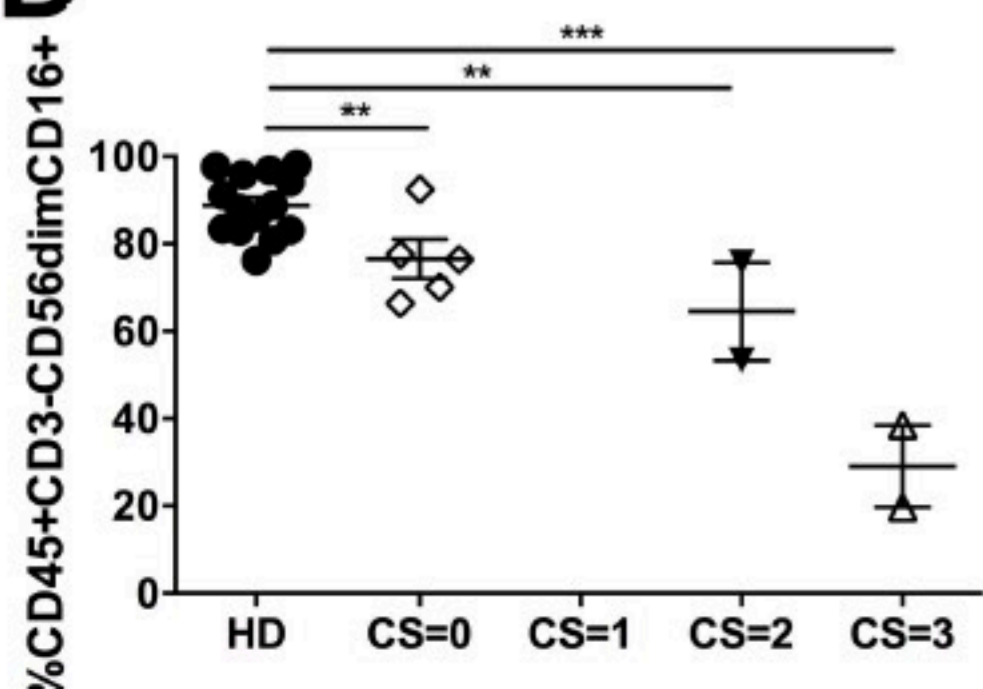
Supplementary Table 5. Surface and Intracytoplasmatic markers in NKT cells.

	Controls		P1			P2			P3			P4		
	mean	sd	mean	sd	p value	mean	sd	p value	mean	sd	p value	mean	sd	p value
CD27	42,49	25,62	82,91	3,16	0,019	63,41	5,75	0,133	72,72	9,62	0,132	21,51	2,11	0,282
CD57	47,82	23,65	57,47	18,72	0,597	53,81	14,52	0,739	61,90	12,88	0,437	63,06	5,73	0,397
Perforin	59,49	29,74	75,50	2,23	0,504	74,06	3,90	0,543	73,00	11,41	0,577	38,74	6,94	0,397
GZMA	65,15	20,47	86,32	-	-	79,25	8,49	0,409	98,37	0,30	0,082	88,80	2,91	0,184
GZMB	57,28	26,53	41,40	20,47	0,476	61,99	7,81	0,821	55,76	10,81	0,942	61,68	7,79	0,833
CD25	3,86	4,07	3,75	2,42	0,964	1,42	1,78	0,334	0,37	0,24	0,259	1,58	2,04	0,458
CD69	8,87	5,60	2,95	3,85	0,196	22,23	4,07	0,004	55,67	41,95	0,003	42,39	29,37	0,004
CD2	97,89	1,77	84,57	5,04	<0,0005	86,30	12,33	0,003	69,22	2,21	<0,0005	99,42	0,59	0,261
CD8	70,10	16,91	61,49	16,14	0,433	84,31	4,33	0,178	75,47	3,03	0,670	64,62	3,71	0,664
CD16	5,80	5,37	3,65	0,53	0,590	2,80	2,11	0,365	3,78	4,90	0,623	5,22	5,68	0,887
DNAM1	93,90	6,22	91,31	2,33	0,496	75,60	3,58	<0,0005	89,94	5,75	0,408	97,82	1,13	0,400
NKg2A	1,85	2,06	0,66	0,43	0,348	0,97	0,46	0,419	0,41	0,21	0,353	4,24	6,00	0,227
NKg2D	86,03	10,84	95,71	3,36	0,155	85,72	9,41	0,964	79,20	22,63	0,466	81,28	7,81	0,565
NKp44	1,69	2,59	1,32	0,87	0,815	0,28	0,42	0,376	1,12	0,82	0,770	6,67	8,95	0,077
NKp46	3,29	4,00	1,12	0,77	0,374	1,03	1,03	0,356	1,15	1,39	0,476	16,16	22,80	0,033
CD11a	99,40	1,09	98,15	3,08	0,216	99,91	0,13	0,436	95,00	7,07	0,018	96,63	4,63	0,040
CD11b	74,70	15,26	87,10	7,36	0,198	69,11	12,42	0,564	89,99	1,39	0,191	91,00	12,72	0,175
CD18	96,91	4,42	97,71	1,88	0,766	99,97	0,05	0,260	99,90	0,01	0,369	98,99	1,39	0,530

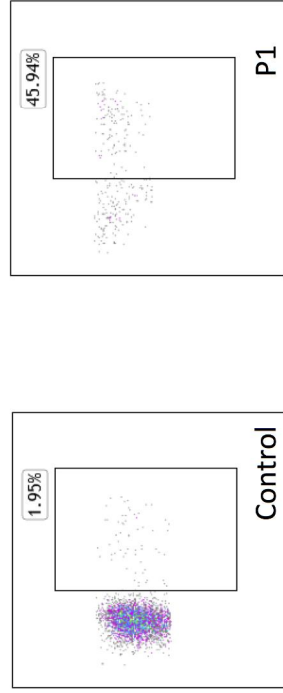
Supplementary Figure 1. CD8 and NK cells cytolytic molecules and NK cell cytotoxicity in GATA2 deficient patients.

(A) Percentage of perforin, granzyme A and granzyme B in CD8 T cells (B) Cytotoxicity of NK cells; the results show the percentage of K562 cells incorporating propidium iodide (PI). (C) Percentage of perforin, granzyme A and granzyme B in CD56^{dim} NK cells. (D) Percentage of CD16⁺ cells in CD56^{dim} NK cells represented in accordance to clinical score from patients. CS=0 n=2, CS=2 n=1, CS=3 n=1. Lines represent mean and bars represent the standard error of the mean (SEM). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

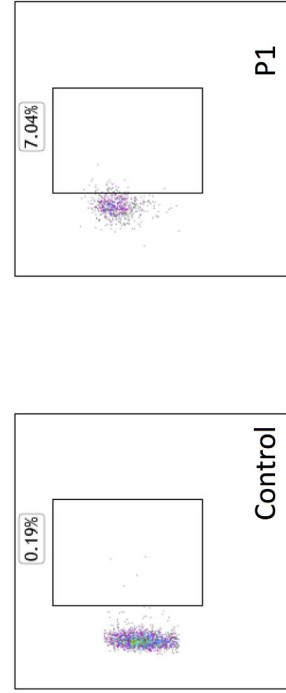
Supplementary Figure 2. Representative dot plots of CD56^{dim} stains. CD27, CD25, CD69, DNAM1, CD16 and CD8 expression in CD45⁺CD3⁺CD56^{dim} cells from patients and controls.

A**B****C****D**

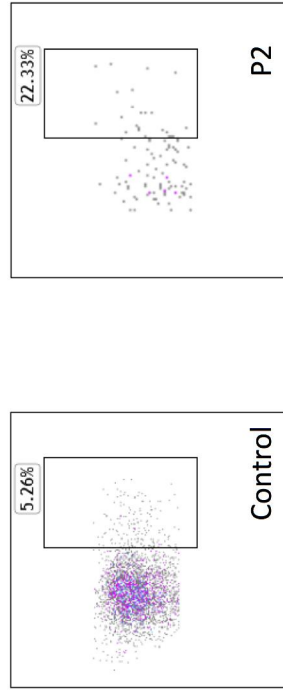
CD45⁺CD3⁻CD56^{dim}



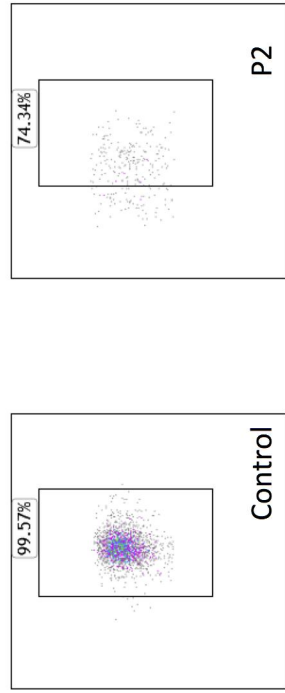
CD27



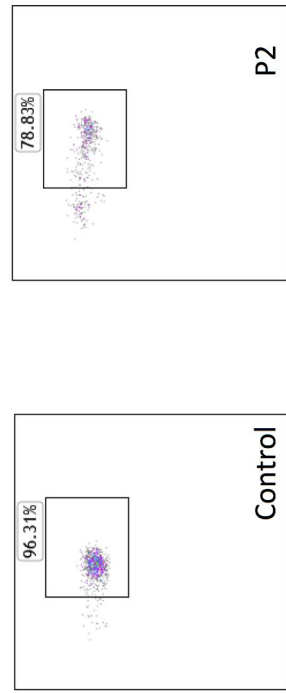
CD25



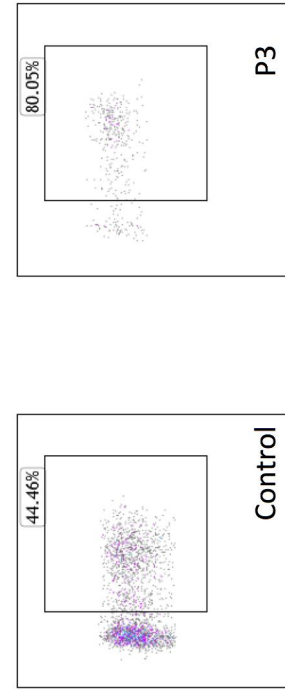
CD69



DNAM1



CD16



CD8

CD56

CAPÍTULO IV:

Mutations in PI3K110 δ lead to impaired NK cell function that is partially rescued by rapamycin treatment.

Autores: Raquel Ruiz-García, Alexander Vargas-Hernández, Ivan K. Chinna, Tram N. Cao, Zeynep Coban-Akdemir, Lisa R. Forbes, Donna M. Muzny, Luis M. Allende, Mohammed S. Ehlayel, Richard A. Gibbs, James R. Lupski , Gulbu Uzel , Jordan S. Orange, Emily M. Mace.

Journal of Allergy and Clinical Immunology. In review.

	Página
Objetivos:.....	120
Conclusiones:.....	121
Publicación:.....	123

El síndrome de Activación de PI3K delta (APDS) se caracteriza clínicamente por la presencia de infecciones respiratorias recurrentes, viremia EBV y CMV junto con linfoproliferación de linfocitos T, linfopenia, aumento de IgM y linfocitos B transicionales. EL APDS tipo I se produce por mutaciones *de novo* ó de herencia autosómica dominante de ganancia de función en la subunidad catalítica p110δ mientras que el APDS tipo II es debido a mutaciones de pérdida de función de la subunidad reguladora p85α con el mismo tipo de herencia. En estos pacientes, el aumento de la fosforilación de la proteína quinasa B (AKT) a través del complejo PI3K impulsa la senescencia prematura de los linfocitos T. La hiperactivación de esta vía produce un marcado aumento de la actividad mTOR y la función glicolítica, que puede contrarrestarse parcialmente mediante el tratamiento con el inhibidor de mTOR.

Objetivos:

1. Identificar molecularmente el defecto genético causante de inmunodeficiencia primaria en 3 hermanos con clínica compatible con APDS.
2. Debido a que los pacientes con APDS padecen infecciones víricas con viremia persistente, decidimos estudiar si la función y características fenotípicas de los linfocitos NK se encuentran alteradas en estos pacientes.
3. Investigar el mecanismo de la deficiencia funcional de los linfocitos NK de los pacientes con APDS.
4. Evaluar la respuesta clínica y función de los linfocitos NK en los pacientes con APDS tras el tratamiento con el inhibidor de mTOR Rapamicina.

Conclusiones:

1. Los 3 hermanos con APDS presentaron la mutación E525K en el gen *PIK3CD* que produce ganancia de función de la subunidad p110 δ de la PI3K.
2. Los pacientes con mutaciones de ganancia de función en *PIK3CD* presentan alteración de la función de las células NK tanto en la capacidad citotóxica natural como en la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). Fenotípicamente, los pacientes presentan reducción del número de linfocitos NK con disminución de expresión de CD122 y de CD16 y aumento de NKg2A en CD56dim. Por otro lado, se observó una disminución de expresión de CD62L y CD127 en CD56bright lo que indica inmadurez celular a pesar de no encontrar diferencias en la distribución de CD56dim y CD56 bright.
3. Se observó una expresión comparable de integrinas y receptores activadores entre donantes sanos y las células de los pacientes. Por contrario, los linfocitos NK de los pacientes mostraron una tendencia menor a la formación de conjugados con células diana. Además, mientras que los linfocitos NK de controles acumulan actina-F después de la conjugación con las células diana, la agregación de actina-F disminuyó significativamente en todos los pacientes independientemente de la mutación. Todo esto puede ser provocado por una fosforilación deficiente de ERK en los pacientes, implicado en la señalización a través de PI3K, y necesario para la correcta formación de la sinapsis inmunológica.
4. Tras la administración de rapamicina los pacientes presentaron un aumento parcial de la actividad citolítica que puede ser explicado por el aumento de la acumulación de actina-F en la sinapsis inmunológica.

1 **Mutations in PI3K110 δ cause impaired NK cell function partially rescued by**
2 **rapamycin treatment**

3
4 Raquel Ruiz-García BS^{a,b}, Alexander Vargas-Hernandez PhD^{a,c}, Ivan K. Chinn MD^{a,c},
5 Laura S. Angelo PhD^{a,c}, Tram N. Cao BS^a, Zeynep Coban-Akdemir PhD^{d,e}, Shalini N.
6 Jhangiani^d, Qingchang Meng PhD^d, Lisa R. Forbes MD^{a,c}, Donna M. Muzny MS^d, Luis
7 M. Allende PhD^b, Mohammed S. Ehlayel^f, Richard A. Gibbs^{d,e}, James R. Lupski MD
8 PhD DSc (hon)^{c,d,e}, Gulbu Uzel MD^g, Jordan S. Orange MD PhD^{a,c}, Emily M. Mace
9 PhD^{a,c}

10 ^aCenter for Human Immunobiology, Texas Children's Hospital, Houston TX USA,

11 ^bServicio de Immunología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain,

12 ^cDepartment of Pediatrics, Baylor College of Medicine, Houston TX USA,

13 ^dDepartment of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston
14 TX USA,

15 ^eHuman Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine, Houston TX USA,

16 ^fDepartment of Pediatrics, Section of Pediatric Allergy and Immunology, Hamad Medical
17 Corporation, Doha, Department of Pediatrics, Weill Cornell Medical College, Ar-Rayyan,
18 Qatar,

19 ^gLaboratory of Clinical Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious
20 Diseases, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD

21

22 **Corresponding author:**

23 Emily Mace, PhD

24 FC330.11 1102 Bates Ave

25 Houston TX USA

26 Phone: (832) 824-2217

27 Fax: (832) 825-1260

28 Email: mace@bcm.edu

29

30

31 **Abstract**

32 **Background:** Heterozygous gain-of-function mutations in PI3K110 δ lead to
33 lymphadenopathy, lymphoid hyperplasia, Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus
34 (CMV) viremia, and sinopulmonary infections.

35 **Objective:** The known role of NK cell function in the control of EBV and CMV prompted
36 us to investigate the functional and phenotypic effect of PI3K110 δ mutations on NK cell
37 subsets and cytotoxic function.

38 **Methods:** Patient mutations were identified by whole exome or targeted sequencing.
39 We performed NK cell phenotyping and functional analysis of patient cells by flow
40 cytometry, standard Cr⁵¹ cytotoxicity assays, and quantitative confocal microscopy.

41 **Results:** PI3K110 δ mutations led to an altered NK cell developmental phenotype and
42 profound cytotoxic dysfunction. Impaired NK cell cytotoxicity was due to decreased
43 conjugate formation with susceptible target cells and abrogated activation of cell
44 machinery required for target cell killing. These defects were partially restored following
45 the initiation of treatment with rapamycin in three patients.

46 **Conclusion:** We describe novel NK cell functional deficiency due to PI3K110 δ
47 mutation, which is a likely contributor to the severe viremia observed in these patients.
48 Rapamycin treatment partially restores NK cell function, providing further rationale for its
49 use in this disease.

50 **Key Messages:**

- 51 • Patients with *PI3KCD* gain-of-function mutations have impaired NK cell cytotoxic
52 function due to decreased conjugate formation and NK cell polarization
- 53 • Patients with *PI3KCD* gain-of-function mutations have decreased NK cell
54 frequency which is accompanied by decreased expression of CD16, CD122 and
55 CD127 and increased expression of NKG2A
- 56 • Functional, but not phenotypic, defects are partially restored by rapamycin
57 treatment

58 **Key words:** NK cell deficiency, combined immunodeficiency, cytotoxicity, APDS, PI3K
59 signaling

60 **Abbreviations:** NK cell deficiency, NKD; primary immunodeficiency, PID; microtubule
61 organizing center, MTOC; EBV, Epstein-Barr virus; CMV, cytomegalovirus; PASLI
62 disease, p110 δ -activating mutation causing senescent T cells, lymphadenopathy and
63 immunodeficiency; APDS, activated PI3K delta syndrome; phosphoinositide 3 OH-
64 kinase, PI3K

65
66

67 **Capsule Summary**

68 Gain-of-function mutations in PI3K110 δ lead to impaired NK cell cytolytic function that
69 can be partially restored with rapamycin treatment.

70

71

72 **Introduction**

73 NK cells play an important role in host defense, and NK cell deficiency (NKD)
74 leads to severe and often fatal viral infection and malignancy¹⁻⁴. While primary
75 immunodeficiencies (PID) leading to isolated NKD are relatively rare, currently greater
76 than 40 congenital deficiencies affect NK cell function in a broader immunological
77 context⁵. Human NK cells play a critical role in the control of viral infections through the
78 secretion of cytokines and the direct, contact dependent killing of virally infected cells.
79 As such, PID that include an effect on NK cell function are frequently caused by
80 mutations in genes that affect the cytolytic machinery of NK cells. These conditions
81 include the familial hemophagocytic lymphohistiocytosis diseases, mutations affecting
82 the cytoskeleton such as DOCK8^{6, 7} and Wiskott-Aldrich syndrome^{8, 9}, defects in the
83 NFκB pathway^{10, 11}, and others⁵.

84 NK cell killing of virally infected targets is mediated by the directed secretion of
85 lytic granules following the formation of a lytic immunological synapse (IS). NK cell IS
86 formation and function includes multiple tightly regulated steps, and the perturbation of
87 these checkpoints leads to a blunting of the cytotoxic response. NK cell cytotoxicity is
88 controlled through a balance of activating and inhibitory receptor signaling. Overcoming
89 a critical threshold of activating receptor signaling leads to commitment to formation of
90 an IS, which includes F-actin remodeling and *de novo* polymerization, polarization of the
91 microtubule organizing center (MTOC) and lytic granules to the IS, and exocytosis of
92 perforin- and granzyme-containing lytic granules. An early priming step in IS formation
93 is the convergence of lytic granules to the MTOC, which occurs in response to diverse
94 activating signals, including cytokine stimulation, integrin ligation and activating receptor

95 ligation¹²⁻¹⁴. This step, which is independent of actin remodeling, precedes integrin-
96 mediated firm adhesion and *de novo* F-actin polymerization, which occurs downstream
97 of activating receptor signaling. Convergence is followed by polarization of the MTOC,
98 which delivers lytic granules to the IS. Lytic granules then traverse the F-actin network
99 at the IS and undergo exocytosis, leading to target cell apoptosis.

100 The phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway is a key axis for NK cell
101 cytotoxicity. Signaling downstream from NK cell activating receptors, such as CD16 and
102 NKG2D, leads to PI3K recruitment and activation through adaptors including DAP10
103 and CD3 ζ ¹⁵⁻²⁰. Downstream signalling to cytotoxicity is mediated by Rac1, p21 activated
104 kinase-1 (PAK1), mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) and extracellular
105 regulated kinases (ERK) 1/2²¹. The requirement for PI3K in NK cell cytotoxic function
106 has been shown using pharmacologic inhibitors, with varying effects dependent upon
107 the target and killing not being entirely abrogated in all cases^{16, 19}. Further insight has
108 been gained using isoform-specific mouse models to dissect the role of individual
109 subunits in the cytotoxic process. Class 1A PI3K in lymphocytes are comprised of a
110 p110 catalytic subunit, encoded by the *PIK3CA*, *PIK3CB* or *PIK3CD* gene, paired with a
111 p85, p55 or p50 regulatory subunit. Catalytic inactivation specifically of the PI3K110 δ
112 subunit in mice leads to reduced NK cell number, impaired maturation, and decreased
113 cytotoxic function²². The effect of gain-of-function *Pik3cd* mutations has not been
114 directly tested in mice, however their effect can be predicted based on loss-of-function
115 mutations in *Pten*, which have a similar effect of elevating PtdIns(3,4,5)P3 levels.

116 Mutations in PI3K isoforms lead to distinct PID; loss of p85 in both mice and
117 humans leads to loss of B cell function and subsets, whereas gain-of-function mutations

118 in p110 δ patients lead to “p110 δ -activating mutation causing senescent T cells,
119 lymphadenopathy and immunodeficiency” (PASLI) disease²³ or “activating PI3K δ
120 syndrome, class 1” (APDS1)²⁴, characterized by EBV and CMV viremia in conjunction
121 with T cell lymphoproliferation and CD8⁺ T cell metabolism defects, lymphopenia,
122 increased IgM and circulating transitional B cells, and recurrent respiratory infections²³⁻
123 ²⁷. In these patients, hyperactive PI3K pathway signalling through protein kinase B
124 (AKT) drives premature senescence of CD8⁺ T cells and subsequent loss of CD8⁺ T cell
125 mediated IL-2 secretion²³, as reviewed in Lucas et al.²⁸. The hyperactivation of the PI3K
126 pathway leads to increased mammalian target of rapamycin (mTOR) activity and
127 glycolytic function. These effects are partially counteracted by treatment with the mTOR
128 inhibitor rapamycin. Rapamycin treatment of APDS1 patients results in decreased CD8⁺
129 cellularity and increased IL-2 secretion, which is accompanied by observed clinical
130 improvement of the disease²³.

131 In this study, we identified a family of three siblings with E525K mutations in the
132 *PIK3CD* gene^{29, 30}. The 3 affected brothers had clinical and immunologic features
133 consistent with *PIK3CD* gain-of-function disease, including persistently elevated EBV
134 PCR titers, diffuse lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, markedly elevated
135 percentages of transitional B cells, and poor responses to polysaccharide antigens. The
136 identification of this mutation in these patients afforded us the opportunity to evaluate
137 NK cell function and phenotype prior to and following the initiation of rapamycin
138 treatment. Further, we expanded our cohort to describe NK cell deficiency in 5
139 previously described patients²³ and 2 additional previously unreported patients. We
140 show that both E1021K and E525K gain-of-function mutations in PI3K110 δ lead to

141 functional NK cell deficiency because of decreased frequency of conjugate formation
142 with susceptible target cells and impaired signalling leading to the execution of
143 cytotoxicity. Further, skewing of the NK cell phenotype occurs, notably with decreased
144 expression of the Fc receptor (CD16) and IL-2 receptor β (CD122) on patient cells.
145 Following stabilization while on rapamycin therapy a significant improvement in NK cell
146 function was observed, reflected by partially corrected immune synapse formation.
147 Therefore, we define gain-of-function mutations in PI3K p110 δ as a novel cause of NK
148 cell functional and developmental impairment and a likely contributor to the disease in
149 these patients.

