

MASARYKOVA UNIVERZITA

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

HABILITAČNÍ PRÁCE

Vybrané klinické a laboratorní aspekty
nemaligních poruch tvorby protilátek v dospělém věku

MUDr. Zita Chovancová, Ph.D.

Ústav klinické imunologie a alergologie FN u sv. Anny v Brně a LF MU

Prohlášení autora:

Prohlašuji, že v souladu s ustanovením uvedeném v článku 5 odstavce 1, písmene b, Směrnice MU č. 7/2017 - Habilitační řízení a řízení ke jmenování profesorem (ve znění účinném od 1. ledna 2021), jsou všechny vědecké práce, které tvoří habilitační práci uveřejněny a jsou veřejně dostupné. Dále prohlašuji, že uvedená habilitační práce obsahuje pouze recenzované vědecké články.

Poděkování:

Mé poděkování patří přednostovi Ústavu klinické imunologie a alergologie FN u sv. Anny a LF MU panu prof. MUDr. Jiřímu Litzmanovi, CSc. za odbornou podporu, ale také za zdravě motivační, spravedlivý a lidský přístup. Dále bych chtěla poděkovat emeritnímu přednostovi Ústavu klinické imunologie a alergologie FN u sv. Anny a LF MU panu prof. MUDr. Jindřichu Lokajovi, CSc. za jeho všeobecný pozitivní životní i odborný nadhled, laskavý přístup a ovlivnění svým inspirativním vztahem k oboru. Ráda bych poděkovala také všem svým kolegům, sestrám, laborantkám a ostatním pracovníkům Ústavu klinické imunologie a alergologie FN u sv. Anny v Brně a LF MU za profesionální i osobní zázemí, kolegiální a vstřícnost, což umožňuje vytvářet a dlouhodobě udržovat vynikající podmínky pro naši všeobecnou spolupráci.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému manželovi a celé své rodině, která mě vždy podporovala v mém úsilí dosáhnout všeho, pro co jsem se rozhodla.

Obsah

1	KOMENTÁŘ K HABILITAČNÍ PRÁCI.....	8
2	CÍLE PRÁCE	10
3	Úvod.....	11
4	B lymfocyty a jejich základní charakteristika	13
4.1	Základní dělení B lymfocytů	13
4.2	B-1 B lymfocyty	13
4.3	B-2 B lymfocyty	14
4.4	Regulační B lymfocyty	14
4.5	Vývoj B lymfocytů	15
5	Protilátková imunitní odpověď.....	18
5.1	Základní typy protilátkové imunitní odpovědi	18
6	Imunoglobuliny a jejich fyziologické a vybrané patologické aspekty	30
6.1	Izotypy imunoglobulinů	30
6.2	Imunoglobuliny ve třídě IgE.....	31
6.3	Imunoglobuliny ve třídě IgD	33
6.4	Imunoglobuliny ve třídě IgM	36
6.5	Imunoglobuliny ve třídě IgA	40
6.6	Imunoglobuliny ve třídě IgG	42
7	Běžná variabilní imunodeficience	47
7.1	Obecná charakteristika diagnózy CVID	47
7.2	Základní klinická manifestace pacientů s CVID	48
7.3	Vybrané laboratorní patologické nálezy u pacientů s CVID	50
8	Diskuze	61
9	Závěr.....	71
10	ANNEXES.....	89

ZKRATKY

AERD	aspirinem exacerbované respirační onemocnění
AIM/CD5L	inhibitor apoptózy makrofágů
ALPS	autoimunitní lymfoproliferativní syndrom
APC	antigen prezentující buňka
ASCs	protilátky produkující buňky
Bcl-6	inhibitor apoptózy makrofágů
BCR	B-buněčný receptor
Blimp-1	B lymfocyty indukovaný maturační protein 1
Breg	regulační B lymfocyty
CD21 ^{low}	CD21 ^{low} B lymfocyty
cDC	konvenční neboli myeloidní dendritické buňky
CLR	lektinové receptory typu C
CP5	polysacharid typu 5 <i>Staphylococcus aureus</i>
CP8	polysacharid typu 8 <i>Staphylococcus aureus</i>
CVID	běžná variabilní imunodeficiencie
CXCL13	chemokinový C-X-C ligand 13
CXCR5	chemokinový C-X-C receptor typu 5
DC	dendritické buňky
FAE	schopnost výměny Fab ramének
fMLP	N-formylmethionyl-leucin-fenylalanin
FOB	folikulární B lymfocyty
Gal-9	galektin-9
GC	zárodečné centrum
G-MDSCs	granulocytární myeloidní supresorové buňky
HDNs	neutrofilů s vysokou denzitou
HRCT	výpočetní tomografie s vysokým prostorovým rozlišením
ICAM-1	intercelulární adhezivní molekula 1
ICOS	inducibilní kostimulační protein
IFN- γ	interferon gamma
IGH	těžký řetězec imunoglobulinů
IGL	lehký řetězec imunoglobulinů

ILC-2	přirozené lymfoidní buňky typu 2
IPEX	imunitní polyendokrinopatie a enteropatie vázaná na X chromosom
IVIG	intravenózní imunoglobuliny
LDNs	neutrofilny s nízkou denzitou
LFA-1	antigen spojený s funkcí lymfocytů 1
LPS	lipopolysacharid
MAC	membránu atakující komplex
MBL	manózu vázající lektin
MCP-1	monocyty atrahující protein 1
MDSCs	myeloidní supresorové buňky
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MLR	smíšená leukocytární reakce
moDC	z monocytů odvozené dendritické buňky
MZB	B lymfocyty marginální zóny
NB	naivní B lymfocyty
NETs	neutrofilní extracelulární síť
NGAL	lipokalin asociovaný s želatinázou neutrofilů
NGS	sekvenování nové generace
NHPLH	nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů
PAMPs	s patogenem asociované molekulární vzory
PB	plazmablasty
PBMCs	periferní mononukleární buňky
PC	plazmatické buňky
PCP	pneumokokové polysacharidy
PD-1	receptor programované buněčné smrti 1
pDC	plazmacytoidní dendritické buňky
pIgR	polymerní imunoglobulinový receptor (poly-Ig receptor)
PMA	forbol myristyl acetát
PRRs	receptory rozpoznávající vzorce
pSS	primární Sjögrenův syndrom
PWM	pokeweed mitogen
RIGI	kyselinou retinovou indukovatelný gen I
SAC	Saccharomyces cerevisiae Cowan I

SCID	těžká kombinovaná imunodeficience
SD	směrodatná odchylka
SFC	buňky tvořící spoty (z anglického „spot forming cells“)
SHM	somatické hypermutace
sIgAD	selektivní deficit IgA
SLE	systemový lupus erythematoses
SMB	izotypově přesmyknuté paměťové B lymfocyty
Sp1	polysacharid typu 1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>
SSc	systemová sklerodermie
STAT-5	signální transduktor a aktivátor transkripce 5
TCR	T-buněčný receptor
TD	T-dependentní
TI	T-independentní
TLR	Toll-like receptory
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
TRB	tranzientní B lymfocyty
VLA	velmi pozdní antigen
XLA	X-vázaná agamaglobulinémií
ZPS	zwitterionické polysacharidy

1 KOMENTÁŘ K HABILITAČNÍ PRÁCI

Imunitní systém člověka představuje komplikovaný soubor mechanismů, které se podílejí na udržování homeostázy organismu, a tím jeho přežití v prostředí neustále se měnících podmínek vnějšího a vnitřního prostředí. Mezi základní obranné mechanismy organismu patří protilátky. Předkládaná habilitační práce je komponovaná z devíti komentovaných autorských prací jejímž cílem bylo přinést nové poznatky ohledně klinického významu dysregulace sérové koncentrace jednotlivých imunoglobulinových tříd a podtříd. Rozšiřuje také dnes známá patofyziologická fakta týkající se patogeneze nejčastější symptomatické a klinicky významné vrozené poruchy tvorby protilátek v dospělém věku, a to běžné variabilní imunodeficiencie (CVID).

Každý z izotypů imunoglobulinů plní v rámci obranyschopnosti rozdílné funkce. Jejich snížená nebo nadměrná tvorba přímo způsobuje nebo provází celou řadu různých patologických stavů, mezi které patří také vzácné vrozené poruchy funkce imunitního systému. K usnadnění diferenciální diagnostiky této skupiny onemocnění v dětském věku jsme u pacientů s neonatální erythrodermií, těžkou atopickou dermatitidou nebo elevací sérové koncentrace celkových IgE imunoglobulinů navrhli nové diferenciálně diagnostické postupy. Popsali jsme novou mutaci stojící za heterozygotním deficitem exprese IgD na povrchu B lymfocytů. Zjistili jsme, že se B lymfocyty bez povrchové exprese IgD imunoglobulinu vyvíjejí až do stádia paměťových B lymfocytů, takže exprese IgD na povrchu B lymfocytů není pravděpodobně podstatná pro diferenciaci těchto buněk. Publikováním klinických a laboratorních parametrů pacientů se selektivním deficitem IgM jsme přispěli k rozvoji poznání o této vzácné protilátkové deficienci s nejasnou klinickou relevancí. U většiny těchto pacientů jsme našli velmi nízké titry izohemaglutininů, zvýšení počtu tranzientních B lymfocytů, snížení množství B lymfocytů marginální zóny, zvýšení počtu CD21^{low} B lymfocytů a dále srovnatelnou povrchovou expresi IgM na povrchu B lymfocytů a jejich subpopulací s kontrolními osobami. U části pacientů byla zachována také produkce IgM protilátek po mitogenní stimulaci. Popsali jsme první případ pacienta s Wiskottovým-Aldrichovým syndromem, u kterého se podařilo úspěšně provést transplantaci ledviny z důvodu IgA nefropatie, přičemž nedošlo k rychlému odhojení štěpu a jeho funkci se podařilo udržet několik let. Cílem další práce bylo upozornit lékaře onkology na existenci skupiny IgG4 asociovaných onemocnění, jejichž základním diagnostickým úskalím je fakt, že tyto stavy na zobrazovacích metodách velmi přesvědčivě imitují pokročilá nádorová onemocnění, což často vede ke zbytečnému odstranění orgánů nebo

jejich částí v rámci chirurgického řešení ve spojení s histologickým odběrem. Podstatou patofyziologie pacientů s diagnózou CVID je dysregulace funkce imunitního systému, která se týká mechanismů vrozeného i získaného imunitního systému. Výzkumem funkce vybraných parametrů vrozeného imunitního systému u pacientů s CVID jsme prokázali, že deficit MBL je u pacientů s CVID asociovaný s rozvojem bronchiektázií a může tyto pacienty predisponovat k rozvoji plicní fibrózy a respirační insuficience. Dále se nám podařilo popsat, že diagnóza CVID je asociována s chronickou granulocytární aktivací, která je dále potencována pomocí IVIG léčby. Ukázali jsme, že neutrofilů pacientů s CVID jsou aktivované a silně snižují T-buněčnou aktivaci. Proto ovlivnění aktivity myeloidních supresorových buněk by mohlo znamenat novou potenciální léčebnou strategii u pacientů s CVID. Výzkumem zaměřeným na protilátkovou odpověď u pacientů s CVID jsme prokázali, že se u těchto pacientů vyskytuje pravděpodobně porucha v terminální diferenciaci B lymfocytů do stádia plazmablastů produkujících protilátky. Navíc detekce počtu plazmablastů 7. den po očkování může sloužit jako pomocný diagnostický marker odpovědi na vakcinaci v rámci diagnostického procesu před zavedením léčby, ale také ke sledování protilátkové odpovědi u pacientů na imunoglobulinové substituční léčbě.

Protilátková imunitní odpověď představuje jeden ze základních pilířů obranyschopnosti organismu. I když poznání ohledně mechanismů tvorby protilátek v lidském organismu v posledních desetiletích značně pokročilo, stále zůstávají některé části tohoto procesu ne zcela objasněny. Jednou z možností, jak postoupit dál v poznáním protilátkové imunitní odpovědi v lidském organismu, je výzkum na poli vrozených poruch tvorby protilátek, který nám pomůže objasnit další chybějící detaily fyziologických i patologických principů protilátkové imunitní odpovědi.

2 CÍLE PRÁCE

- 1) Rozbor funkcí jednotlivých tříd a podtříd imunoglobulinů se zaměřením na příklady patologických stavů souvisejících s dysregulací jejich tvorby.
- 2) Přispění k rozšíření znalostí ohledně vybraných patologických stavů souvisejících s poruchou tvorby jednotlivých imunoglobulinových tříd.
- 3) Rozbor základních mechanismů tvorby protilátek v lidském organismu, co se týče zapojení jednotlivých buněk imunitního systému v závislosti na typu antigenů, které imunitní odpověď vyvolávají.
- 4) Přispění k rozšíření znalostí ohledně patogeneze a diagnostických možností běžné variabilní imunodeficience (CVID) jako klinicky nejvýznamnější poruchy tvorby protilátek v dospělém věku.

3 Úvod

Imunitní systém člověka představuje komplikovaný soubor mechanismů, které se podílejí na udržování homeostázy organismu, a tím přispívá k jeho přežití v prostředí neustále se měnících podmínek vnějšího a vnitřního prostředí. Schopnost imunitního systému člověka reagovat na různé podněty se během života mění. Po narození se obranyschopnost člověka postupně rozvíjí ve snaze dosáhnout co nejlepší funkce v boji proti nežádoucím vlivům vnějšího i vnitřního prostředí, čehož je využíváno během produktivního života člověka. Nicméně ve vyšším věku dochází k postupné remodelaci funkce imunitního systému, která může být v jistých ohledech pro organismus výhodná, ale ve většině případů je tomu spíše naopak. Tento proces je označován jako imunosenescence [1]. Mezi hlavní funkce imunitního systému patří obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled. Během fylogenetického vývoje se k původním vrozeným nespecifickým mechanismům imunitního systému postupně vyvinula schopnost adaptivní imunitní odpovědi, která umožňuje specifickou a účinnou obranu proti celé řadě patogenů. Imunitní systém funguje jako síť vzájemně propojených molekul a buněk, která je ovlivňována také nervovým a endokrinním systémem. Jednotlivé mechanismy řadící se do vrozeného nebo adaptivního imunitního systému od sebe nelze funkčně oddělit a pracují vždy ve vzájemném propojení, což s sebou přináší celou řadu důsledků, které se uplatňují jak ve fyziologické, tak v patologické úrovni.

Poruchy funkce imunitního systému se mohou týkat jejich jednotlivých složek (poruchy funkce B lymfocytů, T lymfocytů, komplementového systému nebo fagocytózy). Mezi nejčastější vrozené poruchy imunitního systému patří protilátkové imunodeficiencie. Poruchy funkce imunitního systému se mimo jiné manifestují zvýšenou náchylností k infekčním komplikacím, které mohou být způsobeny atypickými patogeny, mají prodloužené trvání nebo nereagují adekvátně na symptomatickou léčbu. Nicméně původní pohled na poruchy funkce imunitního systému ve smyslu prostého snížení jeho funkce v tíži a fenotypu dle závažnosti a typu porušené části imunitního systému (původním označením imunodeficiencie) se dnes mění na mechanismus související s komplexní dysregulací funkce imunitního systému (nyní nově „inborn errors of immunity“ neboli „vrozené poruchy imunity“). Tomu odpovídá také fakt, že asi u třetiny pacientů s vrozenými poruchami funkce imunitního systému se vyskytuje dominantně imunitně mediovaná patologie (autoimunitní onemocnění, autoinflamace nebo hyperinflamace, lymfoproliferace, malignity nebo těžké atopické stavy) [2]. Dle nejnověji publikovaných dat IUIS klasifikace z roku 2022 bylo popsáno

celkem 485 genetických defektů asociovaných s poruchou funkce imunitního systému [3]. Celá řada z nich se klinicky manifestuje predominantně imunitně mediovanou patologií spíše než infekčními komplikacemi [2]. Nejdůležitější částí patogeneze těchto onemocnění je právě prolomení imunitní regulace. Jedna z klinicky nejvýznamnějších vrozených poruch tvorby protilátek v dospělém věku, běžná variabilní imunodeficience (z anglického „common variable immunodeficiency disorders“; CVID) nebo pacienti s CVID-like fenotypem, stojí na pomezí toho dělení, protože jedna část pacientů se manifestuje převážně infekčními komplikacemi, zatímco u druhé části pacientů klinicky dominují příznaky dysregulace funkce imunitního systému [2].

V této práci se proto zaměříme především na protilátkovou imunitní odpověď, její fyziologické a patologické aspekty a propojení mezi vrozenou a adaptivní imunitou i na úrovni nemaligních poruch tvorby protilátek, jejímž základním zástupcem je právě diagnóza CVID.

4 B lymfocyty a jejich základní charakteristika

B lymfocyty představují společně s T lymfocyty základní buněčnou složku adaptivního imunitního systému. Terminálně diferencovaná stádia B lymfocytů, kam patří plazmablasty a plazmatické buňky, jsou dosud jediné známé buňky lidského těla, které jsou schopny secernovat protilátky. B lymfocyty byly poprvé popsány v roce 1965 [4] a od doby svého objevu došlo postupně k významnému vývoji poznání ohledně jejich vývoje, maturace a funkce, který však zatím není zdaleka u konce. Navíc obecně platnou významnou limitací studií týkajících se výzkumu lymfocytárních populací je fakt, že řada dat byla získána z pokusů na myších modelech, přičemž jednoduchá extrapolace těchto poznatků na lidský imunitní systém není vždy možná.

4.1 Základní dělení B lymfocytů

Do dnešní doby byla identifikována celá řada subpopulací B lymfocytů, které spadají do několika základních skupin. Jedná se o B-1 B lymfocyty, B-2 B lymfocyty a regulační B lymfocyty (Breg). B-1 B lymfocyty pochází většinou z fetálních jater a jsou tvořeny subpopulacemi B-1a a B-1b B lymfocytů. B-2 B lymfocyty pochází z kostní dřeně a jsou dále děleny na folikulární B-2 B lymfocyty (FOB) a B-2 B lymfocyty marginální zóny (MZB). Breg lymfocyty se vytváří během procesů ustanovení tolerance imunitního systému na úrovni kostní dřeně a dalších oblastí. Produkci převážně protizánětlivého cytokinu IL-10 se účastní i regulace protilátkové imunitní odpovědi [5].

4.2 B-1 B lymfocyty

Skupina B-1 B lymfocytů představuje pravděpodobně původní populaci B lymfocytů charakterizovanou jedinečnou fenotypovou, ontogenní a funkční charakteristikou, která tyto buňky odlišuje od konvenčních B-2 B buněčných subpopulací. Tyto buňky se vyskytují zejména v pleurální nebo peritoneální dutině, přičemž ve slezině nebo periferních lymfatických uzlinách se nachází jen v malém množství [6]. Je pro ně charakteristická zejména konstitutivní produkce tzv. přirozených protilátek ve třídě IgM a IgA bez zřejmé přítomnosti antigenní stimulace ve smyslu infekce nebo vakcinace. Přirozené protilátky se pravděpodobně účastní obraných mechanismů v době, než dojde k aktivaci produkce klasických protilátek pomocí konvenčních B-2 B lymfocytů. Kromě toho se přirozené protilátky váží také na autoantigeny a neoepitopy, které vznikají během odumírání buněk lidského organismu, a podílejí se na jejich

odstraňování a tím udržování homeostázy [7]. B-1 B lymfocyty jsou tedy považovány za spojenci mezi vrozeným a adaptivním imunitním systémem.

4.3 B-2 B lymfocyty

Do skupiny B-2 B lymfocytů jsou řazeny klasické konvenční B lymfocyty, které fyziologicky produkují protilátky v odpovědi na setkání se organismu s infekčním agens. Mezi základní B-lymfocytární subpopulace patří tranzientní B lymfocyty ($CD38^{high}IgM^{high}$; TRB), naivní B lymfocyty ($IgM^+IgD^+CD27^-$; NB), B lymfocyty marginální zóny ($IgM^+IgD^+CD27^+$; MZB), izotypově přesmyknuté paměťové B lymfocyty ($IgM-IgD-CD27^+$; SMB), $CD21^{low}$ B lymfocyty ($CD21^{low}CD38^{low}$; $CD21^{low}$) a terminálně diferencovaná stádia B lymfocytů produkujících protilátky (ASCs), kam patří krátce žijící cirkulující plazmablasty (PB) a dlouze žijící plazmatické buňky (PC) [8-10].

Toto dělení B lymfocytů však vychází z jejich vývojového, ale nikoli funkčního stavu [9]. O to se pokusila nedávno publikovaná práce, která rozdělila B lymfocytárních subpopulace dle jejich funkce [11]. Glass et al. vyšetřili expresi 351 známých buněčných povrchových molekul na B lymfocytech pomocí hmotnostní spektrofotometrie, přičemž na nich detekovali přítomnost 98 z nich. Kombinací těchto molekul s ohledem na jejich funkci bylo navrženo nové klasifikační schéma B lymfocytů, které rozdělilo tyto buňky do 12 subtypů dle čtyřech funkčních oblastí (kostní dřeň, tonsily, lymfatické uzliny, periferní krev) [11]. Nové funkční subpopulace lymfocytů představují tranzientní nevyzrálé B lymfocyty, $CD73^-$ naivní B lymfocyty, $CD73^+$ naivní B lymfocyty, $CD45RB^+CD27^-$ paměťové B lymfocyty, $CD45RB^+CD27^+CD73^-$ paměťové B lymfocyty, $CD45RB^+CD27^+CD73^+$ paměťové B lymfocyty, $CD45RB^-$ paměťové B lymfocyty, $CD95^+$ paměťové B lymfocyty, $CD19^{high}CD11C^+$ paměťové B lymfocyty, plazmatické buňky, B lymfocyty zárodečného centra a $CD39^+$ tonzilární B lymfocyty. Ukázalo se, že pozitivita znaků $CD45RB$, $CD11c$, $CD39$, $CD73$ a $CD95$ definuje B lymfocyty, které se již setkaly s antigenem [11].

4.4 Regulační B lymfocyty

Pod pojmem B-regulačních lymfocytů (Breg) se skrývá skupina B lymfocytů, u kterých byla prokázána imunoregulační funkce. Jejich funkcí je udržování tolerance, tlumení probíhající imunitní odpovědi a udržování homeostázy organismu. Regulační B lymfocyty hrají

důležitou roli v prevenci rozvoje autoimunitních onemocnění a rejekce štěpů v rámci transplantace, ale účastní se také patogeneze infekčních, alergických, nádorových a chronických metabolických onemocnění [12]. Tyto buňky jsou schopné vykonávat své efektorové funkce zejména produkcí imunosupresivních cytokinů (IL-10, TGF- β nebo IL-35), ale také přítomností povrchových molekul CD1d a PD-L1 a schopností indukovat tvorbu regulačních T lymfocytů [13]. Mezi dnes známé lidské regulační B lymfocyty patří B10 B lymfocyty (CD24^{hi}CD27⁺), tranzientní B lymfocyty (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}), Br1 B lymfocyty (CD19⁺CD25^{hi}CD71^{hi}CD73⁻), plazmablasty (IgA⁺CD138⁺PD-L1⁺IL-10⁺ a CD19⁺CD27^{int}CD38⁺), GrB⁺ B lymfocyty (CD19⁺CD38⁺CD1d⁺IgM⁺CD147⁺), CD9⁺ B lymfocyty (CD19⁺CD9⁺) a CD5⁺CD1d⁺ B lymfocyty (CD19⁺CD5⁺CD1d^{hi}) [12].

4.5 Vývoj B lymfocytů

4.5.1 Původ a vývoj B-1 B lymfocytů

Zatímco myši B-1 a B-2 B lymfocyty vznikají ze dvou odlišných progenitorů, původ lidských B-1 a B-2 B lymfocytů zatím zůstává ne zcela objasněn. Je to dáno také tím, že lidské B-1 a B-2 B lymfocyty od sebe nelze jednoduše fenotypicky odlišit tak, jako je tomu u myši [14]. V roce 2011 byla popsána v pupečnickové krvi a periferní krvi dospělých osob nová populace CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻ buněk, která sdílela podobné funkční vlastnosti jako myši B-1 B lymfocyty [15] a jejich počet se snižoval s věkem [15]. Jejich vývojový původ však zůstává nejasný. Zdá se však, že by se lidské B-1 a B-2 B lymfocyty mohly na rozdíl o myších analogů vyvíjet ze společné Lin⁻CD34⁺CD38^{low} populace kmenových buněk [14]. Nicméně míra poznání ohledně původu a jednoznačné charakteristiky lidských B-1 B lymfocytů produkujících přirozené protilátky zatím zůstává neúplná [16].

4.5.2 Původ a vývoj B-2 B lymfocytů

Tyto konvenční B lymfocyty vznikají a vyvíjí se ze svých prekurzorů v kostní dřeni, kde prochází stádiem pro-B lymfocytů, pre-B lymfocytů a nezrálých B lymfocytů. Během této diferenciaci v kostní dřeni dochází také k vývoji jejich BCR receptoru pomocí procesů tzv. VDJ rekombinace. Jedná se o mechanismus genetické rekombinace vyskytující se evolučně u obratlovců, který náhodně vybírá a spojuje segmenty genů kódujících specifické proteiny zásadní pro fungování imunitního systému. Tento proces dává vzniknout rozmanitému repertoáru molekul receptorů T lymfocytů (TCR) a B lymfocytů (BCR) nezbytných

k rozpoznávání velkého množství antigenů pocházejících z cizorodých bakterií, virů, parazitů nebo vlastních poškozených buněk [17]. Během VDJ rekombinace se u B lymfocytů vytváří unikátní BCR receptor. U každého prekurzoru B lymfocytu dochází nejprve ke kombinaci mezi jedním genem variabilní (V) oblasti s jedním genem oblasti různorodosti (D) a jedním genem spojovací oblasti (J) tak, aby se vytvořil gen kódující těžký řetězec imunoglobulinu (IGH). Vysoký počet možných kombinací jednotlivých genů V, D a J oblasti společně s přidáním N-nukleotidů a delecí nukleotidů v junkční oblasti umožňuje vytvoření velkého počtu rozmanitých BCR receptorů. Po úspěšném dokončení VDJ rekombinace v oblasti IGH lokusu a přeskupení oblasti lehkého řetězce imunoglobulinů (IGL) dochází k testování, zda není nově vzniklý BCR receptor autoreaktivní. V případě vzniku autoreaktivního BCR receptoru dochází k úpravě receptoru nebo apoptóze autoreaktivního B lymfocytu, zatímco ostatní B lymfocyty opouštějí kostní dřeň a přeměňují se do stádia tranzitních B lymfocytů (T1, T2 a T3), které exprimují znaky $CD19^+IgD^{low/+}CD27^-CD24^{++}CD38^{++}$. B lymfocyty se dále diferencují do stádia B lymfocytů marginální zóny (MZB) a přes stádium vyzrálých naivních B lymfocytů do stádia folikulárních B lymfocytů (FOB). MZB lymfocyty tvoří asi 20 % periferních B lymfocytů. Usídlují se v marginální zóně sleziny, kde umožňují rozvoj T-independentní imunitní odpovědi. FOB lymfocyty osídlují lymfoidní folikuly ve slezině a lymfatických uzlinách a tvoří dominantní populaci B lymfocytů. Po setkání se s antigenem a obdržení pomoci od folikulárních T lymfocytů proliferují v zárodečných centrech lymfatických uzlin, což nakonec vede k tvorbě specifických vysokoafinitních protilátek všech imunoglobulinových izotypů [18].

Mezi konečná stádia diferenciacie B lymfocytů patří plazmablasty (PB) a plazmatické buňky (PC). Plazmablasty představují populaci rychle proliferujících krátce žijících B lymfocytů, které produkují protilátky. Do stádia plazmablastů se mohou vyvinout obecně B-1 B lymfocyty, MZB lymfocyty, FOB lymfocyty nebo paměťové B lymfocyty. Plazmatické buňky představují nedělící se terminálně diferencované B lymfocyty, které mohou vznikat z vyzrálých aktivovaných B lymfocytů zárodečného centra. Tato buněčná populace je schopná vytvářet velká množství protilátek s vysokou afinitou různých izotypů a specifit. Jedná se dlouze žijící buňky, které migrují do kostní dřeně, kde přežívají v prostředí stromálních buněk. Také plazmablasty se mohou nakonec přeměnit do stádia plazmatických buněk. B lymfocyty se mohou přeměnit také do stádia paměťových B lymfocytů, které mohou být po opětovném setkání s antigenem reaktivovány a přeměněny opět do stádia B lymfocytů zárodečného centra, plazmablastů a plazmatických buněk [17, 19]. Recentně bylo popsáno,

že populace lidských cirkulujících buněk se skládá z celkem čtyř populací, a to paměťových B lymfocytů, plazmablastů, B-1 B lymfocytů a nově popsaných $CD20^+CD27^{hi}CD38^{hi}$ B lymfocytů [5]. Tyto nově popsané B lymfocyty byly schopny podobně jako B-1 B lymfocyty a plazmablasty tvořit protilátky a vykazovaly znaky cirkulujících preplazmablastů [5].

4.5.3 Původ a vývoj regulačních B lymfocytů

Vzhledem ke značné heterogenitě B lymfocytárních subpopulací různých maturačních a diferenciačních stádií, které vykazují regulační charakter, se zdá být pravděpodobné, že různá vývojová stádia B lymfocytů si mohou osvojit regulační fenotyp v odpovědi na nejrozličnější faktory zevního prostředí. Vzhledem ke značné heterogenitě subpopulace Breg lymfocytů zatím nebyl nalezen specifický transkripční faktor, který by vedl k rozvoji regulačního fenotypu těchto buněk. Možné je také to, že Breg lymfocyty nepředstavují jednu určitou buněčnou linii a regulační fenotyp tak mohou získat různé subpopulace B lymfocytů [12].

5 Protilátková imunitní odpověď

Protilátková imunitní odpověď představuje základní obranný mechanismus adaptivního imunitního systému a její rozvoj je výsledkem kooperace celé řady buněčných a humorálních faktorů. B lymfocyty jako takové stojí na samém konci složitého řetězce událostí, které vedou k jejich aktivaci a rozvoji humorální imunitní odpovědi. Soubor protilátek všech specifit a pěti různých izotypů (IgG, IgA, IgM, IgD a IgE), namířených jak proti nebezpečným agens z vnějšího prostředí, tak vlastním antigenům, představuje základní humorální efektorovou a regulační složku adaptivní imunitní odpovědi.

5.1 Základní typy protilátkové imunitní odpovědi

V imunitním systému člověka se můžeme setkat se třemi základními typy protilátkové odpovědi, které se od sebe v různých aspektech liší. Jedná se o tvorbu protilátek indukovanou antigenem proteinové nebo polysacharidové povahy, ale také tvorbu protilátek bez významné antigenní stimulace ve smyslu imunizace infekčním agens nebo vakcinálním antigenem. Jednotlivé typy protilátkové odpovědi se od sebe liší typem vyvolávajícího činitele, mírou potřeby T-lymfocytární pomoci nebo predilekčním izotypem produkovaných protilátek. Antigeny schopné aktivovat B lymfocyty byly historicky děleny dle toho, zda byly schopny u thymektomovaných myší, které měly tím pádem porušený vývoj T lymfocytů, vyvolat protilátkovou odpověď. Antigeny, které tvorbu protilátek vyvolaly, byly označeny jako thymus-independentní (T-independentní, TI). Ostatní antigeny, které vyvolaly tvorbu protilátek pouze v přítomnosti funkčních pomocných T lymfocytů, byly označeny jako thymus-dependentní (T-dependentní, TD) [20].

V lidském organismu byly původně popsány tři základní skupiny B lymfocytů, které se účastní různých typů protilátkové imunitní odpovědi. Jedná se o folikulární B lymfocyty (FOB) vyskytující se zejména v B-buněčných folikulech lymfatických uzlin, které jsou zodpovědné za TD protilátkovou odpověď, a tím pádem převážně za odstraňování patogenů pocházejících z vnějšího prostředí. Druhým typem B lymfocytů jsou B lymfocyty marginální zóny (MZB) vyskytující se zejména v marginální zóně sleziny, které jsou zodpovědné za TI protilátkovou odpověď, a tím pádem tvoří první linii obrany proti patogenům nacházejícím se převážně ve vaskulárním systému a uplatňují se také v udržování homeostázy organismu. Posledním typem B lymfocytů jsou B-1 B lymfocyty produkující protilátky bez přímé antigenní

stimulace, které tvoří první linii obrany proti patogenům pocházejícím z oblasti sliznic a také se podobně jako MZB lymfocyty uplatňují při udržování homeostázy organismu [21].

U člověka dochází po narození k postupnému vývoji schopnosti protilátkové odpovědi proti různým antigenům. Zatímco TD protilátková odpověď na komplexní proteinové antigeny je přítomná již krátce po narození, míra TI protilátkové odpovědi se vyvíjí s věkem [22]. Proto je třeba mít na paměti, že TI protilátková odpověď není plně vyvinuta u dětí mladších 2 let a vytrácí se v rámci imunosenescence také u seniorní populace [23].

5.1.1 T-independentní protilátková odpověď

T-independentní antigeny získaly svůj název díky schopnosti aktivovat B lymfocyty k tvorbě protilátek bez nutnosti T buněčné pomoci závislé na spolupráci TCR receptoru s receptorem hlavního histokompatibilního systému (MHC) na antigen prezentujících buňkách (APC). Dělí se do dvou základních typů. T-independentní antigeny typu 1 (TI-1) jsou schopny stimulovat B lymfocyty bez závislosti na signalizaci přes BCR receptor, čímž se řadí mezi nespecifické B-buněčné mitogeny. Do této skupiny antigenů patří lipopolysacharidy (LPS) tvořící buněčnou stěnu gramnegativních bakterií a rostlinné lektiny, kam patří například pokeweed mitogen (PWM) [24]. T-independentní antigeny typu 2 (TI-2) jsou charakterizované přítomností mnohokrát se opakujících molekulárních struktur, které jsou schopné zesíťovat specifické BCR receptory a zajišťovat tak specifickou B-buněčnou T-independentní aktivaci. Medicínský nejvýznamnějším příkladem těchto antigenů jsou polysacharidové struktury kapsul opouzdřených bakterií (například *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* nebo *Neisseria meningitidis*), které se skládají z neutrálních nebo negativně nabitých monosacharidů, nebo polysacharidové epitopy buněčné stěny neopouzdřených bakterií. Tyto polysacharidové struktury jsou sice intracelulárně zpracovány [25], nejsou se však schopny navázat na MHC glykoproteiny II. třídy a být vystaveny na povrchu APC a aktivovat tak T lymfocyty [26]. Výjimku tvoří jedinečná skupina mikrobiálních polysacharidů, které se střídavě skládají z kladně a záporně nabitých monosacharidů, a jsou proto označovány jako tzv. zwitterionické polysacharidy (ZPS). Příkladem těchto polysacharidů je polysacharid typu 5 a 8 *Staphylococcus aureus* (CP5 a CP8), polysacharid typu 1 *Streptococcus pneumoniae* (Sp1) nebo polysacharid A *Bacteroides fragilis* [26]. Na rozdíl od ostatních polysacharidů se ZPS po přípravě APC k prezentaci mohou vázat na MHC glykoproteiny II. třídy a vyvolat tak silnou T-buněčnou aktivaci [27].

Hlavními buňkami, které se uplatňují v rozvoji TI protilátkové odpovědi jsou B lymfocyty marginální zóny a B-1 B lymfocyty. Mezi základní buňky, které transportují antigeny nacházející se v krevním řečišti do sleziny, patří neutrofilní granulocyty a CD11c^{low} nezrálé dendritické buňky. Zdá se, že rozvoj TI protilátkové odpovědi závisí podobně jako u TD protilátkové odpovědi na dvou základních signálech, které se však vzájemně liší. Základním rozdílem mezi TI a TD antigeny je jejich molekulární struktura. Zatímco TD antigeny jsou rozpoznávány T lymfocyty v podobě krátkých peptidových fragmentů, základní charakteristikou TI antigenů je přítomnost mnohočetných opakujících se antigenních determinant, které jsou schopné přemostit a následně zesíťovat mnoho povrchových BCR receptorů. To představuje první signál vedoucí k proliferaci B lymfocytů bez přímé účasti T lymfocytů a rozvoji rychlé IgM protilátkové odpovědi, která nastupuje do 48 hodin po aktivaci B lymfocytu [28]. Zdá se, že k aktivaci jednoho B lymfocytu TI antigenem postačí zesíťování přibližně 10 BCR receptorů pomocí multivalentní antigenní molekuly [29]. K vyvolání proliferace poloviny B-lymfocytární populace je zapotřebí asi 100 povrchových IgD molekul, což představuje méně než 0,1 % celkového počtu membránových imunoglobulinů na B-buněčném povrchu [28]. Nutnost přítomnosti druhého signálu představuje pojistku proti tvorbě autoreaktivních protilátek. Nezávislost rozvoje protilátkové odpovědi na multivalentní antigeny na T lymfocytech je tedy pouze relativní. Navázání multivalentního antigenu totiž spouští proliferaci B lymfocytů *in vitro*, nicméně pro zahájení tvorby protilátek B lymfocyty potřebují druhý kostimulační signál [30]. Těchto druhých signálů může však být celá řada. Například bylo prokázáno, že samotné TI antigeny jsou schopny vyvolat tvorbu jen velmi malého až nedetekovatelného množství protilátek B lymfocytu, pokud byly kultivovány *in vitro* pouze se samotnými B lymfocyty bez dalších kostimulačních signálů. Jakmile však byly do kultury přidány cytokiny pocházející z T-lymfocytů, tvorba protilátek se signifikantně zvýšila [28]. Z toho vyplývá, že přemostění povrchových B-buněčných receptorů představuje pouze částečný aktivační signál, který může za přispění dalších kostimulačních signálů spustit proliferaci a diferenciaci B lymfocytů do plazmatických a paměťových buněk. Těmito kostimulačními signály může být přítomnost určitých cytokinů, buněčný kontakt s dendritickými buňkami nebo přímá interakce se systémem Toll-like receptorů (TLR) [28].

5.1.2 T-dependentní protilátková odpověď

K aktivaci B lymfocytů a následné tvorbě protilátek proti T-dependentním antigenům je třeba vzájemná souhra celé řady buněk a jejich povrchových receptorů, cytokinového

prostředí, ale také určitého lokálního mikroprostředí, ve kterém se rozvoj protilátkové odpovědi odehrává. Navíc všechny zúčastněné buňky musí být aktivovány stejným antigenem. Pro TD antigeny je typické, že se mohou dostat na povrch APC ve vazbě na MHC glykoproteiny II. třídy, zatímco u TI antigenů toto možné není.

5.1.2.1 Antigenní prezentace je klíčová pro rozvoj T-dependentní protilátkové odpovědi

T lymfocyty a jejich TCR receptory nejsou schopny rozpoznávat antigeny v nativní podobě. Antigeny musí být nejprve připraveny k prezentaci T lymfocytům pomocí APC. Mezi základní APC patří dendritické buňky, monocyty/ makrofágy, ale také B lymfocyty. Tyto buňky jsou schopny prezentovat na svém povrchu peptidové fragmenty pocházející z extracelulárního nebo intracelulárního prostředí ve vazbě na receptory MHC. Peptidové fragmenty vystavené na MHC glykoproteinech I. třídy jsou prezentovány cytotoxickým $CD8^+$ T lymfocytům (T_c) a pocházejí z intracelulárního prostředí, zatímco peptidové fragmenty vystavené na MHC glykoproteinech II. třídy jsou prezentovány pomocným $CD4^+$ T lymfocytům (T_h) a pocházejí z extracelulárního prostředí [31].

Klíčovými buňkami, které se přímo specializují na prezentaci antigenů, jsou dendritické buňky. Podílí se na udržování homeostázy organismu tím, že v klidovém stavu nastavují imunitní toleranci, ale při setkání s patogeny aktivují imunitní systém. Vyskytují se v periferních tkáních i lymfatických orgánech. Tvoří funkční pilíř propojující vrozený a adaptivní imunitní systém. Původní výzkumy ohledně typů a funkce dendritických buněk byly prováděny na myších modelech, přičemž později se ukázalo, že takto získaná data nelze jednoduše aplikovat na imunitní systém člověka. Myší dendritické buňky vznikají z lymfoidních nebo myeloidních prekurzorů v kostní dřeni a dělí se do dvou základních typů [32]. Klasické (konvenční) dendritické buňky (cDC) jsou tvořeny dvěma subtypy, a to $CD8\alpha^+CD103^+$ cDC a $CD11b^+$ cDC. Mezi neklasické (nekonvenční) dendritické buňky se řadí z monocytů odvozené dendritické buňky (moDC), plazmacytoidní dendritické buňky (pDC) a Langerhansovy nebo epidermální dendritické buňky (DC) [32]. Lidské dendritické buňky patří mezi leukocyty vznikající v kostní dřeni a vyvíjející se ze společného hematopoetického $CD34^+$ progenitoru. Tato buňka dává vznik myeloidním a lymfoidním prekurzorům. Myeloidní buňky se dále diferencují na monocyty, makrofágy a myeloidní prekurzory dendritických buněk (MDP), které dávají vznik monocytům a společným prekurzorům dendritických buněk. Tyto společné prekurzory dendritických buněk se nachází v kostní dřeni, kde se z nich následně vyvíjí plazmacytoidní dendritické buňky (pDC) a cirkulující

prekurzory konvenčních dendritických buněk (pre-cDC). Z nich se následně vytvářejí dva typy dendritických buněk (cDC1 a cDC2), které osidlují sekundární lymfatické orgány [33]. Dle nejnovějších poznatků se skupina lidských dendritických buněk dělí na základě cytokinového prostředí do čtyřech subpopulací. Jedná se o klasické, konvenční neboli myeloidní dendritické buňky (cDC), dermální nebo intersticiální dendritické buňky, Langerhansovy buňky a plazmacytoïdní dendritické buňky (pDC). Na základě exprese povrchových markerů se lidské dendritické buňky dělí do tří základních subpopulací, a to na BDCA1 (CD1c⁺), BDCA2 (CD303⁺) a BDCA3 (CD141⁺) dendritické buňky. Dnes je všeobecně přijímáno, že lidské BDCA1 (CD1c⁺) dendritické buňky odpovídají myším CD11b⁺ cDC, BDCA2⁺CD11c dendritické buňky jsou ekvivalentem myších plazmacytoïdních dendritických buněk a BDCA3⁺ dendritické buňky jsou ekvivalentem myších CD8α⁺ cDC [32].

Jejich základní funkcí je příprava antigenu k prezentaci a následná prezentace antigenních fragmentů naivním T lymfocytům, což vede k aktivaci těchto buněk. Nevyzrálé dendritické buňky, které vznikají hematopoézou, migrují z kostní dřeně a osidlují nelymfatické tkáně lidského organismu. Díky receptorům na svém povrchu, patřícím do skupiny receptorů rozpoznávajících vzorce (z anglického „pattern recognition receptors“; PRRs), rozpoznávají různé struktury patogenů, které se nevyskytují na savčích buňkách. Mezi tyto receptory dendritických buněk patří Toll-like receptory (TLR), lektinové receptory typu C (CLR) nebo kyselinou retinovou indukovatelný gen I (RIGI). Dendritickými buňkami rozpoznávané struktury se nazývají s patogenem asociované molekulární vzory (z anglického „pathogen associated molecular patterns“; PAMPs). Tyto patogenní složky aktivují receptory nebo spustí internalizaci daného patogenu do nitra dendritické buňky. Takto aktivované dendritické buňky migrují do lymfatických uzlin, následně vyzrávají, ztrácí schopnost vychytávání nových antigenů a stávají se z nich potentní APC díky povrchové expresi MHC glykoproteinů I. nebo II. třídy s navázanými peptidovými fragmenty zpracovaných antigenů, aktivačních molekul CD40, CD80 a CD86, ale také tvorbě imunostimulačních cytokinů a chemokinů [34].

5.1.2.2 Aktivace a diferenciacie T lymfocytů účastnících se protilátkové odpovědi

Lymfocyty, které aktivují B lymfocyty k tvorbě protilátek, patří do skupiny pomocných T lymfocytů (Th) a jsou charakterizovány mimo jiné povrchovou expresí znaku CD4. Do skupiny CD4⁺ T lymfocytů patří Th1 a Th2 lymfocyty, Th17 lymfocyty, folikulární pomocné T lymfocyty (T_{FH}) a regulační T lymfocyty (Treg) [35]. Dendritické buňky hrají ústřední roli v regulaci proliferace naivních CD4⁺ T lymfocytů. Společně s ostatními buňkami

se podílí také na polarizaci naivních $CD4^+$ T lymfocytů do jejich jednotlivých podtypů v závislosti na druhu stimulu, který vyvolal celou reakci. K aktivaci a další diferenciaci naivního $CD4^+$ T lymfocytu do efektorových podtypů je zapotřebí celkem 3 základních signálů. Prvním zásadním signálem je vazba TCR receptoru naivního $CD4^+$ T lymfocytu na cizorodý peptidový fragment navázaný na MHC glykoproteinu II. třídy na povrchu antigen prezentující buňky. Druhým kostimulačním signálem je vazba molekuly CD28 na povrchu $CD4^+$ T lymfocytů s molekulou CD80 a CD86 na povrchu antigen prezentujících buněk. Třetím signálem jsou pak mezibuněčné interakce a cytokinové signály v mikroprostředí probíhající imunitní reakce, na kterém se podílí dendritické buňky, ale i další přítomné buňky. První dva signály jsou pro aktivaci naivních $CD4^+$ T lymfocytů zásadní. I když schopnost poskytnutí prvního a druhého signálu není výsadou samotných dendritických buněk, jsou tyto buňky často nezbytné a postačující k aktivaci naivních $CD4^+$ T lymfocytů, protože mají jedinečnou schopnost migrovat z tkání do lymfatických uzlin nebo sleziny [36].

Hlavní populací dendritických buněk, které migrují do lymfatických uzlin a aktivují naivní $CD4^+$ T lymfocyty, jsou konvenční (klasické) dendritické buňky (cDC) [34]. Tyto dendritické buňky mohou být děleny na rezidentní cDC a migrující cDC, přičemž oba tyto typy jsou dále děleny na cDC1 a cDC2 dendritické buňky. Migrující cDC buňky se vyskytují zejména ve tkáních, odkud migrují přes lymfatické cévy do sekundárních lymfatických orgánů v klidovém stádiu organismu i v případě infekce. Rezidentní dendritické buňky se sice vyskytují převážně v lymfatických uzlinách, ale zachovávají si také jistou schopnost migrace [36]. Lidské cDC1 dendritické buňky jsou definovány jako $Lin^-CD64^-HLA-DR^+CD141^+$ buňky a díky jejich schopnosti zkřížené prezentace antigenů (tedy vazby extracelulárního patogenu na MHC glykoproteiny I. třídy) se účastní zejména aktivace cytotoxických $CD8^+$ T lymfocytů a tím pádem antivirové a protinádorové imunitní odpovědi. Prezentují však antigeny také $CD4^+$ T lymfocytům, v klidovém stavu se podílí zejména na tvorbě regulačních T lymfocytů a v období zánětu pak aktivují Th1 mediovanou buněčnou imunitní odpověď. Lidské cDC2 dendritické buňky definované jako $Lin^-HLA-DR^+CD1c^+SIRP\alpha^+$ se podílejí zejména na aktivaci naivních $CD4^+$ T lymfocytů a jejich polarizaci na Th2, Th17, Treg a T_{FH} T lymfocyty dle podtypu těchto buněk a cytokinového prostředí.

5.1.2.3 *Th2 a T_{FH} lymfocytární populace jsou zásadní pomocné T lymfocyty účastníci se protilátkové odpovědi*

Populace lidských pomocných CD4⁺ T lymfocytů byla nejprve rozčleněna na Th1 a Th2 podtypy dle různých cytokinových profilů, které tyto buňky produkovaly [37]. Následně se ukázalo, že hlavními cytokiny Th2 lymfocytů jsou IL-4, IL-5 a IL-13 a předpokládalo se, že se tím pádem jedná o hlavní pomocné T lymfocyty, které aktivují B lymfocyty k tvorbě protilátek. Počátkem druhého desetiletí tohoto století byla však objevena nová subpopulace pomocných T lymfocytů produkujících IL-4, které byly dle místa svého výskytu v B-buněčných folikulech sekundárních lymfatických orgánů nazvány jako folikulární pomocné T lymfocyty (T_{FH}). Tyto buňky jsou charakterizovány povrchovou expresí chemokinového receptoru CXCR5, který jim umožňuje homing do oblasti folikulů sekundárních lymfatických orgánů.

Th2 buněčná populace se podílí na aktivaci imunitního systému v boji proti parazitárním infekcím a jedům, ale zároveň se podílí také na procesu hojení ran. Dysregulace této fyziologické imunitní odpovědi vede k rozvoji alergických onemocnění. Th2 lymfocyty produkují cytokiny IL-4, IL-5 a IL-13, které se účastní akumulace eozinofilů v místě zánětu a spouští produkci IgE protilátek B lymfocyty a hlenu epiteliálními buňkami [38]. Těmto buňkám chybí exprese chemokinového receptoru CXCR5, a tudíž mohou na rozdíl od T_{FH} lymfocytů vykonávat své efektorové funkce přímo v místě zánětu. Signály pocházející od APC vedoucí k diferenciaci naivních CD4⁺ T lymfocytů do Th2 subtypu nejsou ještě zcela objasněny. Hlavními cytokiny, které spouští expresi klíčového transkripčního faktoru pro diferenciaci Th2 lymfocytů GATA-3 [39], jsou IL-2 a IL-4 [40]. Nicméně zdroj tvorby IL-4 zůstává nejasný. Neexistují důkazy o tom, že by IL-4 produkovaly samotné dendritické buňky, nicméně jeho tvorba byla zjištěna u bazofilů, NK T lymfocytů, $\gamma\delta$ T lymfocytů a přirozených lymfoidních buněk [41]. Do jaké míry se však tyto buňky podílí na diferenciaci Th2 lymfocytů není zcela jasné. Další studie ukázaly, že cytokin IL-13 produkovaný přirozenými lymfoidními buňkami typu 2 (ILC-2) je zásadní ke spuštění migrace CD11b⁺ cDC do lymfatických uzlin, kde se odehrává diferenciaci naivních CD4⁺ T lymfocytů do podoby Th2 lymfocytů [42]. Dle posledních výzkumů se zdá být pravděpodobné, že klasické konvenční dendritické buňky typu 2 (cDC2) jsou hlavním podtypem dendritických buněk, které se podílí na rozvoji Th2 imunitní odpovědi. Langerhansovy buňky mohou za určitých okolností vývoj Th2 lymfocytů podporovat, zatímco cDC1 a pDC dendritické buňky diferenciaci do Th2 lymfocytů inhibují [41].

Folikulární pomocné T lymfocyty (T_{FH}) jsou speciálním podtypem pomocných $CD4^+$ T lymfocytů, které hrají zásadní roli v rozvoji B-buněčné imunitní odpovědi. Vyskytují se v B buněčných folikulech sekundárních lymfatických orgánů a rozvíjí protilátkovou imunitní odpověď ve smyslu aktivace reakcí zárodečného centra a diferenciaci B lymfocytů do podoby paměťových B lymfocytů a plazmatických buněk [43]. Tyto buňky na svém povrchu exprimují stimulační molekuly CD40L a tvoří cytokiny IL-4 a IL-21, které dodávají B lymfocytům v zárodečných centrech lymfatických uzlin nejen proliferační signály, ale umožňují také jejich přežití. Tvorba T_{FH} lymfocytů z naivních $CD4^+$ T lymfocytů nastává v případě vhodného cytokinového prostředí za přítomnosti IL-6, IL-12 a IL-21, zatímco IL-2 jejich diferenciaci tlumí [44]. Tento cytokin totiž suprimuje aktivitu hlavního transkripčního faktoru Bcl-6 prostřednictvím upregulace STAT5 a Blimp-1, které snižují expresi Bcl-6 [45, 46]. Tento transkripční faktor totiž exkluzivně spouští diferenciaci naivních $CD4^+$ T lymfocytů do podoby T_{FH} buněk, a nikoli ostatních subtypů (Th1, Th2 nebo T17 lymfocytů) [45]. Diferenciaci T_{FH} buněk je několikastupňový proces, během kterého se uplatňují kromě dendritických buněk také B lymfocyty. Dendritické buňky hrají svou roli v rozvoji T_{FH} buněk během prvních tří dní po antigenní stimulaci, ale dále již samotné nestačí k udržení životaschopnosti a kompletní funkce těchto buněk. Jsou zodpovědné za zvýšení exprese CXCR5 u T_{FH} buněk, a tím za jejich nasměrování do lymfatických folikulů sekundárních lymfatických orgánů, kde se setkávají s B lymfocyty [47], které jsou nezbytné pro jejich finální diferenciaci. T_{FH} lymfocyty na svém povrchu exprimují kromě transkripčního faktoru Bcl-6 také inducibilní kostimulační protein (ICOS), receptor programované buněčné smrti 1 (PD-1) a chemokinový receptor CXCR5. Právě ligand tohoto receptoru CXCL13 umožňuje homing T_{FH} lymfocytů do oblasti B-buněčných folikulů [43].

K aktivaci naivního $CD4^+$ T lymfocytu je vždy zapotřebí nejméně dvou signálů. Vazba TCR receptoru naivního T lymfocytu na cizorodý peptidový fragment exprimovaný na MHC glykoproteinu II. třídy na povrchu APC představuje první signál potřebný pro aktivaci a další diferenciaci naivních T lymfocytů. Druhým signálem je vazba molekuly CD28 na povrchu T lymfocytů s molekulou CD80 a CD86 na povrchu APC, což vede v určitém cytokinovém prostředí a přítomnosti dalších faktorů popsaných výše k aktivaci a diferenciaci naivních T lymfocytů do podoby T_{FH} pomocných T lymfocytů.

5.1.2.4 Reakce zárodečného centra (germinální reakce)

Naivní konvenční B lymfocyty se vyskytují v klidovém stádiu v periferní krvi nebo v sekundárních lymfatických orgánech a čekají na setkání s antigenem. Jakmile svým BCR receptorem naváží antigen v nativní podobě, internalizují ho a intracelulárně připraví k prezentaci na svém povrchu na MHC glykoproteinech II. třídy společně s kostimulačními molekulami CD80 a CD86. Následně migrují do sekundárních lymfatických orgánů, protože ke své aktivaci a diferenciaci do plně vyžralých efektorových B lymfocytů potřebují několik dalších kostimulačních signálů a určité cytokinové prostředí. Terminální kroky jejich diferenciaci probíhají ve specializovaných oblastech sekundárních lymfatických orgánů, která se označují jako germinální neboli zárodečná centra (GC).

Germinální centra byla poprvé popsána Waltherem Flemmingem v roce 1884 jako mikroanatomické oblasti v sekundárních lymfatických orgánech, které obsahovaly dělící se buňky. Původně se myslelo, že se jedná o místo vzniku nových lymfocytů, ale časem bylo zjištěno, že se germinální centra vytváří pouze v odpovědi na antigenní stimuly a jsou místem klonální expanze B lymfocytů během T-dependentní protilátkové odpovědi. Zárodečná centra jsou organizována do dvou oblastí, kterým se říká světlá zóna a tmavá zóna. Mezi těmito oblastmi se B lymfocyty neustále pohybují, dokud nedosáhnou vysoké afinity pro cílový antigen [48]. Zárodečná centra jsou tvořena samotnými B lymfocyty v odpovědi na Bcl-6 expresi [49]. IL-21 představuje hlavní cytokin, který je zodpovědný za maximální tvorbu a udržování zárodečných center [50, 51]. Jakmile se B lymfocyty, které byly aktivovány antigenem, dostanou do sekundárních lymfatických orgánů, pohybují se směrem k rozhraní mezi B-lymfocytární a T-lymfocytární oblastí, kde dochází ke kontaktu mezi B lymfocyty a T_{FH} lymfocyty, které byly aktivovány stejným antigenem. Pomocné T_{FH} lymfocyty rozpoznají tento antigen na MHC glykoproteinech II. třídy na povrchu B lymfocytů, což představuje první signál pro aktivaci B lymfocytů následovaný interakcí receptoru CD40 na povrchu B lymfocytu s ligandem tohoto receptoru CD40L na povrchu aktivovaného T_{FH} lymfocytu. Signalizace přes receptor CD40 je esenciální pro další fáze protilátkové odpovědi, jako je afinitní maturace a izotypový přesmyk [52]. Po této aktivaci se B lymfocyty přesouvají do vnějších částí lymfatických folikulů, kde se intenzivně dělí, vytvářejí extrafolikulární oblasti a diferencují se do protilátky tvořících plazmablastů a následně plazmatických buněk. Mnoho z nich však zahyne apoptózou in situ [53]. Variabilní oblasti takto produkovaných protilátek jsou většinou nemutované a jsou ve třídě IgM. Nicméně tyto protilátky představují důležitou složku rychlé humorální obranyschopnosti v úvodní fázi boje proti patogenům. Část z původně aktivovaných

B lymfocytů se však vrací zpět do primárních folikulů, kde intenzivně proliferují a tvoří zárodečná centra, kde dochází k druhé vlně tvorby plazmatických buněk. B lymfocyty v zárodečných centrech vytrvale migrují mezi světlou a tmavou zónou. Antigen specifické B lymfocyty se v oblasti tmavé zóny rychle dělí a probíhají u nich somatické hypermutace (SHM). Jedná se o náhodné mutace variabilních oblastí těžkých i lehkých řetězců. SHM jsou zahájeny pomocí enzymu aktivací indukované deaminázy (AID). Tento enzym má obrovský mutační potenciál, jelikož frekvence SHM BCR receptoru je až milionkrát vyšší než frekvence spontánní mutagenese. Tyto náhodné mutace mohou vést k apoptóze B lymfocytů nebo tvorbě BCR receptorů s nižší, stejnou nebo vyšší afinitou k původnímu antigenu. Následně B lymfocyty po ukončení fáze SHM migrují do světlé zóny zárodečného centra, kde probíhá antigenní selekce a izotypový přesmyk (CSR). Interagují zde pomocí svých BCR receptorů s folikulárními dendritickými buňkami, které na svém povrchu exprimují dané antigeny. B lymfocyty tyto antigeny internalizují a intracelulárně zpracují, přičemž je následně vystaví na svém povrchu na MHC glykoproteinech II. třídy pro jejich rozpoznání pomocí antigen specifických T_{FH} lymfocytů. Míra afinity BCR receptoru pro daný antigen pravděpodobně pozitivně koreluje s množstvím internalizovaného antigenu a tím pádem mírou následné pomoci od T_{FH} lymfocytů [53]. Klony B lymfocytů mohou dopadnout čtyřmi různými způsoby dle síly BCR signálu (antigenní afinity) a velikosti pomoci od T_{FH} lymfocytů: nízká afinita a nepřítomnost pomoci od T_{FH} lymfocytů vede k jejich apoptóze; střední afinita a malá míra pomoci od T_{FH} lymfocytů vede k tvorbě dlouze žijících paměťových B lymfocytů; vyšší afinita a míra pomoci od T_{FH} lymfocytů vede k dalšímu kolu SHM ve tmavé zóně; vysoká úroveň afinity a kvalitní pomoc od T_{FH} lymfocytů vede k diferenciaci do podoby dlouze žijících plazmatických buněk [54]. Obecně se dá říci, že přežívají a dále se diferencují pouze ty B lymfocyty, u kterých se vytvoří BCR receptory s určitou mírou afinity vůči původnímu antigenu. Část těchto B lymfocytů se potom vrací do tmavé zóny sekundárních lymfatických orgánů a probíhají u nich další kola SHM. Druhá část těchto B lymfocytů opouští zárodečná centra jako paměťové buňky nebo plazmatické buňky [53].

Vyzrání B lymfocytů je kompletní po izotypovém přesmyku, který buňkám umožňuje produkci jednotlivých imunoglobulinových tříd, což mění efektorové funkce vytvořených specifických protilátek. Výsledkem těchto procesů je vytvoření sady BCR receptorů, které představují antigenem selektovaný BCR repertoár [55]. Během izotypového přesmyku dochází k deleční rekombinaci genů konstantní oblasti kódujících IgM a IgD a expresi různých následně se vyskytujících genů ostatních konstantních domén (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 a

IgE) [56]. Po rozpoznání antigenu se tedy naivní IgM^+IgD^+ B lymfocyty přeměňují tak, aby byly schopny tvořit ostatní imunoglobulinové třídy (IgG, IgA a IgE) a jejich podtřídy (IgG1-4, IgA 1-2) díky rekombinacím genů konstantní části těžkých řetězců. Dnešní znalosti týkající se izotypového přesmyku jsou však interpolovány z analýzy B lymfocytů, které byly přivedeny do fáze izotypového přesmyku *in vitro*. Přesný průběh tohoto biologického procesu vedoucího k izotypovému přesmyku reálně v živém organismu zůstává zatím nepoznáno. Původně se myslelo, že se tento děj odehrává během vyzrání B lymfocytů v germinálním centru a je spojen s buněčným dělením a SHM. Dle nejnovějších výzkumů se zdá být pravděpodobné, že se izotypový přesmyk děje ještě před vstupem buněk do zárodečného centra [57]. Původní paradigma rozvoje protilátkové odpovědi říká, že vyšší frekvence SHM B lymfocytů v GC vedoucí k ustanovení vyšší afinity BCR receptorů nasměřuje další vývoj B lymfocytů spíše do podoby plazmablastů než paměťových B lymfocytů [58, 59]. King a kol. však prokázali, že izotypově přesmyknuté paměťové B lymfocyty mají srovnatelnou frekvenci SHM jako plazmablasty, což neodpovídá výše uvedeným představám o tom, že B lymfocyty GC s vyšší afinitou svých BCR receptorů se přednostně přeměňují do podoby plazmablastů produkujících protilátku, zatímco nízké afinitní klony B lymfocytů tvoří paměťový kompartment [59]. King et al. také dále prokázali, že izotypově přesmyknuté B lymfocyty GC mají na rozdíl od IgM^+ B lymfocytů genovou expresi odpovídající zvýšené schopnosti signalizace cestou jejich BCR receptoru a vyšší schopnost udržet se v GC a získat T-buněčnou pomoc, aby u nich mohlo dojít k dalším kolům SHM a afinitní maturace [56]. Je tedy pravděpodobné, že selekční mechanismy založené na protilátkách se liší dle následného vývoje B lymfocytů do fáze plazmablastů nebo paměťových B lymfocytů a závisí na procesech, které se odehrávají dříve během procesů maturace B lymfocytů [56]. Pokud se izotypový přesmyk ve skutečnosti objevuje před vstupem B lymfocytu do zárodečných center [57], tak by schopnost B lymfocytů získat vysokou afinitu mohla být určována tím, jak dopadne specifický kontrolní bod izotypového přesmyku ve stádiu před vstupem do germinálního centra [56].

Plazmatické buňky představují konečné vývojové stádium konvenčních B lymfocytů, které produkuje protilátky. Plazmatické buňky, které opustily zárodečná centra, migrují do kostní dřeně, kde přežívají po mnoho let. Tyto plazmatické buňky se liší od B lymfocytu zárodečných center a paměťových B lymfocytů afinitou BCR receptoru k antigenu, která je u plazmatických buněk vyšší v porovnání s ostatními B lymfocyty [58, 60]. Takže další vývojový osud B lymfocytů pravděpodobně závisí na afinitě jejich BCR receptoru, přičemž

B lymfocyty s vysokou afinitou BCR receptoru k danému antigenu se přeměňují do stádia plazmatických buněk. To má pravděpodobně za cíl udržovat nejvyšší možnou kvalitu protilátek pro dlouhodobou ochranu organismu [53]. Vzhledem k tomu, že poločas cirkulujících protilátek je několik dní až týdnů, udržování populace specifických plazmatických buněk je zásadní pro existenci protilátkové imunitní odpovědi.

Schopnost tvořit různé třídy protilátek díky izotypovému přesmyku, které se od sebe odlišují svými funkčními vlastnostmi, je zásadní pro obranyschopnost vůči různým druhům patogenů. Poruchy v tomto procesu však vedou k rozvoji různých onemocnění spojených s imunitní dysregulací, jako jsou autoimunitní nebo alergická onemocnění, IgG4-asociovaná onemocnění, hyper-IgE syndromy a další [61].

6 Imunoglobuliny a jejich fyziologické a vybrané patologické aspekty

Imunoglobuliny představují složité proteinové molekuly, které jako humorální složky adaptivního imunitního systému hrají ústřední roli v propojení mechanismů vrozené a adaptivní imunitní odpovědi. O jejich existenci víme již více než 130 let. Již v roce 1890 popsali poprvé v Německu von Behring a KITASATO přítomnost látek v krvi člověka, které jsou schopny neutralizovat difterický toxoid [62]. Tato látka byla původně nazvána „Antikörper“, což odpovídá dnešnímu anglickému označení „antibody“ neboli protilátka. Následně byla pojmenována také látka, která vyvolává tvorbu protilátek jako „Antisomatogen + Immunkörperbildner“, z čehož bylo odvozeno anglické označení „antibody generating substances“, tedy zkráceně antigen. V roce 1939 TISELIUS a KABAT poprvé separovali sérum elektroforézou a získali kromě albuminové, alfa-globulinové a beta-globulinové také gama-globulinovou frakci, kterou tvoří právě lidské imunoglobuliny [63].

6.1 Izotypy imunoglobulinů

Imunoglobuliny se vyskytují v pěti základních třídách neboli izotypech (IgG, IgM, IgA, IgE a IgD), přičemž třída IgG a IgA je dále členěna na podtřídy (IgG1–4, IgA1–2). Asi 75 % imunoglobulinů krevního séra je tvořeno imunoglobuliny ve třídě IgG, 15 % ve třídě IgA, 10 % ve třídě IgM a zbývající malé množství je tvořeno imunoglobuliny ve třídě IgD a IgE. Jednotlivé třídy imunoglobulinů jsou tvořeny souborem specifických protilátek namířených proti konkrétní antigenní determinantě neboli epitopu jednotlivých antigenů. Protilátky mají dvě základní funkce, které se odvíjí od jejich lokalizace. Povrchově vázané imunoglobuliny slouží jako receptory pro antigen, což vede k aktivaci signalizačních drah a následné buněčné aktivaci. Solubilní efektorové protilátky poskytují obranu organismu obecně třemi základními mechanismy, mezi které patří neutralizace antigenů znemožňující vstup do hostitelské buňky, opsonizace antigenů podílející se na usnadnění procesu fagocytózy a aktivace mechanismů vedoucích k lýze patogenů (aktivace přirozených zabíječů nebo komplementového systému). Jednotlivé protilátkové třídy se v rámci těchto reakcí uplatňují různě. Jednotlivé izotypy imunoglobulinů se vzájemně odlišují svými Fc doménami, které ovlivňují specifické funkce pěti základních protilátkových tříd, kam patří zejména schopnost aktivace komplementu, fagocytóza, cytotoxicita závislá na protilátkách nebo uvolňování prozánětlivých cytokinů [64].

Představa o klasickém fungování protilátek spočívá ve vazbě protilátky na příslušný antigen za vzniku imunokomplexu, což vede k aktivaci mechanismů vrozeného imunitního systému. Nicméně protilátky mají celou řadu dalších neklasických funkcí, které souvisejí s destrukcí různých patogenů díky katalytické aktivitě a kofaktorovým účinkům, působí jako agonisté nebo antagonisté různých receptorů, kontrolují bakteriální diverzitu střeva a podobně. Tyto široké mechanismy účinku jsou umožněny existencí značně rozsáhlého protilátkového repertoáru, ale také přítomností různých typů protilátek, které se v těle vytvářejí (antigen specifické, přirozené, polyreaktivní, široce neutralizující, homofilní, bispecifické nebo katalytické) [65]. Některé izotypy imunoglobulinů se uplatňují zejména v sekreční podobě, jiné zase vázané na membránách. S tím souvisí také různá sérová koncentrace jednotlivých izotypů imunoglobulinů, což odpovídá jejich odlišným fyziologickým funkcím.

6.2 Imunoglobuliny ve třídě IgE

Imunoglobuliny ve třídě IgE představují unikátní imunoglobulinové izotypy s nejnižší sérovou koncentrací, které se jako součást humorálního adaptivního imunitního systému uplatňují v aktivaci vrozeného buněčného imunitního systému (zejména bazofilů a mastocytů). Sérová koncentrace IgE imunoglobulinů je přibližně 0,00005–0,0002 g/l, což je přibližně o čtyři až pět řádů méně, než odpovídá koncentraci ostatních imunoglobulinových tříd [66]. Sekreční IgE protilátky mají nejkratší sérový poločas ze všech imunoglobulinových izotypů, který činí asi 2 dny [67]. Nicméně IgE protilátky navázané na vysokoafinitních receptorech pro IgE (FcεRI) na povrchu buněk nesoucích tento receptor mají relativně dlouhý poločas rozpadu, který je podobně jako u IgG imunoglobulinů přibližně 3 týdny [68]. Funkce IgE protilátek jsou zprostředkovány pomocí vazby těchto protilátek na jejich receptory, kam patří vysokoafinitní receptory pro IgE (FcεRI) a nízkoafinitní receptory pro IgE (FcεRII; CD23) [69].

Receptory FcεRI se vyskytují především na mastocytech a bazofílech, nachází se také na eozinofilech, neutrofilech, plazmacytoidních dendritických buňkách, monocytech a makrofázích, trombocytech, ale vyskytují se také na buňkách hladkých svalů dýchacích cest, bronchiálního epitelu a střevních epiteliálních buněk [69]. Mastocyty a bazofily jsou aktivovány po navázání multivalentního antigenu na specifické IgE protilátky navázané na povrchu bazofilů nebo mastocytů na FcεRI receptorech, což vede k rychlému uvolnění preformovaných mediátorů (jako je histamin nebo proteázy) a k tvorbě nově syntetizovaných lipidových mediátorů, cytokinů a chemokinů [70]. Tato reakce je fyziologicky namířená proti

parazitárním infekcím. Pro aktivaci mastocytů je třeba přemostění 100–1000 receptorů, přičemž na mastocytech může být v jednu chvíli navázáno 300–3000 specifických IgE protilátek namířených proti různým antigenům. Tomu by odpovídal také fakt, že pro aktivaci lidských mastocytů je potřeba přemostění přibližně 0,3 % specifických IgE protilátek [71]. Nicméně následná aktivace mastocytů ve smyslu jejich degranulace a tvorby cytokinů nebo chemokinů je závislá na počtu aktivovaných receptorů na povrchu mastocytů [72]. Například lymfokiny účastníci se alergické reakce (například monocyty atrahující protein 1; MCP-1) jsou silně produkovány při nízké koncentraci antigenu nebo při nízkém počtu FcεRI receptorů s navázaným IgE, zatímco interleukiny regulující tuto reakci (například IL-10) jsou produkovány při vysokém počtu FcεRI receptorů s navázaným IgE [72]. Receptory FcεRII byly poprvé objeveny na B lymfocytech a jsou exprimovány na několika dalších typech buněk, včetně různých APC, ale také buněk respiračního nebo gastrointestinálního epitelu. Vazba IgE protilátek na FcεRII (CD23) na B lymfocytech vede na jednu stranu k regulaci IgE mediované buněčné odpovědi v důsledku snížení možnosti vazby těchto protilátek na aktivační FcεRI receptory, ale na druhou stranu vazba imunokomplexů IgE s antigenem usnadňuje antigení prezentaci prostřednictvím dendritických buněk [73]. Bylo prokázáno, že solubilní IgE protilátky se váží preferenčně na FcεRI receptory, zatímco imunokomplexy IgE protilátek s navázaným antigenem se váží převážně na FcεRII receptory [74].

I když elevace celkových imunoglobulinů ve třídě IgE provází nejčastěji kromě jiného parazitní onemocnění nebo atopické stavy, bývá také výrazem dysregulace funkce imunitního systému u celé řady onemocnění patřících do skupiny vrozených poruch imunitního systému. Proto je třeba v rámci diferenciální diagnostiky atopických stavů u dětí pomýšlet také na vzácné vrozené poruchy imunitního systému. Pro usnadnění diferenciální diagnostiky klinicky mírnějších prostých atopických stavů od klinicky závažnějších vrozených poruch imunitního systému jsme se v naší práci zaměřili na přehlednou sumarizaci klinických a laboratorních parametrů jednotlivých onemocnění patřících do skupiny vrozených poruch imunitního systému, které jsou charakterizované neonatální erythrodermií, těžkou atopickou dermatitidou nebo elevací sérové koncentrace celkových IgE imunoglobulinů. Tato onemocnění mohou být tím pádem v úvodu mylně považována za prostý těžký atopický stav. Dle nejnovější IUIS klasifikace publikované ke konci roku 2022 byly zatím popsány tři nejdůležitější hyper-IgE syndromy (HIES). Jedná se o klasický Jobův syndrom (způsobený mutací vedoucí ke ztrátě funkce proteinu kódované genem STAT3 děděnou autozomálně dominantně), dále PGM3 deficienci (způsobenou mutací genu PGM3 děděnou autozomálně recesivně) a Comelův-

Nethertonův syndrom (způsobený mutací genu SPINK5). Extrémní zvýšení koncentrace celkových IgE imunoglobulinů doprovází poměrně nedávno popsané vrozené poruchy imunitního systému, a to onemocnění způsobené mutací vedoucí ke ztrátě funkce proteinu kódovaného genem CARD11 děděnou autozomálně dominantně a deficiencí proteinu ZNF341 způsobenou mutací genu ZNF341 děděnou autozomálně recesivně. Variabilní sérové koncentrace IgE imunoglobulinů se vyskytují u různých dalších onemocnění ze skupiny poruch vrozeného imunitního systému nebo humorálních, buněčných či kombinovaných defektů adaptivní imunity. Neonatální erythrodermie je jedním z klinických příznaků Omennova syndromu patřícího mezi onemocnění ze skupiny těžkých kombinovaných imunodeficiencí (SCID), kompletního diGeorgova syndromu, ichthyosis vulgaris nebo Comelova-Nethertonova syndromu. Těžká atopická dermatitida se vyskytuje u pacientů s Jobovým syndromem, ZNF341 deficiencí, PGM3 deficiencí, Wiskottovým-Aldrichovým syndromem, DOCK8 deficiencí a pacientů s X-vázanou imunitní polyendokrinopatií a enteropatií vázanou na X chromozom (IPEX syndrom). V rámci přehledu jednotlivých výše uvedených diagnóz jsme také navrhli základní diferenciativně diagnostické postupy, které mohou napomoci klinickým lékařům odlišit, zda se jedná o prostý atopický stav nebo o pacienta s vrozenou poruchou funkce imunitního systému. Časná diagnostika těchto onemocnění je totiž zásadní pro základní léčbu i další péči umožňující přežití a zvýšení kvality života pacientů s vrozenými poruchami imunitního systému.

ANNEX I

PONSFORD, Mark J., Adam KLOCPERK, Federica PULVIRENTI, Virgil A. S. H. DALM, Tomas MILOTA, Francesco CINETTO, Zita CHOVANCOVA, Manuel J. RIAL, Anna SEDIVA, Jiri LITZMAN, Carlo AGOSTINI, Martin VAN HAGEN, Isabella QUINTI a Stephen JOLLES. **Hyper-IgE in the allergy clinic-when is it primary immunodeficiency?** Allergy [online]. 2018, 73(11), 2122–2136. ISSN 0105-4538. Dostupné z: doi:10.1111/all.13578

Document Type: Review; IF = 6,771

6.3 Imunoglobuliny ve třídě IgD

IgD imunoglobuliny tvoří v séru druhou nejméně zastoupenou třídu imunoglobulinů. Sérová koncentrace IgD imunoglobulinů vykazuje značnou variabilitu, proto není snadné jednoznačně určit normální sérovou koncentraci tohoto imunoglobulinu. Dle několika publikovaných prací se však sérová koncentrace IgD pohybovala v intervalu 0,005–0,240 g/l

[75]. Secernovaný IgD se tvoří v rámci adaptivní imunitní odpovědi následně po IgM imunoglobulinech [76]. Jeho přítomnost byla poprvé popsána v séru v roce 1965. Teprve později bylo zjištěno, že je membránově vázaný imunoglobulin IgD současně exprimován s imunoglobulinem IgM jako receptor na povrchu naivních B lymfocytů [77]. Přítomnost IgD imunoglobulinů je fylogeneticky zakonzervovaná již od imunitního systému ryb, což bezpochyby vypovídá o jeho podstatné roli v imunitních reakcích organismu. Přesto všechno však začaly být jeho specifické funkce objasňovány teprve nedávno, přičemž role povrchových IgD imunoglobulinů zůstává i nadále ne zcela jasná.

Solubilní IgD imunoglobulin je tvořen IgD^+IgM^- plazmatickými buňkami, které vznikají ze slizničních B lymfocytů, které prošly izotypovým přesmykem z IgM na IgD [78]. Tento proces se odehrává v lymfoepiteliálních orgánech sliznice dýchacích cest a trávicího systému. Lidské IgD^+IgM^- plazmatické buňky netvoří IgD pouze ve sliznicích, ale dostávají se také do systémové cirkulace, aby osídlily střední ucho, slzné, slinné a prsní žlázy. Zajímavé je, že k izotypovému přesmyku z IgM do IgD nedochází v systémových lymfoidních tkáních, ale vyskytuje se ve slizničních oblastech, které jsou pod tlakem antigenů pocházejících ze vzduchu nebo potravy [79]. Při vývoji B lymfocytů dochází nejdříve k expresi IgM imunoglobulinu jako součásti BCR receptoru, přičemž exprese IgD se poprvé objevuje po migraci pre-B lymfocytů do periferie ve stádiu tranzientních B lymfocytů. Sestřih do podoby IgD je kriticky závislý na přítomnosti proteinu ZFP318 [80]. U vyzrálých naivních B lymfocytů přesahuje množství povrchově navázaných IgD imunoglobulinů IgM a k snižování jeho exprese dochází až po rozpoznání antigenu B lymfocylem. Některé B lymfocyty se v návaznosti na časnou expozici solubilním antigenům přeměňují do stádia plazmatických buněk tvořících IgD protilátky [81]. Solubilní IgD protilátky rozpoznávají komenzální mikroorganismy respiračního a gastrointestinálního traktu, patogeny i potravinové antigeny. Ukázalo se, že IgD protilátky se váží na myeloidní efektorové buňky, jako jsou bazofily nebo mastocyty přes receptor, který se skládá z molekuly CD44 a galectinu-9 (Gal-9) [81]. Po vazbě specifických IgD protilátek na tento receptor a navázání antigenu na jejich vazebná místa dochází k aktivaci bazofilů ve smyslu sekrece cytokinů IL-4, IL-5 a IL-13, což má za následek zvýšenou produkci protilátek ve třídě IgG1 a IgE díky aktivaci B lymfocytů prostřednictvím Th2-buněčné imunitní odpovědi [81]. Na druhou stranu však navázané IgD protilátky na povrchu bazofilů nebo mastocytů snižují jejich degranulaci zprostředkovanou pomocí IgE protilátek [81]. Tento proces se může podílet na udržování slizniční homeostázy a imunitní odpovědi ve spolupráci se sekrečními IgA a IgG protilátkami.

V naší ambulanci se nám podařilo náhodně zachytit pacienta, jehož jedna polovina naivních vyzrálých B lymfocytů exprimovala na svém povrchu IgD, přičemž druhá polovina těchto buněk nikoli. Jednalo se o náhodný nález, který byl zjištěn při podrobném vyšetření lymfocytárních subpopulací z periferní krve pacienta metodou průtokové cytometrie v rámci vstupního imunologického vyšetření. Důvodem tohoto vyšetření bylo levostranné zvětšení lymfatických uzlin v tříselech, které si pacient sám nahmatal. Histologické vyšetření prokázalo granulomatózní mykotickou lymfadenopatii s nejistými znaky, které by mohly odpovídat aspergilové infekci. Vzhledem k nejasnosti nálezu byla doplněna biopsie druhé uzliny, která v době prvního vyšetření u nás nebyla ještě k dispozici. Vzhledem ke zjištěné anomálii ohledně exprese IgD na B-buněčném povrchu byly lymfocyty toho pacienta dále zkoumány. Bylo zjištěno, že za tímto fenotypem stála heterozygotní nonsense mutace v genu pro těžký řetězec delta (IGHD). Jednalo se konkrétně o c.368G>A mutaci vIGHD exonu 1. Tato heterozygotní mutace vedla je změně tryptofanu (TGG) na stop kodon (TAG). Jelikož se tato nonsense mutace (p.W123X) nachází v exonu 1, tato alela neumožňuje vznik funkční IgD molekuly. To vede ke ztrátě membránové exprese IgD u přibližně 50 % naivních B lymfocytů u všech nositelů této mutace. Při vyšetření ostatních dostupných členů rodiny pacienta bylo zjištěno, že stejná mutace se vyskytovala také u matky pacienta, sestry matky pacienta a dědečka pacienta z matčiny strany. Tato mutace naopak nebyla zjištěna u otce pacienta a babičky pacienta z matčiny strany, kteří vykazovali povrchovou expresi IgD na B lymfocytech srovnatelnou s kontrolními osobami. Tato mutace nebyla doposud publikována v elektronické databázi Ensembl, proto se jednalo o první popsání této mutace vedoucí poruše tvorby IgD imunoglobulinů. Následný výzkum významu této mutace byl zaměřen na zjištění in vivo role povrchových IgD imunoglobulinů v B-buněčné homeostáze a protilátkové odpovědi. Všichni pacienti s touto heterozygotní mutací v genuIGHD měli normální počty B lymfocytů a koncentraci sérových imunoglobulinů. Klinicky neměli příznaky svědčící pro imunodeficienci nebo imunodysregulaci. Polovina naivních vyzrálých B lymfocytů těchto pacientů exprimovala IgD (IgD⁺) a druhá polovina nikoli (IgD⁻). Obě tyto dvě skupiny B lymfocytů však měly stejný imunofenotyp až na sníženou expresi CD79b u skupiny IgD⁻naivních vyzrálých B lymfocytů. Nicméně obě dvě skupiny naivních vyzrálých B lymfocytů měly nezávisle na expresi povrchové molekuly IgD srovnatelnou replikační historii, stejnou kapacitu diferenciaci do plazmatických buněk po stimulaci in vitro a izotypově přesmyknuté paměťové B lymfocyty vykazovaly podobnou úroveň SHM. B lymfocyty, kterým chyběla exprese membránově vázaného IgD, se tedy normálně vyvíjely až do stádia paměťových B lymfocytů. To by mohlo znamenat, že by se IgD mohlo uplatňovat spíše v modulaci B-buněčné odpovědi na konkrétní antigeny. Vývoj

klinického stavu pacienta s opakovaným histologickým vyšetřením lymfadenopatie nakonec u něj vedl ke stanovení diagnózy nodulárního Hodgkinova lymfomu s predominancí lymfocytů (NLPHL), který byl úspěšně zaléčen chemoterapií, radioterapií a biologickou léčbou. Pacient je v současné době v remisi základního onemocnění.

ANNEX II

NECHVATALOVA, Jana, Sophinus J. W. BARTOL, Zita CHOVANCOVA, Louis BOON, Marcela VLKOVA a Menno C. VAN ZELM. **Absence of Surface IgD Does Not Impair Naive B Cell Homeostasis or Memory B Cell Formation in IGHD Haploinsufficient Humans.** *Journal of Immunology* [online]. 2018, 201(7), 1928–1935. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1800767

Document Type: Article; IF = 4,718

6.4 Imunoglobuliny ve třídě IgM

Imunoglobuliny ve třídě IgM byly poprvé popsány v roce 1939, když byla poprvé určena molekulová hmotnost protilátek tvořených některými zvířaty a člověkem v odpovědi na očkování proti pneumokokovi. Vzhledem k vysoké molekulové hmotnosti (přibližně 990 kDa) byly tyto velké molekuly označeny jako γ -makroglobuliny [82]. Následně byly tyto protilátky v roce 1964 přejmenovány Světovou zdravotnickou organizací (WHO) na IgM protilátky odkazující na původní označení „makroglobulin“. Dalším výzkumem bylo zjištěno, že sekreční IgM imunoglobuliny představují multifunkční evolučně konzervované protilátky, které jsou velmi důležité pro udržení tkáňové homeostázy, stejně tak pro rozvoj plně protektivní humorální odpovědi na patogeny. Poločas rozpadu IgM je velmi krátký a činí asi 5–8 dní [83]. Sérová koncentrace IgM imunoglobulinů je přibližně 0,5–3,0 g/l, což je činí třetím nejvíce zastoupeným izotypem imunoglobulinů v séru.

Imunoglobuliny ve třídě IgM představují evolučně vysoce konzervovaný imunoglobulinový izotyp, který je součástí povrchového antigenního receptoru B lymfocytů (BCR). IgM je vůbec prvním typem protilátky tvořené v ontogenetickém vývoji a je také první protilátkou uvolňovanou v odpovědi na setkání se s patogenem. Od ostatních imunoglobulinových izotypů se strukturálně odlišují, protože v sekreční podobě se vyskytují ve formě pentamerů a chybí jim flexibilní pantová oblast [84]. Jednotlivé monomery IgM jsou spojeny do podoby pentamerů pomocí spojovacího řetězce (J-řetězce) [84]. Tato pentamerní

struktura významně zvyšuje aviditu vazby této protilátky na antigen. V případě absence J-řetězce agregují monomery IgM do podoby hexamerů, které váží komplementový systém ještě efektivněji než pentamery IgM [84]. Nicméně o fyziologické funkci hexamerů IgM je dnes známo jen velmi málo. Celou dobu se myslelo, že hlavní efektorovou funkcí protilátek ve třídě IgM je specifická vazba na antigen a následně aktivace komplementové kaskády klasickou cestou aktivace komplementu. Dle posledních výzkumů se ukázalo, že IgM pentamer není tvořen symetrickou strukturou vazby pěti monomerů IgM, ale tvoří asymetrický pentagon, který obsahuje jeden velký prostor mezi dvěma monomery IgM [85]. V tomto prostoru se vyskytuje navázaný sérový protein „inhibitor apoptózy makrofágů“ (AIM/CD5L). Takže IgM pravděpodobně neslouží pouze jako efektorová protilátka, ale také transportér pro další efektorový protein [85].

Pentamerní IgM se může vázat na polymerní imunoglobulinový receptor (pIgR) přes svůj J-řetězec, který urychluje transport IgM protilátek přes epitel do lumen slizničních tkání [86]. Ukázalo se, že oblast lamina propria lidského gastrointestinálního traktu obsahuje signifikantní množství IgM plazmatických buněk. Sekreční IgM společně se sekrečním IgA ovlivňuje střevní mikrobiální diverzitu díky vazbě na komenzální bakterie a jejich ukotvení ve vrstvě hlenu [87]. Není však zatím zcela jasné, jak se funkčně odlišuje vazba IgM a IgA protilátek na součásti mikrobioty a jaké jsou zjevně druhově specifické rozdíly těchto procesů. Nicméně přítomnost sekrečního IgM zčásti vysvětluje fakt, proč pacienti se sIgAD, kteří z podstaty svého onemocnění netvoří nejvíce zastoupené slizniční protilátky ve třídě IgA, mají většinou poměrně chudou klinickou symptomatologii [88].

Sekreční IgM protilátky se řadí do dvou základních typů podle svého původu, způsobu regulace jejich produkce a celkové funkce, a to na přirozené IgM protilátky a imunitně indukované IgM protilátky. Zatímco přirozené IgM protilátky jsou tvořeny konstitutivně bez antigenní stimulace, imunitně indukované IgM protilátky vznikají v důsledku působení vyvolávajícího činitele (tkáňového poškození nebo infekce).

Přirozené IgM protilátky, sekretované převážně B-1 B lymfocyty, tvoří skupinu cirkulujících protilátek, které reagují s autoantigeny, ale také patogeny, odstraňují apoptotické a jiné buněčné zbytky a iniciují silnou imunitní odpověď [89]. Základní vlastností přirozených IgM protilátek je jejich polyreaktivita a zároveň schopnost vazby na některé společné antigeny patogenních mikroorganismů (např. různé epitopy fosfolipidů, sacharidů, ssDNA, dsDNA, oxidovaných LDL částic a různých dalších PAMPs). Tato vlastnost přirozených IgM protilátek jim dává evoluční výhodu, která je pravděpodobně důvodem, proč se právě IgM protilátky

(a ne IgG nebo IgA protilátky) vyskytují u všech obratlovců [90]. Nízká afinita vazby přirozených IgM protilátek na antigen je vyvážená vyšší aviditou teoreticky 10 dostupných vazeb pentamerního sekrečního IgM. Přirozené IgM protilátky se na jednu stranu váží na autoantigeny a umožňují tak navození homeostázy prevencí rozvoje zánětu a tkáňového poškození. Na druhou stranu v případě chronického nebo silného zánětu se mohou při porušení endotelu cév dostávat do tkání, kde se dále podílejí na rozvoji zánětu a na tkáňovém poškození [89].

Imunitně indukované IgM protilátky, vznikající po stimulaci zejména konvenčních B-2 B lymfocytů patogenními agens, zesilují tuto časnou pasivní linii IgM-mediované imunitní odpovědi a regulují následnou IgG tvorbu. Podle posledních výzkumů se totiž ukázalo, že imunitně indukované IgM protilátky nejsou důležité pouze v úvodní fázi boje organismu proti infekci, kde se uplatňuje zejména jejich schopnost aktivace komplementu. U značné části paměťových B lymfocytů, které prošly reakcí v germinálním centru, totiž nedochází k izotypovému přesmyku a zůstávají v paměťové podobě nachystané k další produkci IgM protilátek po opětovném setkání s antigenem [91], což by mohlo ukazovat na další důležité efektorové funkce IgM protilátek vycházející z vazby na jejich receptory. Například nedostatečná tvorba IgM protilátek se může podílet na rozvoji autoimunitní reakce proti vlastním antigenům [92]. Sekreční IgM protilátky hrají také důležitou roli v rozvoji maximální IgG imunitní odpovědi [89]. Ačkoli je tento fenomén IgM-zvyšované IgG produkce znám už mnoho let a uplatňuje se zejména při indukci imunitní odpovědi při omezeném množství vyvolávajícího antigenu, přesný mechanismus toto jevu není zatím objasněn [93-95].

Rozdílné efekty sekrečního IgM v procesech navození homeostázy či imunitní obrany jsou způsobeny díky vazbě těchto protilátek na receptory na různých buňkách. V poslední době byly objeveny tři Fc receptory pro IgM. Jedná se o $Fc\alpha/\mu$ receptor ($Fc\alpha/\mu$ R), polymerní imunoglobulinový receptor (pIgR) a $Fc\mu$ receptor ($Fc\mu$ R) [96]. $Fc\alpha/\mu$ R je exprimován hematopoetickými i nehematopoetickými buňkami a hraje důležitou roli v humorální imunitní odpovědi (zejména v prozánětlivých funkcích B-lymfocytů marginální zóny sleziny při sepsi). Hlavní funkcí pIgR je transport dimerního IgA a polymerního IgM z lamina propria mucosae přes epiteliální bariéru na povrch sliznic. $Fc\mu$ R byl objeven teprve nedávno a jeho fyziologická funkce není ještě zcela objasněna [96].

Bylo prokázáno, že se u velmi malé části populace vyskytují velmi snížené nebo až neměřitelné hladiny sérové koncentrace celkových IgM imunoglobulinů. Tento stav se označuje jako selektivní deficit IgM a je řazen do skupiny převážně protilátkových deficiencí s nejasnou

patogenezi a klinickým významem. Podle definice by pacienti s diagnózou sIgMD měli mít opakovaně prokázané snížení sérové koncentrace IgM ($<0,2$ g/l nebo <2 SD od průměru sérové koncentrace IgM pro danou věkovou skupinu). Současně by měli mít také nesníženou koncentraci celkových IgG a IgA imunoglobulinů včetně jejich podtříd, normální odpověď po antigenní stimulaci, absenci T-buněčného deficitu a vyloučení dalších sekundárních příčin snížení koncentrace IgM imunoglobulinů. Nicméně kohorty a případové studie pacientů publikovaných jako pacientů se sIgMD ne vždy tato kritéria zcela splňují. Proto jsme se v naší další práci rozhodli publikovat klinická a laboratorní data 17 pacientů se selektivním deficitem IgM sledovaných na Ústavu klinické imunologie a alergologie FN u sv. Anny v Brně a FN v Hradci Králové. V databázi PubMed jsme pomocí klíčových slovních spojení „IgM deficiency“ a „Selective IgM deficiency“ vytrídili 32 publikovaných pracích, ve kterých byla uvedena klinická a laboratorní data celkem 81 pacientů se sIgMD a tyto jsme porovnali s nálezy našich 17 pacientů se sIgMD. U našich pacientů jsme sledovali koncentraci celkových imunoglobulinů ve třídě IgG a jeho podtříd, IgA, IgM a IgE, sérové koncentrace protilátek proti tetanickému toxoidu, pneumokokovým polysacharidům a *Haemophilus influenzae* typu b, izohemaglutininů, zastoupení lymfocytárních subpopulací, expresi IgM na povrchu B lymfocytů a tvorbu IgM protilátek B lymfocyty. Bylo zjištěno, že většina našich a publikovaných pacientů se sIgMD měla velmi nízké titry izohemaglutininů, zvýšení počtu tranzientních B lymfocytů, snížení množství B lymfocytů marginální zóny a zvýšení počtu CD21^{low} B lymfocytů. Dále jsme u 10 pacientů se sIgMD měřili povrchovou expresi IgM na B lymfocytech, kterou jsme porovnávali s povrchovou expresí IgM na B lymfocytech u 24 zdravých kontrol a nezjistili jsme žádný statisticky významný rozdíl mezi těmito dvěma skupinami. Podobné výsledky jsme získali při pozorování rozdílů v mediánu intenzity fluorescence exprese IgM na povrchu B lymfocytárních subpopulací (naivních B lymfocytů, B lymfocytů marginální zóny, IgM only CD27⁺IgM⁺IgD⁻ B lymfocytů, izotypově přesmyknutých paměťových B lymfocytů, CD21^{low} B lymfocytů a plazmablastů). U 5 pacientů se sIgMD byla také testována B-lymfocytární produkce IgM po stimulaci PWM a SAC (*Saccharomyces cerevisiae* Cowan I), přičemž snížená tvorba IgM protilátek byla zjištěna u 2 pacientů a zbylí 3 pacienti měli tvorbu IgM protilátek srovnatelnou s kontrolními osobami. Nízká sérová koncentrace IgM byla u našich pacientů asociována s různými patologickými stavy, nicméně není zřejmé, jak je tato asociace významná a zda jsou imunopatologické stavy v primárním nebo sekundárním vztahu ke snížené sérové koncentraci IgM imunoglobulinů.

ANNEX III

CHOVANCOVA, Zita*(corresponding author)*, Pavlina KRALICKOVA, Alena PEJCHALOVA, Marketa BLOOMFIELD, Jana NECHVATALOVA, Marcela VLKOVA a Jiri LITZMAN. **Selective IgM Deficiency: Clinical and Laboratory Features of 17 Patients and a Review of the Literature.** Journal of Clinical Immunology [online]. 2017, 37(6), 559–574. ISSN 0271-9142. Dostupné z: doi:10.1007/s10875-017-0420-8

Document Type: Review; IF = 4,227

6.5 Imunoglobuliny ve třídě IgA

Imunoglobuliny ve třídě IgA představují skupinu protilátek, které jsou denně produkovány s nejvyšší koncentrací. Bylo popsáno, že se během jednoho dne tvoří přibližně 60 mg IgA imunoglobulinů na kilogram váhy lidského organismu [97]. Jeho převážná část se uplatňuje na sliznicích lidského organismu, které mají povrch zhruba 400 m² [98]. Jedná se tedy o imunoglobulinovou třídu predominantně zastoupenou na sliznicích, přičemž v séru jsou IgA imunoglobuliny zastoupeny dle výše koncentrace na druhém místě hned po IgG imunoglobulinech. Normální rozmezí sérové koncentrace celkových IgA imunoglobulinů je přibližně 0,8–4,5 g/l. Skupina IgA imunoglobulinů je tvořena IgA1 podtřídou, která se nachází predominantně na sliznicích respiračního traktu, a IgA2 podtřídou imunoglobulinů, která se vyskytuje převážně na sliznicích gastrointestinálního traktu. V séru se nachází přibližně 90 % IgA1 a 10 % IgA2 podtypů IgA imunoglobulinů. Na sliznicích je rozložení podtříd IgA více vyrovnané, a to 40 % IgA1 a 60 % IgA2 podtypů IgA imunoglobulinů [99].

Unikátní stavba těžkého řetězce IgA imunoglobulinu umožňuje tvorbu polymerů, což vede zejména k tvorbě dimerických forem, ale někdy také větších polymerů na slizničním povrchu. Obě formy IgA imunoglobulinů (sérová monomerní a slizniční dimerní nebo polymerní) jsou schopny neutralizovat a podílet se na odklizení patogenů například prostřednictvím svých Fc receptorů Fc α RI (CD89) na fagocytárních buňkách [99]. Nicméně v poslední době se ukázalo, že IgA při zajištění slizniční imunity kooperuje také s IgM, IgG a IgD imunoglobuliny k zajištění maximální slizniční homeostázy a imunity [79].

Dalším důkazem dysregulace funkce imunitního systému je to, že pro některá onemocnění ze skupiny vrozených poruch imunitního systému je typická elevace celkových IgA imunoglobulinů. Mezi tato onemocnění patří kongenitální trombocytopenie, a to Wiskottův-Aldrichův syndrom (WAS) nebo X-vázaná trombocytopenie (XLT), které jsou způsobené

poruchou tvorby Wiskottova-Aldrichova proteinu (WASp). V naší další práci jsme publikovali raritní případ pacienta s WAS, jehož správná diagnóza byla vzhledem k mírnějšímu fenotypu odhalena genetickým vyšetřením až v pubertálním věku, tím pádem neprodělal transplantaci hematopoetických krevních buněk, jak je u těchto pacientů obvyklé, za to však u něj byla úspěšně provedena transplantace ledvin z důvodu IgA nefropatie. WAS představuje vzácnou X-vázanou vrozenou poruchu imunitního systému, pro kterou je charakteristická přítomnost trombocytopenie s malými destičkami doprovázené tendencí ke krvácení, poruchou funkce imunitního systému manifestující se zvýšenou náchylností k infekcím a těžkým atopickým ekzémem. Navíc jsou tito pacienti náchylnější k rozvoji autoimunitních onemocnění a vzniku lymfomů. Pokud tito pacienti nepodstoupí transplantaci hematopoetických krevních buněk, umírají většinou na komplikace způsobené intracerebrálním krvácením, těžkými infekčními komplikacemi nebo lymfomy. Námi vyšetřený pacient s WAS byl od narození sledován v dětské nemocnici pro těžkou atopickou dermatitidu. Na imunologické vyšetření se k nám dostavil poprvé až v 16 letech. Během základního laboratorního vyšetření byla u něj nově náhodně zachycena mimo jiné trombocytopenie s malými destičkami. Vzhledem ke svému klinickému fenotypu byl pacient následně vyšetřen geneticky a byla u něj potvrzena mutace v genu pro WAS protein. Jednalo se o sestřihovou mutaci 30 intron + 4, CTC na CCC v exonu 11, která pravděpodobně stála za klinickým fenotypem pacienta. Následnou analýzou pomocí Western blotu byla detekována reziduální aktivita WAS proteinu. Vzhledem k tomu měl pacient pravděpodobně mírnější klinický fenotyp onemocnění a nebylo u něj po zjištění diagnózy rozhodnuto o provedení transplantace hematopoetických krevních buněk. V 21 letech se u něj rozvinula IgA nefropatie. Toto onemocnění představuje častou komplikaci pacientů s WAS. O pět let později u pacienta došlo k selhání ledvin. Pacient nastoupil do hemodialyzačního programu. Po osmi měsících léčby hemodialyzační léčby podstoupil úspěšnou transplantaci ledvin od kadaverózního dárce. Dle HLA typizace zde byla jen jedna neshoda v B lokusu (dárce: B13, 14; příjemce: B13, 62). V té době také byla u něj zahájena substituční imunoglobulinová léčba, i když pacient neměl výraznější příznaky imunodeficience. Po transplantaci bylo u pacienta pokračováno v podávání imunoglobulinové substituční léčby. Výrazně se mu zlepšily příznaky atopické dermatitidy, i když chronická lichenifikace přetrvávala. Ve 35 letech došlo bohužel k návratu postižení transplantované ledviny v podobě IgA nefropatie a pacient musel po šesti a půl letech nastoupit opět do hemodialyzačního programu. V době publikace našeho sdělení byl pacient v relativně stabilním stavu, neměl výrazné příznaky imunodeficience a čekal na dalšího vhodného dárce ledviny. Dle našich tehdejších znalostí se jednalo o první publikovaný případ pacienta s diagnózou WAS,

u kterého byla provedena transplantace ledviny, nedošlo k rychlému odhojení štěpu nebo úmrtí pacienta a štěp se podařilo udržet několik následujících let funkční.

ANNEX IV

CHOVANCOVA, Zita*(corresponding author)*, Milan KUMAN, Marcela VLKOVA a Jiri LITZMAN. Successful renal transplantation in a patient with a Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene mutation. *Transplant International* [online]. 2015, 28(8), 1005–1009. ISSN 0934-0874. Dostupné z: doi:10.1111/tri.12583

Document Type: Article; IF = 2,835

6.6 Imunoglobuliny ve třídě IgG

Imunoglobuliny ve třídě IgG představují nejvíce zastoupenou skupinu protilátek v séru. Normální rozmezí sérové koncentrace celkových IgG imunoglobulinů je přibližně 7,5–15,6 g/l. V 60. letech minulého století byly popsány 4 podtřídy IgG imunoglobulinů (IgG1–IgG4), jejichž soubor tvoří skupinu celkových IgG imunoglobulinů. Byly číselně označeny podle jejich relativního zastoupení v lidském séru od nejvyšší koncentrace po koncentraci nejnižší. Za nejvíce zastoupenou podtřídu IgG1 (61 %) následuje podtřída IgG2 (32 %), IgG3 (4 %) a nejnižší sérová koncentrace se nachází u podtřídy IgG4 (3 %) [100]. Jednotlivé podtřídy IgG se od sebe strukturálně i funkčně odlišují, i když jejich konstantní domény vykazují 95 % sekvenční homologii. Každá IgG podtřída je charakterizována vlastním těžkým řetězcem, který je kódován odlišnými geny. Geny pro jednotlivé IgG podtřídy jsou v konstantní oblasti kódující těžké řetězce imunoglobulinů seřazeny následovně: IgG3, IgG1, IgG2 a IgG4 [100]. Strukturální odlišnost jednotlivých podtříd IgG vede také k funkčním rozdílům ve schopnosti aktivovat komplementový systém klasickou cestou aktivace komplementu mezi jednotlivými podtřídami IgG (IgG3 > IgG1 > IgG2 > IgG4), ale také rozdílům ve vazbě jednotlivých IgG podtříd na Fc receptory [101]. Všechny Fc-gamma receptory (FcγR) patří do stejné imunoglobulinové superrodiny a představují nejdůležitější Fc receptory, které zprostředkovávají fagocytózu opsonizovaných bakterií. Existuje několik druhů těchto receptorů, které se od sebe liší ve své afinitě k protilátkám v důsledku rozdílné molekulární struktury. Jedná se o FcγRI (CD64), FcγRIIA a FcγRIIB (CD32), FcγRIIIA (CD16A) a FcγRIIIB (CD16B). Obecně se dá říci, že na receptor FcγRI se váží IgG imunoglobuliny s vyšší afinitou než na receptory FcγRII a FcγRIII [102].

Komplexní biologická funkce jednotlivých podtříd imunoglobulinů a jejich vzájemná interakce a kooperace není v současnosti zcela objasněna, i když některé dílčí mechanismy již známy jsou.

6.6.1 Základní charakteristika podtříd IgG imunoglobulinů

IgG1 podtřída imunoglobulinů představuje nejčastěji zastoupenou podtřídu IgG imunoglobulinů v séru, kde se vyskytuje v koncentraci přibližně 4,9–11,4 g/l, proto jsou změny v její sérové koncentraci nejvíce zodpovědné za změny koncentrace celkových IgG imunoglobulinů. IgG1 má poločas rozpadu v séru v přibližně 22 dní podobně jako IgG2 nebo IgG4 podtřída imunoglobulinů. Je tvořena zejména v odpovědi na solubilní proteinové antigeny a membránové proteiny. Ačkoli lidský imunitní systém dokáže teoreticky vytvářet biliony různých protilátek díky procesům rekombinace a SHM, ukázalo se, že každý člověk disponuje pouze jednoduchým, i když jedinečným repertoárem IgG1 protilátek [103]. Proteomický výzkum Bondta et al. ukázal, že skoro dvě třetiny všech detekovaných cirkulujících IgG1 protilátek tvořilo třicet nejvíce zastoupených klonů [103]. Tyto klonální protilátkové profily byly jedinečné pro jednotlivé vyšetřované osoby. Na jednu stranu byly stabilní po delší dobu sledování, na druhou stranu se bylo jejich spektrum schopné adaptovat na patofyziologické změny organismu (např. sepsi) [103].

IgG2 podtřída imunoglobulinů představuje druhou nejvíce zastoupenou podtřídu IgG imunoglobulinů se sérovou koncentrací přibližně 1,5–6,4 g/l. Tato podtřída protilátek nás chrání proti opouzdřeným bakteriím a má zásadní význam v obranyschopnosti proti polysacharidovým antigenům (např. *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* nebo *Streptococcus pneumoniae*). Vykazuje také vyšší rezistenci k mikrobiálním proteázám v důsledku unikátní struktury spodní části pantové oblasti [104]. IgG2 váže jen slabě C1q složku komplementu, proto IgG2 aktivuje komplementovou kaskádu přes alternativní cestu aktivace komplementu [105]. Ze všech tří typů Fc γ R se IgG2 váže pouze na Fc γ RII a Fc γ RIII. IgG2 podtřída imunoglobulinů váže C1q složku komplementu jen velmi slabě, takže predominantně aktivuje komplementový systém alternativní cestou aktivace komplementu [106].

IgG3 podtřída imunoglobulinů se vyskytuje v sérové koncentraci přibližně 0,2–1,1 g/l. Představuje společně s IgG1 podtřídou hlavní protilátky tvořené v odpovědi na proteinové antigeny. IgG3 podtřída imunoglobulinů má však v porovnání s ostatními podtřídami

imunoglobulinů kratší biologický poločas, který je asi 7 dní [107]. Důvodem je to, že IgG3 se na rozdíl od ostatních podtříd IgG neváže na neonatální Fc receptor [107]. IgG3 podtřída imunoglobulinů společně s IgG1 podtřídou spouští své efektorové funkce vazbou na Fc γ receptory a aktivací komplementového systému. Dle pokusů *in vitro* se zdá, že se IgG3 váže s vyšší aviditou na lidské alveolární makrofágy, což by mohlo ukazovat na význam specifických IgG3 protilátek v protilátkami zprostředkované fagocytóze [108]. IgG3 podtřída imunoglobulinů podobně jako IgG1 vzniká při virových infekcích s tím, že IgG3 protilátky se vytváří jako první [109]. Zajímavostí je fakt, že IgG3 má nejdelší pantovou oblast ze všech podtříd IgG, která je tvořena asi 62 aminokyselinami, což je asi čtyřnásobek počtu aminokyselin tvořících pantovou oblast IgG1 [110]. Fab fragmenty jsou od Fc fragmentů IgG3 podtřídy imunoglobulinů relativně vzdálené, což této molekule dává větší míru flexibility. Ze stejného důvodu má tato podtřída v porovnání s ostatními podtřídami IgG nejvyšší molekulární hmotnost [100]. Nicméně obecně se dá říct, že IgG3 dominantní odpověď se zdá být vzácná [100].

IgG4 podtřída imunoglobulinů se vyskytuje v sérové koncentraci cca 0,08–1,40 g/l. IgG4 podtřída imunoglobulinů tvoří nejméně zastoupenou podtřidu ze všech IgG podtříd. Jedná se o zvláštní typ protilátek, které se svými charakteristickými vlastnostmi a funkcemi zcela vymykají klasické představě o fungování protilátek ve smyslu prozánětlivého působení a rozvoje imunitní odpovědi. Díky strukturálním rozdílům Fc oblasti se u nich nemohou uplatňovat klasické Fc-dependentní efektorové mechanismy, proto její efektorové funkce závisí především na Fc-independentních mechanismech. Mezi ně patří například ovlivnění interakce mezi dvěma proteiny, což vede ke stimulaci nebo blokádě funkce receptorů nebo enzymů, blokádě přenosu signálů nebo znemožnění mezibuněčné adheze [111]. Vzhledem k výrazné flexibilitě jejich pantové oblasti dokáží vytvářet disulfidické můstky mezi dvěma těžkými řetězci, ale také v rámci jednoho svého těžkého řetězce [112]. Jejich unikátní vlastností je také schopnost výměny Fab ramének (FAE; z anglického Fab arm exchange) a Fc-Fc interakce. FAE umožňuje kombinaci poloviny jedné protilátky (jednoho těžkého a lehkého řetězce) a poloviny druhé protilátky za vzniku bispecifické monovalentní protilátky, která dokáže přemostit dva antigeny [113]. Díky schopnosti Fc-Fc interakce se IgG4 protilátka dokáže vázat na protilátky všech ostatních IgG podtříd, ale ne ostatních izotypů imunoglobulinů. Tento proces pravděpodobně slouží k odstraňování ostatních podtříd IgG s porušenou strukturou [114]. Biologické funkce této zvláštní imunoglobulinové podtřídy nejsou v současnosti sice zcela

objasněny, ale předpokládá se jejich uplatnění zejména v regulaci imunitní odpovědi. Tyto protilátky jsou tvořeny v důsledku dlouhodobé nebo silné antigenní stimulace [115].

S tvorbou IgG4 podtřídy imunoglobulinů souvisí také poměrně nedávno popsaná skupina onemocnění, které se označují jako IgG4-asociovaná onemocnění (IgG4-RD). Cílem další naší práce bylo upozornit na problematiku toho vzácného onemocnění zejména klinické onkology, kteří se mohou s tímto onemocněním v rámci diferenciální diagnostiky nádorového postižení setkat. Skupina IgG4-RD představuje imunitně podmíněné patologické stavy, jejichž podstatou je tvorba fibrózních a sklerotizujících ložisek v různých orgánech lidského těla, což vede k progredujícímu postižení jejich funkce. Mezi nejčastěji postižené orgány patří pankreas a velké slinné žlázy, ale také orbity, slzné žlázy, biliární cesty, plíce, ledviny, retroperitoneum, aorta, meningy nebo štítná žláza. Základním diagnostickým kritériem je typický histologický obraz, kam patří zejména lehká až střední infiltrace eozinofily, storiformní fibróza, obliterativní flebitida a infiltráty velkého množství IgG4⁺ plazmatických buněk. K diagnóze může přispět i vyšetření sérové koncentrace IgG4 imunoglobulinů, která by se měla dle diagnostických kritérií pohybovat nad 1,35 g/l. Nicméně část pacientů s IgG4-RD má sérovou koncentraci IgG4 v normě. Navíc elevace koncentrace IgG4 podtřídy imunoglobulinů se může vyskytovat také u jiných patologických stavů, které jsou charakterizované přítomností chronické zánětlivé aktivity (některá respirační onemocnění, onemocnění zažívacího traktu, autoimunitní a nádorová onemocnění a další patologické stavy). Jedno ze základních diagnostických úskalí této skupiny onemocnění představuje fakt, že tyto stavy na zobrazovacích metodách velmi přesvědčivě imitují pokročilá nádorová onemocnění, což často vede ke zbytečnému odstranění orgánů nebo jejich částí v rámci chirurgického řešení suspektního nádorového bujení ve spojení s histologickým odběrem. Mezi výskytem IgG4-asociovaných onemocnění a nádorových onemocnění panuje pravděpodobně určitá souvislost, nicméně do dnešní doby není zcela jasné, zda se u pacientů s IgG4-asociovaným onemocněním vyskytuje vyšší frekvence nádorových onemocnění nebo u pacientů s nádorovými onemocněními vyšší frekvence IgG4-asociovaných onemocnění. Nicméně je jisté, že souběh obou onemocnění bývá poměrně častý.

ANNEX V

CHOVANCOVÁ, Z.*(corresponding author)*, P. FILIPENSKÝ, S. ROTNÁGLOVÁ, I. STANICZKOVÁ ZAMBO, T. SHATOKHINA, K. NOVOSÁDOVÁ a J. LITZMAN. **IgG4 immunoglobulin subclass and related pathological conditions or how to effectively imitate cancer disease.** *Klinicka Onkologie* [online]. 2022, 35(1), 20–31. Dostupné z: doi:10.48095/ccko202220

Document type: Article

Jak již bylo nastíněno dříve, tak proces tvorby protilátek v celé své komplexitě představuje velmi složitý proces různých na sebe navazujících reakcí, které jsou ovlivňovány buňkami vrozené i adaptivní imunity, cytokinovým prostředím a lokalizací rozvoje samotné imunitní odpovědi. Kromě toho nemusí být porucha tvorby protilátek jako taková jedinou patologií, ale může se stát součástí ještě složitějšího mechanismu celkové dysregulace funkce imunitního systému. Prototypem heterogenního onemocnění imunitního systému, u kterého se snoubí snížení koncentrace některých celkových imunoglobulinů doprovázené porušenou protilátkovou odpovědí po antigenní stimulaci společně s celou řadou dalších patologických stavů odpovídajících dysregulaci funkce imunitního systému, je běžná variabilní imunodeficience (CVID).

7 Běžná variabilní imunodeficience

Běžná variabilní imunodeficience (CVID) představuje nejčastější symptomatickou vrozenou poruchu tvorby protilátek s incidencí asi 1:25 000 obyvatel [116]. Poprvé bylo toto onemocnění popsáno v roce 1954 u 39-leté dospělé ženy, přičemž do té doby bylo pozorováno snížení koncentrace imunoglobulinů pouze u chlapců, kteří však trpěli pravděpodobně později popsanou X-vázanou Brutonovou agamaglobulinémií [117]. Označení tohoto onemocnění (z anglického „common variable immunodeficiency“) bylo poprvé použito až v roce 1971 komisí Světové zdravotnické organizace (WHO), aby došlo k oddělení této skupiny onemocnění od ostatních v té době již více klinicky popsaných onemocnění imunitního systému a těch z mendeliánskou dědičností [118]. Do češtiny byl název tohoto onemocnění přeložen ne zcela šťastně jako „běžná variabilní imunodeficience“. To totiž vyvolává mylný dojem, že se jedná o běžné, a tudíž časté onemocnění. Přílehlavějším označením tohoto onemocnění bylo například „obecná variabilní imunodeficience“, nicméně původní označení se již vžilo.

7.1 Obecná charakteristika diagnózy CVID

Toto onemocnění se manifestuje heterogenními klinickými příznaky, kterým dominují zejména těžké a opakované infekce, přičemž u některých pacientů se k tomu přidává celá řada dalších komplikací vycházejících z dysregulace funkce imunitního systému, jako je zvýšený výskyt autoimunitních, autoinflamatorních a nádorových stavů. Přibližně dvě třetiny pacientů s tímto onemocněním jsou diagnostikovány v dospělosti s maximem klinické manifestace v období druhé a třetí dekády života, zbylá třetina pak v dětském nebo adolescentním věku [119]. Za posledních několik desetiletí byla publikována celá řada odborných prací, které se zabývají patogenezi tohoto onemocnění. S postupujícím poznáním se došlo k závěru, že diagnóza CVID je tvořena skupinou onemocnění s podobným klinickým a laboratorním fenotypem, ze které se postupem času oddělují samostatné diagnózy charakterizované nově zjištěnými genetickými defekty, které vedou k rozvoji fenotypu CVID. Nedávné studie také upozornily na důležitý vliv epigenetických modifikací v rozvoji tohoto onemocnění.

V roce 2016 bylo odhadováno, že monogenní příčina fenotypu CVID byla odhalena u asi 2–10 % případů tohoto onemocnění [120], zatímco v letošním roce se již dle literatury jedná o 20–50 % pacientů s monogenní příčinou rozvoje fenotypu CVID [121]. Monogenní genetické poruchy byly nalezeny na třech buněčných úrovních, a to na povrchu buněk,

v cytoplazmě a jádře [116]. Mezi geny, jejichž poruchy byly asociovány s CVID fenotypem, patří *ICOS*, *TNFRSF13B* (TACI), *TNFRSF13C* (BAFF-R), *TNFSF12* (TWEAK), *CD19*, *CD81*, *CR2* (CD21), *MS4A1* (CD20), *TNFRSF7* (CD27), *IL21*, *IL21R*, *LRBA*, *CTLA4*, *PRKCD*, *PLCγ2*, *NFKB1*, *NFKB2*, *PIK3CD* GOF (APDS1), *PIK3R1* LOF (APDS2), *Vav1*, *Rac2*, *BLK*, *IKZF1* (IKAROS), *IRF2BP2*, *PTEN*, *TNFSF13* (APRIL), *TRNT1*, *ATP6AP1*, *ARHGEF1*, *SH3KBPI* (CIN85), *SEC61A1*, *MOGS* a *CTNNB1*, *FCγRIIa*, *PKCδ*, *IP3*, *LCK*, *ZAP70*, *ERK*, *CARMA1/CARD11*, *Bob1*, *STAT1*, *NEIL1*, *CD70*, *TTC37* [116, 120, 121].

Genetické mutace vedoucí k rozvoji klinického a laboratorního CVID fenotypu u zbylých pacientů zatím zůstávají neobjasněny. U těchto pacientů je proto diagnostika tohoto onemocnění v současné době založena zejména na splnění diagnostických kritérií, která byla postupem času již několikrát modifikována. Mezi dnes nejpoužívanější diagnostická kritéria patří ICON diagnostická kritéria z roku 2016 a nejnovější ESID diagnostická kritéria z roku 2019 [122, 123]. Ačkoli se jednotlivá diagnostická kritéria od sebe svými parametry více či méně odlišují, základem všech dosud publikovaných diagnostických kritérií je vždy v první řadě vyloučení sekundárních příčin rozvoje hypogamaglobulinémie [124, 125] a přítomnost porušené protilátkové odpovědi po antigenní stimulaci.

7.2 Základní klinická manifestace pacientů s CVID

Pacienti s diagnózou CVID trpí klinickými příznaky způsobenými na jedné straně infekčními komplikacemi v důsledku poruchy tvorby protilátek, a na straně druhé různou četností a závažností dalších rozmanitých neinfekčních klinických příznaků vycházejících z dysregulace funkce imunitního systému, kam patří zejména autoimunitní, lymfoproliferativní a nádorová onemocnění [126].

Infekční komplikace patří mezi základní klinické manifestace u pacientů s CVID a postihují zejména respirační a gastrointestinální trakt [127]. Většina pacientů s diagnózou CVID trpí zejména na opakované a závažné infekce dýchacích cest (otitidy, sinusitidy a pneumonie) způsobené převážně opouzdřenými patogeny (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Neisseria meningitidis*), ale také dalšími bakteriemi (například *Moraxella catarrhalis* nebo *Staphylococcus* sp.). V rozvoji infekčních komplikací se u pacientů s CVID uplatňují také viry a další patogeny (například *Rhinovirus*, virus *Herpes zoster* nebo *Mycoplasma species*). Gastrointestinální infekce se manifestují nejčastěji ve formě akutních nebo chronických průjmů. Nejčastějším patogenem je *Giardia lamblia*, ale také *Campylobacter*

jejuni nebo *Salmonella species*. Zajímavostí je také fakt, že se u pacientů s CVID nevyskytuje vyšší prevalence infekce způsobené *Helicobacter pylori* v porovnání s běžnou populací [116].

Až 90 % pacientů s CVID je postiženo plicními komplikacemi tohoto onemocnění, mezi které patří následky prodělaných infekcí, další imunitně mediované komplikace nebo nádorové procesy [128]. Mezi nejčastější postižení plic u pacientů s CVID patří rozvoj bronchiektázií a intersticiálního plicního postižení. Bronchiektázie, vyskytující se až u poloviny pacientů s CVID, představují patologickou ireverzibilní dilataci bronchů a bronchiolů, která se rozvíjí v důsledku zánětlivé destrukce jejich stěny [129]. V místě bronchiektázií dochází k opakovaným infekcím a zánětlivým reakcím, které dále poškozují nejen průdušky, ale i okolní plicní tkáň [130]. Asi 8–20 % pacientů s CVID trpí na granulomatózně-lymfocytární intersticiální plicní nemoc (GLILD) [131]. Jedná se o klinicky-radiologicky-patologicky definované intersticiální plicní postižení, u kterého se nachází kombinace přítomnosti plicních granulomů a lymfoproliferace, kam patří lymfocytární intersticiální pneumonie, folikulární bronchiolitida a lymfoidní hyperplazie [132]. GLILD je často doprovázena dalšími extrapulmonálními příznaky patřícími do skupiny dysregulace funkce imunitního systému, jako je splenomegalie, autoimunitní cytopenie a zvýšené riziko rozvoje lymfomů [131].

U více než čtvrtiny pacientů s CVID se vyskytují různé autoimunitní komplikace [133], které jsou více než sedmkrát častější než v běžné populaci [119]. Tato onemocnění mohou být také prvním manifestním příznakem imunodeficience pacientů s diagnózou CVID. Mezi nejčastější autoimunitní komplikace patří autoimunitní cytopenie (imunitní trombocytopenická purpura nebo hemolytická anémie), ale dále se u nich vyskytuje revmatoidní artritida, uveitida, alopecie, autoimunitní postižení štítné žlázy, systémový lupus erythematodes (SLE), vaskulitidy, antifosfolipidový syndrom, psoriáza, roztroušená skleróza, lichen planus, vitiligo, diabetes mellitus I. typu, perniciózní anémie, myasthenia gravis nebo autoimunitní pankreatitida) [134].

Mezi další klinické komplikace pacientů s CVID patří lymfoproliferativní onemocnění, která se vyskytují přibližně u pětiny pacientů. Mezi ně se řadí lymfadenopatie, lymfoidní hyperplázie nebo lymfocytický zánět, lymfocytóza a gamapatie, ale také lymfomy [135]. U pacientů se CVID se vyskytují častěji také další nádorová onemocnění, přičemž mezi nejčastější z nich patří nádorová onemocnění žaludku a nádory kůže vyjma melanomu [136]. Ukázalo se, že se nádorová onemocnění častěji vyskytovala u pacientů s klinickými příznaky odpovídajícími imunitní dysregulaci (přítomnost artritidy, atrofické gastritidy nebo intersticiálního plicního postižení), na druhou stranu výzkum týkající se výskytu genetické

predispozice k nádorovým onemocněním nepřinesl u této skupiny pacientů slibné výsledky [136].

Postižení gastrointestinálního traktu se u pacientů s CVID manifestuje zejména jako atrofická gastritida, perniciózní anémie, chronická enteropatie a kolitida, která připomíná nálezy u zánětlivých střevních onemocněních. Většina pacientů s CVID trpí na chronické průjmy, které u více než poloviny z nich mohou vést až k malabsorpci [137]. Mezi nejčastější histopatologické nálezy patří vilózní atrofie a přítomnost zánětlivých lymfocytárních infiltrátů [138]. Postižení gastrointestinálního traktu často imituje celiakii, ale bezlepková dieta v tomto případě nepřináší pacientům žádný klinický benefit [139]. Značná heterogenita a neznámý mechanismus vedoucí k rozvoji CVID enteropatie a tím pádem nemožnost efektivní léčby této skupiny komplikací zvyšuje morbiditu a mortalitu těchto pacientů.

Výzkum na poli patogeneze této diagnózy stále intenzivně probíhá a zaměřuje se kromě detekce nových kandidátních genů také na změny vrozené i adaptivní imunity, které by dokázaly vysvětlit patogenezi rozvoje klinického fenotypu CVID u většiny těchto pacientů.

7.3 Vybrané laboratorní patologické nálezy u pacientů s CVID

Jelikož původně bylo na diagnózu CVID nahlíženo jako na imunodeficienci ve smyslu snížené tvorby protilátek, úvodní výzkum na tomto poli byl věnován zejména základním parametrům adaptivního imunitního systému. Do dnešní doby byly popsány nejružnější patologické změny počtu a funkce B-lymfocytárních nebo T-lymfocytárních subpopulací u těchto pacientů. V současnosti popsané genetické defekty u pacientů s CVID fenotypem jsou spjaty s procesy maturace, aktivace a přežívání B lymfocytů. Mutace v genech kódujících receptory a aktivační nebo kostimulační molekuly ovlivňují také funkci T lymfocytů a jsou spojeny s různou tíží klinické manifestace základního onemocnění. Nicméně u přibližně poloviny pacientů s CVID zůstává příčina jejich klinického fenotypu neodhalena. Proto výzkum počtu a funkce jejich lymfocytárních subpopulací může přispět k odhalení společných zákonitostí a tím nasměrování k možnému odhalení příčiny tohoto stavu. Zajímavostí zůstává fakt, že ačkoli se jedná o jednu z klinicky nejvýznamnějších poruch tvorby protilátek v dospělém věku, tak u většiny pacientů s CVID fenotypem nacházíme normální počty B lymfocytů v periferní krvi. Méně pozornosti bylo donedávna věnováno možným defektům vrozené imunitní odpovědi, které by však mohly pomoci vysvětlit heterogenitu klinického fenotypu pacientů s CVID.

Obecně nejvýznamnějším limitujícím faktorem téměř všech studií zabývajících se sledování změn parametrů imunitního systému u pacientů s COVID je často poměrně malý počet pacientů, kteří jsou navíc v rámci své základní diagnózy značně heterogenní, zejména co se týče fenotypu. To může být také důvodem často protichůdných výsledků výzkumu některých imunologických parametrů u těchto pacientů. V našich studiích jsme se zabývali některými aspekty vrozené i adaptivní imunity pacientů s COVID ve snaze o zlepšení diagnostiky nebo přispění k odhalení některých aspektů patogeneze tohoto onemocnění.

7.3.1 Účastní se komplementový systém patogeneze COVID?

Jednu ze základních humorálních složek vrozeného imunitního systému představuje komplementový systém, přičemž jeho vliv na patogenezi COVID není ještě zcela objasněn. Jedná se o vysoce zakonzervovanou část vrozeného imunitního systému, která se skládá z asi 40 plazmatických proteinů a povrchově vázaných regulačních proteinů. I když komplementový systém patří mezi mechanismy vrozeného imunitního systému, hraje zásadní roli také v imunitní odpovědi mediované mechanismy adaptivní imunity. Aktivace kaskády komplementových proteinů může být dělena do tří základních fází. Nejprve dochází k vazbě molekul na mikrobiální povrchy, což vede k nastartování aktivace komplementového systému. Následně se vytváří C3 a C5 konvertázy, které spouští štěpení C3 a C5 složky komplementu na konkrétní štěpné produkty. Výsledným krokem je tvorba membránu atakujícího komplexu (MAC), což vede k finálnímu vytvoření póru v membráně cílové buňky, a tím k její osmotické lýze. Komplementový systém může být aktivován třemi základními cestami, mezi které patří klasická, alternativní a lektinová cesta aktivace komplementu. Klasická cesta je spouštěna vazbou C1q složky komplementu na imunokomplex. Při alternativní cestě dochází k samovolnému štěpení složky C3. Lektinová cesta aktivace komplementu je spouštěna přes manózu vázající lektin (MBL) [140].

MBL představuje cirkulující extracelulární protein, který je produkován jaterními buňkami [141]. Nachází se však také v místě probíhajícího zánětlivého procesu a podílí se na odstraňování širokého množství patogenních mikroorganismů [141]. Po vazbě na MBL-receptor aktivuje komplementový systém, zprostředkovává opsonizaci a následně fagocytózu. Umožňuje také uvolnění prozánětlivých cytokinů z monocytů, účastní se odklizení apoptotických buněk, ovlivňuje produkci reaktivních metabolitů kyslíku neutrofilů, ale váže se také na nádorové buňky, které zabíjí mechanismem MBL-dependentní buněčně mediované cytotoxicity [141]. Bylo prokázáno, že genetické polymorfismy v genu *MBL2* vedou ke snížení

sérové koncentrace MBL. Zatímco deficit složek klasické nebo alternativní dráhy aktivace komplementu je vzácný, deficit MBL charakterizovaný sérovou koncentrací MBL <0,5 µg/ml je v normální populaci naopak poměrně častý. Postihuje průměrně 5–30 % světové populace [142], přičemž jeho výskyt je popisován u přibližně 5–15 % kavkazské populace [143], 25 % euroasijské populace [144] a 50–60 % obyvatel subsaharské oblasti [145].

I když většina pacientů s deficitem MBL bývá asymptomatická, některé pacienty tento deficit predisponuje k vyšší frekvenci respiračních infekcí nebo může být spojen s rozvojem závažných infekčních komplikací, a to zejména u pacientů s dalšími porušenými složkami vrozené imunitní odpovědi. Plicní tkáň sama o sobě MBL netvoří. Tato molekula se do plicní tkáně dostává zřejmě přechodem z krevního řečiště při probíhajícím zánětu. Tento protein byl totiž detekován v bronchoalveolární laváži u pacientů s pneumonií, ale ne u pacientů bez plicní infekce [146]. Jeho nedostatečná přítomnost v plicích může být spojena s prokázanou vyšší náchylností k respiračním infekcím u některých pacientů s MBL deficitem. Ukázalo se, že snížení sérové koncentrace MBL predisponuje dětskou populaci k opakovaným respiračním infekcím [147, 148]. Studie Holdawayové et al. popsala podobný trend také v dospělé populaci [149], avšak Dahl et al. tuto asociaci ve své studii nepotvrdili [150]. Bylo prokázáno, že MBL hraje roli v imunitní obranyschopnosti proti infekci způsobené opouzdřenými bakteriemi (například *Streptococcus pneumoniae*, ale také *Staphylococcus aureus* nebo *Neisseria meningitidis*), protože se váže na jejich povrch a usnadňuje fagocytózu a usmrcení těchto bakterií neutrofily nebo makrofágy [151-153]. MBL deficiencie zvyšuje riziko úmrtí pacientů se závažnou pneumokokovou infekcí [144]. Nicméně je třeba mít na paměti, že lektinová cesta aktivace komplementu se podílí na komplement-dependentní obraně proti *Streptococcus pneumoniae* v porovnání s klasickou cestou aktivace komplementu jen významně menší měrou [154]. Deficit MBL může mít také negativní vliv na průběh některých dalších respiračních onemocnění, jako je například primární ciliární dyskineze [155], cystická fibróza [156] nebo chronická obstrukční plicní nemoc [157]. Rozporuplná data se týkají vlivu této molekuly na rozvoj a tíži bronchiektázií [158-160] nebo náchylnost k infekci způsobenou původcem *Mycobacterium tuberculosis* [161-166]. Obecně však nebylo prokázáno, že by deficit MBL zvyšoval mortalitu svých nositelů [150].

Ne zcela jednoznačná data ohledně významu deficitu MBL u jinak imunokompetentní populace nás přivedla na myšlenku klinického výzkumu této patologie u pacientů s COVID. Proto jsme se zaměřili na to, zda se snížená tvorba MBL může podílet na tíži klinických příznaků u pacientů s COVID. Provedli jsme analýzu polymorfismů MBL2 genu u celkem 94 pacientů

s CVID, přičemž 54 z nich pocházelo z Ústavu klinické imunologie a alergologie FN u sv. Anny v Brně a LF MU a zbylých 40 pacientů z Oddělení revmatologie a klinické imunologie z Freiburgu. Dále bylo vyšetřeno celkem 359 kontrolních osob české národnosti, aby mohla být určena frekvence MBL2 genotypu v geograficky odpovídající kontrolní populaci. U celkem 66 pacientů s CVID bylo k dispozici CT vyšetření plic k určení přítomnosti bronchiektázií a u 90 pacientů také funkční spirometrické vyšetření. Dle genetického vyšetření bylo zjištěno, že celkem 58 pacientů s CVID vykazovalo genotyp asociovaný s normální sérovou koncentrací MBL, 19 pacientů s CVID mělo genotyp asociovaný s nízkými hladinami MBL a u 17 pacientů byl geneticky prokázán deficit MBL. Frekvence výše popsanych genetických anomálií týkající se genu kódujícího MBL byla stejná u pacientů s CVID i vyšetřené kontrolní populace. U pacientů s genotypem, který je predisponoval ke snížené tvorbě MBL, byla zjištěna zvýšená frekvence bronchiektázií, plicní fibrózy a respirační insuficience. Nicméně na celou řadu klinických a laboratorních nálezů u pacientů s CVID neměl genotyp spojený se sníženou tvorbou MBL statisticky významný vliv. Jednalo se o věk při rozvoji klinických příznaků, věk v době diagnózy, počet pneumonií před stanovením diagnózy, koncentraci imunoglobulinů ve třídě IgG, IgA nebo IgM před započítáním imunoglobulinové substituční léčby, rozvoj emfyzému, abnormality v plicních funkcích, přítomnost průjmů, granulomů, lymfadenopatie, splenomegalie, frekvenci infekcí respiračního traktu nebo počet antibiotických kúr. Naše studie byla pravděpodobně prvním publikovaným výzkumem, který prokázal asociaci MBL deficiencie s rozvojem bronchiektázií u pacientů s CVID. Kromě toho se zdá být pravděpodobné, že nedostatečná tvorba MBL by mohla pacienty s CVID predisponovat také k rozvoji plicní fibrózy a respirační insuficience. Na druhou stranu se ukázalo, že nedostatečná tvorba MBL by neměla mít vliv na rozvoj dalších komplikací související s touto diagnózou.

ANNEX VI

LITZMAN, J., T. FREIBERGER, B. GRIMBACHER, B. GATHMANN, U. SALZER, T. PAVLIK, J. VLCEK, V. POSTRANECKA, Z. TRAVNICKOVA a V. THON. **Mannose-binding lectin gene polymorphic variants predispose to the development of bronchopulmonary complications but have no influence on other clinical and laboratory symptoms or signs of common variable immunodeficiency.** *Clinical and Experimental Immunology* [online]. 2008, 153(3), 324–330. ISSN 0009-9104. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03700.x

7.3.2 Mohly by se také neutrofilní granulocyty účastnit rozvoje COVID?

Neutrofilny tvoří základní buněčnou složku vrozeného imunitního systému. Jejich význam odráží také množství těchto buněk v periferní krvi, kdy tvoří přibližně 50–70 % lidských cirkulujících leukocytů. Neutrofilny vznikají v kostní dřeni a jsou rychle uvolňovány do periferní cirkulace, odkud jsou schopny se dostat do místa infekce nebo zánětu pomocí leukocytární adhezivní kaskády [167]. Tam se podílejí na odstraňování patogenů a tvorbě různých mediátorů, které regulují vrozenou i adaptivní imunitní odpověď [168]. Neutrofilny jsou obvykle krátce žijící buňky, které v cirkulaci přežívají několik hodin a po vycestování do tkání několik dní. Po vykonání svých efektorových funkcí v místě zánětu nakonec hynou apoptózou a jsou odstraňovány makrofágy bez závislosti na cytokinovém mikroprostředí [169]. Odstranění navenek neporušených neutrofilů fagocytózou je důležité pro zamezení uvolnění jejich cytotoxického obsahu do extracelulárního prostředí, ke kterému by došlo v případě, že by buňky zahynuly nekrotickou smrtí. Zkrácení životaschopnosti neutrofilů díky jejich zvýšené apoptóze však může způsobit zvýšenou náchylnost organismu k závažným a opakovaným infekcím.

Na povrchu lidských neutrofilů se konstitutivně nachází molekuly CD11b, CD15, CD16 a CD33, a to bez závislosti na buněčné lokalizaci, stupni aktivace nebo aktuální fázi onemocnění [170]. Molekula CD11b patří do rodiny integrinů a nachází se na povrchu širokého spektra leukocytů (kromě neutrofilů také monocytů, makrofágů, NK buněk a dalších). Tato molekula napomáhá adhezi neutrofilů na aktivovaný endotel a společně s molekulou CD18 umožňuje vycestování leukocytů do tkání diapedézou [171]. Molekula CD15 (Lewis x) se vyskytuje na lidských myeloidních buňkách a zprostředkovává adhezi neutrofilů k dendritickým buňkám. Mechanismus exprese této molekuly zůstává neobjasněn [172]. Molekula CD16 (v případě neutrofilů FcγRIIIb) představuje Fc receptor pro IgG, který se účastní degranulace neutrofilů. Molekula CD33 patří mezi sialoadheziny, vykazuje lektinovou aktivitu a zprostředkovává mezibuněčné interakce vazbou na rezidua kyseliny sialové různých glykoproteinů či glykolipidů.

Neutrofilny disponují celou řadou efektorových mechanismů, mezi které se řadí fagocytóza, produkce reaktivních metabolitů kyslíku, proteáz a tvorba neutrofilních extracelulárních sítí (NETs) [168]. Ve své cytoplazmě obsahují množství intracelulárních granulí a vezikul, které se dostávají na buněčný povrch neutrofilů postupnou exocytózou po jeho stimulaci prozánětlivými cytokiny. Mezi základní granula neutrofilů patří azurofilní (primární), specifická (sekundární), želatinázová (terciární) a sekreční granula [173]. Po aktivaci neutrofilů dochází nejprve k exocytóze a uvolnění obsahu ze sekrečních granulí,

následně pak želatinázových a specifických granulí. Azurofilní granula se podílí na tvorbě fagolysozomu uvnitř neutrofilů [174]. Obsahují antibakteriální proteiny (myeloperoxidázu, azurocidin nebo heparin vázající protein) a proteázy, které degradují proteiny extracelulární matrix. Proteázy se dále podílejí na aktivaci a inaktivaci buněčných receptorů a účastní se procesů nitrobuněčného rozkladu vedoucích mimo jiné k odstranění patogenů (neutrofilní elastáza, katepsin G a proteináza-3). Specifická granula obsahují antibakteriální proteiny (laktoferin, neutrofilní s želatinázou asociovaný lipokalin, katelicidin a lysozym) a proteázy (kolagenázu a další). Želatinázová granula obsahují antibakteriální proteiny (lysozym) a proteázy (želatinázu a leukolysin). Sekreční granula neobsahují velké množství antibakteriálních proteinů nebo proteáz, ale nachází se zde antimikrobiální protein azurocidin [175], který se uvolňuje z neutrofilů v časně i pozdní fázi jejich aktivace [176]. Kromě toho obsahují komplementové receptory a receptory, které jsou důležité pro migraci neutrofilů. Jedná se o chemotaktický receptor pro N-formylmethionyl-leucin-fenylalanin (fMLP), CD14 receptor pro bakteriální lipopolysacharid (LPS) a nejméně čtyři komplementové receptory (C1qR, CR1, CR3 a CR4), které se spolu s nimi dostávají také na povrch neutrofilů při jeho degranulaci. Pátý komplementový receptor C5aR se vyskytuje na povrchu neutrofilů konstitutivně.

Cílem další studie bylo ukázat, zda pacienti s CVID vykazují zvýšené systémové hladiny markerů aktivace granulocytů a zda jsou tyto hladiny dále ovlivnitelné pomocí intravenózní imunoglobulinové substituční léčby (IVIG). Vyšetřovanou skupinu tvořilo celkem 46 pacientů s CVID a kontrolní skupinu pak 44 zdravých osob. U pacientů s CVID i kontrolních osob byly změřeny počty neutrofilů. Pomocí metody ELISA byly u obou vyšetřovaných skupin mimo akutní infekci změřeny sérové hladiny elastázy a myeloperoxidázy, jejichž sérová koncentrace patří mezi aktivační známky granulocytů. Navíc u 24 pacientů s CVID byly aktivační markery změřeny před aplikací IVIG a dále za 1 hodinu po aplikaci IVIG. Plazmatické hladiny elastázy a myeloperoxidázy byly signifikantně vyšší ve skupině pacientů s CVID v porovnání s kontrolní skupinou. Sérové hladiny elastázy se navíc ještě zvýšily u pacientů s CVID po aplikaci IVIG. Absolutní počty neutrofilů byly statisticky signifikantně vyšší ve skupině pacientů s CVID v porovnání s kontrolními osobami. Plazmatické hladiny elastázy a myeloperoxidázy byly signifikantně vyšší ve skupině pacientů s CVID v porovnání s plazmatickými hladinami elastázy a myeloperoxidázy skupiny kontrolních osob. Statisticky signifikantně vyšší hodnoty plazmatických koncentrací neutrofilní elastázy a myeloperoxidázy byly pozorovány u 21 pacientů s CVID a současně přítomnou splenomegalií v porovnání s 21 pacienty s CVID

bez splenomegalie. Žádné rozdíly v plazmatické koncentraci elastázy a myeloperoxidázy nebyly patrné u pacientů s CVID a přítomností nebo nepřítomností bronchiektázií. Pacienti bez dalších komplikací patřících k diagnóze CVID vykazovali nižší plazmatické koncentrace myeloperoxidázy v porovnání s pacienty s CVID s dalšími komplikacemi patřícími k diagnóze CVID. Pacienti s CVID a enteropatií měli vyšší hladiny myeloperoxidázy než pacienti bez této komplikace. Žádné rozdíly v plazmatické koncentraci myeloperoxidázy nebyly patrné mezi skupinami pacientů s přítomností nebo nepřítomností dalších klinických znaků (lymfocytické infiltráty, autoimunitní onemocnění). Žádné rozdíly nebyly patrné v jednotlivých skupinách ohledně sérové koncentrace plazmatické elastázy. Dále bylo sledováno, jaký má na plazmatické koncentrace elastázy a myeloperoxidázy vliv imunoglobulinová substituční léčba. Sérové hladiny elastázy se zvýšily u pacientů s CVID po aplikaci imunoglobulinové substituční léčby. Nebyl však rozdíl v tom, zda byla imunoglobulinová substituční léčba podávána intravenózně nebo subkutánně. In vitro stimulace plné krve 13 pacientů s CVID pomocí IVIG v terapeuticky relevantní dávce po dobu 2 hodin vedla k signifikantnímu zvýšení plazmatické koncentrace elastázy v porovnání s nestimulovanou krví. Tyto výsledky ukazují, že CVID je asociována s chronickou granulocytární aktivací, která je dále potencována pomocí IVIG léčby. Zvýšená koncentrace elastázy a myeloperoxidázy se tedy může podílet na komorbiditách u pacientů s CVID.

ANNEX VII

LITZMAN, Jiri, Zita CHOVANCOVA, Petr BEJDAK, Marek LITZMAN, Zdenek HEL a Marcela VLKOVA. **Common variable immunodeficiency patients display elevated plasma levels of granulocyte activation markers elastase and myeloperoxidase.** International Journal of Immunopathology and Pharmacology [online]. 2019, 33, 2058738419843381. ISSN 0394-6320. Dostupné z: doi:10.1177/2058738419843381

Document Type: Article; IF = 2,209

Původně se předpokládalo, že populace neutrofilních granulocytů je v lidském organismu tvořena homogenní skupinou buněk. Postupem času se však ukázalo, že vykazuje značnou morfoloickou, fenotypovou a funkční heterogenitu [177]. S postupujícím poznáním došlo také ke změně současného pohledu na funkci těchto buněk. Dnes je stále jasnější, že antimikrobiální aktivita neutrofilů spočívající v odstraňování patogenů v rámci vrozené imunitní odpovědi není zdaleka jejich jedinou funkcí. Neutrofilové jsou totiž schopné významně

regulovat také adaptivní imunitní odpověď [167]. Populace lidských neutrofilů je tvořena přinejmenším dvěma základními odlišnými buněčnými fenotypy, a to tzv. neutrofilů s vysokou denzitou (z anglického „high density neutrophils“; HDNs) a neutrofilů s nízkou denzitou (z anglického „low density neutrophils“; LDNs) [177]. HDNs představují klasickou populaci neutrofilů, která převažuje u zdravých osob bez chronických onemocnění. LDNs byly poprvé izolovány popsány v roce 1986 jako buňky, které byly identifikovány v lymfocytárním prstenci mezi mononukleárními buňkami po gradientové centrifugaci periferní krve získané od pacientů se systémovým autoimunitním onemocněním [178]. Následně se ukázalo, že se tyto buňky vyskytují také u pacientů s různými většinou chronickými onemocněními. Skupinu LDNs tvoří řada odlišných neutrofilů (s prozánětlivými nebo protizánětlivými vlastnostmi, nezralými i vyzralými formami), které se vyskytují za různých patologických stavů [179]. Oba tyto typy neutrofilních subpopulací se statisticky významně neliší v délce přežívání nebo ve schopnosti fagocytózy, ale snížená denzita neutrofilů koreluje se jejich zvýšenou odpovědí na fMLP, zamezením šíření bakterií a zvýšenou kapacitou snižovat T-lymfocytární proliferaci [179].

Vzhledem k výše uvedeným faktům jsme se v následující studii zaměřili na to, zda fenotyp neutrofilů pacientů s CVID může ovlivňovat aktivitu jejich T lymfocytů. Fenotypová a funkční charakteristika plazmatických markerů a populací neutrofilů byla provedena u 46 pacientů s CVID a 44 kontrolních osob. Všichni pacienti s CVID byli léčeni buď intravenózní (25 pacientů) nebo subkutánní (21 pacientů) imunoglobulinovou substituční léčbou. Pacienti s CVID měli zvýšený absolutní počet neutrofilů a snížený absolutní počet lymfocytů v porovnání s kontrolními osobami. Pacienti s diagnózou CVID vykazovali statisticky významně zvýšenou plazmatickou hladinu lipokalínu asociovaného s želatinázou neutrofilů (NGAL), který je markerem aktivace a degranulace neutrofilů. K vyloučení vlivu zvýšeného absolutního počtu neutrofilů u pacientů s CVID na zvýšenou plazmatickou koncentraci NGAL v porovnání s kontrolními osobami byla proveden přepočít koncentrace NGAL na absolutní počet neutrofilů, přičemž statistická signifikance zvýšení plazmatické koncentrace NGAL u pacientů s CVID zůstala v porovnání s kontrolními osobami zachována. Podobných výsledků bylo dosaženo po vyloučení pacientů s hodnotami CRP > 10 mg/l, takže za zvýšením plazmatické koncentrace NGAL u pacientů s CVID nestojí pouze systémová imunitní aktivace. U pacientů s CVID jsme dále prokázali zvýšenou expresi povrchového markeru neutrofilů CD11b a PD-L1 a snížení exprese povrchové markeru CD62L, CD16 a CD80 v porovnání s kontrolními osobami, což odpovídá fenotypu aktivovaných neutrofilů se supresivními vlastnostmi. Na druhou stranu exprese znaků CD11a, CD87, HLA-DR, CD10, CXCR4 a CD54

se mezi oběma sledovanými skupinami statisticky významně nelišila. Fenotypová analýza T lymfocytů pacientů s CVID ukázala zvýšenou expresi PD-1 na CD4⁺ i CD8⁺ T lymfocytech v porovnání s kontrolními osobami, nicméně nebyla prokázána statisticky významná korelace mezi expresí znaku PD-L1 na neutrofilech a PD-1 na T lymfocytech u pacientů s CVID. Dříve bylo prokázáno, že CD11b⁺CD16⁺CD62L^{dim} neutrofile vykazují imunosupresivní vlastnosti. Proto jsme následně zkoumali schopnost neutrofilů pacientů s CVID suprimovat T-buněčnou aktivitu *in vitro*. Pokud byly T lymfocyty pacientů s CVID inkubovány společně s autologními neutrofilemi, došlo ke snížení exprese aktivačního znaku CD25 u populace CD4⁺ T lymfocytů. Neutrofile pacientů s CVID tedy aktivně snižují T-buněčnou aktivaci a tvorbu IFN- γ prostřednictvím produkce reaktivních kyslíkových radikálů. Navíc byla u pacientů s CVID prokázána zvýšená frekvence neutrofilů s nízkou denzitou a granulocytárních myeloidních supresorových buněk (LDNs/G-MDSCs). Počet těchto buněk také koreloval se snížením odpovědi T lymfocytů. Vnější stimulace plné krve pomocí LPS napodobovala některé, ale ne všechny fenotypové změny pozorované na neutrofilech pacientů s CVID a vedla k tvorbě populace neutrofilů s LDN fenotypem. Tato data ukazují na to, že neutrofile pacientů s CVID jsou aktivované a silně snižují T-buněčnou aktivitu. Zaměření se na MDSCs by mohlo znamenat novou potenciální léčebnou strategii u pacientů s CVID.

ANNEX VIII

VLKOVA Marcela, Zita CHOVANCOVA, Jana NECHVATALOVA, Ashley Nicole CONNELLY, Marcus Darrell DAVIS, Peter SLANINA, Lucie TRAVNICKOVA, Marek LITZMAN, Tereza GRÝMOVA, Premysl SOUCEK, Tomas FREIBERGER, Jiri LITZMAN a Zdenek HEL. **Neutrophil and Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Mediated T Cell Suppression Significantly Contributes to Immune Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency Disorders.** Journal of Immunology [online]. 2019, 202(1), 93–104. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1800102

Document Type: Article; IF = 4,886

7.3.3 Jaká je úroveň tvorby protilátek u pacientů s CVID?

Porušená schopnost nebo neschopnost tvořit protilátky po antigenní stimulaci je jednou z nevýznamnějších charakteristik pacientů s CVID. Klinickým pozorování těchto pacientů bylo prokázáno, že incidence a rekurence jejich infekčních komplikací nekoreluje s mírou snížení sérové koncentrace celkových IgG imunoglobulinů, ale spíše s mírou zachování schopnosti

určité tvorby specifických protilátek [133, 180]. Ukázalo se, že určitá část pacientů s CVID je schopna jisté protilátkové tvorby, která je však vždy významně snižena oproti běžné imunokompetentní populaci. Nicméně po několika týdnech až měsících po odeznění antigenního stimulu dochází k opětovnému snížení koncentrace protilátek někdy až pod hranici dolního referenčního rozmezí. Druhá část pacientů nevytvoří po antigenní stimulaci protilátky prakticky žádné. I přes celou řadu studií, které se zabývají protilátkovou odpovědí u pacientů s CVID, existuje pouze málo publikovaných prací zabývajících se vztahem mezi mírou protilátkové odpovědi po vakcinaci a zařazením pacienta dle používaných CVID klasifikačních schémat.

V další naší studii jsme se zaměřili na výzkum tvorby protilátek u pacientů s CVID po antigenní stimulaci proteinovým i polysacharidovým antigenem přímo na B lymfocytární úrovni, neboť nepřímé stanovení protilátkové tvorby u pacientů s CVID zaléčených substituční imunoglobulinovou léčbou ze séra metodou ELISA není možné. Koncentrace protilátek v séru pacientů s CVID je totiž zkreslena jejich pasivním podáváním pomocí imunoglobulinové substituční léčby. V naší studii jsme vyšetřovali jednak produkci protilátek na B-lymfocytární úrovni pomocí ELISPOT eseje po vakcinaci proteinovým a polysacharidovým antigenem, dále jsme se soustředili na detekci přítomnosti plazmablastů v periferní krvi po vakcinaci. V úvodních pokusech ohledně dynamiky tvorby protilátek proti tetanickému toxoidu a pneumokokovým polysacharidům u kontrolních osob bylo prokázáno, že přesně 7. den po očkování je optimální pro stanovení produkce tvorby protilátek ve třídě IgG, IgA a IgM metodou ELISPOT na B-lymfocytární úrovni z periferní krve, což korespondovalo také s peakem zvýšení počtu plazmablastů v periferní krvi po očkování měřeným průtokovou cytometrií. Následně byla skupina 37 pacientů s CVID a 80 kontrolních osob vakcinována tetanickým toxoidem (Alteana) a 23-valentní nekonjugovanou polysacharidovou vakcínou (Pneumo-23). Před vakcinací a 7. den po vakcinaci byla změřena produkce protilátek metodou ELISPOT po separaci mononukleárních buněk a byly detekovány změny v B-lymfocytárních subpopulacích včetně změn počtu plazmablastů v periferní krvi. U kontrolních osob jsme 7. den po vakcinaci prokázali tvorbu spotů v ELISPOT eseji (SFC), což odpovídalo produkci IgG, IgA i IgM protilátek proti tetanickému toxoidu i pneumokokovým polysacharidům. Navíc jsme detekovali statisticky významné zvýšení počtu plazmablastů v periferní krvi 7. den po vakcinaci metodou průtokové cytometrie, což odpovídalo cirkulujícím B lymfocytům produkujícím protilátky. Avšak u pacientů s CVID se nález lišil. Celkem 30 pacientů s CVID netvořilo žádné SFC po vakcinaci proteinovým i polysacharidovým antigenem a zbylých 7 pacientů s CVID

mělo jen slabou odpověď v porovnání s kontrolní skupinou. Navíc u pacientů s CVID nebylo detekováno zvýšení počtu plazmablastů v periferní krvi po vakcinaci metodou průtokové cytometrie. Všichni tito, až na jednoho pacienta s měřitelnou odpovědí po antigenní stimulaci, patřili do skupiny II dle Freiburské klasifikace a skupiny smB⁺ dle klasifikace EUROclass. V těchto skupinách jsou zařazeni obecně CVID pacienti s téměř normálním počtem izotypově přesmyknutých paměťových B-lymfocytů, kteří jsou charakterizováni mírnějšími komplikacemi tohoto onemocnění v porovnání s ostatními skupinami. Naše výsledky přispívají k potvrzení teorie, že se u pacientů s CVID vyskytuje porucha v terminální diferenciaci B lymfocytů do stádia plazmablastů produkujících protilátky. Navíc detekce počtu plazmablastů 7. den po očkování může sloužit jako pomocný diagnostický marker odpovědi na vakcinaci v rámci diagnostického procesu před zavedením léčby, ale také ke sledování protilátkové odpovědi u pacientů na imunoglobulinové substituční léčbě.

ANNEX IX

CHOVANCOVA, Zita, Marcela VLKOVA, Jiri LITZMAN, Jindrich LOKAJ a Vojtech THON. **Antibody forming cells and plasmablasts in peripheral blood in CVID patients after vaccination.** Vaccine [online]. 2011, 29(24), 4142–4150. ISSN 0264-410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2011.03.087

Document Type: Article; IF = 3,766

8 Diskuze

Všechny protilátky v lidském organismu se dělí do pěti základních tříd (IgG, IgA, IgM, IgD a IgE). Mezi nejvíce zastoupené třídy imunoglobulinů v séru patří první tři z nich. Bylo popsáno, že sérové koncentrace IgG a IgM imunoglobulinů jsou vyšší u žen v porovnání s muži, zatímco u těch bývá naopak vyšší sérová koncentrace IgA imunoglobulinů [181]. Zatímco sérová koncentrace IgG a IgA protilátek se s věkem zvyšuje, sérové koncentrace IgM zůstávají s věkem stabilní [181]. Zbylé dvě třídy imunoglobulinů (IgD a IgE) se vyskytují v séru v nízké koncentraci a zejména IgE imunoglobuliny se vyskytují převážně v membránově vázané podobě. Různá sérová koncentrace imunoglobulinů tedy odráží jejich odlišný výskyt v organismu, co se týče jejich přítomnosti v převážně volné nebo membránově vázané podobě, predilekčním výskytu v jednotlivých tkáňových či cirkulačních kompartmentech organismu nebo dynamice jejich tvorby v souvislosti s časovým hlediskem setkání se organismu s antigenem. To vše souvisí s rozdílnou funkcí jednotlivých izotypů imunoglobulinů v obraných reakcích organismu.

Zvýšení nebo snížení koncentrace jednotlivých tříd a podtříd imunoglobulinů se může vyskytovat u různých jiných většinou chronických patologických stavů. Příkladem mohou být dnes ještě ne zcela objasněné změny v distribuci IgG podtříd doprovázejících některé patologické stavy. V poslední době se však zvyšuje počet studií, které se zabývají sledováním rozdílů v zastoupení IgG podtříd u nejrůznějších diagnóz včetně specifických autoprottilátek v jednotlivých IgG podtřídách. Například Engelhartová et al. zkoumali rozložení koncentrace podtříd IgG v populaci a jejich vztah k diagnostikovaným onemocněním jednotlivých pacientů. Z 12 323 vyšetřených pacientů zjistili izolovanou elevaci jedné z podtříd IgG u 552 z nich [182]. Izolovaná elevace IgG1 byla statisticky signifikantně asociována s hepatitidou C a monoklonální gamapatií (včetně monoklonální gamapatie nejasného významu a mnohočetného myelomu), statistické významnosti se blížila také asociace elevace IgG1 se SLE. Izolovaná elevace IgG2 byla statisticky signifikantně asociována s hypothyroidismem a syndromem dráždivého tračníku. Revmatoidní artritida byla asociována s izolovanou elevací IgG1 nebo IgG3. Izolovaná elevace IgG4 byla statisticky signifikantně asociována s celiakií, aspirinem exacerbovaným respiračním onemocněním (AERD), nazálními polypy a eozinofilii. A potvrdila se také již dříve publikovaná data, že izolovaná elevace IgG4 podtřídy imunoglobulinů je asociována s autoimunitní pankreatitidou, která se dnes řadí do skupiny onemocnění označovaných jako IgG4-asociovaná onemocnění [182]. Ve skupině pacientů

s izolovanou elevací IgG2 podtřídy imunoglobulinů se prokázal také vyšší počet pacientů s autoimunitní pankreatitidou, což odpovídá zvažované roli elevace podtřídy IgG2 jako dalšího ze serologických markerů IgG4-asociovaných onemocnění [183]. Tento typ vzácného onemocnění může postihnout jakýkoli orgán lidského těla, přičemž v zobrazovacích metodách často imituje pokročilé nádorové onemocnění. Na tuto skutečnost by měli v rámci diferenciální diagnostiky myslet také radiologové a onkologové, na což jsme chtěli upozornit také v naší práci [184]. Další studie se zabývají distribucí IgG podtříd u pacientů se systémovými autoimunitními onemocněními. Dle studie Zhanga et al. se u pacientů s autoimunitními onemocněními vyskytovala zvýšená sérová koncentrace IgG1 a/nebo IgG3 podtřídy imunoglobulinů [185]. Na druhou stranu IgG2 sérová koncentrace byla signifikantně nižší u pacientů s primárním Sjögrenovým syndromem (pSS), SLE a systémovou sklerodermií (SSc). Pouze 6,34 % pacientů s autoimunitním onemocněním mělo sérovou koncentraci IgG4 > 1,35 g/l, což nebylo statisticky signifikantní v porovnání se zdravými osobami [185]. Jiné výsledky přinesly další studie. Dle studie Lina et al. bylo prokázáno, že pacienti se SLE mají signifikantně zvýšené koncentrace IgG1, IgG2 a IgG3 podtřídy imunoglobulinů v porovnání s kontrolními osobami, zatímco hladina IgG4 podtřídy imunoglobulinů byla mezi těmito dvěma skupinami srovnatelná [186]. Podobný profil koncentrace podtříd IgG byl pozorován také u pacientů se pSS, až na statisticky významné snížení IgG4 podtřídy imunoglobulinů v porovnání s kontrolními osobami [187]. Zeng et al. sledovali zastoupení podtříd IgG tvořících antinukleární protilátky (ANA) u pacientů se SLE a popsali, že tito pacienti měli statisticky signifikantně zvýšenou sérovou koncentraci celkových IgG imunoglobulinů, ale také všech IgG podtříd. Navíc bylo zjištěno, že kožní a renální postižení bylo u pacientů se SLE asociováno zejména s ANA autoprotiátkami ve třídě IgG1 a IgG4, zatímco kloubní postižení bylo asociováno zejména s ANA autoprotiátkami ve třídě IgG3 [188].

Také změny sérové koncentrace IgA imunoglobulinů mohou provázet celou řadu onemocnění. Polyklonální zvýšení koncentrace IgA imunoglobulinů bylo popsáno u těžkých alkoholiků [189] a dále pacientů s diabetem mellitem a metabolickým syndromem [190]. Na sérovou koncentraci celkových IgA imunoglobulinů měly nejvyšší vliv abdominální obezita, hypertriglyceridémie a hyperglykémie [181]. Zvýšená sérová koncentrace IgA se vyskytuje také u Henoch-Schönleinovy purpury nebo IgA nefropatie. Přítomnost zvýšené koncentrace sérových IgA imunoglobulinů může být varovným signálem přítomnosti některých vrozených poruch funkce imunitního systému, chronických autoimunitních onemocnění nebo zánětlivých střevních onemocnění [191]. Bylo popsáno, že zvýšená koncentrace IgA

imunoglobulinů doprovázela u celé řady pacientů abnormality zubů u ektodermální dysplázie, postižení plic u dyskeratosis congenita, diabetes u IPEX syndromu, autoimunitní projevy u autoimunitního lymfoproliferativního syndromu (ALPS) a gastrointestinální příznaky u deficiencie mevalonát kinázy (hyper-IgD syndromu) [191]. Detekce elevace celkových IgA imunoglobulinů mohlo v tomto případě přispět k diagnóze těchto onemocnění. Podobně tomu mohlo být u našeho pacienta s Wiskottovým-Aldrichovým syndromem. Tato diagnóza je také spojena s elevací sérové koncentrace IgA imunoglobulinů. Ačkoli bývá tato diagnóza většinou odhalena v raném dětství, v případě mírnějšího fenotypu tohoto onemocnění může zůstat neodhalena až do rané dospělosti. Jednalo se o první publikovaný případ pacienta s touto diagnózou transplantovaného pro IgA nefropatii, u něhož nedošlo k rychlému odhojení štěpu a jeho funkci se podařilo udržet několik let [192]. Případ našeho pacienta dává naději dalším pacientům s mírnějším klinickým fenotypem tohoto onemocnění, že je u nich provedení transplantace ledvin možné a že se i přes svůj imunodeficit dokážou vyrovnat s určitou redukovanou mírou imunosupresivní léčby.

Jistou záhadou i přes veškerou současnou úroveň poznání zůstává funkce IgD imunoglobulinů. Jejich tvorba je fylogeneticky zachována, což svědčí i přes jejich velmi nízkou sérovou koncentraci o jejich nezanedbatelné funkci. U lidí bylo IgD v sekreční podobě detekováno v cirkulaci, v nazofaryngeálním hlenu, slinách nebo slzách a dále ve vázané formě na povrchu bazofilů, mastocytů a monocytů [76]. Tyto solubilní IgD protilátky se váží na komenzální mikroorganismy respiračního a gastrointestinálního traktu, ale také na potravinové antigeny a patogeny. Díky schopnosti vazby na slizniční mastocyty, bazofily a pravděpodobně také fagocytující buňky se sekreční IgD protilátky mohou podílet na odstraňování běžných antigenů prostředí včetně alergenů [81]. Je zajímavé, že také IgE může vykazovat podobné funkce, což by mohlo znamenat, že IgD protilátky kooperují ve svých efektorových funkcích s protilátkami ve třídě IgE [79]. Tato spolupráce by mohla znamenat soutěž o vazbu antigenu na IgD nebo IgE protilátky navázané na povrchu bazofilů nebo mastocytů, přičemž vazba na IgD povede spíše k regulaci degranulace těchto buněk, zatímco vazba přes IgE k jejich aktivaci [79]. Nicméně k přesnému objasnění těchto mechanismů je potřeba dalších studií. O protektivní roli IgD imunoglobulinů svědčí také některá další data. Například množství plazmatických buněk vylučujících IgD se kompenzatorně zvyšuje u pacientů se selektivním deficitem IgA [193]. Koncentrace IgD se zvyšuje také v séru pacientů s respiračními infekcemi a chronickým plicním zánětem [194]. Koncentrace solubilního IgD imunoglobulinu a počet $\text{IgD}^+\text{CD19}^+\text{CD38}^{\text{bright}}$ plazmablastů byl zvýšen v nazální tkáni pacientů

s chronickou sinusitidou bez nosních polypů [195]. K rozšíření poznání funkce IgD imunoglobulinů přispěla i naše práce týkající se náhodně zachyceného pacienta, jehož polovina naivních vyzrálých B lymfocytů vykazovala poruchu exprese IgD na svém povrchu. K tomuto fenotypu vedla námi nově popsaná heterozygotní nonsense mutace v genu kódujícího IGHD [196]. Co se týče významu funkce membránově vázaného IgD imunoglobulinu bylo však překvapující, že se funkčně tyto dvě populace B lymfocytů nelišily v replikační historii, schopnosti diferenciaci do plazmatických buněk a přítomnosti SHM. B lymfocyty bez povrchové exprese IgD molekuly se normálně vyvíjely až do stádia paměťových B lymfocytů. Vzhledem k tomu se zdá být pravděpodobné, že by se IgD mohlo uplatňovat spíše v modulaci odpovědi B lymfocytů na antigen. Nicméně k objasnění tohoto předpokladu je třeba dalších výzkumů.

Změny koncentrace celkových imunoglobulinů ve třídě IgE se vyskytují také u celé řady patologických stavů. Zvýšení sérové koncentrace celkových IgE imunoglobulinů se nevyskytuje pouze u parazitárních onemocnění nebo atopických stavů, ale provází také některá další infekční onemocnění (například infekci způsobenou virem HIV, cytomegalovirem nebo virem Epstein-Barrové, dále *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium leprae* nebo kandidiázy), vybraná zánětlivá onemocnění (eozinofilní granulomatózu s polyangiitidou, Kawasakiho nebo Kimurovu chorobu), nádorová onemocnění (Hodgkinův lymfom, Sézaryho chorobu nebo IgE myelom) nebo další onemocnění (cystickou fibrózu, nefrotický syndrom, bulózní pemfigoid a další). Kromě toho se elevace celkových IgE imunoglobulinů může vyskytovat jako výraz dysregulace funkce imunitního systému u celé řady vrozených poruch funkce imunitního systému. Proto jsme se v naší práci jsme se zaměřili na přehled vrozených poruch imunitního systému, u kterých se vyskytují známky atopického stavu (elevace celkových IgE imunoglobulinů, neonatální erythrodermie nebo těžká atopická dermatitida), jehož cílem bylo usnadnění diferenciální diagnostiky těchto vzácných onemocnění, které mohou být považovány za pouhý těžký atopický stav [197]. Zatímco dříve byl zájem odborné veřejnosti fokusován zejména na patologii spojenou se zvýšenou koncentrací IgE imunoglobulinů, nedávné prospektivní a retrospektivní studie ukázaly, že také nízké sérové koncentrace IgE imunoglobulinů přinášejí zdravotní komplikace. Dle recentní retrospektivní studie zaměřené na klinické parametry pacientů charakterizovaných velmi nízkou koncentrací IgE imunoglobulinů (<2,5 kU/l) a zároveň normální sérovou koncentrací ostatních imunoglobulinových tříd bylo zjištěno, že tito pacienti měli vyšší frekvenci celé řady infekčních i neinfekčních komplikací [198]. Asi třetina těchto pacientů trpěla na opakované infekce

horních dýchacích cest, bronchiektázie, nějaký typ autoimunitního nebo maligního onemocnění s nejvyšším zastoupením non-Hodgkinských lymfomů [198]. Zajímavé je zjištění, že velmi nízké sérové hladiny IgE jsou asociovány se zvýšeným rizikem rozvoje nádorového bujení [199]. Pro zvýšenou náchylnost k maligním onemocněním není pravděpodobně důležitá pouze snížená sérová koncentrace IgE imunoglobulinů, ale také nedostatečné množství tkáňově vázaných IgE protilátek. Bylo prokázáno, že pacienti s nízkou sérovou hladinou IgE imunoglobulinů a nízkým množstvím buněčně vázaného IgE měli vyšší riziko rozvoje nádorového bujení v porovnání s pacienty s nízkou sérovou hladinou IgE imunoglobulinů, ale normálním množstvím buněčně vázaného IgE [199]. Detekce velmi nízkých koncentrací IgE protilátek by se v budoucnosti mohla stát jedním z nových biomarkerů zvýšené náchylnosti k rozvoji maligního bujení [200]. Nicméně je potřeba dalších prospektivních studií ke zjištění pro lepší charakterizaci pacientů se selektivním deficitem IgE a rozhodnutí o tom, zda má být tento stav zařazen mezi ostatní vrozené poruchy tvorby protilátek. Zajímavostí také je, že i autoprotiátky se vyskytují ve třídě IgE. Přítomnost těchto autoprotiátek byla popsána u celé řady chronických a autoimunitních onemocnění, jako je SLE, chronická spontánní urtikárie, bulózní pemfigoid, smíšená choroba pojiva, roztroušená skleróza, Graves-Basedowova choroba, Hashimotova thyreoiditida, pSS, SSc, revmatoidní artritida a autoimunitní uveitida [201]. V patogeneze těchto onemocnění se tedy také zřejmě uplatňují buňky nesoucí na svém povrchu FcεRI receptory, kam patří zejména bazofily a mastocyty, ale také eozinofily, plazmacytoidní dendritické buňky a Langerhansovy buňky. Této premise odpovídá také fakt, že léčba namířená proti IgE imunoglobulinům se zdá být účinná také u těchto onemocnění [201]. Během posledních desetiletí byla popsána také přítomnost autoprotiátek namířených proti IgE ve třídě IgG i IgE a jejich receptoru ve třídě IgG [201].

Zvýšení nebo snížené koncentrace jednotlivých imunoglobulinových tříd je také podkladem rozvoje různých klinických fenotypů, které definují jednotlivá onemocnění. Zajímavým faktem zůstává, že dysregulace koncentrace jednotlivých tříd a podtříd imunoglobulinů je spjata s poměrně velmi širokým rozpětím klinické závažnosti stavů, které jsou touto dysregulací definovány. Příkladem stojícím na obou stranách tohoto rozpětí mohou být dvě diagnózy ze skupiny vrozených poruch tvorby protilátek, a to sIgMD a CVID.

Absence přítomnosti IgM protilátek v séru u osob následně zařazených do skupiny pacientů se sIgMD bývá většinou náhodným nálezem. Toto onemocnění ze skupiny převážně protilátkových deficiencí s nejasnou patogenezi a klinickým významem bylo poprvé popsáno Hobbsem et al. v roce 1966 u dvou chlapců, kteří prodělali fulminantní meningokokovou

septikémii a v rámci toho byla u nich zjištěna také velmi nízká koncentrace celkových IgM imunoglobulinů [202]. Zdá se, že pravý selektivní deficit IgM je velmi vzácný [203]. O jeho otazné klinické relevanci vypovídá také fakt, že toto onemocnění nebylo zařazeno ani do posledního aktualizovaného přehledu známých vrozených poruch imunity (IUIS klasifikace) [3]. K obohacení poznatků u této diagnóze přispěla i naše práce týkající se klinických a laboratorních parametrů u 17 pacientů se sIgMD, protože práce týkající se popisu klinických a laboratorních parametrů větší kohorty pacientů se sIgMD v literatuře stále chybí [205]. V naší kohortě pacientů se sIgMD jsme prokázali, že tito pacienti mají povrchovou expresi IgM na B lymfocytech srovnatelnou s kontrolními osobami. Také jsme nezaznamenali rozdíl v povrchové expresi IgM u jednotlivých B-lymfocytárních subpopulacích. Testování produkce IgM protilátek B lymfocyty u pacientů se sIgMD po stimulaci B-lymfocytárnými mitogeny prokázalo snížení tvorby u 40 % a srovnatelnou tvorbu IgM protilátek s kontrolními osobami u 60 % z nich. Bylo také prokázáno, že nízká sérová koncentrace IgM byla u našich pacientů asociována s různými patologickými stavy, jako jsou autoimunitní a alergická onemocnění [206]. Není ovšem jasné, jak je tato asociace významná a zda jsou imunopatologické stavy v primárním nebo sekundárním vztahu ke snížené sérové koncentraci IgM imunoglobulinů.

Na druhou stranu snížená tvorba imunoglobulinů ve třídě IgG, která se vyskytuje u pacientů s CVID, je obvykle spjata s výraznou imunodeficitní klinickou manifestací asociovanou často s dalšími imunodysregulačními příznaky. Diagnóza CVID dnes sdružuje pacienty s heterogenním klinickým a podobným laboratorním fenotypem, ze které se postupně oddělují samostatné nosologické jednotky, u kterých je odhalena genetická příčina tohoto stavu. I když výzkum na tomto poli v posledních desetiletích pokročil, stále u nejméně poloviny pacientů s CVID není známá příčina rozvoje jejich klinického a laboratorního fenotypu. Nicméně jednou ze základních skutečností, která bez pochyby ovlivňuje tíži jejich klinické manifestace, je míra jejich porušené protilátkové odpovědi po antigenní stimulaci. Úroveň protilátkové odpovědi se totiž mezi jednotlivými pacienty liší. Zatímco absence protilátkové odpovědi na polysacharidové antigeny by se měla vyskytovat prakticky u všech pacientů s CVID, může u nich být patrné zachování proteinové protilátkové odpovědi [22]. Například Al-Herz a kolektiv dle své studie na 4 prospektivně sledovaných pacientech s CVID ukázali, že schopnost tvorby protilátek proti polysacharidovým antigenům u pacientů s CVID vymizela dříve než schopnost tvorby protilátek proti proteinovým antigenům [22]. Goldackerová et al. sledovali protilátkovou odpověď u 21 CVID pacientů na substituční imunoglobulinové léčbě po vakcinaci proteinovým a polysacharidovým antigenem ze séra metodou ELISA. Prokázali

pozitivní vakcinační odpověď u téměř čtvrtiny pacientů s CVID po očkování T-dependentním antigenem, ale také téměř pětiny pacientů s CVID po očkování T-independentním antigenem [207]. Také výsledky dalších studií ukazují na značnou heterogenitu protilátkové odpovědi u pacientů s CVID, která je u jedné části z nich slabá a u druhé části z nich zcela chybí. Navíc pro obě skupiny je typické, že pacienti s CVID nejsou schopni udržet paměťovou imunitní odpověď po delší časové období v porovnání s imunokompetentními kontrolními osobami. Například Zhan et al. prokázali, že se u zdravých kontrolních osob po očkování sezónní neadjuvantní trivalentní vakcínou proti chřipce vyskytuje populace specifických IgM paměťových B lymfocytů, zatímco u pacientů s CVID dochází jen k mírnému nesignifikantnímu zvýšení počtu těchto buněk. U poloviny z 11 vyšetřovaných CVID pacientů a všech 9 kontrolních osob došlo po očkování proti chřipce ke zvýšení počtu specifických IgG tvořících paměťových B lymfocytů, zatímco druhá polovina CVID pacientů je přítomné neměla. Nikdo z CVID pacientů nevytvořil IgA paměťové B lymfocyty, zatímco více než polovina kontrolních osob ano. Za 4 měsíce po očkování specifická B-buněčná paměťová odpověď u kontrolních osob poklesla, přičemž u CVID pacientů zcela vymizela [208]. Cavaliere et al. zjišťovali specifickou IgA a IgM protilátkovou odpověď u 125 pacientů s CVID po vakcinaci 23-valentní polysacharidovou vakcínou proti *Streptococcus pneumoniae* (IgA a IgM anti-PCP) [209]. Tvorba protilátek IgA anti-PCP a/nebo IgM anti-PCP se vyskytovala u minoritního počtu pacientů s CVID, kteří měli menší incidenci respiračních komplikací. Pacienti s CVID, kteří neodpověděli na vakcinaci tvorbou anti-PCP protilátek, měli zvýšenou incidenci pneumonií a bronchiektázií [209]. K podobným závěrům došla i italská skupina, která vyšetřovala tvorbu IgA protilátek proti všem 23 pneumokokovým polysacharidům ve třídě IgA, a to u 74 pacientů s CVID naočkovaných 23-valentní polysacharidovou vakcínou proti *Streptococcus pneumoniae*. Pacienti, kteří netvořili IgA anti-PCP protilátky nebo nedokázali udržet tvorbu protilátek po očkování v čase, měli zvýšené riziko komorbidit a špatnou prognózu vývoje jejich zdravotního stavu. Detekce IgA anti-PCP protilátek po očkování polysacharidovou pneumokokovou vakcínou by se mohlo stát prognostickým markerem vývoje klinického stavu pacientů s CVID [210]. Sánchez-Ramón et al. provedli multicentrickou studii, v rámci které naočkovali kromě jiného 22 dospělých pacientů s CVID polysacharidovou vakcínou proti *Streptococcus pneumoniae* a *Salmonella typhi*. V této studii bylo prokázáno, že zjišťování protilátkové odpovědi proti polysacharidovým antigenům detekcí tvorby protilátek po antigenní stimulaci vakcínou Typhim Vi je klinicky relevantní a umožňuje diagnostikovat porušenou protilátkovou odpověď po antigenní stimulaci u pacientů s CVID [211]. Podobné výsledky přinesla i studie týkající se očkování vakcínou

proti *Streptococcus pneumoniae* a *Salmonella typhi* u 28 pacientů dětské populace s opakovanými respiračními infekcemi, kteří měli snížené koncentrace protilátek proti oběma patogenům před vakcinací [212]. Počet dětí s anamnézou pneumonie a potřebou intravenózní antibiotické léčby byl statisticky signifikantně vyšší ve skupině dětí, které neodpověděly tvorbou protilátek po očkování vakcínou Typhim Vi [212]. Pacienti s CVID mohou odpovídat také na podání mRNA vakcíny proti viru Sars-Cov-2, i když vždy méně než imunokompetentní populace. Například Jalil et al. publikovali kazuistiku pacientky s CVID bez zavedené imunoglobulinové substituční léčby, která v minulosti odpověděla tvorbou protilátek na proteinovou, ale nikoli polysacharidovou vakcinaci, přičemž vytvořila protilátky po vakcinaci BNT162b2 mRNA vakcínou [213]. Salinasová et al. publikovali data ohledně očkování 41 pacientů s CVID pomocí BNT162b2 mRNA vakcíny namířené proti spike proteinu viru Sars-Cov-2 [214]. Celkem 20 % pacientů s CVID si bylo schopno vytvořit protilátky proti spike proteinu viru Sars-Cov-2 ve třídě IgG a IgA [214]. V prospektivní multicentrické studii týkající se 505 pacientů s vrozenou poruchou imunitního systému, které se účastnilo také 212 pacientů s CVID, byla zjišťována B lymfocytární a T lymfocytární odpověď pacientů na vakcinaci 2 dávkami mRNA vakcíny 1273 proti viru Sars-Cov-2 [215]. Zatímco průměrný titr specifických IgG anti-Sars-Cov-2 protilátek činil pro kontrolní skupinu 3503 BAU/mL (95 % CI, 3098–3961), u pacientů s CVID byl titr protilátek statisticky významně snížen (345.4 BAU/mL; 95 % CI, 240.4–496.1; $P < 0.0001$) [215]. Skupina pacientů s CVID vykazovala také nižší specifickou T-lymfocytární odpověď a nižší produkci IFN- γ v porovnání s kontrolními osobami [215]. Kromě klasické odpovědi na vakcinaci existují také další důkazy o určité míře protilátkové tvorby u některých pacientů s fenotypem CVID. Například opakovaně bylo prokázáno, že pacienti s CVID mající v rámci své diagnózy neměřitelné koncentrace celkových IgA imunoglobulinů odpovídající v podstatě definici sIgAD (IgA $< 0,07$ g/l), jsou schopni produkovat IgG anti-IgA protilátky [216-219]. S výše uvedenými fakty korelují také výsledky naší studie týkající se protilátkové odpovědi po antigenní stimulaci proteinovým i polysacharidovým antigenem sledované přímo na B-lymfocytární úrovni. Z vyšetřených 37 pacientů s CVID celkem 7 pacientů vykazovalo slabou protilátkovou odpověď v porovnání s kontrolními osobami. Navíc jsme prokázali, že stanovení počtu plazmablastů 7. den po očkování v periferní krvi může sloužit jako nový diagnostický marker onemocnění CVID [220]. Nepřítomnost plazmablastů v periferní krvi po antigenní stimulaci by mohla znamenat poruchu v terminální diferenciaci B lymfocytů do stádia buněk produkujících protilátky. Většina studií totiž ukázala, že téměř 90 % pacientů s CVID má normální počty celkových B lymfocytů v periferní krvi [221, 222].

Kromě širokého spektra popsaných defektů týkající se adaptivního imunitního systému se v patogeneze CVID může uplatňovat také porušená funkce některých vrozených složek imunitního systému. Příkladem může být dysregulace funkce komplementového systému, která se může podílet na zvýšené náchylnosti k infekcím, ale také zvýšené frekvenci autoimunitních onemocnění těchto pacientů. Vzhledem k častému postižení plicní tkáně u pacientů s CVID byl zvažován také vliv tvorby MBL na patogenezi tohoto onemocnění. Ve studii na 31 pacientech s CVID byla prokázána asociace mezi strukturálními mutacemi *MBL2* genu a zvýšenou frekvencí těžkých respiračních infekcí u pacientů CVID [223]. Studie Fevanga et al. ukázala v rámci vyšetření 71 pacientů s CVID, že u pacientů se sérovou koncentrací MBL $<0,5 \mu\text{g/ml}$ byla zvýšená frekvence infekcí dolních dýchacích cest a bronchiektázií, zatímco u pacientů s MBL hladinami $>4,0 \mu\text{g/ml}$ byla frekvence těchto respiračních onemocnění snižená v porovnání s běžnou populací [224]. Ve studii týkající se 163 pacientů s CVID bylo popsáno, že MBL deficiencie by se mohla podílet na dřívějším nástupu klinických příznaků a rozvoji autoimunitních onemocnění u pacientů s CVID [225]. Kromě toho bylo recentně v kohortě 29 pacientů s CVID popsáno, že se u nich v porovnání s kontrolními osobami vyskytuje snížená plazmatická koncentrace MBL-asociované serinové proteinázy MASP-2, která štěpí komplementové složky C4 a C2, a MBL-asociovaného proteinu Map44 [226]. Navíc kombinace nízkých sérových koncentrací IgA a současně MBL byla asociována s přítomností bronchiektázií, snížení plicních funkcí a zhoršení abnormalit na HRCT snímcích plic těchto pacientů [227]. Také v naší studii jsme prokázali, že deficiencie MBL je asociována s rozvojem bronchiektázií u pacientů s CVID. Navíc se zdá být pravděpodobné, že porušená tvorba MBL by mohla vést u pacientů s CVID k rozvoji plicní fibrózy a respirační insuficience. Nicméně dle výsledků naší studie se zdá být pravděpodobné, že porucha tvorby MBL by neměla mít vliv na rozvoj dalších komplikací asociovaných s CVID [228].