150

151

152

153 **Materials and Methods**

154 ***Cell isolation and cell lines***

155 All human samples were obtained using written informed donor consent and were used
156 with the approval of the National Institutes of Health (NIH) and Baylor College of
157 Medicine Institutional Review Boards for the Protection of Human Subjects. All samples
158 were obtained in compliance with the Declaration of Helsinki. Peripheral blood
159 mononuclear cells (PBMC) were isolated by density centrifugation over Ficoll-Paque
160 according to manufacturer's instructions. For Cr⁵¹ release assays, Raji and K562 cell
161 lines were used as target cells for NK cell cytotoxicity and were maintained in
162 supplemented RPMI media with 10% fetal calf serum. Target cells were routinely tested
163 and confirmed to be mycoplasma free.

164

165 ***Genetic studies***

166 Whole exome sequencing for research at Baylor College of Medicine was performed as
167 previously described³¹. Clinical sequencing was performed by Baylor Genetics^{32, 33}.
168 Variants were confirmed by Sanger sequencing by the Baylor DNA Sequencing Core
169 Facility. Patients from the NIH were identified genetically by targeted sequencing or
170 whole exome sequencing as previously described²³. For deep sequencing, the *PIK3CD*
171 c.G1573A variant was validated by amplicon deep sequencing on MiSeq sequencer
172 (Illumina). Briefly, an amplicon of 234bp defined by forward primer of 5'-
173 ACCGAGGAGGAGGTGAGTG-3' and reverse primer of 5'-
174 ACTTGGTGACCAGCAGCAG-3' was generated through polymerase chain reaction
175 (PCR) from 6 genomic DNA samples of the proband and family members using

176 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara). PCR products were purified with AMPure
177 beads (Beckman Coulter) and further end-repaired and ligated with TruSeq indexed
178 adaptors. Equal amounts of ligated amplicons were pooled and sequenced by MiSeq
179 Nano Kit v2 300 cycles with PhiX spike-in. The raw sequencing data were
180 demultiplexed and converted to Fastq files. The reads were then aligned to human
181 genome assembly 37/hg19 reference sequence by BWA-MEM. Variants were called
182 and number of variants read were counted from each de-multiplexed sample.

183

184 ***Cr⁵¹ release assays***

185 Chromium release assays for the analysis of NK cell activity were performed as
186 previously described³⁴. Freshly isolated PBMC were incubated at varying ratios (50:1,
187 25:1, 12.5:1, 6.25:1, 3.13:1) with 10⁴ K562 or Raji target cells that had been labeled with
188 50 µCi of Cr⁵¹ then washed. Where indicated, assays were performed in the presence
189 of 1000 U/ml IL-2 (Roche) or, as a stimulus for antibody-mediated cytotoxicity, 20 µg/ml
190 Rituximab. Effector:target conjugates were incubated in 200 µl in round-bottomed 96
191 well plates (Corning). Following 4 hours of incubation, positive controls for maximal lysis
192 were produced by lysing labeled target cells with 1% octylphenoxypolyethoxyethanol.
193 Supernatant was harvested and transferred to LumaPlates (PerkinElmer). The
194 supernatant was dried and plates were read on a TopCount gamma counter
195 (PerkinElmer). Percent specific lysis was calculated as [(Experimental release –
196 spontaneous release)/maximum release*100]. Lytic units were calculated as the
197 number of effectors required to lyse 10% of K562 target cells using the slope of the
198 curves generated by cytotoxicity assay data over the range of effector to target ratios⁸.

199

200 **Flow cytometry**

201 Multi-parametric flow cytometry was done using the antibodies described in
202 Supplemental Table 1. For cell surface receptors, all incubations were performed for 30
203 minutes at 4°C. For intracellular staining of cytokines and effector molecules, cells were
204 fixed and permeabilized with Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience) followed by incubation
205 with antibodies of interest. For activating and functional assays, cells were pre-
206 incubated with phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin (Sigma Aldrich) or
207 vehicle control for 6 hours. Brefeldin A (10 µg/mL-Sigma Aldrich) was added 4 hours
208 before antibody staining. Flow cytometric data were acquired on a BD Fortessa with 18-
209 color configuration. Data were exported as FCS files. SPADE analysis was performed
210 with Cytobank Premium³⁵ following gating on lymphocytes then CD56⁺CD3⁻ cells.
211 Clustering analysis was based upon the following parameters: CD94, CD117, CD57,
212 CD62L, CD16, CD27 and CD127. Pairwise comparison of single markers and routine
213 flow cytometric analyses were performed using FlowJo X (TreeStar Inc.).

214 For detection of downstream signaling, NK cells were activated for 0, 2, 4, 8 or
215 16 minutes with PMA and ionomycin and then harvested, fixed, permeabilized and
216 stained for intracellular phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2; Thr202/Tyr2014, D13.14.4E,
217 Cell Signaling Technology). Samples were acquired and analyzed as above.

218 For flow cytometric analysis of conjugation frequency, PBMC were pre-incubated
219 with anti-CD56 (clone HCD56, Biolegend) and anti-CD3 (clone SK7, Biolegend) to
220 identify NK cells as CD56⁺CD3⁻. Susceptible K562 target cells labeled with vital dye
221 PKH26 were mixed with PBMC and incubated for 0, 20, 40 or 60 minutes prior to

222 fixation. Data were acquired on a BD Fortessa and analyzed using FlowJo X. NK cells
223 were gated and the frequency of cells found in conjugates was calculated as
224 $[\text{PKH26}^+\text{CD56}^+\text{CD3}^-]/[\text{CD56}^+\text{CD3}^-]$.

225

226 ***Confocal microscopy***

227 Confocal microscopy was performed as previously described³⁶. Briefly, patient
228 PBMC were incubated with susceptible K562 target cells for 45 minutes to facilitate
229 conjugate formation. Following incubation, cells were fixed and permeabilized, then
230 stained intracellularly with anti-tubulin biotin (Life Technologies) followed by streptavidin
231 AlexaFluor 488 (Life Technologies). These steps were followed by staining with anti-
232 perforin AlexaFluor 647 (clone δG9 ; Biolegend) and phalloidin AlexaFluor 568 (Life
233 Technologies). Slides were mounted with ProLong Gold anti-fade media (Life
234 Technologies). Images were acquired on a Zeiss Axio Observer Z1 microscope with
235 Yokogawa CSU-10 spinning disk, Hamamatsu ORCA-AG camera, and Zeiss 63X 1.43
236 NA oil immersion lens. Excitation lasers (405 nm, 488 nm, 568 nm) were managed
237 through an LMM5 laser merge unit (Spectral Research). Images were taken in a single
238 Z-plane. Images were acquired and analyzed with Volocity 6.0 software (PerkinElmer).
239 Image analysis was performed as described for F-actin accumulation, lytic granule
240 convergence and MTOC polarization³⁶⁻³⁸. Briefly, F-actin accumulation at the synapse
241 was calculated with Volocity software (PerkinElmer) by measuring the intensity and area
242 of F-actin above a uniform threshold. Cortical actin from both effector and target cells
243 was subtracted from F-actin at the synapse so that only specific F-actin accumulation
244 was measured³⁷. For measurement of granule convergence, centroids of lytic granules

245 were detected by perforin intensity and the MTOC was detected by intensity of tubulin
246 immunostaining. Distance of granules to the MTOC was measured for each granule
247 using Volocity software; each data point represents the mean of all granules within a
248 given cell³⁸.

249

250 ***Graphing and statistical analysis***

251 Pairwise comparisons were made by Student's two-tailed t test. For cytotoxicity
252 assays, conditions were compared by ordinary one-way ANOVA with post hoc analysis
253 by Tukey's multiple comparisons test. For conjugation assays, statistical outliers were
254 identified using ROUT analysis (1%) and excluded from analysis. All graphing and
255 statistical analysis were performed with Prism 6.0 (GraphPad Software).

256

257 **Results**

258 ***Clinical history and genetic confirmation of PI3K110 δ mutation***

259 The index family consists of 3 brothers from Qatar who presented at 9 years, 5 years,
260 and 1 year of age, respectively, due to diffuse lymphadenopathy, hepatosplenomegaly,
261 and persistently elevated EBV PCR titers. X-linked lymphoproliferative disease,
262 autoimmune lymphoproliferative syndrome, and hemophagocytic lymphohistiocytosis
263 were excluded, and the family returned to Qatar without a formal diagnosis. They
264 returned 4 years later for further evaluation. The older brother had developed
265 bronchiectasis and mild pulmonary fibrosis in the interim due to recurrent pneumonias.
266 They otherwise denied any other recurrent infections. The parents denied
267 consanguinity, and the 3 siblings had 2 other older twin brothers who were healthy.

268 Immunologically, the 3 affected boys had markedly elevated transitional B cell
269 percentages and poor antibody responses to polysaccharide antigens. Whole exome
270 sequencing was performed and revealed the presence of a heterozygous missense
271 *PIK3CD* E525K mutation in the 3 affected brothers; the 2 twin siblings carried wild-type
272 *PIK3CD* sequences (see Supp. Table 2 for other variants found at low frequency within
273 the EXaC database). The father was noted to have 6 variant reads out of 38 total reads,
274 suggestive of mosaicism^{29, 30} or heterozygosity. As the resolution of Sanger sequencing
275 did not permit us to determine whether the father was truly heterozygous (Supp. Fig
276 1A), we performed deep sequencing of the region of interest, generating greater than
277 200,000 reads (Supp. Fig 1B). This analysis confirmed the presence of the
278 heterozygous mutation in the 3 affected siblings and homozygosity of the wild-type
279 allele in the unaffected brothers. The father was found to have full heterozygosity at this
280 locus, with 49% of reads having the mutation present in the affected children.
281 Unfortunately, unfortunately the father had returned to Qatar and was not available for
282 further immunologic or clinical evaluation.

283 We identified further individuals with *PIK3CD* mutations. First, we were
284 introduced to a 5-year-old asymptomatic boy who had clinical whole exome sequencing
285 performed due to mild developmental delay. The results incidentally revealed the
286 presence of a single heterozygous E1021K mutation in *PIK3CD*, which was confirmed
287 by clinical Sanger sequencing. This subject was also noted to have an elevated
288 transitional B cell percentage (over 20% of CD19⁺ B cells) and lack of response to
289 polysaccharide antigens. Serologic and PCR testing showed that he had never been
290 previously exposed to EBV. Next, we obtained samples from 5 previously reported

291 subjects and one unreported individual who had *PIK3CD* mutations identified by whole
292 exome or targeted sequencing²³. Three of the 6 subjects carried the E525K mutation, 2
293 had the E1021K mutation, and 1 patient had the N334K mutation (summarized in Table
294 1). As previously described^{23, 24}, the E1021K mutation is located within the kinase
295 domain of PI3K110 δ and the E525K mutation is found within the helical domain (Supp.
296 Fig 1C).

297

298 ***NK cells from PI3K110 δ patients have decreased natural and antibody-mediated***
299 ***cytotoxicity***

300 NK cells from PI3K110 δ mutant mice have decreased natural cytotoxicity^{22, 39}
301 and PASLI/APDS1 patients show susceptibility to viral infection. As NK cells participate
302 in antiviral defense, we tested the function of patient NK cells using Cr⁵¹ release assays
303 against susceptible K562 target cells in the presence or absence of IL-2. Patients
304 showed decreased cytotoxic function, although interestingly stratification based on
305 mutation was observed for both unstimulated and IL-2 stimulated cells (Fig 1A). Patients
306 with E525K and N334K mutations had a greater reduction in NK cell lytic function than
307 those with E1021K mutation relative to grouped healthy controls. While response to IL-2
308 was minimal in patients with E525K mutations, a relative increase in cytolytic function in
309 response to IL-2 in patients with E1021K and N334K mutations was noted (Fig 1A). We
310 further evaluated the cytolytic capacity of patient NK cells by calculating lytic units
311 required to lyse 10% of K562 target cells following adjustment for the frequency of NK
312 cells within the PBMC population (Fig. 1B). With the exception of Patient 5, patient NK
313 cells had reduced lytic capacity when directly compared to the healthy donor control

314 used for their respective assays. Following IL-2 stimulation, the response was varied but
315 consistently lower than control, including for Patient 5 who had minimal cytotoxic
316 function in response to IL-2 when compared to control.

317 To determine the effect of PI3K110 δ mutation on antibody-mediated cellular
318 cytotoxicity (ADCC), Raji target cells were coated with rituximab, and cytotoxicity assays
319 were performed as above. While Raji cells in the absence of antibody were not lysed
320 (not shown), the presence of antibody led to effective killing of targets by controls.
321 However, patient NK cells had significantly decreased function regardless of mutation
322 (Fig. 1B). Taken together, these results show severely impaired NK cell function in
323 patients with gain-of-function PI3K110 δ mutations, producing significantly reduced
324 cytolytic function towards both susceptible tumor cells and antibody-coated targets.

325

326 ***PI3K110 δ mutation leads to skewed NK cell developmental phenotypes in human***
327 ***NK cells***

328 Alteration of PI3K function in mice is known to lead to reduced NK cell numbers
329 with altered NK cell developmental subsets^{22, 39}. In addition, patients with PI3K110 δ
330 gain-of-function mutations have some variability in NK cell numbers and altered T cell
331 subsets due to premature senescence^{25,23}. To fully explore the NK cell phenotype in
332 these patients, we performed quantitative flow cytometry analysis with 40 parameters
333 including NK cell surface receptors, intracellular cytokines, and markers of NK cell
334 activation (Supplemental Table 1). To visually compare the distribution of phenotypic
335 subsets between healthy donor and patient samples and to identify novel populations,
336 we performed visual spanning tree progression of density normalized events

337 (SPADE)⁴⁰. Analysis was performed on flow cytometry data of 8 key NK cell maturation
338 markers following gating for CD56⁺CD3⁻ NK cells from 2 patients with E525K mutations
339 and 5 healthy donors from 3 independent experiments. Consistently, Patients 1 and 3
340 (E525K mutation) had unique subsets preserved between the two patients that were not
341 seen in healthy donors (Fig 2). Healthy donor populations from 5 individuals were
342 remarkably similar when visualized by SPADE given the known intra-individual
343 heterogeneity in NK cell subsets (Fig 2, not shown)^{41, 42}.

344 Guided in part by our SPADE analysis, we identified markers of interest that were
345 differentially expressed on patient cells compared to healthy controls. To quantitatively
346 compare these, we performed pairwise analyses of frequency of receptor expression
347 (percent positive) on NK cells. Since CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells represent
348 phenotypic and functional subsets, and CD56^{bright} NK cells are thought to be the
349 developmental precursors of CD56^{dim} NK cells, we quantified expression on these
350 subsets individually. As previously described, we saw significant reduction in NK cell
351 numbers in many PI3K110δ patients²³ (Fig 3A). While the frequency of patient
352 CD56^{bright} cells was normal (Fig 3B), skewing of the NK cell phenotype towards a
353 generally immature one was present, with a decrease in CD16 and increase in NKG2A
354 expression on CD56^{dim} NK cells (Fig 3C). Further, CD62L and CD127 expression were
355 decreased on CD56^{bright} NK cells, and CD122 expression was diminished on both
356 subsets (Fig 4C). In contrast to the phenotype observed in the mouse model, no
357 detectable difference in CD27 expression was observed on patient NK cells (not
358 shown)²². Granzyme B and CD57 were also unchanged between patient and healthy
359 donor cells, in contrast to the phenotype of effector T cells in these patients²³.

360 Intracellular IFN γ expression in response to PMA/ionomycin stimulation was lower in
361 patient NK cells, although not significantly. While TNF α expression was also not
362 affected, a significant decrease in GM-CSF expression by patient NK cells was
363 observed (Supp. Fig. 2). Taken together, these results indicate an alteration in NK cell
364 phenotype or activation state. These effects are independent of global NK cell
365 development when taken in light of the normal distribution of CD56^{bright} and CD56^{dim}
366 subsets. Furthermore, they are distinct from effects on both murine NK cells and human
367 CD8⁺ effector cells, which have unique markers affected by PI3K110 δ mutation.
368 Collectively, however, they likely at least partially account for the loss of cytotoxic
369 function in patient NK cells.

370

371

372 ***Impaired conjugate formation, ERK phosphorylation and lytic machinery***
373 ***polarization in PI3K110 δ NK cells***

374 To further probe the mechanism of cytotoxic dysfunction, we sought to identify
375 the affected stage(s) of PI3K110 δ patient NK cell-mediated killing of target cells. The
376 initial stage of NK cell cytotoxicity is recognition and conjugate formation leading to firm
377 adhesion (reviewed in⁴³). Given the requirement for F-actin rearrangement in conjugate
378 formation and the potential impact of deregulated PI3K activity on this pathway, we
379 analyzed the frequency of NK- target cell conjugate formation by FACS. Differentially
380 labeled NK cells and targets were mixed and allowed to form conjugates for 0, 10, 20,
381 30 and 60 minutes. Despite comparable expression of integrins and activating receptors
382 between healthy donors and patient cells (not shown), NK cells from PI3K110 δ patients

383 showed a trend towards lower conjugate formation that was significant in patients with
384 E1021K mutations at later time points (60 minutes: HD 7.9±1.9%; E525K 4.4±0.7%;
385 E1021K 1.9±0.4%) ($p < 0.05$ by one-way ANOVA, Fig 4A).

386 PI3K110 δ catalytically inactive mutant mice show impaired signaling in the MAPK
387 pathways, specifically phosphorylation of JNK1/2²² and *Pik3cd*^{-/-} *Pik3cg*^{-/-} mice have
388 defective ERK1/2 signaling³⁹. To test this pathway in patient cells, we performed
389 intracellular FACS for phosphorylated ERK1/2, JNK1/2 and p38 following NK cell
390 activation by PMA and ionomycin. While phosphorylation of JNK1/2 and p38 were intact
391 in patient cells, the percentage of NK cells with ERK1/2 phosphorylation was
392 significantly reduced in patients with both E525K and E1021K mutations 15 minutes
393 following activation (HD 43.3±9.2%; E525K 7.2±2.2%; E1021K 9.2±1.4%) ($p < 0.05$ by
394 one-way ANOVA, Fig 4B).

395 Upon conjugate formation and activating signaling, NK cells rapidly converge lytic
396 granules to the MTOC, which is followed by the effector stage of cytotoxicity, marked by
397 accumulation of F-actin and polarization of lytic granules and the MTOC to the
398 immunological synapse^{38, 43}. To further investigate the impact of impaired PI3K110 δ
399 signaling on NK cell lytic function, we performed quantitative analysis of the polarization
400 of lytic machinery in NK cells conjugated to susceptible target cells and imaged by
401 confocal microscopy (Fig. 4C). While healthy donor NK cells had accumulation of F-
402 actin following conjugation to target cells, aggregation of F-actin at the immunological
403 synapse was significantly decreased in all patient cells tested, regardless of mutation
404 (Fig 4D). Furthermore, significant defects in the convergence of lytic granules to the

405 MTOC and MTOC polarization were present in the E525K cohort (Fig 4D). Interestingly,
406 these parameters were not significantly affected in the E1021K patients.

407

408 ***Partial increase in NK cell function following initiation of treatment with***
409 ***rapamycin***

410 Rapamycin treatment has proven relevant for the amelioration of symptoms in
411 PI3K110 δ patients²³. To determine the specific effect of treatment on NK cell function,
412 we evaluated NK cell cytotoxicity in Patients 1-3 both prior to initiation of rapamycin and
413 following the establishment of treatment. While NK cell number increased in one patient
414 only (Fig 5A) and cell surface receptor phenotype was not significantly changed (not
415 shown), improvement in the specific lysis of K562 target cells was seen in all three
416 patients (Fig 5B). When normalized to healthy donor controls, the mean specific lysis at
417 50:1 effector to target for all three patients was raised from 0.14 ± 0.01 to 0.49 ± 0.1
418 ($p<0.01$, Fig 5B). Finally, to ascertain if this increase in cytotoxic function correlated with
419 a restoration of previously impaired effector mechanism, we re-evaluated NK-target
420 conjugates by confocal microscopy. We found that following the establishment of
421 rapamycin therapy in the patients, who had all failed to accumulate F-actin at the
422 synapse previously, we now observed that F-actin rearrangement was comparable to
423 that of healthy donor controls (Fig 5C). Therefore, the increase in NK cell function
424 following mTOR inhibition in PI3K110 δ patients is at least partly attributable to
425 restoration of cytolytic machinery.

426

427 **Discussion**

428 The PI3K signaling axis is important in NK cell biology, as demonstrated by studies in
429 both mouse^{22, 39} and humans^{23, 24, 44}. In particular, the PI3K signaling pathway is
430 required for the development of NK cells in mouse^{22, 39} and the polarization of lytic
431 machinery during human NK cell-mediated killing of target cells⁴⁵. The recent
432 description of patients with gain-of-function mutations in *PIK3CD* highlights the
433 importance of balanced signaling through this pathway in human health, as patients
434 suffer severe lymphoproliferative disease and immunodeficiency. The prevalence of
435 EBV disease, a hallmark of NK cell dysfunction, and the documented role for this
436 signaling pathway in NK cell function led us to investigate further the functional and
437 developmental phenotype of NK cells in these patients. Here we show that in addition to
438 the reduced NK cell number seen in some PI3K110 δ patients²³, significant impairments
439 in NK cell phenotype and function exist in patients with *PIK3CD* gain-of-function
440 mutations.

441 Previous studies of murine models have revealed both developmental and
442 functional abnormalities in NK cells following disruption of PI3K110 δ . Loss of PI3K110 δ
443 function leads to reduced NK cell number in the periphery and an immature phenotype
444 when combined with loss of the PI3K110 δ α subunit³⁹. Catalytically inactive PI3K110 δ
445 results in a similar phenotype, with a block in NK cell development leading to decreased
446 NK cell numbers and specific decrease in the CD27^{hi} mature population²². In both
447 previous studies, developmental defects were accompanied by specific loss of NK cell
448 function, as impairment in JNK1/2 and ERK1/2 activation leads to defective in vitro and

449 in vivo tumour clearance^{22, 39}. We have now demonstrated that hyperactive PI3K110 δ
450 function in humans leads to similar NK cell derangements.

451 The careful examination of the NK cell phenotype in PI3K110 δ patients shows
452 select developmental defects. Interesting conserved defects were observed between
453 the gain-of function mutations in our patients and murine loss-of-function models. This
454 semblance includes the immature NK cell phenotype seen in patient cells, although this
455 defect is not as absolute as the halt in NK cell development seen in the mouse model.
456 The presence of CD27 at comparable levels to healthy donors is a notable difference,
457 although the significant divergence between mouse and man in terms of NK cell
458 development may also account for this discrepancy. Whereas human NK cells are
459 defined largely phenotypically and functionally by CD56 density, with CD56^{bright} being
460 the cytokine producing subset and CD56^{dim} the predominantly cytotoxic subset, murine
461 NK cells do not express a CD56 homologue. As human NK cells are thought to pass
462 first through the CD56^{bright} stage and then mature to the CD56^{dim} stage, it has been
463 difficult to completely correlate these stages in the mouse. However, a surrogate
464 scheme based on CD27 and CD11b (Mac-1) density has been designed in terms of
465 function⁴⁶, and thus the lack of CD27^{hi} NK cells in the mouse model is reflective of a
466 block in maturation. That said, the relative frequency of CD56^{bright} and CD56^{dim} cells was
467 not directly affected in the patients we examined. Instead, other very consistent
468 differences were observed that indicated a less mature NK cell functional phenotype in
469 patients.

470 These phenotypic changes were initially illuminated by SPADE analysis that
471 showed unique NK cell subsets in patient cells relative to healthy donors. Further

472 analysis showed a generally immature CD56^{dim} population, with decreased CD16 and
473 increased NKG2A expression. Interestingly, both CD56^{bright} and CD56^{dim} subsets had
474 decreased CD122 expression, which could indicate that at least some of the functional
475 hyporesponsiveness shown by patient NK cells is due to decreased IL-2 mediated
476 activation. While CD56^{dim} NK cells appeared less mature, the CD56^{bright} NK cells in our
477 patients had decreased CD62L and CD127 receptors, and it would be of interest to
478 determine whether patient T cells were similarly affected and whether this decreased
479 expression contributes to the T cell phenotype seen in these patients^{23, 24, 44}.
480 Interestingly, CD56^{bright} NK cells appeared to have normal cytokine production, including
481 IFN γ , upon stimulation, and levels of granzyme B were not affected unlike in cytotoxic T
482 lymphocytes²³.