Ukázalo se, že v patogeneze CVID by mohly hrát důležitou roli také neutrofilní granulocyty. Pacienti s CVID trpí často na bronchiektázie, u kterých se předpokládá patogenetický vliv neutrofilů [229]. Tyto buňky obsahují prozánětlivou proteázu elastázu, přičemž bylo prokázáno, že množství elastázy koreluje s tíží plicního postižení a podílí se na progresi bronchiektázií [230]. Také cytokinový profil pacientů s CVID charakterizovaný zvýšenou sérovou koncentrací cytokinů asociovaných s monocytomakrofágovou a granulocytární buněčnou linií podporuje přítomnost chronické granulocytární aktivity u těchto pacientů [231]. Také vzhledem k výše uvedeným skutečnostem se při výzkumu patogeneze rozvoje fenotypu CVID dostávají do popředí neutrofilové a ovlivnění jejich funkce

pomocí imunoglobulinové substituční léčby. Již dříve bylo prokázáno, že substituční imunoglobulinová léčba může regulovat aktivitu neutrofilů [232-234]. Studie Prezza et al. na 22 pacientech s CVID prokázala, že tito pacienti na dlouhodobé imunoglobulinové substituční léčbě mají snížení uvolňování elastázy z neutrofilů, ale normální expresi molekul CXCR1, CD66b a CD11c na neutrofilech, neporušenou schopnost fagocytózy a normální sekreci IL-8 [232]. Navíc po aplikaci IVIG došlo k rychlému snížení sérových koncentrací IL-8, snížení exprese jeho receptoru CXCR1 a snížení uvolňování neutrofilní elastázy [232]. Aplikace IVIG však neměla vliv na fagocytózu neutrofilů a expresi receptorů CD66b a CD11c [232]. Dále bylo prokázáno, že podávání imunoglobulinové substituční terapie způsobuje degranulaci neutrofilů [233]. K té dochází v důsledku přímé interakce mezi protilátkami a neutrofilami přes Fc γ RII receptory. Ukázalo se, že za ni byly zodpovědné zejména polymerní a dimerní IgG protilátky přítomné v těchto preparátech, které postupně vznikají při delší časovém odstupu mezi odběrem biologického materiálu a jeho finálním medicínském použitím [233]. Později bylo zkoumáno, zda k podobným změnám dochází také při aplikaci imunoglobulinové substituční léčby *in vivo* [234]. Přitom se ukázalo, že neutrofilie jsou pravděpodobně aktivovány nepřímo prostřednictvím makrofágů, a že míra jejich aktivace závisí na množství přítomných IgG dimerů [234]. Degranulace neutrofilů by se mohla podílet na rozvoji nežádoucích účinků po podání imunoglobulinové substituční léčby. Také výsledky našeho výzkumu ukázaly, že pacienti s CVID vykazují chronickou granulocytární aktivaci, o které vypovídá zvýšená koncentrace elastázy a myeloperoxidázy v séru těchto pacientů. Chronická granulocytární aktivace je dále prohloubena podáváním imunoglobulinové substituční léčby [235]. Zvýšená koncentrace elastázy a myeloperoxidázy se tedy může podílet na komorbiditách u pacientů s CVID.

Bylo prokázáno, že CVID pacienti mají mimo jiné zvýšenou sérovou koncentraci cytokinů souvisejících s chronickou aktivací monocytárních a granulocytárních buněčných linií (G-CSF, CXCL-10/IP-10, IL-1R antagonistů, TNF- α , IL-10, IL-12, CCL-2/MCP-1 a eotaxinu) [231]. V naší studii jsme prokázali, že neutrofilie pacientů s CVID vykazují odchylný profil povrchových molekul v porovnání s kontrolní populací [236]. Neutrofilie pacientů s CVID mají sníženou povrchovou expresi znaků CD16, CD62L a CD80 a zvýšenou povrchovou expresi znaků CD11b a PD-L1. Již dříve bylo prokázáno, že CD16^{low} a CD62L^{low} neutrofilie snižují T-buněčnou aktivaci [237, 238]. V naší studii jsme prokázali, že neutrofilie pacientů s CVID aktivně snižují aktivaci a produkci IFN- γ CD8⁺ T lymfocyty díky tvorbě reaktivních metabolitů kyslíku a částečně přes PD-L1/PD-1 regulační cestu. Na snížené odpovědi T lymfocytů

u pacientů s CVID se může dále podílet zvýšené zastoupení LDNs/G-MDSCs buněk. Počet těchto buněk také koreloval se snížením aktivity T lymfocytů. Výsledky našeho výzkumu přinesly zcela nový pohled na mechanismy snížení funkce imunitního systému u CVID pacientů a potenciálně dalších imunodeficiencí nebo zánětlivých onemocnění. Prokázali jsme, že neutrofilie pacientů s CVID vykazují aktivovaný fenotyp a silně suprimují T-buněčnou aktivitu. Není zatím jasné, zda se rozdíly ve fenotypu pacientů s CVID přímo podílejí na porušené protilátkové odpovědi u těchto pacientů. Nicméně ovlivnění funkce MDSC buněk by mohlo znamenat novou potenciální léčebnou strategii u pacientů s CVID.

9 Závěr

Přítomnost polyklonálních protilátek namířených proti různým antigenům vnějšího i vnitřního prostředí představuje zásadní nástroj obranyschopnosti i udržování homeostázy fungování lidského organismu. Proces jejich tvorby představuje složitý řetězec událostí počínající prvotním setkáním se složek imunitního systému s antigenem a končící tvorbou protilátek různých izotypových tříd nesoucích specifické efektorové charakteristiky. Tento proces je ovlivňován celou řadou humorálních a buněčných faktorů vrozené i adaptivní imunity. I když jsme v kontextu dnešního poznání významně pokročili ohledně znalostí mechanismů procesu tvorby protilátek, stále však nejsou všechny jeho aspekty objasněny. Jednou z možností, jak se zpětně vrátit k fyziologii tvorby protilátek je výzkum zaměřený na poruchy tvorby protilátek, jejichž pochopení nám umožní přiblížit se poznání celého procesu, který k jejich tvorbě vede. U celé řady onemocnění charakterizovaných poruchou tvorby protilátek se uplatňuje také různá míra dysregulace imunitního systému. Jedním z prototypových onemocnění tohoto druhu je diagnóza CVID. Vzhledem k původnímu pohledu na diagnózu CVID jako protilátkového imunodeficitu, byl výzkum byl zaměřen zejména na počty a funkční charakteristiku jejich B a T lymfocytů. Nicméně poslední dobou se dostává do popředí také výzkum mechanismů vrozeného imunitního systému, jejichž postižení může nemalou měrou přispět k rozvoji patogeneze CVID. Výzkum na poli patogeneze tohoto onemocnění může přinést důležité informace k všeobecnému poznání základních mechanismů protilátkové imunitní odpovědi. Díky tomu také dochází k postupné úpravě paradigmat fungování imunitního systému. Určitou limitací těchto výzkumů na lidské populaci však zůstává fakt, že z etického důvodu většinou možné vyšetřovat imunologické humorální

a buněčné parametry pouze z periferní krve nebo buněčných kultur *in vitro*, což nám nikdy zcela neodpoví na to, co se děje přímo uvnitř našeho organismu. Optikou toho pak musíme opatrně zacházet s informacemi, které se nám podaří získat.

Reference:

1. Chovancová Z: **Imunosenescence - západ slunce nad imunitním systémem.** *Vnitřní Lékarství* 2020, **66**(6):353–358.
2. Chan AY, Torgerson TR: **Primary immune regulatory disorders: a growing universe of immune dysregulation.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2020, **20**(6):582–590.
3. Bousfiha A, Moundir A, Tangye SG, Picard C, Jeddane L, Al-Herz W, Rundles CC, Franco JL, Holland SM, Klein C *et al*: **The 2022 Update of IUIS Phenotypical Classification for Human Inborn Errors of Immunity.** *J Clin Immunol* 2022, **42**(7):1508–1520.
4. Cooper MD, Peterson RD, Good RA: **Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken.** *Nature* 1965, **205**:143–146.
5. Quách TD, Rodríguez-Zhurbenko N, Hopkins TJ, Guo X, Hernández AM, Li W, Rothstein TL: **Distinctions among Circulating Antibody-Secreting Cell Populations, Including B-1 Cells, in Human Adult Peripheral Blood.** *J Immunol* 2016, **196**(3):1060–1069.
6. Hayakawa K, Hardy RR, Herzenberg LA: **Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells.** *J Exp Med* 1985, **161**(6):1554–1568.
7. Grönwall C, Silverman GJ: **Natural IgM: beneficial autoantibodies for the control of inflammatory and autoimmune disease.** *J Clin Immunol* 2014, **34** Suppl 1:S12–21.
8. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM: **The generation of antibody-secreting plasma cells.** *Nat Rev Immunol* 2015, **15**(3):160–171.
9. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R: **Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project.** *Nat Rev Immunol* 2012, **12**(3):191–200.
10. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR *et al*: **The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency.** *Blood* 2008, **111**(1):77–85.
11. Glass DR, Tsai AG, Oliveria JP, Hartmann FJ, Kimmey SC, Calderon AA, Borges L, Glass MC, Wagar LE, Davis MM *et al*: **An Integrated Multi-omic Single-Cell Atlas of Human B Cell Identity.** *Immunity* 2020, **53**(1):217–232.
12. Jansen K, Cevhertas L, Ma S, Satitsuksanoa P, Akdis M, van de Veen W: **Regulatory B cells, A to Z.** *Allergy* 2021, **76**(9):2699–2715.
13. Catalán D, Mansilla MA, Ferrier A, Soto L, Oleinika K, Aguillón JC, Aravena O: **Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells.** *Front Immunol* 2021, **12**:611795.
14. Quách TD, Hopkins TJ, Holodick NE, Vuyyuru R, Manser T, Bayer RL, Rothstein TL: **Human B-1 and B-2 B Cells Develop from Lin-CD34+CD38^{lo} Stem Cells.** *J Immunol* 2016, **197**(10):3950–3958.
15. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL: **Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-.** *J Exp Med* 2011, **208**(1):67–80.
16. Prieto JMB, Felipe MJB: **Development, phenotype, and function of non-conventional B cells.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2017, **54**:38–44.

17. Carmona LM, Schatz DG: **New insights into the evolutionary origins of the recombination-activating gene proteins and V(D)J recombination.** *FEBS J* 2017, **284**(11):1590–1605.
18. Cyster JG, Allen CDC: **B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions.** *Cell* 2019, **177**(3):524–540.
19. Inoue T, Shinnakasu R, Kurosaki T: **Generation of High Quality Memory B Cells.** *Front Immunol* 2021, **12**:825813.
20. Mitchell GF, Grumet FC, McDevitt HO: **Genetic control of the immune response. The effect of thymectomy on the primary and secondary antibody response of mice to poly-L(Tyr, glu)-poly-D, L-ala-poly-L-lys.** *J Exp Med* 1972, **135**(1):126–135.
21. Palm AE, Kleinau S: **Marginal zone B cells: From housekeeping function to autoimmunity?** *J Autoimmun* 2021, **119**:102627.
22. Al-Herz W, McGeady SJ: **Antibody response in common variable immunodeficiency.** *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003, **90**(2):244–247.
23. Clutterbuck EA, Oh S, Hamaluba M, Westcar S, Beverley PC, Pollard AJ: **Serotype-specific and age-dependent generation of pneumococcal polysaccharide-specific memory B-cell and antibody responses to immunization with a pneumococcal conjugate vaccine.** *Clin Vaccine Immunol* 2008, **15**(2):182–193.
24. Mosier DE, Mond JJ, Goldings EA: **The ontogeny of thymic independent antibody responses in vitro in normal mice and mice with an X-linked B cell defect.** *J Immunol* 1977, **119**(6):1874–1878.
25. Duan J, Avci FY, Kasper DL: **Microbial carbohydrate depolymerization by antigen-presenting cells: deamination prior to presentation by the MHCII pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(13):5183–5188.
26. Sun L, Middleton DR, Wantuch PL, Ozdilek A, Avci FY: **Carbohydrates as T-cell antigens with implications in health and disease.** *Glycobiology* 2016, **26**(10):1029–1040.
27. Cobb BA, Wang Q, Tzianabos AO, Kasper DL: **Polysaccharide processing and presentation by the MHCII pathway.** *Cell* 2004, **117**(5):677–687.
28. Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ: **B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms.** *Immunol Rev* 2000, **176**:154–170.
29. Brunswick M, Finkelman FD, Highet PF, Inman JK, Dintzis HM, Mond JJ: **Picogram quantities of anti-Ig antibodies coupled to dextran induce B cell proliferation.** *J Immunol* 1988, **140**(10):3364–3372.
30. Peçanha LM, Snapper CM, Finkelman FD, Mond JJ: **Dextran-conjugated anti-Ig antibodies as a model for T cell-independent type 2 antigen-mediated stimulation of Ig secretion in vitro. I. Lymphokine dependence.** *J Immunol* 1991, **146**(3):833–839.
31. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P: **Pathways of antigen processing.** *Annu Rev Immunol* 2013, **31**:443–473.
32. Zanna MY, Yasmin AR, Omar AR, Arshad SS, Mariatulqabtiah AR, Nur-Fazila SH, Mahiza MIN: **Review of Dendritic Cells, Their Role in Clinical Immunology, and Distribution in Various Animal Species.** *Int J Mol Sci* 2021, **22**(15).

33. Breton G, Zheng S, Valieris R, Tojal da Silva I, Satija R, Nussenzweig MC: **Human dendritic cells (DCs) are derived from distinct circulating precursors that are precommitted to become CD1c+ or CD141+ DCs.** *J Exp Med* 2016, **213**(13):2861–2870.
34. Cabeza-Cabrero M, Cardoso A, Minutti CM, Pereira da Costa M, Reis e Sousa C: **Dendritic Cells Revisited.** *Annu Rev Immunol* 2021, **39**:131–166.
35. Zhu J, Yamane H, Paul WE: **Differentiation of effector CD4 T cell populations (*).** *Annu Rev Immunol* 2010, **28**:445–489.
36. Worbs T, Hammerschmidt SI, Förster R: **Dendritic cell migration in health and disease.** *Nat Rev Immunol* 2017, **17**(1):30–48.
37. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.** *J Immunol* 1986, **136**(7):2348–2357.
38. Lloyd CM, Snelgrove RJ: **Type 2 immunity: Expanding our view.** *Sci Immunol* 2018, **3**(25).
39. Hosoya T, Maillard I, Engel JD: **From the cradle to the grave: activities of GATA-3 throughout T-cell development and differentiation.** *Immunol Rev* 2010, **238**(1):110–125.
40. Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A: **Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility.** *Annu Rev Immunol* 2006, **24**:607–656.
41. Yin X, Chen S, Eisenbarth SC: **Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells.** *Annu Rev Immunol* 2021, **39**:759–790.
42. Halim TY, Steer CA, Mathä L, Gold MJ, Martinez-Gonzalez I, McNagny KM, McKenzie AN, Takei F: **Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation.** *Immunity* 2014, **40**(3):425–435.
43. Song W, Craft J: **T follicular helper cell heterogeneity: Time, space, and function.** *Immunol Rev* 2019, **288**(1):85–96.
44. Deng J, Wei Y, Fonseca VR, Graca L, Yu D: **T follicular helper cells and T follicular regulatory cells in rheumatic diseases.** *Nat Rev Rheumatol* 2019, **15**(8):475–490.
45. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, Dent AL, Craft J, Crotty S: **Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation.** *Science* 2009, **325**(5943):1006–1010.
46. Johnston RJ, Choi YS, Diamond JA, Yang JA, Crotty S: **STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation.** *J Exp Med* 2012, **209**(2):243–250.
47. Crotty S: **T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease.** *Immunity* 2014, **41**(4):529–542.
48. Mesin L, Ersching J, Victora GD: **Germinal Center B Cell Dynamics.** *Immunity* 2016, **45**(3):471–482.
49. Basso K, Dalla-Favera R: **Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells.** *Immunol Rev* 2012, **247**(1):172–183.
50. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, Corcoran LM, Godfrey DI, Toellner KM, Smyth MJ *et al*: **IL-21 regulates germinal center B cell**

- differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism.** *J Exp Med* 2010, **207**(2):365–378.
51. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, Verma NK, Smyth MJ, Rigby RJ, Vinuesa CG: **IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses.** *J Exp Med* 2010, **207**(2):353–363.
 52. Chaplin DD: **Overview of the immune response.** *J Allergy Clin Immunol* 2010, **125**(2 Suppl 2):S3–23.
 53. Ise W, Kurosaki T: **Plasma cell generation during T-cell-dependent immune responses.** *Int Immunol* 2021, **33**(12):797–801.
 54. Laidlaw BJ, Cyster JG: **Transcriptional regulation of memory B cell differentiation.** *Nat Rev Immunol* 2021, **21**(4):209–220.
 55. van Schouwenburg PA, IJspeert H, Pico-Knijnenburg I, Dalm VASH, van Hagen PM, van Zessen D, Stubbs AP, Patel SY, van der Burg M: **Identification of COVID Patients With Defects in Immune Repertoire Formation or Specification.** *Front Immunol* 2018, **9**:2545.
 56. King HW, Orban N, Riches JC, Clear AJ, Warnes G, Teichmann SA, James LK: **Single-cell analysis of human B cell maturation predicts how antibody class switching shapes selection dynamics.** *Sci Immunol* 2021, **6**(56).
 57. Roco JA, Mesin L, Binder SC, Nefzger C, Gonzalez-Figueroa P, Canete PF, Ellyard J, Shen Q, Robert PA, Cappello J *et al*: **Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers.** *Immunity* 2019, **51**(2):337–350.e337.
 58. Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M, Takahashi Y, Fukuyama H, Okada T, Kurosaki T: **Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment.** *Nat Immunol* 2016, **17**(7):861–869.
 59. Suan D, Sundling C, Brink R: **Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center.** *Curr Opin Immunol* 2017, **45**:97–102.
 60. Ise W, Fujii K, Shiroguchi K, Ito A, Kometani K, Takeda K, Kawakami E, Yamashita K, Suzuki K, Okada T *et al*: **T Follicular Helper Cell-Germinal Center B Cell Interaction Strength Regulates Entry into Plasma Cell or Recycling Germinal Center Cell Fate.** *Immunity* 2018, **48**(4):702–715.
 61. Horns F, Vollmers C, Croote D, Mackey SF, Swan GE, Dekker CL, Davis MM, Quake SR: **Lineage tracing of human B cells reveals the in vivo landscape of human antibody class switching.** *Elife* 2016, **5**(2):e16578.
 62. von Behring E, Kitasato S: **[The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890].** *Mol Immunol* 1991, **28**(12):1317, 1319–1320.
 63. Tiselius A, Kabat EA: **An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations.** *J Exp Med* 1939, **69**(1):119–131.
 64. Sun Y, Huang T, Hammarström L, Zhao Y: **The Immunoglobulins: New Insights, Implications, and Applications.** *Annu Rev Anim Biosci* 2020, **8**:145–169.
 65. Ermakov EA, Nevinsky GA, Buneva VN: **Immunoglobulins with Non-Canonical Functions in Inflammatory and Autoimmune Disease States.** *Int J Mol Sci* 2020, **21**(15).

66. Wu LC, Zarrin AA: **The production and regulation of IgE by the immune system.** *Nat Rev Immunol* 2014, **14**(4):247–259.
67. Dullaers M, De Bruyne R, Ramadani F, Gould HJ, Gevaert P, Lambrecht BN: **The who, where, and when of IgE in allergic airway disease.** *J Allergy Clin Immunol* 2012, **129**(3):635–645.
68. Ando T, Kitaura J: **Tuning IgE: IgE-Associating Molecules and Their Effects on IgE-Dependent Mast Cell Reactions.** *Cells* 2021, **10**(7).
69. Sutton BJ, Davies AM: **Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII.** *Immunol Rev* 2015, **268**(1):222–235.
70. Blank U, Huang H, Kawakami T: **The high affinity IgE receptor: a signaling update.** *Curr Opin Immunol* 2021, **72**:51–58.
71. Hjort C, Schiøtz PO, Ohlin M, Würtzen PA, Christensen LH, Hoffmann HJ: **The number and affinity of productive IgE pairs determine allergen activation of mast cells.** *J Allergy Clin Immunol* 2017, **140**(4):1167–1170.
72. Gonzalez-Espinosa C, Odom S, Olivera A, Hobson JP, Martinez ME, Oliveira-Dos-Santos A, Barra L, Spiegel S, Penninger JM, Rivera J: **Preferential signaling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells.** *J Exp Med* 2003, **197**(11):1453–1465.
73. Engeroff P, Vogel M: **The role of CD23 in the regulation of allergic responses.** *Allergy* 2021, **76**(7):1981–1989.
74. Engeroff P, Caviezel F, Mueller D, Thoms F, Bachmann MF, Vogel M: **CD23 provides a noninflammatory pathway for IgE-allergen complexes.** *J Allergy Clin Immunol* 2020, **145**(1):301–311.
75. Vladutiu AO: **Immunoglobulin D: properties, measurement, and clinical relevance.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2000, **7**(2):131–140.
76. Gutzeit C, Chen K, Cerutti A: **The enigmatic function of IgD: some answers at last.** *Eur J Immunol* 2018, **48**(7):1101–1113.
77. Rowe DS, Hug K, Forni L, Pernis B: **Immunoglobulin D as a lymphocyte receptor.** *J Exp Med* 1973, **138**(4):965–972.
78. Wallace ZS, Wallace CJ, Lu N, Choi HK, Stone JH: **Association of IgG4-Related Disease With History of Malignancy.** *Arthritis Rheumatol* 2016, **68**(9):2283–2289.
79. Chen K, Magri G, Grasset EK, Cerutti A: **Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA.** *Nat Rev Immunol* 2020, **20**(7):427–441.
80. Enders A, Short A, Miosge LA, Bergmann H, Sontani Y, Bertram EM, Whittle B, Balakishnan B, Yoshida K, Sjollem G *et al*: **Zinc-finger protein ZFP318 is essential for expression of IgD, the alternatively spliced Igh product made by mature B lymphocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(12):4513–4518.
81. Shan M, Carrillo J, Yeste A, Gutzeit C, Segura-Garzón D, Walland AC, Pybus M, Grasset EK, Yeiser JR, Matthews DB *et al*: **Secreted IgD Amplifies Humoral T Helper 2 Cell Responses by Binding Basophils via Galectin-9 and CD44.** *Immunity* 2018, **49**(4):709–724.
82. Kabat EA: **The molecular weight of antibodies.** *J Exp Med* 1939, **69**(1):103–118.

83. Brekke OH, Sandlie I: **Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century.** *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**(1):52–62.
84. Pan S, Manabe N, Yamaguchi Y: **3D Structures of IgA, IgM, and Components.** *Int J Mol Sci* 2021, **22**(23).
85. Hiramoto E, Tsutsumi A, Suzuki R, Matsuoka S, Arai S, Kikkawa M, Miyazaki T: **The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein.** *Sci Adv* 2018, **4**(10):eaau1199.
86. Moh ES, Lin CH, Thaysen-Andersen M, Packer NH: **Site-Specific N-Glycosylation of Recombinant Pentameric and Hexameric Human IgM.** *J Am Soc Mass Spectrom* 2016, **27**(7):1143–1155.
87. Magri G, Comerma L, Pybus M, Sintes J, Lligé D, Segura-Garzón D, Bascones S, Yeste A, Grasset EK, Gutzeit C *et al*: **Human Secretory IgM Emerges from Plasma Cells Clonally Related to Gut Memory B Cells and Targets Highly Diverse Commensals.** *Immunity* 2017, **47**(1):118–134.
88. Yel L: **Selective IgA deficiency.** *J Clin Immunol* 2010, **30**(1):10–16.
89. Blandino R, Baumgarth N: **Secreted IgM: New tricks for an old molecule.** *J Leukoc Biol* 2019, **106**(5):1021–1034.
90. Zhou ZH, Tzioufas AG, Notkins AL: **Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells.** *J Autoimmun* 2007, **29**(4):219–228.
91. Pape KA, Maul RW, Dileepan T, Paustian AS, Gearhart PJ, Jenkins MK: **Naive B Cells with High-Avidity Germline-Encoded Antigen Receptors Produce Persistent IgM.** *Immunity* 2018, **48**(6):1135–1143.
92. Gupta S, Gupta A: **Selective IgM Deficiency-An Underestimated Primary Immunodeficiency.** *Front Immunol* 2017, **8**:1056.
93. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA, Chen J: **B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection.** *J Exp Med* 2000, **192**(2):271–280.
94. Boes M, Esau C, Fischer MB, Schmidt T, Carroll M, Chen J: **Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM.** *J Immunol* 1998, **160**(10):4776–4787.
95. Heyman B, Pilström L, Shulman MJ: **Complement activation is required for IgM-mediated enhancement of the antibody response.** *J Exp Med* 1988, **167**(6):1999–2004.
96. Liu J, Wang Y, Xiong E, Hong R, Lu Q, Ohno H, Wang JY: **Role of the IgM Fc Receptor in Immunity and Tolerance.** *Front Immunol* 2019, **10**:529.
97. Mestecky J, Russell MW, Jackson S, Brown TA: **The human IgA system: a reassessment.** *Clin Immunol Immunopathol* 1986, **40**(1):105–114.
98. Childers NK, Bruce MG, McGhee JR: **Molecular mechanisms of immunoglobulin A defense.** *Annu Rev Microbiol* 1989, **43**:503–536.
99. de Sousa-Pereira P, Woof JM: **IgA: Structure, Function, and Developability.** *Antibodies (Basel)* 2019, **8**(4).

100. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T: **IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions**. *Front Immunol* 2014, **5**:520.
101. Napodano C, Marino M, Stefanile A, Pocino K, Scatena R, Gulli F, Rapaccini GL, Delli Noci S, Capozio G, Rigante D *et al*: **Immunological Role of IgG Subclasses**. *Immunol Invest* 2021, **50**(4):427–444.
102. Indik ZK, Park JG, Hunter S, Schreiber AD: **The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis**. *Blood* 1995, **86**(12):4389–4399.
103. Bondt A, Hoek M, Tamara S, de Graaf B, Peng W, Schulte D, van Rijswijck DMH, den Boer MA, Greisch JF, Varkila MRJ *et al*: **Human plasma IgG1 repertoires are simple, unique, and dynamic**. *Cell Syst* 2021, **12**(12):1131–1143.
104. Brezski RJ, Oberholtzer A, Strake B, Jordan RE: **The in vitro resistance of IgG2 to proteolytic attack concurs with a comparative paucity of autoantibodies against peptide analogs of the IgG2 hinge**. *MAbs* 2011, **3**(6):558–567.
105. Seino J, Eveleigh P, Warnaar S, van Haarlem LJ, van Es LA, Daha MR: **Activation of human complement by mouse and mouse/human chimeric monoclonal antibodies**. *Clin Exp Immunol* 1993, **94**(2):291–296.
106. Hui GK, Gardener AD, Begum H, Eldrid C, Thalassinou K, Gor J, Perkins SJ: **The solution structure of the human IgG2 subclass is distinct from those for human IgG1 and IgG4 providing an explanation for their discrete functions**. *J Biol Chem* 2019, **294**(28):10789–10806.
107. Roopenian DC, Akilesh S: **FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age**. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**(9):715–725.
108. Naegel GP, Young KR, Reynolds HY: **Receptors for human IgG subclasses on human alveolar macrophages**. *Am Rev Respir Dis* 1984, **129**(3):413–418.
109. Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG: **IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens**. *Pediatr Infect Dis J* 1990, **9**(8 Suppl):S16–24.
110. Saluk PH, Clem LW: **The unique molecular weight of the heavy chain from human IgG3**. *J Immunol* 1971, **107**(1):298–301.
111. Koneczny I: **Update on IgG4-mediated autoimmune diseases: New insights and new family members**. *Autoimmun Rev* 2020, **19**(10):102646.
112. Bloom JW, Madanat MS, Marriott D, Wong T, Chan SY: **Intrachain disulfide bond in the core hinge region of human IgG4**. *Protein Sci* 1997, **6**(2):407–415.
113. Rispens T, Ooijevaar-de Heer P, Bende O, Aalberse RC: **Mechanism of immunoglobulin G4 Fab-arm exchange**. *J Am Chem Soc* 2011, **133**(26):10302–10311.
114. Bianchini R, Karagiannis SN, Jordakieva G, Jensen-Jarolim E: **The Role of IgG4 in the Fine Tuning of Tolerance in IgE-Mediated Allergy and Cancer**. *Int J Mol Sci* 2020, **21**(14).
115. Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T: **Immunoglobulin G4: an odd antibody**. *Clin Exp Allergy* 2009, **39**(4):469–477.
116. Yazdani R, Habibi S, Sharifi L, Azizi G, Abolhassani H, Olbrich P, Aghamohammadi A: **Common Variable Immunodeficiency: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical**

- Manifestations, Diagnosis, Classification, and Management.** *J Investig Allergol Clin Immunol* 2020, **30**(1):14–34.
117. SANFORD JP, FAVOUR CB, TRIBEMAN MS: **Absence of serum gamma globulins in an adult.** *N Engl J Med* 1954, **250**(24):1027–1029.
118. Fudenberg H, Good RA, Goodman HC, Hitzig W, Kunkel HG, Roitt IM, Rosen FS, Rowe DS, Seligmann M, Soothill JR: **Primary immunodeficiencies. Report of a World Health Organization Committee.** *Pediatrics* 1971, **47**(5):927–946.
119. Odnoletkova I, Kindle G, Quinti I, Grimbacher B, Knerr V, Gathmann B, Ehl S, Mahlaoui N, Van Wilder P, Bogaerts K *et al*: **The burden of common variable immunodeficiency disorders: a retrospective analysis of the European Society for Immunodeficiency (ESID) registry data.** *Orphanet J Rare Dis* 2018, **13**(1):201.
120. Bogaert DJ, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F: **Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all?** *J Med Genet* 2016, **53**(9):575–590.
121. Fekrvand S, Khanmohammadi S, Abolhassani H, Yazdani R: **B- and T-Cell Subset Abnormalities in Monogenic Common Variable Immunodeficiency.** *Front Immunol* 2022, **13**:912826.
122. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, Costa-Carvalho BT, Cunningham-Rundles C, de la Morena MT, Espinosa-Rosales FJ, Hammarström L, Nonoyama S, Quinti I *et al*: **International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders.** *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016, **4**(1):38–59.
123. Seidel MG, Kindle G, Gathmann B, Quinti I, Buckland M, van Montfrans J, Scheible R, Rusch S, Gasteiger LM, Grimbacher B *et al*: **The European Society for Immunodeficiencies (ESID) Registry Working Definitions for the Clinical Diagnosis of Inborn Errors of Immunity.** *J Allergy Clin Immunol Pract* 2019, **7**(6):1763–1770.
124. Chovancová Z: **Sekundární imunodeficience jako následek iatrogenního působení.** *Postgraduální medicína* 2019, **21**(4):1212–4184.
125. Chovancová Z: **Sekundární imunodeficience jako následek chronických onemocnění.** *Vnitřní lékařství* 2019, **65**(2):117–124.
126. Thalhammer J, Kindle G, Nieters A, Rusch S, Seppänen MRJ, Fischer A, Grimbacher B, Edgar D, Buckland M, Mahlaoui N *et al*: **Initial presenting manifestations in 16,486 patients with inborn errors of immunity include infections and noninfectious manifestations.** *J Allergy Clin Immunol* 2021, **148**(5):1332–1341.
127. Patuzzo G, Barbieri A, Tinazzi E, Veneri D, Argentino G, Moretta F, Puccetti A, Lunardi C: **Autoimmunity and infection in common variable immunodeficiency (CVID).** *Autoimmun Rev* 2016, **15**(9):877–882.
128. Hampson FA, Chandra A, Sreaton NJ, Condliffe A, Kumararatne DS, Exley AR, Babar JL: **Respiratory disease in common variable immunodeficiency and other primary immunodeficiency disorders.** *Clin Radiol* 2012, **67**(6):587–595.
129. Brent J, Guzman D, Bangs C, Grimbacher B, Fayolle C, Huissoon A, Bethune C, Thomas M, Patel S, Jolles S *et al*: **Clinical and laboratory correlates of lung disease and cancer in adults with idiopathic hypogammaglobulinaemia.** *Clin Exp Immunol* 2016, **184**(1):73–82.

130. Baroš J, Doubková M, Chovancová Z: **Plicní postižení u primárních protilátkových imunodeficiencí.** *Alergie* 2020, **22**(2):97–104.
131. Cinetto F, Scarpa R, Carrabba M, Firinu D, Lougaris V, Buso H, Garzi G, Gianese S, Soccodato V, Punziano A *et al*: **Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease (GLILD) in Common Variable Immunodeficiency (CVID): A Multicenter Retrospective Study of Patients From Italian PID Referral Centers.** *Front Immunol* 2021, **12**:627423.
132. Doubková M, Špeldová J, Chovancová Z: **Immunodeficiency in the differential diagnosis of interstitial lung diseases.** *Vnitřní lékařství* 2019, **65**(11):685–693.
133. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, Fieschi C, Thon V, Abedi MR, Hammarstrom L: **Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes.** *Blood* 2008, **112**(2):277–286.
134. Ho HE, Cunningham-Rundles C: **Non-infectious Complications of Common Variable Immunodeficiency: Updated Clinical Spectrum, Sequelae, and Insights to Pathogenesis.** *Front Immunol* 2020, **11**:149.
135. Yakaboski E, Fuleihan RL, Sullivan KE, Cunningham-Rundles C, Feuille E: **Lymphoproliferative Disease in CVID: a Report of Types and Frequencies from a US Patient Registry.** *J Clin Immunol* 2020, **40**(3):524–530.
136. Bruns L, Panagiota V, von Hardenberg S, Schmidt G, Adriawan IR, Sogka E, Hirsch S, Ahrenstorf G, Witte T, Schmidt RE *et al*: **Common Variable Immunodeficiency-Associated Cancers: The Role of Clinical Phenotypes, Immunological and Genetic Factors.** *Front Immunol* 2022, **13**:742530.
137. Malamut G, Verkarre V, Suarez F, Viallard JF, Lascaux AS, Cosnes J, Bouhnik Y, Lambotte O, Béchade D, Ziol M *et al*: **The enteropathy associated with common variable immunodeficiency: the delineated frontiers with celiac disease.** *Am J Gastroenterol* 2010, **105**(10):2262–2275.
138. Uzzan M, Ko HM, Mehandru S, Cunningham-Rundles C: **Gastrointestinal Disorders Associated with Common Variable Immune Deficiency (CVID) and Chronic Granulomatous Disease (CGD).** *Curr Gastroenterol Rep* 2016, **18**(4):17.
139. Andersen IM, Jørgensen SF: **Gut inflammation in CVID: causes and consequences.** *Expert Rev Clin Immunol* 2022, **18**(1):31–45.
140. Conigliaro P, Triggianese P, Ballanti E, Perricone C, Perricone R, Chimenti MS: **Complement, infection, and autoimmunity.** *Curr Opin Rheumatol* 2019, **31**(5):532–541.
141. Kalia N, Singh J, Kaur M: **The ambiguous role of mannose-binding lectin (MBL) in human immunity.** *Open Med (Wars)* 2021, **16**(1):299–310.
142. Takahashi K: **Mannose-binding lectin and the balance between immune protection and complication.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011, **9**(12):1179–1190.
143. Skattum L, van Deuren M, van der Poll T, Truedsson L: **Complement deficiency states and associated infections.** *Mol Immunol* 2011, **48**(14):1643–1655.
144. Eisen DP, Dean MM, Boermeester MA, Fidler KJ, Gordon AC, Kronborg G, Kun JF, Lau YL, Payeras A, Valdimarsson H *et al*: **Low serum mannose-binding lectin level increases the risk of death due to pneumococcal infection.** *Clin Infect Dis* 2008, **47**(4):510–516.

145. Dommett RM, Klein N, Turner MW: **Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future.** *Tissue Antigens* 2006, **68**(3):193–209.
146. Fidler KJ, Hilliard TN, Bush A, Johnson M, Geddes DM, Turner MW, Alton EW, Klein NJ, Davies JC: **Mannose-binding lectin is present in the infected airway: a possible pulmonary defence mechanism.** *Thorax* 2009, **64**(2):150–155.
147. Summerfield JA, Sumiya M, Levin M, Turner MW: **Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series.** *BMJ* 1997, **314**(7089):1229–1232.
148. Cedzynski M, Szemraj J, Swierzko AS, Bak-Romaniszyn L, Banasik M, Zeman K, Kilpatrick DC: **Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system.** *Clin Exp Immunol* 2004, **136**(2):304–311.
149. Holdaway J, Deacock S, Williams P, Karim Y: **Mannose-binding lectin deficiency and predisposition to recurrent infection in adults.** *J Clin Pathol* 2016, **69**(8):731–736.
150. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG: **A population-based study of morbidity and mortality in mannose-binding lectin deficiency.** *J Exp Med* 2004, **199**(10):1391–1399.
151. Neth O, Jack DL, Johnson M, Klein NJ, Turner MW: **Enhancement of complement activation and opsonophagocytosis by complexes of mannose-binding lectin with mannose-binding lectin-associated serine protease after binding to Staphylococcus aureus.** *J Immunol* 2002, **169**(8):4430–4436.
152. Jack DL, Lee ME, Turner MW, Klein NJ, Read RC: **Mannose-binding lectin enhances phagocytosis and killing of Neisseria meningitidis by human macrophages.** *J Leukoc Biol* 2005, **77**(3):328–336.
153. Faber J, Schuessler T, Finn A, Murdoch C, Zenz W, Habermehl P, Meyer CU, Zabel BU, Schmitt H, Zepp F *et al*: **Age-dependent association of human mannose-binding lectin mutations with susceptibility to invasive meningococcal disease in childhood.** *Pediatr Infect Dis J* 2007, **26**(3):243–246.
154. Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, Walport MJ, Botto M: **The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to Streptococcus pneumoniae infection in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(26):16969–16974.
155. Videbaek K, Buchvald F, Holgersen MG, Henriksen A, Eriksson F, Garred P, Nielsen KG: **The impact of mannose-binding lectin polymorphisms on lung function in primary ciliary dyskinesia.** *Pediatr Pulmonol* 2019, **54**(8):1182–1189.
156. Laubach JP, Ludwig M, Horn T, Eickmeier O, Smaczny C, Schubert R, Zielen S, Majoor C, Aydin M, Schmitt-Grohé S: **Mannose-Binding Lectin (MBL) and Gap Junction Protein Alpha 4 (GJA4) Gene Heterogeneity in Relation to Severity of Clinical Disease in Cystic Fibrosis.** *Front Biosci (Landmark Ed)* 2022, **27**(6):168.
157. Mandal J, Malla B, Steffensen R, Costa L, Egli A, Trendelenburg M, Blasi F, Kostikas K, Welte T, Torres A *et al*: **Mannose-binding lectin protein and its association to clinical outcomes in COPD: a longitudinal study.** *Respir Res* 2015, **16**:150.
158. Chalmers JD, McHugh BJ, Doherty C, Smith MP, Govan JR, Kilpatrick DC, Hill AT: **Mannose-binding lectin deficiency and disease severity in non-cystic fibrosis bronchiectasis: a prospective study.** *Lancet Respir Med* 2013, **1**(3):224–232.

159. Macfarlane JG, Jary H, Hester KL, McAlinden P, Wake J, Small T, Walton KE, Spickett G, De Soyza A: **Low serum mannose-binding lectin level is not associated with disease severity in non-cystic fibrosis bronchiectasis.** *Innate Immun* 2012, **18**(6):787–792.
160. Dogru D, Polat SE, Tan Ç, Tezcan İ, Yalçın SS, Utine E, Oğuz B, Yaz İ, Emiralioglu N, Hızal M *et al*: **Impact of mannose-binding lectin 2 gene polymorphisms on disease severity in noncystic fibrosis bronchiectasis in children.** *Pediatr Pulmonol* 2020, **55**(5):1190–1198.
161. Mandal RK, Khan MA, Hussain A, Dar SA, Aloufi S, Jawed A, Wahid M, Panda AK, Lohani M, Akhter N *et al*: **Association of MBL2 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis susceptibility: trial sequence meta-analysis as evidence.** *Infect Drug Resist* 2019, **12**:185–210.
162. Denholm JT, McBryde ES, Eisen DP: **Mannose-binding lectin and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis.** *Clin Exp Immunol* 2010, **162**(1):84–90.
163. Areeshi MY, Mandal RK, Akhter N, Dar SA, Jawed A, Wahid M, Mahto H, Panda AK, Lohani M, Haque S: **A Meta-analysis of MBL2 Polymorphisms and Tuberculosis Risk.** *Sci Rep* 2016, **6**:35728.
164. Shi J, Xie M, Wang JM, Xu YJ, Xiong WN, Liu XS: **Mannose-binding lectin two gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility in Chinese population: a meta-analysis.** *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2013, **33**(2):166–171.
165. Shen W, Xiao L, Li Y, Zhou D, Zhang W: **Association between polymorphisms in mannose-binding lectin 2 gene with pulmonary tuberculosis susceptibility.** *Hereditas* 2020, **157**(1):33.
166. Tong X, Wan Q, Li Z, Liu S, Huang J, Wu M, Fan H: **Association between the mannose-binding lectin (MBL)-2 gene variants and serum MBL with pulmonary tuberculosis: An update meta-analysis and systematic review.** *Microb Pathog* 2019, **132**:374–380.
167. Rosales C: **Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity.** *J Leukoc Biol* 2020, **108**(1):377–396.
168. Castanheira FVS, Kubes P: **Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation.** *Blood* 2019, **133**(20):2178–2185.
169. Lawrence SM, Corriden R, Nizet V: **How Neutrophils Meet Their End.** *Trends Immunol* 2020, **41**(6):531–544.
170. Lakschevitz FS, Hassanpour S, Rubin A, Fine N, Sun C, Glogauer M: **Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry.** *Exp Cell Res* 2016, **342**(2):200–209.
171. Bouti P, Webbers SDS, Fagerholm SC, Alon R, Moser M, Matlung HL, Kuijpers TW: **2 Integrin Signaling Cascade in Neutrophils: More Than a Single Function.** *Front Immunol* 2020, **11**:619925.
172. Gadhoum SZ, Sackstein R: **CD15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity.** *Nat Chem Biol* 2008, **4**(12):751–757.
173. Pham CT: **Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40**(6–7):1317–1333.

174. Borregaard N, Cowland JB: **Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte.** *Blood* 1997, **89**(10):3503–3521.
175. Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K: **Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins.** *Trends Immunol* 2007, **28**(8):340–345.
176. Soehnlein O, Lindbom L: **Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system.** *J Leukoc Biol* 2009, **85**(3):344–351.
177. Ng LG, Ostuni R, Hidalgo A: **Heterogeneity of neutrophils.** *Nat Rev Immunol* 2019, **19**(4):255–265.
178. Hacbarth E, Kajdacsy-Balla A: **Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever.** *Arthritis Rheum* 1986, **29**(11):1334–1342.
179. Hassani M, Hellebrekers P, Chen N, van Aalst C, Bongers S, Hietbrink F, Koenderman L, Vrisekoop N: **On the origin of low-density neutrophils.** *J Leukoc Biol* 2020, **107**(5):809–818.
180. Chapel H, Cunningham-Rundles C: **Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions.** *Br J Haematol* 2009, **145**(6):709–727.
181. Gonzalez-Quintela A, Alende R, Gude F, Campos J, Rey J, Meijide LM, Fernandez-Merino C, Vidal C: **Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities.** *Clin Exp Immunol* 2008, **151**(1):42–50.
182. Engelhart S, Glynn RJ, Schur PH: **Disease associations with isolated elevations of each of the four IgG subclasses.** *Semin Arthritis Rheum* 2017, **47**(2):276–280.
183. Chan ASY, Mudhar H, Shen SY, Lang SS, Fernando M, Hilmy MH, Guppy NJ, Rennie I, Dunkley L, Al Jajeh I: **Serum IgG2 and tissue IgG2 plasma cell elevation in orbital IgG4-related disease (IgG4-RD): Potential use in IgG4-RD assessment.** *Br J Ophthalmol* 2017, **101**(11):1576–1582.
184. Chovancová Z, Filipenský P, Rotnáglová S, Zambo Staniczková I, Shatokhina T, Novosádová K, Litzman J: **Podtřída imunoglobulinů IgG4 a s ní související patologické stavy aneb jak účinně imitovat nádorové onemocnění.** *Klinická onkologie* 2022; **35**(1):20–31.
185. Zhang H, Li P, Wu D, Xu D, Hou Y, Wang Q, Li M, Li Y, Zeng X, Zhang F *et al*: **Serum IgG subclasses in autoimmune diseases.** *Medicine (Baltimore)* 2015, **94**(2):387.
186. Lin GG, Li JM: **IgG subclass serum levels in systemic lupus erythematosus patients.** *Clin Rheumatol* 2009, **28**(11):1315–1318.
187. Liu Y, Li J: **Preferentially immunoglobulin (IgG) subclasses production in primary Sjögren's syndrome patients.** *Clin Chem Lab Med* 2011, **50**(2):345–349.
188. Zeng Y, Zhang Y, Chen Q, Huang Q, Lin Y, Wang X, Wang JJ, Jiang L, Xiao Y: **Distribution of IgG subclass anti-nuclear antibodies (ANAs) in systemic lupus erythematosus.** *Lupus* 2021, **30**(6):901–912.
189. Latvala J, Hietala J, Koivisto H, Järvi K, Anttila P, Niemelä O: **Immune Responses to Ethanol Metabolites and Cytokine Profiles Differentiate Alcoholics with or without Liver Disease.** *Am J Gastroenterol* 2005, **100**(6):1303–1310.

190. Rodriguez-Segade S, Camiña MF, Carnero A, Lorenzo MJ, Alban A, Quinteiro C, Lojo S: **High serum IgA concentrations in patients with diabetes mellitus: age-wise distribution and relation to chronic complications.** *Clin Chem* 1996, **42**(7):1064–1067.
191. Copetti V, Pastore S, De Pieri C, Radillo O, Taddio A, Ventura A, Tommasini A: **Clinical significance of hyper-IgA in a paediatric laboratory series.** *Arch Dis Child* 2014, **99**(12):1114–1116.
192. Chovancova Z, Kuman M, Vlkova M, Litzman J: **Successful renal transplantation in a patient with a Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene mutation.** *Transpl Int* 2015, **28**(8):1005–1009.
193. Brandtzaeg P, Johansen FE: **Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties.** *Immunol Rev* 2005, **206**:32–63.
194. Chen K, Cerutti A: **New insights into the enigma of immunoglobulin D.** *Immunol Rev* 2010, **237**(1):160–179.
195. Min JY, Nayak JV, Hulse KE, Stevens WW, Raju PA, Huang JH, Suh LA, Van Roey GA, Norton JE, Carter RG *et al*: **Evidence for altered levels of IgD in the nasal airway mucosa of patients with chronic rhinosinusitis.** *J Allergy Clin Immunol* 2017, **140**(6):1562–1571.
196. Nechvatalova J, Bartol SJW, Chovancova Z, Boon L, Vlkova M, van Zelm MC: **Absence of Surface IgD Does Not Impair Naive B Cell Homeostasis or Memory B Cell Formation in.** *J Immunol* 2018, **201**(7):1928–1935.
197. Ponsford MJ, Klopperk A, Pulvirenti F, Dalm VASH, Milota T, Cinetto F, Chovancova Z, Rial MJ, Sediva A, Litzman J *et al*: **Hyper IgE in the Allergy Clinic - when is it Primary Immunodeficiency?** *Allergy* 2018, **73**(11):2122–2136.
198. Picado C, de Landazuri IO, Vlaga A, Bobolea I, Arismendi E, Amaro R, Sellarés J, Bartra J, Sanmarti R, Hernandez-Rodriguez J *et al*: **Spectrum of Disease Manifestations in Patients with Selective Immunoglobulin E Deficiency.** *J Clin Med* 2021, **10**(18).
199. Ferastraoar D, Jordakieva G, Jensen-Jarolim E: **The other side of the coin: IgE deficiency, a susceptibility factor for malignancy occurrence.** *World Allergy Organ J* 2021, **14**(1):100505.
200. Ferastraoar D, Bax HJ, Bergmann C, Capron M, Castells M, Dombrowicz D, Fiebiger E, Gould HJ, Hartmann K, Jappe U *et al*: **AllergoOncology: ultra-low IgE, a potential novel biomarker in cancer-a Position Paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI).** *Clin Transl Allergy* 2020, **10**:32.
201. Charles N: **Autoimmunity, IgE and FcεRI-bearing cells.** *Curr Opin Immunol* 2021, **72**:43–50.
202. Hobbs JR, Milner RD, Watt PJ: **Gamma-M deficiency predisposing to meningococcal septicaemia.** *Br Med J* 1967, **4**(5579):583–586.
203. Janssen LMA, Macken T, Creemers MCW, Pruijt JFM, Eijk JJJ, de Vries E: **Truly selective primary IgM deficiency is probably very rare.** *Clin Exp Immunol* 2018, **191**(2):203–211.
204. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T *et al*: **Human Inborn Errors of Immunity:**

- 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee.** *J Clin Immunol* 2020, **40**(1):24–64.
205. Chovancova Z, Kralickova P, Pejchalova A, Bloomfield M, Nechvatalova J, Vlkova M, Litzman J: **Selective IgM Deficiency: Clinical and Laboratory Features of 17 Patients and a Review of the Literature.** *J Clin Immunol* 2017, **37**(6):559–574.
206. Saifi M, Wysocki CA: **Autoimmune Disease in Primary Immunodeficiency: At the Crossroads of Anti-Infective Immunity and Self-Tolerance.** *Immunol Allergy Clin North Am* 2015, **35**(4):731–752.
207. Goldacker S, Draeger R, Warnatz K, Huzly D, Salzer U, Thiel J, Eibel H, Schlesier M, Peter HH: **Active vaccination in patients with common variable immunodeficiency (CVID).** *Clin Immunol* 2007, **124**(3):294–303.
208. Zhan W, Hatchette T, Yue F, Liu J, Song H, Zhao H, Betschel S, Ostrowski M: **Impaired Memory B-Cell Response to Influenza Immunization in Patients With Common Variable Immunodeficiency (CVID).** *Pathog Immun* 2021, **6**(2):105–118.
209. Cavaliere FM, Milito C, Martini H, Schlesier M, Dräger R, Schütz K, Brunetti G, Pesce AM, Thon V, Warnatz K *et al*: **Quantification of IgM and IgA anti-pneumococcal capsular polysaccharides by a new ELISA assay: a valuable diagnostic and prognostic tool for common variable immunodeficiency.** *J Clin Immunol* 2013, **33**(4):838–846.
210. Pulvirenti F, Milito C, Cavaliere FM, Mezzaroma I, Cinetto F, Quinti I: **IGA Antibody Induced by Immunization With Pneumococcal Polysaccharides Is a Prognostic Tool in Common Variable Immune Deficiencies.** *Front Immunol* 2020, **11**:1283.
211. Sánchez-Ramón S, de Gracia J, García-Alonso AM, Rodríguez Molina JJ, Melero J, de Andrés A, García Ruiz de Morales JM, Ferreira A, Ocejo-Vinyals JG, Cid JJ *et al*: **Multicenter study for the evaluation of the antibody response against salmonella typhi Vi vaccination (EMPATHY) for the diagnosis of Anti-polysaccharide antibody production deficiency in patients with primary immunodeficiency.** *Clin Immunol* 2016, **169**:80–84.
212. Guevara-Hoyer K, Gil C, Parker AR, Williams LJ, Orte C, Rodriguez de la Peña A, Ochoa-Grullón J, Rodriguez De Frias E, García IS, García-Gómez S *et al*: **Measurement of Typhim Vi IgG as a Diagnostic Tool to Determine Anti-polysaccharide Antibody Production Deficiency in Children.** *Front Immunol* 2019, **10**:654.
213. Jalil M, Abraham JM, Hostoffer R: **The Successful Vaccination of an IVIgG Naive CVID Patient with an mRNA COVID-19 Vaccine.** *Allergy Rhinol (Providence)* 2021, **12**:21526567211049744.
214. Salinas AF, Mortari EP, Terreri S, Quintarelli C, Pulvirenti F, Di Cecca S, Guercio M, Milito C, Bonanni L, Auria S *et al*: **SARS-CoV-2 Vaccine Induced Atypical Immune Responses in Antibody Defects: Everybody Does their Best.** *J Clin Immunol* 2021, **41**(8):1709–1722.
215. van Leeuwen LPM, GeurtsvanKessel CH, Ellerbroek PM, de Bree GJ, Potjewijd J, Rutgers A, Jolink H, van de Veerdonk F, van Gorp ECM, de Wilt F *et al*: **Immunogenicity of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine in adult patients with inborn errors of immunity.** *J Allergy Clin Immunol* 2022, **149**(6):1949–1957.

216. Horn J, Thon V, Bartonkova D, Salzer U, Warnatz K, Schlesier M, Peter HH, Grimbacher B: **Anti-IgA antibodies in common variable immunodeficiency (CVID): diagnostic workup and therapeutic strategy.** *Clin Immunol* 2007, **122**(2):156–162.
217. Ahrens N, Höflich C, Bombard S, Lochs H, Kiesewetter H, Salama A: **Immune tolerance induction in patients with IgA anaphylactoid reactions following long-term intravenous IgG treatment.** *Clin Exp Immunol* 2008, **151**(3):455–458.
218. Torabi Sagvand B, Mirminachi B, Abolhassani H, Shokouhfar T, Keihanian T, Amirzargar A, Mahdavian A, Aghamohammadi A: **IgG anti-IgA antibodies in paediatric antibody-deficient patients receiving intravenous immunoglobulin.** *Allergol Immunopathol (Madr)* 2015, **43**(4):403–408.
219. Björkander J, Hammarström L, Smith CI, Buckley RH, Cunningham-Rundles C, Hanson LA: **Immunoglobulin prophylaxis in patients with antibody deficiency syndromes and anti-IgA antibodies.** *J Clin Immunol* 1987, **7**(1):8–15.
220. Chovancova Z, Vlkova M, Litzman J, Lokaj J, Thon V: **Antibody forming cells and plasmablasts in peripheral blood in CVID patients after vaccination.** *Vaccine* 2011, **29**(24):4142–4150.
221. Ahn S, Cunningham-Rundles C: **Role of B cells in common variable immune deficiency.** *Expert Rev Clin Immunol* 2009, **5**(5):557–564.
222. Warnatz K, Schlesier M: **Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency.** *Cytometry B Clin Cytom* 2008, **74**(5):261–271.
223. Andersen P, Permin H, Andersen V, Schejbel L, Garred P, Svejgaard A, Barington T: **Deficiency of somatic hypermutation of the antibody light chain is associated with increased frequency of severe respiratory tract infection in common variable immunodeficiency.** *Blood* 2005, **105**(2):511–517.
224. Fevang B, Mollnes TE, Holm AM, Ueland T, Heggelund L, Damås JK, Aukrust P, Frøland SS: **Common variable immunodeficiency and the complement system; low mannose-binding lectin levels are associated with bronchiectasis.** *Clin Exp Immunol* 2005, **142**(3):576–584.
225. Mullighan CG, Marshall SE, Welsh KI: **Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency.** *Scand J Immunol* 2000, **51**(2):111–122.
226. Mistegaard CE, Jensen L, Christiansen M, Bjerre M, Jensen JMB, Thiel S: **Low levels of the innate immune system proteins MASP-2 and MAP44 in patients with common variable immunodeficiency.** *Scand J Immunol* 2022, **96**(3):13196.
227. Gregersen S, Aaløkken TM, Mynarek G, Fevang B, Holm AM, Ueland T, Aukrust P, Kongerud J, Johansen B, Frøland SS: **Development of pulmonary abnormalities in patients with common variable immunodeficiency: associations with clinical and immunologic factors.** *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010, **104**(6):503–510.
228. Litzman J, Freiberger T, Grimbacher B, Gathmann B, Salzer U, Pavlík T, Vlcek J, Postránecká V, Trávníčková Z, Thon V: **Mannose-binding lectin gene polymorphic variants predispose to the development of bronchopulmonary complications but have no influence on other clinical and laboratory symptoms or signs of common variable immunodeficiency.** *Clin Exp Immunol* 2008, **153**(3):324–330.

229. Daheshia M, Prahl JD, Carmichael JJ, Parrish JS, Seda G: **The immune response and its therapeutic modulation in bronchiectasis.** *Pulm Med* 2012, **2012**:280528.
230. Mårdh CK, Root J, Uddin M, Stenvall K, Malmgren A, Karabelas K, Thomas M: **Targets of Neutrophil Influx and Weaponry: Therapeutic Opportunities for Chronic Obstructive Airway Disease.** *J Immunol Res* 2017, **2017**:5273201.
231. Hel Z, Huijbregts RP, Xu J, Nechvatalova J, Vlkova M, Litzman J: **Altered serum cytokine signature in common variable immunodeficiency.** *J Clin Immunol* 2014, **34**(8):971–978.
232. Prezzo A, Cavaliere FM, Milito C, Bilotta C, Iacobini M, Quinti I: **Intravenous immunoglobulin replacement treatment reduces in vivo elastase secretion in patients with common variable immune disorders.** *Blood Transfus* 2019, **17**(2):103–111.
233. Teeling JL, De Groot ER, Eerenberg AJ, Bleeker WK, Van Mierlo G, Aarden LA, Hack CE: **Human intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations degranulate human neutrophils in vitro.** *Clin Exp Immunol* 1998, **114**(2):264–270.
234. Teeling JL, Bleeker WK, Rigter GM, van Rooijen N, Kuijpers TW, Hack CE: **Intravenous immunoglobulin preparations induce mild activation of neutrophils in vivo via triggering of macrophages studies in a rat model.** *Br J Haematol* 2001, **112**(4):1031–1040.
235. Litzman J, Chovancová Z, Bejdák P, Litzman M, Hel Z, Vlková M: **Common variable immunodeficiency patients display elevated plasma levels of granulocyte activation markers elastase and myeloperoxidase.** *Int J Immunopathol Pharmacol* 2019, **33**:2058738419843381.
236. Vlkova M, Chovancova Z, Nechvatalova J, Connelly AN, Davis MD, Slanina P, Travnickova L, Litzman M, Grymova T, Soucek P *et al*: **Neutrophil and Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Mediated T Cell Suppression Significantly Contributes to Immune Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency Disorders.** *J Immunol* 2019, **202**(1):93–104.
237. Choi J, Suh B, Ahn YO, Kim TM, Lee JO, Lee SH, Heo DS: **CD15+/CD16low human granulocytes from terminal cancer patients: granulocytic myeloid-derived suppressor cells that have suppressive function.** *Tumour Biol* 2012, **33**(1):121–129.
238. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, Ulfman LH, Leenen LP, Pickkers P, Koenderman L: **A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1.** *J Clin Invest* 2012, **122**(1):327–336.

10 ANNEXES

- I PONSFORD, Mark J., Adam KLOPPERK, Federica PULVIRENTI, Virgil A. S. H. DALM, Tomas MILOTA, Francesco CINETTO, Zita CHOVANCOVA, Manuel J. RIAL, Anna SEDIVA, Jiri LITZMAN, Carlo AGOSTINI, Martin VAN HAGEN, Isabella QUINTI a Stephen JOLLES. **Hyper-IgE in the allergy clinic-when is it primary immunodeficiency?** Allergy [online]. 2018, 73(11), 2122–2136. ISSN 0105-4538. Dostupné z: doi:10.1111/all.13578

Document Type: Review; IF = 6,771

- II NECHVATALOVA, Jana, Sophinus J. W. BARTOL, Zita CHOVANCOVA, Louis BOON, Marcela VLKOVA a Menno C. VAN ZELM. **Absence of Surface IgD Does Not Impair Naive B Cell Homeostasis or Memory B Cell Formation in IGHD Haploinsufficient Humans.** Journal of Immunology [online]. 2018, 201(7), 1928–1935. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1800767

Document Type: Article; IF = 4,718

- III CHOVANCOVA, Zita*(corresponding author)*, Pavlina KRALICKOVA, Alena PEJHALOVA, Marketa BLOOMFIELD, Jana NECHVATALOVA, Marcela VLKOVA a Jiri LITZMAN. **Selective IgM Deficiency: Clinical and Laboratory Features of 17 Patients and a Review of the Literature.** Journal of Clinical Immunology [online]. 2017, 37(6), 559–574. ISSN 0271-9142. Dostupné z: doi:10.1007/s10875-017-0420-8

Document Type: Review; IF = 4,227

- IV CHOVANCOVA, Zita*(corresponding author)*, Milan KUMAN, Marcela VLKOVA a Jiri LITZMAN. Successful renal transplantation in a patient with a Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene mutation. Transplant International [online]. 2015, 28(8), 1005–1009. ISSN 0934-0874. Dostupné z: doi:10.1111/tri.12583

Document Type: Article; IF = 2,835

- V CHOVANCOVÁ, Z.*(corresponding author)*, P. FILIPENSKÝ, S. ROTNÁGLOVÁ, I. STANICZKOVÁ ZAMBO, T. SHATOKHINA, K. NOVOSÁDOVÁ a J. LITZMAN. **IgG4 immunoglobulin subclass and related pathological conditions or how to effectively imitate cancer disease.** Klinická Onkologie [online]. 2022, 35(1), 20–31. Dostupné z: doi:10.48095/ccko202220

Document type: Article

- VI LITZMAN, J., T. FREIBERGER, B. GRIMBACHER, B. GATHMANN, U. SALZER, T. PAVLIK, J. VLCEK, V. POSTRANECKA, Z. TRAVNICKOVA a V. THON. **Mannose-binding lectin gene polymorphic variants predispose to the development of bronchopulmonary complications but have no influence on other clinical and laboratory symptoms or signs of common variable immunodeficiency.** *Clinical and Experimental Immunology* [online]. 2008, 153(3), 324–330. ISSN 0009-9104. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03700.x

Document Type: Article; IF = 2,853

- VII LITZMAN, Jiri, Zita CHOVANCOVA, Petr BEJDAK, Marek LITZMAN, Zdenek HEL a Marcela VLKOVA. **Common variable immunodeficiency patients display elevated plasma levels of granulocyte activation markers elastase and myeloperoxidase.** *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* [online]. 2019, 33, 2058738419843381. ISSN 0394-6320. Dostupné z: doi:10.1177/2058738419843381

Document Type: Article; IF = 2,209

- VIII VLKOVA Marcela, Zita CHOVANCOVA, Jana NECHVATALOVA, Ashley Nicole CONNELLY, Marcus Darrell DAVIS, Peter SLANINA, Lucie TRAVNICKOVA, Marek LITZMAN, Tereza GRYSOVA, Premysl SOUCEK, Tomas FREIBERGER, Jiri LITZMAN a Zdenek HEL. **Neutrophil and Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Mediated T Cell Suppression Significantly Contributes to Immune Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency Disorders.** *Journal of Immunology* [online]. 2019, 202(1), 93–104. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1800102

Document Type: Article; IF = 4,886

- IX CHOVANCOVA, Zita, Marcela VLKOVA, Jiri LITZMAN, Jindrich LOKAJ a Vojtech THON. **Antibody forming cells and plasmablasts in peripheral blood in CVID patients after vaccination.** *Vaccine* [online]. 2011, 29(24), 4142–4150. ISSN 0264-410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2011.03.087

Document Type: Article; IF = 3,766



Annex I

PONSFORD, Mark J., Adam KLOCPERK, Federica PULVIRENTI, Virgil A. S. H. DALM, Tomas MILOTA, Francesco CINETTO, Zita CHOVANCOVA, Manuel J. RIAL, Anna SEDIVA, Jiri LITZMAN, Carlo AGOSTINI, Martin VAN HAGEN, Isabella QUINTI a Stephen JOLLES. **Hyper-IgE in the allergy clinic-when is it primary immunodeficiency?** Allergy [online]. 2018, 73(11), 2122–2136. ISSN 0105-4538. Dostupné z: doi:10.1111/all.13578

Document Type: Review; IF = 6,771

REVIEW ARTICLE

Hyper-IgE in the allergy clinic—when is it primary immunodeficiency?

Mark J. Ponsford¹  | Adam Klocperk² | Federica Pulvirenti³ | Virgil A. S. H. Dalm⁴ | Tomas Milota²  | Francesco Cinetto⁵ | Zita Chovancova^{6,7} | Manuel J. Rial⁸ | Anna Sediva² | Jiri Litzman^{6,7} | Carlo Agostini⁵ | Martin van Hagen⁴ | Isabella Quinti³ | Stephen Jolles¹

¹Immunodeficiency Centre for Wales, Cardiff, UK

²Department of Immunology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

³Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

⁴Department of Internal Medicine, Division of Clinical Immunology and Department of Immunology, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands

⁵Department of Medicine, Treviso Hospital, University of Padova, Padova, Italy

⁶Department of Clinical Immunology and Allergology, St. Anne's University Hospital in Brno, Czech Republic

⁷Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁸Department of Allergy, University Hospital Jiménez Díaz Foundation, Madrid, Spain

Correspondence

Mark J. Ponsford, Immunodeficiency Centre for Wales, Cardiff, UK.
Email: ponsfordm@cardiff.ac.uk

Funding information

European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI)

Abstract

The 2017 International Union of Immunological Societies (IUIS) classification recognizes 3 hyper-IgE syndromes (HIES), including the prototypic Job's syndrome (autosomal dominant STAT3-loss of function) and autosomal recessive PGM3 and SPINK5 syndromes. Early diagnosis of PID can direct life-saving or transformational interventions; however, it remains challenging owing to the rarity of these conditions. This can result in diagnostic delay and worsen prognosis. Within increasing access to “clinical-exome” testing, clinicians need to be aware of the implication and rationale for genetic testing, including the benefits and limitations of current therapies. Extreme elevation of serum IgE has been associated with a growing number of PID syndromes including the novel CARD11 and ZNF341 deficiencies. Variable elevations in IgE are associated with defects in innate, humoral, cellular and combined immunodeficiency syndromes. Barrier compromise can closely phenocopy these conditions. The aim of this article was to update readers on recent developments at this important interface between allergy and immunodeficiency, highlighting key clinical scenarios which should draw attention to possible immunodeficiency associated with extreme elevation of IgE, and outline initial laboratory assessment and management.

1 | RATIONALE AND SEARCH STRATEGY

Half a century has passed since IgE was recognized as the circulating factor responsible for triggering allergic reactions.¹ Its discovery was hampered by its extremely low plasma concentrations, several logarithms lower than other immunoglobulin classes.² A similar challenge exists for the clinician and patient in diagnosing primary immune deficiency, where rarity mandates “*To diagnose PID, you must first think of PID*”.

The adult range for total serum IgE is typically cited as below 100–140 IU/mL,^{2,3} but varies with age⁴ and ethnicity.⁵ Extreme

elevation of IgE levels ten times the upper limit of normal has been used to define the prototypic hyper-IgE syndrome (HIES). Job's syndrome is a triad of elevated IgE, recurrent skin boils and cyst-forming lung infections.⁶ The NIH-scoring system⁷ has been modified and validated² to aid recognition and diagnosis of this autosomal dominant condition; however, it has limited relevance to other PID-associated conditions with extreme elevation of IgE. These include severe combined immunodeficiency (SCID) and other defects in T-cell development, where early recognition is life-saving. There is a wide differential diagnosis for elevated IgE (Table 1). Following a

recent article highlighting medical diagnoses associated with elevated IgE over 1000 IU/mL in a tertiary referral hospital, where the prevalence of primary immunodeficiency was <1%,⁸ we set out to identify distinctive clinical features where pretest probability is sufficient to “think of PID”.

We searched OVID MEDLINE for reports in English available up to 13-2-18 for conditions where IgE values exceeded 1000 IU/mL, in line with the value used within the hyper-IgE-syndrome-screening tool developed by Woellner et al,² using the search terms “primary immune/immunodeficiency,” “PID,” and “hyper OR elevated,” and “IgE” or “Immunoglobulin E” to identify PID syndromes and associated clinical conditions associated with IgE > 1000 IU/mL (Tables 1 and 2). Following expert panel review, we identified five key scenarios which should raise suspicion of rare disease, initial strategies to facilitate safe diagnosis, and management. Scenarios I-IV highlight presentations which should trigger consideration of primary immunodeficiency. Appreciation of allergy as a manifestation of immunodysregulation should also trigger consideration of specialist allergology input for these patients and scenario V considers the relative burden of allergy associated with different disorders. Together these observations provide valuable insights into the pathogenesis of atopy and allergy and serve as a reminder that the finding of an extremely elevated serum IgE remains relevant. Common themes include defects in T-cell receptor signalling, autoimmunity and overlap with connective tissue disease. This can be viewed in addition to well-known warning signs of PID, such as family history of severe recurrent infections, consanguinity or unexplained death.⁹

2 | I: NEONATAL ERYTHRODERMA

Erythroderma is a medical emergency defined as inflammatory skin disorder affecting more than 90% of the body surface.¹⁰ Although uncommon in children, erythroderma may be the clinical presentation of a wide range of acquired and inherited diseases, including infections, inflammatory skin diseases, inborn errors of metabolism, ichthyoses, drug hypersensitivity reactions and congenital immunodeficiencies. Onset within the first month of life often heralds an underlying monogenetic cause.¹¹ Rapid diagnostic assessment in

parallel with supportive measures is vital to differentiate infective or iatrogenic causes (e.g drug related), and direct appropriate treatment. Skin biopsy with H&E and immunohistochemistry are invaluable in differentiating the underlying cause,¹⁰ enabling nature of dermal inflammatory infiltrate to be determined alongside characteristic epidermal changes. Typical features may not develop until after 6 weeks of age.¹² In this setting, demonstration of exaggerated total IgE alongside eosinophilia can help narrow the differential diagnosis (Figure 1) and should prompt consideration of atypical presentations of severe combined immunodeficiency (SCID) with Omenn syndrome. This is characterized by early-onset diffuse exudative erythroderma, alopecia, lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, chronic persistent diarrhoea, failure to thrive with hypereosinophilia and serum IgE levels reported in excess of 10 000 IU/mL.¹³ Omenn syndrome was first described in association with hypomorphic mutations in RAG1 and RAG2; however, mutations in other SCID genes are now recognized. ADA-SCID appears particularly associated with elevated IgE levels.¹⁴ Bone marrow transplantation in this setting is a medical emergency and is life-saving.

An Omenn-like syndrome can also be the first manifestation of complete DiGeorge syndrome and may be accompanied by hypocalcaemic tetany, cardiac and palatal defects. Thoracic imaging may demonstrate thymic absence. Complete DiGeorge syndrome represents 1.5% of patients with 22q11 deletions and may present with an Omenn-like syndrome. Thymic transplant is successful in restoring peripheral lymphocyte function, but immunosuppression may be required to prevent graft rejection and post-transplant autoimmunity.¹⁵

Barrier defects also manifest with severe early onset of cutaneous features in association with failure to thrive, infection and extreme elevation of serum IgE. The commonest keratinization disorder, ichthyosis vulgaris, is caused by loss-of-function mutations in filaggrin (FLG). Null mutations are now recognized as the most common genetic risk factor for development of atopic sensitization; however, their penetrance is incomplete.¹⁶ Comèl-Netherton syndrome (CNS) is a distinctive congenital ichthyosis syndrome, caused by highly penetrant autosomal recessive mutations in the serine protease inhibitor gene Kazal-type 5 (SPINK5) which plays a central role in preserving skin barrier integrity. The initial presentation of CNS is

TABLE 1 Differential diagnosis of elevated IgE

Disease Group	Examples
Atopic disease	Atopic dermatitis, allergic asthma, allergic rhinitis/conjunctivitis
Parasitic infection	Helminths (e.g Ascaris, Enterobius, Schistosoma, Strongyloides)
Viral infection	Human immunodeficiency virus (HIV)
Malignancy	Hodgkin and Non-Hodgkin lymphoma, Sézary disease, IgE multiple myeloma
Lung diseases	Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), Chronic eosinophilic pneumonia
Primary immunodeficiencies	IUIS recognized hyper-IgE syndromes <ul style="list-style-type: none"> • Autosomal dominant loss-of-function STAT3 • Autosomal recessive PGM3 deficiency • Autosomal recessive SPINK5 deficiency See Table 2

TABLE 2 PID conditions associated with serum IgE > 1000 IU/mL

PID defect associated with IgE > 1000 IU/mL		Section							
Altered process	Genetic defect	Functional defect	Inheritance	I: Erythroderma	II: Infantile eczema and recurrent infections	III: Syndromic features	IV: Autoimmunity	V: Allergy	
Barrier-defect	SPINK5	Defective epidermal LEKTI protein ¹⁸	AR	Erythroderma/Omenn-like syndrome	Severe dermatitis	-	-	Prominent	
	"Comel-Netherton Syndrome"				Predominantly cutaneous infection				
	TRPV3	Thermosensitive cation nonselective channel in skin and immune cells ²¹	AD/AR						
	DSG1 "SAM syndrome"	Loss of desmoglein compromises epidermal integrity and barrier function ²²	AR						
	FLG	Loss of filaggrin compromises epidermal integrity and barrier function ¹⁶	AR						
	CDSN	Loss of corneodesmosin compromises epidermal integrity and barrier function ¹⁰³	AR						
Restricted T-cell repertoire ^a 13,14	ADA deficiency	Elevated lymphotoxic metabolites	AR	Erythroderma/Omenn-like syndrome	Opportunistic infections (bacterial, viral, fungal)	Syndromic features may be present (e.g. 22q11ds)	Variable	Variable	
	CHD7	Chromatin organization defects	AR						
	DNA Ligase IV	Double strand break repair	AR						
	IL-2R γ	Defective in common γ -chain of multiple cytokine pathways (IL-2/4/7/9/15)	XL						
	IL-7R α	Defect in IL-7 cytokine signalling	AR						
	RAG1/2	T- and B-cell receptor generation abnormality	AR						
	ZAP70	TCR transduction signalling defect	AR						
	Atypical 22q11 deletion syndrome	Complete athymia with DiGeorge Syndrome ¹⁵	AD						
	WAS	Regulates Arp1/2 complex ⁷²	XL		Early-onset eczema	Severe eczema with opportunistic infections	(Thrombocytopenia)	Prominent (see Table 3)	Prominent
	Impaired TCR signalling and cytoskeletal remodelling ^a	DOCK8 deficiency	Regulates cdc42 and WASp activation ^{46,50}	AR					
ARPC1B deficiency		Component of Arp2/3 complex required for f-actin polymerization ⁴²	AR						

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

PID defect associated with IgE > 1000 IU/mL		Section						
Altered process	Genetic defect	Functional defect	Inheritance	I: Erythroderma	II: Infantile eczema and recurrent infections	III: Syndromic features	IV: Autoimmunity	V: Allergy
	MALT1	Scaffold in CBM signalosome with paracaspase activity ⁵¹	AR	Early-onset rash	Persistent dermatitis Cutaneous and pulmonary infections	Low impact fractures	Inflammatory gastrointestinal disease	-
	CARD11 (hypomorphic)	Defective activation of NF- κ B and mTORC1 kinase pathways ⁵⁰	AD	-	Severe atopic dermatitis Variable infections beyond skin	-	-	Prominent
Defective glycosylation	PGM3	Defective glycosylation ^{37,38}	AR	-	Severe atopic dermatitis	Neurodevelopmental delay	-	-
Cytokine signalling defects ^a	STAT3 "Job's syndrome" ZNF341	Defective STAT3 signalling with disruption of wide range of intracellular pathways ³² Key upstream regulatory step needed to trigger the normal induction of the Th17 differentiation pathway ^{34,35}	AD AR	Early-onset rash	Distinctive dermatitis pattern Staphylococcal abscesses Pneumatoceles	Distinctive facial, vascular, & skeletal features	-	Increased
	TGF- β /RSMAD "Loeys-Dietz Syndrome" ERBIN	Deregulated TGF- β signalling with increased regulatory T cells and total FOXP3 expression ^{62,63}	AD	-	Dermatitis common Infection not prominent	Similar to STAT3	-	Increased
	STAT5b ^{GOF}	Somatic mutation driving nonclonal eosinophilia ⁵⁸	Somatic	-	Early-onset urticaria, dermatitis Variable infections	-	Alopecia totalis	Variable
	IRAK4 MYD88	Defective IL-1 receptor (IL-1R) and TLR signalling (except TLR3) ⁸⁸	AR	-	Eczema uncommon Recurrent life-threatening bacterial diseases with blunted inflammation	-	-	-
	IL6ST	Encodes gp130, common subunit for IL-6, IL-11, IL-27, and OSM receptor signalling ⁶⁴	AR	-	Eczema Recurrent skin and pulmonary infections	Craniosynostosis Neurodevelopmental delay	-	-
	TYK2	Defective cytokine signalling type I and II cytokines ^{54,55}	AR	-	Recurrent bacterial, viral, and mycobacterial susceptibility	-	-	-
Tolerance failure ^a	FOXP3 "IPEX"	Defective generation of regulatory T cells ⁶⁷	XL	Severe early-onset dermatitis Recurrent severe infections	(Lymphoproliferation)	Prominent (see Table 3)	Variable	-
	FAS/FAS-L, caspases 8 and 10 "ALPS"	Defective apoptosis including rogue germinal centre B-cell maturation ⁷⁰	Usually AR	-	Bacterial infections associated with neutropenia	(Lymphoproliferation)	Prominent (see Table 3)	-

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

PID defect associated with IgE > 1000 IU/mL		Section						
Altered process	Genetic defect	Functional defect	Inheritance	I: Erythroderma	II: Infantile eczema and recurrent infections	III: Syndromic features	IV: Autoimmunity	V: Allergy
Congenital defects of phagocyte	-CYBB- gp91 - NCF1 (p47phox), NCF2 (p67phox), CYBA (p22phox), and NCF4 (p40phox) "CGD"	Defects of nicotinamide dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase components ⁶	XL AR	-	Bacterial and fungal infections (invasive). Atopic dermatitis not prominent.	-	Inflammatory gastrointestinal disease	-
Polygenic disorders	Selective IgA deficiency	Impaired mucosal/barrier defence ⁹²	-	-	Often asymptomatic	-	-	-

"c." denotes presentation is not reported or observed in case reports/series.

^aPathway defects may overlap in practice.

with early-onset generalized rash that develops into severe ichthyosis.¹⁷ Characteristic bamboo hair (*trichorrhexis invaginata*) is often present.¹⁸ CNS presents at the interface of PID, with impaired vaccine responses, particularly to polysaccharide T-cell independent vaccines. Prognosis is poor, with up to 20% mortality at one year. Laboratory testing shows hypoalbuminaemia and electrolyte imbalances due to skin failure, enteropathy, with a resulting failure to thrive. Conventional supportive therapy should include allergy control and skin care (emollients, topical steroids, calcineurin inhibitors, retinoic acid and antibiotics) alongside nutritional and electrolyte support. These can improve but may not normalize skin fully (Figure 2). Assessment of T-dependent and T-independent vaccination responses may support trial of immunoglobulin replacement therapy (IGRT), which has been associated with remarkable clinical benefit.¹⁸ Anti-TNF- α therapy and omalizumab have also been used with benefit in small series in CNS.^{19,20} Recognition of CNS within the IUIS-PID classification of HIES¹⁸ raises the question whether other barrier defects may be associated with immune deficiency. Olmsted syndrome is caused by constitutive activating mutations of TRPV3 and is characterized by mutilating palmoplantar keratoderma, dermal infections, eosinophilia and gross elevation of IgE.²¹ Desmoglein-1 deficiency has been recognized as a rare autosomal recessive disorder associated with severe dermatitis, multiple allergies and metabolic wasting (SAM) syndrome. Erythroderma manifests within the first weeks of life and may be complicated by recurrent life-threatening infections, notably respiratory and skin. Food allergy and elevated IgE follow barrier dysfunction and enhanced systemic Th2 response.²²

3 | II: INFANTILE ECZEMA AND RECURRENT INFECTIONS

Eczematous lesions are the second most common cutaneous presentation of PID after infections.²³ Recognition is challenging as atopic dermatitis (AD) affects up to 20% of populations from developed countries, typically manifesting during childhood after 2 months of age.²⁴ Individuals with severe AD often show greatly increased IgE levels and eosinophilia and are at risk of suprainfection with *S. aureus*, *Herpes simplex* or *Molluscum contagiosum*.²⁵ Detailed exploration of the timing and nature of dermatitis can be informative. In a case series of patients with clinical diagnoses of HIES, 8 of 43 were born with a rash; 81% had developed the rash within the first 35 days of life.²⁶ STAT3-LOF mutations were subsequently confirmed in these patients (personal communication, B Grimbacher).

Patients with severe AD appear highly enriched for underlying PID, with Aghamohammadi et al²⁷ identifying six of 75 patients through a combination of history, clinical and laboratory findings; ideally, molecular confirmation should be performed to support diagnosis (outlined Figure 3). Dermatitis is also a common presenting feature of some autoimmune disorders, such as the immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy X-linked (IPEX) syndrome.²⁸ These observations underline the importance of eliciting a

personal or family history of recurrent infections in patients with dermatitis, as recognition of a PID disorder can provide additional or curative therapeutic options.

The nature of dermatitis can also aid diagnosis. The prototypic hyper-IgE syndrome, Job's syndrome (STAT3 loss of function), is characterized by recurrent staphylococcal skin abscesses, chronic mucocutaneous candidiasis and pneumonia. In addition to early onset, skin findings distinguishing it from atopic dermatitis include distinctive thickened texture of the facial skin, retroauricular fissures, and severe folliculitis of the axillae and groin. Chronic mucocutaneous candidiasis may also be present.²⁶ Although defective neutrophil chemotaxis has been described,²⁹ aspiration of "cold" abscesses often reveals frank pus.³⁰ Analysis of the skin microbiome for patients with STAT3-HIES reveals a distinctive microbiome to healthy individuals, with bacterial and fungal species such as *Clostridium* and *Serratia marcescens*, *Candida*, and *Aspergillus*.²³ The significance of early diagnosis follows recurrent sinopulmonary infections by encapsulated bacteria and *Staphylococcus Aureus* observed within the first year of life. These often lead to pneumatocele formation, creating a focus for subsequent opportunistic pathogens (Figure 4). Early instigation of prophylactic antistaphylococcal and

antifungal agents is recommended to reduce risk of cutaneous and sinopulmonary bacterial infections, alongside topical antiseptics.³¹ Variable specific antibody production is seen, and patients may require immunoglobulin replacement.

The molecular cause of Job's syndrome was elucidated in 2007 as autosomal dominant mutations in STAT3 causing loss of function.³² This is integral for a number of immunological processes including differentiation of IL-17/22 producing Th17 effector T cells, which in humans play a key role in controlling infections due to extracellular fungi.³³ ZNF341 deficiency has recently been identified as an autosomal recessive cause of this phenotype, highlighting a role for this transcription factor in modulating STAT3 nuclear localization and transcription.^{34,35} STAT3 deficiency is amenable to allogeneic haematopoietic transplantation, although longer-term follow-up is required to establish the degree of phenotype reversal given the wider functions regulated by STAT3³⁶—as discussed in section III.

Autosomal recessive phosphoglucomutase 3 (PGM3) deficiency was described in 2015, linking defective glycosylation with multisystem involvement some replicating features of STAT3-HIES.³⁷ Neurological symptoms in early infancy are distinctive additions to an

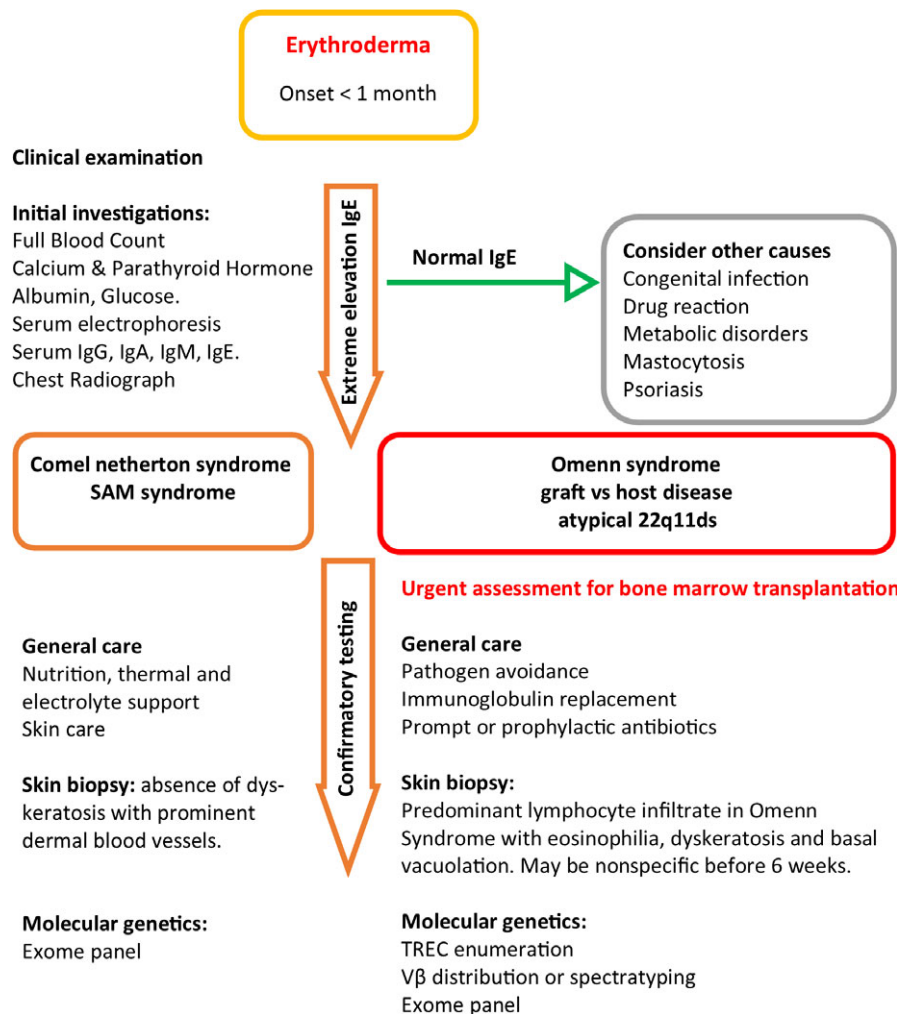


FIGURE 1 Approach to child with erythroderma: considering PID-related differential diagnosis



FIGURE 2 Comel-Netherton syndrome. Photographs obtained by TM with parental consent and subject assent

infective and atopic phenotype. These include developmental delay, psychomotor retardation, hypotonia, ataxia, dysarthria, sensorineural hearing loss and myoclonus. Skeletal abnormalities may resemble those of STAT3-HIES patients.³⁷ Leukocytoclastic vasculitis is a distinguishing feature but is not universally present. Defective glycosylation may also compromise antibody function due to aberrant post-translational modification. PGM3-deficiency patients display susceptibility to bacteria, fungal and viral infections, representing an overlap between STAT3 and DOCK8 (as described below) patterns of infection.³⁸ Pneumatocoeles have been considered pathognomonic for STAT3-HIES; however, they are now recognized to accompany other PIDs including PGM3-deficiency.³⁸

When severe eczema is associated with recurrent viral infections, combined immunodeficiency syndromes should also be considered.³⁹ DOCK8 and WAS protein both play a critical role in the initiation of T-cell receptor-driven actin polymerization and interact via a complex also involving WIP,⁴⁰ integrin regulator *talin*⁴¹ and Arp2/3 complex.⁴² The integrity of the actin cytoskeleton is important for T-cell migration into tissues, defence against pathogens, with defects in epithelial immunosurveillance contributing to viral persistence and increased rates of haematological and dermatological malignancy.⁴³ Weak TCR signalling during T-cell activation has been associated with a skew towards the development of T helper type 2 cells (Th2 cells),⁴⁴ suggesting its status as a default differentiation pathway partly underlying the features of atopy in these patients.

DOCK8 deficiency is inherited in an autosomal recessive fashion, and suspicion should be raised where there is a background of consanguinity. It shares many clinical features with STAT3-HIES, including eosinophilia, staphylococcal skin and respiratory infections. Whilst survival until the sixth decade is common for individuals with STAT3-HIES, median survival in DOCK8 is typically only 20 years despite prophylactic antimicrobials and immunoglobulin replacement.⁴⁵ This places emphasis on early diagnosis to direct potentially curative allogeneic bone marrow transplantation, ideally prior to development of end-organ damage or disability.⁴⁶

WASp deficiency, which results in the X-linked WAS, shares clinical features of viral skin infections, recurrent sinopulmonary infections, eczema, elevated serum IgE levels, food allergies and an increased risk for malignancy and autoimmune diseases. Early suspicion of Wiskott-Aldrich syndrome should be raised by the triad of eczema within the first weeks of life, thrombocytopenia with small platelets (<6 fL) and recurrent infections; however, the complete triad is present in only one-third of cases.⁴⁷ Skewed X-inactivation can result in symptomatic females.⁴⁸ The eczema resembles classical AD, but may be more severe and combined with serosanguinous crusting, petechiae and purpura.⁴⁹ Encapsulated bacteria account for most infective episodes, but *Pneumocystis jirovecii* or disseminated herpes simplex and varicella viral infections are also prominent. Malignancies, typically EBV-positive B-cell lymphoma and leukaemia, are common.⁴⁷ Homozygous defects in a component of the Arp2/3 complex have been described in a child with combined immunodeficiency, mild bleeding tendency, elevated IgE and multiple allergies.⁴²

The recent landmark description of hypomorphic mutations in CARD11 as a novel autosomal dominant cause of hyper-IgE, associated with AD and variable skin and lung infective phenotype, highlights the potential for personalized therapy through molecular diagnosis. CARD11 has also been identified as a risk locus for AD.⁵⁰ The mutation causes a dominant-negative effect, disrupting the CARD11-Bcl2-MALT1 (CBM)-signalosome. Autosomal recessive MALT1 insufficiency associated with chronically elevated IgE is also reported.⁵¹ Exploration of the molecular pathway highlights glutamine signalling via the CBM-mTOR pathway as a key driver to polarization of naïve T cells to a Th1/17 fate⁵²; loss of CARD11 results in a Th2 bias, which can be ameliorated in vitro by glutamine supplementation.⁵⁰

Randomized clinical trials of glutamine supplementations in very low-birthweight infants have demonstrated a reduced incidence of atopic dermatitis in the first year of life.⁵³ Future evaluation of dietary glutamine supplementation in atopic individuals (including with

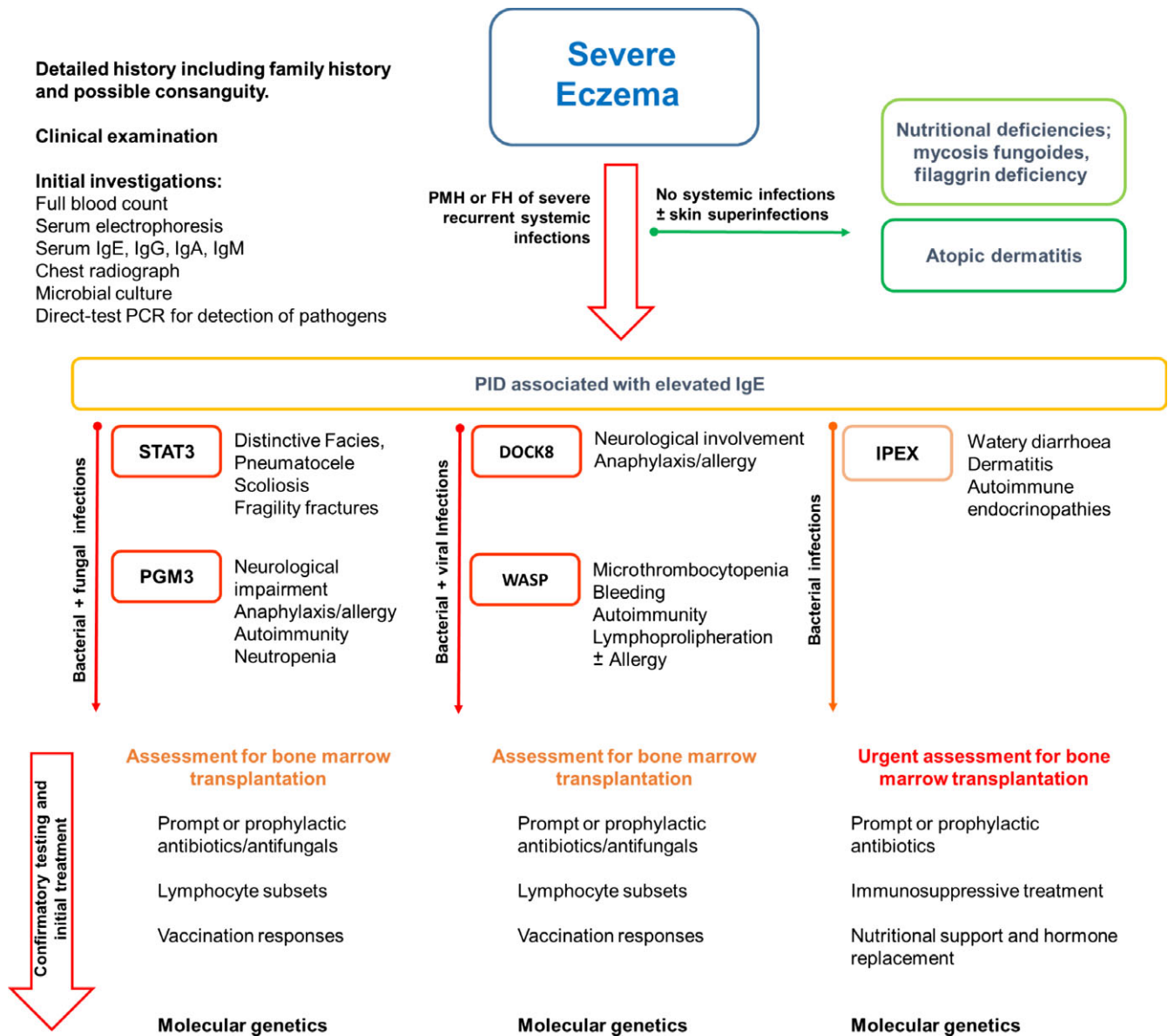


FIGURE 3 Approach to child with severe eczema and possible PID-related diagnosis

CARD11-mutations) is suggested to assess whether this simple dietary manoeuvre can lead to real benefit in vivo.