483 The significance of the differences between the mutations is not entirely clear.
484 While both E525K and E1021K result in impaired NK cell cytotoxic function and
485 seemingly similarly affect NK cell number and phenotype, the E1021K mutation had a
486 significant effect on conjugate formation, whereas the E525K mutation had a greater
487 effect on polarization of lytic machinery following the formation of conjugates. The
488 E1021K mutation, located in the kinase domain, has been shown to increase membrane
489 association and kinase activity^{24, 47}. In contrast, both N334K and E525K mutations
490 interrupt inhibitory interactions between the regulatory p85 α subunit and p110 δ catalytic
491 subunit, leading to a different mechanism of PI3K hyperactivation. While both mutations
492 have the effect of promoting PtdIns(4,5)P₂ phosphorylation, subtle differences may exist
493 as a result of the mislocalization of E1021K mutations that have yet to be determined.

494 Despite hyperphosphorylation of AKT as a result of both E525K and E1021K
495 mutations^{23, 24}, the effect of gain-of-function mutations on both T cells and NK cells
496 appears to be one of cellular hyporesponsiveness. This conclusion is consistent with
497 our results obtained on a single cell level by confocal microscopy image analysis. It is
498 interesting that rarer loss-of-function mutations in PI3K also lead to immunodeficiency
499 and impaired immune responses^{48, 49}, however the cellular phenotype of NK cells was
500 not specifically studied in these instances. Gain-of-function mutations in PTEN, which
501 would be predicted to have an effect counter to that of PI3K gain-of-function, also lead
502 to a very similar NK cell phenotype. Human NK cells overexpressing PTEN have
503 impaired F-actin accumulation, granule convergence and MTOC polarization as seen in
504 APDS1 patients⁵⁰. Interestingly, PI3K inhibitors also impair conjugate formation,
505 cytotoxic function and MTOC polarization⁵¹. This effect underscores the importance of
506 carefully regulated PtdIns(4,5)P₂ and PtdIns(3,4,5)P₃ signaling in NK cell cytotoxic
507 function and suggests that deregulation of this signalling globally leads to
508 hyporesponsiveness. In T cells, this hyporesponsiveness is likely due to premature
509 senescence of the effector population. However, as NK cell senescence is poorly
510 defined it is difficult to draw a parallel. The similarities between loss- and gain-of-
511 function mutations in terms of NK cell phenotype suggests that overactivation of this
512 signaling pathway leads to an inability to tune its responsiveness and may be as
513 detrimental as inactivation through loss of function. This signaling can be partially
514 restored through dampening hyperactive signaling, and inhibition of mTOR signaling is
515 effective in partially restoring NK cell function in these patients. Treatment with
516 rapamycin in our cohort led to increased cytotoxic function that was at least partially

517 attributable to increased F-actin accumulation at the NK cell synapse, a critical step in
518 NK cell cytotoxicity. Interestingly, this was independent of reversal of the phenotypic
519 changes that we detected in patient NK cells, suggesting that it may represent a partial
520 restoration of intracellular activation that has been rendered hyporesponsive in APDS
521 patient NK cells. While the exact mechanism of action is not known, the known
522 importance of the PI3K signaling pathway through AKT and mTOR in NK cells suggests
523 that re-tuning responsiveness to cytokine or activating receptor signaling may enable
524 restoration of function in patient cells. mTOR plays a role in both the generation and
525 activation of NK cells, and primary human cells from healthy donors treated with
526 rapamycin have impaired cytotoxic function, suggesting a direct role for mTOR signaling
527 in the regulation of lytic function⁵².

528 Taken together, our data confirm speculation²⁸ that extreme susceptibility to
529 herpesviral infection in APDS patients is due in part to impaired NK cell function and
530 provides additional rationale for the use of rapamycin in patients, particularly those with
531 viral illness.

532
533 **Acknowledgments:** We thank the patients and their families for their participation in
534 this study. This work was supported by NIH-NIAID Grants R01AI067946 and R01
535 AI120989 to JSO, the Jeffrey Modell Foundation, the American Society of Hematology
536 Junior Scholar Award to EMM, and NIH-NHGRFI/NHHLBI Grant U54HG006542 to the
537 Baylor Hopkins Center for Mendelian Genomics.

538
539 **Competing interests:** Baylor College of Medicine (BCM) and Miraca Holdings Inc.
540 have formed a joint venture with shared ownership and governance of the Baylor
541 Genetics (BG), which performs clinical exome sequencing. JRL is an employee of BCM
542 and derives support through a professional services agreement with the BG. JRL serves
543 on the Scientific Advisory Board of the BG. JRL has stock ownership in 23andMe, is a
544 paid consultant for Regeneron Pharmaceuticals, has stock options in Lasergen, Inc.,
545 and is a coinventor of US and European patents related to molecular diagnostics for
546 inherited neuropathies, eye diseases, and bacterial genomic fingerprinting. The
547 remaining authors declare that they have no competing interests.

548

549 **Table 1.**

patient	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
family*	N/A	N/A	N/A	F.II.1 *	E.1*	D.I.1*	B.III.1*	N/A	N/A	G.1*
mutational	E525K	E525K	E525K	E525K	E525K	E525K	E1021K	E1021K	E1021K	N334K
Clinical/immunological Phenotype										
transitional B cells	↑	↑	↑						↑	
specific ab response	↓	↓	↓						↓	
IgA				↓						↓
IgM							↑			↑
IgG						↑				↓
switched B memory				↓	↓		↓			↓
D4+					↓	↓	↓			↓
D8+ Effector				↑	↑	↑	↑			↑
D8+ Central memory				↑						
EBV	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	ND	No	Yes
lymphadenopathy	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	ND	No	Yes
hepatosplenomegaly	Yes	Yes	Yes	No	No	No	No	ND	No	ND
Other				EBV+ lymphoma	CMV	CMV				Sinopulmonary bacterial infections

550

551

552 *refers to Lucas et al, Nat Immunology 2014. Epstein-Barr virus, EBV; cytomegalovirus,

553 CMV; ND, not determined

554

555

556

557

558

559

560 **Supplemental material: Table 1 (FACS antibodies) (next page)**

561 Receptors and intracellular proteins were grouped in 5 panels as shown. Activation and
562 functional panels were performed with and without stimulation as described in Materials
563 and Methods. All panels included CD56, CD3 and CD45 to identify NK cells as
564 CD45⁺CD56⁺CD3⁻.

565

566 Supplemental Table 2. Variants detected by whole exome sequencing of the proband
567 and his affected siblings that are present at <1% frequency in the ExAC database.

	Fluorophore	Marker	Clone; Source
Anchor (all panels)	QD605	CD56	HCD56, Biolegend
	QD711	CD3	SK7, Biolegend
	PE Cy7 or APC Cy7	CD45	J.33, Beckman Coulter
Maturation	APC	CD94	DX22, Biolegend
	APC Cy7	CD34	581, Biolegend
	Pacific Blue	CD57	NC1, Beckman Coulter
	QD655	CD62L	DREG56, Biolegend
	PE Cy7	CD117	104D2, Biolegend
	CF 594	CD16	3G8, Biolegend
	FITC	IL15Ra	151303, R&D Systems
	PE	CD122	TU27, Biolegend
	PE Cy5	CD27	O323, Affymetrix eBioscience
Adhesion	Pacific Blue	CD2	39C1.5, Beckman Coulter
	PE	CD28	L293, BD Biosciences
	PE Cy7	CD11a	HI111, BD Biosciences
	CF 594	CD11b	ICRF44, BD Biosciences
	APC	CD18	6.7, BD Pharmingen
Inhibitory	APC Cy7	KLRG1	REA261, Miltenyi Biotec
	Bv421	CD158e	DX9, Biolegend
	PE Cy7	CD158a	HP-MA4, eBioscience
	FITC	CD158b	DX27, Biolegend
	AlexaFluor 700	NKG2A	131411, R&D Systems
	PE	NKG2C	134591, R&D Systems
	PE-Cy7	NKG2D	1D11, Biolegend
Function	AlexaFluor 700	IFN γ	4S.B3, Biolegend
	FITC	Perforin	δ G9, BD Pharmingen
	Pacific Blue	GM-CSF	BVD2-21C11, Biolegend
	PE Cy7	IL-10	JES3-9D7, Biolegend
	CF 594	Granzyme B	GB11, Invitrogen
	APC	IL-13	JES10-5A2
	QD655	TNF α	Mab11, Biolegend
Activating	Pacific Blue	NKp46	9E2, Biolegend
	Bv785	CD8a	RPA-T8, Biolegend
	CF 594	CD69	FN50, BD Biosciences
	APC	NKp30	P30-15, Biolegend
	AlexaFluor 700	CD25	B1.49.9, Beckman Coulter
	FITC	CD244	2-69, BD Biosciences

568

569

570

571 **References**

- 572 1. Ham H, Billadeau DD. Human immunodeficiency syndromes affecting human
573 natural killer cell cytolytic activity. *Front Immunol* 2014; 5:2.
- 574 2. Orange JS. Human natural killer cell deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*
575 2006; 6:399-409.
- 576 3. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin*
577 *Immunol* 2006; 118:1-10.
- 578 4. Voss M, Bryceson YT. Natural killer cell biology illuminated by primary
579 immunodeficiency syndromes in humans. *Clin Immunol* 2015.
- 580 5. Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132:515-
581 25; quiz 26.
- 582 6. Ham H, Guerrier S, Kim J, Schoon RA, Anderson EL, Hamann MJ, et al.
583 Deducator of cytokines 8 interacts with talin and Wiskott-Aldrich syndrome
584 protein to regulate NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 2013; 190:3661-9.
- 585 7. Mizesko MC, Banerjee PP, Monaco-Shawver L, Mace EM, Bernal WE, Sawalle-
586 Belohradsky J, et al. Defective actin accumulation impairs human natural killer
587 cell function in patients with dedicator of cytokines 8 deficiency. *J Allergy Clin*
588 *Immunol* 2013; 131:840-8.
- 589 8. Orange JS, Ramesh N, Remold-O'Donnell E, Sasahara Y, Koopman L, Byrne M,
590 et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and
591 colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl*
592 *Acad Sci U S A* 2002; 99:11351-6.
- 593 9. Orange JS, Roy-Ghanta S, Mace EM, Maru S, Rak GD, Sanborn KB, et al. IL-2
594 induces a WAVE2-dependent pathway for actin reorganization that enables
595 WASp-independent human NK cell function. *J Clin Invest* 2011; 121:1535-48.
- 596 10. Orange JS, Brodeur SR, Jain A, Bonilla FA, Schneider LC, Kretschmer R, et al.
597 Deficient natural killer cell cytotoxicity in patients with IKK-gamma/NEMO
598 mutations. *J Clin Invest* 2002; 109:1501-9.
- 599 11. Willmann KL, Klaver S, Dogu F, Santos-Valente E, Garncarz W, Bilic I, et al.
600 Biallelic loss-of-function mutation in NIK causes a primary immunodeficiency with
601 multifaceted aberrant lymphoid immunity. *Nat Commun* 2014; 5:5360.
- 602 12. Hsu HT, Mace EM, Carisey AF, Viswanath DI, Christakou AE, Wiklund M, et al.
603 NK cells converge lytic granules to promote cytotoxicity and prevent bystander
604 killing. *J Cell Biol* 2016; 215:875-89.
- 605 13. James AM, Hsu HT, Dongre P, Uzel G, Mace EM, Banerjee PP, et al. Rapid
606 activation receptor- or IL-2-induced lytic granule convergence in human natural
607 killer cells requires Src, but not downstream signaling. *Blood* 2013; 121:2627-37.
- 608 14. Zhang M, March ME, Lane WS, Long EO. A signaling network stimulated by
609 beta2 integrin promotes the polarization of lytic granules in cytotoxic cells. *Sci*
610 *Signal* 2014; 7:ra96.
- 611 15. Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. NKG2D-DAP10
612 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory
613 pathway. *Nat Immunol* 2003; 4:557-64.
- 614 16. Bonnema JD, Karnitz LM, Schoon RA, Abraham RT, Leibson PJ. Fc receptor
615 stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase in natural killer cells is associated

- 616 with protein kinase C-independent granule release and cell-mediated cytotoxicity.
617 J Exp Med 1994; 180:1427-35.
- 618 17. Cerboni C, Gismondi A, Palmieri G, Piccoli M, Frati L, Santoni A. CD16-mediated
619 activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) in human NK cells involves
620 tyrosine phosphorylation of Cbl and its association with Grb2, Shc, pp36 and p85
621 PI-3K subunit. Eur J Immunol 1998; 28:1005-15.
- 622 18. Jiang K, Zhong B, Gilvary DL, Corliss BC, Vivier E, Hong-Geller E, et al. Syk
623 regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent NK cell function. J Immunol
624 2002; 168:3155-64.
- 625 19. Upshaw JL, Arneson LN, Schoon RA, Dick CJ, Billadeau DD, Leibson PJ.
626 NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate
627 and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. Nat Immunol
628 2006; 7:524-32.
- 629 20. Vivier E, Nunes JA, Vely F. Natural killer cell signaling pathways. Science 2004;
630 306:1517-9.
- 631 21. Jiang K, Zhong B, Gilvary DL, Corliss BC, Hong-Geller E, Wei S, et al. Pivotal
632 role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells.
633 Nat Immunol 2000; 1:419-25.
- 634 22. Guo H, Samarakoon A, Vanhaesebroeck B, Malarkannan S. The p110 delta of
635 PI3K plays a critical role in NK cell terminal maturation and cytokine/chemokine
636 generation. J Exp Med 2008; 205:2419-35.
- 637 23. Lucas CL, Kuehn HS, Zhao F, Niemela JE, Deenick EK, Palendira U, et al.
638 Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic
639 subunit p110delta result in T cell senescence and human immunodeficiency. Nat
640 Immunol 2014; 15:88-97.
- 641 24. Angulo I, Vadas O, Garcon F, Banham-Hall E, Plagnol V, Leahy TR, et al.
642 Phosphoinositide 3-kinase delta gene mutation predisposes to respiratory
643 infection and airway damage. Science 2013; 342:866-71.
- 644 25. Coulter TI, Chandra A, Bacon CM, Babar J, Curtis J, Screatton N, et al. Clinical
645 spectrum and features of activated phosphoinositide 3-kinase delta syndrome: A
646 large patient cohort study. J Allergy Clin Immunol 2017; 139:597-606 e4.
- 647 26. Elkaim E, Neven B, Bruneau J, Mitsui-Sekinaka K, Stanislas A, Heurtier L, et al.
648 Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide
649 3-kinase delta syndrome 2: A cohort study. J Allergy Clin Immunol 2016;
650 138:210-8 e9.
- 651 27. Elgizouli M, Lowe DM, Speckmann C, Schubert D, Hulsdunker J, Eskandarian Z,
652 et al. Activating PI3Kdelta mutations in a cohort of 669 patients with primary
653 immunodeficiency. Clin Exp Immunol 2016; 183:221-9.
- 654 28. Lucas CL, Chandra A, Nejentsev S, Condliffe AM, Okkenhaug K. PI3Kdelta and
655 primary immunodeficiencies. Nat Rev Immunol 2016; 16:702-14.
- 656 29. Eldomery MK, Coban-Akdemir Z, Harel T, Rosenfeld JA, Gambin T, Stray-
657 Pedersen A, et al. Lessons learned from additional research analyses of
658 unsolved clinical exome cases. Genome Med 2017; 9:26.
- 659 30. Stray-Pedersen A, Sorte HS, Samarakoon P, Gambin T, Chinn IK, Coban
660 Akdemir ZH, et al. Primary immunodeficiency diseases: Genomic approaches

- delineate heterogeneous Mendelian disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139:232-45.
- 663 31. Lupski JR, Gonzaga-Jauregui C, Yang Y, Bainbridge MN, Jhangiani S, Buhay
664 CJ, et al. Exome sequencing resolves apparent incidental findings and reveals
665 further complexity of SH3TC2 variant alleles causing Charcot-Marie-Tooth
666 neuropathy. *Genome Med* 2013; 5:57.
- 667 32. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical
668 whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med*
669 2013; 369:1502-11.
- 670 33. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular findings
671 among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA* 2014;
672 312:1870-9.
- 673 34. Sanborn KB, Rak GD, Maru SY, Demers K, Difeo A, Martignetti JA, et al. Myosin
674 IIA associates with NK cell lytic granules to enable their interaction with F-actin
675 and function at the immunological synapse. *J Immunol* 2009; 182:6969-84.
- 676 35. Kotecha N, Krutzik PO, Irish JM. Web-based analysis and publication of flow
677 cytometry experiments. *Curr Protoc Cytom* 2010; Chapter 10:Unit10 7.
- 678 36. Sanborn KB, Rak GD, Mentlik AN, Banerjee PP, Orange JS. Analysis of the NK
679 cell immunological synapse. *Methods Mol Biol* 2010; 612:127-48.
- 680 37. Banerjee PP, Orange JS. Quantitative measurement of F-actin accumulation at
681 the NK cell immunological synapse. *J Immunol Methods* 2010; 355:1-13.
- 682 38. Mentlik AN, Sanborn KB, Holzbaur EL, Orange JS. Rapid lytic granule
683 convergence to the MTOC in natural killer cells is dependent on dynein but not
684 cytolytic commitment. *Mol Biol Cell* 2010; 21:2241-56.
- 685 39. Tassi I, Cella M, Gilfillan S, Turnbull I, Diacovo TG, Penninger JM, et al.
686 p110gamma and p110delta phosphoinositide 3-kinase signaling pathways
687 synergize to control development and functions of murine NK cells. *Immunity*
688 2007; 27:214-27.
- 689 40. Qiu P, Simonds EF, Bendall SC, Gibbs KD, Jr., Bruggner RV, Linderman MD, et
690 al. Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with
691 SPADE. *Nat Biotechnol* 2011; 29:886-91.
- 692 41. Angelo LS, Banerjee PP, Monaco-Shawver L, Rosen JB, Makedonas G, Forbes
693 LR, et al. Practical NK cell phenotyping and variability in healthy adults. *Immunol*
694 *Res* 2015; 62:341-56.
- 695 42. Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, Kubo J, Nemat-Gorgani N, Dogan
696 OC, et al. Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity
697 revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med* 2013; 5:208ra145.
- 698 43. Mace EM, Dongre P, Hsu HT, Sinha P, James AM, Mann SS, et al. Cell
699 biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. *Immunol Cell*
700 *Biol* 2014; 92:245-55.
- 701 44. Elgizouli M, Lowe DM, Speckmann C, Schubert D, Hulsdunker J, Eskandarian Z,
702 et al. Activating PI3Kdelta mutations in a cohort of 669 patients with primary
703 immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 2015.
- 704 45. Chen X, Trivedi PP, Ge B, Krzewski K, Strominger JL. Many NK cell receptors
705 activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule
706 polarization and cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:6329-34.

- 707 46. Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with
708 distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol* 2006; 176:1517-24.
- 709 47. Dornan GL, Siempelkamp BD, Jenkins ML, Vadas O, Lucas CL, Burke JE.
710 Conformational disruption of PI3Kdelta regulation by immunodeficiency
711 mutations in PIK3CD and PIK3R1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114:1982-7.
- 712 48. Conley ME, Dobbs AK, Quintana AM, Bosompem A, Wang YD, Coustan-Smith
713 E, et al. Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the
714 p85alpha subunit of PI3K. *J Exp Med* 2012; 209:463-70.
- 715 49. Zhang KJ, Husami, A., Marsh, R. & Jordan, M. B. Identification of a
716 phosphoinositide 3-kinase (PI-3K) p110δ (PIK3CD) deficient individual. *Journal*
717 *of Clinical Immunology* 2013; 33:673-4.
- 718 50. Briercheck EL, Trotta R, Chen L, Hartlage AS, Cole JP, Cole TD, et al. PTEN is a
719 negative regulator of NK cell cytolytic function. *J Immunol* 2015; 194:1832-40.
- 720 51. Segovis CM, Schoon RA, Dick CJ, Nacusi LP, Leibson PJ, Billadeau DD. PI3K
721 links NKG2D signaling to a CrkL pathway involved in natural killer cell adhesion,
722 polarity, and granule secretion. *J Immunol* 2009; 182:6933-42.
- 723 52. Marcais A, Cherfils-Vicini J, Viant C, Degouve S, Viel S, Fenis A, et al. The
724 metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the
725 development and activation of NK cells. *Nat Immunol* 2014; 15:749-57.
- 726
- 727

728 **Figure legends**

729

730 **Figure 1. PI3K110δ mutation results in impaired NK cell cytotoxic function.** PBMC

731 isolated from healthy donors (circles, n=18), PI3K110δ E525K patients (squares, n=6),
732 PI3K110δ E1021K patients (triangles, n=3) or PI3K110δ N334K (diamonds, n=1) were
733 incubated with A) susceptible K562 target cells in the absence (left) or presence of 1000
734 U/ml IL-2 (right). Cytotoxicity was measured by Cr⁵¹ release assay. B) Results from (A)
735 are shown as the lytic units (LU₁₀) required to lyse 10% of target cells when adjusted for
736 the frequency of NK cells within PBMC. Patient LU₁₀ is normalized to the healthy donor
737 control for each assay. C) PBMC isolated from healthy donors (circles, n=10), PI3K110δ
738 E525K patients (squares, n=4) or PI3K110δ E1021K patients (triangles, n=2) were
739 incubated with Patient Raji B cells in the presence of 20 µg/ml Rituximab. Cytotoxicity
740 was measured by Cr⁵¹ release assay.

741

742 **Figure 2. PI3K110δ mutation leads to altered NK cell subset distribution.** Flow

743 cytometry data from 8-color analysis of NK cell surface receptors associated with
744 developmental subsets on healthy donor (top) and two E525K PI3K110δ patients
745 (bottom) and was visualized by spanning analysis of density events (SPADE). Gating
746 strategy for each patient or control is shown on the left with the frequency of NK cells
747 within the lymphocyte gate. Clustering parameters are shown in the center. SPADE plot
748 node sizes and intensities are based upon cell counts as shown in the heat map legend.

749

750 **Figure 3. Pairwise analysis of differentially expressed receptors on NK cells from**

751 **patients and healthy donors.** PBMC from 5 healthy donors (black circles) and

752 PI3K110δ patients with E525K (red), E1021K (blue) or N334K (green) mutations were

753 analyzed by flow cytometry as in Figure 2. A) NK cell frequency and B) CD56^{bright} subset
754 distribution. C) NK cell receptor expression on CD56^{bright} and CD56^{dim} subsets as
755 indicated. * $p < 0.05$ by Student's two-tailed T test.

756

757 **Figure 4. Impaired conjugate formation, ERK phosphorylation and effector cell**

758 **polarization in NK cells from PI3K110 δ patients.** A) Differentially labeled NK cells

759 within PBMC and K562 targets were incubated together for times indicated, then fixed,
760 and conjugate frequency was determined by flow cytometry. Healthy donor, $n=7$;

761 E525K, $n=5$; E1021K, $n=4$. B) Intracellular phospho-ERK was analyzed by flow

762 cytometry following activation by plate bound anti-NKG2D. * $p < 0.05$ by ordinary one-way

763 ANOVA with post hoc comparison, $n=5$. C) NK cells were conjugated to K562 targets

764 then fixed, permeabilized and stained with anti-perforin, anti-tubulin and phalloidin.

765 Scale bar= $5 \mu\text{m}$. D) F-actin accumulation, lytic granule convergence and MTOC

766 polarization were measured for >25 conjugates. * $p < 0.05$ by Student's two-tailed T test.

767

768 **Figure 5. Partial restoration of NK cell function following initiation of rapamycin**

769 **treatment in PI3K110 δ patients.** A) NK cell number in three patients prior to (open

770 squares) and following initiation of (open circles) rapamycin treatment. B) Evaluation of

771 NK cell cytotoxic function without IL-2 stimulation in the same three patients relative to

772 normal controls (dashed line). C) NK cell-target conjugates were analyzed as in Figure

773 5. ** $p < 0.01$ by Student's two-tailed T test at 50:1 ratio. * $p < 0.05$ by ordinary one-way

774 ANOVA with post hoc comparison.

775

776 **Supplemental Figure 1. Genetic confirmation of PI3K110δ mutation.** A) Pedigree of
777 our proband showing affected (filled) and unaffected (open) family members
778 accompanied by the Sanger confirmation of the E525K
779 (Chr1:9780851_G>A:NM_005026:exon13:c.1573G>A) mutation. B) Schematic of
780 PI3K110δ protein showing the positions of E525K and E1021K mutations. ABD: adaptor
781 binding domain; RBD: Ras-binding domain.