Among PIDs associated with IgE elevation and eczema in childhood, autosomal recessive mutations in nonreceptor tyrosine kinase 2 (Tyk2) have classically been labelled as a HIES, based on the initial case description of patients who suffered from AD⁵⁴; however, the subsequently identified patients have failed to recapitulate the atopic phenotype.⁵⁵ Similar observations have been made for mammalian sterile 20-like one deficiency, a rare form of combined immunodeficiency, where high IgE levels were found only in three of 10 patients described to date.⁵⁶ Recessive defects in the cytoskeletal regulator CARMIL2 manifest with dermatitis and combined immunodeficiency, but only two of seven patients had IgE >1000 IU/mL.⁵⁷ A novel somatic STAT5b gain of function has been associated with nonclonal eosinophilia, atopic

dermatitis, urticaria and diarrhoea in two paediatric patients; however, serum IgE was only elevated in one.⁵⁸ Consequently, it is difficult to separate mechanistic links to incidental background atopy.

4 | III: SYNDROMIC APPEARANCE OR CONNECTIVE TISSUE DISORDER

A hallmark of STAT3-HIES is its multisystem nature, encompassing a range of dental, craniofacial, musculoskeletal and vascular abnormalities that represent nonimmunological complications of the dominant-negative STAT3 mutation,³ (Figure 5). These features may be absent early in life, and their manifestation can have significant implications beyond diagnosis. Minimal trauma fractures

occur in over half of patients; fracture risk is disproportionate to the degree of osteopenia, suggesting conventional measures for improving bone density via inhibition of osteoclastogenesis may be ineffective.⁵⁹ Screening of adult STAT3-deficient patients with multimodal angiography demonstrated arterial abnormalities of peripheral and brain circulations in 84% and coronary arteries in 50%.⁶⁰ These represent a hidden and potentially devastating complication of this disorder and should be considered in the diagnostic assessment of patients.⁶¹

A connective tissue and atopic phenotype with variable elevation of IgE are also observed in Loews-Dietz syndrome (LDS). Here, autosomal dominant mutations in the transforming growth factor β (TGF- β) receptor pathway are associated with a Marfan-like syndrome and familial thoracic aortic aneurysms. Affected individuals have a high prevalence of allergic presentations, including asthma, food allergy, allergic rhinitis, atopic eczema and eosinophilic gastrointestinal disease.⁶² The molecular link between nonimmunological connective tissue phenotypes and allergic diseases has recently been revealed by description of ERBIN deficiency. ERBB2-interacting protein (ERBIN) is integral for STAT3-mediated downregulation of TGF- β signalling. Loss of ERBIN favours regulatory T-cell (T-reg) and Th2 polarization, recapitulating the allergic and connective tissue phenotypes of LDS and STAT3-HIES.⁶³ Homozygous mutation of IL6ST (encoding GP130) has recently been described in a patient presenting with eczema, recurrent infections, bronchiectasis, high IgE, defective B-cell memory. They showed an impaired acute-phase response, as well as skeletal abnormalities including craniosynostosis. GP130 acts as the common subunit for cytokine receptor for multiple cytokines, and deficiency leads to blunting of interleukin 6 (IL-6), IL-11, IL-27 and oncostatin M signalling.⁶⁴ It is intriguing to note case reports of craniosynostosis in association with HIES, prior to description of many of these genes⁶⁵; consequently, the true incidence of these mutations is likely underreported due to their novelty.

5 | IV: AUTOIMMUNITY

The presence of autoimmunity in association with elevated IgE is a hallmark of several primary immunodeficiencies. Principal among these are two dysregulation syndromes: IPEX and ALPS (autoimmune lymphoproliferative syndrome), which serve as paradigms for defects of central and peripheral tolerance. Prevalence of autoimmune complications in these select PIDs is summarized in Table 3, with patients commonly developing multiple autoimmune complications.

First described in 1982 by Powell et al,⁶⁶ IPEX is caused by a defect in the *FOXP3* gene, which is vital for development and function of thymic-committed T-regs. Symptoms appear during the first months of life and are characterized by potentially life-threatening enteropathy presenting as intractable diarrhoea and eczema of variable severity. Patients develop early-onset autoimmune disorders, typically type 1 diabetes, autoimmune thyroiditis or nephritis.⁶⁷

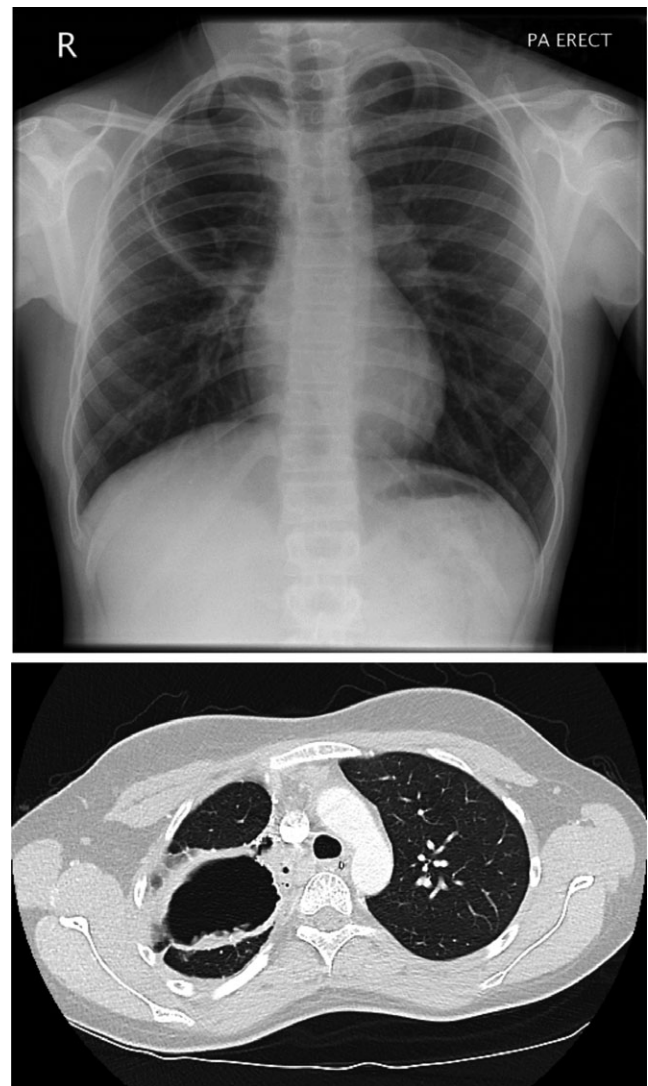


FIGURE 4 Chest radiograph and computed tomography (CT) images of right upper lobe pneumatocele in a STAT3-HIES patient, developing by age 19 following recurrent pneumonias

Aside from elevated IgE, detailed immunological profiling in IPEX demonstrates normal lymphocyte numbers and immunoglobulins, but absent CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ Tregs.⁶⁸ Molecular diagnosis is confirmed by identification of *FOXP3* mutations, although homozygous mutations in *CD25* may phenocopy IPEX.⁶⁹ Treatment relies on immunosuppression as a bridge to HSCT. Gene therapy to produce Treg-like cells from IPEX patient CD4⁺ lymphocytes may hold promise.

ALPS is caused by heritable defects in lymphocyte apoptosis (“including” Fas, Fas-ligand, caspase-8, caspase-10, or undefined), resulting in failure of lymphocyte negative selection leading to the survival of autoreactive T and B cells. Elevated serum IgE levels and eosinophilia are observed in 16%–25% of patients with ALPS, likely caused by antigen-independent maturation of IgE-producing class-switched plasma cells.⁷⁰ Clinically this manifests with chronic nonmalignant lymphadenopathy, splenomegaly and autoimmunity—in particular cytopenias (autoimmune haemolytic anaemia, thrombocytopenia,

Autosomal Dominant STAT3-Loss of Function

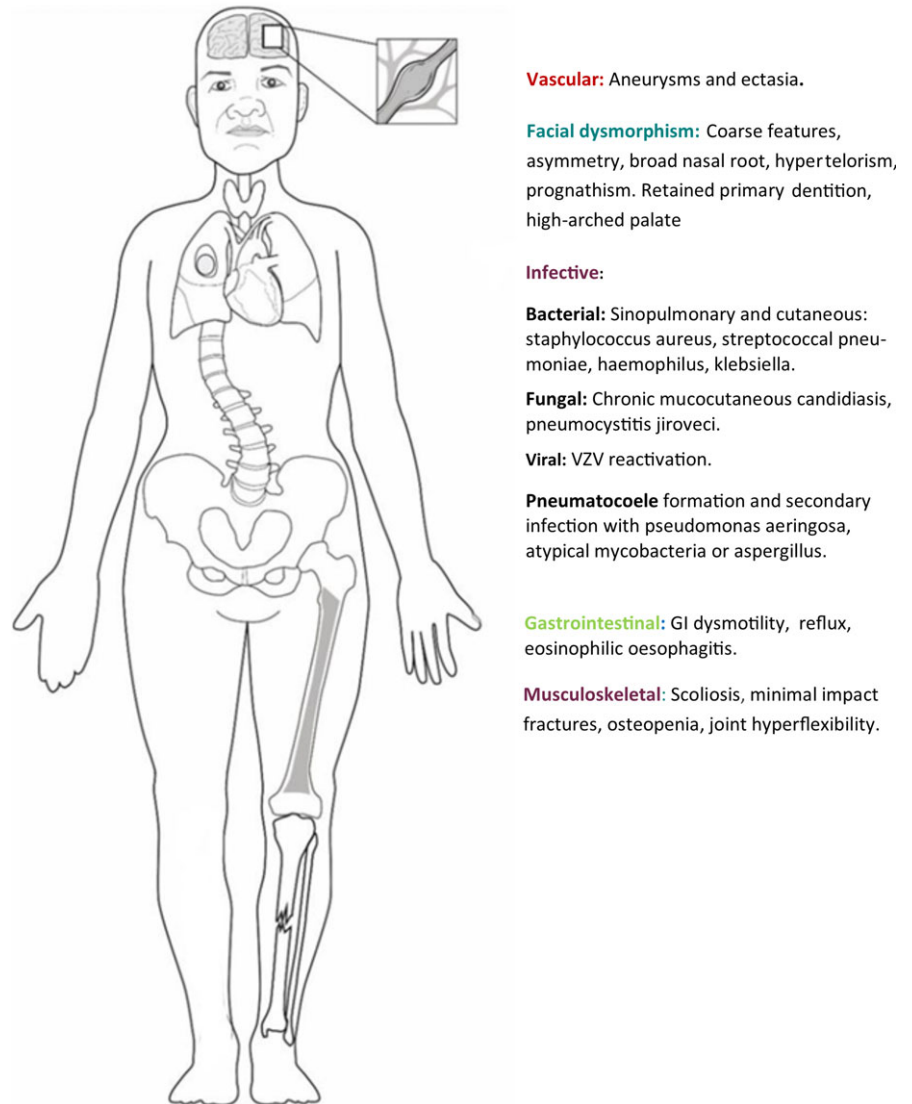


FIGURE 5 Diagram showing syndromic features of AD-HIES. Courtesy of Cardiff University Medical Illustration Department

neutropenia). There is an increased risk of haematologic malignancies, in particular lymphoma.⁷¹ Laboratory findings of an elevated population of double-negative (CD4⁻8⁻) TCR-alpha/beta cells and elevated serum vitamin B₁₂ should alert clinicians to the possibility of ALPS. Treatment options include corticosteroids and high-dose intravenous immunoglobulins, as well as immunosuppressive and immunomodulatory agents, such as rituximab, mycophenolate mofetil, calcineurin inhibitors or sirolimus.

Rates of autoimmune complications are also increased in both WAS and DOCK8, affecting almost 26%-72% of patients WAS^{72,73} and 13% of DOCK8 patients.⁴⁶ Typically this manifests in the form of a vasculitis or an autoimmune haemolytic anaemia (AIHA).⁴⁶ Patients with the milder X-linked thrombocytopenia may also develop autoimmunity over time, notably IgA nephropathy.⁷⁴ Early haematopoietic stem cell transplantation has become the standard of care for children with these disorders. In WAS at least, the level of donor chimerism is a powerful predictor of post-HSCT autoimmunity, malignancy or thrombocytopenia.⁷⁵ This is an important outcome to

consider for future gene therapy trials, where full chimerism may be difficult to achieve.

Conditions including inflammatory bowel disease or discoid lupus may accompany neutrophil function defects such as chronic granulomatous disease (CGD). Case series linking CGD with marked elevations of IgE and sensitization to *Aspergillus* species highlight overlap and possible confusion with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). The use of steroid monotherapy for "ABPA" in undiagnosed HIES or CGD cases has led to invasive disease and mortality.⁷⁶

6 | V: ALLERGIC MANIFESTATIONS OF PID

Elevation of serum total IgE is characteristic but not specific for allergic diseases. Total levels at birth correlate poorly to future allergy⁷⁷; however, elevation in young children is associated with subsequent development of allergen-specific IgE and allergic disease, particularly respiratory.⁷⁸ Misdiagnosis of PID as allergy is well described and may be

complicated by co-occurrence of allergy as a manifestation.⁷⁹ Comparison of sensitization patterns shows marked differences between patients with DOCK8, STAT3 or AD.⁸⁰ Allergic symptoms and skin prick test results correlate well with specific IgE results in DOCK8 and AD patients⁸⁰ and can be useful in directing dietary exclusion.⁸¹ In an international review of 136 cases, over 70% of DOCK8 patients had clinical symptoms of allergy, with food-related anaphylaxis in 16%. Drug allergy, asthma and rhinitis were also observed.⁴⁶ Food allergy in DOCK8-HIES patients can persist even following HSCT despite full donor chimerism.⁸² Multiple allergies are reported in the limited published series of PGM3-HIES,³⁷ whilst WAS patients and murine models frequently develop IgE-mediated reactions to common environmental and food allergens.⁸³

In contrast, STAT3-HIES patients show remarkably similar specific IgE values and skin prick testing to healthy individuals despite extremely high total IgE levels.⁸⁰ The lifetime frequency and severity of food allergies for STAT3-HIES remain higher than reported by healthy controls but is greatly diminished relative to atopic controls with similar IgE.⁸⁴

One explanation for this apparent paradox is the profound impairment of mast cell degranulation associated with STAT3 loss of function.⁸⁴ Physicochemical analysis of the skin barrier in STAT3-HIES and AD individuals suggests an additional explanation: dermal integrity remains remarkably preserved in STAT3-HIES.⁸⁵ In contrast to atopic dermatitis patients, transepidermal water loss (TEWL) and stratum corneum thymic stromal lymphopoietin (TSLP) were equivalent to healthy controls in STAT3-HIES.⁸⁵ This is in line with the observation that topically applied JAK inhibitors ameliorate eczema, acting through suppression of STAT3 signalling to enhance filaggrin expression.⁸⁶ Assessment of TEWL presents a useful bedside tool to risk stratify babies at risk of future atopic dermatitis⁸⁷ and can direct more aggressive supportive therapy.

Discordance between total IgE and allergic symptoms is not exclusive to STAT3-HIES. Mutations within innate-immune signalling pathways including IRAK4 and MyD88 have been described in association with a hyper-IgE like syndrome. In a case series of 48 IRAK4 patients and 12 MyD88 patients, none of these patients were reported to suffer from allergic asthma, whilst chronic eczematous skin disease was reported only in one patient.⁸⁸ However, a variety of allergen-specific IgE are detectable in a subset of patients with MyD88 and IRAK4 deficiencies,⁸⁹ and disruption of effector responses might also contribute. Similarly, despite elevated circulating IgE levels and eosinophilia in a subset of patients with ALPS, the prevalence of allergic diseases does not appear increased.⁷⁰ This subset of patients is noteworthy, however, as they represent a distinct subgroup of ALPS patients with higher mortality from infectious complications.⁹⁰

Allergic diseases may be the first and/or only clinical manifestation of selective IgA deficiency, slgAD. This is the commonest humoral immunodeficiency, with a prevalence in Europeans of roughly 1:600.⁹¹ IgA deficiency is frequently asymptomatic and may be underreported. First identified by Buckley, it can be associated with elevation of serum IgE (range 3-3800 IU/mL).⁹² Diagnosis can only be made after 4th year of life and is defined by undetectable serum IgA levels (<0.07 g/L), normal serum IgG and IgM on at least

TABLE 3 Common autoimmune complications of IPEX, ALPS, DOCK8 and WASP deficiency

Disease	Prevalence
IPEX ⁶⁷	>90%
Autoimmune enteropathy	92%
Type 1 diabetes	49%
Autoimmune cytopenia	31%
Autoimmune thyroiditis	20%
Autoimmune hepatitis	6%
Others: including adrenal insufficiency, pemphigoid, psoriasis, alopecia, nephritis, arthritis	
ALPS ¹⁰⁴	61%
Autoimmune haemolytic anaemia	52%
Autoimmune thrombocytopenia	26%
Autoimmune neutropenia	8%
Vasculitis	4%
Autoimmune hepatitis	3%
Autoimmune nephritis	2%
Other: uveitis, pancreatitis	
WAS deficiency ⁷²	72%
Autoimmune haemolytic anaemia	36%
Autoimmune thrombocytopenia	33%
Autoimmune neutropenia	25%
Skin vasculitis	22%
Intestinal bowel disease	9%
Cerebral vasculitis	7%
Nephritis	4%
DOCK8 deficiency ⁴⁶	13%
Vasculitis	6%
Autoimmune haemolytic anaemia	3.7%
Autoimmune nephritis	0.7%
Others: Systemic lupus erythematosus, arthritis, autoimmune thyroiditis	4.4%

two determinations, normal IgG antibody response to vaccinations, and exclusion of secondary causes of hypogammaglobulinaemia and T-cell defects.⁹³ Up to 50% of slgAD patients are recognized after an allergologic evaluation.⁹⁴ The most common allergic features are conjunctivitis, rhinitis, urticaria, eczema, food allergy and asthma.^{95,96} Patients with IgA deficiency may also present severe anaphylaxis when receiving IgA-containing blood products, possibly due to anti-IgA IgG or IgE antibodies.⁹⁷

7 | DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC OUTLOOKS

The therapeutic approach for many HIES-associated PID following diagnosis is much brighter, reflecting initiation of appropriate antimicrobial therapies, IGRT and consideration of HSCT. Early diagnosis

remains challenging as current diagnostic scoring systems, such as the NIH Score,² are reliant on emergence of sufficient immunological, infective and anatomical features. This signature may not emerge until irreversible damage has occurred. Judicious access to “clinical exomes” promises earlier and clinically impactful diagnosis,⁹⁸ and we highlight 5 clinical settings to trigger consideration of further investigation or referral. The monogenetic PID disorders continue to reveal molecular mechanisms underpinning our understanding of tolerance and immunity. Targeted therapeutic strategies are in development for Comel-Netherton syndrome, including protein replacement, tissue kallikrein inhibitors or using of autologous grafts of genetically corrected patient keratinocytes.⁹⁹ If successful, these promise to reveal whether restoration of barrier function can prevent development of the associated immunodeficiency. Whilst the role of barrier compromise in environmental allergen sensitization is well established, we are now recognizing the additional importance of the microbiota's ability to drive autoimmunity. In murine models of Omenn's syndrome, marked dysbiosis and translocation of gut commensals across the mucosal lining is associated with local inflammation, and systemic autoimmunity. Treatment with oral broad-spectrum antibiotics normalized serum hyper-IgE and ameliorated systemic autoimmunity.¹⁰⁰ Confirmation in human states are required; however, the implications are manifold. The interaction between the microbiota, barrier and mucosal immune system likely represents a modifiable factor contributing to the enteropathy seen in other PIDs associated with immune dysregulation and enteropathy, but potentially also the extreme rise in IgE described with graft-vs-host disease following HSCT.¹⁰¹ Normalization of the microbiota from the skewed populations observed in many HIES-PID may be an important means to optimize therapies and might explain the decline of IgE levels observed in some adults with STAT3-HIES.³ Restoration of epithelial defence is an attractive avenue. Chaperone modulators can ameliorate certain genotypes of cystic fibrosis, and this approach appears suitable for STAT3-HIES.¹⁰² This could be an important adjunct to HSCT, given the wide range of extrahaematological manifestations. Translation of current therapies such as dupilumab, a monoclonal anti-IL-4R α antibody, offers “off the shelf” options. Meanwhile, the potential for a dietary intervention guided by detailed characterization of molecular pathways revealed by CARD11 hints at wider implications for atopy sufferers. International collaborative efforts to standardize reporting, such as the USIDNET and ESID registry, are therefore vital to further characterize the true phenotypes of the expanding range of conditions and long-term outcomes of these emerging therapeutic options. Together this will help raise awareness and improve treatment for not only monogenic PID and may inform molecularly guided treatments for a much wider range of conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the support of the EAACI in providing travel and accommodation support for authors in the process of expert panel review, and support of publication costs.

CONFLICT OF INTEREST

MP has received support for conference and training day attendance from CSL Behring, Shire, Baxter and Biotest. SJ has received advisory board, consulting, meeting attendance, speaker, study, author and project support from CSL Behring, Shire, LFB, Biotest, Binding Site, UCB Pharma, Grifols, Octapharma, SOBI, GSK, Sanofi, BPL, Zarodex, Weatherden and Uptodate. CA reports grants and personal fees from Shire, grants and personal fees from CSL Behring, and personal fees from Octapharma, Roche, Boehringer Ingelheim, outside the submitted work. The remaining authors have no relevant conflict of interest to declare.

ORCID

Mark J. Ponsford  <http://orcid.org/0000-0002-0236-1059>

Tomas Milota  <http://orcid.org/0000-0003-2105-3462>

REFERENCES

- Oettgen HC. Fifty years later: emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:1631-1645.
- Woellner C, Gertz EM, Schaffer AA, et al. Mutations in STAT3 and diagnostic guidelines for hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:424-432.
- Grimbacher B, Holland SM, Gallin JI, et al. Hyper-IgE syndrome with recurrent infections — an autosomal dominant multisystem disorder. *N Engl J Med.* 1999;340:692-702.
- Hamilton RG, Adkinson NF. 23. Clinical laboratory assessment of IgE-dependent hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(2 Supplement 2):S687-S701.
- Litonjua AA, Celedón JC, Hausmann J, et al. Variation in total and specific IgE: effects of ethnicity and socioeconomic status. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:751-757.
- Davis S, Schaller J, Wedgwood R. Job's Syndrome. Recurrent, “cold”, staphylococcal abscesses. *Lancet.* 1966;1(7445):1013-1015.
- Grimbacher B, Schaffer AA, Holland SM, et al. Genetic linkage of hyper-IgE syndrome to chromosome 4. *Am J Hum Genet.* 1999;65:735-744.
- Tay TR, Bosco J, Aumann H, O'Hehir R, Hew M. Elevated total serum immunoglobulin E (>1000 IU/mL): implications? *Intern Med J.* 2016;46:846-849.
- Arkwright PD, Gennery AR. Ten warning signs of primary immunodeficiency: a new paradigm is needed for the 21st century. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1238:7-14.
- Hoeger PH, Harper JI. Neonatal erythroderma: differential diagnosis and management of the “red baby”. *Arch Dis Child.* 1998;79:186-191.
- Dhar S, Banerjee R, Malakar R. Neonatal erythroderma: diagnostic and therapeutic challenges. *Indian J Dermatol.* 2012;57:475-478.
- Scheimberg I, Hoeger P, Harper J, Lake B, Malone M. Omenn's syndrome: differential diagnosis in infants with erythroderma and immunodeficiency. *Pediatr Dev Pathol.* 2001;4:237-245.
- Aleman K, Noordzij J, de Groot R, van Dongen J, Hartwig N. Reviewing Omenn Syndrome. *Eur J Pediatr.* 2001;160:718-725.
- Lawrence MG, Barber JS, Sokolic RA, et al. Elevated IgE and atopy in patients treated for early onset ADA-SCID. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:1444-1446.

15. Davies EG, Cheung M, Gilmour K, et al. Thymus transplantation for complete DiGeorge syndrome: European experience. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:1660-1670.
16. Cabanillas B, Novak N. Atopic dermatitis and filaggrin. *Curr Opin Immunol.* 2016;42:1-8.
17. Comel M. Ichthyosis linearis circumflexa. *Dermatologica.* 1949;98:133-136.
18. Renner ED, Hartl D, Rylaarsdam S, et al. Comèl-Netherton syndrome – defined as primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124:536-543.
19. Fontao L, Laffitte E, Briot A, et al. Infliximab infusions for Netherton Syndrome: sustained clinical improvement correlates with a reduction of thymic stromal lymphopoietin levels in the skin. *J Investig Dermatol.* 2011;131:1947-1950.
20. Yalcin AD. A case of netherton syndrome: successful treatment with omalizumab and pulse prednisolone and its effects on cytokines and immunoglobulin levels. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2016;38:162-166.
21. Danso-Abeam D, Zhang J, Dooley J, et al. Olmsted syndrome: exploration of the immunological phenotype. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:79-79.
22. Samuelov L, Sarig O, Harmon RM, et al. Desmoglein 1 deficiency results in severe dermatitis, multiple allergies and metabolic wasting. *Nat Genet.* 2013;45:1244-1248.
23. Relan M, Lehman HK. Common dermatologic manifestations of primary immune deficiencies. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014;14:480.
24. Weidinger S, Novak N. Atopic dermatitis. *Lancet.* 2016;387:1109-1122.
25. Thijs JL, Strickland I, Bruijnzeel-Koomen CAFM, et al. Moving toward endotypes in atopic dermatitis: identification of patient clusters based on serum biomarker analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:730-737.
26. Eberting CD, Davis J, Puck JM, Holland SM, Turner ML. Dermatitis and the newborn rash of hyper-ige syndrome. *Arch Dermatol.* 2004;140:1119-1125.
27. Aghamohammadi A, Moghaddam ZG, Abolhassani H, et al. Investigation of underlying primary immunodeficiencies in patients with severe atopic dermatitis. *Allergol Immunopathol.* 2014;42:336-341.
28. Wildin R, Smyk-Pearson S, Filipovich A. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet.* 2002;39:537-545.
29. Hill HR, Quie PG, Pabst HF, et al. Defect in neutrophil granulocyte chemotaxis in Job's syndrome of recurrent "cold" staphylococcal abscesses. *Lancet.* 1974;304(7881):617-619.
30. Freeman AF, Holland SM. The hyper IgE syndromes. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2008;28:277-291.
31. Sowerwine KJ, Holland SM, Freeman AF. Hyper-IgE syndrome update. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1250:25-32.
32. Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, et al. STAT3 mutations in the Hyper-IgE Syndrome. *N Engl J Med.* 2007;357:1608-1619.
33. Mogensen TH. STAT3 and the Hyper-IgE syndrome: clinical presentation, genetic origin, pathogenesis, novel findings and remaining uncertainties. *JAK-STAT.* 2013;2:e23435.
34. Béziat V, Li J, Lin J-X, et al. A recessive form of hyper-IgE syndrome by disruption of ZNF341-dependent STAT3 transcription and activity. *Sci Immunol.* 2018;3:pil: eaat4956.
35. Frey-Jakobs S, Hartberger JM, Fliegau M, et al. ZNF341 controls STAT3 expression and thereby immunocompetence. *Sci Immunol.* 2018;3:pil: eaat4941.
36. Dimitrova D, Freeman AF, Holland SM, Gea-Banacloche J, Kanakry CG, Kanakry JA. Allogeneic bone marrow transplantation for STAT3 deficiency. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(3, Supplement): S267-S268.
37. Zhang Y, Yu X, Ichikawa M, Lyons JJ, Datta S, Lamborn IT. Autosomal recessive phosphoglucomutase 3 (PGM3) mutations link glycosylation defects to atopy, immune deficiency, autoimmunity, and neurocognitive impairment. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:1400-1409.
38. Yang L, Fliegau M, Grimbacher B. Hyper-IgE syndromes: reviewing PGM3 deficiency. *Curr Opin Pediatr.* 2014;26:697-703.
39. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, et al. The 2017 IUIS phenotypic classification for primary immunodeficiencies. *J Clin Immunol.* 2018;38:129-143.
40. Janssen E, Tohme M, Hedayat M, et al. A DOCK8-WIP-WASp complex links T cell receptors to the actin cytoskeleton. *J Clin Investig.* 2016;126:3837-3851.
41. Ham H, Guerrier S, Kim J, et al. Deducator of cytokinesis 8 interacts with Talin and Wiskott-Aldrich syndrome protein to regulate NK cell cytotoxicity. *J Immunol.* 2013;190:3661.
42. Kuijpers TW, Tool ATJ, van der Bijl I, et al. Combined immunodeficiency with severe inflammation and allergy caused by ARPC1B deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140:273-277.
43. Biggs CM, Keles S, Chatila TA. DOCK8 deficiency: insights into pathophysiology, clinical features and management. *Clin Immunol.* 2017;181:75-82.
44. Milner JD, Fazilleau N, McHeyzer-Williams M, Paul W. Cutting Edge: lack of high affinity competition for peptide in polyclonal CD4+ responses unmasks IL-4 production. *J Immunol.* 2010;184:6569-6573.
45. Pichard DC, Freeman AF, Cowen EW. Primary immunodeficiency update I: syndromes associated with eczematous dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2015;73:355-364.
46. Aydin SE, Kilic SS, Aytakin C, Kumar A, Porras O, Kainulainen L. DOCK8 deficiency: clinical and immunological phenotype and treatment options—a review of 136 patients. *J Clin Immunol.* 2015;35:189-198.
47. Sullivan KE, Mullen CA, Blaese RM, Winkelstein JA. A multi-institutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr.* 1994;125 (6 Part 1):876-885.
48. Parolini O, Ressmann G, Haas OA, et al. X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. *N Engl J Med.* 1998;338:291-295.
49. Youssef M, Chiu Y. Eczema and urticaria as manifestations of undiagnosed rare disease. *Pediatr Clin North Am.* 2017;64:39-56.
50. Ma CA, Stinson JR, Zhang Y, et al. Germline hypomorphic CARD11 mutations in severe atopic disease. *Nat Genet.* 2017;49:1192-1201.
51. McKinnon ML, Rozmus J, Fung S-Y, et al. Combined immunodeficiency associated with homozygous MALT1 mutations. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133:1458-1462.
52. Nakaya M, Xiao Y, Zhou X, et al. Inflammatory T cell responses rely on amino acid transporter ASCT2 facilitation of glutamine uptake and mTORC1 kinase activation. *Immunity.* 2014;40:692-705.
53. van den Berg A, van Zwol A, Moll H, Fetter W, van Elburg R. Glutamine-enriched enteral nutrition in very low-birth-weight infants: effect on the incidence of allergic and infectious diseases in the first year of life. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007;161:1095-1101.
54. Minegishi Y, Saito M, Morio T, et al. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity.* 2006;25:745-755.
55. Kreins AY, Ciancanelli MJ, Okada S, Kong XF, Ramirez-Alejo N, Kilic SS. Human TYK2 deficiency: mycobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome. *J Exp Med.* 2015;212:1641-1662.
56. Halacli SO, Ayvaz DC, Sun-Tan C, et al. STK4 (MST1) deficiency in two siblings with autoimmune cytopenias: a novel mutation. *Clin Immunol.* 2015;161:316-323.
57. Alazami AM, Al-Helale M, Alhissi S, et al. Novel CARMIL2 mutations in patients with variable clinical dermatitis, infections, and combined immunodeficiency. *Front Immunol.* 2018;9:203.

58. Ma CA, Xi L, Cauff B, et al. Somatic STAT5b gain-of-function mutations in early onset nonclonal eosinophilia, urticaria, dermatitis, and diarrhea. *Blood*. 2017;129:650-653.
59. Sowerwine KJ, Shaw PA, Gu W, et al. Bone density and fractures in autosomal dominant hyper IgE syndrome. *J Clin Immunol*. 2014;34:260-264.
60. Chandesris M-O, Azarine A, Ong K-T, et al. Frequent and widespread vascular abnormalities in human signal transducer and activator of transcription 3 deficiency. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5:25-34.
61. Yavuz H, Chee R. A review on the vascular features of the hyper-immunoglobulin E syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2010;159:238-244.
62. Frischmeyer-Guerrero PA, Guerrero AL, Oswald G, et al. TGF β receptor mutations impose a strong predisposition for human allergic disease. *Sci Transl Med*. 2013;5(195):195ra194.
63. Lyons JJ, Liu Y, Ma CA, et al. ERBIN deficiency links STAT3 and TGF- β pathway defects with atopy in humans. *J Exp Med*. 2017;214:669-680.
64. Schwerd T, Twigg SRF, Aschenbrenner D, et al. A biallelic mutation in IL6ST encoding the GP130 co-receptor causes immunodeficiency and craniosynostosis. *J Exp Med*. 2017;214:2547-2562.
65. Boeck A, Kosan C, Ciznar P, Kunz J. Saethre-Chotzen syndrome and hyper IgE syndrome in a patient with a novel 11 bp deletion of the TWIST gene. *Am J Med Genet Part A*. 2001;104:53-56.
66. Powell BR, Buist NR, Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr*. 1982;100:731-737.
67. Barzaghi F, Passerini L, Bacchetta R. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome: a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity. *Front Immunol*. 2012;3:211.
68. d'Hennezel E, Bin Dhuban K, Torgerson T, Piccirillo C. The immunogenetics of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet*. 2012;49:291-302.
69. Caudy AA, Reddy ST, Chatila T, Atkinson JP, Verbsky JW. CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4+ lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:482-487.
70. Butt D, Chan Tyani D, Bourne K, et al. FAS inactivation releases unconventional germinal center B Cells that escape antigen control and drive IgE and autoantibody production. *Immunity*. 2015;42:890-902.
71. Rao V, Oliveira J. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. 2011;118:5741-5751.
72. Chen N, Zhang Z-Y, Liu D-W, Liu W, Tang X-M, Zhao X-D. The clinical features of autoimmunity in 53 patients with Wiskott-Aldrich syndrome in China: a single-center study. *Eur J Pediatr*. 2015;174:1311-1318.
73. Dupuis-Girod S, Medioni J, Haddad E, et al. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics*. 2003;111(5 Pt 1):e622-627.
74. Imai K, Morio T, Zhu Y, et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood*. 2004;103:456-464.
75. Moratto D, Giliani S, Bonfim C, et al. Long-term outcome and lineage-specific chimerism in 194 patients with Wiskott-Aldrich syndrome treated by hematopoietic cell transplantation in the period 1980-2009: an international collaborative study. *Blood*. 2011;118:1675-1684.
76. Eppinger TM, Greenberger PA, White DA, Brown AE, Cunningham-Rundles C. Sensitization to *Aspergillus* species in the congenital neutrophil disorders chronic granulomatous disease and hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:1265-1272.
77. Sybilski A, Doboszynska A, Samolinski B. Prediction of atopy in the first year of life using cord blood IgE levels and family history. *Eur J Med Res*. 2009;14:227.
78. Sherrill DL, Stein R, Halonen M, Holberg CJ, Wright A, Martinez FD. Total serum IgE and its association with asthma symptoms and allergic sensitization among children. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:28-36.
79. Melo K, Dantas E, De Moraes-Pinto M, et al. Primary immunodeficiency may be misdiagnosed as cow's milk allergy: seven cases referred to a tertiary pediatric hospital. *ISRN Pediatr*. 2013;2013:6.
80. Boos AC, Hagl B, Schlesinger A, et al. Atopic dermatitis, STAT3-and DOCK8-hyper-IgE syndromes differ in IgE-based sensitization pattern. *Allergy*. 2014;69:943-963.
81. Savova R, Arshinkova M, Houghton J, et al. Clinical case of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked (IPEX) syndrome with severe immune deficiency and late onset of endocrinopathy and enteropathy. *Case Rep Med*. 2014;2014:564926.
82. Happel CS, Stone KD, Freeman AF, et al. Food allergies can persist after myeloablative hematopoietic stem cell transplantation in DOCK8-deficient patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137:1895-1898.
83. Lexmond WS, Goettel JA, Sallis BF, et al. Spontaneous food allergy in Was-/- mice occurs independent of Fc ϵ R1-mediated mast cell activation. *Allergy*. 2017;72:1916-1924.
84. Siegel AM, Stone KD, Cruse G, et al. Diminished allergic disease in patients with STAT3 mutations reveals a role for STAT3 signaling in mast cell degranulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:1388-1396.
85. Mócsai G, Gáspár K, Dajnoki Z, et al. Investigation of skin barrier functions and allergic sensitization in patients with hyper-IgE syndrome. *J Clin Immunol*. 2015;35:681-688.
86. Amano W, Nakajima S, Kunugi H, et al. The Janus kinase inhibitor JTE-052 improves skin barrier function through suppressing signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:667-677.
87. Kelleher M, Dunn-Galvin A, Hourihane JOB, et al. Skin barrier dysfunction measured by transepidermal water loss at 2 days and 2 months predates and predicts atopic dermatitis at 1 year. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135:930-935.
88. Picard C, von Bernuth H, Ghandil P, et al. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine (Baltimore)*. 2010;89:403-425.
89. Lawrence MG. Patterns of allergic sensitization in high IgE syndromes. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015;15:8.
90. Kim YJ, Dale JK, Noel P, Brown MR, Nutman TB, Straus SE. Eosinophilia is associated with a higher mortality rate among patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Hematol*. 2007;82:615-624.
91. Hammarström L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 2000;120:225-231.
92. Buckley RH, Fiscus SA. Serum IgD and IgE concentrations in immunodeficiency diseases. *J Clin Invest*. 1975;55:157-165.
93. ESID. ESID Registry - Working definitions for clinical diagnosis of PID. 2017 April, 25, 2017 Accessed December 1, 2017 <https://esid.org/Working-Parties/Registry-Working-Party/Diagnosis-criteria>
94. Cunningham-Rundles C. Physiology of IgA and IgA deficiency. *J Clin Immunol*. 2001;21:303-309.
95. Jorgensen GH, Gardulf A, Sigurdsson MI, et al. Clinical symptoms in adults with selective IgA deficiency: a case-control study. *J Clin Immunol*. 2013;33:742-747.
96. Urm S-H, Yun HD, Fenta YA, et al. Asthma and risk of selective IgA deficiency or common variable immunodeficiency: a population-based case-control study. *Mayo Clin Proc*. 2013;88:813-821.
97. Burks AW, Sampson HA, Buckley RH. Anaphylactic reactions after gamma globulin administration in patients with hypogammaglobulinemia. *N Engl J Med*. 1986;314:560-564.

98. Rae W, Ward D, Mattocks C, et al. Clinical efficacy of a next-generation sequencing gene panel for primary immunodeficiency diagnostics. *Clin Genet*. 2017;93:647-655.
99. Di W-L, Mellerio J, Bernadis C, et al. Phase I study protocol for ex vivo lentiviral gene therapy for the inherited skin disease, Netherton syndrome. *Hum Gene Ther Clin Dev*. 2013;24:182-190.
100. Rigoni R, Grassi F, Villa A, Cassani B. RAGs and BUGS: an alliance for autoimmunity. *Gut Microbes*. 2016;7:503-511.
101. Ringden O, Persson U, Johansson S, et al. Markedly elevated serum IgE levels following allogeneic and syngeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1983;61:1190-1195.
102. Bocchini CE, Nahmod K, Katsonis P, et al. Protein stabilization improves STAT3 function in autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Blood*. 2016;128:3061-3072.
103. Oji V, Eckl K-M, Aufenvenne K, et al. Loss of corneodesmosin leads to severe skin barrier defect, pruritus, and atopy: unraveling the peeling skin disease. *Am J Hum Genet*. 2010;87:274-281.
104. Neven B, Magerus-Chatinet A, Florkin B, et al. A survey of 90 patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome related to TNFRSF6 mutation. *Blood*. 2011;118:4798-4807.

How to cite this article: Ponsford MJ, Klocperk A, Pulvirenti F, et al. Hyper-IgE in the allergy clinic—when is it primary immunodeficiency? *Allergy*. 2018;73:2122–2136.
<https://doi.org/10.1111/all.13578>

Annex II

NECHVATALOVA, Jana, Sophinus J. W. BARTOL, Zita CHOVANCOVA, Louis BOON, Marcela VLKOVA a Menno C. VAN ZELM. **Absence of Surface IgD Does Not Impair Naive B Cell Homeostasis or Memory B Cell Formation in IGHD Haploinsufficient Humans.** *Journal of Immunology* [online]. 2018, 201(7), 1928–1935. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1800767

Document Type: Article; IF = 4,718



COVID-19 Research Tools

Defeat the SARS-CoV-2 Variants

InvivoGen



Absence of Surface IgD Does Not Impair Naive B Cell Homeostasis or Memory B Cell Formation in *IGHD* Haploinsufficient Humans

This information is current as of June 30, 2022.

Jana Nechvatalova, Sophinus J. W. Bartol, Zita Chovancova, Louis Boon, Marcela Vlkova and Menno C. van Zelm

J Immunol 2018; 201:1928-1935; Prepublished online 24 August 2018;
doi: 10.4049/jimmunol.1800767
<http://www.jimmunol.org/content/201/7/1928>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2018/08/23/jimmunol.1800767.DCSupplemental>

References This article **cites 46 articles**, 27 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/201/7/1928.full#ref-list-1>

Why *The JI*? [Submit online.](#)

- **Rapid Reviews! 30 days*** from submission to initial decision
- **No Triage!** Every submission reviewed by practicing scientists
- **Fast Publication!** 4 weeks from acceptance to publication

**average*

Subscription Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscription>

Permissions Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/alerts>



Absence of Surface IgD Does Not Impair Naive B Cell Homeostasis or Memory B Cell Formation in *IGHD* Haploinsufficient Humans

Jana Nechvatalova,^{*,†} Sophinus J. W. Bartol,[‡] Zita Chovancova,^{*,†} Louis Boon,[§] Marcela Vlkova,^{*,†} and Menno C. van Zelm^{‡,¶}

Surface IgD is coexpressed with IgM on naive mature B cells. Still, the role of surface IgD remains enigmatic even 50 y after its initial discovery. In this study, we examined the *in vivo* role of surface IgD in human B cell homeostasis and Ab responses in four individuals with heterozygous nonsense mutations in *IGHD*. All *IGHD* heterozygous individuals had normal numbers of B cells and serum Igs and did not show signs of immunodeficiency or immune dysregulation. IgD⁺ and IgD⁻ naive mature B cells were present in equal numbers and showed similar immunophenotypes, except for decreased expression of CD79b in the IgD⁻ subset. Furthermore, both IgD⁺ and IgD⁻ naive mature B cells had normal replication histories and similar capacities to differentiate into plasma cells upon *in vitro* stimulation, and Ig class-switched memory B cells showed similar levels of somatic hypermutations. Thus, human B cells lacking IgD expression develop normally and generate immunological memory *in vivo*, suggesting that surface IgD might function more restrictedly in regulating of B cell activation to specific antigenic structures. *The Journal of Immunology*, 2018, 201: 1928–1935.

Surface-expressed Igs are the hallmark of B cells. During precursor development in bone marrow, each developing B cell creates an Ig molecule with unique specificity through genomic reassembly of elements in their Ig loci (1). This results in the expression of a receptor with the IgM isotype, which is crucial for naive B cell survival and activation of the cell in response to a specific Ag (2, 3). In addition to IgM, circulating naive B cells coexpress a receptor with the IgD isotype, resulting from alternative splicing of the exons encoding the variable domain to C δ constant regions encoding exons (4–6). IgM function has been extensively studied, and even though IgD coexpression is highly conserved in jawed vertebrates (7), the biological role of surface IgD remains enigmatic even 50 y after its initial discovery (8, 9).

IgD was first described in 1965 by Rowe et al. (10, 11) as serum Ig prior to the identification of coexpression with IgM on the

surface of B cells (12–15). The IgM isotype is already expressed in progenitor B cells, either with the surrogate L chains as pre-BCR on pre-BII cells, or together with a rearranged Ig L chain on immature B cells as BCR. IgM is first expressed as pre-BCR (μ chain with surrogate L chains) by pre-B cells. IgD expression is first upregulated after migration to the periphery at the transitional B cell stage, and splicing to IgD is critically dependent on Zinc-finger protein ZFP318 (16, 17). In mature naive B cells, the levels of IgD exceed that of IgM and are downregulated after Ag recognition (18, 19).

Surface IgD has been implicated in regulation of tolerance induction or anergy versus Ag responses. Activation of IgD⁻ immature B cells was found to result in tolerance induction or apoptosis, whereas similar Ag doses activated IgD⁺ mature B cells (20). In contrast, Übelhart et al. (21) recently showed using *in vitro* models that the large flexible hinge region of IgD prevents low-valent Ags from triggering downstream signaling and B cell activation. Furthermore, IgD exhibits reduced sensing of endogenous Ags (22). This would suggest that the presence of IgD on mature B cells functions to inhibit responses to potential non-complexed autoantigens. In addition, high levels of IgD expression in comparison with IgM are associated with anergy in both human and mouse B cells (23, 24).

In terms of immune responses, IgM and IgD appear to function very similarly: both activate the same downstream signaling cascades, and both can mediate B cell activation, deletion, or anergy after interaction with specific Ags (25). Furthermore, mouse models that are deficient in IgD or have IgM substituted with IgD have normal generation of B cells and are capable of generating responses to T cell-dependent and independent Ags (26–28). Still, affinity maturation is slightly delayed in the primary immune response of B cells expressing IgD only (26), and it has been suggested in one study that the signal transduction differs qualitatively between IgM and IgD (29). Together, these studies indicate potential roles for surface IgD in B cell homeostasis and immune responses, but its function in B cell *in vivo* immunity remains unclear and prompted us to investigate this *in vivo*.

*Department of Clinical Immunology and Allergology, St. Anne's University Hospital in Brno, 65691 Brno, the Czech Republic; [†]Faculty of Medicine, Masaryk University, 62500 Brno, the Czech Republic; [‡]Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center, 3015CN Rotterdam, the Netherlands; [§]Bioceros, 3584CM Utrecht, the Netherlands; and [¶]Department of Immunology and Pathology, Central Clinical School, Monash University and The Alfred Hospital, Melbourne, Victoria 3004, Australia

ORCID: 0000-0003-0634-005X (J.N.); 0000-0003-2122-7784 (M.V.); 0000-0003-4161-1919 (M.C.v.Z.).

Received for publication June 11, 2018. Accepted for publication July 25, 2018.

This work was supported by Grants 15-28732A and 15-28541A of the Czech Health Research Council and the Lifelong Learning Programme/Erasmus Programme and by a National Health and Medical Research Council Senior Research Fellowship (GNT1117687) to M.C.v.Z.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Menno C. van Zelm, Department of Immunology and Pathology, Central Clinical School, Monash University, Level 6 Burnet Centre, 89 Commercial Road, Melbourne, VIC 3004, Australia. E-mail address: menno.vanzelm@monash.edu

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CDR, complementarity determining region; ENA, extranuclear Ag; GPC, gastric parietal cell; KREC, κ -deleting recombination excision circle; SHM, somatic hypermutation; TPO, thyroid peroxidase.

Copyright © 2018 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/18/\$35.00

In this report, we studied the *in vivo* function of surface IgD on human B cells in four individuals from one family who carried heterozygous germline nonsense mutations in the *IGHD* gene. Detailed clinical, molecular, and cellular analyses of the family were performed and included direct comparison of the B cells expressing the wild type *IGHD* allele and those using the *IGHD* mutant allele.

Materials and Methods

Patients

This family came to our attention when the index patient (IGHD6; Table I) was referred to the Department of Immunology and Allergology of the St. Anne's University Hospital in Brno on the basis of having enlarged inguinal and axillar lymph nodes. Histological examination proved granulomatous mycotic lymphadenitis. Later, he was diagnosed with nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma (clinical stage III A). Five other members of the family (father; mother; and aunt, grandmother, and grandfather from mother's side) underwent extensive immunological examinations after informed consent was obtained and according to the guideline of the local medical ethics committee. They had no clinical manifestation of recurrent infection and/or malignancy. The aunt suffered from celiac disease and Turner syndrome.

Flow cytometric immunophenotyping and purification of B cells from human blood

All peripheral blood samples were obtained with informed consent and according to the guidelines of the Medical Ethics Committee of Erasmus MC and the Institutional Review Board of St. Anne's University Hospital.

Absolute counts of blood CD3⁺ T cells, CD16⁺/56⁺ NK cells, and CD19⁺ B cells were obtained with a diagnostic lyse-no-wash protocol. For detailed 11-color flow cytometry, RBCs were lysed with NH₄Cl prior to incubation of 1 million nucleated cells for 15 min at room temperature in a total volume of 100 μl (Abs listed in Supplemental Table I). After preparation, cells were measured on a four-laser LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences) using standardized settings (30). Data were analyzed with FACSDiva software V8.0 (BD Biosciences).

DNA isolation and *IGHD* mutation analysis

DNA was isolated from post-Ficoll-Paque granulocytes and sorted B cell subsets with the GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich). All eight *IGHD*-encoding exons including splice sites (reference sequence NG_001019) were PCR amplified (Supplemental Table II) from granulocyte DNA and sequenced on an ABI Prism 3130xl fluorescence sequencer (Applied Biosystems).

Sequence analysis of complete *IGH* gene rearrangements

IgD⁺ and IgD⁻ naive mature B cells (CD19⁺IgM⁺CD27⁻CD38^{dim}) were single-cell sorted into 96-well PCR plates containing 4 μl of lysis solution (0.5× PBS containing 10 mM DTT, 8 U of RNasin [Promega], and 0.4 U of 5'-3' RNase Inhibitor [Eppendorf]) and immediately frozen on dry ice. RNA from single cells was reverse-transcribed in the original 96-well plate in 12.5-μl reactions containing 100 U of Superscript III RT (Life Technologies) for 45 min at 42°C using primers in the leader sequence of *IGHV* subgroups and a C_μ reverse primer (31–33).

IgA and IgG transcripts were amplified from the cDNA of post-Ficoll mononuclear cells by using the same *IGHV* subgroup-specific forward primers in combination with a C_α or C_γ consensus reverse primer (32, 34). The usage of V, D, and J genes, as well as the junctional regions was analyzed using the international ImMunoGeneTics information system (<http://www.imgt.org/>) (35). IgG and IgA subclasses were identified using the germline sequence of the *IGH* locus (NG_001019).

Replication history analysis using the κ-deleting recombination excision circles assay

The replication history of sorted IgD⁺ and IgD⁻ transitional (CD19⁺CD27⁻IgM⁺CD38^{hi}) and naive mature (CD19⁺CD27⁻IgM⁺CD38^{dim}) B cell subsets was determined with the κ-deleting recombination excision circles (KREC) assay as described previously (36). Briefly, the amounts of coding and signal joints of the *IGK*-deleting rearrangement were measured by real-time quantitative PCR in DNA from sorted B cell populations on an ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). Signal joints, but not coding joints, are diluted 2-fold with every cell division (36). To measure the number of cell divisions undergone by each population, we calculated the ratio between the number of coding joints and signal joints. The previously

established control cell line U698 DB01 (Invivoscribe) containing one coding and one signal joint per genome was used to correct for minor differences in efficiency of both real-time quantitative PCR assays.

Restriction enzyme-based assay for *IGHD* allele usage

Ig class-switched cells have deleted *IGHD* from the functional *IGH* allele, and only the nonfunctional *IGHD* allele can be amplified by PCR. Because the nonsense mutation in exon 1 of *IGHD* disrupts an MscI restriction site (5'-TGGCCA-3'), exon 1 from *IGHD* was amplified with a FAM-labeled forward primer from the DNA of purified CD19⁺CD38^{dim}IgA⁺ and CD19⁺CD38^{dim}IgG⁺ memory B cells from heterozygous *IGHD*-deficient individuals. The PCR products were digested with MscI (New England Biolabs) and run on the ABI Prism 3130xl. The relative amounts of uncut (mutated) *IGHD* were compared with those in granulocytes that each carry both *IGHD* alleles. An increase in undigested product would suggest more frequent usage of the wild type *IGHD* allele in the Ig class-switched cells. DNA from healthy controls was used as a positive control for complete digestion with MscI.

In vitro plasma cell differentiation of purified naive B cells

IgD⁺ and IgD⁻ naive B cells were purified and cultured with combinations of anti-IgM F(ab')₂, anti-CD40 agonist, CpG ODN2006, and IL-21 as described previously (37, 38). Cells were harvested after a 6-d culture for TaqMan-based quantitative RT-PCR on a StepOnePlus (Applied Biosystems). Target gene expression levels were determined in freshly isolated and cultured cells with intron-spanning primes and fluorogenic probes (Supplemental Table II) and expressed relative to the *ABL* control gene (39). All quantitative RT-PCR reactions were performed in duplicate.

Serology

Using a nephelometric method, we determined the levels of CRP, IgG, IgA, IgM, and IgG subclasses (IMMAGE 800 Immunochemistry System; Beckman Coulter) as well as IgD, IgE, and IgA subclasses (Behring Nephelometer II, Siemens, Marburg, Germany). ELISA was used for the determination of the following specific Abs: anti-extranuclear Ags (ENA; ENA screen; BL Diagnostika GmbH, Mainz, Germany), anti-thyroid peroxidase (anti-TPO), anti-thyroglobulin, anti-tissue transglutaminase IgG and IgA, and rheumatoid factor (all from AESKU.DIAGNOSTICS, Wendelsheim, Germany). Indirect immunofluorescence was used to detect anti-nuclear Abs (HEp-2 kit; Euroimmun, Lübeck, Germany), anti-neutrophil cytoplasmic Abs (granulocytes [EOH]; Euroimmun), anti-gastric parietal cells (anti-GPC), anti-reticulon, and anti-smooth muscle Abs (autoantibodies RL/RK/RS kit; ORGENTEC, Mainz, Germany). Ab titers to common bacterial pathogens were evaluated by serological determination of IgG anti-pneumococcal capsular polysaccharide (23 serotypes), anti-*Haemophilus influenzae*, and anti-tetanus toxoid Ab levels (VaccZyme IgG Enzyme Immunoassay Kit; Binding Site, Birmingham, U.K.).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with the Mann-Whitney *U* test, paired Student *t* test, or χ^2 test as indicated in detail in the figure legends. Any *p* values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Identification of a family with heterozygous nonsense mutations in *IGHD*

As part of the diagnostic workup, blood B cells were studied by flow cytometric immunophenotyping in a patient with nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma (index case; IGH6). Peripheral blood B cells appeared polyclonal with a normal Igκ/Igλ ratio. However, the patient carried an abnormally large population of IgM-expressing B cells that lacked IgD expression (31.2% of B cells; Fig. 1A). These cells were phenotypically diverse, with the majority being CD38^{dim}CD27⁻ (naive) and smaller fractions being either CD38^{hi}CD27⁻ (transitional) or CD38^{dim}CD27⁺ (memory). Because about half of the CD27⁻IgM⁺ naive B cell compartment was IgD⁻, we hypothesized that these cells used an *IGH* allele with a germline mutation in the *IGHD*-encoding exons. To study whether this abnormal population was inborn, blood from the patient's family members was immunophenotyped. The patient's mother, maternal aunt, and grandfather carried an abnormally large fraction of B cells that were IgM⁺IgD⁻CD27⁻, fitting with a monoallelic

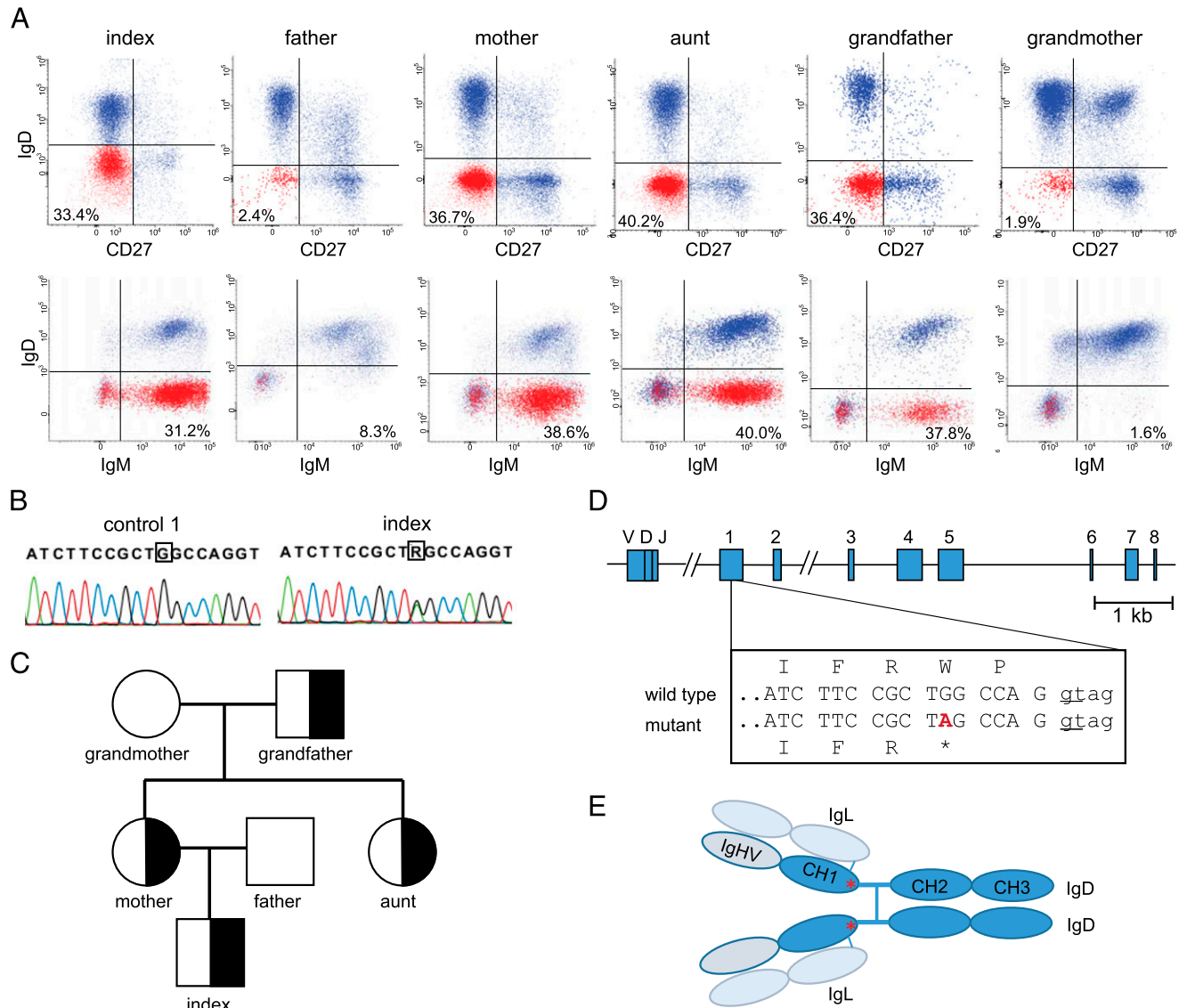


FIGURE 1. Identification of heterozygous IgD deficiency. **(A)** Large fractions of IgM-expressing B cells lack surface IgD in four individuals from one family. Red events denote CD27⁻IgD⁻ B cells; all other CD19⁺ B cell events are indicated in blue. **(B)** Detection of a heterozygous G > A mutation in all four individuals with large IgD-negative B cell populations. **(C)** Family tree. Half-filled symbols denote known carriers of the mutation; squares denote male family members; circles denote female family members. **(D and E)** The c.368G>A mutation in *IGHD* exon 1 results in a premature stop codon (p.W123X) in the first Ig constant domain (denoted by *). The underlined gt represents 3' splice site of exon 1. IgL, Ig L chain.

inheritance. Sequence analysis of the *IGHD* gene revealed that all four affected individuals carried the same heterozygous G to A mutation in exon 1 (Fig. 1B, 1C; Supplemental Fig. 1). This heterozygous c.368G>A mutation results in mutation of a tryptophan (TGG) to a stop codon (TAG). Because the nonsense mutation (p.W123X) is already in exon 1, this allele will not give rise to a functional IgD molecule (Fig. 1D), resulting in the lack of IgD membrane expression in ~50% of naive B cells in all affected individuals. The c.368G>A mutation was not present in the unaffected father and grandmother, or in the healthy control, and has not been reported in Ensembl (current as of August 2018).

Humoral immunity in *IGHD* heterozygous individuals

Extensive clinical and immunological workup was performed on all six included family members. Except for the index patient (Hodgkin lymphoma), only the affected aunt had a history of celiac disease and Turner syndrome. Besides reduced serum IgD, heterozygous *IGHD*-deficient individuals carried mostly normal serum Ig levels (Table I). Specific Ab levels against common

bacterial pathogens were normal in the three *IGHD* carriers that were tested (Table II). Because nationwide vaccination of children against *H. influenzae* B and *Streptococcus pneumoniae* was introduced in the Czech Republic after the year 2000, the positive titers to the latter reflect responses to previous infections. Reactivity analysis to a large panel of 13 autoantigens revealed the presence of anti-TPO autoantibodies in the grandmother, anti-GPC in the mother, and anti-ENA in the father. The grandfather, aunt, and index patient, who are all carriers of the *IGHD* mutation, were negative for all tested autoantibodies.

Flow cytometric analysis revealed normal numbers of blood B cells in all individuals except for the grandfather. This reduction resulted from low numbers in both the naive and memory B cell subsets (Table II). Naive and memory B cells were normally present in the other individuals, except for low numbers of CD27⁺IgM⁺IgD⁺ marginal-zone-like B cells in carriers of the *IGHD* mutation. To study if Ag-experienced B cells showed normal signs of molecular maturation in the *IGHD* mutation carriers, IgA and IgG transcripts were amplified from PBMC without discrimination of origin from

Table I. Basic and immunological characteristics of all family members

	Index (Carrier)	Father	Mother (Carrier)	Aunt (Carrier)	Grandmother	Grandfather (Carrier)	Normal Values
Gender	M	M	F	F	F	M	
Age (y)	21	49	56	63	86	88	
Blood cells (cells/ μ l)							
Lymphocytes	1080	1361	1852	1290	2860 ^a	856	1000–2800
CD3 ⁺ T cells	615.6 ^b	1048.7	1403.7	1007.2	1924.3	623.3 ^b	700–2100
CD4 ⁺ T cells	302.4	698.4	678	472.4	962.2	372.1	300–1400
CD8 ⁺ T cells	270	328.2	662.5	475.4	877.5	228.8	200–900
CD19 ⁺ B cells	172.8	100.1	156.2	111.3	416.3	37.9 ^b	100–500
CD16/CD56 ⁺ NK cells	280.8	179.7	252.3	152.2	460.6	234.4	90–600
Ig serum levels (g/l)							
IgG	7.83	10.4	8.75	9.24	14.8	9.7	7.51–15.6
IgG1	4.64 ^b	5.12	4.89 ^b	3.94 ^b	5.91	6.41	4.9–11.4
IgG2	2.95	4.82	4.12	4.5	8.32 ^a	3.46	1.5–6.4
IgG3	0.225	0.245	0.366	0.421	0.407	0.203	0.2–1.1
IgG4	0.295	1.78 ^a	<0.07 ^b	0.26	1.92 ^a	0.291	0.08–1.4
IgA	1.36	2.62	1.58	2.84	4.86 ^a	1.88	0.82–4.53
IgA1	1.20	2.19	1.27	2.25	3.90 ^a	1.46	0.58–2.63
IgA2	0.317	0.489	0.315	0.767	0.737	0.723	0.12–1.41
IgM	0.385 ^a	1.25	0.931	0.271 ^b	0.413 ^b	0.579	0.46–3.04
IgD (U/ml)	<4.6 ^b	35.7	5.8 ^b	6.7 ^b	35.1	<4.6 ^b	0.19–156 ^c
IgE (IU/ml)	22	48	<17	<17	<17	22	0–100
CRP (mg/l)	3.8	5.05	2.15	2.94	10.6 ^a	3.03	0–8
Autoantibodies	Negative	Anti-ENA ^b	Anti-GPC ^b	Negative	Anti-TPO ^b	Negative	

Only positive tests for autoantibodies are indicated.

^aSupranormal values.

^bSubnormal values.

^cDunnette et al. (44).

CRP, C-reactive protein; F, female; M, male.

the *IGHD* wild type or mutant allele. Sequence analysis revealed the presence of multiple unique clones that nearly all contained somatic hypermutations (SHM). The mutation levels in IgA transcripts were slightly higher, and in IgG transcripts, they were similar to those of unaffected controls (Fig. 2). All IgA and IgG subclasses were present in carriers of the *IGHD* mutation with slightly but significantly reduced fractions of IgA2 and IgG1 in the carriers.

In conclusion, humoral immunity appears to be normal in carriers of the *IGHD* mutation with no overt signs of autoimmunity or immunodeficiency.

Molecular and immunophenotypic characteristics of IgD⁻ naive B cells

In normal human B cell development, IgD expression starts from the transition of immature to mature B cells and coincides with the migration from bone marrow to the periphery (40, 41). To study

whether defective IgD expression affected B cell generation or homeostasis of naive B cells, we first analyzed the frequencies of transitional and naive mature B cells expressing IgD. In unaffected controls, nearly all naive B cells in blood coexpress IgM and IgD (Fig. 3A), whereas in the *IGHD* carriers, only 48.4% of B cells do (Fig. 3A). These equal frequencies of IgD⁺ and IgD⁻ fractions indicate that there is no selective advantage to the presence of IgD in the generation of new B cells (transitional) or homeostasis of naive mature B cells.

Naive B cells express IgM and IgD as alternative splice variants (4). To study the effect of the *IGHD* nonsense mutation on IgM and IgD transcript levels, IgD⁺ and IgD⁻ naive mature B cells were isolated from blood of three *IGHD* heterozygous individuals. As the index patient had started treatment with rituximab, we could not obtain sufficient cells from him. IgM transcripts were equally present between subsets, whereas IgD transcripts were reduced by almost 2-fold in

Table II. Immune response characteristics of all family members

	Index (Carrier)	Father	Mother (Carrier)	Aunt (Carrier)	Grandmother	Grandfather (Carrier)	Normal Values ^a
B cell subsets (cells/ μ l)							
CD38 ^{hi} CD27 ⁻ transitional	24.0	2.5 ^b	5.0	4.1	3.0	1.2 ^b	3–50
CD27 ⁻ IgM ⁺ naive mature	113.7	50.7 ^b	104.2	87.8	230.2	26.4 ^b	57–447
CD27 ⁺ IgD ⁺ IgM ⁺ memory	1.2 ^b	20.5	6.4 ^b	1.9 ^b	12.9	0.7 ^b	9–88
CD27 ⁺ IgM ⁺ IgD ⁻ (IgM only)	1.2	6.6	4.5	1.3	2.5	0.7 ^b	1–33
CD27 ⁺ IgG ⁺ memory	ND	2.8 ^b	8.0	2.0 ^b	25.0	0.9 ^b	5–59
CD27 ⁺ IgA ⁺ memory	ND	7.1	7.9	5.2	30.5	0.8 ^b	2–35
CD27 ⁻ IgG ⁺ memory	ND	0.3 ^b	1.0	0.7 ^b	1.4	0.2 ^b	1–46
CD27 ⁻ IgA ⁺ memory	ND	0.3 ^b	0.6	0.9	1.0	0.2 ^b	0.4–25
CD38 ^{hi} CD27 ^{hi} plasma cells	2.1	0.4 ^b	0.2 ^b	0.3 ^b	1.2	0.1 ^b	1–3
CD21 ^{low} CD38 ^{low}	6.2	2.8 ^b	9.5	2.0 ^b	8.0	4.3	4–11
IgG titers to common bacterial pathogens							
Anti-tetanus (IU/ml)	3.0	ND	0.31	0.20	ND	ND	>0.12
Anti-PCP (mg/l)	32.1	ND	30.0	42.3	ND	ND	>15.4
Anti-HIB (mg/l)	6.5	ND	0.14	0.42	ND	ND	0.09–17.7

^a5–95 percentiles for B cell subsets (45, 46).

^bSubnormal values.

HIB, *H. influenzae* B; PCP, pneumococcal capsular polysaccharide.

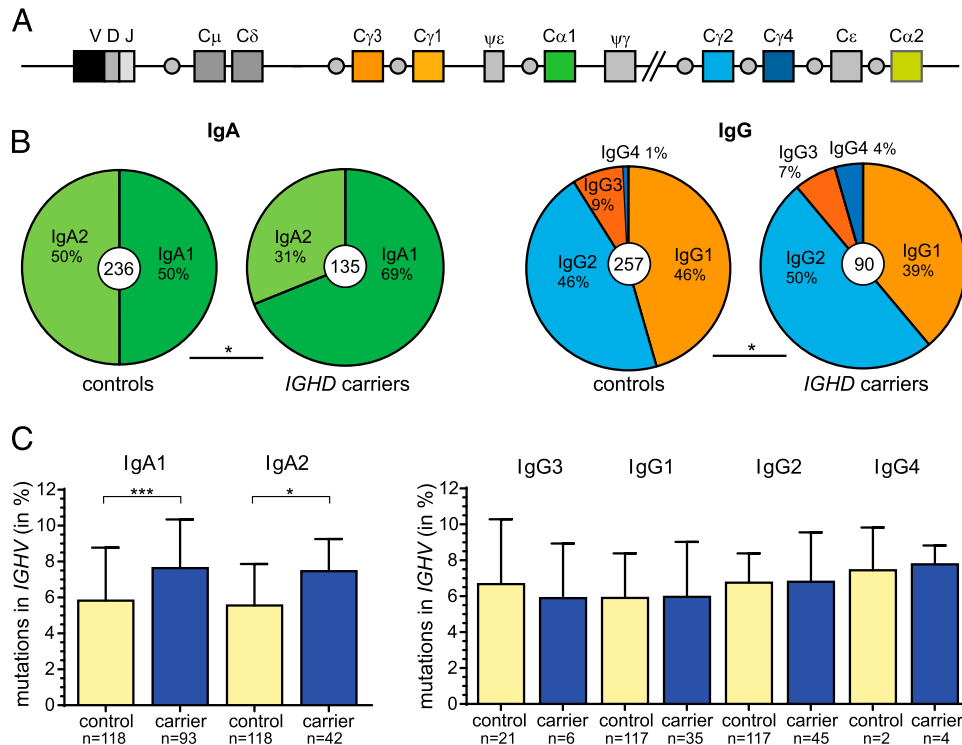


FIGURE 2. Molecular analysis of B cell memory. **(A)** Schematic representation of the Ig constant gene regions in the human *IGH* locus. **(B)** Distribution of IgA and IgG subclass use in switched transcripts of healthy controls ($n = 6$) and *IGHD* carriers ($n = 3$). Total numbers of analyzed sequences are indicated in the center of each plot. Differences in the distributions were statistically analyzed with the χ^2 test. * $p < 0.05$. **(C)** *IGHV* mutation frequencies in distinct IgA and IgG subclasses. Column heights indicate the median values, with error bars showing the interquartile range. Statistical significance was calculated with the Mann-Whitney U test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

IgD⁻ B cells (Fig. 3B). Consequently, IgM surface expression was similar between both subsets (Fig. 3C). Importantly, surface CD79b expression levels were reduced in IgD⁻ B cells. Thus, the *IGHD* nonsense mutation does not seem to affect IgM transcript and protein levels. However, mutant *IGHD* transcript levels were reduced, and the lack of IgD surface expression resulted in a decrease in the total number of B cell receptors on the surface of naive mature B cells.

To further study the homeostasis of naive B cells, DNA was isolated from IgD⁺ and IgD⁻ transitional and naive mature B cells for analysis of their replication history with the KREC assay (36). Similar to unaffected controls, the IgD⁺ and IgD⁻ B cells from *IGHD* heterozygous individuals did not show proliferation of transitional B cells and on average showed up to two cell divisions in naive mature B cells (Fig. 3D). Furthermore, both IgD⁺ and IgD⁻ naive mature B cells showed normal expression of BAFF receptor (BAFF-R) and TACI, and lacked expression of CD95 (Fig. 3E). Finally, complete *IGH* gene rearrangements were sequenced from DNA of purified IgD⁺ and IgD⁻ naive mature B cells to determine the length of complementarity determining region (CDR)3 as a measure for Ig repertoire selection. IgD⁺ and IgD⁻ naive mature B cells showed similar average CDR3 sizes and ranges, and these were not different from those of unrelated controls (Fig. 3F) (42). Thus, the absence of IgD on naive B cells does not affect their phenotype or cell numbers or impair homeostatic proliferation and, consequently, does not impair their generation and homeostasis.

B cell memory and plasma cell differentiation in absence of IgD

The individuals with heterozygous *IGHD* mutations carried Ig class-switched memory B cells. To study whether these were derived equally from IgD-expressing and IgD-deficient naive

B cells, we designed a restriction enzyme assay to discriminate PCR products derived from the wild type or the mutant allele and applied this to genomic DNA that was isolated from purified IgG and IgA memory B cell subsets. These cells have deleted the IgD coding exons from their functionally rearranged *IGH* locus, and any amplified *IGHD* DNA would be derived from the nonfunctional allele. Purified IgA- and IgG-switched B cells from all three carriers tested contained equal numbers of mutated and wild type IgD alleles (Fig. 4A). Thus, in vivo memory B cell formation had occurred equally from IgD⁺ and IgD⁻ naive B cells.

In addition to quantitative analysis of memory B cell formation from IgD⁺ and IgD⁻ naive B cells, we devised a strategy to trace the origin of IgA and IgG transcripts from the *IGHD* wild type or mutant alleles. First, *IGH* transcripts were sequenced from single-sorted IgD⁺ and IgD⁻ naive B cells to identify *IGHV* genes that were polymorphic between the mutant and wild type alleles of three *IGHD* heterozygous individuals (Supplemental Table III). Subsequently, we designated the IgA and IgG transcripts that used these 11 alleles into those derived from *IGHD* wild type and *IGHD* mutant alleles. IgA transcripts from *IGHD* wild type alleles and IgG transcripts from *IGHD* mutant alleles carried higher SHM frequencies than those of controls (Fig. 4B).

Finally, we studied plasma cell differentiation from naive B cells in the presence or absence of IgD. Naive mature B cells from *IGHD* heterozygous individuals were sort-purified and stimulated in vitro with anti-IgM and anti-CD40 agonist or CpG to mimic T cell dependent and T cell independent secondary stimulation. After 6 d of culture, IgD⁺ and IgD⁻ B cells expressed similar levels of activation-induced cytidine deaminase, which was undetectable in unstimulated cells, as well as transcription factors IRF4 and XBPI (Fig. 4C).

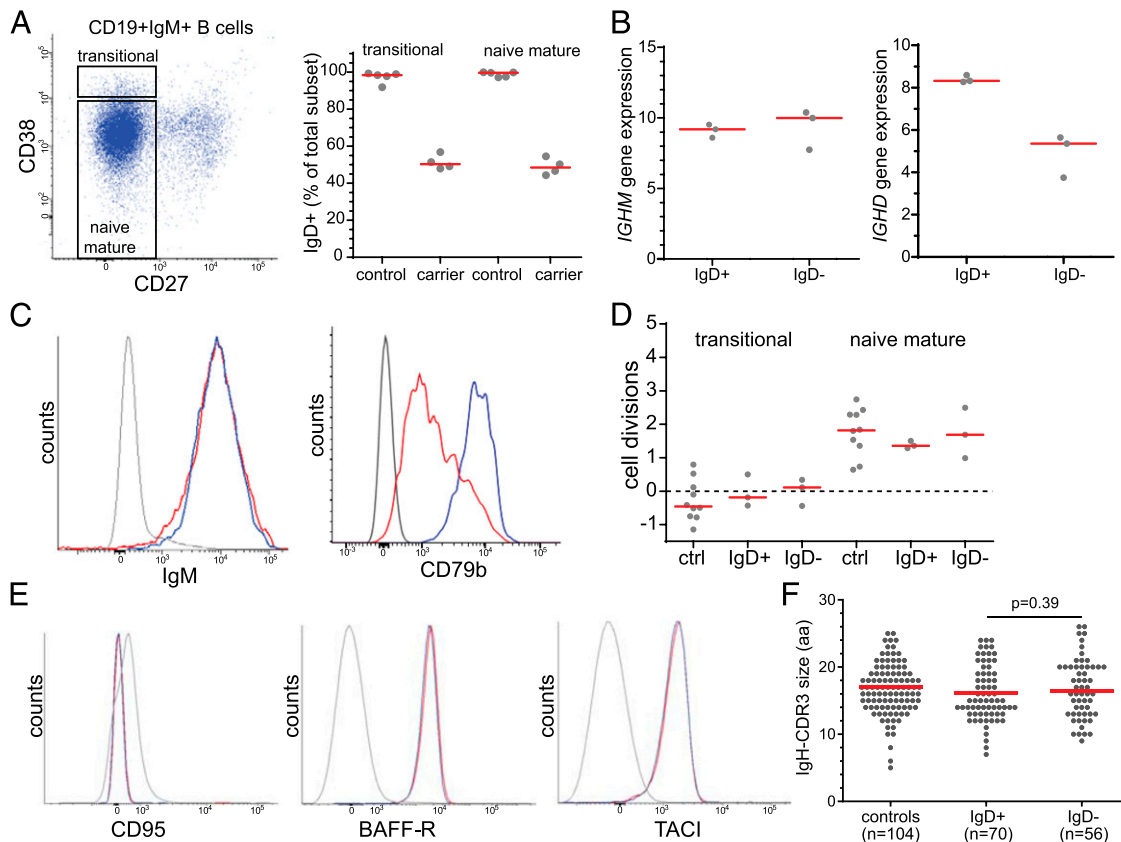


FIGURE 3. Effects of IgD deficiency on naive B cells. **(A)** Frequencies of transitional and naive mature B cells that express IgD in *IGHD* heterozygous individuals and unaffected controls. **(B)** *IGHM* and *IGHD* transcript levels in sort-purified IgD⁺ and IgD⁻ naive mature B cells from *IGHD* heterozygous individuals as determined by TaqMan-based quantitative PCR. **(C)** IgM and CD79b surface expression levels on IgD⁺ (blue lines) and IgD⁻ (red lines) naive mature B cells as determined by flow cytometry. CD3⁺ T cells were used as control (gray lines). **(D)** Replication histories of transitional and naive mature B cells from as determined with the KREC assay (36). Values from control (ctrl) populations were determined previously (43). Differences between IgD⁻ and IgD⁺ cells from *IGHD* heterozygous individuals and those of controls were statistically analyzed with the Mann–Whitney *U* test. **(E)** Surface expression levels of CD95, BAFF-R, and TAC1 on naive B cells as determined by flow cytometry [see (C) for details]. **(F)** IgH-CDR3 lengths derived from nucleotide sequence analysis of unique *IGH* gene rearrangements of purified IgD⁺ and IgD⁻ naive mature B cells of *IGHD* heterozygotes. Data from unrelated controls were generated previously (42). Statistics: Mann–Whitney *U* test. Red lines in (A), (B), (D), and (F) represent median values.

In conclusion, the IgD⁺ and IgD⁻ naive B cell in heterozygous *IGHD*-deficient individuals show equal homeostasis and are similarly capable of differentiation into memory and plasma cells.

Discussion

In this study, we described four members from one family with heterozygous nonsense mutations in *IGHD*. Despite half of their B cells lacking IgD expression and reduced serum IgD levels, these individuals did not display overt clinical or immunological defects, nor did they display defective IgG responses to polysaccharide and protein Ags. Our detailed analysis showed that the lack of functional IgD did not impair B cell generation, homeostasis, or differentiation into memory B cells and plasma cells.

The expression of IgM was not affected in transitional and naive mature B cells that used the IgD mutant allele. As a result, these cells carried fewer surface Ig molecules than IgD-expressing B cells. In the early 1990s, two IgD-deficient mouse models were generated (27, 28). The IgD-deficient B cells in these models showed increased surface IgM levels, resulting in near-normal total surface Ig. Although the lack of compensation by increased IgM in the human IgD-deficient B cells could reflect a difference in species, it is more likely that the difference results from the introduced mutations. IgD transcript levels in B cells from mutant mice were strongly reduced, most likely because of increased splicing of the rearranged VDJ_H exon to the first C_μ coding exon

at the expense of splicing to C_δ (27, 28). This is recapitulated in *zfp318* mutant mice in which the B cells are impaired in the splicing of VDJ_H to *IGHD* and express 3-fold more surface IgM (16). The *IGHD* p.W123X mutation did result in reduced IgD transcript levels. Because this was not compensated by increased IgM transcript, this is likely a postslicing effect of transcript instability due to the premature stop codon.

The expression of surface Ig is crucial for B cell survival. In vivo ablation of surface Ig from mouse B cells was found to result in upregulation of surface Fas (CD95), which rendered these cells susceptible to T cell–mediated killing (2). Although B cell survival can be directly affected by surface Ig levels, we did not find evidence for this in IgD-deficient B cells. Transitional and naive mature B cells in the four *IGHD* heterozygous individuals were equally composed of IgD⁺ and IgD⁻ B cells. Furthermore, neither CD95 expression levels nor the replication histories were increased, thereby excluding compensatory proliferation. Thus, the absence of IgD and the lower levels of surface Ig did not appear to affect in vivo human naive B cell homeostasis. This contrasts with previous observations from mice heterozygous for the previously mentioned *IGHD*-deficient alleles (27, 28), as these carried ~2 times more B cells expressing the wild type IgD allele than B cells expressing the IgD mutant allele. In contrast, *zfp318* null B cells that lack IgD expression have increased surface IgM levels, and these are present in normal numbers in the blood and

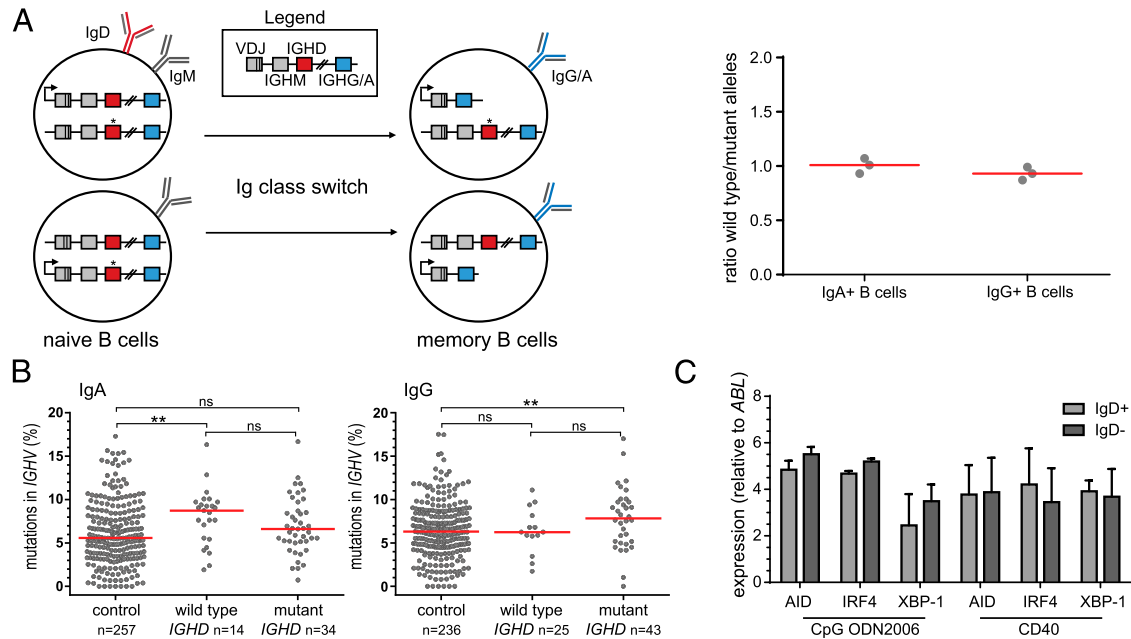


FIGURE 4. Effects of IgD on memory formation and plasma cell differentiation. **(A)** Ratio of IgA- and IgG-expressing memory B cells in *IGHD* heterozygous individuals that are derived from naive B cells using the wild type versus mutant allele, as determined by a restriction enzyme–based assay detecting the other, unswitched, alleles (details in *Materials and Methods*). Dots represent ratio of wild type and mutant (*) allele usage in IgG and IgA memory cells. **(B)** *IGHV* mutation frequencies in transcripts of Ig class-switched B cells from IgD⁺ and IgD⁻ origin. Allelic variants in *IGHV* genes were derived from single-sorted IgD⁺ and IgD⁻ naive B cells (Supplemental Table III). Red lines in (A) and (B) indicate median values. Statistical significance was calculated with the Mann–Whitney *U* test; ***p* < 0.01. **(C)** Gene expression levels of *AID*, *IRF4*, and *XBP1* following 6-d culture of purified IgD⁺ and IgD⁻ naive B cells following stimulation with anti-IgM and CD40 or CpG. Expression was quantified relative to *ABL*. Data are expressed as the mean ± SD.

spleen (16). Still, population of peripheral lymphoid compartments by *zfp318*-deficient B cells has not been tested in a competitive setting with wild type B cells. Thus, it is possible that it is not the absence of IgD but the overexpression of IgM that might impair naive B cell survival in IgD-deficient murine B cells. More recently, mice with an Ile81Lys mutation in *Ighd* have been described. Cells expressing this allele have low levels of surface IgD without altered IgM expression, and these are outcompeted by IgD wild type cells. It remains unclear if low expression of the mutant allele affects any of these processes or if there is a species difference in the role of IgD between human and mouse. Irrespective of this, our studies demonstrate that the lack of surface IgD does not impair homeostasis of naive B cells in humans.

On top of normal naive B cell homeostasis, we did not find evidence of impaired memory B cell or plasma cell formation from IgD-deficient B cells either. IgA and IgG memory B cells were equally derived from naive B cells expressing *IGHD* wild type and mutant alleles and carried similar levels of SHM. Furthermore, IgD⁺ and IgD⁻ naive B cells were equally efficient in differentiation into plasma cells following stimulation with anti-CD40 agonist or CpG. IgD-deficient mice showed mostly normal humoral immunity as well (27, 28). Still, in heterozygous mutant mice, specific IgG1 generated following immunization with a protein Ag was predominantly produced by cells expressing the IgD wild type allele. We were not able to detect IgG variants in the *IGHD* carriers, preventing the analysis of Ag-specific responses of IgD⁺ and IgD⁻ B cells. Possibly, IgD-deficient B cells respond differently to specific types of Ags (e.g., polyvalent Ags [see below]) (21). Still, this will be restricted to a relatively small amount of Ags, as we did not observe selective involvement of IgD wild type alleles in Ag-experienced B cells in vivo.

Structurally, IgD differs mostly from IgM by the presence of a large hinge region. Übelhart et al. (21) recently demonstrated that the hinge region makes IgD nonresponsive to monovalent Ags.

Binding of polyvalent Ags to surface IgD normally activated the cells and did not result in an overresponse. These findings support a function of IgD to limit rather than enhance certain types of responses. This could be important in suppression of responses to autoantigens. However, we did not find evidence of enhanced autoimmunity in our patients. Following testing of 13 types of autoantibodies, only two out of four *IGHD* heterozygous individuals were positive for one each. Hence, loss of surface IgD does not directly lead to overt autoimmunity. However, to establish whether IgD has a function in regulating autoreactivity, more individuals would need to be studied.

The lack of functional impairments in human B cells expressing a defective *IGHD* allele was not expected because surface IgD expression is highly conserved in jawed vertebrates (7). Potentially, IgD affects Ig repertoire selection in developing B cells. As IgD is not expressed in pre-B or immature B cells in bone marrow (41), it potentially only affects peripheral selection from the transitional to the naive mature cell stage (33). We did not find evidence of increased autoreactivity based on IgH-CDR3 lengths. However, more specific changes in the Ig repertoire could be present that have not been picked up by our studies.

If IgD does not confer a general advantage for homeostasis or Ag responses of naive B cells, what would be the function of surface IgD? We were not able to study the complete absence of IgD in vivo, as we did not find an individual with biallelic IgD mutations. Therefore, in all our study subjects, deficits of IgD-deficient B cells to specific Ags could have been obscured by IgD-expressing B cells.

In conclusion, in the absence of surface IgD, human B cells are normally produced and capable of Ag-dependent maturation that is not outcompeted by IgD⁺ B cells as assessed in our assays. Rather than affecting the “wiring” of B cell differentiation and maturation, surface IgD might have a more specific role in modulating responses to Ag based on their structural organization.

Acknowledgments

We are indebted to the support and advice from Drs. J. Litzman (Czech Republic), J.J.M. van Dongen (the Netherlands), and D. Tarlinton (Australia).

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References


- Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302: 575–581.
- Lam, K. P., R. Kühn, and K. Rajewsky. 1997. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90: 1073–1083.
- Pillai, S., A. Cariappa, and S. T. Moran. 2004. Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunol. Rev.* 197: 206–218.
- Kerr, W. G., L. M. Hendershot, and P. D. Burrows. 1991. Regulation of IgM and IgD expression in human B-lineage cells. *J. Immunol.* 146: 3314–3321.
- Maki, R., W. Roeder, A. Trauneker, C. Sidman, M. Wabl, W. Raschke, and S. Tonegawa. 1981. The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell* 24: 353–365.
- Moore, K. W., J. Rogers, T. Hunkapiller, P. Early, C. Nottenburg, I. Weissman, H. Bazin, R. Wall, and L. E. Hood. 1981. Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1800–1804.
- Ohta, Y., and M. Flajnik. 2006. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 10723–10728.
- Geisberger, R., M. Lamers, and G. Achatz. 2006. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* 118: 429–437.
- Gutzeit, C., K. Chen, and A. Cerutti. 2018. The enigmatic function of IgD: some answers at last. *Eur. J. Immunol.* 48: 1101–1113.
- Rowe, D. S., and J. L. Fahey. 1965. A new class of human immunoglobulins. I. A unique myeloma protein. *J. Exp. Med.* 121: 171–184.
- Rowe, D. S., and J. L. Fahey. 1965. A new class of human immunoglobulins. II. Normal serum IgD. *J. Exp. Med.* 121: 185–199.
- Finkelman, F. D., J. A. van Boxel, R. Asofsky, and W. E. Paul. 1976. Cell membrane IgD: demonstration of IgD on human lymphocytes by enzyme-catalyzed iodination and comparison with cell surface Ig of mouse, guinea pig, and rabbit. *J. Immunol.* 116: 1173–1181.
- Rowe, D. S., K. Hug, W. P. Faulk, J. N. McCormick, and H. Gerber. 1973. IgD on the surface of peripheral blood lymphocytes of the human newborn. *Nat. New Biol.* 242: 155–157.
- Rowe, D. S., K. Hug, L. Forni, and B. Pernis. 1973. Immunoglobulin D as a lymphocyte receptor. *J. Exp. Med.* 138: 965–972.
- Van Boxel, J. A., W. E. Paul, W. D. Terry, and I. Green. 1972. Communications. IgD-bearing human lymphocytes. *J. Immunol.* 109: 648–651.
- Enders, A., A. Short, L. A. Miosge, H. Bergmann, Y. Sontani, E. M. Bertram, B. Whittle, B. Balakrishnan, K. Yoshida, G. Sjollem, et al. 2014. Zinc-finger protein ZFP318 is essential for expression of IgD, the alternatively spliced Igh product made by mature B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 4513–4518.
- Pioli, P. D., I. Debnath, J. J. Weis, and J. H. Weis. 2014. Zfp318 regulates IgD expression by abrogating transcription termination within the Ighm/Ighd locus. *J. Immunol.* 193: 2546–2553.
- Havran, W. L., D. L. DiGiusto, and J. C. Cambier. 1984. mIgM:mIgD ratios on B cells: mean mIgD expression exceeds mIgM by 10-fold on most splenic B cells. *J. Immunol.* 132: 1712–1716.
- Yuan, D. 1984. Regulation of IgM and IgD synthesis in B lymphocytes. II. Translational and post-translational events. *J. Immunol.* 132: 1566–1570.
- Carsetti, R., G. Köhler, and M. C. Lamers. 1993. A role for immunoglobulin D: interference with tolerance induction. *Eur. J. Immunol.* 23: 168–178.
- Übelhart, R., E. Hug, M. P. Bach, T. Wossning, M. Dühren-von Minden, A. H. Horn, D. Tsiantoulas, K. Kometani, T. Kurosaki, C. J. Binder, et al. 2015. Responsiveness of B cells is regulated by the hinge region of IgD. *Nat. Immunol.* 16: 534–543.
- Novitski, M., J. L. Mueller, A. Satterthwaite, L. A. Garrett-Sinha, F. Brombacher, and J. Zikherman. 2018. IgM and IgD B cell receptors differentially respond to endogenous antigens and control B cell fate. *Elife* 7: e35074.
- Duty, J. A., P. Szodoray, N. Y. Zheng, K. A. Koelsch, Q. Zhang, M. Swiatkowski, M. Mathias, L. Garman, C. Helms, B. Nakken, et al. 2009. Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J. Exp. Med.* 206: 139–151.
- Quách, T. D., N. Manjarez-Orduño, D. G. Adlowitz, L. Silver, H. Yang, C. Wei, E. C. Milner, and I. Sanz. 2011. Anergic responses characterize a large fraction of human autoreactive naive B cells expressing low levels of surface IgM. *J. Immunol.* 186: 4640–4648.
- Brink, R., C. C. Goodnow, J. Crosbie, E. Adams, J. Eris, D. Y. Mason, S. B. Hartley, and A. Basten. 1992. Immunoglobulin M and D antigen receptors are both capable of mediating B lymphocyte activation, deletion, or anergy after interaction with specific antigen. *J. Exp. Med.* 176: 991–1005.
- Lutz, C., B. Ledermann, M. H. Kosco-Vilbois, A. F. Ochsenbein, R. M. Zinkernagel, G. Köhler, and F. Brombacher. 1998. IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells. *Nature* 393: 797–801.
- Nitschke, L., M. H. Kosco, G. Köhler, and M. C. Lamers. 1993. Immunoglobulin D-deficient mice can mount normal immune responses to thymus-independent and -dependent antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1887–1891.
- Roes, J., and K. Rajewsky. 1993. Immunoglobulin D (IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B cells. *J. Exp. Med.* 177: 45–55.
- Kim, K. M., and M. Reth. 1995. The B cell antigen receptor of class IgD induces a stronger and more prolonged protein tyrosine phosphorylation than that of class IgM. *J. Exp. Med.* 181: 1005–1014.
- Kalina, T., J. Flores-Montero, V. H. van der Velden, M. Martin-Ayuso, S. Böttcher, M. Ritgen, J. Almeida, L. Lhermitte, V. Asnafi, A. Mendonça, et al; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). 2012. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* 26: 1986–2010.
- Meffre, E., A. Schaefer, H. Wardemann, P. Wilson, E. Davis, and M. C. Nussenzweig. 2004. Surrogate light chain expressing human peripheral B cells produce self-reactive antibodies. *J. Exp. Med.* 199: 145–150.
- Tiller, T., E. Meffre, S. Yurasov, M. Tsujii, M. C. Nussenzweig, and H. Wardemann. 2008. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J. Immunol. Methods* 329: 112–124.
- Wardemann, H., S. Yurasov, A. Schaefer, J. W. Young, E. Meffre, and M. C. Nussenzweig. 2003. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301: 1374–1377.
- Berkowska, M. A., J. N. Schickel, C. Grosserichter-Wagener, D. de Ridder, Y. S. Ng, J. J. van Dongen, E. Meffre, and M. C. van Zelm. 2015. Circulating human CD27-IgA+ memory B cells recognize bacteria with polyreactive Igs. *J. Immunol.* 195: 1417–1426.
- Alamyar, E., P. Duroux, M. P. Lefranc, and V. Giudicelli. 2012. IMGT(®) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods Mol. Biol.* 882: 569–604.
- van Zelm, M. C., T. Szczepanski, M. van der Burg, and J. J. van Dongen. 2007. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J. Exp. Med.* 204: 645–655.
- van Zelm, M. C., S. J. Bartol, G. J. Driessen, F. Mascart, I. Reisli, J. L. Franco, B. Wolska-Kusnierz, H. Kanegane, L. Boon, J. J. van Dongen, and M. van der Burg. 2014. Human CD19 and CD40L deficiencies impair antibody selection and differentially affect somatic hypermutation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134: 135–144.
- Verstegen, R. H., G. J. Driessen, S. J. Bartol, C. J. van Noesel, L. Boon, M. van der Burg, J. J. van Dongen, E. de Vries, and M. C. van Zelm. 2014. Defective B-cell memory in patients with down syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134: 1346–1353.e9.
- van Zelm, M. C., J. Smet, B. Adams, F. Mascart, L. Schandené, F. Janssen, A. Ferster, C. C. Kuo, S. Levy, J. J. van Dongen, and M. van der Burg. 2010. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J. Clin. Invest.* 120: 1265–1274.
- Ghia, P., E. ten Boekel, E. Sanz, A. de la Hera, A. Rolink, and F. Melchers. 1996. Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J. Exp. Med.* 184: 2217–2229.
- van Zelm, M. C., M. van der Burg, D. de Ridder, B. H. Barendregt, E. F. de Haas, M. J. Reinders, A. C. Lankester, T. Révész, F. J. Staal, and J. J. van Dongen. 2005. Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. *J. Immunol.* 175: 5912–5922.
- Berkowska, M. A., C. Grosserichter-Wagener, H. J. Adriaansen, D. de Ridder, K. P. Mirani-Oostdijk, H. J. Agteresch, S. Böttcher, A. Orfao, J. J. van Dongen, and M. C. van Zelm. 2014. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis: extensively proliferated CD27+IgM+IgD+ memory B cells with a distinctive immunophenotype. *Leukemia* 28: 1560–1564.
- Berkowska, M. A., G. J. Driessen, V. Bikos, C. Grosserichter-Wagener, K. Stamatopoulos, A. Cerutti, B. He, K. Biermann, J. F. Lange, M. van der Burg, et al. 2011. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 118: 2150–2158.
- Dunnette, S. L., G. J. Gleich, R. D. Miller, and R. A. Kyle. 1977. Measurement of IgD by a double antibody radioimmunoassay: demonstration of an apparent trimodal distribution of IgD levels in normal human sera. *J. Immunol.* 119: 1727–1731.
- Driessen, G. J., V. A. Dalm, P. M. van Hagen, H. A. Grashoff, N. G. Hartwig, A. M. van Rossum, A. Warris, E. de Vries, B. H. Barendregt, I. Pico, et al. 2013. Common variable immunodeficiency and idiopathic primary hypogammaglobulinemia: two different conditions within the same disease spectrum. *Haematologica* 98: 1617–1623.
- Morbach, H., E. M. Eichhorn, J. G. Liese, and H. J. Girschick. 2010. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin. Exp. Immunol.* 162: 271–279.

Annex III

CHOVANCOVA, Zita*(corresponding author)*, Pavlina KRALICKOVA, Alena PEJCHALOVA, Marketa BLOOMFIELD, Jana NECHVATALOVA, Marcela VLKOVA a Jiri LITZMAN. **Selective IgM Deficiency: Clinical and Laboratory Features of 17 Patients and a Review of the Literature.** *Journal of Clinical Immunology* [online]. 2017, 37(6), 559–574. ISSN 0271-9142. Dostupné z: doi:10.1007/s10875-017-0420-8

Document Type: Review; IF = 4,227

Selective IgM Deficiency: Clinical and Laboratory Features of 17 Patients and a Review of the Literature

Zita Chovancova^{1,2}  · Pavlina Kralickova³ · Alena Pejchalova⁴ · Marketa Bloomfield⁵ · Jana Nechvatalova^{1,2} · Marcela Vlkova^{1,2} · Jiri Litzman^{1,2}

Received: 8 March 2017 / Accepted: 6 July 2017 / Published online: 21 July 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract

Purpose Primary selective IgM deficiency (sIgMD) is a primary immunodeficiency with unclear pathogenesis and a low number of published cases.

Methods We reviewed clinical and laboratory manifestations of 17 sIgMD patients. Serum IgM, IgG, and its subclasses, IgA, IgE, antibodies against tetanus toxoid, pneumococcal polysaccharides and *Haemophilus influenzae type b*, isohemagglutinins, and T and B lymphocyte subsets, expressions of IgM on B cells and B lymphocyte production of IgM were compared with previously reported case reports and a small series of patients, which included 81 subjects in total.

Results We found that some patients in our cohort (OC) and published cases (PC) had increased IgE levels (OC 7/15; PC 21/37), decreased IgG4 levels (OC 5/14), very low titers of isohemagglutinins (OC 8/8; PC 18/21), increased transitional B cell counts (OC 8/9), decreased marginal zone B cell counts (OC 8/9), and increased 21^{low} B cell counts (OC 7/9). Compared with the PC (20/20), only two of five OC patients

showed very low or undetectable production of IgM after stimulation. A majority of the patients had normal antibody production to protein and polysaccharide antigens, basic lymphocyte subset counts, and expression of surface IgM molecules on B cells.

Conclusions Low IgM levels are associated with various immunopathological disorders; however, pathogenic mechanisms leading to decreased IgM serum level in selective IgM deficiency remain unclear. Moreover, it is difficult to elucidate how strong these associations are and if these immunopathological conditions are primary or secondary.

Keywords Selective IgM deficiency · primary immunodeficiency · infections · autoimmunity · allergy

Introduction

Immunoglobulin M (IgM) is the first immunoglobulin isotype expressed on the cell surface of immature B cells during B lymphocyte lineage differentiation and represents the first antibody that is produced during an immune response after initial antigen encounter [1]. Circulating human polyclonal IgM is present in plasma at a concentration between approximately 0.5 and 2.0 g/l in healthy adults, with a half-life of about 5 days [2]. Polyreactivity, antimicrobial activity, and housekeeping functions, such as the capacity to promote the removal of apoptotic cells, belong among the key properties of IgM [3, 4].

Primary selective IgM deficiency (sIgMD) is thought to be a rare primary immunodeficiency disease (PID). The prevalence ranges from 0.03 to 3.80% in various studies [5–10]. It is characterized by low serum level of IgM (<0.20 g/l or <2 standard deviations below the age-adjusted mean) and normal IgG and IgA levels; however, the IgE levels can be increased [11]. The definition of sIgMD based on IgM levels remains

✉ Zita Chovancova
zita.chovancova@fnusa.cz

¹ Department of Clinical Immunology and Allergy, St. Anne's University Hospital in Brno, Pekarska 53, 65691 Brno, Czech Republic

² Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³ Charles University in Prague School of Medicine and University Hospital, Institute of Clinical Immunology and Allergology, Hradec Kralove, Czech Republic

⁴ Transfusion and Tissue Department, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

⁵ Department of Immunology, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

problematic compared to selective IgA deficiency (sIgAD), in which immeasurable level of IgA (<0.07 g/l) is a criterion for the diagnosis. In some previously published cases of patients with sIgMD, the IgM levels are just slightly below IgM reference ranges. This could explain the discrepancies in clinical and laboratory parameters reported among studies. No genetic or molecular defects have been established yet. The clinical features of these patients are variable. Although upper respiratory tract infections, e.g., rhinitis, otitis media, and sinusitis, were among the most common clinical symptoms found in sIgMD patients, they also presented with various other manifestations (e.g., sepsis, meningitis, and anaphylaxis). Nevertheless, some of the patients are asymptomatic [11].

Goldstein et al. described the clinical features of adult and pediatric patients with sIgMD in two review studies [6, 12]. Upper respiratory tract infections were among the most common clinical symptoms accompanied with autoimmune diseases and allergies. The course of the disease was asymptomatic in only 3% of sIgMD patients [6, 12]. On the other hand, only a few series that are primarily focused on the laboratory parameters of sIgMD patients have been published to date. In our study, we focused on previously reported cases of patients with sIgMD that contained their laboratory parameters, and we present the clinical and laboratory data of our cohort of 17 adult patients with sIgMD.

Methods

We examined the clinical and immunological features of 17 adult patients with sIgMD (referred to the Department of Clinical Immunology and Allergy of St. Anne's University Hospital in Brno and the Institute of Clinical Immunology and Allergy of Charles University Hospital in Hradec Kralove from 1995 to 2015).

In a PubMed literature search using the keywords “IgM deficiency” and “Selective IgM deficiency,” 32 papers containing laboratory data of the included patients were identified.

The study was approved by the institutional ethics committee of St. Anne's University Hospital in Brno and University Hospital of Charles University in Hradec Kralove. Informed consents were obtained from the sIgMD patients for anonymous publication of their data.

Patient Characteristics

The study group consisted of 17 patients, 9 males aged between 22 and 70 years with a mean age of 43.8 years at the time of diagnosis and 8 females aged between 36 and 66 years with a mean age of 52.6 years at the time of diagnosis. All patients met the diagnostic criteria for primary sIgMD [5]. The presence of any other well-defined primary or secondary

immunodeficiencies that are accompanied by decreased levels of IgM was considered an exclusion criterion.

Patient's charts were analyzed regarding clinical manifestations, and laboratory data was retrieved and evaluated for serum levels of IgG, IgG subclasses, IgA, IgM, and IgE immunoglobulins, antibody titers against tetanus toxoid (anti-TET), pneumococcal polysaccharides (anti-PPS) and *Haemophilus influenzae type b* (anti-HIB), isohemagglutinin (IH) levels, T and B cell lymphocyte subsets, expression of IgM on B cell surfaces and B lymphocyte production of IgM.

Laboratory Investigation

The serum immunoglobulin concentrations were measured by nephelometry. Autoantibody concentrations against extractable nuclear antigen, tissue transglutaminase, cardiolipin, double-stranded DNA, thyroglobulin, thyroid peroxidase, and rheumatoid factor were determined with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Autoantibodies against gastric parietal cells, smooth muscle, neutrophil cytoplasm, mitochondria, endomysium, basal glomerular membrane, and double-stranded DNA and antinuclear antibodies were determined by indirect immunofluorescence. Nephelometry was used to evaluate rheumatoid factor. Anti-TET, anti-PPS, and anti-HIB antibodies were measured with ELISA assays (*VaccZyme™ Immunoassay Kits, the Binding Site Group Ltd., Birmingham, UK*).

Plasma anti-A and anti-B isohemagglutinins were investigated with a saline agglutination tube test with incubation to demonstrate IgM activity. Red blood cells, which possess the corresponding antigen A1 and/or B, were used for reactivity strength grading.

Immunophenotyping of lymphocyte subpopulations was performed with the Cytomix FC500 five-color cytometer (*Beckman Coulter Miami, FL, USA*). Lymphocyte subsets, including T lymphocytes (CD3⁺), helper T lymphocytes (Th; CD3⁺CD4⁺), cytotoxic T lymphocytes (Tc; CD3⁺CD8⁺), B lymphocytes (CD19⁺), and natural killer cells (NK; CD16⁺/CD56⁺), were identified using the following monoclonal antibodies (mAbs): fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-CD45, phycoerythrin (PE) anti-CD4, phycoerythrin-Texas red X (ECD) anti-CD8, r-phycoerythrin-cyanine 5 (PC5) anti-CD3, PE-anti-CD56, ECD-anti-CD19 (*Cyto-Stat tetraCHROME, Beckman Coulter, Miami, FL, USA*) and PE-anti-CD16 (*Immunotech, Marseille, France*).

B cell subpopulations, including CD21^{low} B cells (21low; CD21^{low}CD38^{low}), naïve B cells (NA; IgM⁺CD27⁻), marginal zone B cells (MZ; IgM⁺CD27⁺), switched memory B cells (SM; IgM⁻CD27⁺), and plasmablasts (PB; CD27⁺⁺⁺CD38⁺⁺⁺), were identified using the following mAbs: Krome Orange (KO) anti-CD45, PE-anti-CD24, r-phycoerythrin-cyanine 7 (PC7) anti-CD19, allophycocyanin

(APC) Alexa Fluor 750-conjugated anti-CD38 (*Beckman Coulter, Marseille, France*), brilliant violet 421 (BV421) anti-CD27, FITC-anti-IgD, peridinin chlorophyll (PerCP) Cy5.5 anti-IgM (*Biolegend, San Diego, USA*), and APC-anti-CD21 (*BD Pharmingen, San Jose, CA, USA*). The reference values published by Morbach et al. [13] were used.

T cell subpopulations, including naïve (CD45RA) and memory (CD45RO) CD4⁺ and CD8⁺ T cells, were identified using the following mAbs: KO-anti-CD45, PC7-anti-CD3, APC Alexa Fluor A700-conjugated anti-CD8, PE-anti-CD45RA, ECD-anti-CD45RO (*Beckman Coulter, Marseille, France*), and pacific blue (PB) anti-CD4 (*Exbio, Prague, Czech Republic*).

IgM production was measured with an ELISA assay after a 10-day incubation of peripheral blood mononuclear cells (10⁶ PBMCs/well) with pokeweed mitogen (PWM) at three concentrations (2.0, 0.2, and 0.02 µg/ml) and *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) at a concentration 1:1000 and 1:10,000. The reference ranges used in this article are the reference ranges of a local laboratory.

Statistical Analysis

The two-sided Mann–Whitney *U* test was applied, and *p*-values ≤0.05 were considered as statistically significant. If not otherwise indicated, the results are expressed as the mean ± SD.

Results

Our sIgMD Patient Cohort

Clinical Findings

Age at Time of Diagnosis The mean age at the time of sIgMD diagnosis was 47.9 ± 15.3 years (Table 1). The onset time could not be precisely determined because more than one third of the patients were asymptomatic with respect to infections (6/17). The low IgM level findings in these patients were incidental (Table 1).

Clinical Course of the Disease Increased susceptibility to infections, especially involving recurrent upper respiratory tract infections (i.e., ≥3 per year; 9/17; 53%) [14], pneumonia (3/17; 18%), urinary tract infections (3/17; 18%), sinusitis (2/17; 12%), otitis media (2/17; 12%), meningitis (2/17; 12%), recurrent colpitis (2/17; 12%), and furunculosis (2/17; 12%), was the most common clinical manifestation in our patients. Other infectious complications in individual patients included typhoid, erysipelas, and hepatitis B. Except two episodes of meningitis, no life-threatening infections were

observed. No increased incidence of infections was recorded in one third of the patients (6/17; 35%) (Table 1).

Allergic disorders included allergic rhinitis (8/17; 47%), drug allergy (5/17; 29%), bronchial asthma (3/17; 18%), atopic dermatitis (2/17; 12%), urticaria (2/17; 12%), and bee sting allergy (1/17; 6%). No clinical symptoms related to allergic disorders were registered in three patients (3/17; 18%). Autoimmune manifestations included Sjögren's syndrome (3/17; 18%), systemic lupus erythematosus (2/17; 12%), thyreopathy (1/17; 6%), and alopecia (1/17; 6%). One patient suffered from rectal adenocarcinoma, one patient from basalioma and melanoma, and patient no. 9 developed thymoma and Good's syndrome 8 years after the sIgMD diagnosis was established (Table 1).

Treatment No prophylactic antibiotic treatment or immunoglobulin substitution was required in our patients except for patient no. 9 in whom immunoglobulin replacement therapy (IVIG) was initiated because of the transition of sIgMD into Good's syndrome. The treatment of all allergic disorders of the patients did not diverge from standard approaches.

Clinical Outcome and Mortality Two of our patients died during the observation period; one aged 71 years of rectal carcinoma, and the second one aged 76 years of undetermined reason.

In a female patient no. 9, sIgMD was diagnosed at the age of 51 years. Remarkably, a gradual decrease in IgG and IgA was observed at age of 54 years. Finally, her IgA dropped to 0.14 g/l, and her IgG dropped to 1.99 g/l, which led to the IVIG administration initiation. At the age of 59 years, Good's syndrome was diagnosed due to the discovery of thymoma.

Laboratory Findings

Serum Immunoglobulin Levels Within our 17 sIgMD patients, 6 had undetectable levels of serum IgM (<0.05 g/l) and 11 had IgM levels that ranged from 0.05 to 0.19 g/l. The serum levels of IgG and IgA were 11.89 ± 5.04 and 2.97 ± 1.93 g/l, respectively. Nearly half of the patients (7/15) had increased levels of IgE (122–2110 IU/ml). The IgG subclass concentrations (IgG₁–IgG₄) were evaluated in 14 of 17 sIgMD patients; half of the patients had normal levels (Table 2). One patient had reduced IgG₁ levels; one patient had reduced IgG₂ levels, and one patient had reduced IgG₁ and IgG₄ levels. Five patients had reduced or unmeasurable levels of IgG₄ (Table 2).

Antibody Levels The anti-TET, anti-PPS, and anti-HIB IgG antibody levels were evaluated in 11 of 17 patients. All of them had protective levels of antibodies except patient no. 5, who had decreased anti-PPS IgG antibody levels (8.1, >15.5 mg/l).

Table 1 Clinical manifestations and characteristics of sIgMD patients

No.	Sex	Age at time of immunological investigation		Reason for the first immunological investigation	Clinical manifestation	URTI	P	S	O	M	Other infections	Allergy	Autoimmunity	Malignancy or benign tumors	
		S	M												
1	M	35	22	20	Cough, breathlessness (referred from GP)	R	1	×	1	×	×	AR, AB, DA	×	×	
2	M	76 ^a	65	65	Generalized candidiasis (referred from GP)	R	×	×	×	×	×	UTI, VZV, TS, ERY	×	×	
3	M	71 ^a	41	38	Recurrent furunculosis (referred from GP)	NF	×	×	×	×	×	Furunculosis	×	Rectal adenocarcinoma	
4	M	33	26	21	Tiredness, subfebrile temperature (referred from GP)	R	×	×	R	×	×	AR, AD	×	×	
5	F	59	49	48	Cold urticaria (referred from GP)	R	×	×	×	×	×	<i>H. pylori</i>	×	×	
6	F	73	65	65	Allergic symptoms (referred from GP)	NF	×	×	×	×	×	Urticaria	SLE	×	
7	F	77	66	63	Incidental finding of low IgM (referred from rheumatology)	R	×	×	×	×	×	UTI	AR, DA	SLE, SS	
8	F	78	63	63	Increased IgG and FW, leucopenia (referred from hematology)	R	1	×	×	×	×	UTI, RC	AR	SS	
9	F	68	51	51	Incidental finding of low IgM (referred from hematology)	R	×	R	×	1	×	RC	AR, AB, DA	×	Thymoma
10	M	57	65	65	Tiredness (referred from GP)	NF	×	×	×	×	×	×	×	Hypothyreosis	×
11	M	36	31	31	Incidental finding of low IgM (referred from reproduction clinic)	NF	×	×	×	×	×	×	×	×	×
12	M	39	32	32	Incidental finding of low IgM (referred from reproduction clinic)	NF	×	×	×	1	×	×	AR	×	×
13	F	42	38	38	Increased frequency of URTI (referred from GP)	R	1	×	×	×	×	Hepatitis B	AR, AB	×	
14	M	44	42	34	Recurrent furunculosis (referred from GP)	NF	×	×	×	×	×	Furunculosis	AR	×	
15	F	71	53	50	Suspicion of Sjögren's syndrome (referred from GP)	NF	×	×	×	×	×	×	SS, Alopecia	×	
16	M	79	70	69	Recurrent skin carcinoma (referred from GP)	NF	×	×	×	×	×	×	Bee sting allergy	×	Basalioma melanoma
17	F	38	36	10	Incidental finding of low IgM (referred from allergy clinic)	R	×	R	×	×	×	AD	×	×	

S study, D diagnosis, M manifestation, GP general practitioner, R recurrent, NF normal frequency, URTI upper respiratory tract infections, P pneumonia, S sinusitis, O otitis media, M meningitis, UTI urinary tract infections, RC recurrent colitis, VZV varicella zoster virus, TA typhus abdominalis, ERY erysipelas, AB asthma bronchiale, DA drug allergy, SLE systemic lupus erythematosus, SS Sjögren's syndrome

^a Year of death

After excluding the patients with proven autoimmune disease (patient nos. 6, 7, 8, and 15), positive antinuclear autoantibodies were observed in 5 of remaining 14 patients (Table 2). No other autoantibodies were detected during the follow-up period.

We performed ABO blood group testing by measuring isohemagglutinin titers (anti-A and anti-B antibodies in IgM class) in nine patients. One patient had the AB blood group; the remaining patients had low but detectable titers of the corresponding isohemagglutinins in the IgM class. In three patients, the IgM anti-A isohemagglutinin titer value was 2 (reference ranges: anti-A ≥ 32). In six patients, the IgM anti-B isohemagglutinin titer value ranged from 2 to 16 (reference ranges: anti-B ≥ 8) (Table 3).

Lymphocyte Subsets The lymphocyte subsets were determined in 11 patients. The absolute numbers and frequencies of the total T cells, Th and Tc cells, NK cells, and B cells were within the reference ranges in all investigated patients, except patient no. 9, who had a decreased Th cell percentage, patient no. 8, who had a decreased B cell percentage, and three patients (nos. 3, 7, and 8), who had decreased absolute B cell numbers. Moreover, patient no. 8 had a decreased absolute B cell count and B cell frequency (data not shown).

B lymphocyte subpopulations were analyzed in nine patients (Fig. 1). We found that eight out of nine patients had increased transitional B cell frequencies and absolute counts compared with the reference range [13].

The patients had variable naïve B cell counts; two patients had increased frequencies as well as absolute counts; three patients had normal frequencies but decreased absolute counts; two patients had normal frequencies and increased absolute counts, and two patients had increased frequencies but decreased absolute counts. Regarding marginal zone B cells, out of nine patients, six had decreased absolute numbers and percentages, two had decreased percentages but normal absolute counts, and one had both increased absolute counts and frequency. Regarding 21^{low} B cells, out of nine patients, seven had increased and two had normal percentages; out of seven patients, three had increased and one had decreased absolute counts. The numbers of switched memory B cells and plasmablasts were variable (Fig. 1a, b).

The T lymphocyte differentiation stages were analyzed in nine patients (Fig. 2). The absolute numbers and percentages of $CD4^{+}$ naïve T cells (Fig. 2a, b) were comparable with the reference range in healthy population [15]. Most of the patients had decreased absolute numbers of $CD4^{+}$ memory T cells; nevertheless, the frequency of these cells was normal in nearly all of the investigated patients

Table 2 Immunoglobulin concentrations and autoantibody presence in our sIgMD patient cohort

N/S/A	IgM (g/l)	IgG (g/l)	IgG ₁ (g/l)	IgG ₂ (g/l)	IgG ₃ (g/l)	IgG ₄ (g/l)	IgA (g/l)	IgE (g/l)	Autoantibodies
1/M/35	<0.05	9.41	9.00	2.23	0.77	0.30	2.29	157	ANA
2/M/76	0.17	11.34	7.32	2.45	0.31	0.52	2.73	32	Negative
3/M/71	0.05	8.03	5.23	3.06	1.29	0.32	2.52	157	Negative
4/M/33	<0.05	13.40	8.90	3.66	0.92	0.62	3.59	393	ANA
5/F/59	<0.05	8.13	5.41	1.02	0.30	0.17	8.13	2110	Negative
6/F/73	0.12	11.80	6.26	3.10	0.30	<0.07	6.33	171	ANA, Sm/RNP
7/F/77	0.18	11.20	6.81	2.61	0.20	0.25	5.21	<20	ANA
8/F/78	<0.05	30.30	27.94	1.60	0.70	0.07	1.77	41	ANA, RF, anti-SSA, anti-SSB, anti-GPC
9/F/68	<0.05	8.08	3.54	1.88	1.04	<0.08	0.63	<35	Negative
10/M/57	<0.05	13.50	8.80	5.70	0.71	<0.07	3.30	26	Negative
11/M/36	0.16	10.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.18	n.d.	ANA
12/M/39	0.17	9.59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.45	n.d.	Negative
13/F/42	0.14	9.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.53	100	ANA
14/M/44	0.19	13.30	9.10	2.42	0.24	2.02	3.07	1121	Negative
15/F/71	0.16	15.00	12.00	2.67	0.20	<0.07	3.27	4	ANA, anti-SSA, anti-U1RNP, anti-TG
16/M/79	0.19	8.50	3.40	5.04	0.45	0.26	1.72	18	Negative
17/F/38	0.07	11.10	7.00	3.32	0.46	0.43	0.82	122	ANA

Reference ranges: IgM (0.46–3.04), IgG (7.51–15.6 g/l), IgG₁ (4.90–11.40 g/l), IgG₂ (1.50–6.40 g/l), IgG₃ (0.20–1.10 g/l), IgG₄ (0.08–1.40 g/l), IgA (0.82–4.53 g/l), IgA₁ (0.58–2.63 g/l), IgA₂ (0.12–1.41 g/l), IgE (0–100 IU/ml)
 N/S/A number/sex/age, M male, F female, ANA antinuclear antibodies, RF rheumatoid factor, anti-GPC antibodies against gastric parietal cells, anti-TG anti-thyroglobulin antibodies, Sm/RNP antibodies against Smith antigen/ribonucleoprotein, anti-U1 RNP antibodies against U1 ribonucleoprotein

Table 3 Isohemagglutinin levels in our sIgMD patient cohort

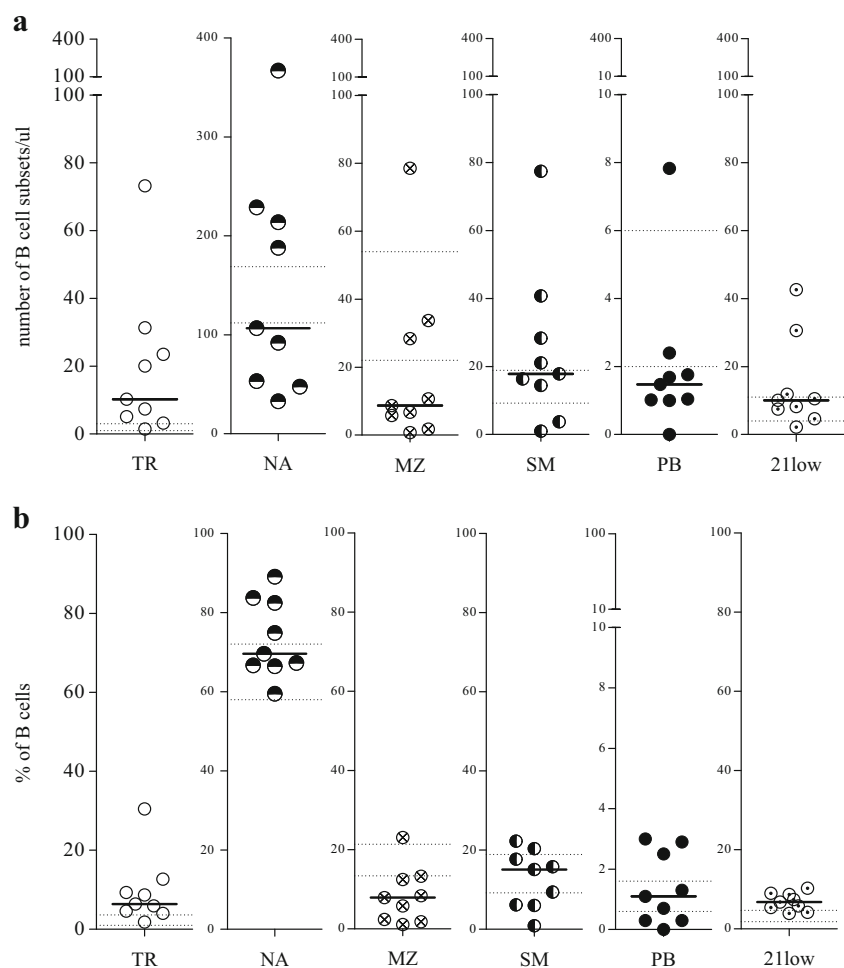
N/S/A	Blood group	Anti-A IgM	Anti-B IgM
1/M/35	A	×	1
3/M/71	A	×	2
4/M/33	B	2	×
6/F/73	B	2	×
7/F/77	A	×	2
8/F/78	AB	×	×
9/F/68	0	2	8
13/F/42	A	×	4
15/F/71	A	×	16

Reference ranges: anti-A ≥ 32 , anti-B ≥ 8

N/S/A number/sex/age, M male, F female, IH isohemagglutinins, n.d. not done, × not applicable

(Fig. 2a, b). Majority of the patients had normal absolute CD8⁺ naïve T cell counts and increased absolute CD8⁺ memory T cell counts while displaying increased percentage of both naïve and memory CD8⁺ T cells (Fig. 2c, d) [16].

Fig. 1 Absolute counts (a) and percentages (b) of B cell subpopulations. TR (CD24⁺⁺CD38⁺⁺ transitional B cells), NA (CD27⁺IgM⁺ naïve B cells), MZ (CD27⁺IgM⁺ marginal zone B cells), SM (CD27⁺IgM⁺ switched memory B cells), PB (CD27⁺⁺⁺CD38⁺⁺⁺ plasmablasts), 21^{low} (CD21^{low}CD38^{low} CD21^{low} B cells). Dotted lines in the graph represent reference ranges: TR (1.0–3.6 %; 1–3/ μ l of blood), NA (58.0–72.1 %; 112–169/ μ l of blood), MZ (13.4–21.4 %; 22–54/ μ l of blood), SM (9.2–18.9 %; 18–40/ μ l of blood), PB (0.6–1.6 %; 2–6/ μ l of blood), 21^{low} (1.8–4.7 %; 4–11/ μ l of blood) [13]. The relative numbers of B cell subpopulations are shown as the mean \pm SD.



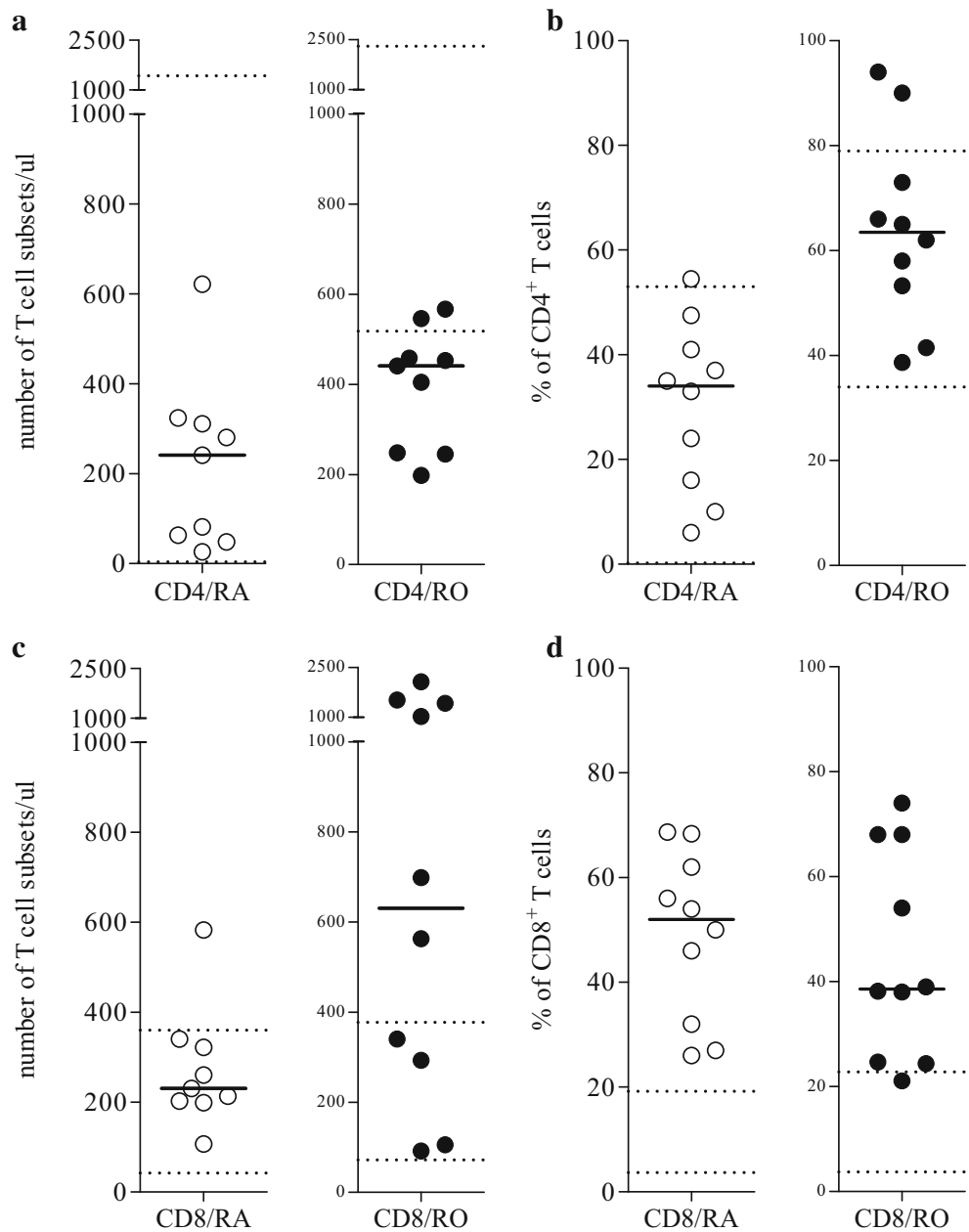
IgM Surface Expression IgM surface expression was measured in 10 patients and compared with 24 healthy donors (HDs). We found no significant difference in the B cell surface IgM expression between the patients and HDs (Fig. 3). The range of B cells bearing IgM on their surface was $70.8 \pm 8.4\%$ in the HD group and $80.2 \pm 9.5\%$ in the patient group. Additionally, we did not observe any significant difference in the median fluorescence intensity (MdFI) of the IgM expression on the transitional, naïve, marginal zone, IgM only (CD27⁺IgM⁺IgD⁻), switched memory, CD21^{low} B cells, and plasmablasts (data not shown).

IgM Production Testing of B lymphocyte IgM production was performed in five patients (nos. 1, 3, 7, 8, and 9) (Table 4). After stimulation with PWM and SAC, the IgM production was comparable to the HDs in three patients (nos. 1, 3, and 7) and decreased in two patients (nos. 8 and 9).

Previously Reported sIgMD Patients

A cohort of 81 sIgMD patients was derived from relevant articles. Serum IgM concentrations were available for 65 of

Fig. 2 Absolute counts and percentages of naïve and memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *CD4/RA* (naïve T lymphocytes), *CD4/RO* (memory T lymphocytes), *CD8/RA* (naïve CD8⁺ T lymphocytes), *CD8/RO* (memory CD8⁺ T lymphocytes). Dotted lines in the graph represent reference ranges: *CD4/RA* (0.23–53 %; 4–1424/ μ l of blood), *CD4/RO* (34–79 %; 518–2300/ μ l of blood) [15]; *CD8/RA* (3.68–19.23 %; 42–360/ μ l of blood), *CD8/RO* (3.78–22.80 %; 72–377/ μ l of blood) [16]



these patients; 15 had undetectable IgM levels (<0.05 g/l); 29 had IgM levels between 0.05 and 0.20 g/l; 21 had IgM levels between 0.21 and 0.39 g/l. IgE concentration data were available for 37 of these patients; 21 patients had increased IgE levels (124–8900 IU/ml) [8, 17–42].

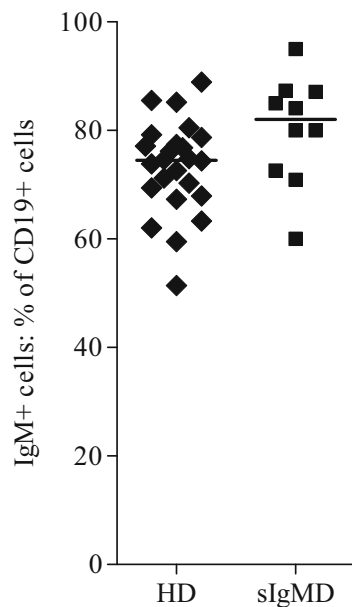
The level of antibodies against protein and polysaccharide antigens was available for 20 out of 81 patients. Protective levels against TET, PPS, and diphtheria toxoid were observed in 11/14, 4/7, and 5/9 patients, respectively. The responses to other vaccine against bacterial or viral antigens are shown in Table 5.

Isohemagglutinin titers were determined in 21 out of 81 patients. Low but detectable anti-A or anti-B antibody titers were observed in 18/21 patients. Specifically, the anti-A and

anti-B isohemagglutinin titer range was 1–32 in 15/18 patients, and 3/18 had natural isohemagglutinins present without a detailed specification (Table 6).

The lymphocyte populations were reviewed for 47 previously reported patients. Not all the subsets were measured for all the patients; nevertheless, the sIgMD patients had normal percentages of CD3⁺ T cells (mean $74.7 \pm 9.5\%$; 60–85%), CD4⁺ cells ($40.8 \pm 14.3\%$; 28–57%), CD8⁺ cells ($31.1 \pm 13.6\%$; 10–39%), NK cells ($9.8 \pm 5.2\%$; 7–31%), and B cells ($12.6 \pm 6.8\%$; 6–19%) [8, 17–19, 22, 25, 26, 28, 29, 32, 33, 35, 37, 38, 40–42].

B lymphocyte subpopulations were analyzed individually in three patients [10, 26, 38] and in cohorts of 16, 29, and 20 sIgMD patients [43–45]. The cell numbers were variable.



HD (healthy donors), sIgMD (patients with sIgMD)

Fig. 3 IgM surface expression on CD19⁺ B cells

Belgemen et al. observed normal naïve and marginal zone B cell frequencies but a decreased frequency of switched memory B cells [38]. Low levels of switched memory B cells were also described in a patient in a study conducted by Saini et al., along with a decreased frequency of marginal zone B cells [10]. A patient in a case report by Ideura et al. had an increased frequency of naïve B cells, decreased frequency of marginal zone B cells, and normal frequency of switched memory B cells [26]. Çipe et al. also observed decreased marginal zone B cell levels in a cohort of 16 patients [43]. Recently, in a cohort of 29 patients, Mensen et al. described that these patients had

Table 4 IgM concentration ($\mu\text{g/l}$) after 10-day stimulation with PWM and SAC

	No.	PWM			SAC	
		2.0 $\mu\text{g/ml}$	0.2 $\mu\text{g/ml}$	0.02 $\mu\text{g/ml}$	1:1000	1:10,000
P	1	176	1564	2023	1289	1037
P	3	280	201	18	106	3326
P	7	175	198	58	70	289
P	8	12	11	6	0	0
P	9	12	11	28	6	128
HD	1	47	234	782	3962	5333
HD	2	86	110	557	103	68
HD	3	228	151	116	176	139
HD	4	290	180	227	240	210
HD	5	383	461	554	52	404

P patient, HD healthy donor, PWM pokeweed mitogen, SAC *Saccharomyces cerevisiae* Cowan I

significantly increased transitional B cells (CD38^{hi}CD24^{hi}) and decreased IgM only (CD27⁺IgM⁺IgD⁻) and switched (CD27⁺IgM⁻IgD⁻) and non-switched (CD27⁺IgM⁺IgD⁺) memory B cells [44]. Additionally, in a cohort of 20 patients, Louis et al. described significant increase of CD21^{low}, IgM memory B cells, Breg cells, and CD8 Treg cells and significant decrease of germinal center B cells, CXCR3⁺ naïve, and memory B cells [45].

Cell proliferation after mitogen stimulation (PWM, phytohemagglutinin or concanavalin A) was measured in 23 out of 81 patients. T lymphocytes proliferated normally after mitogen stimulation in 17/23 patients, but the proliferative response was impaired or diminished in 6/23 patients (Table 7). B cell mitogen stimulation by SAC was performed in 6/23 patients resulting in low response in all of them (Table 7).

Data regarding IgM surface expression were available for 27 out of 81 patients. Surface IgM was present on B cells in normal levels in 21/27 patients, and the expression was decreased in 6 patients; however, in 3 of these patients, it was normalized after a 7-day incubation with PWM (Table 7).

PWM-induced immunoglobulin production by PBMCs over a 7-day culture period was measured in 20 out of 81 patients. All of them had very low or undetectable IgM production after stimulation, although IgG and IgA immunoglobulin production was normal or nearly normal (Table 7).

Discussion

Primary sIgMD was first described by Hobbs et al. in 1966 in two boys who suffered from fulminant meningococcal septicemia and also had very low levels of IgM [46]. Increased susceptibility to infections is indeed the most common manifestation of sIgMD [6, 8, 44]. This may be explained by the role of IgM in primary antibody responses, which cannot be completely compensated for by other immunoglobulins [47–49]. The critical role of IgM in response against bacterial or viral infections was repeatedly demonstrated. For example, soluble IgM (sIgM)-deficient mice were unable to eradicate bacterial infections caused by cecal ligation and puncture [49], and they displayed significantly reduced virus clearance ability and survival rates compared with wild-type mice [50]. Moreover, the presence of specific neutralizing IgM antibodies early in the course of Nile virus infection limited viremia and prevented dissemination into the central nervous system [51]. IgM antibodies enhanced the primary antibody response to sheep erythrocytes [52], and deficiency in secretory IgM resulted in delayed maturation of response to T cell-dependent antigens [53]. Furthermore, it was shown that IgM antibodies might attenuate the infectious consequences of a lack of other immunoglobulin isotypes in patients with hyper-IgM syndrome and polyvalent IgG replacement therapy might not

Table 5 Antibody levels against protein and polysaccharide antigens in the reviewed sIgMD patients

N/S/A	Anti-TET response (IU/ml)	Anti-PPS response (µg/ml)	Anti-DPT response (IU/ml)	Other vaccination response	Ref.
58/F/15	Adequate	1/6	Adequate	n.d.	[24]
61/M/49	Adequate	Adequate	n.d.	n.d.	[25]
64/>M/6	Adequate (6.31)	5/12	Adequate (0.740)	n.d.	[21]
65/F/14	Adequate (>3)	8/12	Adequate (>7.000)	n.d.	[21]
66/F/15	Adequate	1/6	Adequate	n.d.	[21]
68/M/58	n.d.	n.d.	Inadequate (0.065)	n.d.	[30]
71/M/11	n.d.	Inadequate	n.d.	n.d.	[32]
73/F/16	n.d.	n.d.	n.d.	Adequate response to rubella, HSV, EBV VCA (IgG, IgA but not IgM), EBV EA-DR (IgG)	[34]
74/F/59	Adequate (0.5)	n.d.	n.d.	Inadequate response to rubella (IgG < 5 IU/ml)	[35]
78/M/13	Adequate	n.d.	Adequate	Adequate response to measles, mumps, rubella, pertussis	[10]
80/M/6.5	n.d.	Adequate	n.d.	Adequate response to poliovirus	[38]
1/F/3	Inadequate	n.d.	n.d.	Inadequate response to <i>E. coli</i>	[18]
2/M/9	Inadequate	n.d.	n.d.	Inadequate response to <i>E. coli</i>	[18]
25/F/12	Adequate	n.d.	Inadequate	Inadequate response to <i>S. typhi</i>	[42]
63/M/10	n.d.	n.d.	n.d.	Adequate response to rubella and CMV	[27]
69/M/52	Adequate	n.d.	Inadequate	n.d.	[31]
70/M/41	Adequate	n.d.	Inadequate	n.d.	[31]
75/M/65	Inadequate	n.d.	n.d.	n.d.	[36]
76/M/72	Adequate	n.d.	n.d.	n.d.	[36]
81/M/21	n.d.	n.d.	n.d.	Adequate response to vaccinia and variola	[39]
Impaired specific antibody response to pneumococcal antigens in 5 out of 11 studied patients (45%)					[8]

N/S/A number/sex/age, anti-DPT antibodies against diphtheria toxoid, HSV herpes simplex virus, EBV Epstein–Barr virus, CMV cytomegalovirus, *E. coli* *Escherichia coli*, *S. typhi* *Salmonella typhi*, EA-DR antigen diffused/restricted, VCA viral capsid antigen, n.d. not done

Table 6 Isohemagglutinin levels in the reviewed sIgMD patients

N/S/A	Blood group	Isohemagglutinins		Reference ranges	Ref.
		Anti-A	Anti-B		
1/F/3	n.d.	×	8	n.m.	[18]
2/M/9	n.d.	16	×	n.m.	[18]
10/M/65	A Rh+	0	×	n.m.	[33]
58/F/15	n.d.	Isohemagglutinins 16		4–64	[24]
60/M/3	B Rh+	1	×	>10	[17]
64/M/6	n.d.	16	8	1–64	[21]
66/F/15	n.d.	16		4–64	[21]
69/M/52	A	×	4	n.m.	[31]
70/M/41	0	16	4	n.m.	[31]
71/M/11	0	16	4	n.m.	[32]
73/F/16	0 Rh+	4	2	>32	[34]
75/M/65	B Rh–	0	×	n.m.	[36]
76/M/72	A Rh+	×	Very weak	n.m.	[36]
77/M/60	n.d.	Present	Present	n.m.	[36]
78/M/13	n.d.	Isohemagglutinins >128		n.m.	[10]
79/M/16	0 Rh+	32	2	n.m.	[37]
80/M/6.5	B Rh+	2	×	>10	[38]
81/M/21	B	16	×	n.m.	[39]
25/F/12	B Rh+	<2	×	n.m.	[42]
59/F/3.5	n.d.	2	×	>10	[20]
72/M/6	n.d.	×	1	5–640	[22]

N/S/A number/sex/age, M male, F female, n.d. not done, × not applicable, n.m. not mentioned

Table 7 Functional cell characteristics in the reviewed sIgMD patients

	Proliferation and other functional tests	Immunoglobulin production	Surface molecule expression	Other cell information	Ref.
1/F/3	Normal thymidine uptake in response to PHA, ConA, and PWM stimulation	Very low IgM and IgA and normal IgG production in PWM-induced Ig production by PBMC during 7-day culture	Normal or high percentage of sIgM cells, normal differentiation into IgM secreting cells in vitro	n.m.	[18]
2/M/9	Reduced thymidine uptake in response to PHA, ConA, and PWM	No detectable IgM or IgA and very reduced IgG level production in PWM-induced Ig production by PBMC following 7-day culture	Normal or high percentage of sIgM cells, normal differentiation into IgM secreting cells in vitro	n.m.	
3/M/58	E-RFC normal percentage 72% (67.3 ± 4.0)	Normal levels of secreted IgG and IgA, lower levels of secreted IgM after 7-day stimulation of PBLs with PMW (10 µg/ml)	Normal smlgA, smlgM and smlgD reduced smlgG, normal surface IgG, IgA, and IgM after 7-day incubation with PWM	Co-culture of normal B cells with patients' T cells failed to synthesize normal amounts of IgM	[28]
4/F/73	E-RFC normal percentage 84% (67.3 ± 4.0)	Normal levels of secreted IgG and IgA, lower levels of secreted IgM after 7-day stimulation of PBL with PMW (10 µg/ml)	Reduced smlgA, smlgG, smlgD, and smlgM, normal surface IgG, IgA, and IgM after 7-day incubation with PWM		
5/F/71	E-RFC normal percentage 74% (67.3 ± 4.0)	Normal levels of secreted IgG and IgA, lower levels of secreted IgM after 7-day stimulation of PBL with PMW (10 µg/ml)	Normal smlgA, smlgG, smlgD, and smlgM, normal surface IgG, IgA, and IgM after 7-day incubation with PWM		
6/F/53	E-RFC normal percentage 88% (67.3 ± 4.0)	Normal levels of secreted IgG and IgA, lower levels of secreted IgM after 7-day stimulation of PBL with PMW (10 µg/ml)	Reduced smlgA, smlgG, smlgD, and smlgM normal surface IgG, IgA and IgM after 7-day incubation with PWM		
7/F/29	E-RFC normal percentage 74% (67.3 ± 4.0)	Normal levels of secreted IgG and IgA, lower levels of secreted IgM after 7-day stimulation of PBL with PMW (10 µg/ml)	Normal smlgA, smlgG and smlgD reduced smlgM, normal surface IgG, IgA, and IgM after 7-day incubation with PWM		
8/M/30	E-RFC normal percentage 75% (67.3 ± 4.0)	Normal levels of secreted IgG and IgA, lower levels of secreted IgM after 7-day stimulation of PBL with PMW (10 µg/ml)	Normal smlgA, smlgG, smlgD and smlgM normal surface IgG, IgA and IgM after 7-day incubation with PWM		
9/M/48	E-RFC normal percentage 56% (67.3 ± 4.0)	Normal levels of secreted IgG and IgA, lower levels of secreted IgM after 7-day stimulation of PBL with PMW (10 µg/ml)	Normal smlgA, smlgG and smlgM, reduced smlgD, normal surface IgG, IgA, and IgM after 7-day incubation with PWM		
10/M/65	E-RFC normal percentage 80% (67.3 ± 4.0)	Normal levels of secreted IgG, lower levels of secreted IgM after 7-day stimulation of PBL with PMW (1 µg/ml)	Normal smlgA and smlgG sIgM not present	n.m.	[33]

Table 7 (continued)

	Proliferation and other functional tests	Immunoglobulin production	Surface molecule expression	Other cell information	Ref.
11/F/44	n.d.	Almost normal levels of secreted IgG and IgA, low levels of secreted IgM after 7-day stimulation of PBL with PMW (10 µg/ml)	Normal smlgA, smIgG, smIgD and smIgM	n.m.	[40]
12/F/62	n.d.	Almost normal levels of secreted IgG and IgA, low levels of secreted IgM after 7-day stimulation of PBL with PMW (10 µg/ml)	Normal smlgA, smIgG, smIgD, and smIgM	n.m.	
13/F/51	n.d.	Almost normal levels of secreted IgG and IgA, low levels of secreted IgM after 7-day stimulation of PBL with PMW (10 µg/ml)	Normal smlgA, smIgG, smIgD, and smIgM	n.m.	
14/F/60	n.d.	PBL showed class non-specific hyporesponsiveness to PWM; however, the fall in IgM-ISC was greater than that of the other isotypes	Normal smlgA, smIgG, and smIgM increased smIgD	n.m.	
15/M/4	Impaired proliferation response to PHA and ConA	n.d.	IL-2 receptor-positive lymphocytes (measured by anti-CD25 moAb): 13% (normal range 0–3%)	Circulating B cell numbers in all three IgM-deficient patients were normal, as was the ability of B cells to synthesize Ig under the influence of normal T cells in response to PWM stimulation	[19]
16/F/3	Impaired proliferation response to PHA and ConA	n.d.	IL-2 receptor-positive lymphocytes (measured by anti-CD25 moAb): 0% (normal range 0–3%)		
17/F/2.5	Impaired proliferation response to PHA and ConA	n.d.	IL-2 receptor-positive lymphocytes (measured by anti-CD25 moAb): 19% (normal range 0–3%)		
18/M/3	Normal proliferation response to PHA and ConA	n.d.	IL-2 receptor-positive lymphocytes (measured by anti-CD25 moAb): 0% (normal range 0–3%)		
19/M/50	Almost normal proliferation of T cells after PHA and ConA stimulation, low proliferation of B cells to SAC	slgMD B cells + slgMD T cells: 1% PWM (production of one third to one tenth of the control level of IgM)	Normal smlgA, smIgD and smIgM decreased smIgG	n.m.	[41]
20/M/57	Almost normal proliferation of T cells after PHA and ConA stimulation, low proliferation of B cells to SAC	slgMD B cells + normal T cells: 1% PWM (production of one fourth to two thirds of the control level of IgM) no difference in IgG and IgA production between patient and control B cells under the same conditions	Normal smlgG, smIgD and smIgM increased smIgA	n.m.	
21/M/22	Almost normal proliferation of T cells after PHA and ConA stimulation, low proliferation of B cells to SAC	under the same conditions IgM production by the control B cells	n.d.	n.m.	

Table 7 (continued)

	Proliferation and other functional tests	Immunoglobulin production	Surface molecule expression	Other cell information	Ref.
22/M/34	Almost normal proliferation of T cells after PHA and ConA stimulation, low proliferation of B cells to SAC	co-cultured with patient T cells was Similar to the controls	Normal smlgA, smIgG and smIgM decreased smlgD	n.m.	
23/M/57	Almost normal proliferation of T cells after PHA and ConA stimulation, low proliferation of B cells to SAC		Normal smlgA, smIgG and smIgM decreased smlgD	n.m.	
24/F/37	Almost normal proliferation of T cells after PHA and ConA stimulation, low proliferation of B cells to SAC		Normal smlgA, smIgG, smlgD and smIgM	n.m.	
25/F/12	Normal proliferation of T cells after PHA and ConA stimulation	n.d.	Normal smlgA, smIgG and smIgM	n.m.	[42]
57/M/66	n.d.	n.d.	Normal smIgM	n.m.	[23]
58/F/15	Normal lymphocyte proliferation after PHA, ConA, and PWM stimulation	n.d.	n.d.	n.m.	[24]
60/M/3	Normal lymphocyte proliferation after PHA stimulation	n.d.	n.d.	n.m.	[17]
62/F/37	Mildly excessive proliferative T cell response to PHA and ConA	n.d.	n.d.	n.m.	[26]
65/F/14	Normal lymphocyte proliferation after PHA, ConA, and PWM stimulation	n.d.	n.d.	n.m.	[21]
66/F/15	Normal lymphocyte proliferation after PHA, ConA, and PWM stimulation	n.d.	n.d.	n.m.	
67/F/64	n.d.	n.d.	Few surface IgM-positive B lymphocytes	n.m.	[29]
71/M/11	n.d.	n.d.	Normal smIgM	n.m.	[32]
73/F/16	Slightly impaired lymphocyte proliferation after PHA and ConA	n.d.	Normal smIgM	n.m.	[34]
75/M/65	Diminished lymphocyte transformation after PHA and PWM stimulation	n.d.	Normal number of IgM staining B lymphocytes in the peripheral blood	Jejunal biopsy had normal IgM plasma cell numbers, jejunal aspirate IgM nil, IgA, and IgG present secretory component present	[36]
76/M/72	Normal response to mitogen and antigen stimulation	n.d.	Normal smIgM	Bone marrow (fluorescent microscopy) IgM cells present jejunal biopsy no IgM plasma cells in jejunal aspirate	

Table 7 (continued)

	Proliferation and other functional tests	Immunoglobulin production	Surface molecule expression	Other cell information	Ref.
78/M/13	Normal	n.d.	Decreased smIgM	IgM nil, IgA and IgG present	[10]
80/M/6.5	Normal lymphocyte proliferation after PHA and anti-CD3 stimulation	n.d.	n.d.	n.m. n.m.	[38]

PHA phytohemagglutinin, *ConA* concanavalin A, *PWM* pokeweed mitogen, *PBL* peripheral blood lymphocytes, *PBMC* peripheral blood mononuclear cells, *E-RFC* E rosette-forming cells, *ISC* immunoglobulin secreting cells, *sIgM* surface IgM, *moAb* monoclonal antibodies, *smIgG* peripheral blood lymphocytes with surface IgG, *smIgA* peripheral blood lymphocytes with surface IgA, *smIgM* peripheral blood lymphocytes with surface IgM, *smIgD* peripheral blood lymphocytes with surface IgD, *n.d.* not done, *n.m.* not mentioned

fully compensate for IgM deficiency [54]. On the other hand, while prevalence of bronchiectasis was higher in patients with low levels of IgA (<0.8 g/l) and IgM (<0.5 g/l) in addition to IgG deficiency (<5.0 g/l), the difference in bronchiectasis prevalence between patients with normal IgA or IgM and patients with normal IgA and IgM was not statistically significant [55]. In addition, low IgG and IgA but not IgM were shown to be associated with increased risk of pneumonia and bronchiectasis in a long-term follow-up of large cohort of patients with common variable immunodeficiency [56].

An increased frequency of autoimmune diseases is markedly associated with sIgMD [57]; however, this association remains unclear. Recently, secreted polyclonal IgM was shown to prevent autoantibody formation by facilitating normal B cell development and enforcing negative selection of autoreactive B cells [58]. Moreover, secreted IgM (including IgM autoantibodies) may lessen the severity of the autoimmune pathology associated with IgG autoantibodies [59]. sIgM/antigen immunocomplexes promote a negative feedback loop for B cell activation via CD22 receptor in glycan ligand-dependent manner, which may contribute to B cell tolerance [60]. In contrast, increased IgM levels can also be associated with autoimmunity [61, 62]. In human PIDs characterized by elevated IgM levels and impaired B lymphocytes switching to IgG-producing cells, autoimmune disorders may develop [48]. Mice with activation-induced cytidine deaminase defects, that prevent class switch recombination, develop hyper-IgM-like syndromes associated with autoimmune diseases [63, 64]. Nevertheless, the role of IgM in association with autoimmune diseases remains unclear [65–68]. An association between sIgMD and atopic disorders is prominent; however, the mechanism through which the low IgM levels would cause Th1 to Th2 response shift remains unclear. In addition, since the pathogenesis of sIgMD is obscure, it may be even possible that the low IgM levels are secondary to atopy rather than the reverse.

The available data on lymphocyte subpopulations in larger sIgMD cohorts is insufficient and often contradictory. Regarding marginal zone B cells, reduced numbers [10, 26, 38, 43, 44], normal numbers [44, 45], as well as the expansion of the marginal zone B cell compartment in mice deficient for secreted IgM were described [69]. Gupta et al. recently described that adults with sIgMD displayed significantly increased CD21^{low}, IgM memory B cell, B regulatory, and CD8 regulatory T cell levels and a significant decrease in germinal center B cells and CXCR3⁺ naïve and memory B cells [45]. Our results confirmed the increased 21^{low} B cell levels, which is a feature typical for some other PIDs and autoimmune conditions [70]. The plasmablast numbers were normal [45], which corresponds to the normal IgG and IgA levels in sIgMD patients. The increase of transitional B cells described in the Mensen et al. cohort was confirmed in our study [44]. We observed variable levels of switched memory

B cells; however, previous publications predominantly report a decrease in this population [26, 38, 43–45]. Overall, the results concerning B cell levels in patients with sIgMD are ambiguous. Larger studies might clarify association with certain B cell subpopulation abnormalities, such as in CVID [71]; however, the real clinical value is probably limited.

Naïve B cells, transitional B cells, marginal zone B cells, IgM only B cells, and IgM⁺ plasmablasts belong to a group of membrane IgM-expressing cells. It seems that the frequency of IgM-expressing B cells within the total B cell population is not diminished in patients with sIgMD compared with HDs [18, 23, 28, 34, 36, 40–42, 44] although a few studies described decreased surface IgM expression [10, 29, 33]. The loss of serum IgM was not accompanied by diminution in membrane IgM expression in mouse models [53]. In contrast to Mensen et al. observations of significantly decreased membrane IgM expression on IgM-expressing B cells, IgM only memory B cells, marginal zone-like B cells, and IgM⁺CD27[−]IgD[−] memory B cells [44], we found no statistically significant change compared with HDs. The presence of normal circulating B cell numbers with surface IgM suggests a defect in the terminal differentiation of immature B lymphocytes into IgM-secreting plasma cells [18, 23, 36, 72–74].

A small number of studies showed a failure of B and T cell cooperation in IgM production. Functional studies showed that co-cultivation of patient B and T cells in the presence of PWM led to absent or markedly decreased IgM production [18, 23, 28, 34, 41]. Concurrently, the IgG and IgA production was normal [23, 28, 41] or impaired [18, 34] under the same conditions described previously. Some studies showed normal production of IgM when the patient T cells were co-cultured with normal B cells [28, 34, 41], while others showed impaired IgM production [18, 23]. When patient B cells were co-cultured with normal T cells, the IgM production increased or reached normal levels [18, 41]. When irradiated patient T cells were added to patient B cells, IgM production was sufficient [23, 28]. Furthermore, Inoue et al. observed that increased T cell numbers in culture led to increased IgG and IgA but not IgM production [28]. Moreover, when patient B cells were stimulated with SAC and IL-6, they produced a significant amount of IgG and IgA under the same conditions. Recently, Mensen et al. showed a decrease in numbers of IgM-producing antibody-secreting B cells in two out of six patients [44]. Moreover, significantly decreased numbers of IgM-secreting and IgG-secreting cells were found in patients compared with healthy controls due to the low B cell expansion rate in majority of the patients [44]. Interestingly, patient B cells were able to undergo isotype switching and produce immunoglobulins of all other classes, resulting in normal [10, 27, 34, 38, 39] or impaired [18, 21, 24, 32, 36] specific antibody production. IgG and IgM isohemagglutinin production remained at lower levels compared with healthy populations [10, 18, 21, 24, 31, 32, 34, 36, 37, 39]. This suggests the

presence of a selective defect in patient B cells during B cell maturation into IgM-producing cells. Overall, our understanding of T or B cells' function in patients with sIgMD is limited by low number of studies based on small number of patients. In vitro studies have not produced consistent results, which might be attributed to variable pathogenesis of sIgMD and/or differences in in vivo and in vitro conditions of IgM production. Although B cells or T cells' intrinsic defects were suggested to play role in pathogenesis of sIgMD [18, 23, 28, 33, 40, 41, 74, 75], the key problem may be within IgM secretory process because patients produce normal amounts of other immunoglobulin isotypes and majority of them have normal surface IgM expression.

Conclusions

In summary, the underlying mechanism of sIgMD remains elusive. The clinical presentation and laboratory parameters range from asymptomatic individuals to patients affected with severe infections, suggesting that the cause of low or undetectable production of IgM may vary among patients. The treatment is only symptomatic; prophylactic antibiotic treatment is usually not necessary. We advocate that all sIgMD patients should undergo regular immunological evaluation to limit the risk of unrecognized transformation into other, more severe primary immunodeficiency.

Acknowledgements This work was supported by grant 15-28541A from the Czech Ministry of Health.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

References

1. Zhang Y, Garcia-Ibanez L, Toellner KM. Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol Rev.* 2016;270(1):8–19.
2. Kaveri SV, Silverman GJ, Bayry J. Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *J Immunol.* 2012;188(3):939–45.
3. Ehrenstein MR, Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(11):778–86.
4. Smathers RL, Chiang DJ, McMullen MR, Feldstein AE, Roychowdhury S, Nagy LE. Soluble IgM links apoptosis to complement activation in early alcoholic liver disease in mice. *Mol Immunol.* 2016;72:9–18.

5. Cassidy JT, Nordby GL. Human serum immunoglobulin concentrations: prevalence of immunoglobulin deficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 1975;55(1):35–48.
6. Goldstein MF, Goldstein AL, Dunskey EH, Dvorin DJ, Belecanech GA, Shamir K. Selective IgM immunodeficiency: retrospective analysis of 36 adult patients with review of the literature. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2006;97(6):717–30.
7. Hassanein HA, Elbadry MI. Selective immunoglobulin M deficiency in an adult with miliary tuberculosis: a clinically interesting coexistence. A case report and review of the literature. *Int J Mycobacteriol.* 2016;5(1):106–10.
8. Yel L, Ramanuja S, Gupta S. Clinical and immunological features in IgM deficiency. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;150(3):291–8.
9. Takeuchi T, Nakagawa T, Maeda Y, Hirano S, Sasaki-Hayashi M, Makino S, et al. Functional defect of B lymphocytes in a patient with selective IgM deficiency associated with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2001;34(2):115–22.
10. Saini S, Dettore AJ, Bhambhani KJ, Buck S, Poulik J, Savaşan S. Selective IgM deficiency in CD30+ cutaneous lymphoproliferative disorder. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2011;33(4):e156–9.
11. Louis AG, Gupta S. Primary selective IgM deficiency: an ignored immunodeficiency. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2014;46(2):104–11.
12. Goldstein MF, Goldstein AL, Dunskey EH, Dvorin DJ, Belecanech GA, Shamir K. Pediatric selective IgM immunodeficiency. *Clin Dev Immunol.* 2008;2008:624850.
13. Morbach H, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol.* 2010;162(2):271–9.
14. Monto AS, Sullivan KM. Acute respiratory illness in the community. Frequency of illness and the agents involved. *Epidemiol Infect.* 1993;110(1):145–60.
15. Valiathan R, Deeb K, Diamante M, Ashman M, Sachdeva N, Asthana D. Reference ranges of lymphocyte subsets in healthy adults and adolescents with special mention of T cell maturation subsets in adults of South Florida. *Immunobiology.* 2014;219(7):487–96.
16. Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol.* 2004;72(3):203–12.
17. Celmeli F, Turkkahraman D, Cetin Z, Mihci E, Yegin O. Selective IgM deficiency in a boy with ring chromosome 18. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2014;24(6):442–4.
18. De la Concha EG, Garcia-Rodriguez MC, Zabay JM, Laso MT, Alonso F, Bootello A, et al. Functional assessment of T and B lymphocytes in patients with selective IgM deficiency. *Clin Exp Immunol.* 1982;49(3):670–6.
19. Raziuddin S, Elawad ME, Benjamin B. T-cell abnormalities in antibody deficiency syndromes. *Scand J Immunol.* 1989;30(4):419–24.
20. Bolia R, Misra DP, Aggarwal A, Srivastava A. Paediatric selective IgM deficiency and IgG4 deficiency: an extremely unusual association. *BMJ Case Rep* 2014; 2014.
21. Kung SJ, Gripp KW, Stephan MJ, Fairchok MP, McGeady SJ. Selective IgM deficiency and 22q11.2 deletion syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2007;99(1):87–92.
22. Makay B, Unsal E, Anal O, Güneş D, Men S, Cakmakçi H, et al. Chronic recurrent multifocal osteomyelitis in a patient with selective immunoglobulin M deficiency. *Rheumatol Int.* 2009;29(7):811–5.
23. Matsushita S, Inoue T, Okubo H. A case of selective IgM deficiency: isotype-specific suppressor T lymphocytes. *Jpn J Med.* 1984;23(2):149–51.
24. Al-Herz W, McGeady SJ, Gripp KW. 22q11.2 deletion syndrome and selective IgM deficiency: an association of a common chromosomal abnormality with a rare immunodeficiency. *Am J Med Genet A.* 2004;127A(1):99–100.
25. Hong R, Gupta S. Selective immunoglobulin M deficiency in an adult with *Streptococcus pneumoniae* sepsis and invasive aspergillosis. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2008;18(3):214–8.
26. Ideura G, Agematsu K, Komatsu Y, Hatayama O, Yasuo M, Tsushima K, et al. Selective IgM deficiency accompanied with IgG4 deficiency, dermal complications and a bronchial polyp. *Allergol Int.* 2008;57(1):99–105.
27. Kiratli HK, Akar Y. Multiple recurrent hordeola associated with selective IgM deficiency. *J AAPOS.* 2001;5(1):60–1.
28. Inoue T, Okumura Y, Shirama M, Ishibashi H, Kashiwagi S, Okubo H. Selective partial IgM deficiency: functional assessment of T and B lymphocytes in vitro. *J Clin Immunol.* 1986;6(2):130–5.
29. Arahata M, Tajiri K, Nomoto K, Tsuneyama K, Minami S, Shimizu Y. A novel type of selective immunoglobulin m deficiency in a patient with autoimmune liver cirrhosis with recurrent hepatocellular carcinoma: a case report and review of the literature. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;161(1):91–6.
30. Dhir V, Sagar V, Aggarwal A, Rawat A, Singhal M. An unusual cause of recurrent pneumonia in adults. *Lung India.* 2014;31(3):296–8.
31. Yocum MW, Strong DM, Chusid MJ, Lakin JD. Selective immunoglobulin M (IgM) deficiency in two immunodeficient adults with recurrent staphylococcal pyoderma. *Am J Med.* 1976;60(4):486–94.
32. Sugita K, Eguchi M. Chronic idiopathic thrombocytic purpura in a young male patient with isolated IgM deficiency. *Int J Hematol.* 2001;73(4):532–3.
33. Karsh J, Watts CS, Osterland CK. Selective immunoglobulin M deficiency in an adult: assessment of immunoglobulin production by peripheral blood lymphocytes in vitro. *Clin Immunol Immunopathol.* 1982;25(3):386–94.
34. Mayumi M, Yamaoka K, Tsutsui T, Mizue H, Doi A, Matsuyama M, et al. Selective immunoglobulin M deficiency associated with disseminated molluscum contagiosum. *Eur J Pediatr.* 1986;145(1–2):99–103.
35. Phuphuakrat A, Ngamjanyaporn P, Nantiruj K, Luangwedchakarn V, Malatham K. Selective IgM deficiency in an adult presenting with *Streptococcus pneumoniae* septic arthritis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016;49(1):150–3.
36. Ross IN, Thompson RA. Severe selective IgM deficiency. *J Clin Pathol.* 1976;29(9):773–7.
37. Jung CL, Cha MK, Jun BH, Hong KS. A case of IgM deficiency with B cell deficiency detected by ABO discrepancy in a patient with acute osteomyelitis. *Ann Lab Med.* 2013;33(3):208–11.
38. Belgemen T, Suskan E, Dogu F, Ikinciogullari A. Selective immunoglobulin M deficiency presenting with recurrent impetigo: a case report and review of the literature. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;149(3):283–8.
39. Brilliant LB, Nakano JH, Kitamura T, Hodakevic LN, Bharucha PB. Occupationally-acquired smallpox in an IgM-deficient health worker. *Bull World Health Organ.* 1981;59(1):99–106.
40. Ohno T, Inaba M, Kuribayashi K, Masuda T, Kanoh T, Uchino H. Selective IgM deficiency in adults: phenotypically and functionally altered profiles of peripheral blood lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1987;68(3):630–7.
41. Yamasaki T. Selective IgM deficiency: functional assessment of peripheral blood lymphocytes in vitro. *Intern Med.* 1992;31(7):866–70.
42. Thong YH, Maxwell GM. Primary selective deficiency of immunoglobulin M. *Aust NZ J Med.* 1978;8(4):436–8.
43. Cipe FE, Doğu F, Güloğlu D, Aytekin C, Polat M, Biyikli Z, et al. B-cell subsets in patients with transient hypogammaglobulinemia of infancy, partial IgA deficiency, and selective IgM deficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2013;23(2):94–100.

44. Mensen A, Krause T, Hanitsch LG, Meisel C, Kleint ME, Volk HD, et al. Altered B-cell subsets and functional B-cell defects in selective IgM deficiency. *Clin Immunol*. 2015;161(2):96–102.
45. Louis AG, Agrawal S, Gupta S. Analysis of subsets of B cells, Breg, CD4Treg and CD8Treg cells in adult patients with primary selective IgM deficiency. *Am J Clin Exp Immunol*. 2016;5(1):21–32.
46. Hobbs JR, Milner RD, Watt PJ. Gamma-M deficiency predisposing to meningococcal septicaemia. *Br Med J*. 1967;4(5579):583–6.
47. Wardemann H, Boehm T, Dear N, Carsetti R. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *J Exp Med*. 2002;195(6):771–80.
48. Montaudouin C, Anson M, Hao Y, Duncker SV, Fernandez T, Gaudin E, et al. Quorum sensing contributes to activated IgM-secreting B cell homeostasis. *J Immunol*. 2013;190(1):106–14.
49. Boes M, Esau C, Fischer MB, Schmidt T, Carroll M, Chen J. Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *J Immunol*. 1998;160(10):4776–87.
50. Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown LE, Herzenberg LA, Chen J. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med*. 2000;192(2):271–80.
51. Diamond MS, Sitati EM, Friend LD, Higgs S, Shrestha B, Engle M. A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. *J Exp Med*. 2003;198(12):1853–62.
52. Powell R, Hutchings P, Cooke A, Lydyard PM. Antibody mediated regulation of immune responses. I. Enhancement of specific antibody responses through IgM antibodies. *Immunol Lett*. 1982;4(5):253–8.
53. Ehrenstein MR, O’Keefe TL, Davies SL, Neuberger MS. Targeted gene disruption reveals a role for natural secretory IgM in the maturation of the primary immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(17):10089–93.
54. Micol R, Kayal S, Mahlaoui N, Beauté J, Brosselin P, Dudoit Y, et al. Protective effect of IgM against colonization of the respiratory tract by nontypeable *Haemophilus influenzae* in patients with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(3):770–7.
55. Hodgkinson JP, Bangs C, Wartenberg-Demand A, Bauhofer A, Langohr P, Buckland MS, et al. Low IgA and IgM is associated with a higher prevalence of bronchiectasis in primary antibody deficiency. *J Clin Immunol* 2017.
56. Quinti I, Soresina A, Guerra A, Rondelli R, Spadaro G, Agostini C, et al. Effectiveness of immunoglobulin replacement therapy on clinical outcome in patients with primary antibody deficiencies: results from a multicenter prospective cohort study. *J Clin Immunol*. 2011;31(3):315–22.
57. Saifi M, Wysocki CA. Autoimmune disease in primary immunodeficiency: at the crossroads of anti-infective immunity and self-tolerance. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2015;35(4):731–52.
58. Nguyen TT, Elsner RA, Baumgarth N. Natural IgM prevents autoimmunity by enforcing B cell central tolerance induction. *J Immunol*. 2015;194(4):1489–502.
59. Boes M, Schmidt T, Linkemann K, Beaudette BC, Marshak-Rothstein A, Chen J. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(3):1184–9.
60. Adachi T, Harumiya S, Takematsu H, Kozutsumi Y, Wabl M, Fujimoto M, et al. CD22 serves as a receptor for soluble IgM. *Eur J Immunol*. 2012;42(1):241–7.
61. Picchianti Diamanti A, Rosado MM, Scarsella M, Ceccarelli S, Laganà B, D’Amelio R, et al. Increased serum IgM, immunodeficiency, and autoimmunity: a clinical series. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2015;28(4):547–56.
62. Durandy A, Revy P, Imai K, Fischer A. Hyper-immunoglobulin M syndromes caused by intrinsic B-lymphocyte defects. *Immunol Rev*. 2005;203:67–79.
63. Hase K, Takahashi D, Ebisawa M, Kawano S, Itoh K, Ohno H. Activation-induced cytidine deaminase deficiency causes organ-specific autoimmune disease. *PLoS One*. 2008;3(8):e3033.
64. Vyse TJ, Kotzin BL. Genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol*. 1996;8(6):843–51.
65. Kaufman HS, Hobbs JR. Immunoglobulin deficiencies in an atopic population. *Lancet*. 1970;2(7682):1061–3.
66. Fallon KE. Inability to train, recurrent infection, and selective IgM deficiency. *Clin J Sport Med*. 2004;14(6):357–9.
67. Entezari N, Adab Z, Zeydi M, Saghafi S, Jamali M, Kardar GA, et al. The prevalence of selective immunoglobulin M deficiency (SIgMD) in Iranian volunteer blood donors. *Hum Immunol*. 2016;77(1):7–11.
68. Özcan C, Metin A, Erkoçoğlu M, Kocabaş CN. Allergic diseases in children with primary immunodeficiencies. *Turk J Pediatr*. 2014;56(1):41–7.
69. Baker N, Ehrenstein MR. Cutting edge: selection of B lymphocyte subsets is regulated by natural IgM. *J Immunol*. 2002;169(12):6686–90.
70. Thorarinsdottir K, Camponeschi A, Gjertsson I, Mårtensson IL. CD21^{low} B cells: a snapshot of a unique B cell subset in health and disease. *Scand J Immunol*. 2015;82(3):254–61.
71. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008;111(1):77–85.
72. Vogelzang NJ, Corwin H, Finlay JL, Pelletiere EV, Luskin AT, Di Camelli RF, et al. Clear cell sarcoma and selective IgM deficiency: a case report. *Cancer*. 1982;49(2):234–8.73.
73. Guill MF, Brown DA, Ochs HD, Pyun KH, Moffitt JE. IgM deficiency: clinical spectrum and immunologic assessment. *Ann Allergy*. 1989;62(6):547–52.
74. Endoh M, Kaneshige H, Tomino Y, Nomoto Y, Sakai H, Arimori S. Selective IgM deficiency: a case study. *Tokai J Exp Clin Med*. 1981;6(3):327–31.
75. Raziuddin S, Bilal N, Benjamin B. Transient T-cell abnormality in a selective IgM-immunodeficient patient with *Brucella* infection. *Clin Immunol Immunopathol*. 1988;46(3):360–7.

Annex IV

CHOVANCOVA, Zita*(corresponding author)*, Milan KUMAN, Marcela VLKOVA a Jiri LITZMAN. Successful renal transplantation in a patient with a Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene mutation. *Transplant International* [online]. 2015, 28(8), 1005–1009. ISSN 0934-0874. Dostupné z: doi:10.1111/tri.12583

Document Type: Article; IF = 2,835

CASE REPORT

Successful renal transplantation in a patient with a Wiskott–Aldrich syndrome protein (*WASP*) gene mutation

Zita Chovancova,^{1,2} Milan Kuman,³ Marcela Vlkova^{1,2} and Jiri Litzman^{1,2}

1 Department of Clinical Immunology and Allergy, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic

2 Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

3 Cardiovascular and Transplant Surgery Centre, Brno, Czech Republic

Keywords

IgA nephropathy, immunodeficiency, renal transplantation, Wiskott–Aldrich syndrome.

Correspondence

Zita Chovancova, Department of Clinical Immunology and Allergy, St. Anne's University Hospital in Brno, Pekarska 53, 65691 Brno, Czech Republic.

Tel.: + 420 543 183 129;

fax: + 420 543 183 143;

e-mail: zita.chovancova@fnusa.cz

Conflicts of interest

The authors of this manuscript have no conflict of interest to declare.

Received: 2 December 2014

Revision requested: 26 February 2015

Accepted: 7 April 2015

Published online: 30 April 2015

doi:10.1111/tri.12583

Introduction

Wiskott–Aldrich syndrome (WAS) is a rare, X-linked primary immunodeficiency disorder [1] caused by mutations in the WAS protein (*WASP*) gene [2]. The WAS protein is exclusively expressed in haematopoietic cells and is a key regulator of actin polymerization [3,4].

The clinical manifestations in patients with *WASP* mutations are highly variable and depend on the type of gene mutation [5]. The majority of patients suffer from classical WAS, characterized by a triad of small-platelet thrombocytopenia with bleeding tendency, recurrent infections and severe eczema, with an increased risk of autoimmune disorders and lymphoid malignancies. Patients with X-linked thrombocytopenia, a milder variant of WAS, suffer predominantly from thrombocytopenia [6]. If not treated with

Summary

Wiskott–Aldrich syndrome (WAS) is a rare primary immunodeficiency disorder caused by mutations in the WAS protein (*WASP*) gene. Renal disease progressing to renal failure is a well-recognized complication in patients with WAS. Only a few case reports of renal transplantation have been reported to date. Here, we present a patient with a *WASP* mutation who suffered from severe atopic eczema, mild thrombocytopenia and only a slightly increased frequency of infections, who then developed IgA nephropathy and consequently underwent renal transplantation, which was successful. This study demonstrates that renal transplantation is possible in patients with WAS, regardless of conceivable complications.

haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in infancy or childhood, patients with WAS die of intracerebral bleeding, severe infections or lymphoma. Only in a minority of cases with a mild clinical course do patients survive into adulthood without HSCT.

Autoimmune diseases are frequent complications in patients with WAS, the most common being autoimmune haemolytic anaemia [7,8]. Renal disease, a common complication in *WASP* deficiency, is observed in 3.5–19.0% of all cases [8,9] and includes membranoproliferative glomerulonephritis, interstitial nephritis and IgA nephropathy (IgAN) [10,11]. All of these renal diseases may progress to chronic renal failure requiring renal transplantation, which may be difficult and disfavoured by transplant surgeons due to established immunodeficiency in patients with WAS. Therefore, only a few cases of kidney transplantation

have been reported in the literature [12–14] with low success rates.

Here, we report a patient with a *WASP* mutation who suffered from severe atopic eczema and mild thrombocytopenia without bleeding tendency and only a mildly increased occurrence of infections who developed IgAN and consequently underwent renal transplantation, which was successful.

Case report

The patient was referred for immunological investigation at the age of 16 years because of severe eczema that began in his first month of life and an incidental finding of thrombocytopenia with small platelets (Table 1). He suffered from a slightly increased frequency of mild, recurrent respiratory tract infections without severe or life-threatening complications. The immunological investigation revealed the typical picture of patients with WAS (Table 1). Mutation analysis of *WASP* showed a splice site mutation (3' intron + 4, CTC to CCC) in exon 11, which was highly likely to be disease-causing. Subsequent Western blot analysis revealed residual expression of *WASP*.

At 17 years, mild haematuria and proteinuria were observed. A renal biopsy performed at 21 years showed IgAN, but no treatment was necessary. However, at 26 years, the patient developed end-stage renal failure [urea: 18.3 mmol/l and serum creatinine (SCr): 349 µmol/l] with anaemia and hypertension. Intravenous immunoglobulin (IVIg) replacement (250 mg/kg/month) was initiated at 27 years, even though the patient did not suffer from a markedly increased frequency of infections. Haemodialysis was also initiated.

Eight months after haemodialysis was initiated, the patient underwent kidney transplantation from a deceased donor. There was only one mismatch in the B locus (donor: B13, 14 and recipient: B13, 62); no special induction therapy was used. The patient's primary immunosuppression regimen consisted of mycophenolate mofetil (1.0 g/day), tapering to 0.5 g/day on day +60; 10 mg/kg of cyclosporine A (CyA), tapering to a target 2-h postdose (C2) concentration of 1300 ng/ml ±20% for 1–3 months, 1100 ng/ml ±20% for 4–6 months and 900 ng/ml ±20% for 6–7 months after transplantation; and intravenous methylprednisolone doses of 500, 250, 125 and 40 mg on days 1, 2, 3 and 4, respectively, followed by 30 mg of prednisone on day 5, decreasing to 5 mg/day on day +90. Because the patient developed

Table 1. Typical laboratory findings in patients with Wiskott–Aldrich syndrome and laboratory findings in the current patient.

Laboratory investigation (reference ranges)	Typical laboratory findings in patients with WAS	At the time of diagnosis (16 years)	At the time of CRF biopsy-confirmed IgAN (26 years)	1 month before RT (27 years)	3 years after RT (good graft function)	6.5 years after RT (recurrence of IgAN)	3 years after GF waiting for the second RT
IgG (7.51–15.60 g/l)	Within a normal range	10.6	9.0	9.12*	10.90*	7.16*	12.00*
IgA (0.82–4.53 g/l)	Increased	6.4	10.30	6.56	10.30	6.79	6.19
IgM (0.46–3.04 g/l)	Decreased	0.28	0.18	0.10	0.16	0.14	0.18
IgE (0–100 IU/ml)	Increased	644	2660	n.d.	1190	1210	594
CD3 ⁺ (0.90–2.80 × 10 ⁹ l)	NA	0.90	0.66	1.00	4.02	1.01	0.96
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (0.40–1.40 × 10 ⁹ l)	NA	n.d.	0.49	0.77	1.07	0.59	0.39
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (0.20–0.90 × 10 ⁹ l)	NA	n.d.	0.15	0.22	2.78	0.32	0.48
CD19 ⁺ (0.1–0.5 × 10 ⁹ l)	NA	n.d.	0.15	0.16	0.13	n.d.	0.07
CD16 ⁺ /56 ⁺ (0.09–0.60 × 10 ⁹ l)	NA	n.d.	0.38	0.39	0.13	n.d.	0.10
IgG anti-TET (>0.120 IU/ml)	NA	0.170†	0.115†	0.100†	n.d.	n.d.	n.d.
IgG anti-PPS (>15.4 mg/l)	NA	16.5†	99.3†	87.2†	n.d.	n.d.	n.d.
IgG anti-HIB (0.09–17.7 mg/l)	NA	0.013†	0.703†	0.182†	n.d.	n.d.	n.d.
PLT (150–400 × 10 ⁹ /l)	Decreased	34	30	50	82	49	51
MPV (7.80–11.00 fl)	Decreased	6.5	7.9	8.80	8.50	8.20	8.20
Urea (1.70–8.30 mmol/l)	NA	5.4	18.3	9.00	9.40	22.20	20.40
Serum creatinine (44–115 µmol/l)	NA	72	349	434	109	309	728

CD3⁺, T lymphocytes; CD3⁺CD4⁺, helper and regulatory T lymphocytes; CD3⁺CD8⁺, cytotoxic T lymphocytes; CD19⁺, B lymphocytes; CD16⁺/56⁺, NK cells; anti-TET, antibodies against tetanus toxoid; anti-PPS, antibodies against pneumococcal polysaccharides; anti-HIB, antibodies against *Haemophilus influenzae type b*; PLT, platelets; MPV, mean platelet volume; GFR, glomerular filtration rate; IVIG, intravenous immunoglobulin; CRF, chronic renal failure; RT, renal transplantation; WAS, Wiskott–Aldrich syndrome; IgAN, IgA nephropathy; GF, graft failure; NA, not applicable; n.d., not determined.

*The patient was on IVIG treatment at a dose of 250 mg/kg/month.