782

783 Supplemental Figure 2. Intracellular cytokine staining. PBMC from 5 healthy donors
784 (black circles) and PI3K110δ patients with E525K (red) or E1021K (blue) mutations
785 were analyzed by flow cytometry following 4 hours of stimulation with phorbol myristate
786 acetate and ionomycin in the presence of Brefeldin A. A) Intracellular cytokine
787 expression in CD56^{bright} NK cells. * $p < 0.05$ by Student's two-tailed T test.

788

789

790

791

Figure 1

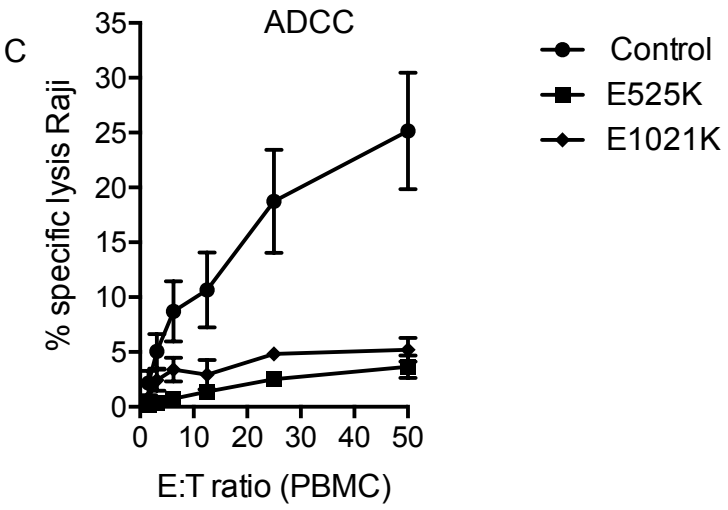
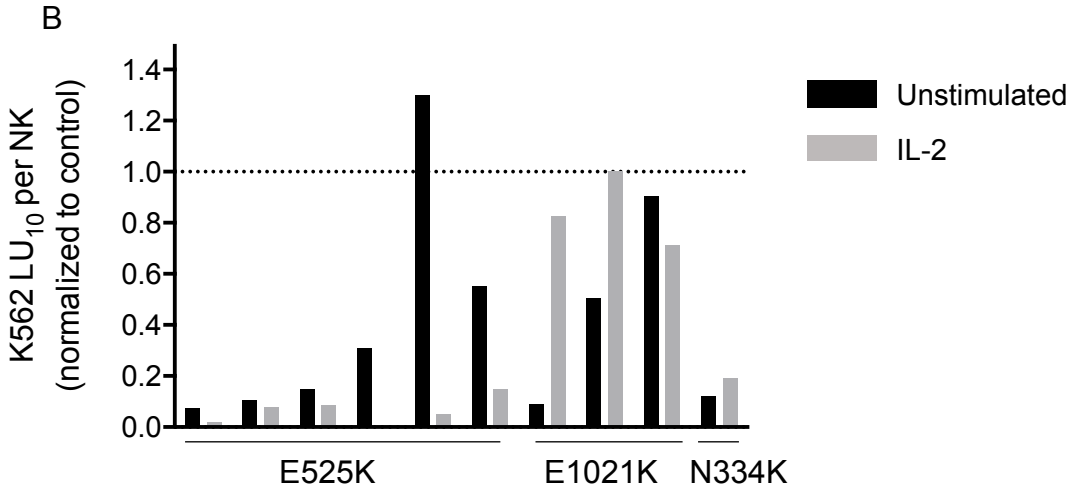
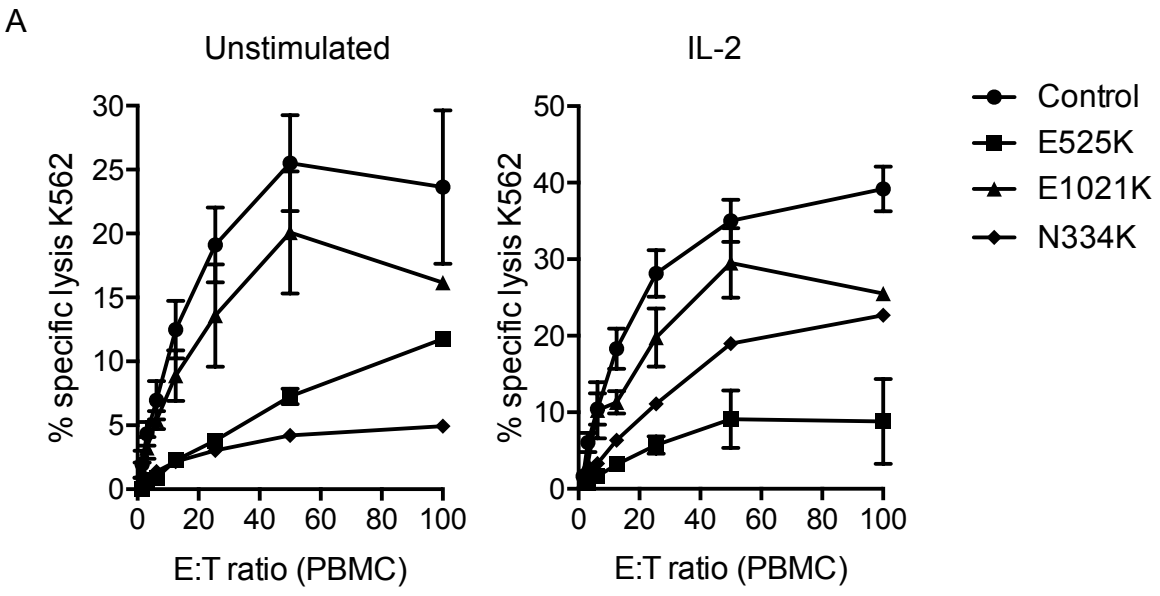


Figure 2

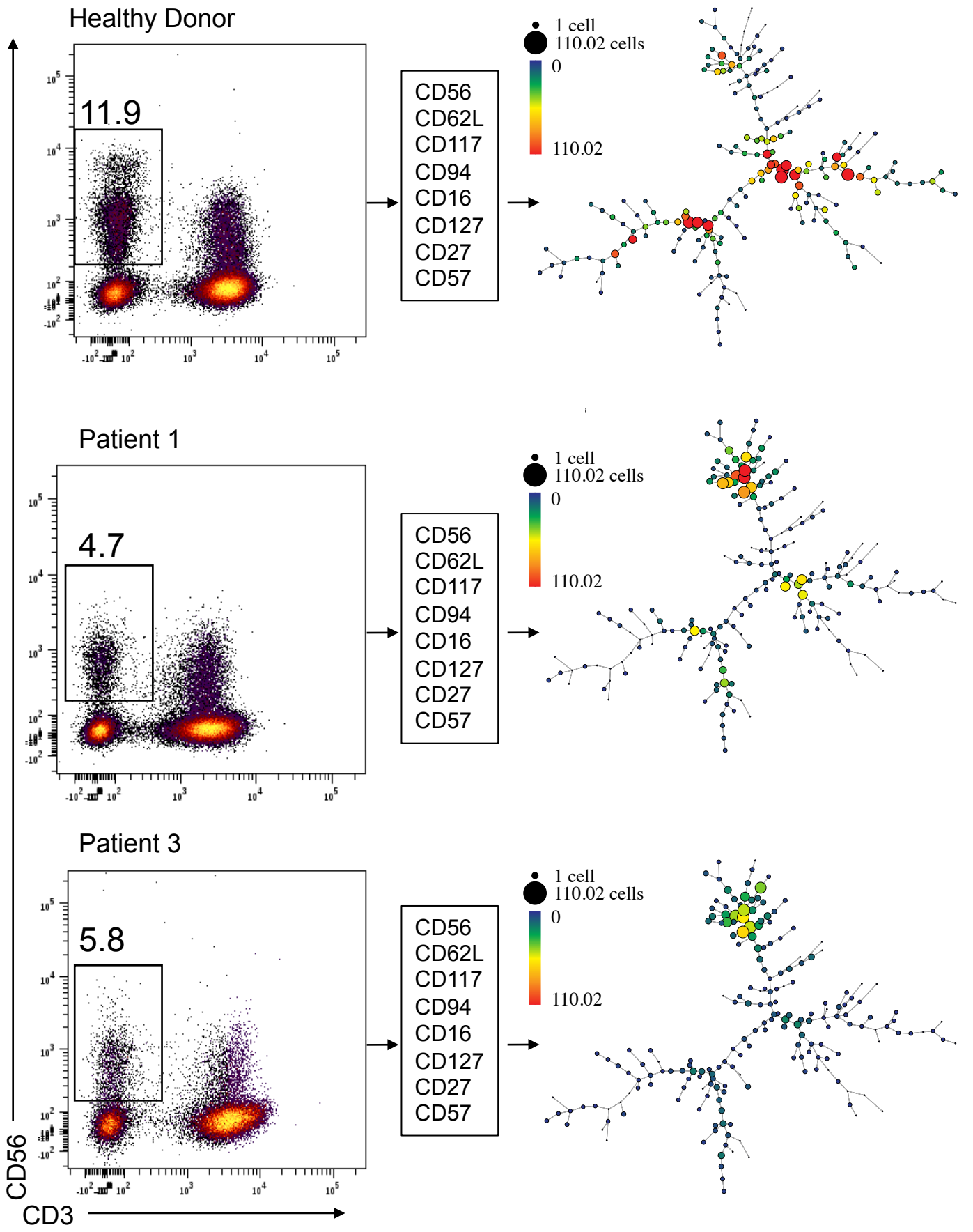
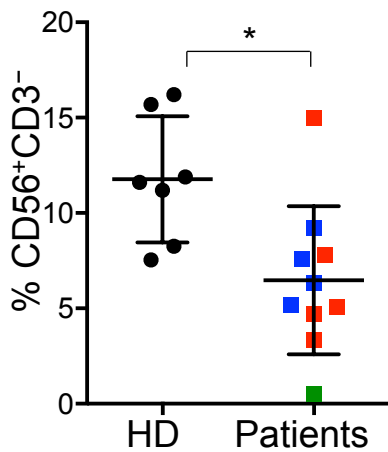
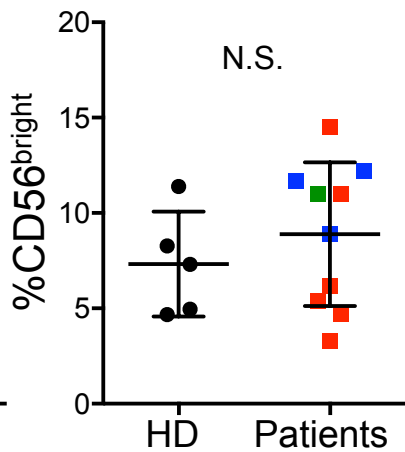


Figure 3

A



B



C

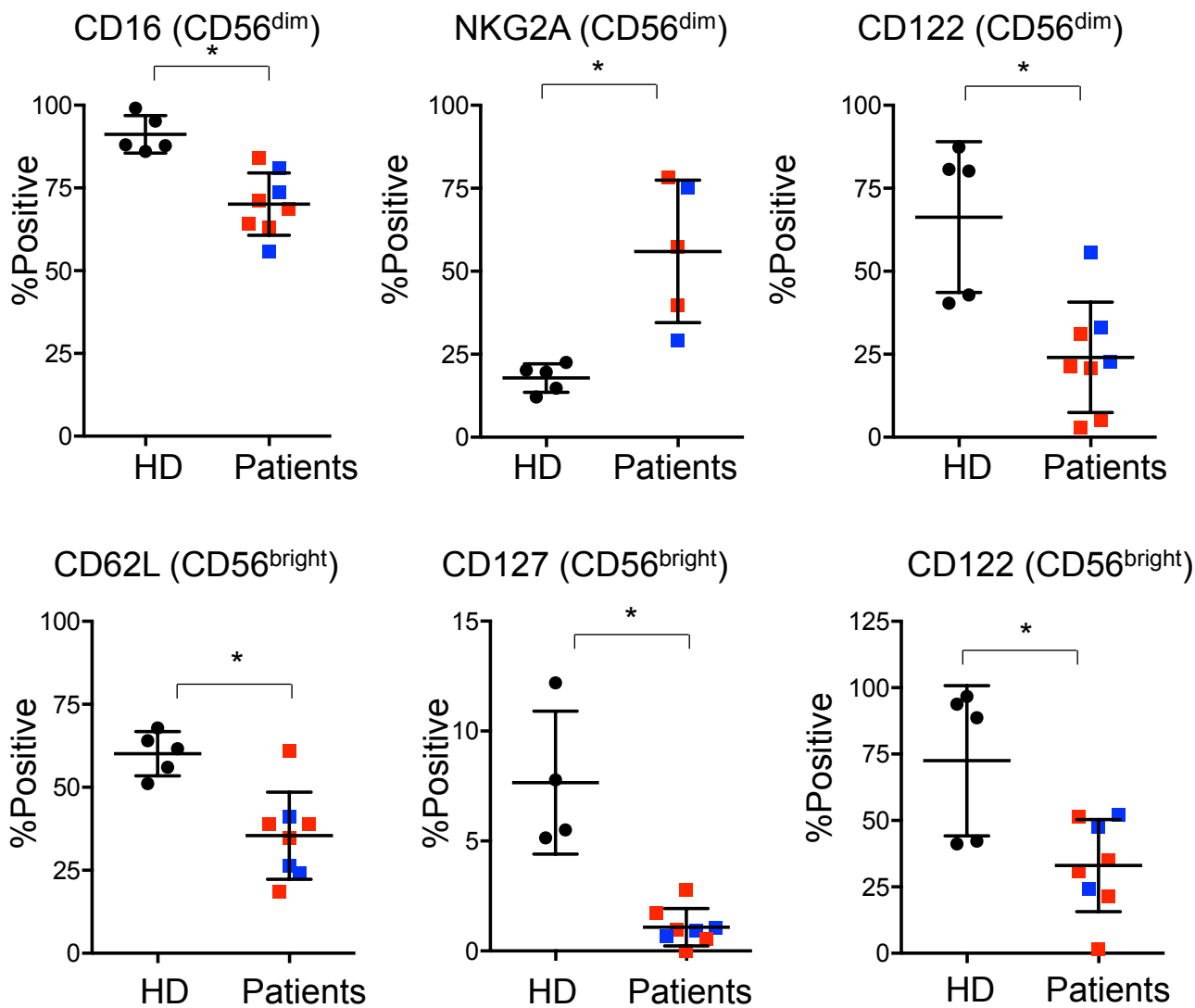
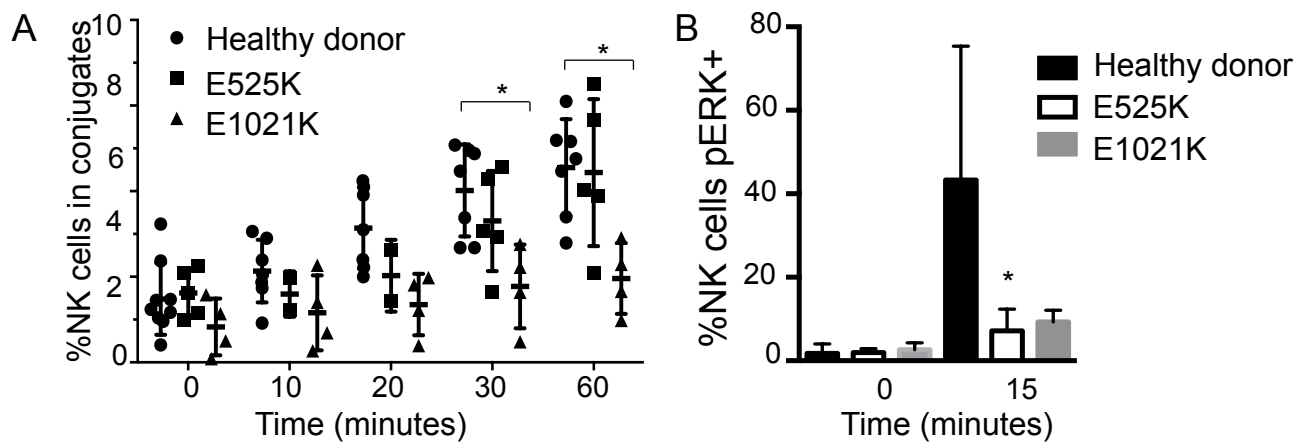
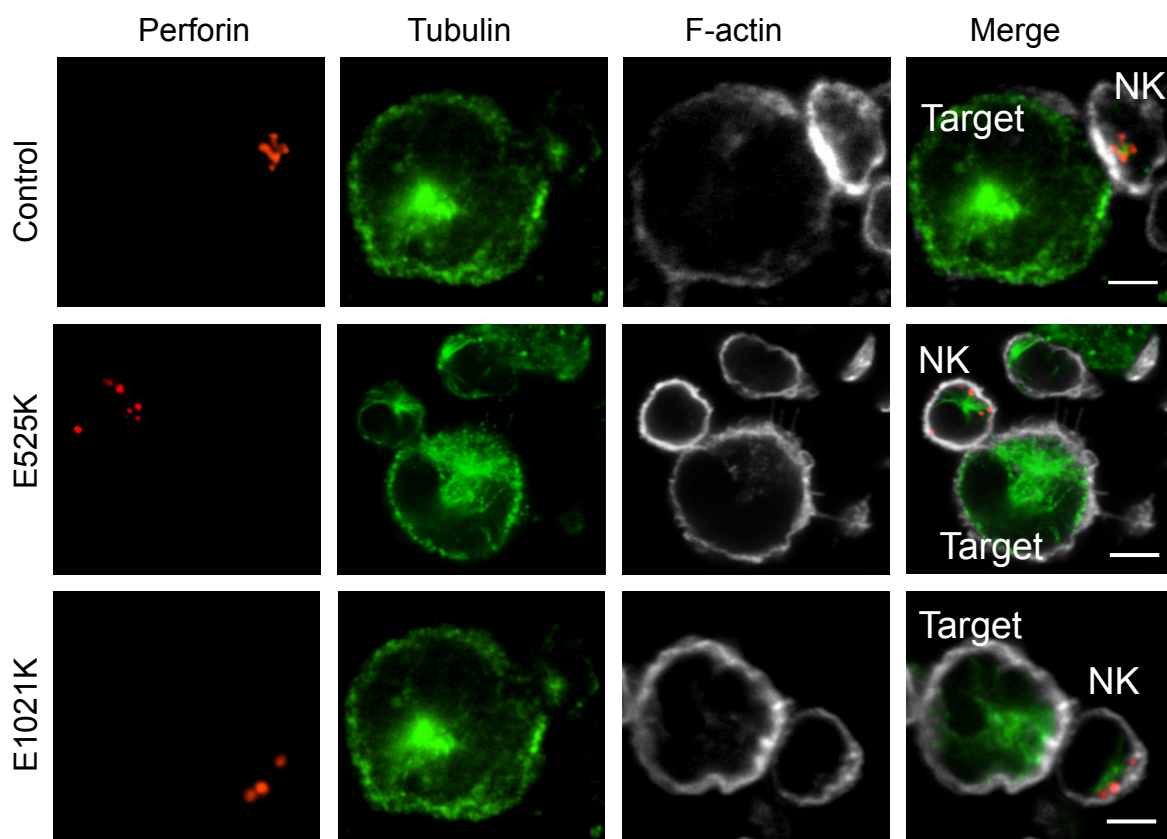


Figure 4



C



D

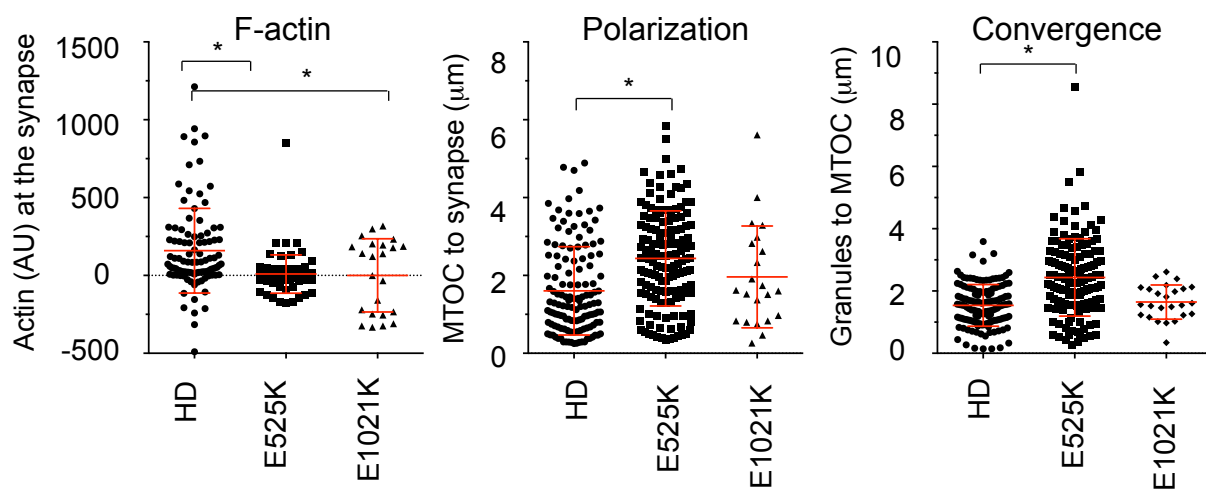
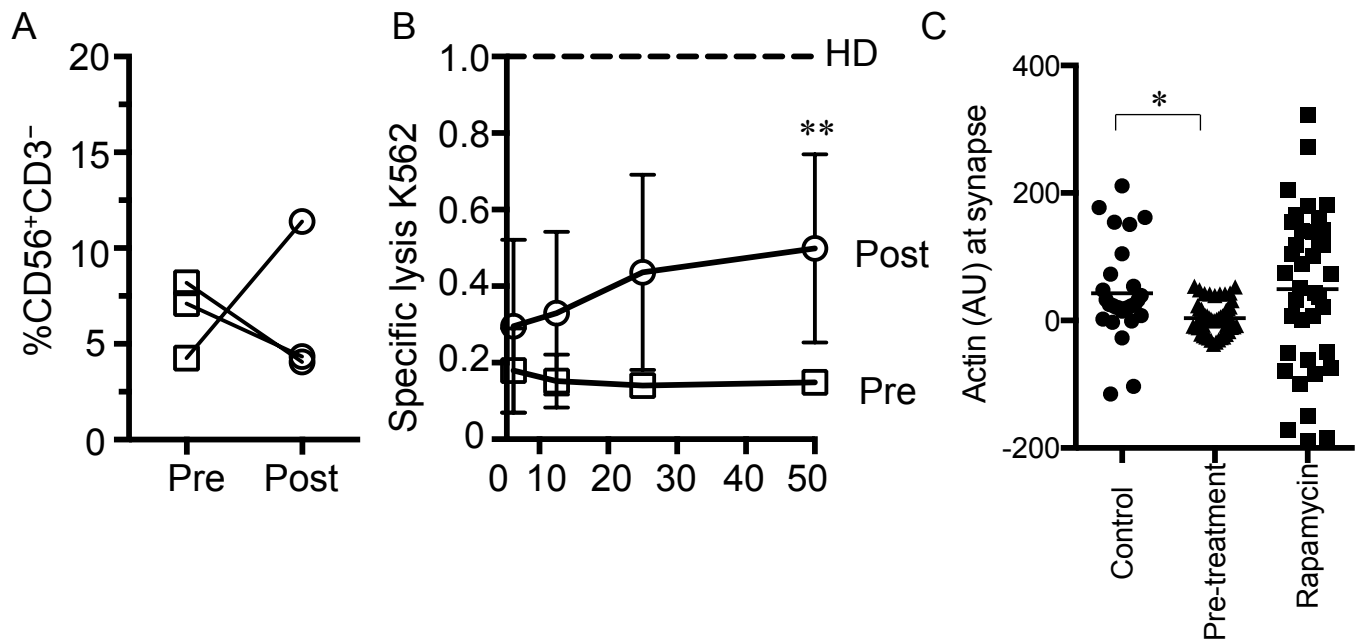
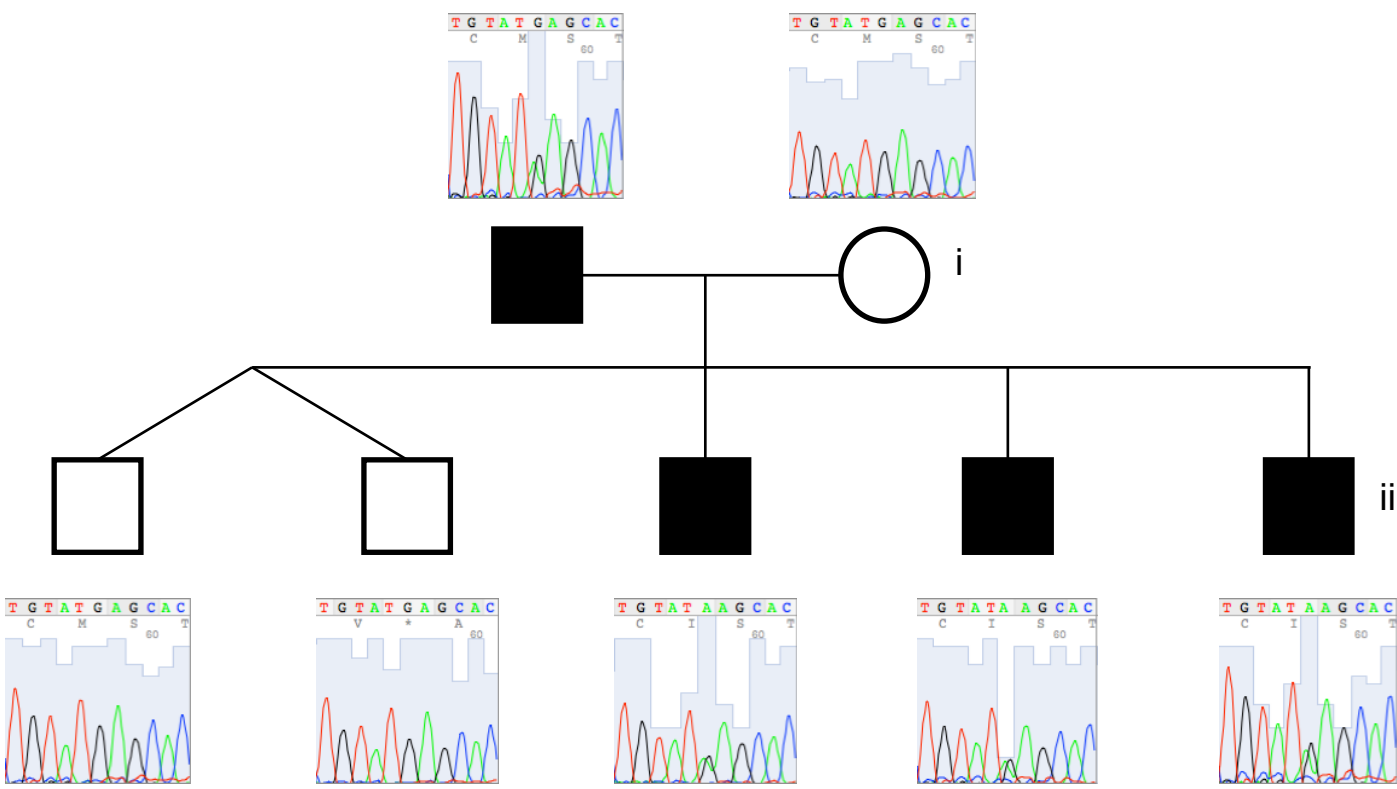


Figure 5



Supplemental Figure 1

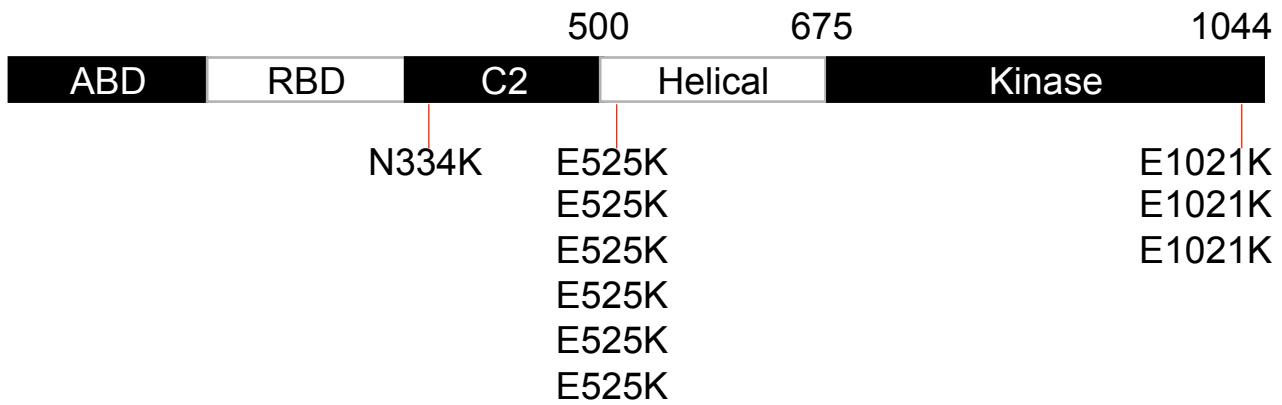
A



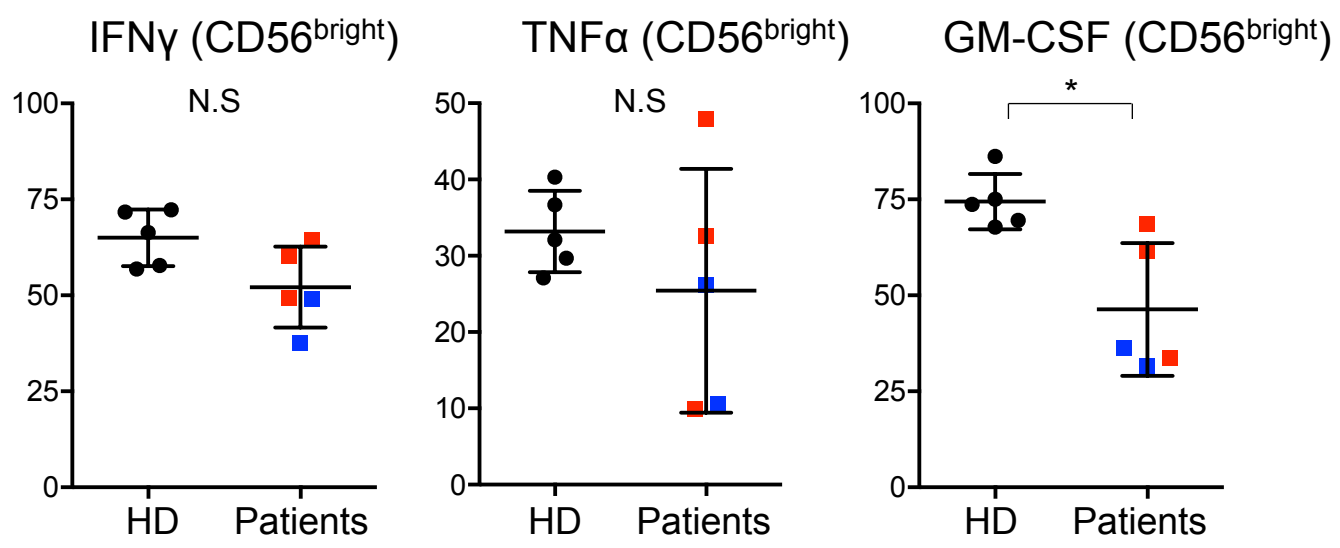
B

Family Relationship	# Mapped Reads	Variant Read Breakdown (%)			
		G (ref)	A	T	C
Father	289,095	51%	49%	1%	0.1%
Proband (Patient 1)	319,229	51%	49%	1%	0.1%
Affected Sibling (Patient 2)	238,666	51%	49%	1%	0.04%
Affected Sibling (Patient 3)	282,084	50%	49%	1%	0.1%
Unaffected Sibling	308,459	99%	0.4%	0.4%	0.01%
Unaffected Sibling	330,711	99%	0.4%	0.4%	0.01%

C



Supplemental Figure 2



IV.DISCUSIÓN GENERAL

Los ratones transgénicos deficientes en alguno de los componentes esenciales del sistema inmunológico han revelado numerosas de las incógnitas sobre el funcionamiento del mismo, e incluso nos ayudan a comprender el mecanismo fisiopatológico de numerosas enfermedades inmunológicas humanas. Sin embargo, no siempre reproducen con exactitud el fenotipo humano y por lo tanto no constituyen el modelo adecuado para el estudio de muchas enfermedades.

Son los propios modelos humanos de enfermedad como los pacientes con inmunodeficiencias primarias los que en ocasiones proporcionan las bases para el entendimiento global del sistema inmunológico. Aún así, no se conocen al completo todos los mecanismos fisiopatológicos que condicionan la susceptibilidad a infecciones, autoinmunidad, inflamación, alergias y malignidad que sufren estos pacientes.

En este estudio hemos querido profundizar en la caracterización molecular, fenotípica y funcional de pacientes con susceptibilidad a infecciones víricas y tumores y así poder aumentar el conocimiento sobre los mecanismos que provocan enfermedad así como la evolución de la misma. Esto puede establecer relaciones genotipo-fenotipo que ayuden a la interpretación de los datos clínicos y a la toma decisiones terapéuticas acordes a cada paciente.

1. La deficiencia de GATA2 provoca alteraciones en el desarrollo y función de los linfocitos NK mientras que la afectación del compartimento T es secundaria a la gravedad del espectro clínico.

El sistema hematopoyético se genera por el desarrollo progresivo de células hematopoyéticas que van adquiriendo mayor complejidad funcional, culminando

en la generación de HSC de larga duración que proporcionan al organismo todas las células sanguíneas funcionales. Este proceso está dirigido por la expresión de un pequeño conjunto de factores de transcripción hematopoyéticos esenciales que impulsan la generación de los progenitores hematopoyéticos y el destino de las células madre. Uno de los factores de transcripción más estudiados y más importantes en este proceso es GATA2. GATA2 pertenece a la familia de proteínas GATA, que juegan un papel esencial en el desarrollo de muchos tipos de células, incluyendo la línea hematopoyética, cardíaca y endodérmica. Los tres primeros factores, GATA 1, 2 y 3, son esenciales para la hematopoyesis normal, y sus mutaciones son responsables de una variedad de trastornos sanguíneos. Las mutaciones en *GATA1* adquiridas y hereditarias están relacionadas con anemia de Diamond-Blackfan, leucemia megacarioblástica aguda, trastorno mieloproliferativo transitorio y un grupo de anemias diseritropoyéticas congénitas con trombocitopenia. Por el contrario, las mutaciones de línea germinal en *GATA2* se asocian con el síndrome de deficiencia de GATA2, mientras que las mutaciones adquiridas se observan en SMD, LMA y en la transformación de la crisis blástica de la LMC. El hecho de que las mutaciones en estos genes se observen comúnmente en los trastornos sanguíneos subraya sus funciones críticas en el desarrollo hematopoyético y pone en relieve la necesidad de desarrollar terapias dirigidas para la deficiencia en los factores de transcripción.

El factor de transcripción GATA2 juega un papel crítico en el mantenimiento y supervivencia de las células madre hematopoyéticas¹⁴¹. Su ausencia en ratones *Gata2*^{-/-} causa letalidad embrionaria debido a que las células STEM hematopoyéticas no maduran correctamente hacia los diferentes linajes

hematopoyéticos¹⁶⁹ mientras que los ratones con mutaciones en heterocigosis presentan unas HSC poco longevas, lo que conduce a un número reducido de células progenitoras. Los modelos murinos siguen siendo modelos imperfectos de la deficiencia de GATA2 humana, ya que los ratones *Gata2*^{-/+} retienen la celularidad normal de la médula ósea y los recuentos de células sanguíneas periféricas y no desarrollan SMD, LMA ni otros trastornos asociados a la deficiencia de GATA2 humana.

En los seres humanos, la haploinsuficiencia de GATA2 causada por mutaciones *de novo* o autosómicas dominantes en heterocigosis causa un amplio espectro de implicaciones clínicas que van desde linfedema, predisposición a infección por micobacterias e infecciones virales hasta insuficiencia de médula ósea con SMD ó LMA. Se han descrito numerosas mutaciones en el gen *GATA2* como la causa de esta enfermedad clínicamente muy heterogénea^{136–138,140,170–172}. Éstas pueden encontrarse en varios dominios pero sobre todo están concentradas en los dominios “zinc finger” de unión al ADN. En este trabajo se presenta un análisis detallado de cuatro pacientes con deficiencia de GATA2 con clínica muy heterogénea, dos de estos pacientes presentaron mutaciones previamente descritas (p.R337X y p.T354M) mientras que los otros dos presentaron dos nuevas variantes en *GATA2*, p.M236Ifs325X y p.K378X (en los pacientes 2 y 3 respectivamente). Recientemente nuestro grupo ha caracterizado a una quinta paciente con DCML y LMA que presentó una nueva variante Leu305Val no descrita en la literatura.

GATA2 no solamente es importante en el desarrollo hematopoyético, también participa en la generación de los vasos linfáticos y el sistema auditivo, 3 de los 4 pacientes presentaron linfedema y uno de ellos también presentó sordera.

La deficiencia de GATA2 parece ser más frecuente de lo inicialmente esperado ya que representa del 7% al 15% de los casos de SMD en niños y adolescentes¹⁷³ y el 72% de los casos de monosomía del cromosoma 7¹⁷². Podría sospecharse el defecto de GATA2, al igual que en nuestra paciente P1, en aquellos niños que presenten neutropenia severa sin alteraciones de médula ósea.

En el síndrome GATA2, los monocitos, las poblaciones B, NK y DC están profundamente disminuidas o no son detectables¹⁷³. En el caso de los pacientes estudiados las DC están ausentes, lo que subraya la importancia de GATA2 como regulador esencial de la diferenciación de DC¹⁷⁴.

Aunque el número de linfocitos B se encontraba considerablemente reducido, las subpoblaciones de memoria y de cambio de clase estaban presentes, aunque dos de los cuatro pacientes presentaron una leve disminución de las células B CD27+. Sin embargo, aparentemente no se observó defecto funcional ya que la inmunización frente a vacunas permanece conservada. La población de monocitos estaba ausente en P1 y P2, que son los dos pacientes que mejor coinciden con la descripción clásica de la deficiencia de DCML, mientras que P3 y P4 tenían números de monocitos con valores cercanos a la normalidad.

En cuanto al estudio de los linfocitos T, tres de cuatro pacientes presentaron aumento de la frecuencia linfocitos T con receptor TCR $\gamma\delta$ y todos los pacientes mostraron aumento del porcentaje de linfocitos NKT. Se ha observado elevación de los linfocitos T con receptor TCR $\gamma\delta$ en otras inmunodeficiencias primarias, tales

como la deficiencia de RAG1,2^{175,176}, CD3 γ , CD3 δ ^{177,178}, o como consecuencia de la infección por CMV o de la inmunodeficiencia combinada de inicio tardío con granulomas y/o autoinmunidad¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Aunque el origen del defecto de éstas células T invariantes no está claro en los pacientes con defecto de GATA2, el número marcadamente reducido de células presentadoras de antígeno (DC, monocitos y células B) podría producir un aumento reactivo de células T con receptor TCR $\gamma\delta$ y iNKT¹⁸².

Pese a que el compartimento T de los pacientes con deficiencia de GATA2 no muestra defectos en la maduración y desarrollo se han descrito anormalidades en la distribución de las subpoblaciones. Dickinson y colaboradores describieron una cohorte de pacientes donde algunos de ellos mostraron una mayor frecuencia de células T CD8 + efectoras terminales TEMRA^{183,184}. En nuestra cohorte, los pacientes 1 y 2 con un fenotipo clínico no grave, presentaron unas subpoblaciones de linfocitos T conservadas. Por el contrario, los pacientes 3 y 4, que clínicamente mostraron un mayor score, presentaron una alteración importante del compartimento T, con elevación de marcadores de senescencia y una distribución alterada de las poblaciones naïve y de memoria. El fenotipo senescente en P3 y P4 podría estar asociado con la senescencia replicativa resultante de la estimulación antigénica continua, como se observa en otras inmunodeficiencias primarias que predisponen a infecciones víricas de repetición como la deficiencia de DOCK8^{185,186}.

Es conocida la alteración de los linfocitos NK en la deficiencia de GATA2, éstos se encuentran reducidos en número, con una deficiencia completa de la subpoblación CD56^{bright}¹⁸⁷, además de una función citotóxica inexistente. En este

trabajo hemos fenotipado extensamente la población CD56^{dim} y observamos que las células NK de los pacientes con deficiencia de GATA2 mostraron un fenotipo inmaduro/activado, con un aumento de la expresión de CD27, CD25 y CD69 y disminución de la perforina y DNAM1.

Es interesante destacar que las células NK de pacientes con deficiencia de GATA2 comparten rasgos tanto de células maduras (CD56^{dim}, Perforina+, GranzimaB+ ...) como inmaduras (aumento de expresión de CD27, CD25 y CD69 y disminución de expresión de CD16 y DNAM1). Se podría especular que estas células NK podrían estar en una etapa de maduración intermedia entre la etapa 4 y la etapa 5¹⁸⁸ en la que GATA2 juega un papel fundamental⁷⁹. La falta de DC que secretan IL12 e IL15 también puede ser un factor importante que contribuye a la alteración de la maduración y actividad de las células NK^{189,190}. Con la excepción de la disminución de expresión de CD16, en los linfocitos NK no observamos la correlación entre el score clínico y el aumento de marcadores de senescencia que observamos en el compartimento de linfocitos T.

En resumen, este estudio amplía el conocimiento de la deficiencia de GATA2 mediante una descripción detallada de las diferentes alteraciones en los compartimentos de células T y NK de pacientes con deficiencia de GATA2. Las alteraciones de las células T podrían ser cambios secundarios debido a infecciones recurrentes que conducen a la estimulación continua del antígeno, pero cualquiera que sea la base de estos cambios inmunológicos es importante señalar que están asociados con una puntuación clínica más alta. Por el contrario, la deficiencia de GATA2 produce un defecto intrínseco de células NK que parece ser independiente de la puntuación clínica. Con la limitación de que hemos estudiado

una cohorte relativamente pequeña y sería interesante analizar más pacientes con deficiencia de GATA2, nuestros datos sugieren fuertemente que el análisis de los subgrupos de linfocitos puede proporcionar un conocimiento indispensable para diferenciar entre la fase sintomática y presintomática de los pacientes con deficiencia de GATA2 que podría ayudar a tomar decisiones clínicas cuando el trasplante de progenitores hematopoyéticos sea considerado tras el diagnóstico.

2. La función citotóxica gránulo-dependiente de los linfocitos T CD8+ y NK se reduce dramáticamente debido al defecto parcial de la proteína DOCK8, sin embargo la clínica infecciosa es más leve que en los pacientes con defecto total.

Una de las actividades fundamentales del sistema inmunológico celular es eliminar las células infectadas por virus y las células tumorales. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos y los linfocitos NK vierten su contenido citotóxico almacenado en vesículas en un proceso complejo compuesto por varias etapas (reconocimiento, señalización, formación de la sinapsis, polarización, secreción y terminación) y en el que participan numerosos factores y moléculas fundamentales. Mutaciones monogénicas en alguno de los componentes que participan en este proceso impiden la correcta eliminación de patógenos y tumores en humanos produciendo inmunodeficiencia y malignidad.

El síndrome de hiper-IgE (HIES) es una inmunodeficiencia primaria caracterizada por infecciones recurrentes que afectan predominantemente a la piel y a los pulmones, con eccema crónico, niveles altos de IgE sérica y eosinofilia. El HIES tiene diversos modos de herencia, autosómica dominante causada por

mutaciones en *STAT3*¹⁹¹ y autosómica recesiva causadas en su mayoría por mutaciones en el gen *DOCK8*¹³² y en menor proporción en *TYK2* y *PGM3*^{192,193}.

En 2009 Zhang y colaboradores demostraron que mutaciones en *DOCK8*, un factor intercambiador de guanina poco conocido de la familia DOCK180, eran responsables del fenotipo clínico en pacientes con síndrome Híper IgE autosómico recesivo¹³². *DOCK8* activa la Rho GTPasa Cdc42 a través de sus dominios DHR1 y 2, ésta es esencial para el ensamblaje del esqueleto dinámico de actina-F que media la adhesión, migración y polarización celular⁹⁰.

En nuestro trabajo presentamos a un paciente con características clínicas compatibles con deficiencia de *DOCK8*, sin embargo, con una presentación de los síntomas tardía, la mayoría de los casos de *DOCK8* debutan en los primeros meses o años de vida, y con una clínica infecciosa más moderada en comparación con otros casos descritos^{130,132}.

Hasta la fecha de publicación de nuestro trabajo se habían descrito alrededor de 50 pacientes en la literatura cuyas mutaciones en *DOCK8*, en su mayoría grandes deleciones o mutaciones puntuales, provocaban la pérdida total de la expresión de la proteína ó predecían su degradación por “non-sense mediate decay”^{130,132,134}. El paciente que reportamos presentó dos mutaciones en heterocigosis, una gran deleción que afectaba los exones del 2 al 8 y otra variante también en heterocigosis que afectaba a la región de splicing del exón 17 provocando la pérdida del mismo. Sin embargo no provocaban la pérdida total de la expresión de proteína. Esto se puede deber a que la posición +5 del extremo 5’ de las regiones intrónicas que flanquean los exones está conservada pero no al 100%¹⁹⁴, por lo que podría estar produciéndose un splicing alternativo que obvie

la mutación y se produzcan transcritos normales de la proteína. En nuestro paciente comprobamos esta hipótesis al cuantificar la cantidad de transcritos WT que presentaba el paciente respecto a controles sanos, que estaba reducida pero no ausente.

Posteriormente a la publicación de nuestro trabajo Jing y colaboradores descubrieron que pacientes con deficiencia de DOCK8 pero que presentaban un fenotipo clínico más suave experimentaron reversiones somáticas de las mutaciones en *DOCK8* en determinados subgrupos celulares, lo que contribuyó a una mayor supervivencia de los pacientes¹⁹⁵. Sin embargo en nuestro caso, descartamos que el fenotipo clínico moderado se debiese a reversiones somáticas (datos no mostrados). Sobre la base de estos hallazgos, concluimos que se trataba del primer caso de deficiencia parcial de DOCK8 hasta la fecha de presentación del trabajo ya que los casos descritos con antelación provocaban la deficiencia total de la proteína^{130,132,134}.

Recientemente nuestro grupo ha caracterizado a otra paciente con una gran deleción en homocigosis en *DOCK8* que provocaba la pérdida total de la expresión de la proteína y que presentó las características clínicas e inmunológicas clásicas del defecto total de DOCK8¹⁹⁶.

La deficiencia de DOCK8 provoca alteraciones graves en el fenotipo linfocitario T¹³⁴ por lo que decidimos estudiar el impacto de la deficiencia parcial sobre las características y función del compartimento de linfocitos T. Nuestro paciente mostró una timopoyesis defectuosa ya que los TRECs no eran detectables, el reordenamiento del TCR oligoclonal y los RTE reducidos en porcentaje. Por otra parte, los niveles plasmáticos de IL-7 estaban elevados lo que

podría reflejar un intento compensatorio de la linfopenia T CD4+. Curiosamente, a pesar de la linfopenia T CD4+, la proliferación de linfocitos T en respuesta a mitógenos no se vió afectada. Al contrario de lo que ocurre en la deficiencia total de DOCK8 el fenotipo T CD8+ del paciente fue comparable a controles sanos y no presentó elevación de marcadores de senescencia. Sin embargo, pese a conservar las características normales la función citotóxica se encontraba reducida. Esto parece indicar que el defecto funcional es intrínseco al defecto molecular y que la alteración de las características fenotípicas es derivada de la estimulación antigénica prolongada debida a las numerosas infecciones que padecen los pacientes con defecto completo.

La alteración funcional de los linfocitos NK en el paciente es similar a la observada en pacientes con defecto total de la proteína. Apenas observamos alteraciones fenotípicas en el compartimento NK, salvo una ligera elevación del porcentaje de células NK CD56^{bright} con la consiguiente disminución de la porción efectora CD56^{dim}.