†The patient was vaccinated only against tetanus toxoid within regular immunization schedule in the Czech Republic.

cyclosporine gingival hyperplasia 7 months after transplantation, CyA was switched to tacrolimus, with a target level of 4–6 µg/l. The postoperative course was uncomplicated with good graft function; at discharge on day 28, the patient's SCr level was 148 µmol/l and the glomerular filtration rate (GFR) was 0.940 ml/s. Despite normal clinical practice in immunocompetent patients, the administration of prednisone was terminated 18 months after transplantation. At that time, the patient had stable renal function (SCr 114 µmol/l, GFR 1.450 ml/s).

In the subsequent post-transplantation period, the patient continued with IVIG treatment (250 mg/kg/month) and his atopic eczema markedly improved, although chronic lichenification persisted. During this stable period, his immunosuppression regime consisted of tacrolimus and mycophenolate mofetil. He did not suffer from an increased frequency of respiratory tract infections; facial herpes zoster at the age of 32 was successfully treated with oral acyclovir. Also at 32 years of age, warm-type autoimmune haemolytic anaemia was successfully treated with methylprednisolone therapy, tapering from a dose of 32 mg to 4 mg by stepping down the dose every 2 days. This 6.5-year-long post-transplantation period was uneventful, enabling the patient to work at a part-time job.

At the age of 35, the patient suffered from oedema of his lower extremities. A graft biopsy showed a relapse of IgAN (treated by 250 mg pulse dosing intravenous methylprednisolone for 3 days followed by increase in oral methylprednisolone to 16 mg/day for 2 weeks without clinical effect). A rapid decrease in graft function over 3 months led to reinitiation of the haemodialysis programme 6.5 years after transplantation. One year later, the patient was hospitalized in the neurosurgery department for an otogenic brain abscess caused by *Pseudomonas aeruginosa*. His condition was successfully treated with stereotactic puncture and

cefotaxime with metronidazole. This therapy led to complete interruption of the immunosuppressive treatment.

At the time that this case report was completed, 10 years had elapsed since the first transplantation. The patient was 38 years of age, was in a relatively stable state, did not have significant immunodeficiency symptoms and was waiting for a second suitable donor.

Discussion

Several renal diseases may lead to renal failure in patients with WAS; IgA nephropathy has been diagnosed in a majority of these cases [15]. In addition to our case, 10 cases of WAS/X-linked thrombocytopenia (XLT) with biopsy-confirmed nephropathy were previously described [10]. To our knowledge, we describe the first case of successful renal transplantation without serious complications over 6.5 years of good kidney graft function in a patient with a WASp mutation and biopsy-proven IgAN.

Renal transplantation is complex in patients with WAS due to the underlying immunodeficiency and the increased risk of lymphoma [12]. Therefore, only a few cases of renal transplantation have been reported (Table 2). The first three reported transplantations were performed in the 1990s, when the standard triple-therapy protocol used for transplantation consisted of azathioprine (2.0 mg/kg), CyA (5.0 mg/kg) and prednisone (0.5 mg/kg) [16]. The immunosuppressive treatment in patients described by Webb *et al.* [14] and Meisels *et al.* [13] was reduced in comparison with that used in immunocompetent patients, but Fischer *et al.* [12] used standard doses of this triple immunosuppressive therapy. The higher, standard doses could be the reason for the fatal outcome in the latter patient, who had complications from multiple infections and lymphoid malignancy 3 months after transplantation (Table 2).

Table 2. Three previously reported cases of renal transplantation in patients with WAS.

Patient	Biopsy	Type of RT	Immunosuppression			Outcome	References
			AZA	CyA	MPD		
46-year-old man	MesPGN	One haplotype matched; deceased donor	1.0 mg/kg	5.0 mg/kg (CO: 100–150 ng/ml)	0.5 mg/kg	No rejection; death 35 months after RT (probable cardiac cause)	[14]
33-year-old man	MPGN	Deceased donor	1.0 mg/kg	8.0 mg/kg (CO: 250–375 ng/ml)	0.3 mg/kg	BPCR on day 26 after RT	[13]
41-year-old man	n.d. (brother IgAN)	One Haplotype matched; living related donor	2.0 mg/kg	CO: 200–250 ng/ml	0.5 mg/kg	BPCR on day 76 after RT; multiple infectious complications and lymphoid malignancy; death 3 months after RT	[12]

AZA, azathioprine; CyA, cyclosporine A; MPD, methylprednisolone; MesPGN, mesangioproliferative glomerulonephritis; MPGN, membranoproliferative glomerulonephritis; CO, trough level; BPCR, biopsy-proven cellular rejection; RT, renal transplantation; n.d., not determined.

Because azathioprine was replaced with mycophenolate mofetil in combination with CyA or tacrolimus and prednisone as the standard protocol at the end of the 1990s [17,18], our patient was treated with a standard dose of mycophenolate mofetil, prednisone and CyA, which was switched to a standard dose of tacrolimus. In our patient, steroid therapy was interrupted 18 months after transplantation to decrease the risk of infectious complications.

Patients with WAS/XLT were recently shown to produce aberrant galactose-deficient IgA, which can participate in development of IgAN [19]. Furthermore, HSCT ameliorated IgAN and causes decrease in aberrant IgA in the serum of patient with WAS [20]. Nevertheless, HSCT was not indicated in our patient because of mild clinical course of the disease.

Unlike our case, all three previously reported WAS transplant patients had strong family histories of WAS disease, and the clinical features typical for these patients were well expressed. Although he has a WASP mutation, our patient likely suffers from a mild clinical form of WAS, particularly regarding infectious complications, which could explain his uneventful post-transplant period.

In conclusion, our case of successful renal transplantation reinforces the fact that renal transplantation is possible in patients with WAS, especially those with a milder clinical form of the disease, regardless of possible complications. These patients may tolerate appropriately reduced chronic immunosuppressive treatment.

Authorship

ZC: collected the data and wrote the paper. MK: contributed clinical data. MV: contributed laboratory data. JL: supervised the evaluation and interpretation of data and clinical information.

Funding

This work was supported by the project “Employment of Newly Graduated Doctors of Science for Scientific Excellence” (CZ.1.07/2.3.00/30.0009) co-financed from European Social Fund and the state budget of the Czech Republic.

Acknowledgements

The authors acknowledge Dr. Alison Jones (Immunology Department of Great Ormond Street Hospital for Children in London) for mutation analysis.

References

1. Albert MH, Notarangelo LD, Ochs HD. Clinical spectrum, pathophysiology and treatment of the Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol* 2011; **18**: 42.

2. Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 1994; **79**: following 922.
3. Moulding DA, Record J, Malinova D, Thrasher AJ. Actin cytoskeletal defects in immunodeficiency. *Immunol Rev* 2013; **256**: 282.
4. Matalon O, Reicher B, Barda-Saad M. Wiskott-Aldrich syndrome protein—dynamic regulation of actin homeostasis: from activation through function and signal termination in T lymphocytes. *Immunol Rev* 2013; **256**: 10.
5. Notarangelo LD, Miao CH, Ochs HD. Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol* 2008; **15**: 30.
6. Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, et al. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood* 2010; **115**: 3231.
7. Catucci M, Castiello MC, Pala F, Bosticardo M, Villa A. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: an unsolved enigma. *Front Immunol* 2012; **3**: 209.
8. Dupuis-Girod S, Medioni J, Haddad E, et al. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics* 2003; **111**: e622.
9. Imai K, Morio T, Zhu Y, et al. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood* 2004; **103**: 456.
10. Liu CH, Wu KH, Lin TY, et al. Wiskott-Aldrich syndrome with IgA nephropathy: a case report and literature review. *Int Urol Nephrol* 2013; **45**: 1495.
11. DeSanto NG, Sessa A, Capodicasa G, et al. IgA glomerulonephritis in Wiskott-Aldrich syndrome. *Child Nephrol Urol* 1988; **9**: 118.
12. Fischer A, Binet I, Oertli D, Bock A, Thiel G. Fatal outcome of renal transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1996; **11**: 2077.
13. Meisels IS, Strom TB, Roy-Chaudhury P, Abrams J, Shapiro ME. Renal allograft rejection in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Transplantation* 1995; **59**: 1214.
14. Webb MC, Andrews PA, Koffman CG, Cameron JS. Renal transplantation in Wiskott-Aldrich syndrome. *Transplantation* 1993; **56**: 1585.
15. Matsukura H, Kanegane H, Miya K, et al. IgA nephropathy associated with X-linked thrombocytopenia. *Am J Kidney Dis* 2004; **43**: e7.
16. Johnson RW. Primary regimens in immunosuppression. *Nephrol Dial Transplant* 1995; **10**(Suppl. 1): 101.
17. Mathew TH. A blinded, long-term, randomized multicenter study of mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation: results at three years. Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. *Transplantation* 1998; **65**: 1450.
18. Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RW, et al. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994–2004. *Am J Transplant* 2006; **6**: 1111.

19. Shimizu M, Kanegane H, Wada T, *et al.* Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**: 587.
20. Hoshino A, Shimizu M, Matsukura H, *et al.* Allogeneic bone marrow transplantation appears to ameliorate IgA nephropathy in a patient with X-linked thrombocytopenia. *J Clin Immunol* 2014; **34**: 53.

Annex V

CHOVANCOVÁ, Z.*(corresponding author)*, P. FILIPENSKÝ, S. ROTNÁGLOVÁ, I. STANICZKOVÁ ZAMBO, T. SHATOKHINA, K. NOVOSÁDOVÁ a J. LITZMAN. **IgG4 immunoglobulin subclass and related pathological conditions or how to effectively imitate cancer disease.** *Klinicka Onkologie* [online]. 2022, 35(1), 20–31. Dostupné z: doi:10.48095/ccko202220

Document type: Article

Podtřída imunoglobulinů IgG4 a s ní související patologické stavy aneb jak účinně imitovat nádorové onemocnění

IgG4 immunoglobulin subclass and related pathological conditions or how to effectively imitate cancer disease

Chovancová Z.¹, Filipenský P.², Rotnáglová S.³, Staniczková Zambo I.⁴, Shatokhina T.⁴,
Novosádová K.⁵, Litzman J.¹

¹ Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

² Urologické oddělení LF MU a FN u sv. Anny v Brně

³ Onkologicko-chirurgické oddělení LF MU a FN u sv. Anny v Brně

⁴ I. ústav patologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně

⁵ Klinika zobrazovacích metod LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Souhrn

Východiska: IgG4 tvoří nejméně zastoupenou podtřidu imunoglobulinů G (IgG) a od ostatních protilátek se odlišují svými zvláštními vlastnostmi. I když jejich funkce v imunitní odpovědi není zcela jasná, uplatňují se zejména v regulaci imunitní odpovědi. IgG4 je tvořen v důsledku chronické nebo silné antigenní stimulace, přičemž v takové situaci se stává dominantně tvořenou podtřidou IgG. IgG4 hrají klíčovou roli v imunitní toleranci u alergií a nádorů. Tolerogenní potenciál IgG4 se uplatňuje v léčbě alergických onemocnění pomocí alergenové imunoterapie, zároveň se však také podílí na navození imunologické tolerance v mikroprostředí nádorů, což podporuje nádorovou progresi. S IgG4 souvisí poměrně nedávno popsané skupiny patologických stavů. Kromě IgG4-autoimunitních onemocnění se jedná zejména o IgG4-asociovaná onemocnění (IgG4-related disease – IgG4-RD). Jedná se o skupinu imunitně podmíněných onemocnění, u kterých dochází k tvorbě fibrózních a sklerotizujících ložisek v různých orgánech lidského těla, což vede k postupnému poškození jejich funkce. Mezi nejčastěji postižené orgány patří pankreas a velké slinné žlázy, přičemž dalšími postiženými orgány bývají orbity a slzné žlázy, biliární cesty, plíce, ledviny, retroperitoneum, aorta, meningy a štítná žláza. Není zcela jasné, zda se u těchto pacientů vyskytují nádorová onemocnění s vyšší frekvencí oproti běžné populaci, nicméně vztah mezi IgG4 a nádorovými onemocněními má ještě jinou rovinu. IgG4-RD totiž velmi často v zobrazovacích metodách imponují jako pokročilá nádorová onemocnění, proto by se na jejich existenci mělo myslet také v diferenciální diagnostice maligních stavů. **Cíl:** Cílem tohoto sdělení je zvýšit povědomí klinických onkologů o diagnóze IgG4-asociovaných onemocnění, která mohou svým obrazem imitovat nádorová onemocnění různých orgánů v lidském těle. Proto je potřeba na ně pomýšlet také v diferenciální diagnostice maligních onemocnění.

Klíčová slova

IgG4 – IgG4-asociovaná choroba – imunoregulace – diferenciální diagnostika – malignita

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Zita Chovancová, Ph.D.

Ústav klinické imunologie
a alergologie

FN u sv. Anny v Brně

Pekařská 53

656 91 Brno

e-mail: zita.chovancova@fnusa.cz

Obdrženo/Submitted: 23. 3. 2021

Přijato/Accepted: 15. 4. 2021

doi: 10.48095/ccko202220

Summary

Background: IgG4 is the least represented subclass of human immunoglobulins G (IgG) in serum and differs from other antibodies by its unique biological properties. Although its function in the immune response is not entirely clear, it is mainly involved in the regulation of the immune response. It is formed as a result of chronic or strong antigenic stimulation; in such a case, it becomes a predominantly formed IgG subclass. IgG4 play a key role in the immune tolerance in allergies and tumors. The tolerogenic potential of IgG4 is used in the treatment of allergic diseases using the allergen immunotherapy; at the same time, it is also involved in inducing the immunological tolerance in the microenvironment of tumors, which promotes tumor progression. The increase of serum IgG4 is associated with relatively recently described groups of diseases. In addition to the IgG4-autoimmune diseases, it is mainly connected with IgG4-associated diseases (IgG4-RD) where various organs of the human body are affected by the formation of fibrous and sclerosing deposits in this group of the immune-mediated diseases, which leads to specific organ dysfunction. The most commonly affected organs include the pancreas and large salivary glands; moreover, the orbits and lacrimal glands, the biliary tract, the lungs, the kidneys, the retroperitoneum, the aorta, the meninges, and the thyroid gland may also be affected. It is not entirely clear whether these patients have a higher prevalence of cancer than the general population; however, there is also another relationship between IgG4 and cancer. IgG4-RD very often imitate advanced cancer in medical imaging techniques, so its existence should also be considered in the differential diagnosis of malignancies. **Purpose:** The aim of this article is to draw attention of clinical oncologists to the issue of IgG4-associated diseases group which can mimic cancer condition in various organs in the human body. Therefore, it is necessary to bear them in mind in the differential diagnosis of malignant diseases.

Key words

IgG4 – IgG4-related disease – immunoregulation – differential diagnosis – malignancy

Úvod

Imunoglobuliny ve třídě IgG tvoří soubor čtyř podtříd (IgG1–IgG4), z nichž IgG4 jsou z hlediska koncentrace v séru nebo plazmě nejméně zastoupenou podtřídou [1]. Od ostatních protilátek i podtříd IgG se odlišují zvláštními vlastnostmi, které se vymykají obecné představě o funkci protilátek jako těch, které směřují a rozvíjejí imunitní odpověď ve smyslu její aktivace. Funkce IgG4 v imunitní odpovědi sice není v současné době ještě zcela objasněna, nicméně svou roli hrají v patogenezi nebo léčbě alergických, autoimunitních či nádorových onemocnění. Poměrně nedávno byla v souvislosti s touto podtřídou imunoglobulinů popsána nová nozologická jednotka s názvem IgG4-asociované onemocnění (IgG4-related disease – IgG4-RD), sdružující jednotlivá onemocnění s odpovídajícím charakterem postižení jednotlivých orgánů, které jsou klasicky vedeny jako samostatné choroby [2]. Do popředí klinického zájmu se v poslední době dostává také problematika IgG4-autoimunitních onemocnění (IgG4-autoimmune diseases – IgG4-AID) [3]. Tolerogenní potenciál IgG4 se uplatňuje v léčbě alergických onemocnění pomocí alergenové imunoterapie, na druhé straně se podílí na navození imunologické tolerance v mikroprostředí nádorů, což podporuje nádorovou progresi a umožňuje šíření nádorových buněk do okolních tkání a orgánů [4].

Vztah mezi IgG4 a nádorovými onemocněními má ještě další rovinu. IgG4-asociované onemocnění totiž v zobrazovacích metodách velmi často imponuje jako pokročilé nádorové onemocnění, proto by se na jeho existenci mělo myslet také v diferenciální diagnostice maligních stavů.

IgG4-asociované onemocnění (IgG4-RD)

Označení IgG4-RD zahrnuje skupinu imunitně podmíněných onemocnění asociovaných s fibroinflamací, jejímž následkem je tvorba fibrózních a sklerotizujících ložisek téměř v jakémkoli orgánu lidského těla [5]. Poprvé byla u pacienta s autoimunitní pankreatitidou popsána zvýšená koncentrace IgG4 v Japonsku v roce 2001 [6]. Od té doby se začaly objevovat v literatuře kazuistiky popisující postižení různých orgánů lidského těla doprovázená elevací sérové koncentrace IgG4 s podobným histologickým nálezem. Tato onemocnění pak byla postupně zařazena pod nové označení tzv. IgG4-asociovaného onemocnění (tab. 1). I když toto onemocnění může postihnout teoreticky jakýkoli orgán, nejčastěji bývá zasažen pankreas a velké slinné žlázy (submandibulární, sublinguální nebo parotická) [7,8]. Dalšími často postiženými orgány jsou slzné žlázy, plíce, ledviny, retroperitoneum a aorta, meninge a štítná žláza, ale i orbita nebo žlučové cesty [9]. Asi 60 % pacientů s IgG4-

-RD má v době diagnózy postižený více než jeden orgán [10]. Např. u pacientů s IgG4-asociovanou pankreatitidou bývají často postiženy také submandibulární slinné žlázy. To může pomoci pomyslet přednostně na diagnózu IgG4-RD a ušetřit pacienta invazivní pankreatektomie v důsledku podezření na nádor pankreatu [10].

S postupujícími znalostmi o tomto onemocnění byla samostatná orgánově specifická diagnostická kritéria doplněna v roce 2011 o všeobecná zevrubná diagnostická kritéria IgG4-RD [11]. Nicméně praktické zkušenosti s jejich používáním v následujících letech přinesly těžkosti v podobě ne vždy snadného provedení bioptického vyšetření některých postižených tkání, problematiky senzitivity a specifity v „cut off“ hladinách IgG4 svědčících pro tuto diagnózu, ale také obtíže s barvením IgG4 v bioptických materiálech. Proto byla tato kritéria v roce 2020 přepracována do podoby revidovaných zevrubných diagnostických kritérií, která se skládají z tří hlavních částí tvořených typickými klinickými a radiologickými znaky, sérologickými a patologickými znaky (tab. 2) [12]. U pacientů s pravděpodobnou nebo možnou diagnózou IgG4-RD je nutné zaměřit se na jednotlivá orgánově specifická diagnostická kritéria, jejichž splnění umožní definitivní stanovení diagnózy IgG4-RD (tab. 2). V rámci diferenciální diagnostiky těchto one-

Tab. 1. Přehled výskytu IgG4-asociovaných onemocnění.

Postižený orgán	IgG4-asociované onemocnění	Původní označení
hypofýza	IgG4-asociovaná hypofyzitida	autoimunitní hypofyzitida
oko	IgG4-asociované oční onemocnění	Mikuliczova choroba
	IgG4-asociovaná dakryoadenitida	
	IgG4-asociovaný pseudotumor	
	IgG4-asociovaná orbitální myozitida	
slinné žlázy	IgG4-asociovaná sialoadenitida	Mikuliczova choroba
	IgG4-asociovaná parotitida	
	IgG4-asociované postižení submandibulární žlázy	Mikuliczova choroba Küttnerův tumor
dura mater	IgG4-asociovaná pachymeningitida	hypertrofická pachymeningitida
štítná žláza	IgG4-asociovaná thyroditida	Riedelova thyroditida
aorta	IgG4-asociovaná aortitida/arteritida	zánětlivé aneuryzma aorty
srdce	IgG4-asociovaná perikarditida	
mediastinum	IgG4-asociovaná mediastinitida	fibrózní mediastinitida
plíce	IgG4-asociovaná pleuritida	
prsní žlázy	IgG4-asociovaná mastitida	
gastrointestinální trakt	IgG4-asociovaná pankreatitida	autoimunitní pankreatitida (I. typu)
	IgG4-asociovaná sklerozující cholangitida	
	IgG4-asociovaná cholecystitida	
ledviny	IgG4-asociované postižení ledvin	tubulointersticiální nefritida
retroperitoneum	IgG4-asociovaná retroperitoneální fibróza	Ormondova choroba
prostata	IgG4-asociovaná prostatitida	
kůže	IgG4-asociované kožní onemocnění	kožní pseudolymfom

Tab. 2. Revidovaná zevrubná diagnostická kritéria IgG4-asociovaných onemocnění.

Klinická a radiologická diagnostická kritéria

- v jednom nebo více orgánech se nachází typický otok, hmota nebo noduly
- pokud je postižen jen jeden orgán, nemusí být přítomno zvětšení lymfatických uzlin

Sérologická diagnostická kritéria

- sérová koncentrace IgG4 je > 1,35 g/l (referenční rozmezí 0,08–1,4 g/l)

Patologická diagnostická kritéria

- pozitivita dvou ze tří následujících patologických kritérií
 - 1) denzní lymfocytární infiltrace a infiltrace plazmatickými buňkami s fibrózou
 - 2) poměr IgG4⁺ plazmatických buněk/ IgG4 buněk > 40 % a počet IgG4⁺ plazmatických buněk > 10 na jedno zorné pole při největším zvětšení
 - 3) typická tkáňová fibróza (zejména storiformní fibróza a obliterativní flebitida)

Diagnóza

- definitivní (splnění bodů 1, 2 a 3)
- pravděpodobná (splnění bodů 1 a 3)
- možná (splnění bodů 1 a 2)

V případě pravděpodobné a možné diagnózy IgG4-RD se přistupuje k diagnostice podle platných orgánově specifických diagnostických kritérií pro IgG4-asociovanou autoimunitní pankreatitidu [71], sklerozující cholangitidu [72] a retroperitoneální fibrózu [73], dále IgG4-asociované postižení slzných a slinných žláz [74], ledvin [75], očí [76] a respiračního traktu [77].

Tab. 3. Diferenciální diagnostika zvýšené koncentrace IgG4.

Respirační onemocnění	bronchiectázie, chronická rhinosinusitida, astma bronchiale, idiopatická plicní fibróza, sarkoidóza, chronická pleuritida, emfyzém, fibrotizující mediastinitida, hypersenzitivní pneumonitida, rekurentní pneumonie
Onemocnění zažívacího traktu	postižení žlučových cest (zúžení žlučových cest nebo konkrement ve žlučových cestách), postižení pankreatu (pankreatitida, pankreatické cysty, insuficience pankreatu), cirhóza a postižení jater
Autoimunitní onemocnění	vaskulitidy (granulomatóza s polyangiitidou, Churgův-Straussův syndrom, polyarteritis nodosa), revmatoidní artritida, dermatopolymyozitida, primární sklerozující cholangitida, pemphigus vulgaris, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, Hashimotova thyreoiditida
Nádorová onemocnění	maligní melanom, cholangiokarcinom, nádory pankreatu, intraduktální papilární mucinózní neoplazie pankreatu
Další onemocnění	atopická dermatitida, laktózová intolerance, neurofibromatóza, psoriáza, Castlemanova choroba

mocnění je vždy nutné vyloučit nejdříve infekční zánětlivé stavy, maligní onemocnění (solidní tumory nebo maligní lymfomy) a další, především autoimunitní onemocnění (např. Sjögrenův syndrom, primární sklerozující cholangitidu, multicentrickou Castlemanovu chorobu, granulomatózu s polyangiitidou, sarkoidózu nebo eozinofilní granulomatózu s polyangiitidou). Je nutné též vyloučit sekundární formy retroperitoneální fibrózy, která se může rozvinout v důsledku nádorových onemocnění, infekcí, traumat, radioterapie, chirurgických zákroků nebo užívání některých léků [13]. V roce 2019 byla vydána také kritéria Americké revmatologické společnosti (diagnostická kritéria ACR/EULAR IgG4-RD), která však ve snaze o dosažení co nejvyšší specifity diagnostiky IgG4-RD potlačují její senzitivitu [14]. Nicméně přehlednost v diagnostice IgG4-RD pro klinické lékaře tato diagnostická kritéria přináší v tom, že pacienti s IgG4-RD jsou děleni dle postižených orgánů do čtyř základních fenotypů. Jedná se o postižení slinivky břišní, jater a žlučových cest (31 %), retroperitoneální fibrózu s aortitidou nebo bez ní (24 %), postižení oblasti hlavy a krku (24 %) a klasický Mikuliczův syndrom (postižení slzných, příušních a submandibulárních žláz) se systémovými příznaky (22 %) [14].

Onemocnění jako takové nezpůsobuje specifické klinické příznaky nebo bolestivost. Klinická manifestace vychází zejména z útlaku nebo poruchy funkce orgánů způsobené přítomností fibrózní masy, příp. zánětlivé odpovědi organismu. Mezi klinicky nejnapadnější

příznaky patří ty z důsledku obstrukce (např. obstrukční žloutenka z mechanického útlaku pankreatu nebo žlučových cest či obstrukční uropatie při retroperitoneální fibróze). Nеспецифické příznaky, jako je únava nebo bolest kloubů, nastupují většinou mírně a pozvolně, přičemž febrilie nebývají typickým příznakem [15]. U pacientů s postižením v hrudní oblasti se může objevit kašel, dušnost a bolesti na hrudi. Lymfadenopatie bývá většinou symetrická, vyskytující se ve více oblastech, jako je krk, axily, plicní hily a mediastinum. Lymfatické uzliny bývají mírně zvětšené, dobře ohraničené a většinou akumulují fludeoxyglukózu (FDG) na PET/CT. Kardiální postižení představuje pseudotumory koronárních arterií, aneurysmata a perikardiální ztluštění. Periaortitida/periarteritida typická pro IgG4-RD postižení se manifestuje jako zbytnění adventicie aorty, plicních arterií nebo velkých cév s aneurysmatickým rozšířením nebo bez něj [16]. U pacientů s postižením pankreatu se může rozvinout diabetes mellitus nebo hubnutí v důsledku pankreatické exokrinní dysfunkce [15]. V důsledku postižení retroperitonea se objevují bolesti zad nebo hydronefrotické postižení ledvin. Krom toho se může objevit také renální selhání v důsledku tubulointericiální glomerulonefritidy [17]. Při postižení štítné žlázy se objevují příznaky hypothyreoidizmu, v případě poruchy hypofýzy pak hypopituitarizmu. Postižení meningů se může projevit obrnou hlavových nervů. Při dalším postižení v oblasti hlavy se může objevit ztráta sluchu nebo čichu, suchost v ústech nebo po-

rucha tvorby slz či porucha vízu nebo diplopie [18].

Základním diagnostickým kritériem je typický histologický obraz, kam patří zejména lehká až střední infiltrace eozinofily, storiformní fibróza, obliterativní flebitida a infiltráty velkého množství IgG4⁺ plazmatických buněk [19]. K diagnóze IgG4-RD může přispět stanovení sérové koncentrace IgG4, která by se měla dle diagnostických kritérií pohybovat nad 1,35 g/l. Tato hodnota má dle velkých kohortových studií senzitivitu asi 97 % a specifita se blíží k 80 % [12,20]. Obecně platí, že čím více orgánů je tímto onemocněním postiženo, tím vyšší bude pravděpodobnost zvýšené koncentrace IgG4 [10]. Zvýšení koncentrace IgG4 nad 2,8 g/l pomáhá odlišit IgG4-asociované onemocnění od ostatních patologických stavů a umožňuje předpokládat multiorgánové postižení [21]. Celkově vzato však elevace sérové koncentrace IgG4 představuje většinou spíše pomocný ukazatel, protože zvýšení koncentrace IgG4 v séru diagnózu jednoznačně nepotvrzuje, na druhou stranu její normální koncentrace naopak sto procentně nevyvrací (tab. 3). Např. u pacientů s adenokarcinomem pankreatu, lymfomy nebo ANCA-asociovanými vaskulitidami můžeme nacházet zvýšenou sérovou koncentraci IgG4, zatímco u pacientů s histologicky potvrzenou IgG4-RD může být sérová koncentrace IgG4 v normě [10]. Nicméně opětovná elevace sérové koncentrace IgG4 u pacientů s původně zvýšenou koncentrací IgG4 v době diagnózy může upozornit na možný relaps IgG4-asociovaného

onemocnění. Mezi další používané indikátory relapsu patří koncentrace IgE a eozinofilie [22,23]. Zdá se, že kombinace sérové koncentrace IgG2 > 5,3 g/l (referenční rozmezí 1,5–6,4 g/l) společně s elevací IgG4 by se mohla stát novým indikátorem IgG4-RD [24]. Mezi další sledované potenciální biomarkery tohoto onemocnění patří stanovování koncentrace solubilního IL-2 receptoru odrážející T-buněčnou aktivaci [25], zvýšení počtu cirkulujících plazmablastů nebo paměťových B lymfocytů [26].

První linií léčby těchto onemocnění jsou glukokortikoidy (většinou prednison v dávce 0,5–1,0 mg/kg/den). Úvodní dávka glukokortikoidů by měla být ponechána po dobu 2–4 týdnů a následně se pozvolna snižovat. Celkově by léčba glukokortikoidy měla trvat asi 3–6 měsíců [27]. V druhé linii léčby je při nedostatečném efektu kortikoterapie možno využít také anti-CD20 monoklonální protilátku (rituximab) [15,27,28]. Léčba touto monoklonální protilátkou vede k rychlému snížení koncentrace IgG4 a zlepšení klinických příznaků onemocnění [29]. V případě nedostatečného účinku monoterapie glukokortikoidy nebo nemožnosti nasazení B-buněčné depleční léčby je možné využít některého z klasických chorobu modifikujících léčiv (disease modifying antirevmatic drugs – DMARDs), a to buď v monoterapii, nebo v kombinaci s glukokortikoidy. Existují však jen malé studie ohledně použití konkrétních DMARDs (mykofenolátu mofetilu, azathioprinu nebo metotrexátu) u pacientů s tímto onemocněním [30]. Zkušenosti s touto léčbou jsou spíše extrapolovány z léčby autoimunitních onemocnění. Dle nejnovější metaanalýzy z Oxfordu se zdá, že kombinovaná léčba glukokortikoidy s imunosupresivou vede k vyššímu počtu remisí, nižšímu počtu relapsů a má podobný bezpečnostní profil jako indukční terapie glukokortikoidy, imunosupresivou nebo rituximabem. Glukokortikoidy v monoterapii vedou k vyššímu počtu relapsů v porovnání s ostatními léčebnými kombinacemi, rituximab významněji snižuje riziko relapsu onemocnění v porovnání s kombinovanou terapií kortikoidů s imunosupresivou [31]. Nicméně k definitivním závěrům je třeba větších prospek-

tivních studií, které v současné době nejsou k dispozici.

Zákeřnou diagnostickou výzvou tohoto vzácného onemocnění je bezesporu skutečnost, že makroskopický nálezná na zobrazovacích metodách a některé klinické příznaky tohoto onemocnění mohou velmi suggestivně imitovat nádorové onemocnění [32–37]. Např. dle britské studie bylo asi 39 % pacientů diagnostikováno s IgG4-asociovaným onemocněním poté, co bylo vzhledem k jejich klinickým potížím a úvodním vyšetřením (úbytek na váze, celkové nespecifické příznaky, masitkáň v zobrazovacích metodách) původně uvažováno o maligním onemocnění [38]. IgG4-asociované onemocnění bylo zpočátku mylně považováno např. za nádorové postižení nosních dutin, plic, pohrudnice, prsní tkáň, žlučníku, žlučovodů, slinivky břišní, ledvin, močodů, prostaty a dalších tkání a orgánů (některé konkrétní příklady jsou uvedeny v tab. 4).

Zatím zůstává nejasné, zda jsou pacienti s diagnózou IgG4-RD ve vyšším riziku rozvoje nádorového bujení v porovnání s běžnou populací. V některých studiích byl popsán zvýšený výskyt maligního bujení u pacientů s IgG4-asociovaným onemocněním, jiné tuto souvislost neprokázaly. Na stranu vyšší incidence nádorového bujení u pacientů s IgG4-RD se staví hned několik studií. První se zabývala kromě jiného výskytem maligních onemocnění u 166 pacientů s diagnózou IgG4-RD, kdy 17 pacientů mělo diagnostikováno maligní onemocnění již před stanovením diagnózy IgG4-RD a 9 pacientů až po stanovení diagnózy IgG4-RD, přičemž v této skupině pacientů byla celkově incidence maligních onemocnění 4,5× vyšší oproti očekávanému výskytu malignit ve standardní populaci [39]. Prospektivní studie výskytu maligních onemocnění u 587 čínských pacientů s diagnózou IgG4-RD trvajících asi 7 let odhalila 17 pacientů s malignitami, přičemž čtyři pacienti prodělali nádorové onemocnění před stanovením diagnózy IgG4-RD a 13 pacientů až poté. Pacienti s IgG4-RD měli v rámci sledované skupiny během 61,4 ± 26,4 měsíců sledování 2,78× zvýšené riziko rozvoje nádorového bujení

oproti běžné populaci, přičemž nejčastěji bylo maligním onemocněním postižením gastrointestinálního traktu [40]. Jedna skupina japonských vědců sledovala 158 pacientů s diagnózou IgG4-RD po dobu 12 let, kdy odhalili 34 maligních onemocnění [41], a druhá skupina popsala výskyt maligních onemocnění u 11 ze 106 pacientů s IgG4-RD do doby diagnózy IgG4-RD a 3,1 roku po stanovení diagnózy, což bylo v obou případech více než v běžné japonské populaci [42]. Také korejská skupina popsala zvýšený výskyt maligních onemocnění u pacientů s IgG4-RD oproti běžné populaci, protože malignitu prokázali u 12 ze 118 pacientů s IgG4-RD, přičemž nejčastější typ nádorového postižení představovaly lymfomy [43]. Na druhou stranu se dle pozorování Hirana et al maligní onemocnění vyskytlo u 13 ze 113 [44] a dle Inoueho et al u 13 z 235 sledovaných pacientů s IgG4-RD, což v obou případech odpovídalo očekávané incidenci maligních onemocnění v japonské populaci [8,44]. Data ze španělského registru také nepřinesla přesvědčivé důkazy o zvýšeném výskytu maligních onemocnění u pacientů s IgG4-RD [45].

Není také jasné, zda prodělané maligní onemocnění zvyšuje riziko následného rozvoje IgG4-asociovaného onemocnění. Tuto možnost naznačují výsledky jedné americké studie, která se zabývala výskytem malignit u 125 pacientů s diagnózou IgG4-RD. Maligním onemocněním trpělo před stanovením diagnózy IgG4-RD 20 ze 125 pacientů. Prevalence malignity byla v této skupině 2,5× vyšší než očekávaná prevalence v dané populaci a 3× vyšší než u kontrol srovnatelných věkem a pohlavím [46]. Dle autorů studie tyto výsledky naznačují, že maligní onemocnění mohou být asociována s následným rozvojem IgG4-asociovaného onemocnění.

Bylo také popsáno, že u pacientů s anamnézou maligního onemocnění se diagnóza IgG4-RD objevila v pozdějším věku a byla provázená zvýšenou sérovou koncentrací IgG4 v porovnání se skupinou pacientů, kteří historii maligního onemocnění neměli [47]. Zatím také nebyl popsán případ pacienta, u kterého by se IgG4-RD objevilo následně po prodělaném maligním procesu ve stejném

Tab. 4. Příklady chybné diagnostiky IgG4-asociovaného onemocnění – záměna za malignitu.

Postižený orgán	Pacient	Klinická manifestace	Zobrazovací vyšetření	Diagnosticko-terapeutický zákrok	Suspektní diagnóza	Definitivní diagnóza	IgG4 (g/l)	Lit.
nosní dutiny	Ž (71 let)	otok pravé tváře a mírná proptóza	CT a MR paranasálních dutin (masa v pravém maxilárním antru zasahující do dutiny nosní)	nazální biopsie	nazální tumor	IgG4-asociované postižení paranasálních dutin	1,6	[78]
plic	Ž (65 let)	produktivní kašel s hemoptýzou a váhovým úbytkem	CT plic (mnohočetné plicní, spíše solidní, opacity vč. mediastinální a hilové lymfadenopatie)	plicní biopsie	karcinom plic	IgG-asociované postižení plic	2,06	[79]
pohrudnice	M (65 let)	kašel a bolesti hrudního koše při kašli	CT hrudníku (mnohočetné pleurální ztlustění a lymfadenopatie)	pleurální biopsie	pleurální mezoteliom	IgG4-asociovaná pleuritida	2,53	[80]
prsni tkáň	Ž (70 let)	bolest v levém podpaží s levostrannou lymfadenopatií	CT hrudníku (mnohočetné noduly v prsní tkáni vlevo dle CT)	biopsie levé prsní žlázy	karcinom prsu	IgG4-asociovaná mastitida	8,82	[81]
žlučník	M (57 let)	bolest v oblasti pravého horního kvadrantu břicha trvající poslední rok	UZV a CT břicha (hypoechogenní masa v oblasti žlučníku s infiltrací jater)	biopsie žlučníku	karcinom žlučníku	IgG4-asociovaná cholecystitida	2,61	[82]
žlučovody	M (56 let)	nebolestivý obstrukční ikterus trvající 2 týdny	CT vyšetření břicha (symetrické zesílení v oblasti ductus hepaticus communis)	hepatektomie pravého laloku jater s extrahepatální resekci žlučovodů a regionální disekcí lymfatických uzlin	cholangio-karcinom	IgG4-asociovaná sklerozující cholangitida	7,23*	[83]
slinivka břišní	M (57 let)	obstrukční ikterus a lymfadenopatie submandibulárních žláz	MR břicha (masa tkáně v oblasti hlavy pankreatu)	biopsie z masy tkáně v oblasti hlavy pankreatu	karcinom pankreatu	IgG4-asociovaná pankreatitida	19,8	[34]
ledviny	Ž (54 let)	bolesti v oblasti levého boku a otok očních víček	CT břicha (renální pánevní hmota a hydronefróza levé ledviny)	levostranná nefroureterální cystektomie	karcinom ledviny	IgG4-asociovaná nefritida	18,6*	[35]
močovody	M (66 let)	levostranná hydronefróza v důsledku zesílení stěny močovodu	UZV břicha (bilaterální mírná hydronefróza)	laparoskopická nefroureterektomie	karcinom ureteru	IgG4-asociovaná nefritida a uretritida	9,13*	[84]
urachus	M (26 let)	opakované infekce močového traktu	UZV břicha (masa tkáně nad močovým měchýřem v oblasti urachu)	parciální cystektomie a umbilektomie	karcinom urachu	IgG4-asociované postižení urachu	2,27*	[85]

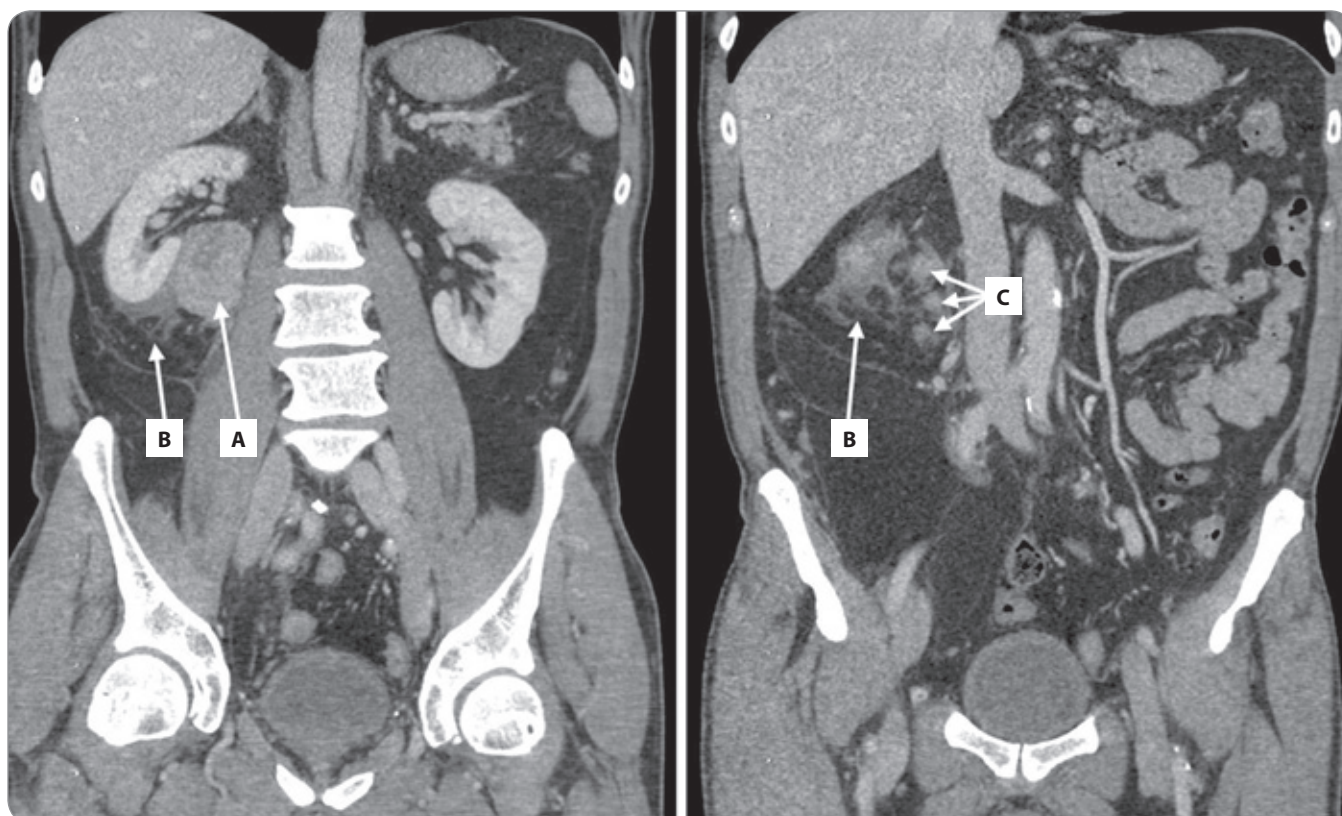
* Hodnoty sérové koncentrace IgG4 byly změřeny až po operačním odstranění části nebo celého orgánu postiženého IgG4-asociovanou chorobou.

Lit – literatura, IgG4 – sérová koncentrace IgG4 v době diagnózy, M – muž, Ž – žena

orgánu. Jsou však známy případy, kdy se malignita objevila v orgánu, kde bylo předtím histologicky prokázáno IgG4-

-asociované onemocnění [48]. Na druhou stranu je třeba vzít v úvahu také to, že patologické změny v zobrazovacích

metodách související s IgG4-asociovaným onemocněním mohou být považovány za metastázy, což může vést v ko-



Obr. 1. CT vyšetření břicha (koronární řezy).

A) Tumorózně se sytící ložisko v těsném sousedství pravé ledviny a musculus psoas major velikosti cca 50 × 36 mm; B) prosak tukové tkáně v okolí; C) další obdobně se sytící drobná ložiska s prosakem okolní tukové tkáně při kaudálním pólu ledviny.

nečném důsledku k poddiagnostikování této nozologické jednotky [49]. Příkladem imitace nádorového bujení na zobrazovacích metodách a také možného rozvoje maligního onemocnění u pacienta s IgG4-asociovaným onemocněním je také následující kazuistika.

Kazuistika pacienta s IgG4-asociovanou nefritidou následovanou karcinomem prostaty

Pacient (muž, narozen 1956) byl na naší imunologické ambulanci poprvé vyšetřen v září roku 2018. V únoru téhož roku podstoupil preventivní kolonoskopické vyšetření, během něž se nepodařilo pravděpodobně z anatomických příčin prohlédnout celé tlusté střevo. Proto bylo indikováno došetření pomocí CT břicha, kde bylo náhodně zachyceno suspektní tumorózní ložisko pravé ledviny. Pacient byl odeslán na urologické oddělení naší nemocnice k dalšímu řešení.

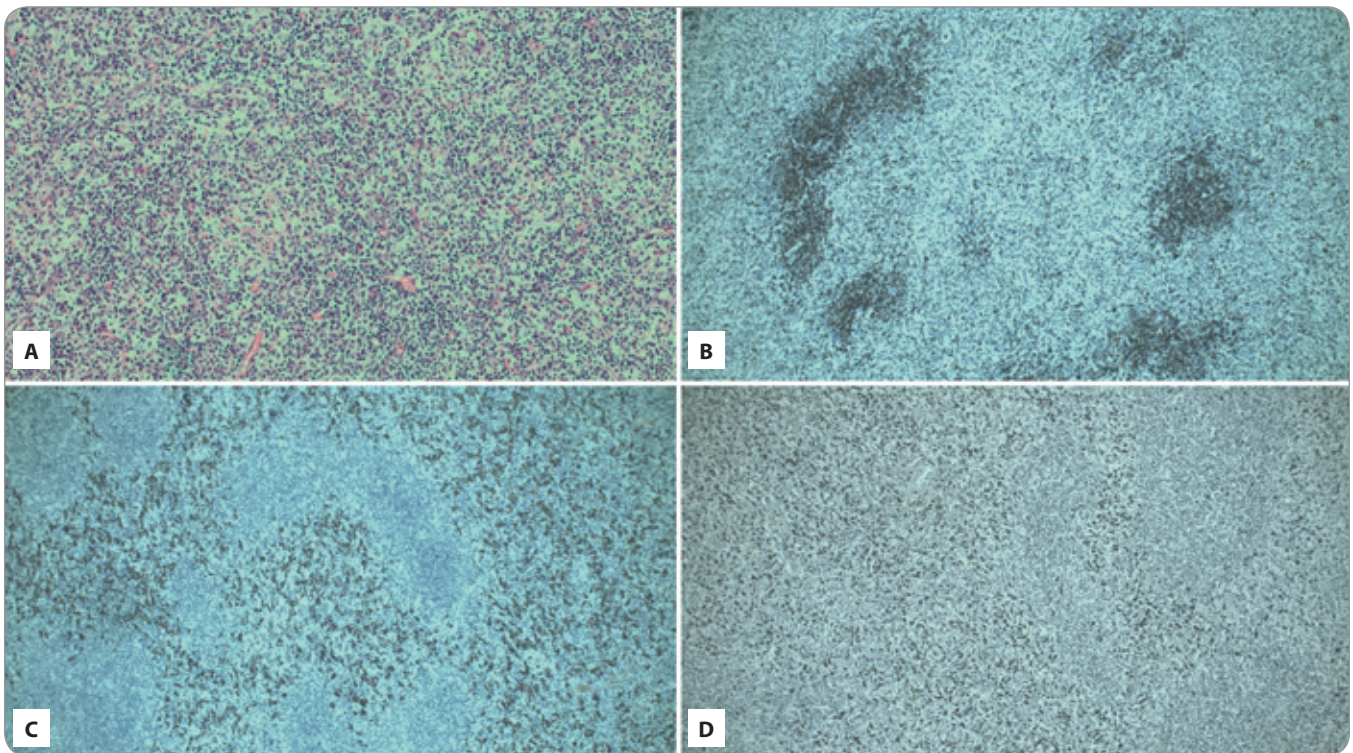
Kontrolní CT vyšetření břicha potvrdilo původní nález doprovázený dalšími dvěma drobnými perirenálními infil-

ráty tukové tkáně a zmnoženými vícečetnými uzlinami v okolí pravé ledviny, v paraaortální oblasti, mezenteriu a peritoneu (obr. 1). V červnu 2019 pacient podstoupil radikální pravostrannou nefrektomii a adrenalectomii. Nicméně histologické vyšetření vyloučilo maligní postižení ledviny. Jednalo se o ne zcela charakteristický histologický obraz polymorfní, pravděpodobně inflamatorní léze s multinodulárními okrsky denzní smíšené lymfoidní celulizace s dominující komponentou IgG⁺/IgG4⁺ plazmocytů, s vyšším podílem aktivovaných makrofágů, příměsí eozinofilů a multinukleárních makrofágů, dále s hypocelulárními úseky fibrózy se sporadickou reaktivní celulizací (obr. 2).

Pro možnou diagnózu IgG4-asociovaného postižení ledvin byl pacient odeslán k nám na imunologické vyšetření, které bylo provedeno v září 2019, tedy 3 měsíce po chirurgickém zákroku. Sérová koncentrace IgG4 byla 2,91 g/l (normální koncentrace 0,08–1,40 g/l), tedy splňující další z kritérií pro dia-

gnózu IgG4-asociovaného onemocnění (IgG4 > 1,35 g/l). V rámci došetření rozsahu IgG-asociovaného onemocnění bylo provedeno PET/CT vyšetření, které prokázalo nejméně tři metabolicky aktivní ložiska z více ložisek v dutině břišní, metabolicky aktivní oblast levého laloku prostaty s podezřením na IgG4-asociovanou prostatitidu a levého varlete a jistou mírnou aktivitu také ve sternoklavikulárním skloubení, distálním jícnu a štítné žláze.

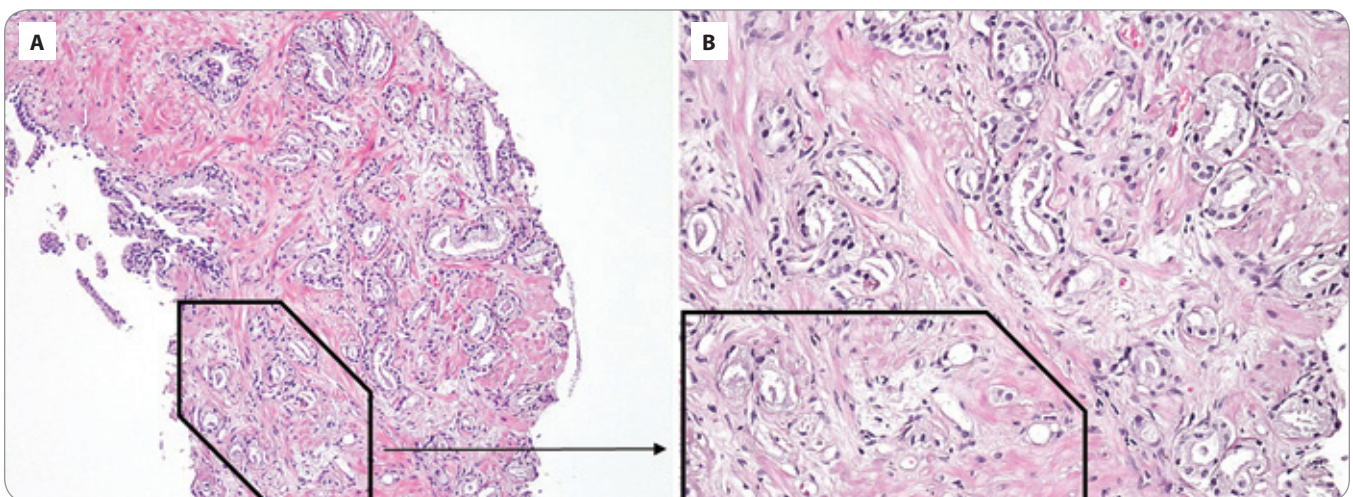
Pacient byl odeslán na kontrolní urologické vyšetření k došetření nálezu na prostatě. Koncentrace PSA byla v normě (4,06 µg/ml; referenční rozmezí 0–4,5 µg/ml), nicméně po domluvě s pacientem byla provedena radikální retropubická prostatektomie, z níž byl histologicky prokázán acinární adenokarcinom (Gleason 7 (3 + 4), grade group 2) s infiltrací unilaterálně vlevo ve ventrální i dorzální části laloku bez extraprostatické expanze (obr. 3). U pacienta nebylo nutné kromě chirurgické intervence následně indikovat další onkologickou léčbu.



Obr. 2. Histologické vyšetření resekátu ledviny s okolní tukovou tkání s nálezem znaků typických pro IgG4 asociované postižení perirenální oblasti.

A) Densní smíšená zánětlivá celulizace v perirenální tukové tkáni (HE, 10×); B) fokálně akcentovaná plazmocytní komponenta v perirenální tukové tkáni s prokázanou přítomností CD79a+ plazmocytní komponenty (IHC, 5×); C) Densní zánětlivá celulizace perirenální tukové tkáně s výrazným podílem aktivovaných makrofágů CD163+ (IHC, 5×); D) perirenální tuková tkáň s lymfoplazmocytní komponentou s extenzivní přítomností IgG4+ plazmocytní komponenty (IHC, 5×).

HE – barvení hematoxilinem a eozinem, IHC – imunohistochemické barvení



Obr. 3. Histologické vyšetření prostaty se semennými váčky prokazující přítomnost acinárního adenokarcinomu prostaty.

Acinární adenokarcinom prostaty, Gleason skóre 7 (3 + 4), grade group 2: převažují izolované nádorové žlázky variabilní velikosti (Gleason pattern 3) a špatně formované až naznačeně fúzující žlázky (Gleason pattern 4 – černý rámeček). A) Zvětšení 100×; B) zvětšení 200×.

IgG4-autoimunitní onemocnění (IgG4-AID)

Kromě IgG4-asociovaných onemocnění (IgG4-RD) tvoří v poslední době rozví-

jející se skupinu nozologických jednotek také IgG4-autoimunitní onemocnění (IgG4-AID). Jedná se o poměrně novou skupinu onemocnění, která jsou charak-

terizována přítomností patogenních antigen-specifických autoprotilátek IgG4. Autoantigeny, proti kterým se autoprotilátky IgG4 vytváří, se nachází v celém

organismu, ale jsou akumulovány ve čtyřech hlavních orgánech (centrální a periferní nervový systém, kůže, ledviny a krevní oběh) [3]. Jedná se o vzácná onemocnění s prevalencí < 0,001–5 případů na 10 000 obyvatel, která mívají obvykle závažný průběh, přičemž mohou být bez léčby, nebo dokonce i přes léčbu smrtelná. Do této skupiny onemocnění patří např. pemphigus vulgaris a foliaceus, myasthenia gravis s pozitivitou protilátek proti svalově specifické tyrozin kináze nebo trombotická trombocytopenická purpura [3].

Jaká je role podtřídy imunoglobulinů IgG4 v imunitní odpovědi?

V 60. letech 20. století byly popsány čtyři podtřídy IgG (IgG1–IgG4), které byly pojmenovány mimo jiné podle jejich relativního zastoupení v lidském séru (IgG1 – 61 %, IgG2 – 32 %, IgG3 – 4 % a IgG4 – 3 %) [50]. Normální rozmezí koncentrace IgG v séru je 7,51–15,6 g/l, z toho IgG4 tvoří 0,08–1,4 g/l. IgG1 se tvoří v odpovědi na solubilní proteinové antigeny a membránové proteiny, IgG2 v odpovědi na bakteriální kapsulární polysacharidové antigeny a IgG3 představuje hlavní prozánětlivé protilátky. Naproti tomu biologické funkce IgG4 jsou zatím popsány jen velmi málo. Je známo, že se tvoří v důsledku dlouhodobé nebo silné antigenní stimulace, přičemž v takovém případě se stávají dominantně tvořenou podtřídou IgG [3]. Koncentrace IgG4 se snižuje po léčbě monoklonální protilátkou anti-CD20, která vede ke snížení počtu B lymfocytů, ale ne plazmatických buněk, zatímco koncentrace ostatních podtříd IgG nemusí být změněna [51]. To by mohlo znamenat, že B lymfocyty produkující IgG4 jsou aspoň částečně senzitivní k anti-CD20 terapii, protože se nejedná o dlouho žijící plazmatické buňky [51].

IgG4 se svými vlastnostmi vymykají představě o klasickém chování protilátek. Molekula IgG4 je charakterizována unikátními strukturálními vlastnostmi pantové oblasti, CH2 a CH3 domény, což pravděpodobně stojí za jejich odlišnými strukturálními vlastnostmi, vazebnou charakteristikou a sníženými efektoro-

vými funkcemi v porovnání s ostatními podtřídami IgG [52]. IgG4 jsou považovány za imunologicky inertní, protože nedokáží indukovat zánětlivou odpověď aktivací buněk imunitního systému nebo komplementu. Díky strukturálním rozdílům v Fc oblasti molekuly imunoglobulinu se u nich totiž nemohou uplatňovat klasické Fc-dependentní efektorové mechanismy, kam patří aktivace komplementu, interakce mezi Fc fragmentem protilátky a Fc receptorem buněk imunitního systému (vedoucí k fagocytóze nebo buněčné cytotoxicitě závislé na protilátkách) či přemostění transmembránových proteinů následované endocytózou a odstraněním antigenů z buněčného povrchu. IgG4 tak působí prostřednictvím Fc-independentních mechanismů, mezi které řadíme blokádu interakce mezi dvěma proteiny. To může vést ke stimulaci receptorů, blokáde funkce receptorů nebo enzymů, blokáde transdukce signálu v signalizačních drahách či znemožnění mezibuněčné adheze [3]. Protilátky IgG4 vykazují výraznou flexibilitu v pantové oblasti, která jim umožňuje nejen tvorbu disulfidických můstků mezi těžkými řetězci, ale také v rámci jednoho jejich těžkého řetězce [53]. Speciální vlastností IgG4 je také možnost tzv. výměny Fab ramének, kdy se jedna polovina molekuly IgG4 (jeden lehký a těžký řetězec) spolu kombinují za vzniku bispecifické monovalentní protilátky, která dokáže přemostit dva antigeny [54]. To zároveň znemožňuje přemostění antigenních determinant na povrchu antigenů a jejich následnou endocytózu, a stejně tak tvorbu imunokomplexů. IgG4 tak brání imunoprecipitaci, kterou způsobuje navázání IgG1 na antigen. Další unikátní vlastností IgG4 je schopnost tzv. Fc-Fc interakce. Protilátka IgG4 je schopna vázat se svým Fc fragmentem na Fc fragment všech čtyř podtříd IgG, ale ne na jiné třídy imunoglobulinů. Tento proces pravděpodobně slouží k odstraňování ostatních podtříd IgG s porušenou strukturou [55].

Se zvýšenou koncentrací IgG4 se můžeme setkat také u celé řady onemocnění, např. u postižení žlučových cest, pankreatu, jater, plicního postižení, nádorů, infekcí, ale také různých autoimu-

nitních onemocnění (revmatoidní artritida, Sjögrenův syndrom nebo vaskulitida) (tab. 3) [22]. Je však možné, že zvýšení koncentrace IgG4 je v těchto případech spíše výsledkem imunoregulační snahy o navození homeostázy než primárním patogenetickým principem [3]. Bylo totiž zjištěno, že na imunomodulační funkci IgG4 se podílí jejich vyšší afinita k vazbě antigenu, ale také k jedinému inhibičnímu Fc receptoru (FcRIIb) v porovnání s ostatními podtřídami IgG. Současná vazba tohoto inhibičního receptoru s ostatními aktivními Fc receptory vede k regulaci imunitní odpovědi [55,56].

IgG4 a jeho klíčová role v imunitní toleranci u alergií a nádorů

Jedním ze základních principů funkce imunitního systému je udržení rovnováhy organismu. Po fázi aktivace imunitního systému nastává fyziologicky jeho utlumení, na kterém se podílí humorální (např. inhibiční cytokiny IL-10 nebo TGF- β), ale i buněčné složky imunity (např. regulační T a B lymfocyty, dendritické buňky, myeloidní supresorové buňky, M2 makrofágy nebo přirozené lymfoidní buňky typu 2) [57]. Chronická zánětlivá aktivita je patogenetickým podkladem celé řady onemocnění [58]. Mimo jiné zvyšuje riziko rozvoje nádorového bujení [59] a provází také onemocnění rozvíjející se na imunopatologickém podkladě časně přecitlivělosti mediované protilátkami IgE [60]. Zatímco navozená imunologická tolerance v mikroprostředí nádorů podporuje nádorovou progresi a umožňuje šíření nádorových buněk do okolních tkání a orgánů [61], rozvoj imunologické tolerance se využívá v léčbě alergických onemocnění pomocí alergenové imunoterapie [62].

V počáteční fázi rozvoje nádorového bujení mají mechanismy vrozené i adaptivní imunity svůj význam, protože dokáží eliminovat aspoň část nádorových buněk. V dalších fázích nádorového bujení však dochází k nastavení buněk imunitního systému do imunoregulačního fenotypu [63], protože samotné nádorové buňky jsou významným zdrojem IL-10, což usnadňuje metastatický proces [64]. Role B-buněčné odpovědi u nádorových onemocnění sice není ještě

zcela objasněna, nicméně infiltrace nádorů B lymfocyty v oblastech s nádorem asociovaných lymfoidních struktur je spojena s lepší prognózou. Specifické protinádorové protilátky IgG1 mohou pomoci eliminovat nádorové buňky. K tomu dochází prostřednictvím klasické cesty aktivace komplementu vedoucí k lýze buňky zprostředkované NK buňkami pomocí mechanismu buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách nebo fagocytózy facilitované protilátkami. Nicméně chronická perzistence antigenu společně s predominantně Th2 cytokinovým prostředím (IL-4, IL-10 a vaskulární endotelový růstový faktor) tvořeným zejména rezidentními T-regulačními buňkami (Treg) a zároveň nádorovými buňkami podporuje izotypový přesmyk do IgG4. Takto vznikající protilátky IgG4 jsou afinitně vyzrálejší v porovnání s klonálně příbuznými protilátkami IgG1 namířeny proti stejným nádorovým antigenům. Proto mohou následně specifické protilátky IgG1 a IgG4 soupeřit o vazbu nádorových antigenů, přičemž IgG4 vítězí, což má další konsekvence. IgG4 totiž mohou díky svým speciálním vlastnostem procházet výměnou Fab ramének s ostatními IgG4, což vede ke vzniku funkčně monovalentních bispecifických protilátek nebo protilátek se zvýšenou aviditou. Neschopnost IgG4 vázat komplement nebo se vázat na Fc γ -receptory buněk imunitního systému může způsobit blokádu výše uvedených mechanismů vedoucích za normálních okolností k zabití cílové nádorově změněné buňky [52]. T-regulační lymfocyty tedy společně s protilátkami IgG4 mohou negativně ovlivňovat imunitní odpověď v tom smyslu, že nádorovým buňkám umožní únik z imunitního dohledu. V současné době není jasné, zda jsou s tumorem asociované protilátky IgG4 namířeny proti nádorovým antigenům, ale nedávné studie týkající se melanomů nebo glioblastomů tomu odpovídají [55]. Celou tuto teorii o negativním vlivu IgG4 v protinádorové odpovědi imunitního systému podporuje také skutečnost, že zvýšená koncentrace IgG4 v tkáních a séru je spojena s horší prognózou některých nádorových onemocnění, jako jsou např. nádory žlu-

čových cest, pankreatu a žaludku, kolorektální karcinom nebo maligní melanom [65–68]. IgG4 také ovlivňují funkci makrofágů, které mimo jiné hrají důležitou roli v protinádorové imunitě. Makrofágy jsou nejhodněji zastoupenými buňkami v mikroprostředí solidních nádorů [69]. Bylo prokázáno, že M2a makrofágy se pod vlivem IgG4 přeměňují do M2b-like tolerogenního fenotypu a negativně ovlivňují fagocytózu cílových buněk závislou na protilátkách [70]. Přítomnost prozánětlivých M1 makrofágů v mikroprostředí nádoru je asociováno s delším přežíváním pacientů, zatímco nízký poměr M1/M2a je asociován se špatnou prognózou celé řady myších modelů maligního bujení, ale také u lidských malignit [52,69]. S tím souvisí také to, že přítomnost IgG4 navozuje M2-mikroprostředí uvnitř nádoru, což vede k horšímu průběhu nádorového onemocnění, nicméně přesný mechanismus není ještě zcela objasněn [70].

Závěr

Podtrída imunoglobulinů IgG4 zůstává i v 21. století přinejmenším částečně opředena tajemstvím. I když znalosti ohledně struktury a funkce těchto protilátek se postupně rozšiřují, jejich jasná role v patogenezi různých onemocnění a patologických stavů zůstává nejasná. Více méně regulační potenciál protilátek IgG4 se pravděpodobně negativně uplatňuje v rozvoji nádorových onemocnění, přičemž na druhou stranu se využívá k navození tolerance u alergických onemocnění. Příkladem onemocnění, která mají nejasný patogenetický vztah k podtrídě imunoglobulinů IgG4, je IgG4-asociované onemocnění. Představuje imunitně podmíněné onemocnění vyznačující se přítomností fibrózních ložisek různých orgánů lidského těla. Ta mohou na zobrazovacích metodách účinně imitovat nádorové postižení, proto je potřeba v rámci diferenciální diagnostiky nádorových onemocnění na tuto vzácnou diagnózu pomyslet.

Literatura

- Ballieux RE, Bernier GM, Tominaga K et al. Gamma globulin antigenic types defined by heavy chain determinants. *Science* 1964; 145(3628): 168–170. doi: 10.1126/science.145.3628.168.

- Kamisawa T, Funata N, Hayashi Y et al. A new clinicopathological entity of IgG4-related autoimmune disease. *J Gastroenterol* 2003; 38(10): 982–984. doi: 10.1007/s00535-003-1175-y.
- Konecny I. Update on IgG4-mediated autoimmune diseases: new insights and new family members. *Autoimmun Rev* 2020; 19(10): 102646. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102646.
- Jensen-Jarolim E, Bax HJ, Bianchini R et al. AllergoOncology: opposite outcomes of immune tolerance in allergy and cancer. *Allergy* 2018; 73(2): 328–340. doi: 10.1111/all.13311.
- Mikulová Š, Jílek D, Richter J. Nemoc asociovaná s IgG4: úvod, diagnostika, patogeneze; 1. část. *Alergie* 2015; 17(1): 16–24.
- Hamano H, Kawa S, Horiuchi A et al. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *N Engl J Med* 2001; 344(10): 732–738. doi: 10.1056/NEJM200103083441005.
- Wallace ZS, Deshpande V, Mattoo H et al. IgG4-related disease: clinical and laboratory features in one hundred twenty-five patients. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67(9): 2466–2475. doi: 10.1002/art.39205.
- Inoue D, Yoshida K, Yoneda N et al. IgG4-related disease: dataset of 235 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(15): e680. doi: 10.1097/MD.0000000000000680.
- Mikulová Š, Jílek D, Richter J. Nemoc asociovaná s IgG4: klinický obraz, organová postižení a terapie; 2. část. *Alergie* 2015; 17(2): 92–99.
- Abraham M, Khosroshahi A. Diagnostic and treatment workup for IgG4-related disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2017; 13(9): 867–875. doi: 10.1080/17446666.2017.1354698.
- Stone JH, Khosroshahi A, Deshpande V et al. Recommendations for the nomenclature of IgG4-related disease and its individual organ system manifestations. *Arthritis Rheum* 2012; 64(10): 3061–3067. doi: 10.1002/art.34593.
- Umehara H, Okazaki K, Kawa S et al. The 2020 revised comprehensive diagnostic (RCD) criteria for IgG4-RD. *Mod Rheumatol* 2021; 31(3): 529–533. doi: 10.1080/14397595.2020.1859710.
- Urban ML, Palmisano A, Nicastro M et al. Idiopathic and secondary forms of retroperitoneal fibrosis: a diagnostic approach. *Rev Med Interne* 2015; 36(1): 15–21. doi: 10.1016/j.revmed.2014.10.008.
- Wallace ZS, Naden RP, Chari S et al. The 2019 American college of rheumatology/European league against rheumatism classification criteria for IgG4-related disease. *Ann Rheum Dis* 2020; 79(1): 77–87. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216561.
- Wallace ZS, Perugino C, Matza M et al. Immunoglobulin G4-related disease. *Clin Chest Med* 2019; 40(3): 583–597. doi: 10.1016/j.ccm.2019.05.005.
- Ozawa M, Fujinaga Y, Asano J et al. Clinical features of IgG4-related periaortitis/periarteritis based on the analysis of 179 patients with IgG4-related disease: a case-control study. *Arthritis Res Ther* 2017; 19(1): 223. doi: 10.1186/s13075-017-1432-8.
- Saeki T, Nishi S, Imai N et al. Clinicopathological characteristics of patients with IgG4-related tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 2010; 78(10): 1016–1023. doi: 10.1038/ki.2010.271.
- Lanzillotta M, Mancuso G, Della-Torre E. Advances in the diagnosis and management of IgG4 related disease. *BMJ* 2020; 369: m1067. doi: 10.1136/bmj.m1067.
- Kamekura R, Takahashi H, Ichimiya S. New insights into IgG4-related disease: emerging new CD4+ T-cell subsets. *Curr Opin Rheumatol* 2019; 31(1): 9–15. doi: 10.1097/BOR.0000000000000558.
- Su Y, Sun W, Wang C et al. Detection of serum IgG4 levels in patients with IgG4-related disease and other disorders. *PLoS One* 2015; 10(4): e0124233. doi: 10.1371/journal.pone.0124233.

21. Culver EL, Sadler R, Simpson D et al. Elevated serum IgG4 levels in diagnosis, treatment response, organ involvement, and relapse in a prospective IgG4-related disease UK cohort. *Am J Gastroenterol* 2016; 111(5): 733–743. doi: 10.1038/ajg.2016.40.
22. Tang J, Cai S, Ye C et al. Biomarkers in IgG4-related disease: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2020; 50(2): 354–359. doi: 10.1016/j.semarthrit.2019.06.018.
23. Culver EL, Sadler R, Bateman AC et al. Increases in IgE, eosinophils, and mast cells can be used in diagnosis and to predict relapse of IgG4-related disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017; 15(9): 1444–1452. doi: 10.1016/j.cgh.2017.02.007.
24. Chan ASY, Mudhar H, Shen SY et al. Serum IgG2 and tissue IgG2 plasma cell elevation in orbital IgG4-related disease (IgG4-RD): potential use in IgG4-RD assessment. *Br J Ophthalmol* 2017; 101(11): 1576–1582. doi: 10.1136/bjophthalmol-2017-310148.
25. Karim AF, Eurelings LEM, Bansie RD et al. Soluble interleukin-2 receptor: a potential marker for monitoring disease activity in IgG4-related disease. *Mediators Inflamm* 2018; 2018: 6103064. doi: 10.1155/2018/6103064.
26. Wallace ZS, Mattoo H, Carruthers M et al. Plasmablasts as a biomarker for IgG4-related disease, independent of serum IgG4 concentrations. *Ann Rheum Dis* 2015; 74(1): 190–195. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205233.
27. Karim AF, Bansie RD, Rombach SM et al. The treatment outcomes in IgG4-related disease. *Neth J Med* 2018; 76(6): 275–285.
28. Adam Z, Chovancová Z, Nová M et al. Remission of the disease associated/related with immunoglobulin IgG4 accompanied by multiple lymphadenopathy after treatment with rituximab and dexamethasone: a case report. *Vnitr Lek* 2018; 64(3): 290–299.
29. Khosroshahi A, Bloch DB, Deshpande V et al. Rituximab therapy leads to rapid decline of serum IgG4 levels and prompt clinical improvement in IgG4-related systemic disease. *Arthritis Rheum* 2010; 62(6): 1755–1762. doi: 10.1002/art.27435.
30. Perugino CA, Stone JH. Treatment of IgG4-related disease: current and future approaches. *Z Rheumatol* 2016; 75(7): 681–686. doi: 10.1007/s00393-016-0142-y.
31. Omar D, Chen Y, Cong Y et al. Glucocorticoids and steroid sparing medications monotherapies or in combination for IgG4-RD: a systematic review and network meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)* 2020; 59(4): 718–726. doi: 10.1093/rheumatology/kez380.
32. Sica A, Casale B, Spada A et al. Differential diagnosis: retroperitoneal fibrosis and oncological diseases. *Open Med (Wars)* 2018; 15: 22–26. doi: 10.1515/med-2020-0005.
33. Bertoglio P, Viti A, Paiano S et al. IgG4-related disease: a new challenging diagnosis mimicking lung cancer. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2019; 28(3): 410–412. doi: 10.1093/icvts/ivy279.
34. Sulieman I, Mahfouz A, AlKuwari E et al. IgG4-related disease mimicking pancreatic cancer: case report and review of the literature. *Int J Surg Case Rep* 2018; 50: 100–105. doi: 10.1016/j.ijscr.2018.07.030.
35. Wang Y, Chen X, Luo R et al. IgG4-related systemic disease mimicking renal pelvic cancer: a rare case. *World J Surg Oncol* 2014; 12: 395. doi: 10.1186/1477-7819-12-395.
36. Ichinokawa M, Matsumoto J, Kuraya T et al. A rare case of localized IgG4-related sclerosing cholecystitis mimicking gallbladder cancer. *J Rural Med* 2019; 14(1): 138–142. doi: 10.2185/jrm.2998.
37. Hwang SM, Paik JH, Lee JY. Immunoglobulin G4-related disease mimicking lymphoma. *Ann Hematol* 2019; 98(9): 2239–2241. doi: 10.1007/s00277-019-03725-8.
38. Poo SX, Tham CSW, Smith C et al. IgG4-related disease in a multi-ethnic community: clinical characteristics and association with malignancy. *QJM* 2019; 112(10): 763–769. doi: 10.1093/qjmed/hcz149.
39. Sekiguchi H, Horie R, Kanai M et al. IgG4-related disease: retrospective analysis of one hundred sixty-six patients. *Arthritis Rheumatol* 2016; 68(9): 2290–2299. doi: 10.1002/art.39686.
40. Tang H, Yang H, Zhang P et al. Malignancy and IgG4-related disease: the incidence, related factors and prognosis from a prospective cohort study in China. *Sci Rep* 2020; 10(1): 4910. doi: 10.1038/s41598-020-61585-z.
41. Asano S, Watanabe T, Oguchi T et al. Association between immunoglobulin G4-related disease and malignancy within 12 years after diagnosis: an analysis after longterm followup. *J Rheumatol* 2015; 42(11): 2135–2142. doi: 10.3899/jrheum.150436.
42. Yamamoto M, Takahashi H, Tabeya T et al. Risk of malignancies in IgG4-related disease. *Mod Rheumatol* 2012; 22(3): 414–418. doi: 10.1007/s10165-011-0520-x.
43. Ahn SS, Song JJ, Park YB et al. Malignancies in Korean patients with immunoglobulin G4-related disease. *Int J Rheum Dis* 2017; 20(8): 1028–1035. doi: 10.1111/1756-185X.13093.
44. Hirano K, Tada M, Sasahira N et al. Incidence of malignancies in patients with IgG4-related disease. *Intern Med* 2014; 53(3): 171–176. doi: 10.2169/internalmedicine.53.1342.
45. Fernández-Codina A, Martínez-Valle F, Pinilla B et al. IgG4-related disease: results from a multicenter Spanish registry. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(32): e1275. doi: 10.1097/MD.0000000000001275.
46. Wallace ZS, Wallace CJ, Lu N et al. Association of IgG4-related disease with history of malignancy. *Arthritis Rheumatol* 2016; 68(9): 2283–2289. doi: 10.1002/art.39773.
47. Bozzalla Cassione E, Stone JH. IgG4-related disease. *Curr Opin Rheumatol* 2017; 29(3): 223–227. doi: 10.1097/BOR.0000000000000383.
48. Ezaki T, Akatsuka S, Sanjo T et al. Symptomatic IgG4-related prostatitis simultaneously diagnosed with aggressive prostate cancer. *Case Rep Urol* 2020; 2020: 6045328. doi: 10.1155/2020/6045328.
49. Giat E, Ehrenfeld M, Shoenfeld Y. Cancer and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2017; 16(10): 1049–1057. doi: 10.1016/j.autrev.2017.07.022.
50. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 2014; 5: 520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
51. Lighaam LC, Rispens T. The immunobiology of immunoglobulin G4. *Semin Liver Dis* 2016; 36(3): 200–215. doi: 10.1055/s-0036-1584322.
52. Crescioli S, Correa I, Karagiannis P et al. IgG4 characteristics and functions in cancer immunity. *Curr Allergy Asthma Rep* 2016; 16(1): 7. doi: 10.1007/s11882-015-0580-7.
53. Bloom JW, Madanat MS, Marriott D et al. Intrachain disulfide bond in the core hinge region of human IgG4. *Protein Sci* 1997; 6(2): 407–415. doi: 10.1002/pro.5560060217.
54. Rispens T, Ooijevaar-de Heer P, Bende O et al. Mechanism of immunoglobulin G4 Fab-arm exchange. *J Am Chem Soc* 2011; 133(26): 10302–10311. doi: 10.1021/ja203638y.
55. Bianchini R, Karagiannis SN, Jordakieva G et al. The role of IgG4 in the fine tuning of tolerance in IgE-mediated allergy and cancer. *Int J Mol Sci* 2020; 21(14): 5017. doi: 10.3390/ijms21145017.
56. Davies AM, Sutton BJ. Human IgG4: a structural perspective. *Immunol Rev* 2015; 268(1): 139–159. doi: 10.1111/imr.12349.
57. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling – regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med* 2000; 28(4 Suppl): N3–12. doi: 10.1097/00003246-200004001-00002.
58. Suzuki K. Chronic inflammation as an immunological abnormality and effectiveness of exercise. *Biomolecules* 2019; 9(6): 223. doi: 10.3390/biom9060223.
59. Singh N, Baby D, Rajguru JP et al. Inflammation and cancer. *Ann Afr Med* 2019; 18(3): 121–126. doi: 10.4103/aam.aam_56_18.
60. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008; 454(7203): 445–454. doi: 10.1038/nature07204.
61. Arneth B. Tumor microenvironment. *Medicina (Kaunas)* 2019; 56(1): 15. doi: 10.3390/medicina56010015.
62. Lei DK, Saltoun C. Allergen immunotherapy: definition, indications, and reactions. *Allergy Asthma Proc* 2019; 40(6): 369–371. doi: 10.2500/aap.2019.40.4249.
63. Schatton T, Schütte U, Frank MH. Effects of malignant melanoma initiating cells on T-cell activation. *Methods Mol Biol* 2016; 20: 10.1007/7651_2015_299. doi: 10.1007/7651_2015_299.
64. Itakura E, Huang RR, Wen DR et al. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod Pathol* 2011; 24(6): 801–809. doi: 10.1038/modpathol.2011.5.
65. Liu Q, Niu Z, Li Y et al. Immunoglobulin G4 (IgG4)-positive plasma cell infiltration is associated with the clinicopathologic traits and prognosis of pancreatic cancer after curative resection. *Cancer Immunol Immunother* 2016; 65(8): 931–940. doi: 10.1007/s00262-016-1853-2.
66. Karagiannis P, Villanova F, Josephs DH et al. Elevated IgG4 in patient circulation is associated with the risk of disease progression in melanoma. *Oncoimmunology* 2015; 4(11): e1032492. doi: 10.1080/2162402X.2015.1032492.
67. Miyatani K, Saito H, Murakami Y et al. A high number of IgG4-positive cells in gastric cancer tissue is associated with tumor progression and poor prognosis. *Virchows Arch* 2016; 468(5): 549–557. doi: 10.1007/s00428-016-1914-0.
68. Harada K, Nakanuma Y. Cholangiocarcinoma with respect to IgG4 reaction. *Int J Hepatol* 2014; 2014: 803876. doi: 10.1155/2014/803876.
69. Salah A, Li Y, Wang H et al. Macrophages as a double-edged weapon: the use of macrophages in cancer immunotherapy and understanding the cross-talk between macrophages and cancer. *DNA Cell Biol* 2021; 40(3): 429–440. doi: 10.1089/dna.2020.6087.
70. Bianchini R, Roth-Walter F, Ohradnova-Repic A et al. IgG4 drives M2a macrophages to a regulatory M2b-like phenotype: potential implication in immune tolerance. *Allergy* 2019; 74(3): 483–494. doi: 10.1111/all.13635.
71. Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L et al. International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatologists. *Pancreas* 2011; 40(3): 352–358. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182142fd2.
72. Kamisawa T, Nakazawa T, Tazuma S et al. Clinical practice guidelines for IgG4-related sclerosing cholangitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2019; 26(1): 9–42. doi: 10.1002/jhbp.596.
73. Mizushima I, Kasashima S, Fujinaga Y et al. Clinical and pathological characteristics of IgG4-related periaortitis/periarteritis and retroperitoneal fibrosis diagnosed based on experts' diagnosis. *Ann Vasc Dis* 2019; 12(4): 460–472. doi: 10.3400/avd.19-00085.
74. Carruthers MN, Khosroshahi A, Augustin T et al. The diagnostic utility of serum IgG4 concentrations in IgG4-related disease. *Ann Rheum Dis* 2015; 74(1): 14–18. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204907.
75. Kawano M, Saeki T, Nakashima H et al. Proposal for diagnostic criteria for IgG4-related kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2011; 15(5): 615–626. doi: 10.1007/s10157-011-0521-2.
76. Goto H, Takahira M, Azumi A et al. Diagnostic criteria for IgG4-related ophthalmic disease. *Jpn J Ophthalmol* 2015; 59(1): 1–7. doi: 10.1007/s10384-014-0352-2.
77. Matsui S, Yamamoto H, Minamoto S et al. Proposed diagnostic criteria for IgG4-related respiratory disease. *Respir Investig* 2016; 54(2): 130–132. doi: 10.1016/j.resinv.2015.09.002.

78. Bashyam A, Nagala S, Tahir F et al. Immunoglobulin G4-related disease of the paranasal sinuses. *BMJ Case Rep* 2018; 2018: bcr2018224472. doi: 10.1136/bcr-2018-224472.
79. Lee LIT, Gillibrand R, Mukerjee D et al. Isolated pulmonary IgG4-related disease mimicking lung malignancy. *BJR Case Rep* 2017; 3(3): 20160134. doi: 10.1259/bjrcr.20160134.
80. Lococo F, Di Stefano T, Rapicetta C et al. Thoracic hyper-IgG4-related disease mimicking malignant pleural mesothelioma. *Lung* 2019; 197(3): 387–390. doi: 10.1007/s00408-019-00224-5.
81. Tsuda B, Kumaki N, Ishida R et al. Distinction of IgG4-related mastitis from breast cancer: a case report. *Surg Case Rep* 2019; 5(1): 123. doi: 10.1186/s40792-019-0681-y.
82. Jearth V, Patil P, Patkar S et al. Immunoglobulin G4-related cholecystitis mimicking a locally advanced gallbladder cancer—a case report and review of literature. *Clin J Gastroenterol* 2020; 13(5): 806–811. doi: 10.1007/s12328-020-01168-7.
83. Rungsakulkij N, Soramayura P, Tannaphai P. Isolated IgG4-related sclerosing cholangitis misdiagnosed as malignancy in an area with endemic cholangiocarcinoma: a case report. *BMC Surg* 2017; 17(1): 17. doi: 10.1186/s12893-017-0214-1.
84. Lei WH, Xin J, Shao CX et al. IgG4-related kidney disease mimicking malignant ureter tumor: case report and literature review. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(3): e2550. doi: 10.1097/MD.00000000000002550.
85. Dum TW, Zhang D, Lee EK. IgG4-related disease in a urachal tumor. *Case Rep Urol* 2014; 2014: 275850. doi: 10.1155/2014/275850.

Annex VI

LITZMAN, J., T. FREIBERGER, B. GRIMBACHER, B. GATHMANN, U. SALZER, T. PAVLIK, J. VLCEK, V. POSTRANECKA, Z. TRAVNICKOVA a V. THON. **Mannose-binding lectin gene polymorphic variants predispose to the development of bronchopulmonary complications but have no influence on other clinical and laboratory symptoms or signs of common variable immunodeficiency.** *Clinical and Experimental Immunology* [online]. 2008, 153(3), 324–330. ISSN 0009-9104. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03700.x

Document Type: Article; IF = 2,853

Mannose-binding lectin gene polymorphic variants predispose to the development of bronchopulmonary complications but have no influence on other clinical and laboratory symptoms or signs of common variable immunodeficiency

J. Litzman,^{*§§} T. Freiberger,^{†§§}

B. Grimbacher,[‡] B. Gathmann,[§]

U. Salzer,[§] T. Pavlík,[§] J. Vlček,^{††}

V. Postránecká,^{‡‡} Z. Trávníčková^{*}

and V. Thon^{*}

^{*}Department of Clinical Immunology and Allergology, Faculty of Medicine, Masaryk University, St Anne's Faculty Hospital, [†]Molecular Genetics Laboratory, Centre for Cardiovascular Surgery and Transplantation, Brno, Czech Republic, [‡]Department of Immunology and Molecular Pathology, Royal Free Hospital and University College London, London, UK,

[§]Division of Rheumatology and Clinical Immunology, University Hospital Freiburg, Germany, [¶]Institute for Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine, Masaryk University, ^{††}2nd Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Masaryk University, St Anne's Faculty Hospital, and ^{‡‡}Department of Medical Imaging, St Anne's Faculty Hospital, Brno, Czech Republic

Accepted for publication 8 May 2008
Correspondence: J. Litzman, Department of Clinical Immunology and Allergology, Faculty of Medicine, Masaryk University, St Anne's Faculty Hospital, Pekarska 53, CZ-656 91 Brno, Czech Republic.
E-mail: jiri.litzman@fnusa.cz

Accepted for publication 8 May 2008

Correspondence: J. Litzman, Department of Clinical Immunology and Allergology, Faculty of Medicine, Masaryk University, St Anne's Faculty Hospital, Pekarska 53, CZ-656 91 Brno, Czech Republic.

E-mail: jiri.litzman@fnusa.cz

^{§§}Drs Litzman and Freiberger contributed equally to this publication.

Introduction

Common variable immunodeficiency (CVID) is a primary hypogammaglobulinaemia affecting both sexes with clinical manifestation beginning at any age over 2 years [1]. Besides frequent and complicated respiratory tract infections (RTI), the patients suffer frequently from other symptoms – diarrhoea, autoimmune diseases, splenomegaly, lymphadenopathy and granuloma formation [2]. Although mutations in genes coding for inducible co-stimulator (ICOS), CD19, B cell-activating factor of the tumour necrosis factor (TNF) family receptor (BAFF-R), and possibly transmembrane acti-

Summary

Mannose-binding lectin (MBL), activating protein of the lectin pathway of the complement system, is an important component of the non-specific immune response. *MBL2* gene polymorphisms, both in the coding and promoter regions, lead to low or deficient serum MBL levels. Low serum MBL levels were shown to be associated with serious infectious complications, mainly in patients in whom other non-specific immune system barriers were disturbed (granulocytopenia, cystic fibrosis). We have analysed two promoter (–550 and –221) and three exon (codons 52, 54 and 57) *MBL2* polymorphisms in a total of 94 patients with common variable immunodeficiency (CVID) from two immunodeficiency centres. Low-producing genotypes were associated with the presence of bronchiectasis ($P = 0.009$), lung fibrosis ($P = 0.037$) and also with respiratory insufficiency ($P = 0.029$). We could not demonstrate any association of MBL deficiency with age at onset of clinical symptoms, age at diagnosis, the number of pneumonias before diagnosis or serum immunoglobulin (Ig)G, IgA and IgM levels before initiation of Ig treatment. No association with emphysema development was observed, such as with lung function test abnormalities. No effect of *MBL2* genotypes on the presence of diarrhoea, granuloma formation, lymphadenopathy, splenomegaly, frequency of respiratory tract infection or the number of antibiotic courses of the patients was observed. Our study suggests that low MBL-producing genotypes predispose to bronchiectasis formation, and also fibrosis and respiratory insufficiency development, but have no effect on other complications in CVID patients.

Keywords: common variable immunodeficiency, complement, lung disease

vator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor (TACI), were documented in some patients [3], in the majority of affected people the genetic background is unknown. Factors influencing the clinical course and various laboratory abnormalities of CVID are still unknown in general. Published studies of genetic polymorphisms have shown that the vitamin D receptor and interleukin (IL)-6 allelic polymorphisms were associated with immunophenotypic abnormalities in CVID patients, and particular variants of TNF and IL-10 alleles conferred susceptibility to granulomatous forms of CVID [4,5], but probably other disease-modifying genes are also involved.

Mannose-binding lectin (MBL) is an important component of the innate humoral immune response. It binds to polysaccharide groups on the surface of various microbes activating the lectin complement pathway, which is independent of previous antigen–antibody interaction. The gene coding for MBL, designated as *MBL2*, is located on chromosome 10. Various variants on exon 1 influencing serum MBL levels have been described. A single nucleotide mutation in codon 54 leads to Gly → Asp substitution (variant B), in codon 57 Gly → Glu (variant C) and in codon 52 Arg → Cys (variant D), while the normal, non-mutated allele is designated as A [6]. Homozygosity in the A allele leads to normal serum levels of MBL, while individuals heterozygous for one of the polymorphic alleles have decreased levels of MBL, reaching approximately one-tenth of the normal levels. Homozygotes or compound heterozygotes for mutated alleles have very low serum MBL levels, hardly detectable by conventional enzyme-linked immunosorbent assay [7], although marked interindividual variation can be documented [8]. Also, polymorphisms in the promoter were documented to lead to alteration of serum MBL levels. *H/L*, *Y/X* and *P/Q* polymorphisms at positions –550, –221 and +4 were described. When in *cis* position with the wild allele, *HYA*, *LXA* and *LXA* haplotypes are associated with high, low and deficient serum MBL levels respectively [9]. In summary, in healthy individuals various combinations of structural and promoter polymorphisms lead to a marked variation of up to 1000-fold in MBL concentrations [6].

The importance of MBL in anti-microbial defence has been documented by studies that showed increased occurrence of invasive infections caused by *Streptococcus pneumoniae* [10] and *Neisseria meningitidis* [11] in people with MBL deficiency. MBL deficiency increases the probability of attraction of human immunodeficiency virus infection [12,13], and possibly also shortens survival of patients in the acquired immune deficiency syndrome stage [12]. The frequency of complications of hepatitis B infection is also associated with *MBL2* genotypes [14,15].

Data concerning the influence of the *MBL2* genotype on the CVID phenotype are limited. Mullighan *et al.* [16] analysed *MBL2* polymorphisms in 163 CVID patients and 100 controls. They found that low MBL-producing alleles were associated with earlier clinical manifestations of CVID. This was most significant in patients with the *LXPA* haplotype. They also found that the *MBL2* +4 Q allele was associated with autoimmune manifestation. Fevang *et al.* [17] found that serum MBL concentrations correlated negatively with the frequency of lower RTI and the presence of bronchiectasis. Andersen *et al.* [18] observed an increased frequency of severe RTI before the initiation of immunoglobulin (Ig) treatment in patients heterozygous for *MBL2* exon 1 structural gene variants. *MBL2* exon 1 polymorphic variants were found in 16 of 23 of the patients with various forms of primary hypogammaglobulinaemia with a proven mycoplasma infection compared with two-thirds in the

general population, showing that MBL deficiency predisposes to mycoplasma infections in hypogammaglobulinaemic patients [19]. None of these results were confirmed by additional studies.

In this study we have analysed *MBL2* exon 1 and promoter polymorphic markers in CVID patients from two immunodeficiency centres and correlated them with various clinical and laboratory parameters to assess to what extent the *MBL2* gene could be regarded as a disease-modifying gene in CVID.

Patients and methods

Ninety-four patients with CVID were included into the study: 51 females and 43 males aged 12–82 years [mean 45.4, standard deviation (s.d.) = 14.7]. Fifty-four patients were from the Department of Clinical Immunology and Allergology in Brno and 40 from the Department of Rheumatology and Clinical Immunology in Freiburg. None of them was known to have *ICOS* (tested in 51 patients) or *TNFRSF13C* (coding for BAFF-R; tested in six patients) mutations, while the *TNFRSF13B* (coding for TACI) mutation was documented in 10 of 87 patients tested.

Fifty-two patients fulfilled the European Society for Immunodeficiencies diagnostic criteria for CVID [1]. In 42 patients, mainly those whose treatment was initiated before the mid-1990s (the introduction of relevant tests in our laboratories), diagnosis was made by low Ig levels, clinically significant immunodeficiency and exclusion of other causes of hypogammaglobulinaemia.

Three hundred and fifty-nine healthy donors of Czech origin were used as control subjects for assessing the frequency of *MBL2* genotypes, as published previously [20].

The onset of the disease was defined as the age when the first episode of pneumonia or a marked increase in the frequency of RTI occurred. In patients without significant immunodeficiency symptoms, the date of statement of a CVID diagnosis was considered to be the beginning of the disease.

The presence of bronchiectasis and lung fibrosis was determined by high-resolution computerized tomography. Data were available in 66 patients. Respiratory functions were determined by spirometry; the data were available in 90 patients. Obstructive disease was graded as mild, moderate and severe if forced expiratory volume in 1 s was 60–79%, 45–59% and < 45% of the predicted value respectively. Restrictive lung disease was graded as mild, moderate and severe if vital capacity was 60–79%, 45–59% and < 45% of the predicted value, respectively. Splenomegaly was defined by the length of the spleen over 11 cm on ultrasonography.

Serum Ig levels were measured by radial immunodiffusion, turbidimetry or nephelometry, the method being dependent upon the year of diagnosis of the patients. In the case of ‘immeasurable’ Ig serum levels, a lower detection limit was used for calculation. B lymphocyte subpopulations were determined by flow cytometry, as published previously

Table 1. Comparison of age at onset, age at diagnosis, diagnostic delay and number of pneumonias in patients with genotypes associated with normal (N), low (L) and deficient (D) serum mannan-binding lectin levels.

	Normal (<i>n</i> = 58)	Low (<i>n</i> = 19)	Deficient (<i>n</i> = 17)	N versus L versus D <i>P</i> -value	N versus L+D <i>P</i> -value	N+L versus D <i>P</i> -value
Age at onset (years)	26.7 (13.7)	28.9 (17.2)	34.9 (15.8)	0.174*	0.122**	0.062**
Age at diagnosis (years)	32.9 (13.6)	35.9 (17.3)	38.4 (17.8)	0.460*	0.191**	0.240**
Diagnostic delay (years)	6.1 (7.6)	7.0 (8.0)	3.5 (4.4)	0.494*	0.866***	0.304***
Pneumonias before diagnosis	1.5 (2.7)	1.6 (3.4)	0.76 (1.0)	0.758*	0.889***	0.617***

The data are given as mean (standard deviation). *Kruskal–Wallis test was used for statistical evaluation; ***t*-test; ***Mann–Whitney test.

[21], and the patients were subdivided according to the 'Freiburg classification' [22].

The *MBL2* genotype determination was performed by multiplex polymerase chain reaction (PCR), as described previously [20]. Briefly, the promoter polymorphisms were detected using the double amplification refractory mutation system method. Three separate amplifications with sequence-specific sense and anti-sense primers were carried out to determine *HY*, *LY* and *LX* promoter haplotypes respectively. The first exon *MBL2* gene mutations were identified using the multiplex PCR method with sequence-specific primers. One reaction with primers specific to *B*, *C* and *D* alleles, and another reaction specific to the *A* allele in codons 52, 54 and 57, were performed. A 4% MetaPhor agarose gel electrophoresis was used to discriminate PCR products of 128, 135 and 143 base pairs. All reactions included internal control of amplification. Assignment of haplotypes was based on the strong linkage disequilibrium between the promoter variants and the first exon alleles, and the existence of the frequent haplotypes *HYA*, *LYA*, *HYD*, *LYB*, *LYC* and *LXA*. All suspected *LYD* haplotypes were confirmed by a separate long-chain PCR reaction with sequence-specific primers.

HYA/HYA, *HYA/LYA*, *HYA/LXA*, *LYA/LYA* and *LXA/LXA* genotypes were considered to be associated with normal levels of serum MBL; the patients with this genotype were labelled as 'normal' (N). Patients with *HYA/HYD*, *HYA/LYB*, *HYA/LYC*, *HYA/LYD*, *LYA/HYD*, *LYA/LYB*, *LYA/LYC*, *LYA/LYD* and *LXA/LXA* genotypes were considered to have low serum MBL levels forming the group 'low' (L), while *HYD/HYD*, *HYD/LYB*, *HYD/LYC*, *HYD/LYD*, *LYB/LYB*, *LYB/LYC*, *LYB/LYD*, *LYC/LYD*, *LYD/LYD*, *LXA/HYD*, *LXA/LYB*, *LXA/LYC* and *LXA/LYD* genotype holders were considered to have deficient MBL levels (the 'deficient' group: D).

Statistical analysis

Testing the difference in two continuous variables was performed using either the two-tailed *t*-test or the Mann–Whitney test according to normality of data, which was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. In the case of more than two variables tested, the Kruskal–Wallis test was used. Categorical variables were analysed using the appropriate test for the contingency tables, i.e. using Spearman's

test for two variables with more than two levels and Fisher's exact test in the case of two variables with binary outcome. A standard level of statistical significance $\alpha = 0.05$ was used, i.e. a *P*-value < 0.05 was considered to be statistically significant. However, because of multiple hypotheses testing, standard Bonferroni correction was applied to the α -level resulting in the appropriate critical value. The statistical package STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA), version 7, was used.

This study was approved by the Ethics Commission of the Centre for Cardiovascular Surgery and Transplantation in Brno. All patients and donors gave their written consent prior to genetic analysis.

Results

Fifty-eight CVID patients had genotypes associated with normal MBL levels, 19 patients had genotypes associated with low MBL levels and 17 patients exhibited genotypes associated with deficient MBL levels.

The frequency of *MBL2* genotype groups leading to normal, low and deficient MBL production in the general Czech population [20] and CVID patients did not show any significant differences (Spearman's test, data not shown), such as frequency of determined alleles or patients having at least one of the determined alleles (Fisher's exact test, data not shown).

State before CVID diagnosis

On comparing age at onset, age at diagnosis and the number of pneumonias before diagnosis, no significant differences were observed (see Table 1). There were no differences in serum IgG, IgA and IgM levels before the diagnosis comparing N versus L+D and N+L versus D groups (Mann–Whitney test, data not shown).

B cell analysis

There were no differences in numbers of patients with B cells < 1% of peripheral lymphocytes (six in normal, four in low and two in deficient groups; *P* = 0.278, Spearman's test). In 76 patients in whom B cells were > 1% of peripheral lymphocytes the Freiburg classification was used, but no signifi-

Table 2. Presence of lung abnormalities on computed tomography scan. The results were available for only 66 patients. Generalized bronchiectases were defined as bronchiectases in more than three lung lobes. The results of the extent of bronchiectasis, the extent of fibrosis and the extent of emphysema are given as no/localized/generalized.

	Normal (n = 43)	Low (n = 13)	Deficient (n = 10)	N versus L versus D P-value	N versus L+D P-value	N+L versus D P-value
Presence of bronchiectasis	15	10	5	0.009*	0.022**	0.999**
Extent of bronchiectasis	28/10/5	3/5/5	5/3/2	0.006*	0.013*	0.768*
Presence of fibrosis	12	8	3	0.037*	0.102**	0.999**
Extent of fibrosis	31/10/2	5/6/2	7/2/1	0.048*	0.091*	0.800*
Presence of emphysema	7	2	2	0.959*	0.999**	0.668**
Extent of emphysema	36/4/3	11/0/2	8/2/0	0.913*	0.893*	0.870*

*Spearman's test; **Fisher's exact test. N, normal; L, low; D, deficient serum mannan-binding lectin levels.

cant differences in the frequency of groups Ia, Ib and II [22] were observed ($P = 0.894$ for all groups, Spearman's test).

Lung abnormalities

The association of *MBL2* genotype groups with the presence of bronchiectasis, lung fibrosis and emphysema is shown in Table 2; as can be seen, the presence of bronchiectasis and lung fibrosis was linked to defective *MBL2* genotype groups. On assessing lung function tests (see Table 3), no relation between restrictive and obstructive disease and *MBL2* genotype groups was observed, while respiratory insufficiency was associated mildly with the presence of defective *MBL2* genotype groups.

Respiratory tract infections

The number of RTI and antibiotic courses in our patients during 1 year prior to inclusion into this study is given in

Table 4; no differences in the frequency of RTI or of antibiotic courses in the subgroups of CVID patients were observed. There was no difference in the number of patients with X-ray-proven pneumonia after the initiation of Ig treatment (nine in the N group, four in the L group, five in the D group) in all three groups of patients (Spearman's test, $P = 0.414$), not even when the groups were merged (N versus L+D: $P = 0.227$, N+L versus D: $P = 0.216$, Fisher's exact test). There was also no difference in the number of patients who were on permanent or seasonal antibiotic prophylaxis (eight patients in group N, three patients in group L and one patient in group D; Spearman's test for all groups: $P = 0.547$, Fisher's exact test for N versus L+D: $P = 0.760$, N+L versus D: $P = 0.688$). No significant difference was observed comparing patients with more than five infections in 1 year prior to inclusion into the study (four of 49 patients in group N, three of 18 patients in group L, one of 15 patients in group D; Spearman's test for all groups $P = 0.421$, Fisher's exact test: N versus L+D: $P = 0.708$, N+L versus D: $P = 0.999$).

Table 3. Lung function abnormalities in patients with common variable immunodeficiency. The results are given as normal/mild/moderate/severe in the degree of obstructive disease and degree of restrictive disease lines (see Patients and methods; 90 patients evaluated) and no/partial/global in the respiratory insufficiency degree line (88 patients evaluated).

	Normal	Low	Deficient	N versus L versus D P-value	N versus L+D P-value	N+L versus D P-value
Obstructive disease	29	5	8	0.132*	0.277**	0.789**
Degree of obstructive disease	27/18/8/3	13/2/2/1	8/3/5/0	0.274*	0.408*	0.620*
Restrictive disease	8	3	2	0.859*	0.999**	0.999**
Degree of restrictive disease	48/7/1/0	15/2/1/0	14/2/0/0	0.869*	0.904*	0.783*
Respiratory insufficiency	3	4	3	0.029*	0.041**	0.380**
Degree of respiratory insufficiency	51/2/1	14/4/0	13/2/1	0.034*	0.033*	0.291*

*Spearman's test; **Fisher's exact test. N, normal; L, low; D, deficient serum mannan-binding lectin levels.

Table 4. Number of respiratory tract infections (RTI) and antibiotic (ATB) courses during 1 year prior to inclusion into the study in subgroups of common variable immunodeficiency patients. Sufficient data were available in 83 patients. The data are given as mean (standard deviation).

	Normal (n = 50)	Low (n = 18)	Deficient (n = 15)	N versus L versus D P-value*	N versus L+D P-value**	N+L versus D P-value**
No of RTI infections	2.4 (2.1)	3.3 (2.6)	2.6 (1.5)	0.541	0.576	0.810
No. of ATB courses	1.6 (1.8)	1.8 (2.6)	1.5 (1.3)	0.761	0.655	0.901

*Kruskal-Wallis test; **Mann-Whitney test. N, normal; L, low; D, deficient serum mannan-binding lectin levels.

Table 5. Presence of splenomegaly, lymphadenopathy, autoimmune phenomena, granulomas and chronic diarrhoea in 94 patients with common variable immunodeficiency. N/L/D means positivity in the patients with genotypes associated with normal/low/deficient mannan-binding lectin levels respectively.

	N/L/D	N versus L versus D P-value	N versus L+D P-value	N+L versus D P-value
Splenomegaly	32/10/9	0.956*	0.999**	0.792**
Lymphadenopathy	45/11/16	0.561*	0.999**	0.106**
Autoimmune phenomena	15/5/6	0.658*	0.636**	0.551**
Granuloma	2/1/1	0.652*	0.635**	0.556**
Chronic diarrhoea	6/3/3	0.413*	0.629**	0.546**

*Spearman's test; **Fisher's exact test.

Other clinical indicators

The frequency of splenomegaly, lymphadenopathy, autoimmune phenomena, granuloma and chronic diarrhoea in CVID patients is given in Table 5. There were no significant differences between the groups studied.

Particular genetic variant analysis

We have analysed the relation of the polymorphic variants of *MBL2* determined with the presence of subsequent clinical or laboratory data: presence of pneumonia after initiation of Ig treatment, chronic diarrhoea, presence of bronchiectasis, fibrosis, emphysema, respiratory insufficiency, obstructive lung disease, restrictive lung disease, chronic diarrhoea, granuloma formation, autoimmune phenomena, splenomegaly and lymphadenopathy; more than five infections in 1 year prior to inclusion into the study. Fisher's test was used for statistical analysis. Only the presence of autoimmune phenomena in patients negative for allele *A* (present in five of eight *A*- patients, compared with 21 of 86 *A*+ patients, Fisher's test: $P = 0.035$), and chronic diarrhoea for variant *D* (present in five of 17 *D*+ patients and in seven of 77 *D*- patients, $P = 0.038$) exceeded $P < 0.05$ but, because of multiple testing, only the resultant P -values < 0.002 should be considered statistically significant.

Discussion

The extensive variability of CVID stimulates searching not only for causative genes, but also for genes modifying the clinical course of the affected individual. One such disease-modifying gene in CVID might be *MBL2*. Previous studies have shown that MBL deficiency has only a minor, if any, influence on the morbidity or mortality of otherwise healthy people [23], but that it becomes symptomatic if other defence barrier(s) is/are disturbed, the best example being granulocytopenia during or after cytostatic treatment [24,25] or cystic fibrosis [26].

Much less clear is the association of MBL deficiency with various types of Ig production disturbances. A possible importance of MBL in patients with antibody deficiencies is

supported by the observation that *MBL2* non-*A* variants were associated with increased otitis media episodes at the age of 12–24 months, but not later [27]. The age span mentioned is the life period when maternally derived antibodies have waned, but adequate adaptive immunity is not yet developed. On the other hand, Aittoniemi *et al.* [28] could not document any influence of serum MBL levels on the clinical state of IgA-deficient individuals.

Our study confirmed the previous observation [17] that in CVID patients low MBL levels were associated with the presence of bronchiectasis; also, the presence of fibrosis was associated with the presence of defective genotypes. Interestingly, observations in CVID patients are, to our knowledge, the first described associations of MBL deficiency with bronchiectasis development. Although the numbers of patients in the evaluated groups were too low to draw any unequivocal conclusions, it seems that it is predominantly the decrease in serum MBL level (in both patients from the L and D groups) that predisposed to bronchiectasis or fibrosis development. On the other hand, patients with MBL-deficient genotypes did not have higher proneness to the mentioned complications than the patients with low MBL-producing genotypes.

The association of *MBL2* genotype groups with respiratory insufficiency was also observed in our study, but this result could be questioned because of the low number of patients in whom respiratory insufficiency was present. On the other hand, we could not prove any influence of MBL status on the frequency of infections of patients under Ig treatment documented previously by others [17], or the frequency of antibiotic courses in CVID patients. Comparing our study and the above-mentioned studies, we have recorded all RTI in our patients, while in the above-mentioned study only lower RTI were documented [17]. As many of our patients were treated many years ago, we could not evaluate the number of lower RTI prior to Ig treatment, which was shown to be increased in patients heterozygous for structural polymorphisms associated with low MBL production [18]. However, when evaluating the number of pneumonias before making a CVID diagnosis, we could not document any difference among patients from different *MBL2* genotype groups.

Unlike the study by Mullighan *et al.* [16], we could not confirm the earlier clinical manifestation of CVID in patients with defective *MBL2* genotypes. Another study from Norway also showed no effect of MBL levels on the age of clinical manifestation of CVID [17]. Surprisingly, our data showed an even later (although not significant) manifestation of CVID in patients with low and mainly deficient MBL-producing genotypes. It is necessary to mention that the retrospective determinations of the onset of immunodeficiency symptoms, even when conducted by experienced physicians, are highly inaccurate in many cases. Also the fact that currently many patients are diagnosed much earlier than previously, even with mild clinical symptoms, should be taken into account as a possible difference from the above-mentioned study [16] published 8 years ago.

Several studies showed that MBL deficiency might be associated with autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus [29] or rheumatoid arthritis [30]. Mullighan *et al.* [16] found an association of autoimmune phenomena with the presence of the *MBL2* +4 Q polymorphism. Unfortunately, the polymorphism *MBL2* +4 was not determined in our study, as this polymorphism has only a minor impact on serum MBL levels [31]. Our study did not find any association of low or deficient *MBL2* genotype groups or the particular polymorphic variants evaluated with autoimmune phenomena in our CVID patients.

The MBL status in this study was determined only by *MBL2* genotyping, while the serum MBL level was not determined. This is a relatively common approach, as it allows simplification of the complex situation when the actual MBL level in a specific person is influenced not only by genetic background, but also by actual inflammatory status, as MBL reacts as an acute-phase protein [32]; thyroid hormones and the growth hormone were also shown to influence the production of MBL by hepatocytes [33]. Serum MBL in CVID patients may be influenced mainly by acute or chronic inflammation, which is common in these patients.

The observation about the influence of MBL deficiency on bronchiectasis and fibrosis development raises the question of whether, in patients with MBL deficiency (or holders of *MBL2* genotypes associated with abnormal serum MBL levels), a more intensive Ig regimen should be applied compared with patients with normal MBL levels. In our opinion the results of our study do not support this approach strongly. Although the results of MBL determination might be taken into account in such considerations, we still do not have clear evidence that the intensity of Ig treatment has a protective effect on bronchiectasis development in general, still less so in the case of MBL deficiency. Only a prospective large-scale study would be able to answer this question.

In general, our study showed that the presence of low or deficient MBL-producing genotypes in patients with CVID is associated with chronic changes of the bronchi and the lungs: bronchiectasis, fibrosis development and respiratory

insufficiency. On the other hand, we could not document any influence of *MBL2* genotypes on the frequency of acute RTI, extrapulmonary manifestation or various laboratory parameters. It is supposed that various other disease-modifying genes and their mutual interactions as well as interactions with environmental factors must be involved in the variability of the disease.

Acknowledgements

This work was supported by grants no. 9192-3 and no. 9035-4 of the Czech Ministry of Health, SFB620 of the German Research Foundation (DFG), and SP23-CT-2005-006411 (EURO-Policy PID) of the European Union.

References

- 1 Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. *Clin Immunol* 1999; **93**:190–7.
- 2 Hermaszewski RA, Webster AD. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med* 1993; **86**:31–42.
- 3 Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher AJ, Gaspar HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 2007; **149**:401–9.
- 4 Mullighan CG, Fanning GC, Chapel HM, Welsh KI. TNF and lymphotoxin-alpha polymorphisms associated with common variable immunodeficiency: role in the pathogenesis of granulomatous disease. *J Immunol* 1997; **159**:6236–41.
- 5 Mullighan CG, Marshall SE, Bunce M, Welsh KI. Variation in immunoregulatory genes determines the clinical phenotype of common variable immunodeficiency. *Genes Immun* 1999; **1**:137–48.
- 6 Dommett RM, Klein N, Turner MW. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 2006; **68**:193–209.
- 7 Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfus Med* 2002; **12**:335–52.
- 8 Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol* 2002; **56**:630–41.
- 9 Worthley DL, Bardy PG, Mullighan CG. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Intern Med J* 2005; **35**:548–55.
- 10 Roy S, Knox K, Segal S, Griffiths D *et al.* MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. *Lancet* 2002; **359**:1569–73.
- 11 Hibberd ML, Sumiya M, Summerfield JA, Booy R, Levin M. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. *Meningococcal Research Group. Lancet* 1999; **353**:1049–53.
- 12 Garred P, Madsen HO, Balslev U *et al.* Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* 1997; **349**:236–40.
- 13 Nielsen SL, Andersen PL, Koch C, Jensenius JC, Thiel S. The level of the serum opsonin, mannan-binding protein in HIV-1 antibody-positive patients. *Clin Exp Immunol* 1995; **100**:219–22.

- 14 Yuen MF, Lau CS, Lau YL, Wong WM, Cheng CC, Lai CL. Mannose binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 1999; **29**:1248–51.
- 15 Thio CL, Mosbruger T, Astemborski J *et al.* Mannose binding lectin genotypes influence recovery from hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; **79**:9192–6.
- 16 Mullighan CG, Marshall SE, Welsh KI. Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol* 2000; **51**:111–22.
- 17 Fevang B, Mollnes TE, Holm AM *et al.* Common variable immunodeficiency and the complement system; low mannose-binding lectin levels are associated with bronchiectasis. *Clin Exp Immunol* 2005; **142**:576–84.
- 18 Andersen P, Permin H, Andersen V *et al.* Deficiency of somatic hypermutation of the antibody light chain is associated with increased frequency of severe respiratory tract infection in common variable immunodeficiency. *Blood* 2005; **105**:511–17.
- 19 Hamvas RM, Johnson M, Vlieger AM *et al.* Role for mannose binding lectin in the prevention of *Mycoplasma* infection. *Infect Immun* 2005; **73**:5238–40.
- 20 Skalníková H, Freiberger T, Chumchalová J, Grombířková H, Sedivá A. Cost-effective genotyping of human *MBL2* gene mutations using multiplex PCR. *J Immunol Methods* 2004; **295**:139–47.
- 21 Vlková M, Thon V, Sárkyová M *et al.* Age dependency and mutual relations in T and B lymphocyte abnormalities in common variable immunodeficiency patients. *Clin Exp Immunol* 2006; **143**:373–9.
- 22 Warnatz K, Denz A, Dräger R *et al.* Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002; **99**:1544–51.
- 23 Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. A population-based study of morbidity and mortality in mannose-binding lectin deficiency. *J Exp Med* 2004; **199**:1391–9.
- 24 Neth O, Hann I, Turner MW, Klein NJ. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. *Lancet* 2001; **358**:614–18.
- 25 Peterslund NA, Koch C, Jensenius JC, Thiel S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet* 2001; **358**:637–8.
- 26 Garred P, Pressler T, Madsen HO *et al.* Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999; **104**:431–7.
- 27 Wiertsema SP, Herpers BL, Veenhoven RH *et al.* Functional polymorphisms in the mannan-binding lectin 2 gene: effect on MBL levels and otitis media. *J Allergy Clin Immunol* 2006; **117**:1344–50.
- 28 Aittoniemi J, Koskinen S, Laippala P, Laine S, Miettinen A. The significance of IgG subclasses and mannan-binding lectin (MBL) for susceptibility to infection in apparently healthy adults with IgA deficiency. *Clin Exp Immunol* 1999; **116**:505–8.
- 29 Lee YH, Witte T, Momot T *et al.* The mannose-binding lectin gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: two case-control studies and a meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2005; **52**:3966–74.
- 30 Graudal NA, Homann C, Madsen HO *et al.* Mannan binding lectin in rheumatoid arthritis. A longitudinal study. *J Rheumatol* 1998; **25**:629–35.
- 31 Madsen HO, Satz ML, Høgh B, Svejgaard A, Garred P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol* 1998; **161**:3169–75.
- 32 Thiel S, Holmskov U, Hviid L, Laursen SB, Jensenius JC. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. *Clin Exp Immunol* 1992; **90**:31–5.
- 33 Sørensen CM, Hansen TK, Steffensen R, Jensenius JC, Thiel S. Hormonal regulation of mannan-binding lectin synthesis in hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 2006; **145**:173–82.

Annex VII

LITZMAN, Jiri, Zita CHOVANCOVA, Petr BEJDAK, Marek LITZMAN, Zdenek HEL a Marcela VLKOVA. **Common variable immunodeficiency patients display elevated plasma levels of granulocyte activation markers elastase and myeloperoxidase.** International Journal of Immunopathology and Pharmacology [online]. 2019, 33, 2058738419843381. ISSN 0394-6320. Dostupné z: doi:10.1177/2058738419843381

Document Type: Article; IF = 2,209

Common variable immunodeficiency patients display elevated plasma levels of granulocyte activation markers elastase and myeloperoxidase

International Journal of
Immunopathology and Pharmacology
Volume 33: 1–10
© The Author(s) 2019
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/2058738419843381
journals.sagepub.com/home/iji


Jiří Litzman^{1,2}, Zita Chovancová^{1,2}, Petr Bejdák^{1,2},
Marek Litzman³, Zdeněk Hel⁴ and Marcela Vlková^{1,2} 

Abstract

Common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) represent a group of primary immunodeficiency diseases characterized by hypogammaglobulinemia and dysfunctional immune response to invading pathogens. Previous studies have indicated that CVID is associated with microbial translocation and systemic myeloid cell activation.

The goal of this study was to determine whether patients with CVID display elevated systemic levels of markers of granulocyte activation and whether the levels are further influenced by intravenous immunoglobulin (IVIg) infusions. The plasma levels of granulocyte activation markers elastase and myeloperoxidase were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 46 CVID patients and 44 healthy controls. All CVID patients were in a stable state with no apparent acute infection. In addition, granulocyte activation markers' plasma levels in 24 CVID patients were determined prior to and 1 h following IVIg administration. Neutrophil elastase and myeloperoxidase plasma levels were significantly higher in CVID patients than in healthy controls. Systemic elastase levels were further increased following IVIg administration. In vitro stimulation of 13 CVID patients' whole blood using IVIg in a therapeutically relevant dose for 2 h resulted in a significant increase in plasma elastase levels compared to unstimulated blood. The data presented here indicate that CVID is associated with chronic granulocytic activation which is further exacerbated by administering IVIg. Increased myeloperoxidase and elastase levels may contribute to associated comorbidities in CVID patients.

Keywords

CVID, elastase, immunoglobulin treatment, myeloperoxidase, neutrophil activation

Date received: 18 September 2018; accepted: 15 March 2019

Introduction

Common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) comprise the most frequent symptomatic primary hypogammaglobulinemia characterized by decreased immunoglobulin G (IgG) levels accompanied by decreased immunoglobulin A (IgA) and/or immunoglobulin M (IgM) serum levels and disturbed response to antigenic stimuli.¹ Clinically significant immunodeficiency in CVID patients is manifested by severe respiratory tract infections, diarrhea, and autoimmune disorders.¹

¹Department of Clinical Immunology and Allergology, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic

²Department of Clinical Immunology and Allergology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Department of Economics, Faculty of Business and Economics, Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic

⁴Departments of Pathology and Microbiology, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA

Corresponding author:

Marcela Vlkova, Department of Clinical Immunology and Allergology, St. Anne's University Hospital, Pekarska 53, 656 91 Brno, Czech Republic.
Email: marcela.vlkova@fnusa.cz



Neutrophil elastase and myeloperoxidase are stored in large quantities in the neutrophils' azurophilic granules and are released into extracellular space following neutrophil activation. The release of elastase, a serine proteinase with broad substrate specificity, results in damage to host tissue in a wide range of inflammatory conditions.² Neutrophil elastase plasma levels were shown to be increased in patients with pneumonia,^{3,4} inflammatory bowel disease,⁵ and preeclampsia.⁶ Systemic levels of myeloperoxidase are elevated in patients with acute coronary syndrome,⁷ pelvic inflammatory disease,⁸ and rheumatic arthritis.⁹

CVID was shown to be associated with an altered neutrophil phenotype characterized by decreased expression of surface markers CD15, CD11b, and CD16.¹⁰ CVID patients display elevated systemic cytokine levels associated with granulocyte-macrophage lineage activation.¹¹ Decreased reactive oxygen species (ROS) production of granulocytes pretreated with toll-like receptor (TLR) 1/2 and TLR 4 agonists after stimulating with N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) was documented, suggesting disturbed granulocytic function in CVID patients.¹⁰ However, no significant difference in granulocytic oxidative burst activity following stimulation with opsonized *Escherichia coli* or phorbol-myristate-acetate (PMA) was observed in CVID patients compared to healthy donors.^{12–14}

The goal of this study was to determine whether the levels of granulocyte activation markers released from azurophilic granules are altered in patients with CVID and whether they are affected by the infusion of intravenous immunoglobulin (IVIg).

Materials and methods

Study participants

The study was approved by the Medical Ethics Committee of St. Anne's University Hospital. Informed consent was obtained from all participants prior to inclusion in the study. A total of 46 CVID patients (25 females, 21 males; median age: 45, range: 22–82 years) were recruited. All patients fulfilled the International Consensus Document (ICON) diagnostic criteria for CVID.¹ The control group consisted of 44 healthy donors (23 females, 21 males; median age: 41, range: 19–78 years). The control persons were recruited mainly from the hospital employees and their relatives, not suffering from a known immunodeficiency or autoimmune disease.

Splenomegaly was defined as a spleen length > 11 cm in ultrasonography. Bronchiectasis was determined by high-resolution computed tomography (HRCT). The clinical phenotypes were defined as described in Chapel et al.¹⁵ B-cell phenotypes were determined according to Wehr et al.¹⁶ (EUROclass).

Plasma neutrophil elastase and myeloperoxidase determination

The blood was collected in an acute infection-free period. In 24 patients on IVIg treatment (aged 22–82 years), elastase and myeloperoxidase plasma levels were determined prior to and 1 h after the completion of IVIg infusion.¹⁴

Human elastase and myeloperoxidase plasma levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's protocol (Hycult Biotech, Plymouth Meeting, PA, USA). The samples were collected into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-containing tubes (S-Monovette; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and placed on ice. Within 20 min, the plasma was separated by centrifugation for 15 min at 1500 g at 4°C. Without disturbing the buffy coat, the plasma was transferred into a polypropylene tube and centrifuged again for 15 min at 1500 g at 4°C. All plasma samples were stored at –20°C.

In vitro stimulation of blood with IVIg

A total of 13 CVID patients' whole blood was collected into three heparinized tubes (S-Monovette) at room temperature. Plasma from the first tube was collected as described above. The second tube was incubated in a water bath at 37°C with gentle mixing every 30 min; after 2 h, plasma was collected. In the third tube, 10% IVIg at a dose of 5.7 mg/mL of heparinized blood (IVIg concentration adequate to the concentration in blood after infusion of 400 mg IgG/kg) was added. The subsequent procedure was identical to the one in tube number 2. Plasma elastase levels were determined as described above.

Statistical analysis

The results were analyzed using the Mann–Whitney rank-sum test, Wilcoxon signed-rank test, and analysis of variance (ANOVA) test as appropriate using Stata and GraphPad Prism 5 statistical

packages. The results are presented as median (5th–95th centile).

Results

Plasma elastase and myeloperoxidase levels

Basic clinical and laboratory characteristics of the CVID patients are shown in Table 1. The absolute number of neutrophils was higher in CVID patients than that in the healthy controls ($3.4 \times 10^9/L$ (1.8–6.8) vs $2.7 \times 10^9/L$ (1.8–4.4); $P=0.02$). The CVID patients displayed significantly higher neutrophil elastase (100.5 $\mu\text{g/L}$; (55.8–184.0) vs 66.9 $\mu\text{g/L}$ (42.2–99.6); $P<0.001$) and myeloperoxidase (28.2 $\mu\text{g/L}$ (15.2–56.6) vs 14.1 $\mu\text{g/L}$ (8.4–19.7); $P<0.001$; analyzed by Mann–Whitney test) plasma levels than the healthy controls (Figure 1). The difference remained significant after the CVID patients with C-reactive protein (CRP) higher than 10 mg/L ($n=7$) were excluded from the analysis (elastase: 89.2 $\mu\text{g/L}$ (54.8–162.1); $P=0.04$; myeloperoxidase: 27.5 $\mu\text{g/L}$ (12.1–55.9); $P<0.001$). No significant differences were observed between patients treated with IVIg ($n=25$) versus subcutaneous immunoglobulin (SCIg; $n=21$) ($P=0.2$ for elastase and $P=0.1$ for myeloperoxidase). Compared to healthy controls, the levels of granulocytic markers were significantly higher in both IVIg (elastase: 110.4 $\mu\text{g/L}$ (55.8–162.1); myeloperoxidase: 26.5 $\mu\text{g/L}$ (12.1–44.7)) and SCIg (elastase: 83.1 $\mu\text{g/L}$ (56.5–191.9); myeloperoxidase: 29.5 $\mu\text{g/L}$ (17.1–62.5)) recipients (all $P<0.001$; analyzed by Mann–Whitney test).

Significantly elevated neutrophil elastase and myeloperoxidase plasma levels were observed in patients with splenomegaly ($n=21$) than patients without splenomegaly ($n=24$) (elastase: 114.9 $\mu\text{g/L}$ (54.8–162.1) vs 76.4 $\mu\text{g/L}$ (56.5–156.9); $P=0.005$; myeloperoxidase: 35.2 $\mu\text{g/L}$ (12.1–56.6) vs 26.5 $\mu\text{g/L}$ (15.8–55); $P=0.02$). No significant differences were observed between patients with ($n=19$) and without ($n=26$) bronchiectasis.

Using clinical phenotype classification,¹⁵ patients classified as “no disease-related complications” ($n=28$) displayed a lower plasma myeloperoxidase concentration (26.9 $\mu\text{g/L}$ (15.2–55.9)) than patients with other complications of CVID ($n=18$) (40.1 $\mu\text{g/L}$ (12.1–71.7); $P=0.007$). Patients with enteropathy ($n=8$) had higher myeloperoxidase levels (42.9 $\mu\text{g/L}$ (12.1–71.7)) than patients without this complication ($n=38$) (27.3 $\mu\text{g/L}$ (15.2–55.9); $P=0.006$). No significant

differences were observed between patients with ($n=7$) and without ($n=39$) lymphocytic infiltration, and with ($n=9$) and without ($n=37$) autoimmune disorders. No patient suffered from lymphoid malignancy. No significant differences were observed in plasma elastase levels.

The ANOVA test did not show any significant difference in elastase ($P=0.35$) and myeloperoxidase ($P=0.06$) plasma levels comparing patient groups defined according to EUROclass.¹⁶

Effect of administering IVIg on plasma neutrophil elastase and myeloperoxidase levels

Administering IVIg resulted in a significant increase in neutrophil elastase plasma levels 1 h after treatment ($P=0.001$; Wilcoxon signed-rank test; Figure 2). A trend toward increased myeloperoxidase levels was observed; however, the effect did not reach statistical significance ($P=0.17$). No adverse reaction to infusion was observed in any of the participants.

The in vitro effect of IVIg on elastase release

To evaluate the potential activation effect of IVIg on CVID neutrophils, whole heparinized blood was stimulated with IVIg. As shown in Figure 3, 2-h cultivation of patients' blood at 37°C leads to an increase in the elastase concentration in plasma by 74.5% (37.2%–273.3%). Stimulating whole blood from CVID patients with IVIg leads to an increase in plasma elastase levels by 104.0% (56.2%–301.3%). The difference between the increase with and without IVIg was statistically significant ($P=0.017$; Wilcoxon signed-rank test; Figure 3).

Discussion

The presented data, together with previously published observations, are indicative of an ongoing chronic granulocytic activation in CVID patients. The cause of activation of granulocytes in CVID remains unclear. However, the data are consistent with a potential role of translocation of microbial products from the intestinal lumen into the systemic circulation. Microbial translocation is observed in various pathological conditions including HIV-1 infection, inflammatory bowel disease, and hepatitis B and C infections.^{17,18} Bacterial and fungal products' translocation results in systemic

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of the patients at the time of the investigation.

Patient No.	Age	Sex	Treatment	CRP (mg/L)	IgG (g/L)	IgA (g/L)	IgM (g/L)	B-cell phenotype	Splenomegaly	Bronchiectasis	Clinical phenotype	Immunosuppressive treatment
1	31	F	SClg	28.80	6.48	<0.02	0.33	smB-2 low	No	Yes	A,E	Prednisone, leflunomide
2	39	M	IVlg	4.49	4.90	<0.02	0.09	smB+2 norm	No	No	N	
3	82	F	IVlg	5.60	6.42	<0.02	0.05	smB+2 low	No	Yes	E	
4	25	M	SClg	1.47	4.55	<0.02	0.13	smB+2 low	No	No	N	
5	66	F	IVlg	6.10	7.37	<0.02	0.06	smB-2 low	Yes	Yes	L	
6	52	F	SClg	4.51	7.59	<0.02	0.09	smB+2 norm	Yes	No	N	
7	42	F	SClg	1.70	5.90	0.02	0.04	smB-2 norm	No	No	A	
8	46	F	SClg	4.56	8.01	<0.02	0.06	B-	No	No	A	Prednisone
9	76	F	IVlg	8.26	7.68	<0.02	0.06	smB+2 norm	Yes	Yes	N	
10	58	M	IVlg	5.44	5.97	<0.02	0.04	B-	No	No	N	
11	62	M	IVlg	1.71	8.62	<0.02	0.27	smB+2 low	No	Yes	N	
12	30	M	IVlg	2.59	7.47	<0.02	0.06	smB-2 norm	Yes	No	N	
13	22	M	SClg	23.40	10.20	<0.02	0.05	B-	No	Yes	L,E	
14	38	M	IVlg	22.80	6.87	<0.02	0.07	smB-2 norm	Yes	Yes	N	
15	34	M	SClg	1.35	12.80	0.37	0.05	smB+2 low	No	No	N	
16	63	M	IVlg	7.25	5.87	<0.02	0.06	smB+2 low	Yes	Yes	N	
17	28	F	IVlg	8.24	6.40	<0.02	0.21	smB+2 norm	No	No	A	
18	20	M	IVlg	3.03	5.89	<0.02	0.18	smB+2 low	Yes	No	A	
19	76	M	SClg	8.87	7.93	0.10	0.11	smB-2 norm	No	Yes	L	
20	35	F	IVlg	1.27	7.07	<0.02	0.15	smB+2 low	ND	ND	N	
21	49	F	SClg	3.00	6.82	0.04	0.07	smB-2 norm	Yes	Yes	L	
22	29	F	SClg	2.43	5.52	0.04	1.41	smB+2 low	No	No	N	
23	45	F	SClg	6.92	6.72	0.02	0.04	smB-2 low Tr+	No	No	L,A	
24	48	M	SClg	12.40	7.37	<0.02	0.06	smB-2 low Tr+	Yes	No	E	
25	33	F	IVlg	8.02	8.86	<0.02	0.10	smB-2 norm	No	No	N	

Table 1. (Continued)

Patient No.	Age	Sex	Treatment	CRP (mg/L)	IgG (g/L)	IgA (g/L)	IgM (g/L)	B-cell phenotype	Splenomegaly	Bronchiectasis	Clinical phenotype	Immunosuppressive treatment
26	37	F	SClg	9.16	5.15	<0.02	0.04	B-	No	No	E,A	Methylprednisone
27	52	F	IVig	25.40	4.00	<0.02	0.05	smB-2 low	No	No	N	
28	45	M	SClg	3.30	6.60	0.03	0.08	smB-2 norm	Yes	No	N	
29	38	F	SClg	5.59	4.66	<0.02	0.08	smB-2 norm	No	No	N	
30	48	F	SClg	3.27	8.65	<0.02	0.13	smB-2 low	Yes	No	N	
31	65	M	SClg	6.65	7.44	0.06	0.06	smB-2 low	Yes	Yes	E,A	
32	46	F	IVig	2.91	9.22	<0.02	0.07	smB-2 low	Yes	Yes	N	
33	51	F	IVig	4.75	8.06	<0.02	0.06	smB-2 low	No	Yes	N	
34	22	M	SClg	23.10	5.56	<0.02	2.29	smB-2 low	Yes	Yes	A	
35	31	M	IVig	10.80	4.78	0.04	0.68	smB-2 low	Yes	No	L,E	Prednisone
36	48	F	SClg	1.67	7.84	<0.02	0.06	smB-2 norm	No	No	N	
37	30	M	SClg	12.20	6.40	<0.02	0.10	smB+2 low	No	No	N	
38	30	M	SClg	8.23	6.11	0.04	0.08	smB-2 low	Yes	Yes	N	
39	58	M	IVig	7.80	6.24	0.29	0.04	smB+2 low	No	Yes	N	
40	52	F	IVig	4.63	5.32	<0.02	0.06	smB-2 norm	Yes	No	L	
41	63	M	IVig	8.35	7.85	<0.02	0.29	smB-2 low	Yes	Yes	N	
42	30	F	IVig	7.35	6.01	0.08	0.97	smB+2 norm	Yes	No	N	
43	58	M	IVig	8.38	9.88	<0.02	0.07	smB+2 norm	Yes	No	N	
44	52	M	IVig	25.50	9.46	<0.02	0.11	smB-2 norm	No	Yes	N	
45	36	F	IVig	2.26	8.72	<0.02	0.05	smB-2 low	No	Yes	N	
46	29	M	IVig	1.81	5.95	<0.02	0.07	smB-2 low	Yes	No	E	

IgG: immunoglobulin G; IgA: immunoglobulin A; IgM: immunoglobulin M; F: female; M: male; IVig: intravenous immunoglobulin; SClg: subcutaneous immunoglobulin; CRP: C-reactive protein; N: no disease-related complications; E: unexplained enteropathy; L: polyclonal lymphocytic infiltration; A: autoimmunity; ND: not detected.

Serum immunoglobulin levels were determined before IVig infusion or during routine follow-up in SClg-treated patients.

B-cell phenotypes were determined according to EUROclass.¹⁶ Clinical phenotypes were defined according to Chapel et al.¹⁵

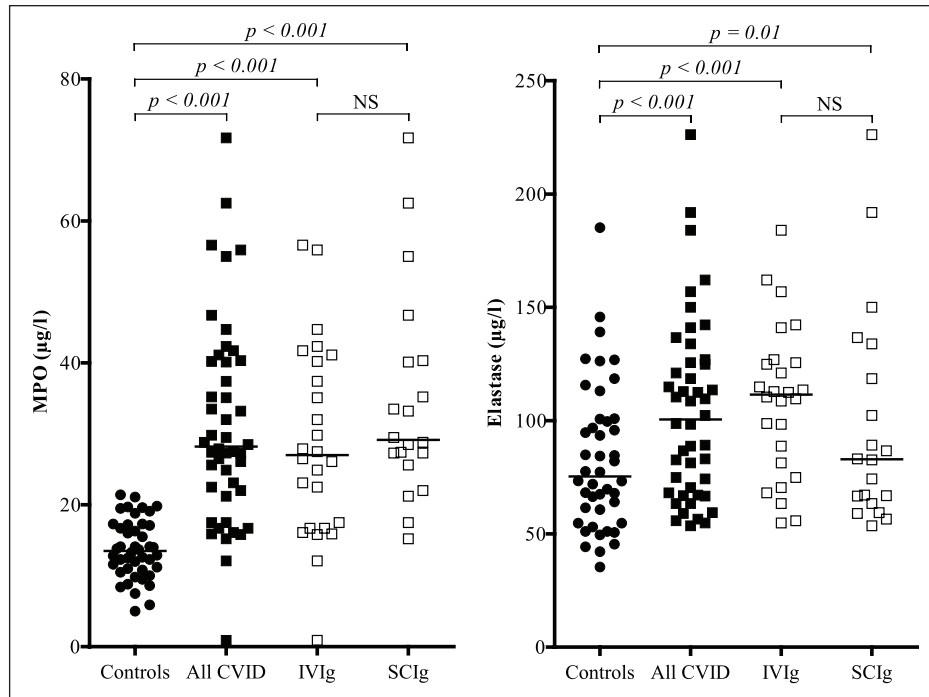


Figure 1. Plasma myeloperoxidase (MPO) and elastase levels in all CVID patients, patients on intravenous immunoglobulin (IVIg) and subcutaneous immunoglobulin (SCIg) treatments and healthy control donors.

NS: non-significant.

Horizontal lines indicate median values; Mann–Whitney rank-sum test was used for statistical evaluation.

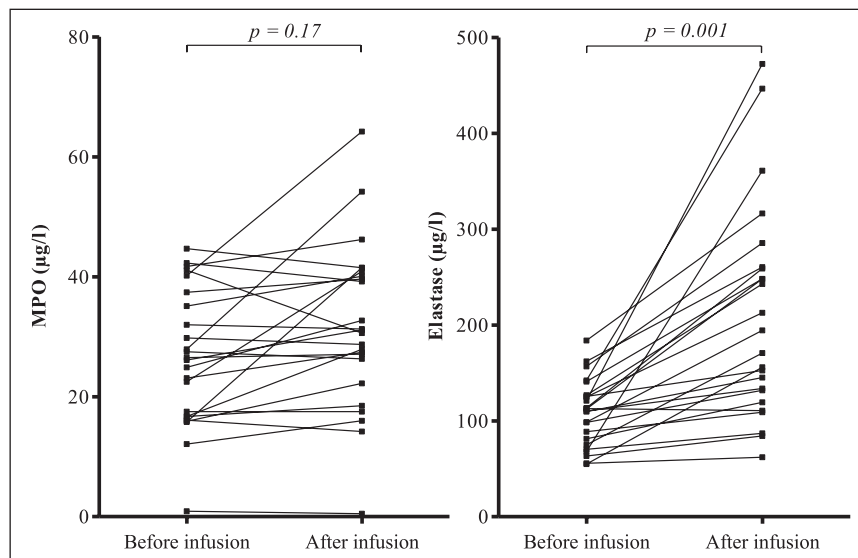


Figure 2. Plasma myeloperoxidase (MPO) and elastase levels before and 1 h after intravenous immunoglobulin infusion in CVID patients.

Wilcoxon signed-rank test was used for statistical evaluation.

immune activation.¹⁷ We and others have previously presented evidence of chronic microbial translocation in CVID patients.^{19–21} Furthermore, CVID patients display an altered cytokine signature profile consistent with an ongoing activation of cells of monocytic and granulocytic lineages.¹¹

In our study, we observed increased serum elastase and myeloperoxidase levels in patients with splenomegaly compared to patients without splenomegaly. Except for the observation showing higher serum myeloperoxidase levels in patients with splenomegaly and liver cirrhosis compared to

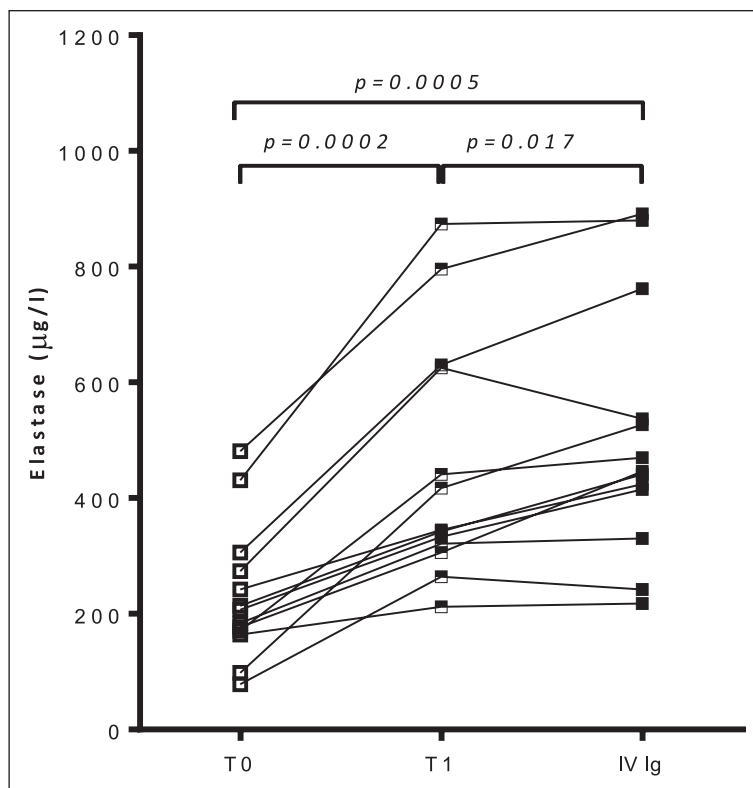


Figure 3. Plasma elastase concentration levels of 13 CVID patients after in vitro stimulation with IVIg.

Elastase concentration was determined in three plasma samples from each patient: T0—the plasma was obtained after the collection of heparinized blood from a patient; T1—heparinized blood was incubated in water bath at 37°C. After 1-h incubation plasma was collected; IVIg—heparinized blood was incubated in water bath at 37°C and stimulated with 10% intravenous immunoglobulin. After 2 h of incubation plasma was collected. All samples of plasma were separated by two consecutive centrifugations, and human elastase plasma levels were determined by ELISA, according to the manufacturer's protocol. Wilcoxon signed-rank test was used for statistical evaluation.

patients without splenomegaly,²² to our knowledge, no association of splenomegaly with myeloperoxidase and elastase levels has been previously reported. However, splenomegaly in CVID is frequently associated with other complications, for example, cytopenias, hepatomegaly, granuloma, enteropathy, autoimmunity, or bronchiectasis.^{15,23} Although we did not observe elevated levels of both granulocyte activation plasma markers in subjects with bronchiectasis, autoimmunity, or lymphatic infiltration in our cohort, the myeloperoxidase levels were lower in patients in the “no disease-related conditions” group¹⁵ than the group with disease-related conditions and increased in patients with enteropathy.

Elevated systemic elastase and myeloperoxidase levels may significantly contribute to the pathogenesis of CVID complications. Neutrophil elastase is involved in destroying the extra-cellular matrix in chronic obstructive pulmonary disease²⁴ and plays a pathogenic role in forming bronchiectasis.²⁵ Neutrophil-derived myeloperoxidase is involved in inducing oxidative stress

and producing proinflammatory cytokines including interleukin (IL)-6, IL-8, and tumor necrosis factor (TNF)- α .²⁴ Therapeutic approaches targeting granulocytic enzymes or curbing their proinflammatory properties may be beneficial to CVID patients.

Here, we report that the administration of IVIg resulted in elevated systemic concentrations of neutrophil elastase and a trend toward an increased concentration of myeloperoxidase at 1 h following the treatment. Limited data are available regarding the effect of IVIg on polymorphonuclear neutrophil (PMN) degranulation upon IVIg stimulation in vitro. Van Mirre et al.²⁶ observed decreased elastase release in isolated granulocytes stimulated by aggregated IgG by adding monomeric IgG (obtained from IVIg). This effect was not observed when PMNs were activated by fMLP/cytochalasin B; monomeric IgG alone did not stimulate PMN, suggesting that monomeric IgG acts as a low-affinity Fc γ R antagonist. On the other hand, in the whole blood, under the in vitro conditions more similar to our experiments, Teeling et al.²⁷ showed that in vitro exposure of whole fresh blood from

healthy donors to commercially available IVIg preparations at therapeutically relevant levels resulted in neutrophil degranulation and a release of elastase and lactoferrin. This effect was mainly mediated by the dimeric and polymeric fractions of the IVIg derivate and was dependent on Fc γ RII.²⁷ Currently available commercial preparations of IVIg contain less than 3% of polymeric IgG.²⁸ Whether or not neutrophil activation by IVIg depends on the presence of polymeric IgG warrants further investigation.

Other studies support potential activation of granulocytes by IVIg. Higurashi et al.²⁹ showed that IVIg administration increased the production of ROS from TNF- α -primed PMN in a process dependent on both the Fab and Fc domains of IgG and interaction with Fc γ RIII. Similarly, using whole-blood conditions, Casulli et al.³⁰ showed that IVIg at low concentrations induced PMN activation indicated by decreased CD62L and increased CD11b surface expression, enhancement of oxidative burst, and prolonged cell survival. In contrast, at higher concentrations, IVIg inhibited lipopolysaccharide (LPS)-induced CD11b degranulation and priming of oxidative burst.³⁰

Limited information is available regarding the effect of IVIg administration on neutrophils in vivo. A significantly reduced capacity for PMA-induced ROS production by PMN obtained from CVID patients after administering IVIg was observed.¹⁴ No effect on CD11b, CD16, and sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin (Singlec) 9 expression on PMNs or ROS production induced by opsonized *E. coli* was documented in this study.¹⁴

Compared to our report, Prezzo et al.¹³ recently observed decreased serum elastase levels in patients with CVID treated by IVIg compared to healthy controls; the levels decreased 1 h after IVIg infusion. The results are not consistent with our study. The differences may be influenced by various factors, including the general clinical health of the investigated patients, the immunoglobulin brand used (stabilizers present in different brands), and others. A probable explanation may also be the variances in the handling of patients' plasma. Compared to our study, Prezzo et al.¹³ used heparinized plasma. Significant differences in sampling conditions when determining the plasma elastase levels were previously demonstrated.³¹ Our observation of increased plasma elastase levels after IVIg treatment is supported by the fact

that previous studies showed an increase in proinflammatory cytokines after IVIg infusions, including neutrophil-activating cytokines TNF- α , IL-6, and IL-8.^{32,33} The observation of an increase in plasma elastase levels following IVIg infusion is supported by other reports of in vitro elastase release²⁷ and general granulocyte activation^{29,30} after in vitro stimulation of whole blood by IVIg.

In summary, the data presented here indicate chronic granulocyte activation in CVID patients, independent of concurrent infection and other forms of disease exacerbation. Administering IVIg further enhances granulocytic degranulation in CVID patients. Pharmacologically targeting granulocytic activation and degranulation may represent a novel approach to CVID treatment.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared the following potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article: J. L. obtained consultation fees from Shire Plc and Octapharma AG. The remaining authors have no conflicts of interest to declare.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This project was supported by a grant from the Czech Health Research Council (No. 15-28732A).

ORCID iD

Marcela Vlčková  <https://orcid.org/0000-0002-1926-5426>

References

1. Bonilla FA, Barlan I, Chapel H, et al. (2016) International Consensus Document (ICON): Common variable immunodeficiency disorders. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 4(1): 38–59.
2. Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, et al. (2010) Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacological Reviews* 62(4): 726–759.
3. Matsuse H, Yanagihara K, Mukae H, et al. (2007) Association of plasma neutrophil elastase levels with other inflammatory mediators and clinical features in adult patients with moderate and severe pneumonia. *Respiratory Medicine* 101(7): 1521–1528.
4. Tagami T, Kushimoto S, Tosa R, et al. (2011) Plasma neutrophil elastase correlates with pulmonary vascular permeability: A prospective observational study in patients with pneumonia. *Respirology* 16(6): 953–958.

5. Gouni-Berthold I, Baumeister B, Wegel E, et al. (1999) Neutrophil-elastase in chronic inflammatory bowel disease: A marker of disease activity. *Hepato-gastroenterology* 46(28): 2315–2320.
6. Gupta AK, Gebhardt S, Hillermann R, et al. (2006) Analysis of plasma elastase levels in early and late onset preeclampsia. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 273(4): 239–242.
7. Liang J, Zheng Z, Wang M, et al. (2009) Myeloperoxidase (MPO) and interleukin-17 (IL-17) plasma levels are increased in patients with acute coronary syndromes. *The Journal of International Medical Research* 37(3): 862–866.
8. Lee SA, Wang PH, Chiou HL, et al. (2009) Markedly elevated plasma myeloperoxidase protein in patients with pelvic inflammatory disease who have A allele myeloperoxidase gene polymorphism. *Fertility and Sterility* 93: 1260–1266.
9. Fernandes RM, da Silva NP and Sato EI (2011) Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 32: 1605–1609.
10. Casulli S, Coignard-Biehler H, Amazzough K, et al. (2014) Defective functions of polymorphonuclear neutrophils in patients with common variable immunodeficiency. *Immunologic Research* 60(1): 69–76.
11. Hel Z, Huijbregts RP, Xu J, et al. (2014) Altered serum cytokine signature in common variable immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* 34(8): 971–978.
12. Kutukculer N, Azarsiz E, Karaca NE, et al. (2015) A Clinical and laboratory approach to the evaluation of innate immunity in pediatric CVID patients. *Frontiers in Immunology* 6: 145.
13. Prezzo A, Cavaliere FM, Milito C, et al. (2018) Intravenous immunoglobulin replacement treatment reduces in vivo elastase secretion in patients with common variable immune disorders. *Blood Transfusion*. Epub ahead of print 17 July. DOI: 10.2450/2018.0043-18.
14. Prezzo A, Cavaliere FM, Bilotta C, et al. (2016) Intravenous immunoglobulin replacement treatment does not alter polymorphonuclear leukocytes function and surface receptors expression in patients with common variable immunodeficiency. *Cellular Immunology* 306–307: 25–34.
15. Chapel H, Lucas M, Lee M, et al. (2008) Common variable immunodeficiency disorders: Division into distinct clinical phenotypes. *Blood* 112(2): 277–286.
16. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, et al. (2008) The EUROclass trial: Defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 111: 77–85.
17. Sandler NG and Douek DC (2012) Microbial translocation in HIV infection: Causes, consequences and treatment opportunities. *Nature Reviews. Microbiology* 10(9): 655–666.
18. Bowers NL, Helton ES, Huijbregts RP, et al. (2014) Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: Role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS Pathogens* 10: e1003993.
19. Litzman J, Nechvatalova J, Xu J, et al. (2012) Chronic immune activation in common variable immunodeficiency (CVID) is associated with elevated serum levels of soluble CD14 and CD25 but not endotoxaemia. *Clinical and Experimental Immunology* 170: 321–332.
20. Barbosa RR, Silva SP, Silva SL, et al. (2012) Monocyte activation is a feature of common variable immunodeficiency irrespective of plasma lipopolysaccharide levels. *Clinical and Experimental Immunology* 169(3): 263–272.
21. Jørgensen SF, Trøseid M, Kummén M, et al. (2016) Altered gut microbiota profile in common variable immunodeficiency associates with levels of lipopolysaccharide and markers of systemic immune activation. *Mucosal Immunology* 9(6): 1455–1465.
22. Nakamuta M, Ohashi M, Tanabe Y, et al. (1993) High plasma concentration of myeloperoxidase in cirrhosis: A possible marker of hypersplenism. *Hepatology* 18(6): 1377–1383.
23. Gathmann B, Mahlaoui N, Gérard L, et al. (2014) Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134(1): 116–126.
24. Hoenderdos K and Condliffe A (2013) The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 48: 531–539.
25. Gramegna A, Amati F, Terranova L, et al. (2017) Neutrophil elastase in bronchiectasis. *Respiratory Research* 18(1): 211.
26. Van Mirre E, Teeling JL, van der Meer JW, et al. (2004) Monomeric IgG in intravenous Ig preparations is a functional antagonist of FcγRII and FcγRIIIb. *Journal of Immunology* 173(1): 332–339.
27. Teeling JL, De Groot ER, Eerenberg AJ, et al. (1998) Human intravenous immunoglobulin (IVIg) preparations degranulate human neutrophils in vitro. *Clinical and Experimental Immunology* 114(2): 264–270.
28. Barahona Afonso AF and João CM (2016) The production processes and biological effects of intravenous immunoglobulin. *Biomolecules* 6: 15.
29. Higurashi S, Machino Y, Suzuki E, et al. (2012) Both the Fab and Fc domains of IgG are essential for ROS emission from TNF-α-primed neutrophils

- by IVIG. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 417: 794–799.
30. Casulli S, Topçu S, Fattoum L, et al. (2011) A differential concentration-dependent effect of IVIg on neutrophil functions: Relevance for anti-microbial and anti-inflammatory mechanisms. *PLoS ONE* 6: e26469.
 31. Fischer JE, Janousek M, Fischer M, et al. (1998) Effect of collection and preprocessing methods on neutrophil elastase plasma concentrations. *Clinical Biochemistry* 31(3): 131–136.
 32. Ibáñez C, Suñé P, Fierro A, et al. (2005) Modulating effects of intravenous immunoglobulins on serum cytokine levels in patients with primary hypogammaglobulinemia. *Biodrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 19(1): 59–65.
 33. Aukrust P, Frøland SS, Liabakk NB, et al. (1994) Release of cytokines, soluble cytokine receptors, and interleukin-1 receptor antagonist after intravenous immunoglobulin administration in vivo. *Blood* 84(7): 2136–2143.

Annex VIII

VLKOVA Marcela, Zita CHOVANCOVA, Jana NECHVATALOVA, Ashley Nicole CONNELLY, Marcus Darrell DAVIS, Peter SLANINA, Lucie TRAVNICKOVA, Marek LITZMAN, Tereza GRYSOVA, Premysl SOUCEK, Tomas FREIBERGER, Jiri LITZMAN a Zdenek HEL. **Neutrophil and Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Mediated T Cell Suppression Significantly Contributes to Immune Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency Disorders.** Journal of Immunology [online]. 2019, 202(1), 93–104. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.1800102

Document Type: Article; IF = 4,886



Make your **mark.**

Discover reagents that make
your research stand out.

DISCOVER HOW



Neutrophil and Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Mediated T Cell Suppression Significantly Contributes to Immune Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency Disorders

This information is current as of June 28, 2022.

Marcela Vlkova, Zita Chovancova, Jana Nechvatalova, Ashley Nicole Connelly, Marcus Darrell Davis, Peter Slanina, Lucie Travnickova, Marek Litzman, Tereza Grymova, Premysl Soucek, Tomas Freiburger, Jiri Litzman and Zdenek Hel

J Immunol 2019; 202:93-104; Prepublished online 28 November 2018;
doi: 10.4049/jimmunol.1800102
<http://www.jimmunol.org/content/202/1/93>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2018/11/27/jimmunol.1800102.DCSupplemental>

References This article **cites 70 articles**, 18 of which you can access for free at:
<http://www.jimmunol.org/content/202/1/93.full#ref-list-1>

Why *The JI*? [Submit online.](#)

- **Rapid Reviews! 30 days*** from submission to initial decision
- **No Triage!** Every submission reviewed by practicing scientists
- **Fast Publication!** 4 weeks from acceptance to publication

**average*

Subscription Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at:
<http://jimmunol.org/subscription>

Permissions Submit copyright permission requests at:
<http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
<http://jimmunol.org/alerts>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
1451 Rockville Pike, Suite 650, Rockville, MD 20852
Copyright © 2018 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Neutrophil and Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Mediated T Cell Suppression Significantly Contributes to Immune Dysregulation in Common Variable Immunodeficiency Disorders

Marcela Vlkova,^{*,†} Zita Chovancova,^{*,†} Jana Nechvatalova,^{*,†} Ashley Nicole Connelly,^{‡,§} Marcus Darrell Davis,^{‡,§} Peter Slanina,^{*,†} Lucie Travnickova,^{*} Marek Litzman,[¶] Tereza Grymova,^{||,#} Premysl Soucek,^{||,#} Tomas Freiburger,^{*,||,#} Jiri Litzman,^{*,†} and Zdenek Hel^{‡,§}

Common variable immunodeficiency disorders (CVID) represent a group of primary immunodeficiency diseases characterized by hypogammaglobulinemia and impaired specific Ab response, resulting in recurrent infections due to dysfunctional immune response. The specific mechanisms mediating immune deficiency in CVID remain to be determined. Previous studies indicated that immune dysregulation in CVID patients is associated with chronic microbial translocation, systemic immune activation, and altered homeostasis of lymphocytic and myeloid lineages. A detailed phenotypic, functional characterization of plasma markers and immune cell populations was performed in 46 CVID patients and 44 healthy donors. CVID patients displayed significantly elevated plasma levels of a marker of neutrophil activation neutrophil gelatinase-associated lipocalin. Neutrophils from CVID patients exhibited elevated surface levels of CD11b and PD-L1 and decreased levels of CD62L, CD16, and CD80, consistent with a phenotype of activated neutrophils with suppressive properties. Neutrophils from CVID patients actively suppressed T cell activation and release of IFN- γ via the production of reactive oxygen species. Furthermore, CVID was associated with an increased frequency of low-density neutrophils (LDNs)/granulocytic myeloid-derived suppressor cells. LDN/granulocytic myeloid-derived suppressor cell frequency in CVID patients correlated with reduced T cell responsiveness. Exogenous stimulation of whole blood with bacterial LPS emulated some but not all of the phenotypic changes observed on neutrophils from CVID patients and induced neutrophil population with LDN phenotype. The presented data demonstrate that neutrophils in the blood of CVID patients acquire an activated phenotype and exert potent T cell suppressive activity. Specific targeting of myeloid cell-derived suppressor activity represents a novel potential therapeutic strategy for CVID. *The Journal of Immunology*, 2019, 202: 93–104.

Common variable immunodeficiency disorders (CVID) are a heterogeneous group of defects representing the most frequent form of primary symptomatic hypogammaglobulinemia (1). CVID patients suffer from clinically significant immunodeficiency that manifests by frequent and severe respiratory tract infections, diarrhea, and autoimmune disorders. Recurrent bacterial infections in CVID patients are predominantly caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Staphylococcus aureus* (2, 3). In ~2–10% of patients with CVID, specific mutations in more than 20 genes were described,

including genes coding for LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA), CTLA-4, CD19, CD20, CD21, CD81, ICOS, BAFF-R, transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI), and others (2, 3). Previous studies have demonstrated a number of lymphocytic abnormalities in CVID patients, including chronic T cell activation, reduced T cell functionality, and decreased absolute numbers of CD4⁺ T cells and NK cells in the systemic circulation (4–10). The specific mechanisms underlying systemic immune dysregulation in CVID remain unclear. Studies by others and us demonstrated

*Department of Clinical Immunology and Allergology, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic; [†]St. Anne's University Hospital, 656 91 Brno, Czech Republic; [‡]Department of Pathology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35249; [§]Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294; [¶]Department of Economics, Faculty of Business and Economics, Mendel University in Brno, 613 00 Brno, Czech Republic; ^{||}Central European Institute of Technology, Masaryk University, 601 77 Brno, Czech Republic; and [#]Centre for Cardiovascular Surgery and Transplantation, 656 91 Brno, Czech Republic

ORCIDs: 0000-0003-2122-7784 (M.V.); 0000-0003-0634-005X (J.N.); 0000-0003-3257-487X (A.N.C.); 0000-0003-0076-3668 (P. Slanina); 0000-0002-1332-3103 (L.T.); 0000-0001-9495-8188 (M.L.); 0000-0002-9985-2531 (P. Soucek); 0000-0001-6532-7053 (T.F.).

Received for publication January 23, 2018. Accepted for publication October 26, 2018.

This work was supported by Grant 15-28732A from the Czech Ministry of Health.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Marcela Vlkova, Department of Clinical Immunology and Allergology, Faculty of Medicine, St. Anne's University Hospital and Faculty of Medicine, Masaryk University, Pekarska 53, 656 91 Brno, Czech Republic. E-mail address: marcela.vlkova@fnusa.cz

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CAT, catalase; CVID, common variable immunodeficiency disorder; G-MDSC, granulocytic myeloid-derived suppressor cell; iNOS, inducible NO synthase; LDN, low-density neutrophil; L-NHA, *N*^G-hydroxy-L-arginine monoacetate; L-NMMA, *N*^ω-monomethyl-L-arginine acetate salt; NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin; ROS, reactive oxygen species, sCD14, soluble CD14; SOD, superoxide dismutase; SSC, side light scatter.

Copyright © 2018 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/18/\$37.50

that immune dysregulation in CVID is associated with chronic microbial translocation, systemic activation of myeloid cells, and altered phenotype of myeloid cell-derived cytokines, including increased production of G-CSF and other factors involved in granulopoiesis and regulation of neutrophil recruitment and activation (10–13).

Neutrophils represent the most abundant nucleated leukocyte population (50–70% of all WBCs) that is specifically geared for sensitive detection of bacterial products (14–16). Any significant functional alteration of this population is likely to exert a profound effect on the host. Systemic bacterial or viral infection induces a hematopoietic response referred to as emergency granulopoiesis, with up to 1×10^{11} granulocytes generated each day (17, 18). Recent elegant studies have demonstrated that emergency granulopoiesis is driven by G-CSF produced by endothelial cells in response to LPS signaling via TLR4/MyD88 pathway (18–20). G-CSF-induced neutrophils were shown to arise from alternative differentiation pathway from common myeloid progenitors and granulocyte/macrophage progenitors, produce reactive oxygen species (ROS), and display potent immunosuppressive properties (19–21).

A new appreciation of the significance of neutrophils for the host has emerged in light of recent findings on their heterogeneity and plasticity (16, 22), their ability to survive long term, and their ability to shape adaptive arm immune responses (14–16, 23, 24). Neutrophils regulate immune hyper and hypoactivation via a release of inflammatory and toxic mediators and by curbing excessive immune responses (16, 25). The altered functionality of neutrophils can lead to severe inflammatory complications and sepsis (26). Neutrophils colocalize and actively communicate with T cells in draining lymph nodes and other organized lymphoid tissues in which they are involved in negative regulation of T cell function via production of ROS and arginase-1 (15, 27–32). We have recently described a presence of immunosuppressive neutrophils in the blood of HIV-1-infected patients that are likely induced by microbial translocation and suppress T cell function via the production of ROS and programmed death PD-1/PD-L1/interaction (33). Recent studies have identified an immunosuppressive population of CD16⁺CD62L^{low} neutrophils that is induced in human volunteers following injection of a low dose of bacterial LPS and inhibits T cell function by local release of hydrogen peroxide (31) and via PD-L1/PD1 axis.

In sepsis, trauma, and various chronic inflammatory conditions, a population of low-density neutrophils (LDNs) with immunosuppressive properties has been detected (23, 30, 33, 34). In autoimmune diseases, LDNs have been associated with enhanced NETosis and extensive endothelial damage (35). A similar population of granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) has been reported by multiple studies, primarily in patients with cancer (30, 34, 36, 37). Both LDNs and G-MDSCs exert low-density phenotype and cosegregate in the PBMC fraction on a density gradient. It is unclear at present whether LDN and G-MDSC populations are identical or differ in their phenotype, origin, and functional properties (30). Furthermore, it remains to be established whether LDNs/G-MDSCs originate by granulopoiesis from dedicated suppressive progenitors in the bone marrow or, alternatively, they represent a functional subset of neutrophils that is acquired the immunosuppressive phenotype in response to specific signals in the periphery (30). Both LDNs and G-MDSCs display a remarkable ability to suppress T cell-mediated immune responses by multiple mechanisms, including production of ROS, the release of arginase-1 resulting in a depletion of arginine and downregulation of TCR ζ chain, production of regulatory cytokines, and induction of regulatory T cells

(30, 32, 34). LDNs/G-MDSCs are believed to serve as a negative feedback mechanism preventing extensive damage to the host in sepsis and inflammation (32).

The goal of the current study was to determine the phenotype of granulocytes in CVID patients with an emphasis on possible regulatory effect on T cell function. We present evidence that neutrophils in CVID patients acquire a specific activated phenotype and exert potent T cell suppressive activity, a previously unrecognized mechanism of immune suppression in CVID patients.

Materials and Methods

Patients and healthy donors

All participants in the study were white and from South Moravian region of Czech Republic. The study was approved by the Medical Ethics Committee of St Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic. Informed consent was obtained from all volunteers prior to the inclusion in the study. A total of 46 CVID patients (25 females, 21 males; median age 45, range 22–82 y) and 44 healthy donors (23 females, 21 males; median age 41, range 19–78 y) were recruited. All patients fulfilled the International Consensus Document diagnostic criteria for CVID (38). Clinical characteristics of the study population are described in Table I. CVID patients were treated with regular i.v. (IVIG) ($n = 25$) or s.c. (SCIG) ($n = 21$) substitution. None of the patients suffered from opportunistic infections typical for late-onset combined immunodeficiency (39). One patient recently had splenectomy for splenomegaly and hypersplenism. One patient underwent partial gastrectomy for gastric cancer; no other malignancies were detected in any of the participants. Three patients were on long-term steroid treatment (owing to granulomatous disease, lung fibrosis, and demyelinating disease). One patient was treated with combined immunosuppressives (steroids and leflunomide) owing to lung fibrosis, arthritis, neurologic involvement, and diarrhea.

Cell isolation

Blood samples for isolation of PBMCs and T cells of patients on IVIG treatment were collected before the IVIG infusion. PBMCs and neutrophils were isolated from the blood harvested in EDTA-containing vacutainers by density gradient centrifugation ($400 \times g$, 30 min) using Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and washed twice with PBS supplemented with 5% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Following centrifugation, the upper mononuclear cell layer was removed, and the lower granulocyte layer was collected and resuspended. Erythrocytes were lysed using isotonic NH_4Cl erythrocyte lysis buffer (170 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 20 mM EDTA, pH 7.3) at room temperature. Cells were cultured in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (HyClone, South Logan, UT), 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine (HyClone), further referred to as complete RPMI medium. T cells were isolated from peripheral blood using RoboSep Human CD3 Positive Selection Whole Blood kit (STEMCELL Technologies, Rockford, IL). Separation was performed on the instrument RoboSep-S (STEMCELL Technologies) according to the manufacturer's instructions.

ELISA for the detection of neutrophil activation markers and cytokines

To prevent neutrophil degranulation and release of enzymes, EDTA blood was collected on ice. Within 20 min after the blood draw, the plasma was separated by centrifugation ($1500 \times g$, 4°C, 15 min). Plasma was removed and transferred to fresh polypropylene tube without disturbing white cells in the buffy coat. Harvested plasma was centrifuged second time under the same conditions to separate any remaining WBCs. Samples were cryopreserved at -80°C . ELISA assays for the determination of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL; Hycult Biotech, Plymouth Meeting) and IFN- γ (BioLegend, San Diego, CA) were performed according to the manufacturers' protocols.

Cell culture

PBMCs and T cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ purified plate-bound anti-CD3 mAb (CD3 mAb; clone Hit-3a; BioLegend) and with added 0.3 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD28 mAb (clone CD28.2; eBioscience) for 18 h in complete RPMI medium in 96-well flat-bottom plates with a starting concentration of 2×10^5 cells per well, (1×10^6 per ml) of PBMCs or 10^5 cells per well (1×10^6 ml) of T cells. For detection of cytokines by intracellular staining, Brefeldin A (10 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich) was added for the last 4 h. Cell

proliferation was determined by the incorporation of thymidine analog BrdU (PerkinElmer, Waltham, MA) into newly synthesized DNA and detection with anti-BrdU Ab. For proliferation, PBMCs and T cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ purified plate-bound anti-CD3 mAb and added to 0.3 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD28 mAb for 48 h in complete RPMI medium at a starting concentration of 2×10^5 cells per well (1×10^6 per ml) for PBMCs and 1×10^5 cells per well for T cells (1×10^6 per ml) in 96 flat-bottom cells. BrdU was added for the last 12 h. Proliferating cells were processed using the DELFIA Cell proliferation kit (PerkinElmer) following the manufacturer's protocol. Briefly, cells are incubated with the nonradioactive pyrimidine analog BrdU to allow its incorporation into newly synthesized DNA. Subsequently, europium-labeled anti-BrdU Abs are used to detect the level of BrdU incorporation via time-resolved fluorescence, a measurement of the Eu-fluorescence in a time-resolved fluorometer EnSight (PerkinElmer). For the neutrophil/T cell suppression assays, purified T cells or PBMCs were stimulated with plate-bound anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) and soluble anti-CD28 (0.3 $\mu\text{g/ml}$) Abs for 18 h for production of cytokines and 48 h for proliferation test. Neutrophils were cocultured with CD3⁺ T cells or PBMCs at 1:3 T cell/neutrophil ratio (10^5 cells; 3×10^5 neutrophils per well). To address the mechanism of neutrophil-mediated suppression of T cells, catalase (CAT; 1000 U/ml) and superoxide dismutase (SOD; 200U/ml; Sigma-Aldrich) were added to media to neutralize ROS, *N*^G-hydroxy-L-arginine monoacetate (L-NHA; 2.5 $\mu\text{g/ml}$) was added to inhibit arginase-1, and *N*^ω-monomethyl-L-arginine acetate salt (L-NMMA; 2.5 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich) was added to inhibit the function of inducible NO synthase (iNOS). Anti-PD-L1 (clone 29E.2A3) (5 $\mu\text{g/ml}$) and anti-PD-1 (clone EH12.2H7) (5 $\mu\text{g/ml}$, BioLegend) Abs were added to inhibit PD-L1/PD-1 signaling pathway.

Intracellular cytokine staining

Cells were washed, fixed, permeabilized using Intracellular Fixation and Permeabilization Buffer Set (eBioscience, San Diego, CA), and stained with IFN- γ -BV421 (clone 4S.B3) (BioLegend). Dead cell exclusion was performed using aqua-fluorescent reactive dye LIVE/DEAD Fixable Stain Kit (Invitrogen, CA). T cell staining was performed using CD4-PE-Cy7 (clone SFCl12T4D11), CD8-allophycocyanin A750 (clone B9.11) (Beckman Coulter, Miami, FL), CD3-allophycocyanin (clone SK7) (BD Biosciences, San Jose, CA), and CD25-PerCP-Cy5.5 (clone BC96) (BioLegend). Gating strategy for the analysis of the expression of CD25 and intracellular production of IFN- γ is depicted in Supplemental Fig. 1.

Flow cytometry characterization of neutrophils and LDNs

For the determination of activation markers on the surface of neutrophils, mAbs were used in the following combinations: 1) CD15-FITC (clone HI98), CD80-PE (clone 2D10), CD14-PerCP-Cy5.5 (clone M5E2), CD274-allophycocyanin (PD-L1) (clone 29E.2A3), CD62L-BV421 (clone DREG-56) (BioLegend) and CD16-allophycocyanin A750 (clone 3G8), CD45-Krome Orange (clone J33) (Beckman Coulter); 2) CD15-FITC, CD87-PE (clone VIM5), CD14-PerCP-Cy5.5, CD11a-PE-Cy7 (clone HI111), HLA-DR-BV421 (clone L243), CD11b-BV 510 (clone ICRF44), (BioLegend), and CD45-allophycocyanin-H700 (clone 2D1) (BD Biosciences); 3) CD15-FITC, CCR3-PE (clone 5E8), CD14-PerCP-Cy5.5, CD64 PC7 (clone 10.1) CXCR4-allophycocyanin (clone 12G5), CD62L-BV421, CD11b-BV 510, CD16-allophycocyanin A750; 4) CD15-FITC, CCR3-PE, CD14-PerCP-Cy5.5, CD64 PE-Cy7, CD54-allophycocyanin (clone HA58), CD62L-BV421, CD11b-BV 510, CD16-allophycocyanin A750; 5) CD15-FITC, CCR3-PE, CD14-PerCP-Cy5.5, CD10-allophycocyanin (clone HI10a), CD62L-BV421, CD11b-BV 510, and CD16-allophycocyanin A750. Briefly, fresh blood samples were incubated for 30 min at 4°C in the dark with mAbs. The erythrocytes were lysed by Multi-Q-Prep Lysing Workstation (Beckman Coulter). Samples were acquired using a Navios flow cytometer (10 colors, three lasers; Beckman Coulter), and cytometry data (LMD files) were analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter). The data are presented as the median fluorescence intensity for each cell subset. Gating strategy for the analysis of neutrophils is depicted in Supplemental Fig. 2A.

For the characterization of LDNs, freshly isolated PBMCs were incubated for 30 min in the dark with the following mAbs: CD15-FITC, CCR3-PE, CD14-PerCP-Cy5.5, CD33-PE-Cy7 (clone D3HL60.251), CD10-allophycocyanin or CXCR4-allophycocyanin or CD54-allophycocyanin, CD62L-BV510 (BioLegend), CD16 allophycocyanin A750, and CD45-Krome Orange (Beckman Coulter). Gating strategy for the analysis of LDNs is depicted in Supplemental Fig. 2B.

Ex vivo stimulation of blood with bacterial products

Whole blood freshly obtained from healthy donors was either not stimulated or stimulated with fMLF (10 μM ; Sigma-Aldrich) or LPS (1 $\mu\text{g/ml}$,

Escherichia coli 0111:B4; Sigma-Aldrich) at 37°C for the indicated time and immediately stained with CD14-allophycocyanin/Fire750 (clone 63D3), CD274-PE-Cy7 (PD-L1; 29E.2A3), CD11b-PerCP-Cy5.5 (ICRF44; BioLegend), CD62L-BV711 (DREG-56), CD193-BV510 (CCR3; 5E8; BD Biosciences), CD15-eFluor450 (HI98), and CD16-allophycocyanin (eBioCB16; eBioscience) for 30 min at 4°C. Samples were washed with cold wash Dulbecco's PBS buffer with EDTA (1 mM EDTA in DPBS) and centrifuged at $200 \times g$ for 5 min to remove unbound Abs. Samples were lysed with 1 ml of 1-step Fix/lyse buffer (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) in the dark at room temperature for 15 min, washed, and resuspended in equal parts of 2% FBS in DPBS and intracellular Fixation buffer (Thermo Fisher Scientific) prior to the analysis on the Attune NxT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific). Cytometry data were analyzed by FlowJo (FlowJo, Ashland, OR). For the analysis of induction of LDNs in whole blood ex vivo, whole blood from healthy donors was either not stimulated or stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) or fMLF (10 μM) at 37°C for the indicated time; PBMCs were purified by gradient centrifugation, and LDNs were characterized as described above.

Statistics

Intergroup differences were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney *U* test or Wilcoxon signed-rank test as appropriate. Correlations were assessed using the Spearman rank correlation test. Fisher exact test was used for the analysis of categorical data. The *p* values <0.05 (two-tailed) were considered statistically significant. Data were analyzed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, CA).

Results

CVID patients display elevated levels of NGAL in plasma

Granulocytes have been previously shown to contribute to several autoimmune and inflammatory complications in CVID patients, including granuloma formation and chronic lung, intestinal, and other organ inflammation (38). We have previously reported that CVID patients display increased levels of myeloid cell-derived cytokines and chemokines in plasma, including factors involved in granulopoiesis and neutrophil activation (10). To further address the potential role of granulocytes in CVID pathogenesis, we analyzed immune cell populations and plasma markers of granulocytic activation in 46 CVID patients and 44 healthy donors (clinical parameters of the study population are described in Table 1). CVID patients displayed increased absolute number of neutrophils compared with controls (3.45×10^9 per l versus 2.71×10^9 per l; *p* = 0.014; Mann-Whitney *U* test) (Fig. 1) whereas the absolute number of lymphocytes was decreased (1.43×10^9 per l versus 1.97×10^9 per l; *p* < 0.0001), consistent with a previous study (5). Interestingly, the plasma concentration of NGAL, a marker of neutrophil activation and degranulation, was significantly increased in CVID patients compared with healthy controls (*p* < 0.0001; Mann-Whitney *U* test) (Fig. 2). Because the elevated plasma level of NGAL could be caused by the increase in the absolute number of circulating neutrophils, normalization to absolute neutrophil count was performed. Following normalization, the statistical significance of intergroup differences was preserved (*p* < 0.0001) (Fig. 2). The intergroup differences remained significant after exclusion of CVID patients with C-reactive protein (CRP) >10 mg/l (*n* = 7; *p* < 0.0001), indicating that the increase in neutrophil activation and degranulation marker could not be attributed solely to the level of systemic immune activation. No correlations between the concentration of NGAL and other laboratory and clinical parameters were observed. No statistically significant difference in plasma levels of arginase-1 between CVID patients and healthy donors was observed (Supplemental Fig. 3).

Neutrophils from CVID patients exhibit an activated phenotype

To further address the potential role of granulocytes in CVID pathogenesis, we evaluated the levels of neutrophil surface markers of activation and potential suppressor activity in fresh blood of

Table I. Clinical characteristics of the study population

	IVIG (n = 27)	SCIG (n = 19)	Total (n = 46)
F/M	14/13	11/8	25/21
Age, mean (range)	43.5 (23–77)	46.9 (21–83)	45.5 (21–83)
Length of Ig treatment, mean (range)	11.52 (0.17–25)	9.89 (1–21)	10.85 (0.17–25)
Bronchiectasis, n (%)	14/25 ^a (56)	3/19 (16)	17/44 ^a (39)
Autoimmune diseases, n (%)	4/27 (15)	7/19 (37)	11/46 (24)
Granuloma, n (%)	4/25 ^a (16)	3/19 (16)	7/44 ^a (16)
Chronic diarrhea, n (%)	4/27 (15)	5/19 (26)	9/46 (20)

^aData concerning bronchiectasis and granulomas were not available in two patients. F, female; M, male.

CVID patients and healthy donors. Whole blood neutrophils were gated as side light scatter (SSC)^{high} CD45⁺ CD15⁺ population, and the surface levels of CD11a, CD11b, CD16, CD62L, CD80, CD87, PD-L1, and HLA-DR were examined. A significant increase of median fluorescence intensity of CD11b ($p < 0.01$) and PD-L1 ($p < 0.002$), and decreases of CD16 ($p < 0.01$), CD62L ($p < 0.0005$), and CD80 ($p = 0.0002$, Mann–Whitney U tests) were observed on neutrophils from CVID patients compared with neutrophils from healthy donors (Fig. 3). CD11a, CD87, HLA-DR, CD10, CXCR4, and CD54 levels were not significantly different between the experimental groups. Surface levels of CD10 and CXCR4 are depicted in Supplemental Fig. 4. Phenotypic analysis of T cells of CVID patients revealed an increased expression of PD-1 on both CD4⁺ and CD8⁺ T cells compared with controls, consistent with previous reports (9, 10). However, no significant correlations were found between the levels of PD-L1 on neutrophils and PD-1 on T cells in CVID patients ($p = 0.2$ and $p = 0.4$ for PD-1 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells, respectively; Spearman correlation test).

Neutrophils from CVID patients suppress T cell activation and production of IFN- γ

CD11b⁺CD16⁺CD62L^{dim} neutrophils were previously described as a unique circulating population mediating the suppression of T cell activation and cytokine production (31, 32). We have, therefore, assessed the ability of neutrophils from CVID patients to suppress the T cell activation upon CD3/CD28 stimulation *ex vivo*. Surface CD25 expression was higher on CD8⁺ T cells of CVID patients compared with controls ($p < 0.02$) but was significantly reduced on

T cells following coincubation with autologous neutrophils ($p = 0.003$; Wilcoxon test) (Fig. 4A). In contrast, neutrophils suppressed CD4⁺ T cell activation in healthy controls ($p = 0.01$) but not CVID patients ($p = 0.1$) (Fig. 4B). Intracellular production of IFN- γ by CD8⁺ T cells following CD3/CD28 stimulation in the absence of neutrophils was higher in CVID patients ($p < 0.0001$) (Fig. 4C) and correlated with the frequency of effector memory CCR7⁻CD45RO⁺ CD8⁺ T cells in CVID patients ($r = 0.4$; $p = 0.003$), but not in healthy donors ($r = 0.3$; $p = 0.09$; Spearman test). Importantly, the production of IFN- γ by CD8⁺ T cells of CVID patients upon CD3/CD28 stimulation was suppressed following coincubation with autologous neutrophils ($p = 0.005$); however, no effect was observed in healthy donors ($p = 0.6$; Wilcoxon test). Intracellular production of IFN- γ by CD4⁺ T cells following CD3/CD28 stimulation in the absence of neutrophils was higher in CVID patients ($p = 0.004$) (Fig. 4D) and correlated with the frequency of effector memory CCR7⁻CD45RO⁺ CD4⁺ T cells in CVID patients ($r = 0.3$; $p = 0.03$), but not in healthy donors ($r = 0.2$; $p = 0.27$; Spearman test). No significant difference was found in the production of IFN- γ in CD4⁺ T cells after coculture with neutrophils of CVID patients or healthy controls. IFN- γ protein accumulation in the medium upon CD3/CD28 stimulation was lower in cocultures of T cells with neutrophils from CVID patients ($p = 0.02$) as well as healthy controls ($p = 0.04$; Wilcoxon test) (Fig. 4E). The production of IFN- γ in the medium upon CD3/CD28 stimulation was higher in the culture of T cells in CVID patients $p < 0.005$; Mann–Whitney U test). Suppressive activity of CVID neutrophils was not significantly associated with clinical symptoms, including bronchiectasis, splenomegaly, chronic diarrhea, granuloma, or autoimmunity (tested using Fischer exact test), duration of Ig treatment, or the time from the first manifestation of ID symptoms (tested using Mann–Whitney U test).

Neutrophil-mediated immune suppression of IFN- γ production by activated T cells in CVID patients is dependent on ROS

To address the mechanisms of neutrophil-mediated suppression of T cell function, T cells were cocultured with neutrophils in media supplemented with CAT and SOD to neutralize ROS, iNOS inhibitor L-NMMA, arginase inhibitor L-NHA, or anti-PD-L1 and anti-PD-1 Abs to inhibit the PD-L1/PD1 pathway. The production of IFN- γ by CD3⁺CD8⁺ T cells following stimulation with CD3/CD28 in coculture with neutrophils from CVID patients was restored in the presence of CAT and SOD (Fig. 5A). Inhibition of PD-L1/PD-1 signaling resulted in partial restoration of neutrophil-mediated suppression of the production of IFN- γ by CD3⁺CD8⁺ T cells in CVID patients (Fig. 5A). In healthy donors, the production of IFN- γ by stimulated CD3⁺CD8⁺ T cells cocultured with neutrophils was restored only in the presence of ROS inhibitors ($p < 0.0001$; Wilcoxon test). No significant alteration of the production of IFN- γ by CD4⁺ T cells stimulated in the presence of inhibitors was observed in CVID patients or healthy controls. Full restoration of neutrophil-mediated suppression of extracellular

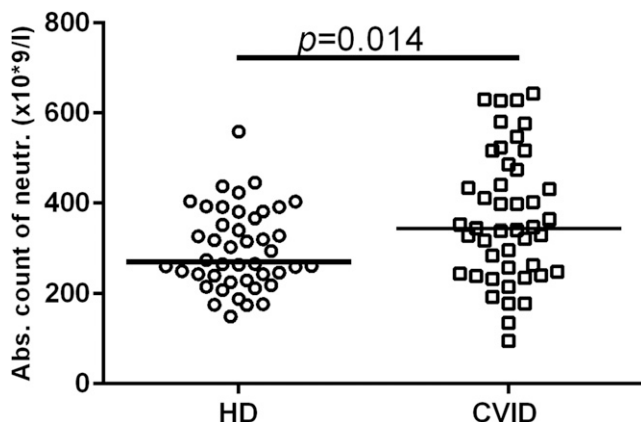
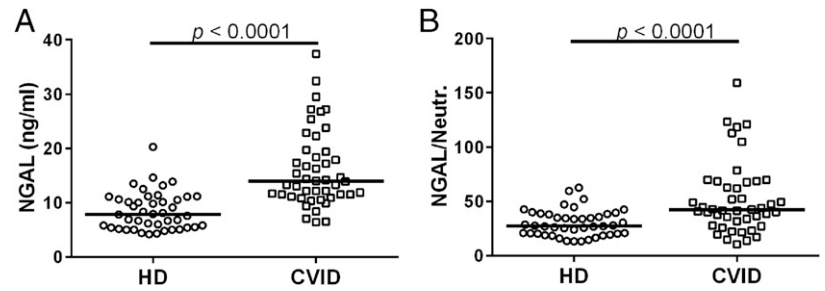


FIGURE 1. CVID patients display increased absolute neutrophil blood count. Total leukocyte counts were determined in whole blood. The neutrophils were gated as CD45⁺CD15⁺ CD16⁺SSC^{high} cells. The absolute number of circulating neutrophils was determined based on the flow cytometry analysis of population frequency and absolute leukocyte count. Horizontal bars represent medians; data were analyzed using the Mann–Whitney U test (CVID: $n = 46$; HD: $n = 44$). HD, healthy donors.