El fenotipo T efector alterado y el deterioro de la citotoxicidad de CD8 y NK en este paciente con deficiencia están probablemente relacionados con la alteración en la regulación de la red dinámica de actina y la formación de la sinapsis inmunológica, necesaria para la correcta activación de células T y la adquisición de funciones efectoras adecuadas.

La deficiencia total de DOCK8 se define como una inmunodeficiencia combinada profunda que compromete seriamente la vida del paciente y cuyo único tratamiento efectivo es el trasplante de progenitores. Sin embargo, en este trabajo ponemos de manifiesto la presencia de alteraciones en DOCK8 que

provocan un fenotipo clínico mucho más leve y cuyo tratamiento podría ser sintomático sin asumir los riesgos que supone el trasplante. En general, sería aconsejable estudiar a los pacientes DOCK8 en profundidad, caracterizando la expresión de la proteína, el fenotipo y la función celular para poder establecer correlaciones genotipo-fenotipo que ayuden a interpretar los hallazgos clínicos y tomar decisiones terapéuticas acordes.

3. La hiperactivación de la vía PI3K-AKT-mTOR debida a mutaciones en *PIK3CD* altera la citotoxicidad NK gránulo-dependiente y es rescatada parcialmente tras el tratamiento con rapamicina.

La vía de señalización de PI3K es importante para el correcto funcionamiento de las células NK, como se demuestra en estudios tanto en ratones^{197,198} como en seres humanos^{157,199,200}. En particular, la vía de señalización PI3K es necesaria para el desarrollo de células NK murinas^{197,198} así como para la polarización de la maquinaria lítica hacia la sinapsis NK durante el proceso de citotoxicidad celular²⁰¹. La reciente descripción de pacientes con mutaciones de ganancia de función en *PIK3CD* pone de manifiesto la importancia de la señalización equilibrada a través de esta vía para el correcto funcionamiento del sistema inmunológico, ya que éstos pacientes sufren de enfermedad linfoproliferativa severa e inmunodeficiencia, en algunos casos también comparten características de ALPS-Like. Los pacientes con APDS frecuentemente presentan infección crónica por EBV, un sello distintivo de la disfunción de las células NK, lo que nos llevó a investigar las células NK y su función en estos pacientes. En este trabajo demostramos que, además de la reducción del número de células NK visto en

algunos pacientes con mutaciones en PI3K110 δ ¹⁵⁷, existen también alteraciones significativas tanto en el fenotipo como en la función de las células NK en los pacientes con mutaciones de ganancia de función en *PIK3CD*.

Estudios previos en modelos murinos han revelado la presencia de anomalías funcionales así como en el desarrollo de los linfocitos NK tras la la expresión alterada de PI3K110 δ . La pérdida de la función PI3K110 δ conduce a un número reducido de células NK en la periferia y a un fenotipo inmaduro¹⁹⁸, concretamente una disminución específica en la población CD27hi¹⁹⁷ y la alteración en la activación de JNK1/2 y ERK1/2^{197,198}. En este trabajo hemos demostrado que la hiperactivación de la función de PI3K110 δ en humanos conduce a trastornos de los linfocitos NK similares a los modelos murinos.

El estudio del fenotipo de células NK en pacientes con alteraciones en PI3K110 δ muestra defectos en el desarrollo madurativo e incluso se observaron alteraciones similares entre las mutaciones de ganancia de función de nuestros pacientes y los modelos de pérdida de función murinos. Los linfocitos NK de los pacientes tienen apariencia fenotípicamente inmadura, aunque este defecto en la interrupción del desarrollo de los linfocitos NK no es tan evidente como el visto en el modelo de ratón. La presencia de CD27 en niveles comparables a donantes sanos es una diferencia notable con el modelo murino. Mientras que las células NK humanas principalmente se definen fenotípicamente y funcionalmente por la densidad de CD56, las CD56^{bright} son el subtipo productor de citoquinas y CD56^{dim} el subtipo citotóxico. Por el contrario, los linfocitos NK murinos no expresan un marcador homólogo a CD56. Dicho esto, la frecuencia relativa de las células CD56^{bright} y CD56^{dim} no se vio afectada directamente en los pacientes que examinamos ya

que poseían proporciones similares a los controles sanos. En cambio, se observaron otras diferencias que indicaban un fenotipo funcional de células NK menos maduro en los pacientes con GOF de PI3K110δ.

Estos cambios fenotípicos fueron revelados inicialmente por el análisis SPADE de los datos de la citometría de flujo, que mostró una distribución de las poblaciones NK única en las células de los pacientes en relación con los donantes sanos. Posteriormente, el análisis convencional de la CF mostró una población NK CD56^{dim} generalmente inmadura, con una disminución de CD16 y un aumento de la expresión de NKG2A. Curiosamente, tanto CD56^{bright} y CD56^{dim} mostraron disminución en la expresión de CD122 (cadena β del receptor de IL-2), lo que podría indicar que al menos una parte de la hiporreactividad funcional de las células NK de los pacientes se debe a la disminución de la activación mediada por IL-2. Mientras que las células NK CD56^{dim} parecían menos maduras, las células NK CD56^{bright} en nuestros pacientes con GOF PI3K110δ tenían disminución de CD62L y de CD127. Sería interesante poder estudiar si la expresión de éstos mismos marcadores se encuentra alterada en los linfocitos T de los pacientes y esto pueda explicar los cambios fenotípicos encontrados en el compartimento T de los pacientes con GOF PI3K110δ.^{157,199,200}

No queda claro si existen diferencias importantes en el fenotipo y función inmunológica según el tipo de mutación encontrada, es decir, si hay clara relación entre fenotipo y genotipo. Las mutaciones E525K y E1021K alteran la función citotóxica de los linfocitos NK y aparentemente afectan también al número de células NK y su fenotipo. Sin embargo, la mutación E1021K tuvo su principal efecto sobre la formación de conjugados, mientras que la mutación E525K tuvo un mayor

efecto sobre la polarización de la maquinaria lítica tras la formación de conjugados. Se ha demostrado que la mutación E1021K, localizada en el dominio catalítico aumenta la actividad quinasa^{156,202}. Por el contrario, las mutaciones N334K y E525K interrumpen las interacciones inhibitorias entre la subunidad p85 α reguladora y la subunidad catalítica p110 δ , lo que conduce a un mecanismo diferente de hiperactivación de PI3K. A pesar de la hiperfosforilación de AKT como resultado de ambas mutaciones E525K y E1021K el efecto final de las mutaciones de ganancia de función en las células T y las células NK resulta en una disminución de la respuesta efectora celular. Esta conclusión es coherente con los resultados obtenidos a nivel celular por microscopía confocal. Es interesante mencionar que las mutaciones de pérdida de función en PI3K también conducen a inmunodeficiencia y alteración de la respuesta inmune¹⁵², sin embargo el fenotipo celular NK no se ha estudiado en estos casos. Las mutaciones de ganancia de función en PTEN, que se prevé que tienen un efecto contrario a las de ganancia de función de PI3K, también conducen a un fenotipo NK muy similar al de los pacientes con GOF PI3K110 δ . Los linfocitos NK humanos que sobreexpresan PTEN tienen una disminución de la acumulación de actina F, de la convergencia de gránulos y de la polarización del MTOC a la sinapsis como se observa en los pacientes con APDS1²⁰³. Curiosamente, los inhibidores de PI3K también perjudican la formación de conjugados, la función citotóxica y la polarización de MTOC²⁰⁴. Este efecto subraya la importancia de la señalización regulada de PtdIns(4,5)P2 y PtdIns(3,4,5)P3 en la función citotóxica de las células NK y sugiere que la desregulación de esta señalización conduce a la hipoactividad celular global. En los linfocitos T, esta hiporreactividad puede ser debida a la senescencia prematura de

la población efectora. Sin embargo, como la senescencia de las células NK no está muy bien definida, es difícil trazar paralelismos. Las similitudes entre la pérdida y la ganancia de función de las mutaciones en cuanto al fenotipo de linfocitos NK sugiere que la sobreactivación de esta vía de señalización conduce a una incapacidad para ajustar su capacidad de respuesta y puede ser tan perjudicial como la inactivación provocada por las mutaciones de ganancia de función.

Recientemente hemos caracterizado un paciente con clínica de APDS y con una nueva mutación en *PIK3R1*, la subunidad reguladora de PI3K δ (p85), que también mostró una capacidad citolítica NK reducida.

La hiperactivación de la vía PI3K δ puede ser parcialmente restaurada a través de la inhibición de la señalización de mTOR provocando la restauración parcial de la función de las células NK de estos pacientes. El tratamiento con rapamicina en nuestra cohorte condujo a un aumento de la función citolítica que fue al menos parcialmente atribuible al aumento de la acumulación de actina F en la sinapsis de las células NK, un paso crítico en la citotoxicidad de las células NK. Curiosamente, esto fue independiente de la reversión de los cambios fenotípicos que hemos detectado en las células NK del paciente, lo que sugiere que puede representar una restauración parcial de la activación intracelular de los pacientes con APDS. Aunque no se conoce exactamente el mecanismo de acción, la importancia de la vía de señalización de PI3K a través de AKT y mTOR en células NK es suficientemente conocida y sugiere que la reactivación de la respuesta a citocinas o a la señalización de receptores activadores puede permitir la restauración de la función en las células NK de los pacientes.

En conjunto, estos datos sugieren que la susceptibilidad a la infección por herpesvirus en pacientes con APDS se debe en parte a una alteración de la función de los linfocitos NK y proporciona un fundamento adicional para el uso de la rapamicina en éstos pacientes, particularmente aquellos con enfermedad viral crónica.

4. Mutaciones en el gen *FASLG* producen síndrome linfoproliferativo autoinmune ALPS-FASLG y disminución de la citotoxicidad gránulo-independiente de linfocitos T y células B transformadas con EBV.

La citotoxicidad gránulo-independiente mediada por los receptores de muerte es esencial para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y en ella juega un papel muy importante el eje FAS/FASL. El defecto de alguna de las moléculas esenciales de esta vía en ratones provoca linfoproliferación y en humanos el síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS). Los ratones *lpr* y *gld* (homólogos a Fas y FasL humanos) desarrollan linfoproliferación del túbulo renal por lo que no son el modelo ideal para el estudio del defecto de Fas ó FasL en humanos.

El síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS) se caracteriza por la desregulación del sistema inmune producida por la incapacidad de mantener la homeostasis linfocitaria a través del proceso de apoptosis. Las consecuencias de esto incluyen la enfermedad linfoproliferativa, que se manifiesta por linfadenopatía, esplenomegalia y/o hepatomegalia, aumento del riesgo de padecer citopenias autoinmunes y linfoma. Los pacientes descritos en este trabajo presentaron al debut de la enfermedad las características clínicas como inmunológicas clásicas de ALPS, linfoproliferación, hepato-esplenomegalia,

citopenias y elevación de biomarcadores característicos de ALPS. Además, se presenta la evolución clínica de una paciente adulta previamente descrita¹⁶⁶ que desarrolló un linfoma no Hodgkin a los 21 años. En la actualidad se desconoce la incidencia y prevalencia mundial de ALPS aunque se estima que se superan los 500 casos, sin embargo, este número no ha sido confirmado de manera fiable. Numerosos pacientes con ALPS siguen probablemente sin diagnosticar debido a la penetrancia y a la expresión fenotípica variable y una constelación de síntomas que se superponen con muchas otras condiciones, en particular al síndrome de Evans y otros trastornos linfoproliferativos. Aproximadamente el 70% de los pacientes con diagnóstico molecular poseen mutaciones germinales o somáticas en *FAS*²⁰⁵. Sin embargo, mutaciones en *FASLG* y *CASP10* pueden también ser la causa de ALPS. Se han descrito además otros genes responsables de un síndrome clínico similar denominado ALPS-Like causado por mutaciones en *CASP8*, *FADD*, *KRAS*, *NRAS*, *PKCδ*, *CTLA4*, *LRBA*, *PIK3CD* y *PIK3R1*. Hasta la fecha de presentación de este trabajo sólo se habían descrito 5 pacientes con mutaciones en *FASLG*, dos de ellos con mutaciones en heterocigosis y 3 en homocigosis de entre los cuales se encuentra el primer paciente descrito con mutación en homocigosis caracterizado por nuestro grupo¹⁶⁶. En el presente trabajo se describen a dos hermanos con una nueva mutación en homocigosis en el gen *FASLG* (c.605G>C), que afecta al dominio extracelular del gen *FASLG* y causa una forma severa de ALPS. El hermano afecto del paciente 1 falleció a causa de las complicaciones clínicas provocadas por ésta enfermedad. La ausencia de síntomas clínicos en sus padres y su hermano sano, heterocigotos para la variante, sugiere una herencia autosómica recesiva de esta deficiencia de ligando de Fas. Las 6 mutaciones descritas en *FASLG* se

encuentran en varios dominios y no sugieren una correlación genotipo-fenotipo. Debido a los pocos casos de mutaciones en *FASLG*, es razonable suponer que estos últimos son o bien recesivos o dominantes con penetrancia muy baja. Se realizó la evaluación funcional del efecto de la mutación C202S sobre la citotoxicidad celular mediada por Fas/FasL que resultó estar muy disminuida probablemente debido a que la mutación en *FASLG* podría dar lugar a una proteína no funcional. Además, el defecto en la citotoxicidad celular es intrínseco al defecto de FASL ya que en la línea celular H293T transformada con *FASLG*^{C202S} se reproduce el defecto. La mutación C202S no afecta a la expresión génica de *FASLG* ya que esta se encontraba conservada tanto a nivel de RNAm como de proteína. Sin embargo no se detectó la forma soluble de la proteína sFasL, lo que podría sugerir que la mutación C202S en *FASLG* interrumpe el correcto procesamiento de la proteína por las metaloproteinasas que liberan la fracción soluble de FASL. Otra de las hipótesis es que la mutación podría afectar al sitio de unión del anticuerpo de detección de sFasL. Ésta variante podría alterar la unión o la correcta señalización a FAS debido a que los resultados confirman una reducción parcial de la AICD en blastos de células T y en líneas celulares de linfocitos B transformados con EBV, lo que demuestra que el impacto de las mutaciones C202S y A247E en la AICD es muy similar y puede indicar que otras vías están actuando en la inducción de AICD, como se ha descrito previamente en otros pacientes con ALPS-FASLG y ALPS-FAS²⁰⁶⁻²⁰⁹.

La AICD en los pacientes ALPS-FAS heterocigotos permanece conservada, mientras que en los pacientes homocigotos ALPS-FAS y ALPS-FASLG^{206,207,209} está parcialmente alterada. Probablemente la ausencia completa de señalización Fas

en los pacientes de este último grupo, con mutaciones bialélicas, causa un defecto en la AICD que puede ser detectado *in vitro*. Sin embargo, en los pacientes ALPS-FAS heterocigotos, parece que otros mecanismos Fas independientes están desempeñando un papel en la AICD capaz de compensar el defecto ya que no se detectan diferencias *in vitro*. Uno de estos mecanismos independientes de Fas podría ser la vía de perforina / granzima, especialmente relevante para las células T CD8 +, siendo el papel de esta vía para la AICD relativamente más importante en ausencia de una contribución de la vía Fas / FasL²⁰⁸. A pesar de esta posible compensación parcial, la ausencia de regulación mediada por Fas / FasL da como resultado una enfermedad grave, especialmente la linfoproliferación masiva y un mayor riesgo de linfoma. De hecho, presentamos en este trabajo a una paciente que desarrolló un linfoma de células T que hasta donde sabemos, es el primer caso reportado de linfoma en un paciente con ALPS-FASLG. Se ha estimado que el riesgo de linfomas de Hodgkin y no Hodgkin en las familias con síndrome de ALPS-FAS es 149 veces y 61 veces mayor de lo esperado respectivamente, siendo la mayoría de los linfomas de linaje B (89%)²¹⁰. Por ello decidimos estudiar si también los linfocitos B de los pacientes ALPS-FASLG mostraban defectos en la AICD como se observa en líneas de linfoblastos T que pudieran explicar los trastornos linfoproliferativos de linaje B. Observamos que las líneas de linfocitos B transformadas con EBV de los pacientes presentaban valores de AICD menores que las líneas de controles sanos, las diferencias no son muy elevadas ya que la expresión en superficie de FasL en los linfocitos B es baja.

En resumen, se describe un nuevo caso de ALPS-FASLG con un fenotipo clínico grave, con alteraciones en la citotoxicidad y AICD. Aunque la deficiencia de FasL es

muy rara, este caso representa el sexto paciente descrito y el cuarto con herencia autosómica recesiva. Además, este estudio es el primero en demostrar el defecto de AICD en linfocitos B transformados con EBV de pacientes con ALPS-FASLG, lo que sugiere que la relación entre el defecto parcial de la AICD en células T y B en pacientes ALPS-FASLG y su relación con el desarrollo de linfoma merece una investigación más exhaustiva.

V. CONCLUSIONES GENERALES

1. El estudio molecular reveló alteraciones en 4 genes diferentes (*DOCK8*, *FASLG*, *GATA2* y *PIK3CD*) asociados con inmunodeficiencias primarias y responsables de los diferentes fenotipos clínicos. Cinco de los diez pacientes presentaron mutaciones no descritas previamente en la literatura.
2. Las mutaciones encontradas en el gen *DOCK8* en el paciente con síndrome Híper IgE no truncan por completo la expresión de la proteína y las alteraciones fenotípicas de linfocitos T y NK que produce no son tan severas como en los pacientes con defecto completo. Estos hallazgos expanden el fenotipo asociado a las mutaciones en *DOCK8*.
3. La mutación C202S en *FASLG* del paciente con ALPS no afecta a la expresión génica y proteica de FasL, sin embargo, la fracción soluble es indetectable. Ésta mutación no provoca alteraciones fenotípicas en los compartimentos T y NK y el síndrome clínico correlaciona al completo con las mutaciones descritas previamente en *FASLG*. Además, reportamos el primer caso de linfoma T no Hodgkin en una paciente previamente descrita.
4. El compartimento NK de los pacientes con defecto de *GATA2* presenta elevación de marcadores fenotípicos de inmadurez sin variaciones entre los pacientes con diferente expresión clínica lo que podría indicar un origen intrínseco del defecto funcional. Sin embargo, sólo aquellos pacientes con mayor severidad clínica presentan un fenotipo T con características de memoria efectora y elevación de marcadores de activación y senescencia. Esto sugiere que este fenotipo es adquirido en respuesta a una estimulación antigénica prolongada debida a infecciones de repetición.

5. Los pacientes con mutaciones de ganancia de función en *PIK3CD* presentan alteración del fenotipo NK con características de inmadurez celular a pesar de no encontrar diferencias en la distribución de la población NK $CD56^{dim}$ y $CD56^{bright}$. Además los linfocitos NK presentaron una fosforilación deficiente de ERK1/2, implicado en la señalización a través de PI3K y necesario para la correcta actividad citolítica NK. En base a estos hallazgos se amplía el fenotipo inmunológico relacionado con las mutaciones de ganancia de función de PI3K δ .
6. Los pacientes con mutaciones en *DOCK8*, *GATA2* y *PIK3CD* presentaron defectos en la citotoxicidad gránulo-dependiente de los linfocitos NK, mientras que los pacientes con mutaciones en *FALSG* mostraron una reducción importante en la citotoxicidad mediada por receptores de muerte tras estimulación tanto en linfoblastos T como en linfocitos B transformados con EBV.
7. Tras la administración de rapamicina a los pacientes con APDS, los linfocitos NK presentaron un aumento parcial de la actividad citolítica que puede ser explicado por el aumento de la acumulación de actina-F en la sinapsis inmunológica *in-vitro*.
8. Los hallazgos moleculares y funcionales han ayudado a interpretar los datos clínicos y a orientar la toma de decisiones terapéuticas acordes para cada paciente. Los pacientes con defecto parcial en *DOCK8* no tienen indicación de trasplante hematopoyético, sin embargo, los pacientes con mutaciones en *GATA2* deben trasplantarse antes de que presenten alteraciones en el

compartimento T y la administración de rapamicina a los pacientes con ALPS y ALPS-like parece revertir los síntomas clínicos y la función inmunológica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Lauritsen, J. P. H., Haks, M. C., Lefebvre, J. M., Kappes, D. J. & Wiest, D. L. Recent insights into the signals that control alphabeta/gammadelta-lineage fate. *Immunol. Rev.* **209**, 176–190 (2006).
2. Trigueros, C. *et al.* Identification of a late stage of small noncycling pTalpha- pre-T cells as immediate precursors of T cell receptor alpha/beta+ thymocytes. *J. Exp. Med.* **188**, 1401–12 (1998).
3. Germain, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 309–322 (2002).
4. Vanhecke, D., Leclercq, G., Plum, J. & Vandekerckhove, B. Characterization of distinct stages during the differentiation of human CD69+CD3+ thymocytes and identification of thymic emigrants. *J. Immunol.* **155**, 1862–72 (1995).
5. Nel, A. E. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: Signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **109**, 758–770 (2002).
6. Intlekofer, A. M. *et al.* Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat. Immunol.* **6**, 1236–44 (2005).
7. Kaech, S. M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 749–761 (2012).
8. Brown, M. H., Cantrell, D. A., Brattsand, G., Crumpton, M. J. & Gullberg, M. The CD2 antigen associates with the T-cell antigen receptor CD3 antigen complex on the surface of human T lymphocytes. *Nature* **339**, 551–553 (1989).
9. Abbas Abul K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier **8^a ed.**, (2014).

10. Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A. & Jordan, M. S. T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 591–619 (2009).
11. Gao, G. F. & Jakobsen, B. K. Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: The molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunology Today* **21**, 630–636 (2000).
12. Kohler, S. & Thiel, A. Life after the thymus: CD31+ and CD31 human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood* **113**, 769–774 (2009).
13. Campbell, J. J. *et al.* CCR7 Expression and Memory T Cell Diversity in Humans. *J. Immunol.* **166**, 877–884 (2001).
14. Ryan, U. S. & Worthington, R. E. Cell-cell contact mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 33–37 (1992).
15. Clement, L. T. Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation. *J. Clin. Immunol.* **12**, 1–10 (1992).
16. Sugamura, K. *et al.* The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 179–205 (1996).
17. Noguchi, M. *et al.* Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* **262**, 1880–1883 (1993).
18. Hendriks, J., Xiao, Y. & Borst, J. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J. Exp. Med.* **198**, 1369–80 (2003).
19. Linsley, P. S. & Ledbetter, J. A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 191–212 (1993).
20. Krummel, M. F. & Allison, J. P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the

- response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* **182**, 459–65 (1995).
21. Malek, T. R. & Castro, I. Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity. *Immunity* **33**, 153–165 (2010).
 22. Tugores, A., Alonso, M. A., Sanchez-Madrid, F. & de Landazuri, M. O. Human T cell activation through the activation-inducer molecule/CD69 enhances the activity of transcription factor AP-1. *J Immunol* **148**, 2300–2306 (1992).
 23. Engleman, E. G., Benike, C. J., Grumet, F. C. & Evans, R. L. Activation of human T lymphocyte subsets: helper and suppressor/cytotoxic T cells recognize and respond to distinct histocompatibility antigens. *J. Immunol.* **127**, 2124–9 (1981).
 24. Francisco, L. M., Sage, P. T. & Sharpe, A. H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews* **236**, 219–242 (2010).
 25. Lopez-Vergès, S. *et al.* CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* **116**, 3865–3874 (2010).
 26. Arase, H., Arase, N. & Saito, T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J. Exp. Med.* **181**, 1235–1238 (1995).
 27. Zamai, L. *et al.* Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* **188**, 2375–80 (1998).
 28. Smyth, M. J. & Trapani, J. A. Granzymes: exogenous proteases that induce target cell apoptosis. *Immunol. Today* **16**, 202–206 (1995).
 29. Afonina, I. S., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunological Reviews* **235**, 105–116 (2010).
 30. Lichtenheld, M. G. *et al.* Structure and function of human perforin. *Nature* **335**,

- 448–451 (1988).
31. Kägi, D. *et al.* Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* **369**, 31–37 (1994).
 32. Herberman, R., Nunn, M. E. & Lavrin, D. H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int. J. Cancer* **16**, 216–229 (1975).
 33. Kiessling, R., Klein, E. & Wigzell, H. „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* **5**, 112–117 (1975).
 34. Vivier, E., Raulet, D., Moretta, A. & Caligiuri, M. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science (80-.)*. **331**, 44–49 (2011).
 35. Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P. & Diefenbach, A. Dendritic Cells Prime Natural Killer Cells by trans-Presenting Interleukin 15. *Immunity* **26**, 503–517 (2007).
 36. Paust, S. & von Andrian, U. H. Natural killer cell memory. *Nat. Immunol.* **12**, 500–508 (2011).
 37. Angelo, L. S. *et al.* Practical NK cell phenotyping and variability in healthy adults. *Immunol. Res.* **62**, 341–356 (2015).
 38. Melsen, J. E., Lugthart, G., Lankester, A. C. & Schilham, M. W. Human Circulating and Tissue-Resident CD56bright Natural Killer Cell Populations. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
 39. Yu, J., Freud, A. G. & Caligiuri, M. A. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.* **34**, 573–582 (2013).
 40. Carrega, P. & Ferlazzo, G. Natural killer cell distribution and trafficking in human

- tissues. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
41. Freud, A. G., Yu, J. & Caligiuri, M. A. Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Seminars in Immunology* **26**, 132–137 (2014).
 42. Freud, A. G. *et al.* Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* **203**, 1033–43 (2006).
 43. Lanier, L. L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**, 495–502 (2008).
 44. Vivier, E. & Ugolini, S. NK cells: receptors and functions. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, (2010).
 45. Paust, S., Senman, B. & Von Andrian, U. H. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunological Reviews* **235**, 286–296 (2010).
 46. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* **22**, 633–640 (2001).
 47. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
 48. Sabry, M. *et al.* Leukemic priming of resting NK cells is killer Ig-like receptor independent but requires CD15-mediated CD2 ligation and natural cytotoxicity receptors. *J. Immunol.* **187**, 6227–34 (2011).
 49. Comerci, C. J., Mace, E. M., Banerjee, P. P. & Orange, J. S. CD2 Promotes Human Natural Killer Cell Membrane Nanotube Formation. *PLoS One* **7**, (2012).
 50. Zheng, X., Wang, Y., Wei, H., Sun, R. & Tian, Z. LFA-1 and CD2 Synergize for the Erk1/2 Activation in the Natural Killer (NK) Cell Immunological Synapse. *J. Biol. Chem.* **284**, 21280–21287 (2009).
 51. Morice, W. G. The immunophenotypic attributes of NK cells and NK-cell lineage

- lymphoproliferative disorders. in *American Journal of Clinical Pathology* **127**, 881–886 (2007).
52. Addison, E. G. *et al.* Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology* **116**, 354–361 (2005).
53. Rodriguez, A. R. *et al.* Influence of interleukin-15 on CD8+ natural killer cells in human immunodeficiency virus type 1-infected chimpanzees. *J Gen Virol* **88**, 641–651 (2007).
54. Corbi, A. L., Larson, R. S., Kishimoto, T. K., Springer, T. A. & Morton, C. C. Chromosomal location of the genes encoding the leukocyte adhesion receptors LFA-1, Mac-1 and p150,95. Identification of a gene cluster involved in cell adhesion. *J. Exp. Med.* **167**, 1597–1607 (1988).
55. Bryceson, Y. T., March, M. E., Barber, D. F., Ljunggren, H.-G. & Long, E. O. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J. Exp. Med.* **202**, 1001–12 (2005).
56. Corbi, A. L., Kishimoto, T. K., Miller, L. J. & Springer, T. A. The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. *J. Biol. Chem.* **263**, 12403–11 (1988).
57. Orange, J. S., Chehimi, J., Ghavimi, D., Campbell, D. & Sullivan, K. E. Decreased natural killer (NK) cell function in chronic NK cell lymphocytosis associated with decreased surface expression of CD11b. *Clin. Immunol.* **99**, 53–64 (2001).
58. Béziat, V. *et al.* CD56 bright CD16 + NK Cells: A Functional Intermediate Stage of NK Cell Differentiation. *J. Immunol.* **186**, 6753–6761 (2011).
59. Mandelboim, O. *et al.* Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural

- killer cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 5640–4 (1999).
60. Sadhu, C., Harris, E. A. S. & Staunton, D. E. Enhancement of Natural Killer cell cytotoxicity by a CD18 integrin-activating antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 938–941 (2007).
61. Axberg, I., Ramstedt, U., Patarroyo, M., Beatty, P. & Wigzell, H. Inhibition of natural killer cell cytotoxicity by a monoclonal antibody directed against adhesion-mediating protein gp 90 (CD18). *Scand. J. Immunol.* **26**, 547–54 (1987).
62. Nagler, A., Lanier, L. L. & Phillips, J. H. Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *J. Exp. Med.* **171**, 1527–33 (1990).
63. Borrego, F., Masilamani, M., Kabat, J., Sanni, T. B. & Coligan, J. E. The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor. *Molecular Immunology* **42**, 485–488 (2005).
64. Chang, C. *et al.* Molecular characterization of human CD94: A type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2433–2437 (1995).
65. Lee, N. *et al.* HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5199–204 (1998).
66. Huntington, N. D. *et al.* IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* **206**, 25–34 (2009).
67. Akira Shibuya, Satoko Tahara-Hanaoka & Kazuko Shibuya. DNAM-1 (CD226): A Two-Sword Fencer for Innate and Adaptive Immunity. *Curr. Med. Chem. - Anti-inflamm. & Anti-Allergy Agents* **4**, 6 (2005).
68. Shibuya, A. *et al.* DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic

- function of T lymphocytes. *Immunity* **4**, 573–581 (1996).
69. Brown, M. H. *et al.* 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med.* **188**, 2083–90 (1998).
70. Boles, K. S. *et al.* Molecular characterization of a novel human natural killer cell receptor homologous to mouse 2B4. *Tissue Antigens* **54**, 27–34 (1999).
71. Yabe, T. *et al.* A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics* **37**, 455–460 (1993).
72. Bauer, S. *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**, 727–729 (1999).
73. Wang, H., Zheng, X., Wei, H., Tian, Z. & Sun, R. Important Role for NKp30 in Synapse Formation and Activation of NK Cells. *Immunol. Invest.* **41**, 367–381 (2012).
74. Vitale, M. *et al.* NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* **187**, 2065–72 (1998).
75. Thorén, F. B. *et al.* Human NK Cells induce neutrophil apoptosis via an NKp46- and Fas-dependent mechanism. *J. Immunol.* **188**, 1668–74 (2012).
76. Parham, P. & Moffett, A. Variable NK cell receptors and their MHC class I ligands in immunity, reproduction and human evolution. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 133–44 (2013).
77. Fu, B. *et al.* CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology* **133**, 350–359 (2011).
78. Vossen, M. T. M. *et al.* CD27 Defines Phenotypically and Functionally Different

- Human NK Cell Subsets. *J. Immunol.* **180**, 3739–3745 (2008).
79. Mace, E. M., Gunesch, J. T., Dixon, A. & Orange, J. S. Human NK cell development requires CD56-mediated motility and formation of the developmental synapse. *Nat. Commun.* **7**, 12171 (2016).
80. Pradier, A. *et al.* Peripheral blood CD56bright NK cells respond to stem cell factor and adhere to its membrane-bound form after upregulation of c-kit. *Eur. J. Immunol.* **44**, 511–520 (2014).
81. Carson, W. E., Haldar, S., Baiocchi, R. a, Croce, C. M. & Caligiuri, M. a. The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7553–7557 (1994).
82. Matos, M. E. *et al.* Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. *J. Exp. Med.* **178**, 1079–84 (1993).
83. Van Parijs, L. & Abbas, A. K. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Current Opinion in Immunology* **8**, 355–361 (1996).
84. Colucci, F., Caligiuri, M. A. & Di Santo, J. P. What does it take to make a natural killer? *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 413–425 (2003).
85. Stinchcombe, J. C. & Griffiths, G. M. Secretory Mechanisms in Cell-Mediated Cytotoxicity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 495–517 (2007).
86. Orange, J. S. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 713–725 (2008).
87. Grakoui, A. The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science (80-)*. **285**, 221–227 (1999).
88. Wulfig, C., Purtic, B., Klem, J. & Schatzle, J. D. Stepwise cytoskeletal polarization as a series of checkpoints in innate but not adaptive cytolytic killing.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7767–72 (2003).
89. Mace, E. M., Zhang, J., Siminovitch, K. A. & Takei, F. Elucidation of the integrin LFA-1-mediated signaling pathway of actin polarization in natural killer cells. *Blood* **116**, 1272–1279 (2010).
90. Harada, Y. *et al.* DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood* **119**, 4451–4461 (2012).
91. Mentlik, A. N., Sanborn, K. B., Holzbaur, E. L. & Orange, J. S. Rapid lytic granule convergence to the MTOC in natural killer cells is dependent on dynein but not cytolytic commitment. *Mol. Biol. Cell* **21**, 2241–56 (2010).
92. Quann, E. J., Merino, E., Furuta, T. & Huse, M. Localized diacylglycerol drives the polarization of the microtubule-organizing center in T cells. *Nat. Immunol.* **10**, 627–635 (2009).
93. Jiang, K. *et al.* Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nat. Immunol.* **1**, 419–425 (2000).
94. Elstak, E. D. *et al.* The munc13-4-rab27 complex is specifically required for tethering secretory lysosomes at the plasma membrane. *Blood* **118**, 1570–1578 (2011).
95. Krzewski, K. & Coligan, J. E. Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Frontiers in Immunology* **3**, (2012).
96. Chen, J. Regulation of the Proinflammatory Effects of Fas Ligand (CD95L). *Science (80-.)*. **282**, 1714–1717 (1998).
97. Henkler, F. *et al.* The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J. Cell Biol.* **168**, 1087–1098 (2005).

98. Mitsiades, N., Yu, W., Poulaki, V., Tsokos, M. & Stamenkovic, I. Matrix Metalloproteinase-7-mediated Cleavage of Fas Ligand Protects Tumor Cells from Chemotherapeutic Drug Cytotoxicity Matrix Metalloproteinase-7-mediated Cleavage of Fas Ligand Protects Tumor Cells from Chemotherapeutic Drug Cytotoxicity. *Cancer Res.* **61**, 577–581 (2001).
99. O' Reilly, L. a *et al.* Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* **461**, 659–63 (2009).
100. Carrington, P. E. *et al.* The Structure of FADD and Its Mode of Interaction with Procaspase-8. *Mol. Cell* **22**, 599–610 (2006).
101. Vucic, D., Dixit, V. M. & Wertz, I. E. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat. Rev Mol Cell Biol* **12**, 439–452 (2011).
102. Li, H., Zhu, H., Xu, C.-J. & Yuan, J. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* **94**, 491–501 (1998).
103. Pan, G. *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276**, 111–113 (1997).
104. Rezaei, N., Aghamohammadi, A. & Notarangelo, L. D. *Primary Immunodeficiency Diseases: Definition, Diagnosis, and Management.* (Springer Science & Business Media, 2008).
105. Bousfiha, A. A. *et al.* Primary immunodeficiency diseases worldwide: More common than generally thought. *J. Clin. Immunol.* **33**, 1–7 (2013).
106. Picard, C. *et al.* Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert

- Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J. Clin. Immunol.* **35**, 696–726 (2015).
107. Mahlaoui, N. The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry. *Rare Dis. Orphan Drugs J.* **1**, 25–27 (2014).
108. Martin, D. & Gutkind, J. S. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene* **27 Suppl 2**, S31–S42 (2008).
109. Philip, M., Rowley, D. A. & Schreiber, H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in Cancer Biology* **14**, 433–439 (2004).
110. Rezaei, N., Hedayat, M., Aghamohammadi, A. & Nichols, K. E. Primary immunodeficiency diseases associated with increased susceptibility to viral infections and malignancies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 1323–1329 (2011).
111. Purtilo, D. *et al.* X-LINKED RECESSIVE PROGRESSIVE COMBINED VARIABLE IMMUNODEFICIENCY (DUNCAN'S DISEASE). *Lancet* **305**, 935–941 (1975).
112. Nichols, K. E., Ma, C. S., Cannons, J. L., Schwartzberg, P. L. & Tangye, S. G. Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunological Reviews* **203**, 180–199 (2005).
113. Rigaud, S. *et al.* XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* **444**, 110–114 (2006).
114. Marsh, R. A. *et al.* XIAP deficiency: A unique primary immunodeficiency best classified as X-linked familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and not as X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* **116**, 1079–1082 (2010).
115. Parolini, S. *et al.* X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of

- natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med* **192**, 337–346 (2000).
116. Yabal, M. *et al.* XIAP Restricts TNF- and RIP3-Dependent Cell Death and Inflammasome Activation. *Cell Rep.* **7**, 1796–1808 (2014).
117. Sieni, E. *et al.* Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: When Rare Diseases Shed Light on Immune System Functioning. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
118. Stepensky, P. *et al.* IL-2-inducible T-cell kinase deficiency: Clinical presentation and therapeutic approach. *Haematologica* **96**, 472–476 (2011).
119. Huck, K. *et al.* Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J. Clin. Invest.* **119**, 1350–1358 (2009).
120. Berg, L. J., Finkelstein, L. D., Lucas, J. a & Schwartzberg, P. L. Tec family kinases in T lymphocyte development and function. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 549–600 (2005).
121. Bachmann, M. F., Littman, D. R. & Liao, X. C. Antiviral immune responses in Itk-deficient mice. *J. Virol.* **71**, 7253–7257 (1997).
122. Atherly, L. O., Brehm, M. a, Welsh, R. M. & Berg, L. J. Tec kinases Itk and Rlk are required for CD8+ T cell responses to virus infection independent of their role in CD4+ T cell help. *J. Immunol.* **176**, 1571–1581 (2006).
123. Henter, J. I. *et al.* HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatric Blood and Cancer* **48**, 124–131 (2007).
124. Weitzman, S. Approach to Hemophagocytic Syndromes. *Hematology* **2011**, 178–183 (2011).

125. Imashuku, S. Treatment of Epstein-Barr Virus-related Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (EBV-HLH); Update 2010. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **33**, 35–39 (2011).
126. Stepp, S. E. *et al.* Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science (80-.)*. **286**, 1957–1959 (1999).
127. Feldmann, J. *et al.* Munc13-4 Is Essential for Cytolytic Granules Fusion and Is Mutated in a Form of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* **115**, 461–473 (2003).
128. zur Stadt, U. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 827–834 (2005).
129. zur Stadt, U. *et al.* Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Type 5 (FHL-5) Is Caused by Mutations in Munc18-2 and Impaired Binding to Syntaxin 11. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 482–492 (2009).
130. Engelhardt, K. R. *et al.* Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, (2009).
131. Engelhardt, K. R. *et al.* The extended clinical phenotype of 64 patients with dedicator of cytokinesis 8 deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **136**, 402–412 (2015).
132. Zhang, Q. *et al.* Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2046–2055 (2009).
133. Randall, K. L. *et al.* Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production. *Nat. Immunol.* **10**, 1283–

- 91 (2009).
134. Randall, K. L. *et al.* DOCK8 deficiency impairs CD8 T cell survival and function in humans and mice. *J. Exp. Med.* **208**, 2305–20 (2011).
135. Mizesko, M. C. *et al.* Defective actin accumulation impairs human natural killer cell function in patients with dedicator of cytokinesis 8 deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 840–848 (2013).
136. Hsu, A. P. *et al.* Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood* **118**, 2653–2655 (2011).
137. Ostergaard, P. *et al.* Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat. Genet.* **43**, 929–31 (2011).
138. Hahn, C. N. *et al.* Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* **43**, 1012–7 (2011).
139. Vinh, D. C. *et al.* Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood* **115**, 1519–1529 (2010).
140. Dickinson, R. E. *et al.* Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood* **118**, 2656–2658 (2011).
141. Tsai, F. Y. & Orkin, S. H. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* **89**, 3636–43

- (1997).
142. Kazenwadel, J. *et al.* Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature. *Blood* **119**, 1283–1291 (2012).
 143. Hsu, A. P., McReynolds, L. J., Holland, S. M. & author Steven Holland, C. M. GATA2 Deficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **15**, 104–109 (2015).
 144. Zuelzer, W. W., Evans, R. K. & Goodman, J. Myelokathexis — A New Form of Chronic Granulocytopenia. *N. Engl. J. Med.* **270**, 699–704 (1964).
 145. Krill Jr., C. E., Smith, H. D. & Mauer, A. M. Chronic Idiopathic neutropenia. *N.Engl.J Med.* **270**, 973–979 (1964).
 146. Kawai, T. & Malech, H. L. WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr. Opin. Hematol.* **16**, 20–26 (2009).
 147. Balabanian, K. *et al.* WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* **105**, 2449–2457 (2005).
 148. Gorlin, R. J. *et al.* WHIM syndrome, an autosomal dominant disorder: Clinical, hematological, and molecular studies. *Am. J. Med. Genet.* **91**, 368–376 (2000).
 149. Hernandez, P. A. *et al.* Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet* **34**, 70–74 (2003).
 150. Lagane, B. *et al.* CXCR4 dimerization and 2-arrestin mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood* **112**, 34–44 (2008).
 151. Tassone, L. *et al.* Defect of plasmacytoid dendritic cells in warts,

- hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome patients. *Blood* **116**, 4870–4873 (2010).
152. Conley, M. E. *et al.* Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the p85 subunit of PI3K. *J. Exp. Med.* **209**, 463–470 (2012).
153. Zhang, Kejian (Division of Human Genetics, Cincinnati Children’s Hospital Medical Center, Cincinnati, O., Husami, Ammar (Division of Human Genetics, C. C. H. M. C., Marsh, Rebecca (Division of Bone Marrow Transplantation and Immunodeficiency, Cincinnati Children’s Hospital Medical Center, Cincinnati, O. . & Jordan, Michael B (Division of Bone Marrow Transplantation and Immunodeficiency, Cincinnati Children’s Hospital Medical Center, Cincinnati, O. . 2013 Annual Meeting: Regulation & Dysregulation of Immunity. IDENTIFICATION OF A PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE (PI-3K) P110DELTA (PIK3CD) DEFICIENT INDIVIDUAL. *J. Clin. Immunol.* **33**, 671–709 (2013).
154. Deau, M. C. *et al.* A human immunodeficiency caused by mutations in the PIK3R1 gene. *J. Clin. Invest.* **124**, 3923–3928 (2014).
155. Lucas, C. L., Chandra, A., Nejentsev, S., Condliffe, A. M. & Okkenhaug, K. PI3K δ and primary immunodeficiencies. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 702–714 (2016).
156. Angulo, I. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase δ gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. *Science* **342**, 866–71 (2013).
157. Lucas, C. L. *et al.* Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI (3) K catalytic subunit p110 δ result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nat. Immunol.* **15**, 88 (2014).
158. Tsujita, Y. *et al.* Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause

- activated phosphatidylinositol 3-kinase ?? syndrome-like immunodeficiency.
Journal of Allergy and Clinical Immunology (2015).
doi:10.1016/j.jaci.2016.03.055
159. Sneller, M. C. *et al.* A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine lpr/gld disease. *J. Clin. Invest.* **90**, 334–341 (1992).
160. Oliveira, J. B. *et al.* Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): Report from the 2009 NIH International Workshop. in *Blood* **116**, (2010).
161. Fisher, G. H. *et al.* Dominant interfering fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935–946 (1995).
162. Rieux-Laucat, F. *et al.* Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science (80-.).* **268**, 1347–1349 (1995).
163. Sneller, M. C. *et al.* Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood* **89**, 1341–1348 (1997).
164. Holzlova, E. *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1409–1418 (2004).
165. Wang, J. *et al.* Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* **98**, 47–58 (1999).
166. Del-Rey, M. *et al.* A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* **108**, 1306–1312 (2006).

167. Wu, J. *et al.* Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J. Clin. Invest.* **98**, 1107–1113 (1996).
168. Rao, V. K. & Oliveira, J. B. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* **118**, 5741–5751 (2011).
169. Tsai, F. Y. *et al.* An Early Hematopoietic Defect in Mice Lacking the Transcription Factor Gata-2. *Nature* **371**, 221–226 (1994).
170. Kazenwadel, J. *et al.* GATA2 is required for lymphatic vessel valve development and maintenance. *J. Clin. Invest.* **125**, 2879–2994 (2015).
171. Hsu, A. P. *et al.* GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. *Blood* **121**, (2013).
172. Wlodarski, M. W. *et al.* Prevalence, clinical characteristics and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes (MDS) in children and adolescents. *Blood* **127**, 1387–1398 (2015).
173. Nováková, M. *et al.* Loss of B cells and their precursors is the most constant feature of GATA-2 deficiency in childhood myelodysplastic syndrome. *Haematologica* **101**, 707–716 (2016).
174. Onodera, K. *et al.* GATA2 regulates dendritic cell differentiation. *Blood* **128**, 508–518 (2016).
175. De Villartay, J. P. *et al.* A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *J. Clin. Invest.* **115**, 3291–3299 (2005).
176. Villa, A. *et al.* V(D)J recombination defects in lymphocytes due to RAG mutations: Severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. *Blood* **97**, 81–88 (2001).
177. Munoz-Ruiz, M. *et al.* Human CD3gamma, but not CD3delta, haploinsufficiency

- differentially impairs gammadelta versus alphabeta surface TCR expression. *BMC Immunol* **14**, 3 (2013).
178. Gil, J. *et al.* A leaky mutation in CD3D differentially affects $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells and leads to a $T\alpha\beta-T\gamma\delta+B+NK+$ human SCID. *J. Clin. Invest.* **121**, 3872–3876 (2011).
179. Schuetz, C. *et al.* An immunodeficiency disease with RAG mutations and granulomas. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2030–8 (2008).
180. Henderson, L. A. *et al.* Expanding the spectrum of recombination-activating gene 1 deficiency: A family with early-onset autoimmunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 969–971.e2 (2013).
181. Lee, Y. N. *et al.* A systematic analysis of recombination activity and genotype-phenotype correlation in human recombination-activating gene 1 deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, (2014).
182. Dickinson, R. E. *et al.* The evolution of cellular deficiency in GATA2 mutation. *Blood* **123**, 863–874 (2014).
183. Brenchley, J. M. *et al.* Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood* **101**, 2711–2720 (2003).
184. Appay, V., Van Lier, R. A. W., Sallusto, F. & Roederer, M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytom. Part A* **73**, 975–983 (2008).
185. Ruiz-García, R. *et al.* A case of partial deficiency of cytokines 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8⁺ and natural killer cell cytotoxicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **134**, 218–221.e7 (2014).
186. Randall, K. L. *et al.* DOCK8 deficiency impairs CD8 T cell survival and function in humans and mice. *J. Exp. Med.* **208**, 2305–2320 (2011).

187. Mace, E. M. *et al.* Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56bright subset. *Blood* **121**, 2669–2677 (2013).
188. Freud, A. G. & Caligiuri, M. A. Human natural killer cell development. *Immunological Reviews* **214**, 56–72 (2006).
189. Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L. & Vivier, E. Natural-killer cells and dendritic cells: ‘L’union fait la force’. *Blood* **106**, 2252–2258 (2005).
190. Biron, C. a, Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P. & Salazar-Mather, T. P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 189–220 (1999).
191. Holland, S. M. *et al.* STAT3 Mutations in the Hyper-IgE Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **357**, 1608–1619 (2007).
192. Minegishi, Y. *et al.* Human Tyrosine Kinase 2 Deficiency Reveals Its Requisite Roles in Multiple Cytokine Signals Involved in Innate and Acquired Immunity. *Immunity* **25**, 745–755 (2006).
193. Sassi, A. *et al.* Hypomorphic homozygous mutations in phosphoglucomutase 3 (PGM3) impair immunity and increase serum IgE levels. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, (2014).
194. Cartegni, L., Chew, S. L. & Krainer, A. R. LISTENING TO SILENCE AND UNDERSTANDING NONSENSE: EXONIC MUTATIONS THAT AFFECT SPLICING. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 285–298 (2002).
195. Jing, H. *et al.* Somatic reversion in dedicator of cytokinesis 8 immunodeficiency modulates disease phenotype. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 1667–1675 (2014).
196. Ruiz-García, R. *et al.* Partial vs. Complete DOCK8 deficiency. *J Clin Immunol* **34**, S224–S225 (2014).

197. Guo, H., Samarakoon, A., Vanhaesebroeck, B. & Malarkannan, S. The p110 delta of PI3K plays a critical role in NK cell terminal maturation and cytokine/chemokine generation. *J. Exp. Med.* **205**, 2419–35 (2008).
198. Tassi, I. *et al.* p110 γ and p110 δ Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathways Synergize to Control Development and Functions of Murine NK Cells. *Immunity* **27**, 214–227 (2007).
199. Angulo, I. *et al.* Phosphoinositide 3-Kinase Gene Mutation Predisposes to Respiratory Infection and Airway Damage. *Science (80-.)*. **342**, 866–871 (2013).
200. Elgizouli, M. *et al.* Activating PI3K δ mutations in a cohort of 669 patients with primary immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol.* **183**, 221–229 (2016).
201. Chen, X., Trivedi, P. P., Ge, B., Krzewski, K. & Strominger, J. L. Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 6329–34 (2007).
202. Dornan, G. L. *et al.* Conformational disruption of PI3K δ regulation by immunodeficiency mutations in *PIK3CD* and *PIK3R1*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 1982–1987 (2017).
203. Briercheck, E. L. *et al.* PTEN Is a Negative Regulator of NK Cell Cytolytic Function. *J. Immunol.* **194**, 1832–40 (2015).
204. Segovis, C. M. *et al.* PI3K links NKG2D signaling to a CrkL pathway involved in natural killer cell adhesion, polarity, and granule secretion. *J. Immunol.* **182**, 6933–6942 (2009).
205. Shah, S., Wu, E., Rao, V. K. & Tarrant, T. K. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome: an Update and Review of the Literature. *Current Allergy and Asthma*

- Reports* **14**, (2014).
206. Del-Rey, M. *et al.* A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* **108**, 1306–1312 (2006).
207. Magerus-Chatinet, A. *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a homozygous null FAS ligand (FASLG) mutation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 486–490 (2013).
208. Mateo, V. *et al.* Perforin-dependent apoptosis functionally compensates Fas deficiency in activation-induced cell death of human T lymphocytes. *Blood* **110**, 4285–4292 (2007).
209. Bosque, A. *et al.* The induction of Bim expression in human T-cell blasts is dependent on nonapoptotic Fas/CD95 signaling. *Blood* **109**, 1627–1635 (2007).
210. Price, S. *et al.* Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood* **123**, 1989–1999 (2014).

VII. ANEXOS



Informe de Idoneidad del Formato de Tesis por Publicaciones

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
<i>Nombre del Doctorando</i>	RAQUEL RUIZ GARCÍA
<i>Título de la Tesis</i>	ESTUDIO FENOTÍPICO, FUNCIONAL Y MOLECULAR DE INMUNODEFICIENCIAS CON DEFECTOS DE CITOTOXICIDAD Y PREDISPOSICIÓN A INFECCIONES VIRALES Y TUMORES
<i>Facultad o Centro</i>	FACULTAD DE MEDICINA, UCM

DATOS DEL DIRECTOR/ES DE LA TESIS DOCTORAL	
<i>Nombre</i>	LUIS MIGUEL ALLENDE MARTINEZ
<i>Centro al que pertenece en la actualidad</i>	SERVICIO DE INMUNOLOGÍA, HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE
<i>DNI/Pasaporte</i>	50837358K
<i>e-mail</i>	<i>luis.allende@salud.madrid.org</i>

DATOS DEL TUTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
<i>Nombre</i>	JOSÉ RAMÓN REGUEIRO GONZÁLEZ-BARROS
<i>Centro al que pertenece en la actualidad</i>	DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I, FACULTAD DE MEDICINA, UCM
<i>DNI/Pasaporte</i>	50417137X
<i>e-mail</i>	<i>regueiro@med.ucm.es</i>

INFORME:

El director y el tutor de la presente Tesis Doctoral hacemos constar la idoneidad de la presentación de ésta tesis bajo la modalidad de compendio de publicaciones. Los artículos que forman parte se indican en el cuadro adjunto, especificando la contribución del doctorando y el índice de calidad de la revista en el momento de su publicación

Publicaciones	Contribución del doctorando	Índice de calidad [Posición de la revista por área de conocimiento (Q), factor de impacto(FI)]
<p><i>A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity.</i> Ruiz-García R., Lermo-Rojo S., Martínez-Lostao L., Mancebo E., Paz-Artal E., Ruiz-Contreras J., Anel A., González-Granado L.I., Allende L.M. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> 2014 Mar 14</p>	<p>Participación en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diseño del estudio • Ejecución de los experimentos • Análisis de los datos • Escritura del artículo 	<p>Posición según área: Inmunología: Q1 Alergia: Q1 FI: 11.48 (2014)</p>
<p><i>Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation.</i> Ruiz-García R., Mora S, Lozano-Sánchez G, Martínez-Lostao L, Paz-Artal E, Ruiz-Contreras J, Anel A, González-Granado LI, Moreno D, Allende LM. <i>Ped Res.</i> 2015, Dec; 78 (6): 603-8</p>	<p>Participación en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diseño del estudio • Ejecución de los experimentos • Análisis de los datos • Escritura del artículo 	<p>Posición según área: Pediatria: Q1 FI: 2.76 (2015)</p>
<p><i>Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2 Deficient Patients.</i> Ruiz-García R., Rodríguez-Vigil C., Marco F.M., Gallego-Bustos F., Castro-Panete M.J., Díez-Alonso L., Muñoz-Ruiz C., Ruiz-Contreras J., Paz-Artal E., González-Granado L.I., Allende L.M. <i>Frontiers Immunology</i> 2017; 8 (802):1-9</p>	<p>Participación en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diseño del estudio • Ejecución de los experimentos • Análisis de los datos • Escritura del artículo 	<p>Posición según área: Inmunología: Q1 FI: 6.429 (2016)</p>
<p><i>Mutations in PI3K110δ lead to impaired NK cell function that is partially rescued by rapamycin treatment.</i> Raquel Ruiz-García, Alexander Vargas-Hernández, Ivan K. Chinna, Tram N. Cao, Zeynep Coban-Akdemir, Lisa R. Forbes, Donna M. Muzny, Luis M. Allende, Mohammed S. Ehllyel, Richard A. Gibbs, James R. Lupski, Gulbu Uzel, Jordan S. Orange, Emily M. Mace. <i>In Review J Allergy Clin Immunol.</i></p>	<p>Participación en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diseño del estudio • Ejecución de los experimentos • Análisis de los datos 	<p>Posición según área: Inmunología: Q1 Alergia: Q1 FI: 13.081 (2016)</p>

Madrid, 4 de Septiembre de 2017

Fdo:

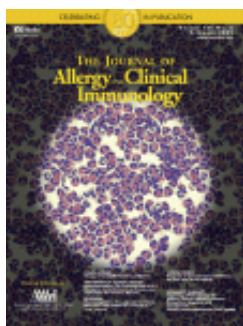
Luis Allende Martínez

José Ramón Regueiro

Este impreso deberá entregarse a la Comisión Académica responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la Tesis Doctoral, con el fin de que se incluya junto a la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la aprobación, si procede y designación del Tribunal que ha de juzgar la Tesis Doctoral en el acto de defensa.



RightsLink®

[Account Info](#)
[Help](#)


Title: A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity

Author: Raquel Ruiz-García, Sara Lermo-Rojo, Luis Martínez-Lostao, Esther Mancebo, Sergio Mora-Díaz, Estela Paz-Artal, Jesús Ruiz-Contreras, Alberto Anel, Luis I. González-Granado, Luis M. Allende

Publication: Journal of Allergy and Clinical Immunology

Publisher: Elsevier

Date: Jul 1, 2014

Copyright © 2014, Elsevier

Logged in as:
Raquel Ruiz-Garcia
Account #:
3001096397

[LOGOUT](#)

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Raquel Ruiz-Garcia ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your order details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License number	Reference confirmation email for license number
License date	Dec 29, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Allergy and Clinical Immunology
Licensed Content Title	A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity
Licensed Content Author	Raquel Ruiz-García, Sara Lermo-Rojo, Luis Martínez-Lostao, Esther Mancebo, Sergio Mora-Díaz, Estela Paz-Artal, Jesús Ruiz-Contreras, Alberto Anel, Luis I. González-Granado, Luis M. Allende
Licensed Content Date	July 2014
Licensed Content Volume	134
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	11
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	ESTUDIO FENOTIPICO, FUNCIONAL Y MOLECULAR DE INMUNODEFICIENCIAS CON DEFECTOS DE CITOTOXICIDAD Y PREDISPOSICIÓN A INFECCIONES VIRALES Y TUMORES
Expected completion date	Apr 2017
Estimated size (number of pages)	200
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Raquel Ruiz-Garcia

Ronda Atocha 18,3H

Madrid, other 28012
Spain
Attn:

Billing Type
Billing address

Invoice
Raquel Ruiz-Garcia
Ronda Atocha 18,3H

Madrid, Spain 28012
Attn: Raquel Ruiz-Garcia

Total

0.00 USD

CLOSE WINDOW

Copyright © 2017 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#)
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com



Title: Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation

Author: Raquel Ruiz-García, Sergio Mora, Gema Lozano-Sánchez, Luis Martínez-Lostao, Estela Paz-Artal et al.

Publication: Pediatric Research

Publisher: Nature Publishing Group

Date: Sep 3, 2015

Copyright © 2015, Rights Managed by Nature Publishing Group

Logged in as:
Raquel Ruiz-Garcia
Account #:
3001096397

LOGOUT

Author Request

If you are the author of this content (or his/her designated agent) please read the following. If you are not the author of this content, please click the Back button and select an alternative [Requestor Type](#) to obtain a quick price or to place an order.

Ownership of copyright in the article remains with the Authors, and provided that, when reproducing the Contribution or extracts from it, the Authors acknowledge first and reference publication in the Journal, the Authors retain the following non-exclusive rights:

- a) To reproduce the Contribution in whole or in part in any printed volume (book or thesis) of which they are the author(s).
- b) They and any academic institution where they work at the time may reproduce the Contribution for the purpose of course teaching.
- c) To reuse figures or tables created by them and contained in the Contribution in other works created by them.
- d) To post a copy of the Contribution as accepted for publication after peer review (in Word or Text format) on the Author's own web site, or the Author's institutional repository, or the Author's funding body's archive, six months after publication of the printed or online edition of the Journal, provided that they also link to the Journal article on NPG's web site (eg through the DOI).

NPG encourages the self-archiving of the accepted version of your manuscript in your funding agency's or institution's repository, six months after publication. This policy complements the recently announced policies of the US National Institutes of Health, Wellcome Trust and other research funding bodies around the world. NPG recognises the efforts of funding bodies to increase access to the research they fund, and we strongly encourage authors to participate in such efforts.

Authors wishing to use the published version of their article for promotional use or on a web site must request in the normal way.

If you require further assistance please read NPG's online [author reuse guidelines](#).

For full paper portion: Authors of original research papers published by NPG are encouraged to submit the author's version of the accepted, peer-reviewed manuscript to their relevant funding body's archive, for release six months after publication. In addition, authors are encouraged to archive their version of the manuscript in their institution's repositories (as well as their personal Web sites), also six months after original publication.

v2.0

BACK

CLOSE WINDOW

FRONTIERS COPYRIGHT STATEMENT

© Copyright 2007–2017 Frontiers Media SA.
All rights reserved.

All content included on Frontiers websites (including Loop), such as text, graphics, logos, button icons, images, video/audio clips, downloads, data compilations and software, is the property of the person or entity who or which owned it prior to submission to Frontiers. If not owned by Frontiers it is licensed to Frontiers Media SA (“Frontiers”) or its licensees and/or subcontractors.

The copyright in the text of individual articles (including research articles, opinion articles, book reviews, conference proceedings and abstracts) is the property of their respective authors, subject to a general license granted to Frontiers and a Creative Commons CC–BY licence granted to all others, as specified below. The compilation of all content on this site, as well as the design and look and feel of this website are the exclusive property of Frontiers.

All contributions to Frontiers (including Loop) may be copied and re–posted or re–published in accordance with the Creative Commons licence referred to below.

Images and graphics not forming part of user–contributed materials may not be downloaded or copied without Frontiers’ explicit and specific permission.

The combination of all content on Frontiers websites, and the look and feel of the Frontiers websites, is the property of Frontiers Media SA.

Articles and other user–contributed materials may be downloaded and reproduced subject to any copyright or other notices.

As an author or contributor you grant permission to others to reproduce your articles, including any graphics and third–party materials supplied by you, in accordance with the Frontiers Terms and Conditions and subject to any copyright notices which you include in connection with such materials. The licence granted to third parties is a Creative Commons Attribution (“CC BY”) licence. The current version is CC–BY, version 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), and the licence will automatically be updated as and when updated by the Creative Commons organisation.

Note that for articles published prior to July 2012, the licence granted may be different and you should check the pdf version of any article to establish what licence was granted. If an article carries only a non–commercial licence and you wish to obtain a commercial licence, please contact Frontiers at editorial.office@frontiersin.org.

All software used on this site, and the copyright in the code constituting such software, is the property of or is licensed to Frontiers and its use is restricted in accordance with the [Frontiers Terms and Conditions](#). All copyright, and all rights therein, are protected by national and international copyright laws.

The above represents a summary only. For the full conditions see the [Frontiers Terms and Conditions](#).

Thank you for your message. With regards to your request, I would like to inform you that the article "[Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients](#)" published in *Primary Immunodeficiencies - Frontiers in Immunology* is distributed under the terms of the CC BY licence.

Authors retain the copyright on their work and the content is free to distribute and use, given that the original source is properly acknowledged and cited, and subject to any copyright notices concerning any third-party content. You can have more information, visiting the following link: <http://www.frontiersin.org/Copyright.aspx>

Please do not hesitate to contact us, should you have any comments on this or need any clarifications.

Kind regards,
Alessandra Fornarelli

--

Frontiers in Immunology| Editorial Office - Journal Development Team
Journal Manager: Aida Paniccia, PhD
Journal Development Specialist: Alessandra Fornarelli, Dr. rer. nat.
Journal Development Specialist: Nikolaos Chatziandreou, PhD

Frontiers

www.frontiersin.org
EPFL Innovation Square, Building I
Lausanne, Switzerland
Office T [+41 21 510 1723](tel:+41215101723)

Don Alberto Anel

Con DNI: 17162783E

Tlf: 627 621195

e-mail: anel@unizar.es

MANIFIESTO QUE:

Como co-autor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y , por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autor.

Relación de artículos:

Título: *A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity.*

Año: 2014

Revista: Journal of Allergy and Clinical Immunology

Volumen: 134(1), pags: 218-21

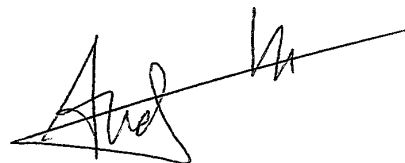
Título: *Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation.*

Año: 2015

Revista: Pediatric Research

Volumen: 78 (6), pags: 603-8

Zaragoza a 14 de Julio de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Anel', with a long horizontal line extending to the right.

Firmado: Alberto Anel

Don Carlos Muñoz Ruiz

Con DNI: 12216397Q

TIF. 695913903

e-mail: inmuno_hga@gva.es

MANIFIESTO QUE:

Como co-autor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autor.

Relación de artículos:

Título: *Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients.*

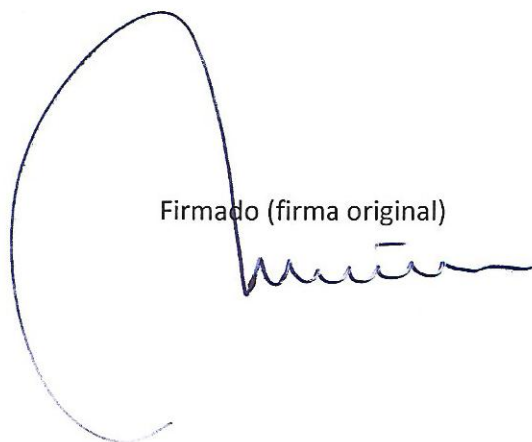
Año: 2017

Revista: *Frontiers Immunology*

Volumen: 8(802), pags: 1-9

Alicante a 14 de julio de 2017

Firmado (firma original)

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'C' followed by a cursive name.

Doña Carmen Rodríguez Vigil

Con DNI: 71636620S

Tlf: 629182956

e-mail: crodriguezvigil@salud.aragon.es

MANIFIESTO QUE:

Como co-autora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y , por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Título: *Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients.*

Año: 2017

Revista: Frontiers Immunology

Volumen: 8(802), pags: 1-9

Zaragoza a 14 de Julio de 2017

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized loop followed by a smaller loop and a final stroke.

Firmado (firma original)

Don David Moreno Pérez

Con DNI: 27390478-P

Tlf : 630251007

e-mail: dmp.malaga@gmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como co-autor NO DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y , por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autor RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation.*

Año: 2015

Revista: Pediatric Research

Volumen: 78 (6), pags: 603-8

Málaga a 01 de Agosto de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'D Moreno P', with a horizontal line underneath the name.

Firmado (firma original)

Doña Estela Paz Artal
Con DNI: 25131880X
Tlfno: 649588788
e-mail: estela.paz@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como co-autora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autora.

Relación de artículos:

Título: *A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity.*

Año: 2014

Revista: Journal of Allergy and Clinical Immunology

Volumen: 134(1), pags: 218-21

Título: *Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation.*

Año: 2015

Revista: Pediatric Research

Volumen: 78 (6), pags: 603-8

Título: *Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients.*

Año: 2017

Revista: Frontiers Immunology

Volumen: 8(802), pags: 1-9

Madrid a 13 de julio de 2017



Firmado (firma original)

Doña Esther Mancebo Sierra

Con DNI: 70801228Y

Tlf: 917792508

e-mail: esther.mancebo@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como co-autora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autora.

Relación de artículos:

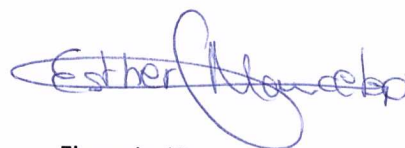
Título: *A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity.*

Año: 2014

Revista: Journal of Allergy and Clinical Immunology

Volumen: 134(1), pags: 218-21

Madrid a 14 de Julio de 2017



Firmado (firma original)

Don Fernando Gallego Bustos

Con DNI: 11860504w

Tlf: 625918956

e-mail: ferga88@gmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como co-autor NO DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y , por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autor RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients.*

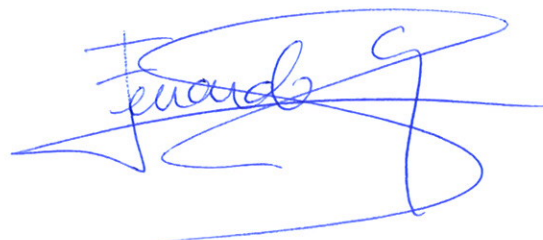
Año: 2017

Revista: Frontiers Immunology

Volumen: 8(802), pags: 1-9

Madrid a 01 de agosto de 2017

Firmado (firma original)



Don Francisco M. Marco

Con DNI: 21997521E

Tlf: 657266184

e-mail: fm.marco@ua.es

MANIFIESTO QUE:

Como co-autor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autor.

Relación de artículos:

Título: *Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients.*

Año: 2017

Revista: *Frontiers Immunology*

Volumen: 8(802), pags: 1-9

Alicante a 15 de julio de 2017



Firmado (firma original)

Doña Gema Lozano Sánchez

Con DNI: 16614413H

Tlf: 679229644

e-mail: gemalozanosanchez@hotmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como co-autora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y , por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation.*

Año: 2015

Revista: Pediatric Research

Volumen: 78 (6), pags: 603-8

Málaga a 21 de Agosto de 2017



Firmado (firma original)

Don Jesús Ruiz Contreras

Con DNI: 06519033-M

Tlf: 615875172

e-mail: jesus.ruiz@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como co-autor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autor.

Relación de artículos:

Título: *A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity.*

Año: 2014

Revista: Journal of Allergy and Clinical Immunology

Volumen: 134(1), pags: 218-21

Título: *Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation.*

Año: 2015

Revista: Pediatric Research

Volumen: 78 (6), pags: 603-8

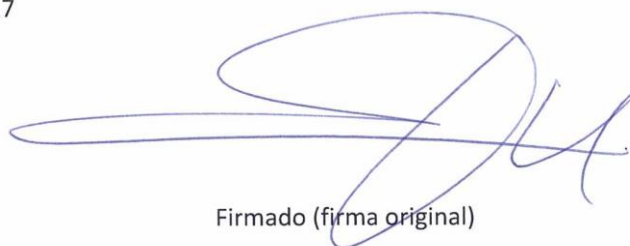
Título: *Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients.*

Año: 2017

Revista: Frontiers Immunology

Volumen: 8(802), pags: 1-9

Madrid a 8 de Agosto de 2017

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'J' followed by a horizontal line and a vertical stroke.

Firmado (firma original)

Don Luis Ignacio González

Con DNI: 12402133G

Tlf: 913908569

e-mail: nachgonzalez@gmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como co-autor NO DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y , por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autor RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity.*

Año: 2014

Revista: Journal of Allergy and Clinical Immunology

Volumen: 134(1), pags: 218-21

Título: *Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation.*

Año: 2015

Revista: Pediatric Research

Volumen: 78 (6), pags: 603-8

Título: *Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients.*

Año: 2017

Revista: Frontiers Immunology

Volumen: 8(802), pags: 1-9

Madrid a 14 de julio de 2017



Firmado (firma original)

Doña Laura Díez Alonso

Con DNI: 53811555-L

Tlf: 680818970

e-mail: ldieza@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como co-autora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients.

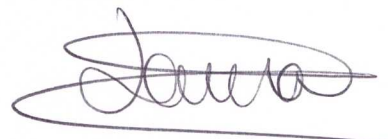
Año: 2017

Revista: Frontiers Immunology

Volumen: 8(802), pags: 1-9

Madrid a 18 de julio de 2017

Firmado (firma original)



Don Luis M. Allende Martínez

Con DNI: 50.837.358k

Tlf: 660544723

e-mail: luis.allende@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como co-autor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autor.

Relación de artículos:

Título: *A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity.*

Año: 2014

Revista: Journal of Allergy and Clinical Immunology

Volumen: 134(1), pags: 218-21

Título: *Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation.*

Año: 2015

Revista: Pediatric Research

Volumen: 78 (6), pags: 603-8

Título: *Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients.*

Año: 2017

Revista: Frontiers Immunology

Volumen: 8(802), pags: 1-9

Madrid a 14 de Julio de 2017



Luis Allende

Firmado (firma original)

Don Luis Martínez Lostao

Con DNI: 25151763K

Tlf: 652854755

e-mail: lumartin@unizar.es

MANIFIESTO QUE:

Como co-autor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y , por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autor.

Relación de artículos:

Título: *A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity.*

Año: 2014

Revista: Journal of Allergy and Clinical Immunology

Volumen: 134(1), pags: 218-21

Título: *Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation.*

Año: 2015

Revista: Pediatric Research

Volumen: 78 (6), pags: 603-8

Madrid a 17 de Julio de 2017

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned above the text 'Firmado (firma original)'.

Firmado (firma original)

Doña M^a José Castro Panete

Con DNI: 76358614V

Tlf: 659573103

e-mail: mariajose.castro@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como co-autora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autora.

Relación de artículos:

Título: *Acquired Senescent T-Cell Phenotype Correlates with Clinical Severity in GATA Binding Protein 2-Deficient Patients.*

Año: 2017

Revista: *Frontiers Immunology*

Volumen: 8(802), pags: 1-9

Madrid a 14 de Julio de 2017



Firmado (firma original)

Doña Sara Lermo Rojo

Con DNI: 12337593-W

Tlf: 652580422

e-mail: saralermorojo@gmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como co-autora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y , por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity.*

Año: 2014

Revista: Journal of Allergy and Clinical Immunology

Volumen: 134(1), pags: 218-21

Madrid a 1 de Agosto de 2017

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'S' followed by a smaller, more complex signature.

Firmado (firma original)

Don Sergio Mora Díaz

Con DNI: 11849417-R

Tlf: 616119447

e-mail: sergio.mora@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como co-autor NO DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña Raquel Ruiz García, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y , por tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como co-autor RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity.*

Año: 2014

Revista: Journal of Allergy and Clinical Immunology

Volumen: 134(1), pags: 218-21

Título: *Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation.*

Año: 2015

Revista: Pediatric Research

Volumen: 78 (6), pags: 603-8

Madrid a 4 de Agosto de 2017



Firmado (firma original)