FIGURE 2. CVID patients display elevated plasma levels of NGAL. Plasma NGAL concentrations were determined using ELISA. The absolute concentration of NGAL (**A**) and concentration of NGAL normalized to absolute neutrophil count (**B**) are depicted. Horizontal bars represent medians; data were analyzed using the Mann–Whitney *U* test (CVID: *n* = 46; HD: *n* = 44). HD, healthy donors.



production of IFN- γ by stimulated T cells was observed in the presence of ROS inhibitors in CVID patients (Fig. 5B) as well as in healthy donors ($p < 0.0001$; tested by Wilcoxon test). A partial restoration was observed in the presence of the inhibitor of arginase-1 or blockade of the PD-L1/PD-1 pathway in CVID patients (Fig. 5B) as well as in healthy donors ($p = 0.0002$ for both L-NHA and PD-L1/PD-L1 inhibition; tested by Wilcoxon test).

Neutrophils from CVID patients suppress the proliferation of autologous T cells

To evaluate the suppressive effect of CVID neutrophils on autologous T cells, T cells were stimulated with CD3/CD28 in the presence or absence of neutrophils and proliferation was analyzed

after 48 h. The proliferation of T cells was significantly reduced following coincubation with autologous neutrophils from CVID patients ($p = 0.03$; Wilcoxon test) (Fig. 6A). No significant effect was detected following coculture of T cells of healthy donors with autologous neutrophils (Fig. 6A). To address the mechanism underlying neutrophil-mediated suppression of T cell proliferation in CVID patients, the experiments were performed in the presence of inhibitors of ROS, iNOS, arginase-1, and PD-L1/PD1 pathway. No statistically significant effect of inhibitors of any of the regulatory pathways was observed (Fig. 6B). Therefore, the mechanism of neutrophil-mediated inhibition of T cell proliferation in CVID patients remains unclear. Importantly, a negative correlation was observed between the expression of CD62L on fresh blood

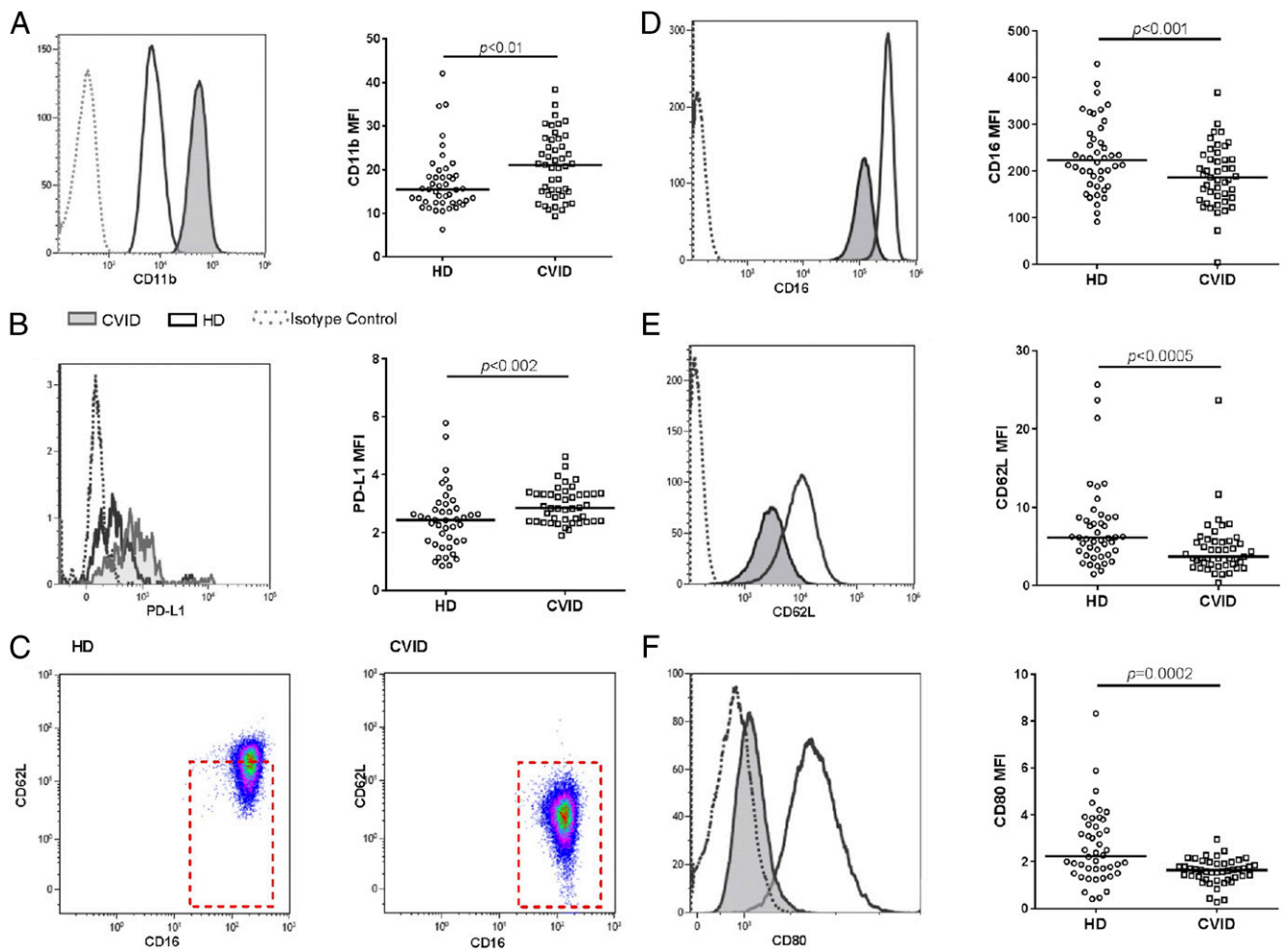
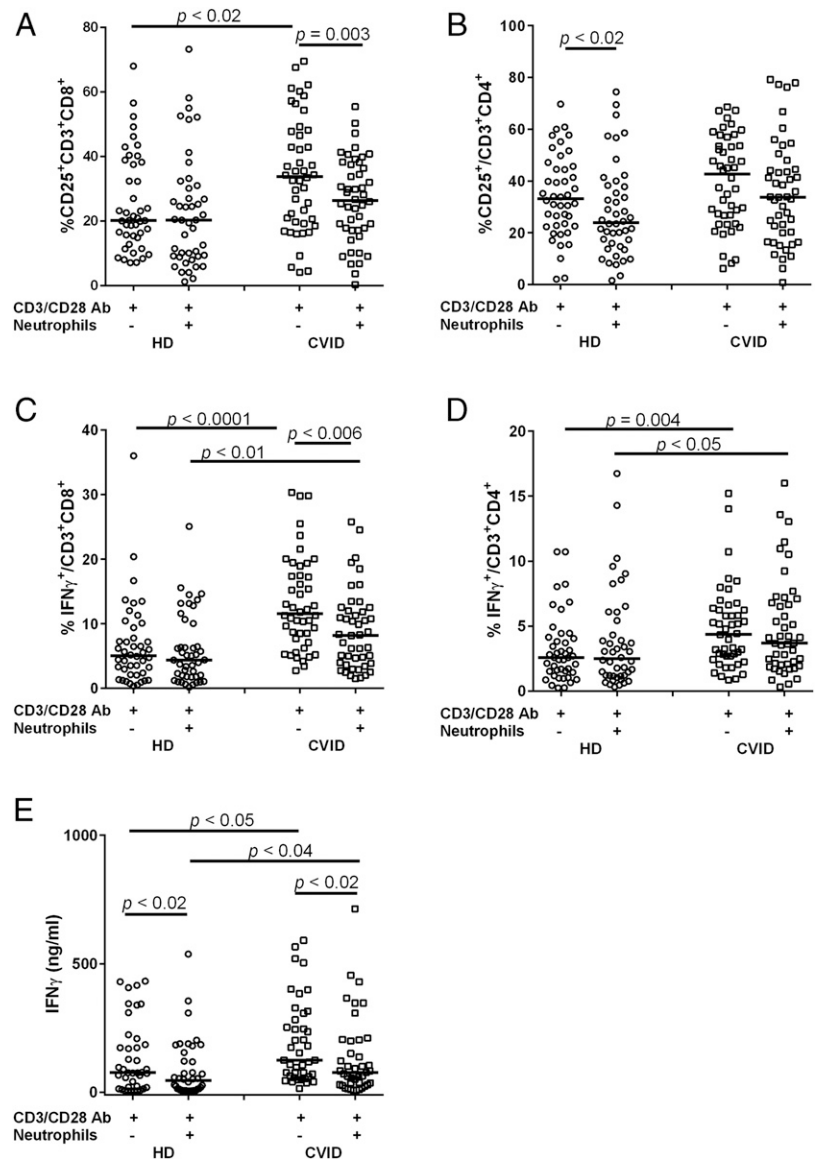


FIGURE 3. Neutrophils from CVID patients exhibit an activated phenotype. Neutrophils were gated as CD45⁺CD15⁺CD16⁺SSC^{high} cells. (**A** and **B**) Increased expression of CD11b (A) and PD-L1 (B) on neutrophils in fresh blood of CVID patients. (**C**) Decreased levels of CD16 and CD62L on neutrophils in fresh blood of CVID patients; representative examples. (**D–F**) Decreased expression of CD16 (D), CD62L (E), and CD80 (F) on neutrophils in fresh blood of CVID patients; cumulative data. Horizontal bars represent medians; data were analyzed using the Mann–Whitney *U* test (CVID: *n* = 46; HD: *n* = 44). HD, healthy donors.

FIGURE 4. Neutrophils from COVID patients suppress T cell activation and production of IFN- γ . Purified CD3⁺ T cells were isolated from healthy donors and COVID patients and stimulated with anti-CD3 (1 μ g/ml) and anti-CD28 (0.3 μ g/ml) Abs in the absence or presence of autologous neutrophils at 1:3 T cell/neutrophil ratio (1×10^5 T cells; 3×10^5 neutrophils per well). After 18 h of coculture, the frequencies of CD25⁺ and IFN- γ ⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells were determined by flow cytometry. IFN- γ was determined by intracellular staining. (**A** and **B**) Percentages of CD25⁺ T cells of total CD3⁺CD8⁺ or CD3⁺CD4⁺ T cells. (**C** and **D**) Percentages of IFN- γ ⁺ T cells of total CD3⁺CD8⁺ or CD3⁺CD4⁺ T cells. (**E**) Coincubation of T cells with autologous neutrophils in culture supernatants in response to the stimulation with CD3/CD28. Horizontal bars represent medians, which were analyzed using Wilcoxon or Mann-Whitney *U* test as appropriate (COVID: *n* = 46; HD: *n* = 44). HD, healthy donors.



neutrophils and their capacity to suppress autologous T cell proliferation *ex vivo* ($r = -0.5$; $p = 0.002$; Spearman test) (Fig. 6C), consistent with the reported suppressive activity of CD62L^{dim} neutrophils (31, 32). In contrast, no significant correlation was observed in healthy donors (Fig. 6C).

COVID patients display an increased frequency of LDNs/G-MDSCs

LDNs and G-MDSCs have been previously described as specific populations of suppressive granulocytes in cancer, trauma, and other inflammatory conditions (33, 34). Although it remains to be determined whether LDNs and G-MDSCs represent an identical cell population, they have been shown to share many key properties, most notably the low-density phenotype resulting in their retention in the PBMC layer on density gradients. We have addressed whether the frequency LDNs/G-MDSCs, characterized as SSC^{high}CD33⁺CD14⁻CD15⁺ cells in fresh PBMCs, is increased in the blood of COVID patients. As shown in Fig. 7A and 7B, COVID patients exhibited a significantly increased frequency of LDNs in PBMCs compared with healthy donors ($p = 0.02$). A positive correlation was observed between CD11b expression on neutrophils from fresh blood and the frequency of LDNs in COVID patients ($r = 0.4$; $p = 0.007$) and

healthy donors ($r = 0.3$; $p = 0.04$; Spearman test). Next, we examined whether the presence of LDNs is associated with reduced production of IFN- γ by CD3/CD28-activated T cells *ex vivo*. A negative correlation was observed between the frequency of LDNs in PBMCs and intracellular production of IFN- γ by CD8⁺ T cells in PBMCs of COVID patients ($r = -0.4$; $p = 0.007$) but not healthy donors ($r = -0.05$; $p = 0.8$; Spearman test). CD10, CXCR4, and CD54 levels were not significantly different on LDNs between the experimental groups. No statistically significant correlation between the frequency of LDNs and administration of IVIG or any other laboratory and clinical parameters was observed.

Ex vivo stimulation of blood with bacterial products reduces neutrophil surface levels of CD62L, increases CD11b, and induces LDNs

Others and we have previously described evidence of microbial translocation in COVID patients (10–12). Circulating products of microbial translocation may be responsible for the activated neutrophil phenotype and altered profile of myeloid cell-derived cytokines and chemokines in COVID patients (10, 11). To address this possibility, fresh blood of healthy donors was stimulated with bacterial products fMLF and LPS. As shown in Fig. 8, stimulation

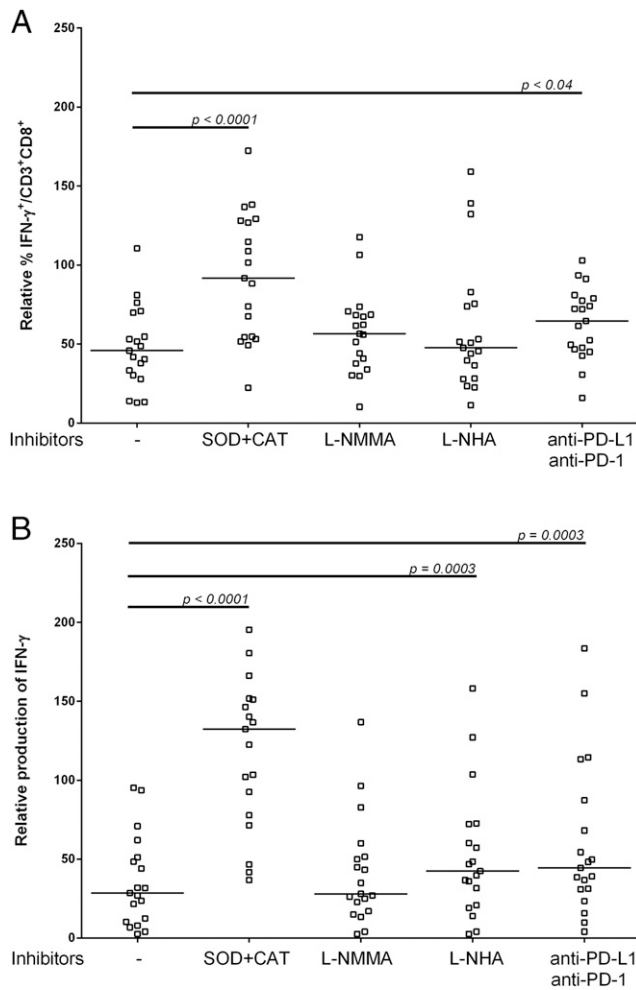


FIGURE 5. Mechanisms of neutrophil-mediated suppression of IFN- γ production by activated T cells in CVID patients. Purified CD3⁺ T cells were isolated from CVID patients and stimulated with anti-CD3 (1 μ g/ml) and anti-CD28 (0.3 μ g/ml) Abs in the presence of autologous neutrophils (10^5 T cells; 3×10^5 neutrophils per well) in the presence or absence SOD (200 U/ml) and CAT (1000 U/ml), L-NMMA (2.5 μ g/ml), L-NHA (2.5 μ g/ml), or anti-PD-1 (5 μ g/ml) and anti-PD-L1 (5 μ g/ml) Abs. After 18 h of coculture, the relative frequency of IFN- γ ⁺ of CD3⁺CD8⁺ cells compared with T cells stimulated in the absence of neutrophils is depicted (**A**). (**B**) IFN- γ concentration was determined in culture supernatants from cell cultures described in (**A**). Relative production of IFN- γ compared with T cells stimulated in the absence of neutrophils is depicted. Analyzed using Wilcoxon test (CVID: $n = 19$).

with LPS and fMLF lead to a rapid increase of surface levels of a degranulation marker CD11b and a decrease in the levels of CD62L. In contrast, the levels of CD16 were not significantly affected by either stimulation. The surface level of suppressor molecule PD-L1 was increased; however, the change did not reach statistical significance. Importantly, stimulation of whole blood from healthy donors ($n = 4$) with bacterial products fMLF or LPS increased the frequency of LDNs in the PBMC layer following density gradient centrifugation by 27-fold ($p = 0.02$) and 18-fold ($p = 0.02$), respectively (Fig. 9).

Discussion

In this study, we show that neutrophils from CVID patients exhibit significantly altered phenotype characterized by reduced surface levels of CD16, CD62L, and CD80 and elevated levels of CD11b and PD-L1. In addition, the presented data indicate that CVID

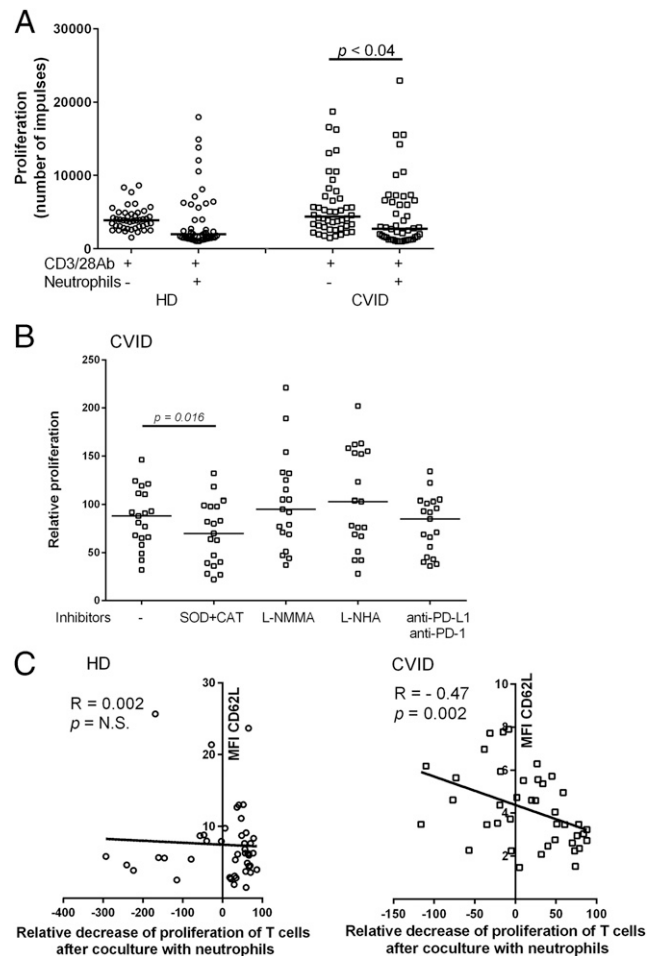


FIGURE 6. CVID neutrophils suppress the proliferation of autologous T cells. (**A**) Purified CD3⁺ T cells from healthy donors and CVID patients were stimulated with anti-CD3 (1 μ g/ml) and anti-CD28 (0.3 μ g/ml) Abs in the absence or presence of autologous neutrophils at 1:3 T cell/neutrophil ratio (1×10^5 T cells; 3×10^5 neutrophils per well). After 48 h of coculture, cell proliferation was determined by the incorporation of BrdU into newly synthesized DNA Analyzed using the Mann-Whitney U test (CVID: $n = 46$; HD: $n = 44$). (**B**) Mechanism of neutrophil-mediated suppression of T cell proliferation. Purified CD3⁺ T cells were isolated from CVID patients and stimulated with anti-CD3 (1 μ g/ml) and anti-CD28 (0.3 μ g/ml) Abs in the presence of autologous neutrophils and in the presence or absence SOD (200 U/ml) and CAT (1000 U/ml), L-NMMA (2.5 μ g/ml), L-NHA (2.5 μ g/ml), or anti-PD-1 (5 μ g/ml) and anti-PD-L1 (5 μ g/ml) Abs. After 48 h of coculture, cell proliferation was determined by the incorporation of BrdU. Relative proliferation compared with T cells stimulated in the absence of neutrophils is depicted. Analyzed using Wilcoxon test (CVID: $n = 19$). (**C**) Correlation between the level of CD62L on fresh blood neutrophils and the relative decrease of T cell proliferation following coincubation with autologous neutrophils from healthy donors and CVID patients. Analyzed using Spearman rank correlation test; r and p values are indicated; lines represent linear regression analysis (CVID: $n = 46$; HD: $n = 44$). HD, healthy donors.

neutrophils actively suppress the activation and IFN- γ production by CD8⁺ T cells via the production of ROS and partially via PD-L1/PD-1 regulatory pathway. This observation may be of high potential importance as it provides a qualitatively new view on the mechanisms of immune suppression in CVID and potentially other immunodeficiencies and inflammatory conditions.

The mechanisms causing altered neutrophil phenotype in CVID are unclear. It is tempting to speculate that changes in neutrophil

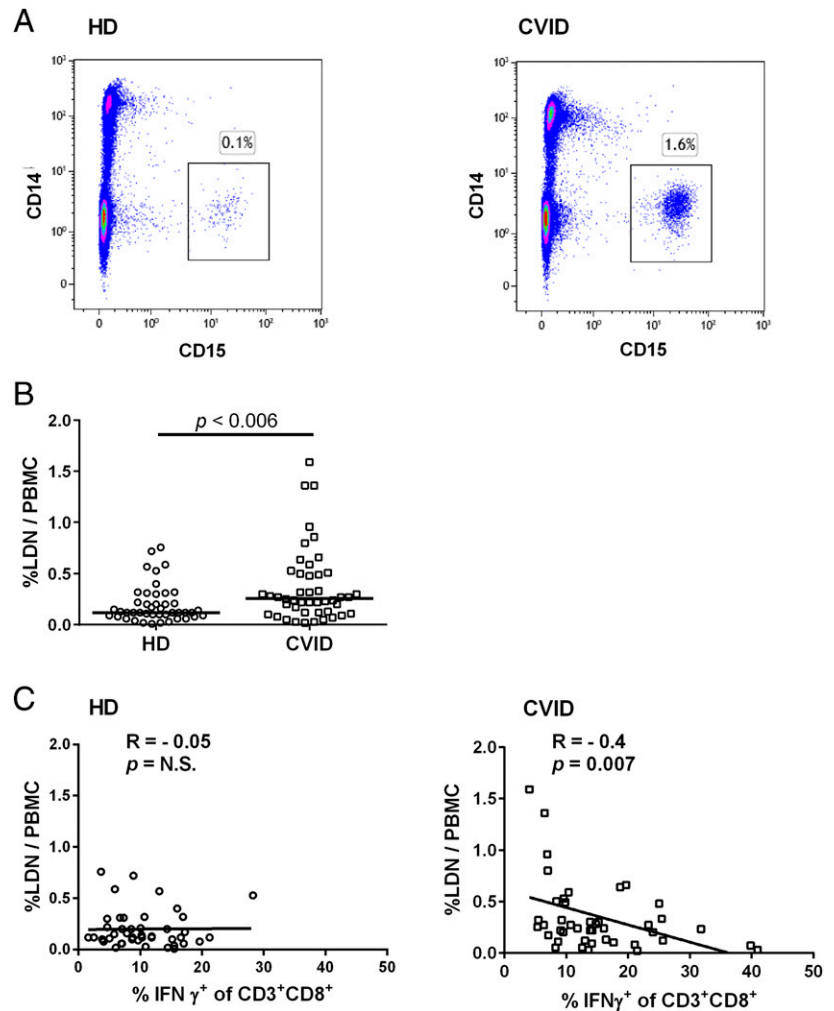


FIGURE 7. The frequency of LDNs is increased in the blood of CVID patients. LDNs were detected as $\text{CD45}^+\text{CD15}^+\text{CCR3}^-\text{CD16}^+$ cells in the PBMC fraction following density gradient centrifugation. **(A)** Representative flow cytometry plots of LDNs detected in PBMCs obtained from a healthy donor and CVID patient. **(B)** Cumulative frequencies of LDNs in PBMCs of healthy donors and CVID patients. Analyzed using the Mann–Whitney U test. **(C)** Correlation between the frequency of LDNs and the percentage of $\text{IFN-}\gamma^+$ $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ T cells following ex vivo stimulation with $\text{CD3}/\text{CD28}$. Analyzed using the Spearman rank correlation test; lines represent linear regression (CVID: $n = 46$; HD: $n = 44$). HD, healthy donors.

population are driven by chronic microbial translocation, a process of transfer of whole bacteria and microbial products from the intestinal lumen into the systemic circulation. Low level of microbial translocation occurs in healthy individuals; however, its extent dramatically increases in various pathological conditions including inflammatory bowel disease, celiac disease, visceral leishmaniasis, dengue virus infection, HIV infection, hepatic cirrhosis caused by alcohol abuse, or hepatitis B and C infections (40, 41). Translocation of bacterial and fungal products results in activation of both innate and acquired immune response mechanisms (10). Others and we have previously presented evidence of chronic microbial translocation in CVID patients (10–13, 42). Complex interactions between LPS, CD14, and TLR 4 results in the secretion of soluble CD14 (sCD14) from myeloid cells. Serum levels of sCD14 represent a marker of bacterial translocation and endotoxemia (43–45). We have previously demonstrated that CVID patients display elevated concentration of plasma sCD14 and other factors consistent with microbial translocation (10). One study showed that, in addition to elevated sCD14, CVID patients display chronic monocytic activation (12). Other investigators showed increased LPS levels together with increased sCD25 in CVID patients (13). We demonstrated that CVID patients display an altered profile of cytokine production, namely reduced serum levels of cytokines produced by CD4^+ Th1 cells ($\text{IFN-}\gamma$, IL-2), Th2 (IL-9, IL-13), and Th17 (IL-17). In contrast, CVID is associated with elevated serum levels of G-CSF, CXCL-10/IP-10, IL-1R antagonist, TNF- α , IL-10, IL-12 (p40), CCL-2/MCP-1,

and eotaxin (10). This cytokine signature is consistent with an ongoing activation of cells of monocytic and granulocytic lineages. The concentration of G-CSF, a key granulopoietic regulator and a central mediator of emergency granulopoiesis (18), was increased by over 2-fold in CVID patients compared with healthy donors ($p = 0.0001$) (10).

Emergency granulopoiesis is a process of rapid generation of neutrophils via increased myeloid progenitor cell proliferation in the bone marrow in response to systemically disseminated bacterial products or invading pathogens. Pathogen sensing occurs mainly in nonhematopoietic cells through TLR signaling. However, sensing by hematopoietic stem and progenitor cells have also been suggested and might contribute to the overall granulopoietic response (17, 18). Recent studies showed that emergency granulopoiesis is driven by G-CSF produced by endothelial cells in response to LPS signaling via the TLR4/MyD88 pathway (18–20, 46). G-CSF-induced neutrophils undergo an alternative differentiation pathway from common myeloid progenitor and granulocyte/macrophage progenitors, produce ROS, and display potent immunosuppressive properties (19–21). In this study, we observed a 30% increase in the absolute numbers of neutrophils in CVID patients ($p = 0.014$; Fig. 1), consistent with enhanced granulopoiesis. However, the rate of granulopoiesis cannot be easily determined from absolute cell counts due to the contribution of complex processes of cell recruitment, trafficking, survival, and removal (47).

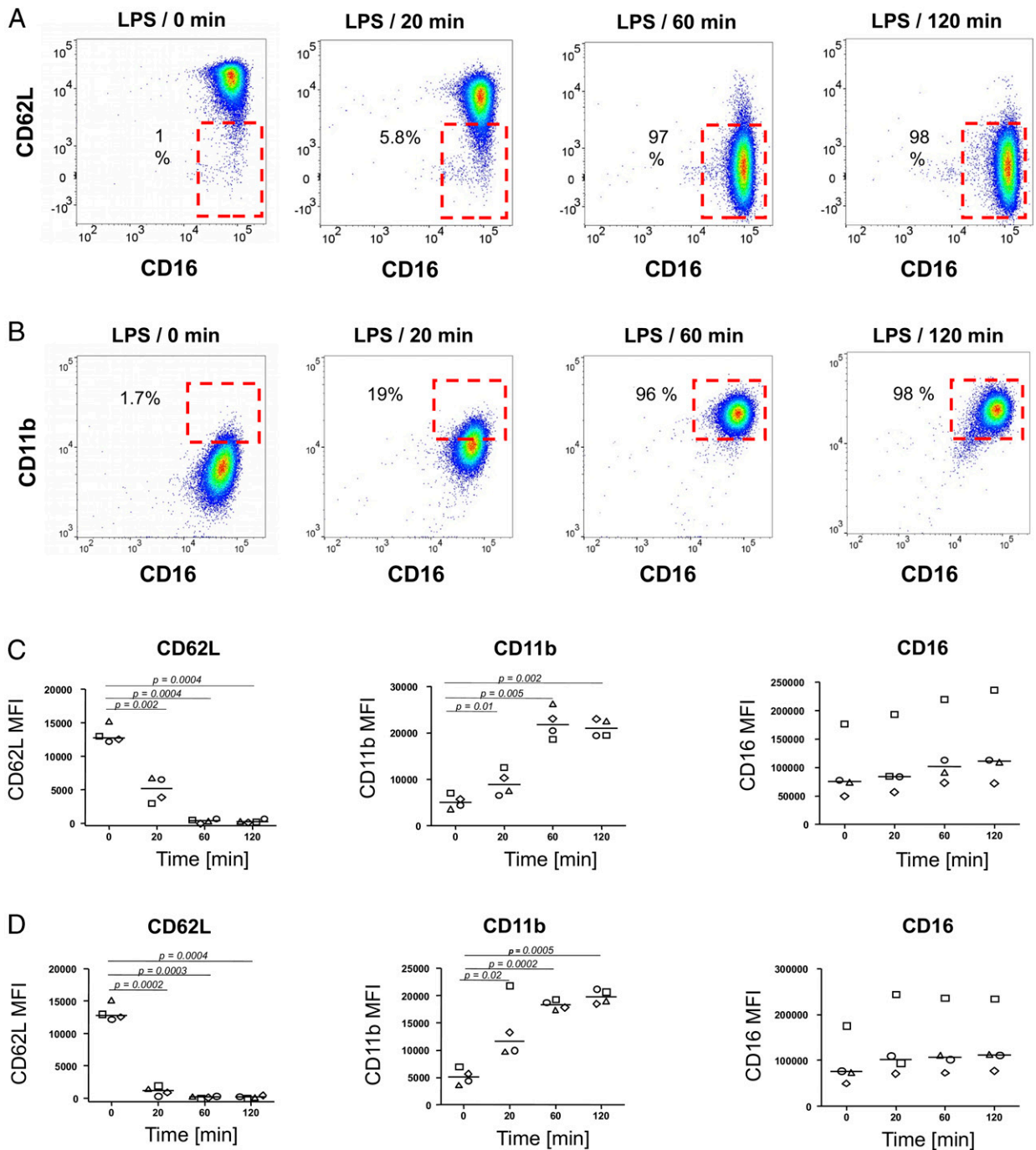


FIGURE 8. Stimulation of whole blood with bacterial products results in a rapid reduction of the neutrophil surface levels of CD62L and increased levels of CD11b. Whole blood from healthy donors was stimulated with bacterial LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and fMLF (10 μM) for the indicated time. The levels of surface markers were analyzed on $\text{SSC}^{\text{high}} \text{CCR3}^- \text{CD14}^- \text{CD15}^+$ cells. **(A and B)** Stimulation of blood with LPS results in a rapid decrease of levels of CD62L and an increase of surface levels of CD11b on neutrophils. **(C and D)** Cumulative data depicting the changes in surface marker expression on neutrophils following the stimulation of whole blood with LPS (C) or fMLF (D). Data obtained from four independent healthy donors and analyzed using Mann–Whitney *U* test.

We show that CVID neutrophils exhibit low surface level of CD16 (Fig. 3). The level of CD16 (Fc γ receptor IIIb; CD16b is the form of CD16 expressed on human neutrophils) increases with neutrophil maturation and serves as a marker of neutrophil differentiation from myelocytes to metamyelocytes, banded neutrophils, and mature segmented neutrophils (48). Low level of neutrophil CD16 is observed in severe bacterial sepsis, infections, and inflammatory states and marks a population of “toxic” or “left-shift” neutrophils with elevated myeloperoxidase activity and

compromised phagocytic and bactericidal activity (49, 50). The level of CD16 is low on neutrophils induced in healthy volunteers following administration of G-CSF (51). The phenotype of neutrophils in CVID patients described in this article is consistent with the phenotype of human G-MDSCs found in the peripheral blood of patients with advanced renal cell carcinoma and pancreatic cancer characterized by low levels of CD16 and CD62L and high levels of CD11b (36, 52). CD16^{low} neutrophils expand in the blood of terminal cancer patients and strongly suppress T cell

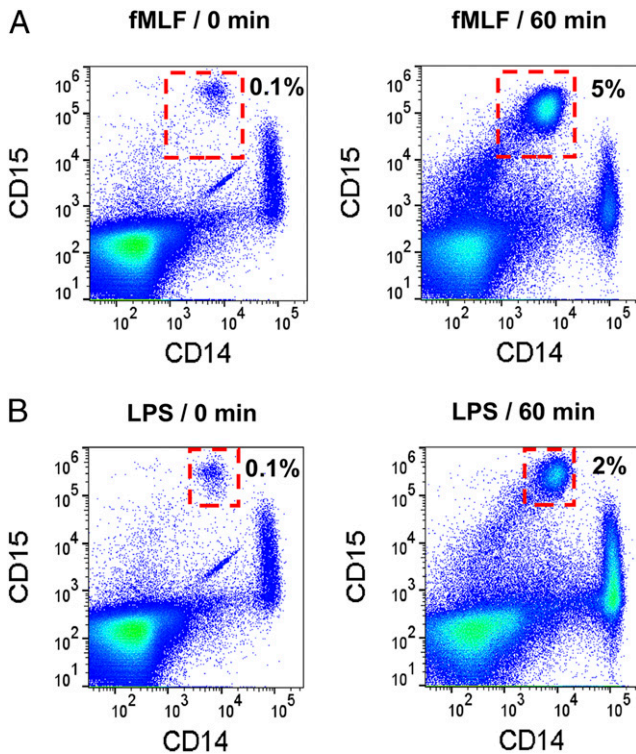


FIGURE 9. Stimulation of whole blood with fMLF or LPS results in an induction of LDNs. Fresh whole blood was either not stimulated or stimulated with fMLF (10 μ M) (A) or LPS (1 μ g/ml) (B) for 60 min. PBMCs were purified by gradient centrifugation, and the frequency of SSC^{high} CCR3⁻ CD14⁻ CD15⁺ LDNs was determined by flow cytometry. Representative data from one of four healthy donors.

proliferation (53). Elegant studies using pulse-chase labeling with 6,6-²H₂-glucose recently demonstrated that CD16^{low} neutrophils represent an immature neutrophil population that is released from the bone marrow several days earlier than mature segmented neutrophils (54). Early mobilization is believed to be a compensatory mechanism allowing the release of substantial numbers of neutrophils, although with lower maturation status and reduced capacity for pathogen clearance (54, 55). The levels of CD16 on CVID neutrophils described in our study closely correlate with the low levels of another myeloid maturation marker CD80 ($r = 0.9$; $p = 0.0008$; Spearman correlation test), consistent with the low maturation status of CD16^{low} cells. Based on these observations, we propose that microbial translocation in CVID patients drives accelerated granulopoiesis and recruitment of alternatively differentiated CD16^{low} neutrophils with potent T cell suppressive activity (19–21, 32).

We demonstrate that CVID is associated with lower neutrophil levels of CD62L (Fig. 2) and that CD62L expression inversely correlates with the level of suppression of T cell proliferation *ex vivo* (Fig. 4). CD62L (L-selectin) mediates the initial tethering and rolling of neutrophils on the endothelial surface. Reduction of CD62L levels can be explained by several distinct mechanisms. CD62L on neutrophils is reduced following administration of G-CSF *in vivo*, and it is shed from the cell surface upon activation with various stimuli, including various bacterial products (56). In this context, we demonstrate that incubation of whole blood with bacterial products fMLF and LPS results in a rapid downmodulation of CD62L on neutrophil surface (Fig. 6). It is, therefore, feasible that CD62L reduction *in vivo* is induced by contact with translocated microbial products. However, an alternative mechanism of

observed downmodulation of neutrophil CD62L in CVID patients can be postulated. An immune suppressive population of CD62L^{low} neutrophils has been identified following injection of a low dose of LPS in human volunteers (31). This population inhibits T cell function via PD-L1/PD-1 interaction and local release of hydrogen peroxide into the immunological synapse between the neutrophil and T cell (31, 57). Using pulse-chase analysis, authors (54) demonstrated that CD62L^{low} neutrophils with hypersegmented phenotype represent a separate cell population distinct from the banded neutrophils and mature segmented neutrophils. Based on proteome analysis, CD62L^{low} neutrophils are closer to the banded neutrophils than to mature segmented neutrophil population (54). The authors suggest that CD62L^{low} neutrophils represent a distinct subset that enters the bloodstream in response to inflammation. CD62L^{low} neutrophils are not likely to be the reverse-transmigrated neutrophils returning from the tissue back into the bloodstream due to the lack of expression of CD54 or reduced expression of CXCR1 and CXCR2 as determined by flow cytometry (31) and proteomics (54). Low expression of CD62L was also observed in the aged neutrophils subset in mice (46). This subset displayed upregulated CXCR4 receptor. In this study, we have not observed elevated expression of CXCR4 on the CD62L^{low} subset of neutrophils or LDNs in CVID patients. It is feasible that the CD62L^{low} phenotype described here results from a combination of the above-described mechanisms. Recently, a subset of neutrophils in spleen (N_{BH}) with CD62L^{low} CD11b^{hi} phenotype and a tendency to produce NETs has been described (58). N_{BH} display higher expression of CD27, CD40L, CD86, CD95, and HLA-DR and activate Ig production by marginal zone B cells via BAFF, APRIL, and IL-21 (57–62). In addition, several recent reports have indicated the induction of neutrophil–dendritic cell hybrids expressing CD80 and HLA-DR and presenting Ags to CD4⁺ T cells in a variety of models and diseases (63–66). In this study, we have not observed elevated expression of CD80 and HLA-DR on neutrophils from CVID patients. Whether the alteration of neutrophil phenotype directly contributes to the dysregulation of Ig production in CVID patients remains unclear. Future studies should focus on more detailed characterization of a CD62L^{low} population of neutrophils in CVID patients to discern between the alternative mechanisms of downmodulation of CD62L.

CD11b is a marker of degranulation that can be rapidly upregulated on stimulated cells by stimulation with bacterial products, including LPS and fMLF (Fig. 6). In addition, anti-CD3-activated CD8⁺ T cells modulate neutrophil levels of CD11b by IFN- γ production (67). CD11b (complement receptor 3[CR3], MAC-1) is an integrin that forms complexes with CD18 and is stored in secretory, gelatinase, and specific granules (49). Our observation of increased CD11b on CVID neutrophils (Fig. 2) is inconsistent with a previous study (68). The reason for the difference between studies is unclear but can be related to differences in cell processing and staining conditions that may result in different levels of surface CD11b and other markers of degranulation.

We show that CVID patients exhibit an increased frequency of LDNs (Fig. 5). Multiple studies have reported the elevated frequency of LDNs with potent T cell suppressive activity in various inflammatory conditions (30, 34, 36, 37). Although we have not directly addressed the immunosuppressive activity of LDNs in the current study, we report a negative correlation between the frequency of LDNs in PBMCs and intracellular production of IFN- γ by CD8⁺ T cells of CVID patients *ex vivo* ($r = -0.4$; $p = 0.007$). The mechanism of induction of LDNs is currently unclear. As shown in Fig. 9, stimulation of whole

blood with bacterial products fMLF and LPS results in rapid induction of LDNs in the PBMC layer following gradient centrifugation. Thus, it is feasible that LDNs arise from the contact of neutrophils with translocated circulating bacterial products in vivo (11, 12). However, it is unclear whether LDNs induced by ex vivo stimulation are phenotypically identical to those observed in the fresh blood of CVID patients. Overall, the accumulated evidence suggests that low-density phenotype is a cellular property rather than a marker of a specific cell population.

A major mechanism of neutrophil suppression of T cells is the production of ROS (30, 32). Production of ROS and release of arginase can result in downregulation of TCR ζ on T cells, thereby arresting the cells in the G0–G1 phase (32). Our observation that the suppression of T cell activation and production of IFN- γ is ROS-dependent is consistent with previous studies (33, 69). Rapid production of ROS by neutrophils can result in immediate suppression of T cell activation and IFN production. Another potential mechanism of T cell suppression is the upregulation of PD-L1 (Fig. 2) associated with IFN-dependent PD-1-mediated T cell apoptosis (32, 68, 70). The increase of expression of PD-1 on T cells in CVID patients was previously described (9, 10). Although it is feasible that PD-L1/PD-1 interaction contributes to T cell suppression in CVID, we did not observe a correlation between expression of PD-1 on T cells, and enhanced expression of PD-L1 on neutrophils and T cell proliferation was not affected by blocking the PD-L1/PD-1 interaction.

In conclusion, the study presented in this article suggests that neutrophils in CVID patients acquire an altered phenotype and exert potent T cell suppressive activity. The presented results have several limitations, including limited sample size of a cross-sectional study design. Although the data need to be confirmed in future detailed studies employing larger populations, the observations presented in this article provide a qualitatively new view on potential mechanisms of immune suppression in CVID and open new avenues for therapeutic targeting of CVID and other inflammatory disorders.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Chapel, H., and C. Cunningham-Rundles. 2009. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *Br. J. Haematol.* 145: 709–727.
- Bogaert, D. J., M. Dullaers, B. N. Lambrecht, K. Y. Vermaelen, E. De Baere, and F. Haerynck. 2016. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J. Med. Genet.* 53: 575–590.
- Yazdani, R., M. G. Hakemi, R. Sherkat, V. Homayouni, and R. Farahani. 2014. Genetic defects and the role of helper T-cells in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Adv. Biomed. Res.* 3: 2.
- Guazzi, V., F. Aiuti, I. Mezzaroma, F. Mazzetta, G. Andolfi, A. Mortellaro, M. Pierdominici, R. Fantini, M. Marziali, and A. Aiuti. 2002. Assessment of thymic output in common variable immunodeficiency patients by evaluation of T cell receptor excision circles. *Clin. Exp. Immunol.* 129: 346–353.
- Vlková, M., V. Thon, M. Sárffyová, L. Bláha, A. Svobodník, J. Lokaj, and J. Litzman. 2006. Age dependency and mutual relations in T and B lymphocyte abnormalities in common variable immunodeficiency patients. *Clin. Exp. Immunol.* 143: 373–379.
- Litzman, J., M. Vlková, Z. Pikulová, D. Stikarovská, and J. Lokaj. 2007. T and B lymphocyte subpopulations and activation/differentiation markers in patients with selective IgA deficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 147: 249–254.
- Aspalter, R. M., W. A. Sewell, K. Dolman, J. Farrant, and A. D. Webster. 2000. Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clin. Exp. Immunol.* 121: 506–514.
- Nechvatalova, J., Z. Pikulova, D. Stikarovska, S. Pesak, M. Vlkova, and J. Litzman. 2012. B-lymphocyte subpopulations in patients with selective IgA deficiency. *J. Clin. Immunol.* 32: 441–448.
- Stuchlý, J., V. Kanderová, M. Vlková, I. Heřmanová, L. Slámová, O. Pelák, E. Taraldsrud, D. Jílek, P. Králíčková, B. Fevang, et al. 2017. Common variable immunodeficiency patients with a phenotypic profile of immunosenescence present with thrombocytopenia. [Published erratum appears in 2017 *Sci. Rep.* 7: 42569.] *Sci. Rep.* 7: 39710.
- Hel, Z., R. P. Huijbregts, J. Xu, J. Nechvatalova, M. Vlkova, and J. Litzman. 2014. Altered serum cytokine signature in common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* 34: 971–978.
- Litzman, J., J. Nechvatalova, J. Xu, O. Ticha, M. Vlkova, and Z. Hel. 2012. Chronic immune activation in common variable immunodeficiency (CVID) is associated with elevated serum levels of soluble CD14 and CD25 but not endotoxaemia. *Clin. Exp. Immunol.* 170: 321–332.
- Barbosa, R. R., S. P. Silva, S. L. Silva, R. Tendeiro, A. C. Melo, E. Pedro, M. P. Barbosa, M. C. Santos, R. M. Victorino, and A. E. Sousa. 2012. Monocyte activation is a feature of common variable immunodeficiency irrespective of plasma lipopolysaccharide levels. *Clin. Exp. Immunol.* 169: 263–272.
- Jørgensen, S. F., M. Trøseid, M. Kummen, J. A. Anmarkrud, A. E. Michelsen, L. T. Osnes, K. Holm, M. L. Høivik, A. Rashidi, C. P. Dahl, et al. 2016. Altered gut microbiota profile in common variable immunodeficiency associates with levels of lipopolysaccharide and markers of systemic immune activation. *Mucosal Immunol.* 9: 1455–1465.
- Amulic, B., C. Cazalet, G. L. Hayes, K. D. Metzler, and A. Zychlinsky. 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* 30: 459–489.
- Mantovani, A., M. A. Cassatella, C. Costantini, and S. Jaillon. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 519–531.
- Mayadas, T. N., X. Cullere, and C. A. Lowell. 2014. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.* 9: 181–218.
- Dancey, J. T., K. A. Deubelbeiss, L. A. Harker, and C. A. Finch. 1976. Neutrophil kinetics in man. *J. Clin. Invest.* 58: 705–715.
- Manz, M. G., and S. Boettcher. 2014. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 302–314.
- Boettcher, S., R. C. Gerosa, R. Radpour, J. Bauer, F. Ampenberger, M. Heikenwalder, M. Kopf, and M. G. Manz. 2014. Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood* 124: 1393–1403.
- Boettcher, S., P. Ziegler, M. A. Schmid, H. Takizawa, N. van Rooijen, M. Kopf, M. Heikenwalder, and M. G. Manz. 2012. Cutting edge: LPS-induced emergency myelopoiesis depends on TLR4-expressing nonhematopoietic cells. *J. Immunol.* 188: 5824–5828.
- Casbon, A. J., D. Reynaud, C. Park, E. Khuc, D. D. Gan, K. Schepers, E. Passet, and Z. Werb. 2015. Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: E566–E575.
- Nauseef, W. M., and N. Borregaard. 2014. Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* 15: 602–611.
- Scapini, P., O. Marini, C. Tecchio, and M. A. Cassatella. 2016. Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions. *Immunol. Rev.* 273: 48–60.
- Nicolás-Ávila, J. A., J. M. Adrover, and A. Hidalgo. 2017. Neutrophils in homeostasis, immunity, and cancer. *Immunity* 46: 15–28.
- Tecchio, C., A. Micheletti, and M. A. Cassatella. 2014. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front. Immunol.* 5: 508.
- Hotchkiss, R. S., C. M. Coopersmith, J. E. McDunn, and T. A. Ferguson. 2009. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nat. Med.* 15: 496–497.
- Chtanova, T., M. Schaeffer, S.-J. Han, G. G. van Dooren, M. Nollmann, P. Herzmark, S. W. Chan, H. Satija, K. Camfield, H. Aaron, et al. 2008. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity* 29: 487–496.
- Beauvillain, C., P. Cunin, A. Doni, M. Scotet, S. Jaillon, M. L. Loiry, G. Magistrelli, K. Masternak, A. Chevaillier, Y. Delneste, and P. Jeannin. 2011. CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood* 117: 1196–1204.
- Müller, I., M. Munder, P. Kropf, and G. M. Hänsch. 2009. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol.* 30: 522–530.
- Pillay, J., T. Tak, V. M. Kamp, and L. Koenderman. 2013. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci.* 70: 3813–3827.
- Pillay, J., V. M. Kamp, E. van Hoffen, T. Visser, T. Tak, J. W. Lammers, L. H. Ulfman, L. P. Leenen, P. Pickkers, and L. Koenderman. 2012. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* 122: 327–336.
- Liefeld, P. H., L. Koenderman, and J. Pillay. 2015. How neutrophils shape adaptive immune responses. *Front. Immunol.* 6: 471.
- Bowers, N. L., E. S. Helton, R. P. Huijbregts, P. A. Goepfert, S. L. Heath, and Z. Hel. 2014. Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS Pathog.* 10: e1003993.
- Gabrilovich, D. I., and S. Nagaraj. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 162–174.
- Carmona-Rivera, C., and M. J. Kaplan. 2013. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol.* 35: 455–463.
- Rodríguez, P. C., M. S. Ernstoff, C. Hernandez, M. Atkins, J. Zabaleta, R. Sierra, and A. C. Ochoa. 2009. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res.* 69: 1553–1560.
- Eruslanov, E., M. Neuberger, I. Daurkin, G. Q. Perrin, C. Algood, P. Dahm, C. Rosser, J. Vieweg, S. M. Gilbert, and S. Kusmartsev. 2012. Circulating and

- tumor-infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer. *Int. J. Cancer* 130: 1109–1119.
38. Bonilla, F. A., I. Barlan, H. Chapel, B. T. Costa-Carvalho, C. Cunningham-Rundles, M. T. de la Morena, F. J. Espinosa-Rosales, L. Hammarström, S. Nonoyama, I. Quinti, et al. 2016. International consensus document (ICON): common variable immunodeficiency disorders. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 4: 38–59.
 39. Malphettes, M., L. Gérard, M. Carmagnat, G. Mouillot, N. Vince, D. Boutboul, A. Béreziné, R. Nove-Josserand, V. Lemoing, L. Tetu, et al; DEFI Study Group. 2009. Late-onset combined immune deficiency: a subset of common variable immunodeficiency with severe T cell defect. *Clin. Infect. Dis.* 49: 1329–1338.
 40. Sandler, N. G., and D. C. Douek. 2012. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 655–666.
 41. Hel, Z., J. R. McGhee, and J. Mestecky. 2006. HIV infection: first battle decides the war. *Trends Immunol.* 27: 274–281.
 42. Perreau, M., S. Vigano, F. Bellanger, C. Pellaton, G. Buss, D. Comte, T. Roger, C. Lacabaratz, P. A. Bart, Y. Levy, and G. Pantaleo. 2014. Exhaustion of bacteria-specific CD4 T cells and microbial translocation in common variable immunodeficiency disorders. *J. Exp. Med.* 211: 2033–2045.
 43. Bazil, V., and J. L. Strominger. 1991. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J. Immunol.* 147: 1567–1574.
 44. Kitchens, R. L., and P. A. Thompson. 2005. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J. Endotoxin Res.* 11: 225–229.
 45. Cross, A. S., S. M. Opal, H. S. Warren, J. E. Palardy, K. Glaser, N. A. Parejo, and A. K. Bhattacharjee. 2001. Active immunization with a detoxified *Escherichia coli* 15 lipopolysaccharide group B meningococcal outer membrane protein complex vaccine protects animals from experimental sepsis. *J. Infect. Dis.* 183: 1079–1086.
 46. Zhang, D., G. Chen, D. Manwani, A. Mortha, C. Xu, J. J. Faith, R. D. Burk, Y. Kunisaki, J. E. Jang, C. Scheiermann, et al. 2015. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* 525: 528–532.
 47. Pillay, J., I. den Braber, N. Vrsekoop, L. M. Kwast, R. J. de Boer, J. A. Borghans, K. Tesselaar, and L. Koenderman. 2010. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116: 625–627.
 48. Elghetany, M. T. 2002. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol. Dis.* 28: 260–274.
 49. Kabutomori, O., Y. Iwatani, T. Koh, R. Fushimi, and N. Amino. 1993. Decrease in the density of IgG-Fc receptor III (CD16) on 'toxic' neutrophils. *Acta Haematol.* 89: 163–164.
 50. Hübl, W., S. Andert, G. Thum, S. Ortner, and P. M. Bayer. 1997. Value of neutrophil CD16 expression for detection of left shift and acute-phase response. *Am. J. Clin. Pathol.* 107: 187–196.
 51. Kerst, J. M., M. de Haas, C. E. van der Schoot, I. C. Slaper-Cortenbach, M. Kleijer, A. E. von dem Borne, and R. H. van Oers. 1993. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: induction of immunophenotypically and functionally altered neutrophils via an effect on myeloid progenitor cells. *Blood* 82: 3265–3272.
 52. Schmielau, J., and O. J. Finn. 2001. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 61: 4756–4760.
 53. Choi, J., B. Suh, Y. O. Ahn, T. M. Kim, J. O. Lee, S. H. Lee, and D. S. Heo. 2012. CD15⁺/CD16^{low} human granulocytes from terminal cancer patients: granulocytic myeloid-derived suppressor cells that have suppressive function. *Tumour Biol.* 33: 121–129.
 54. Tak, T., P. Wijten, M. Heeres, P. Pickkers, A. Scholten, A. J. R. Heck, N. Vrsekoop, L. P. Leenen, J. A. M. Borghans, K. Tesselaar, and L. Koenderman. 2017. Human CD62L^{dim} neutrophils identified as a separate subset by proteome profiling and in vivo pulse-chase labeling. *Blood* 129: 3476–3485.
 55. Glasser, L., and R. L. Fiedlerlein. 1987. Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood* 69: 937–944.
 56. Ohsaka, A., and K. Saionji. 1998. In vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor increases the surface expression of sialyl-Lewis(x) on neutrophils in healthy volunteers. *Acta Haematol.* 100: 187–190.
 57. de Kleijn, S., J. D. Langereis, J. Leentjens, M. Kox, M. G. Netea, L. Koenderman, G. Ferwerda, P. Pickkers, and P. W. Hermans. 2013. IFN- γ -stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1. *PLoS One* 8: e72249.
 58. Chorny, A., S. Casas-Recasens, J. Sintes, M. Shan, N. Polentarutti, R. García-Escudero, A. C. Walland, J. R. Yeiser, L. Cassis, J. Carrillo, et al. 2016. The soluble pattern recognition receptor PTX3 links humoral innate and adaptive immune responses by helping marginal zone B cells. [Published erratum appears in 2017 *J. Exp. Med.* 214: 1559.] *J. Exp. Med.* 213: 2167–2185.
 59. Puga, I., M. Cols, C. M. Barra, B. He, L. Cassis, M. Gentile, L. Comerma, A. Chorny, M. Shan, W. Xu, et al. 2011. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* 13: 170–180.
 60. Gätjen, M., F. Brand, M. Grau, K. Gerlach, R. Kettritz, J. Westermann, I. Anagnostopoulos, P. Lenz, G. Lenz, U. E. Höpken, and A. Rehm. 2016. Splenic marginal zone granulocytes acquire an accentuated neutrophil B-cell helper phenotype in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 76: 5253–5265.
 61. Parsa, R., H. Lund, A. M. Georgoudaki, X. M. Zhang, A. Ortlieb Guerreiro-Cacais, D. Grommisch, A. Warnecke, A. L. Croxford, M. Jagodic, B. Becher, et al. 2016. BAFF-secreting neutrophils drive plasma cell responses during emergency granulopoiesis. *J. Exp. Med.* 213: 1537–1553.
 62. Deniset, J. F., B. G. Surewaard, W. Y. Lee, and P. Kubas. 2017. Splenic Ly6G^{high} mature and Ly6G^{int} immature neutrophils contribute to eradication of *S. pneumoniae*. *J. Exp. Med.* 214: 1333–1350.
 63. Geng, S., H. Matsushima, T. Okamoto, Y. Yao, R. Lu, and A. Takashima. 2013. Reciprocal regulation of development of neutrophil-dendritic cell hybrids in mice by IL-4 and interferon-gamma. *PLoS One* 8: e82929.
 64. Geng, S., H. Matsushima, T. Okamoto, Y. Yao, R. Lu, K. Page, R. M. Blumenthal, N. L. Ward, T. Miyazaki, and A. Takashima. 2013. Emergence, origin, and function of neutrophil-dendritic cell hybrids in experimentally induced inflammatory lesions in mice. *Blood* 121: 1690–1700.
 65. Singhal, S., P. S. Bhojnagarwala, S. O'Brien, E. K. Moon, A. L. Garfall, A. S. Rao, J. G. Quatromoni, T. L. Stephen, L. Litzky, C. Deshpande, et al. 2016. Origin and role of a subset of tumor-associated neutrophils with antigen-presenting cell features in early-stage human lung cancer. *Cancer Cell* 30: 120–135.
 66. Fites, J. S., M. Gui, J. F. Kernien, P. Negoro, Z. Dagher, D. B. Sykes, J. E. Nett, M. K. Mansour, and B. S. Klein. 2018. An unappreciated role for neutrophil-DC hybrids in immunity to invasive fungal infections. *PLoS Pathog.* 14: e1007073.
 67. Pelletier, M., A. Micheletti, and M. A. Cassatella. 2010. Modulation of human neutrophil survival and antigen expression by activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 88: 1163–1170.
 68. Casulli, S., H. Coignard-Biehler, K. Amazzough, M. Shoai-Tehrani, J. Bayry, N. Mahlaoui, C. Elbim, and S. V. Kaveri. 2014. Defective functions of polymorphonuclear neutrophils in patients with common variable immunodeficiency. *Immunol. Res.* 60: 69–76.
 69. Kramer, P. A., L. Prichard, B. Chacko, S. Ravi, E. T. Overton, S. L. Heath, and V. Darley-Usmar. 2015. Inhibition of the lymphocyte metabolic switch by the oxidative burst of human neutrophils. *Clin. Sci. (Lond.)* 129: 489–504.
 70. Hotchkiss, R. S., G. Monneret, and D. Payen. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 862–874.

Annex IX

CHOVANCOVA, Zita, Marcela VLKOVA, Jiri LITZMAN, Jindrich LOKAJ a Vojtech THON. **Antibody forming cells and plasmablasts in peripheral blood in COVID patients after vaccination.** *Vaccine* [online]. 2011, 29(24), 4142–4150. ISSN 0264-410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2011.03.087

Document Type: Article; IF = 3,766



Antibody forming cells and plasmablasts in peripheral blood in CVID patients after vaccination

Zita Chovancova, Marcela Vlkova, Jiri Litzman, Jindrich Lokaj, Vojtech Thon*

Department of Clinical Immunology and Allergy, Medical Faculty of Masaryk University, University Centre for Primary Immunodeficiencies, St. Anne's University Hospital, Pekarska 53, CZ-656 91 Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 November 2010
Received in revised form 11 March 2011
Accepted 22 March 2011
Available online 5 April 2011

Keywords:

CVID
Tetanus toxoid
Pneumococcal vaccine
ELISPOT

ABSTRACT

Common variable immunodeficiency (CVID), the most frequent primary antibody disorder, is characterized by hypogammaglobulinaemia and impaired antibody production. Poor vaccination response is essential for the diagnosis of CVID. Their underlying defects remain to be elucidated. Routine determination of antibody production in serum from CVID patients after vaccination and investigation of B cell function *in vivo* is complicated due to substitution therapy. Therefore we investigated antibody production on the B-cell level by ELISPOT and characterized changes in B-cell subpopulations in CVID patients, including plasmablasts, in peripheral blood by flow cytometry after vaccination for specification of the diagnosis. Thirty-seven CVID patients and eighty healthy volunteers were immunized with tetanus toxoid and pneumococcal polysaccharide vaccines. Specific antibody levels and B cell subpopulations were measured before vaccination and on day 7 after vaccination by ELISPOT assay and flow cytometry respectively. Of the thirty-seven well defined CVID patients studied, thirty lacked detectable spot forming cells producing specific IgG, IgA or IgM antibodies against employed vaccines and seven had only weak responses compared to controls. In the control group, an increase in circulating plasmablasts on day 7 post immunization corresponded with the appearance of antibody forming cells. In contrast, CVID patients failed to increase plasmablasts significantly in peripheral blood after antigen challenge. Our findings indicate that CVID patients have a block in terminal B-cell differentiation and that flow based assessment of plasmablasts in peripheral blood after vaccination serves as a surrogate diagnostic marker for assessing *in vivo* antibody responses in patients suspected to have CVID.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Common variable immunodeficiency (CVID) is the most frequent primary immunodeficiency with prevalence approximately 1:25 000 in Caucasians. It is characterized by low serum levels of IgG, IgA, normal or low levels of IgM and impaired antibody response after vaccination [1]. The clinical presentation of CVID includes recurrent respiratory tract infections by encapsulated bacteria, autoimmunity, granuloma formations, enteropathy and increased risk of malignancies. Although standard treatment include long-term immunoglobulin replacement and antimicrobial

therapy, the mortality rate of CVID patients is higher than that of the general population [2,3].

Despite intensive research the immunopathogenesis of CVID has not yet been elucidated. It has been suggested that CVID is caused by defects in T cells, B cells, insufficient T–B cell interactions or impaired signaling required for B or T-cell maturation and function [4–18]. Molecular genetic defects involving mutations in CD19 [19], ICOS [20,21], CD81 [22], Msh5 [23] and TAC1 [24–26] were found in less than 10% of CVID patients [3,27]. CVID, therefore, is a heterogeneous group of patients expected to have multiple etiologies, all sharing similar immunologic and clinical characteristics. In spite of the coexistence of described T-cell defects, the classification schemes presently in use are based on functional or phenotypic characteristics of B cells (assessment of immunoglobulin synthesis *in vitro* and phenotypic subsets of peripheral blood B cells): Bryant British classification [14], Freiburg classification [6], Paris classification [5] and the recent EUROclass classification [28].

Poor vaccination responses to protein and polysaccharide antigens are essential for definition-based diagnosis of CVID [1]. Although a lot is known about B cell subsets of CVID patients, the way their B-cell subpopulations change in response to vaccination

Abbreviations: CVID, common variable immunodeficiency; ELISPOT, enzyme-linked immunosorbent spot assay; SFC, spot forming cells; TET, tetanus toxoid; PPS, pneumococcal polysaccharides; IVIG, intravenous immunoglobulin therapy; SCIG, subcutaneous immunoglobulin therapy; MZ-like B cells, marginal zone-like B cells; smB, switched memory B cells.

* Corresponding author. Tel.: +420 54318 3128; fax: +420 54318 3143.

E-mail addresses: zita.travnickova@fnusa.cz (Z. Chovancova), marcela.vlkova@fnusa.cz (M. Vlkova), jiri.litzman@fnusa.cz (J. Litzman), jindrich.lokaj@fnusa.cz (J. Lokaj), vojtech.thon@fnusa.cz (V. Thon).

compared to normal individuals is largely unknown. Specifically, there are limited data as to antibody responses to protein or polysaccharide antigens and the quantity and quality of antibodies produced from different groups of CVID patients [29–32].

Quantitative assessment of specific antibody in serum is routinely performed by ELISA assay. However CVID patients are often started on immunoglobulin substitution therapy before antibody production is adequately evaluated. In such a situation, it is difficult to segregate transferred from antigen-induced specific antibody. Therefore we have designed an *in vitro* functional measurement of antibody production on the B-cell level using the ELISPOT technique, which is independent of substitution therapy. In addition, we monitored changes in B-cell subpopulations, including plasmablasts, in peripheral blood by flow cytometry after *in vivo* antigenic challenge.

2. Methods

2.1. Patients and control group

For this study we enrolled 37 patients with established CVID (14 males, 23 females, age range 20–74 years) who were followed at the Department of Clinical Immunology and Allergy of St. Anne's University Hospital in Brno. Twenty-six patients were treated with regular infusions of intravenous immunoglobulin (IVIG), six patients received regular subcutaneous immunoglobulin (SCIG) injections and one patient intramuscular immunoglobulin therapy (IMIG). Four patients were newly diagnosed and not yet on immunoglobulin replacement therapy at the time of the study.

All CVID patients were vaccinated simultaneously with tetanus toxoid (TET) vaccine (ALTEANA, SevaPharma, Prague, Czech Republic) and unconjugated pneumococcal polysaccharide (PPS) antigens (PNEUMO 23, Sanofi Pasteur, Lyon, France), except patient no. 34, who received PPS one year after TET. All patients on IVIG were vaccinated one week prior to administration of replacement therapy.

In the control group fifty (16 males, 34 females, age range 22–72 years) were vaccinated with TET; ten (4 males, 6 females, age range 15–46 years) were given PPS alone; twenty (8 males, 12 females, age range 14–50 years) received both TET and PPS.

The ELISPOT assay was performed before vaccination, on day 7 after vaccination and in range of 3–11 weeks after vaccination to compare with ELISA. B cells were measured by flow cytometry.

The study was approved by the Ethics Committee of Masaryk University, Brno and signed informed consent was obtained from each participant.

2.2. Enzyme-linked immunosorbent spot assay (ELISPOT)

The ELISPOT assay provides both qualitative (type of immune protein) and quantitative (number of responding cells) information [33]. We have modified the ELISPOT technique for the detection of specific antibody responses to TET and PPS.

96 wells microtiter plates (MultiScreen™-HA, Millipore Corporation, Billerica, USA) were coated with tetanus toxoid (10 Lf/ml, Prague) and PPS (0.5 µg/ml, PNEUMO 23, Sanofi Pasteur) antigens in carbonate buffer (pH=9.6) overnight at 4 °C. Plates were washed 3 times with PBS containing 0.05% Tween 20 and subsequently incubated for 30 min at 37 °C with 100 µl per well of blocking buffer (1% solution of bovine serum albumin in PBS; Sigma–Aldrich, Stenheim, Germany). Plates were then stored at 4 °C until use. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), obtained from peripheral blood by gradient centrifugation (Lymphoprep, Axis-Shields PoC AS, Oslo, Norway) were added to the coated microtiter plates in RPMI 1640 medium (Sigma–Aldrich) containing 10% heat-inactivated FCS (LabMediaServis, Jaromer, Czech

Republic) at 4 different dilutions (1.25×10^5 ; 2.5×10^5 ; 5×10^5 and 1×10^6 cells in 100 µl/well for CVID patients and 0.625×10^5 ; 1.25×10^5 ; 2.5×10^5 ; 5×10^5 cells in 100 µl/well for controls) and cultured overnight at 37 °C in 5% CO₂. After cells were washed off the plates 100 µl/well rabbit anti-human IgG, IgA or IgM conjugated to horseradish peroxidase (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark; diluted 1:500 in PBS/Tween) were added to each well and incubated for 1 h in the dark at room temperature. Plates were washed 3 times with PBS containing 0.05% Tween 20 followed by the addition of 100 µl/well of 3-amino-9-ethylcarbazole substrate solution (AEC, Sigma–Aldrich) and incubated for 15 min at room temperature in the dark. Plates were rinsed with water and dried overnight at room temperature.

The red-coloured spots were counted with the AID ELISPOT reader (AID, Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Germany). This provided accurate recognition and calculation of the spots and allowed objective differentiation between background and “real” spots. The results were expressed as a number of SFC per million B cells.

2.3. Flow cytometry

All blood samples (9 ml of peripheral blood in heparin and 2.7 ml in EDTA) were collected between 7 and 12 a.m. to exclude diurnal variation of lymphocyte subsets [34,35]. Lymphocytes and B-cell subpopulations were analyzed directly from peripheral blood (EDTA) or from isolated PBMC (heparin) as described previously [9]. The main B cell subpopulations identified in PBMCs were CD21^{low} B cells characterized as CD21^{low}CD38^{low}, naïve B cells (IgD⁺CD27⁻), marginal zone-like B cells (IgD⁺CD27⁺), switched memory B cells (IgD⁻CD27⁺) and plasmablasts (IgD⁻CD27⁺⁺CD38⁺⁺). Cells were identified using monoclonal antibodies (mAbs): FITC-conjugated anti-CD38, PE-conjugated anti-IgD, PE-conjugated anti-CD21, PC5-conjugated anti-IgM (all from Pharmingen International, San Diego, CA, USA) and PC5-conjugated anti-CD27 (Beckman Coulter Miami, FL, USA). The B-cell subpopulations were analyzed by gating on CD19⁺ cells (PC7-conjugated anti-CD19, Beckman Coulter, Marseille, France). Immunophenotyping of B lymphocytes was performed by five-colour cytometry Cytomix FC500 (Beckman Coulter Miami, FL, USA). The relative numbers of CD19⁺ B cells are showed as mean ± SD.

2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Commercially available kits were used for measuring specific IgG antibody levels against tetanus toxoid (VaccZyme™ Human Anti Tetanus Toxoid IgG EIA Kit, The Binding Site Group Ltd, Birmingham, United Kingdom) and IgG antibodies titers against IgA (Human Anti-IgA isotype IgG ELISA, Biovendor, Brno, Czech Republic) in serum.

2.5. Immunoglobulin quantification

Trough serum levels of immunoglobulins IgG, IgA and IgM were measured in CVID patients prior to the IVIG infusion by nephelometry using the BN2 Nephelometer (Dade Behring, Marburg, Germany) according to the manufacturer's instructions.

2.6. Statistical analysis

Data were analyzed using the STATISTICA software [StatSoft, Inc. (2007), STATISTICA (data analysis software system), version 8.0.; www.statsoft.com]. Mann–Whitney's *U*-test and Wilcoxon's matched pairs test were used for analyses of dependencies between particular parameters in studied groups; $p < 0.05$ was regarded as statistically significant.

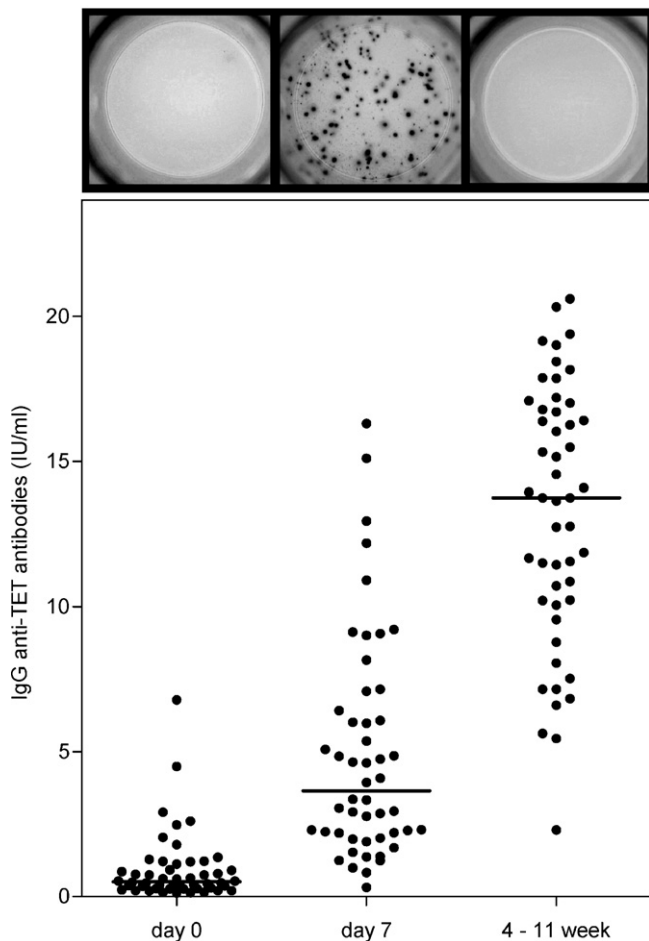


Fig. 1. Dynamics of specific IgG anti-TET antibodies in healthy controls (ELISA versus ELISPOT). Picture shows discrepancy between specific antibody producing cells by ELISPOT (upper part) in peripheral blood (maximal number on day 7) and specific serum antibodies by ELISA assay (lower part; maximal titer at 4–11 weeks after vaccination).

3. Results

3.1. Kinetics and optimal timing for detection of specific spot forming cells isolated from peripheral blood after vaccination

The kinetics of anti-TET (T-dependent) specific antibody production by peripheral blood plasmablasts was tested by ELISPOT assay in healthy volunteers from day 5 to day 9 after antigenic challenge. The same strategy was used in the assessment of anti-PPS (T-independent) specific antibody production in healthy controls from day 1 to day 8 after antigen challenge. Day 7 was found to be optimal for the detection of specific antibody producing B-cells in peripheral blood for both antigens and all tested immunoglobulin isotypes (IgG, IgA, and IgM). Our findings are in agreement with previous studies [36–38].

The different kinetics between the appearance of anti-tetanus antibody in serum, as measured by ELISA assay, and the detection of anti-tetanus antibody producing B cells as identified by ELISPOT assay, are shown in Fig. 1.

3.2. Specific antibody responses against protein (T-dependent) and polysaccharide (T-independent) antigens in healthy individuals

Our group of healthy controls was vaccinated with protein antigen (tetanus toxoid, TET), unconjugated PPS antigens (PNEUMO

Table 1

The number of spot forming cells against protein ($n = 70$) and polysaccharide ($n = 30$) antigens in a group of healthy controls.

	SFC/ 10^6 B cells[z1]		
	Median[z2]	Minimum	Maximum
IgG anti-TET	10 371	964	86 747
IgA anti-TET	532	24	9 707
IgM anti-TET	0	0	0
IgG anti-PPS	3 843	812	76 880
IgA anti-PPS	33 935	3 200	186 384
IgM anti-PPS	9 540	2 165	52 994

SFC/ 10^6 B cells (spot forming cells per million CD19⁺ B cells); IgG, IgA, IgM anti-TET (IgG, IgA, IgM antibodies specific spot forming cells against tetanus toxoid); IgG, IgA, IgM anti-PPS (IgG, IgA, IgM antibodies specific spot forming cells against pneumococcal polysaccharides).

23) either separately or in combination. We found no significant difference in the number of SFC (IgG, IgA, IgM) against vaccinated antigens whether they were administered separately or simultaneously (Mann–Whitney's *U*-test, *p* with range between 0.56 and 0.98). The number of specific SFC against both types of vaccines in the cohort of healthy controls is shown in Table 1.

3.3. Specific antibody response in subgroups of CVID patients

CVID patients ($n = 37$) were classified according to the Freiburg [6] and EUROclass classification [28] (Table 2), allowing a comparative analysis of antibody production and clinical phenotype. The majority of our well-defined CVID patients did not mount a specific humoral immune response against the two vaccines measured by ELISPOT assay but several patients produced low numbers of vaccine-specific SFC (Table 2). As for the EUROclass classification scheme, 3 patients of group smB+21^{norm} ($n = 7$, patient no. 18, 19, 20), 1 patient of group smB+21^{low} ($n = 6$, patient no. 13) and 1 patient of group smB–21^{low} ($n = 12$, no. 1) had detectable IgG antibody responses against tetanus toxoid. In group smB+21^{low} there was 1 patient (no. 14) who secreted IgM and another patient (no. 12) who formed IgA and IgM antibodies against PPS. The latter patient is the only one among the CVID group who formed specific antibodies of 2 different immunoglobulin isotypes. Regarding the group smB–21^{norm} ($n = 12$), no specific antibody production was detected. In the Freiburg classification all patients with detectable antibody responses (no. 12, 13, 14, 18, 19 and 20) were from group II the exception (no. 1) being a group Ia patient (Table 2).

The decreased production of SFC in CVID patients was independent of replacement immunoglobulin treatment: four CVID patients without substitution therapy showed the same defect in the production of SFC and specific antibodies after vaccination as CVID patients on replacement therapy (Table 2).

3.4. Changes of B-cell subpopulations in peripheral blood one week after vaccination

The mean percentage of CD19⁺ B cells was $11 \pm 4\%$ in healthy controls and $13 \pm 7.6\%$ in CVID patients before vaccination. One week after vaccination the percentages were unchanged ($12 \pm 5\%$ in healthy controls and $13 \pm 6.7\%$ in CVID patients).

We then examined the changes of absolute and relative numbers of plasmablasts and other B lymphocyte subpopulations in the peripheral blood one week after antigen challenge (Fig. 2a and b). In healthy controls no statistically significant changes in absolute and relative numbers of switched memory B cells were found between the two measurement time points, before and one week after vaccination. However, a highly significant increase in absolute as well as relative numbers of plasmablasts gated as IgD[–]CD27⁺⁺ (PB CD27⁺⁺) cells and IgM[–]CD38⁺⁺ (PB CD38⁺⁺) cells ($p < 0.001$ in both cases)

Table 2
Results of the ELISPOT assay in group of CVID patients.

Number	Freiburg classification	EUROclass classification[z1]	Sex	Age	Replacement therapy	IgG	IgA	IgM	IgG anti-IgA	IgG anti-TET	IgA anti-TET	IgM anti-TET	IgG anti-PPS	IgA anti-PPS	IgM anti-PPS
						g/l[z2]			Titer	SFC/10 ⁶ B cells[z3]					
1	Ia	smB–21 ^{low}	F	40	IMIG	2.78	<0.01	<0.04	neg	344	0	0	0	0	0
2	Ia	smB–21 ^{low}	F	74	IVIG	5.39	<0.01	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
3	Ia	smB–21 ^{low}	M	47	SCIG	3.92	0.06	0.19	neg	0	0	0	0	0	0
4	Ia	smB–21 ^{low}	M	50	IVIG	3.37	<0.01	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
5	Ia[z4]	smB–21 ^{low}	M	36	IVIG	7.35	<0.01	0.05	neg	0	0	0	0	0	0
6	Ib	smB–21 ^{norm}	F	66	IVIG	5.82	<0.01	0.10	n.d.	0	0	0	0	0	0
7	Ib	smB–21 ^{norm}	F	34	no	2.01	<0.01	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
8	Ib	smB–21 ^{norm}	M	30	IVIG	5.77	<0.01	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
9	Ib	smB–21 ^{norm}	F	20	no	0.66	<0.01	0.13	1:50	0	0	0	0	0	0
10	Ib	smB–21 ^{norm}	F	44	IVIG	3.16	<0.01	0.10	neg	0	0	0	0	0	0
11	Ib	smB–21 ^{norm} [z5]	M	55	IVIG	5.09	<0.01	0.32	neg	0	0	0	0	0	0
12	II	smB+21 ^{low}	F	71	IVIG	6.29	0.08	0.29	neg	0	0	0	2562	659	0
13	II	smB+21 ^{low}	M	19	IVIG	4.49	<0.01	0.07	neg	407	0	0	0	0	0
14	II	smB+21 ^{low}	M	24	no	4.99	<0.01	0.20	neg	0	0	0	0	104	0
15	II	smB+21 ^{low}	F	54	IVIG	6.95	<0.01	0.15	1:100	0	0	0	0	0	0
16	II	smB+21 ^{low}	F	41	SCIG	6.14	<0.01	0.05	neg	0	0	0	0	0	0
17	II	smB+21 ^{low} [z6]	M	57	SCIG	5.66	0.02	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
18	II	smB+21 ^{norm}	F	19	SCIG	6.75	0.05	0.75	neg	185	0	0	0	0	0
19	II	smB+21 ^{norm}	M	44	IVIG	5.91	0.22	<0.05	neg	713	0	0	0	0	0
20	II	smB+21 ^{norm}	M	44	IVIG	6.37	<0.01	0.10	neg	231	0	0	0	0	0
21	II	smB+21 ^{norm}	M	31	IVIG	3.80	0.02	0.07	n.d.	0	0	0	0	0	0
22	II	smB+21 ^{norm}	F	68	IVIG	6.35	<0.01	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
23	II	smB+21 ^{norm}	M	59	IVIG	6.86	0.04	0.06	neg	0	0	0	0	0	0
24	II	smB+21 ^{norm} [z7]	F	41	IVIG	5.26	<0.01	0.08	neg	0	0	0	0	0	0
25	II	smB–21 ^{low}	F	42	IVIG	8.15	<0.01	0.50	neg	0	0	0	0	0	0
26	II	smB–21 ^{low}	F	58	IVIG	5.98	<0.01	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
27	II	smB–21 ^{low}	F	57	IVIG	8.15	<0.01	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
28	II	smB–21 ^{low}	M	34	IVIG	6.21	<0.01	0.05	neg	0	0	0	0	0	0
29	II	smB–21 ^{low}	F	43	IVIG	6.27	<0.01	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
30	II	smB–21 ^{low}	F	50	SCIG	4.48	<0.01	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
31	II	smB–21 ^{low} [z8]	F	28	IVIG	5.62	<0.01	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
32	II	smB–21 ^{norm}	F	44	IVIG	6.75	<0.01	0.05	neg	0	0	0	0	0	0
33	II	smB–21 ^{norm}	F	61	IVIG	7.54	0.09	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
34	II	smB–21 ^{norm}	F	27	no	2.35	<0.01	0.45	neg	0	0	0	0	0	0
35	II	smB–21 ^{norm}	F	40	IVIG	7.10	<0.01	0.09	neg	0	0	0	0	0	0
36	II	smB–21 ^{norm}	F	40	SCIG	8.51	<0.01	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0
37	II	smB–21 ^{norm}	M	19	IVIG	7.00	<0.01	<0.05	neg	0	0	0	0	0	0

F: female; M: male; n.d.: not done; SFC/10⁶ B cells (spot forming cells per million CD19⁺ B cells); IgG, IgA, IgM anti-TET (IgG, IgA, IgM specific spot forming cells against tetanus toxoid); IgG, IgA, IgM anti-PPS (IgG, IgA, IgM specific spot forming cells against pneumococcal polysaccharides); IgG anti-IgA (IgG antibodies against IgA).

occurred (Figs. 2a and 3), while the absolute and relative numbers of CD21^{low} B cells ($p < 0.02$), naïve B cells ($p < 0.001$) and MZ-like B cells ($p < 0.001$) decreased (Fig. 2a). In contrast, among the cohort of CVID patients no statistically significant changes of examined cellular subpopulations, including plasmablasts (Figs. 2b and 3) were observed except for a slight increase in smB cells to a level still well below the levels of healthy controls (Fig. 2a and b). This increase was statistically significant in Wilcoxon's matched pairs test.

Plasmablasts were not increased in CVID patients even when followed up to six weeks post immunization (data not shown).

The fact that the number of plasmablasts corresponds with the number of SFC strongly suggest that the examination of peripheral blood plasmablasts on day 7 after vaccination can be used as a sur-

rogate marker for specific antibody responses in normal controls and as a diagnostic procedure to identified CVID and other patients with defect in terminal B-cell differentiation.

4. Discussion

In our study, we focused on (1) specific *in vitro* antibody production by individual B cells following vaccinations by T-dependent (protein) and T-independent (polysaccharide) antigens and (2) changes of B-cell subpopulation after vaccination in peripheral blood of CVID patients and healthy donors.

Prior to this study, specific antibody production in substituted CVID patients following vaccination had only been evaluated in

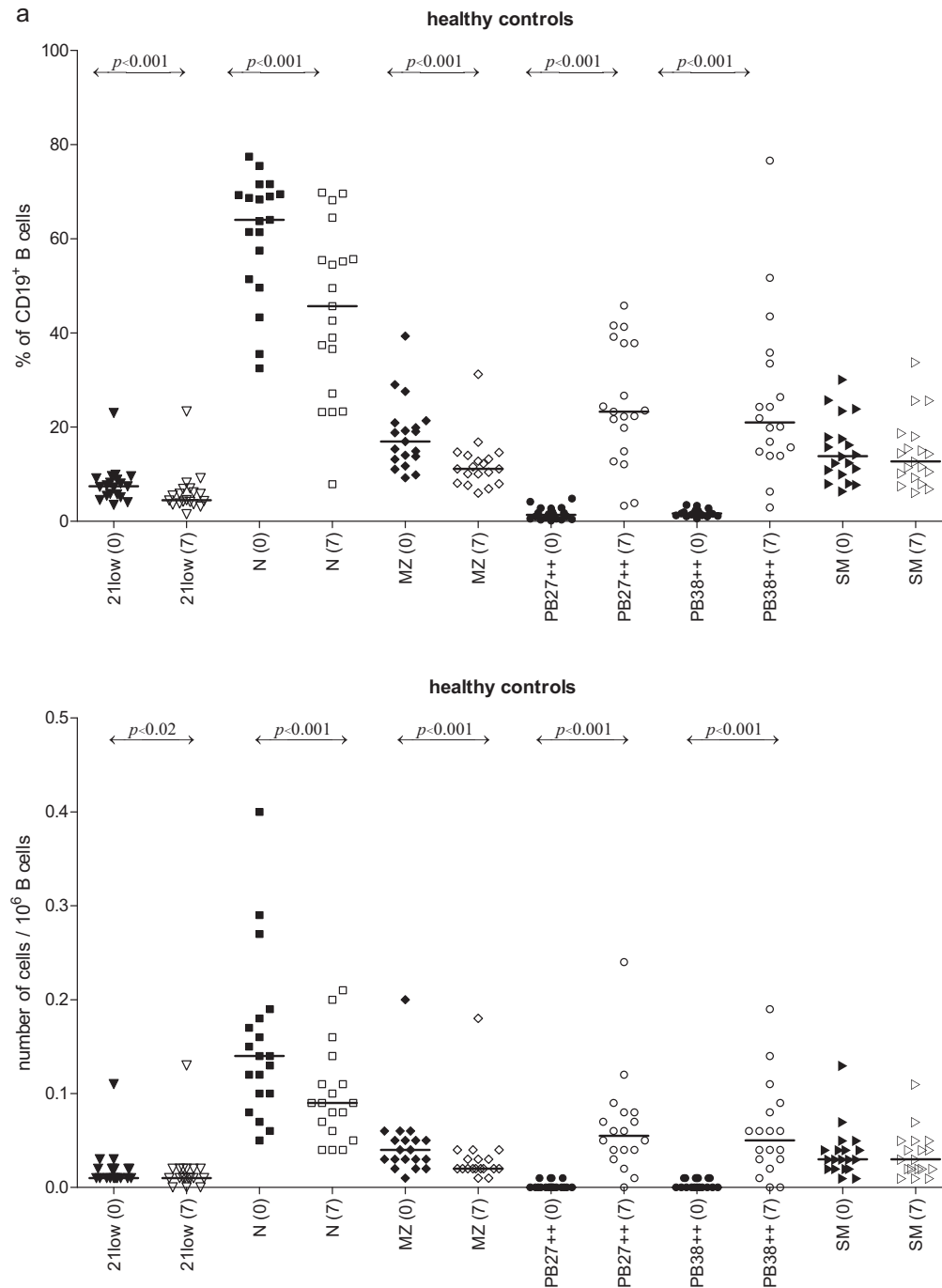


Fig. 2. Changes of relative and absolute numbers of B-cell subpopulations in healthy controls (HC; $n = 19$; a) and CVID patients (CVID; $n = 29$; b) before (0) and one week (7) after antigen challenge. 21^{low} (CD21^{low} B cells), N (naïve B cells), MZ (marginal zone-like B cells), PB27⁺⁺ and PB38⁺⁺ (plasmablasts), and SM (class-switched memory B cells).

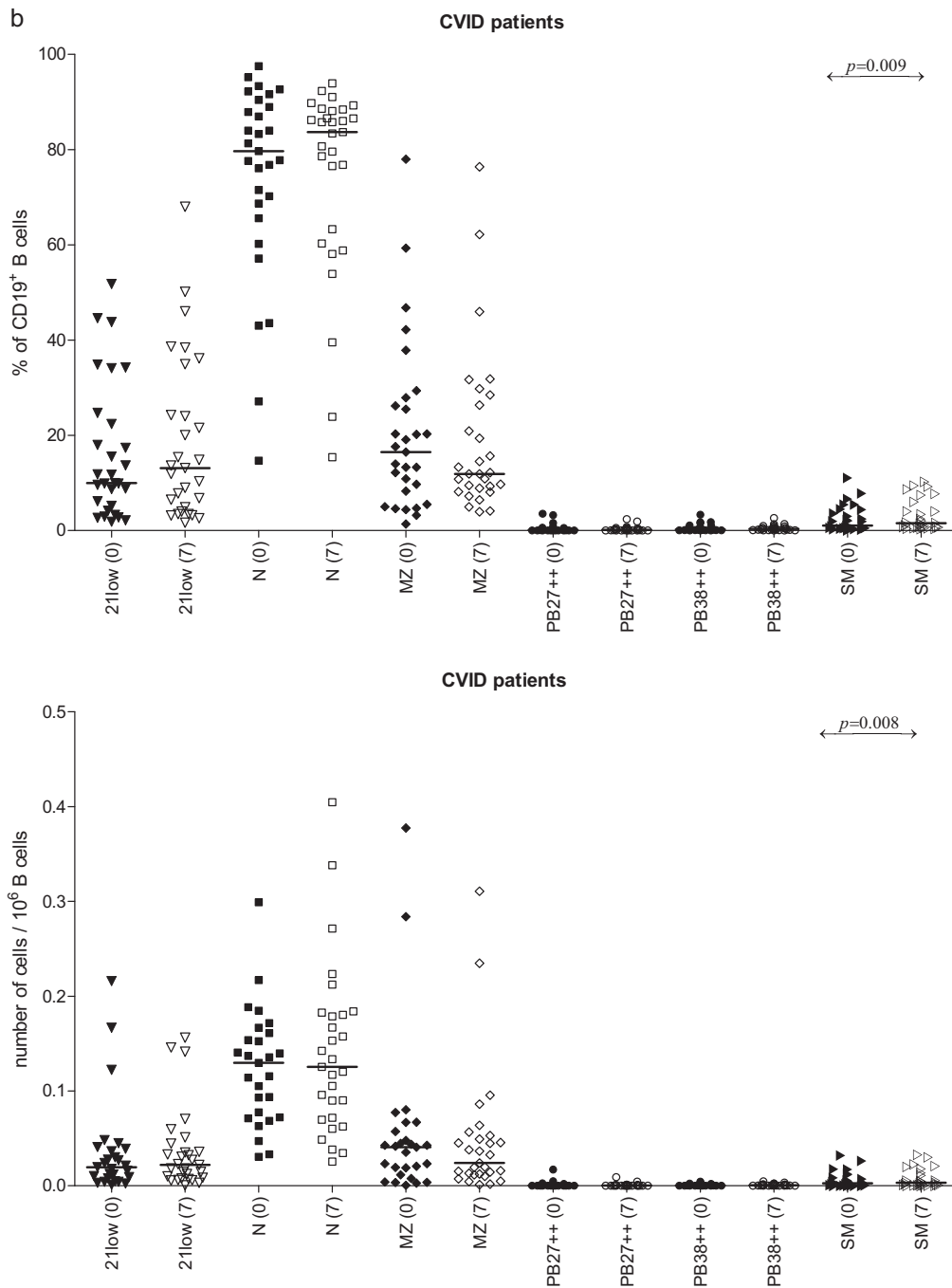


Fig. 2. (Continued).

serum. Goldacker et al. [29] measured specific antibodies in serum by ELISA assay. The contribution of parallel immunoglobulin substitution on antibody titers was difficult to correct and required a relatively complicated vaccination formula. Based on these calculations the authors reported a decrease in serum antibody levels against T-dependent and T-independent antigens in CVID patients between IVIG infusions. Using a meningococcal polysaccharide vaccine, Rezaei et al. described decreased vaccination response against meningococcal polysaccharide measured in serum of CVID patients while on IVIG [30,31]. The other group investigated the specific IgG production ability in CVID patients under immunoglobulin substitution therapy after vaccination against tick-borne encephalitis virus [32]. Immunization with a protein neoantigen, e.g. bacteriophage, and investigation of immune response with neutralization assay brought similar results [39,40].

Nevertheless, there is very little quantitative data correlating individual vaccination responses to proposed classifications of CVID [29,39,41]. Our group of CVID patients was arranged according to the Freiburg [6] and EUROclass classification [28]. The majority of our well defined CVID patients (30/37) failed to mount a specific humoral immune response when analyzed by SFCs collected from peripheral blood before and after immunization. The seven CVID patients who responded had much smaller quantities of specific SFC compared to healthy donors. All but one patient with measurable antibody responses belong to group II of the Freiburg classification or EUROclass group smB⁺ which represent those CVID patients with nearly normal numbers of class-switched memory B cells. Patients in these groups are characterized by milder complications of the disease compared to other groups [28,42]. Our data show that some of the CVID patients mount antibodies against protein or polysac-

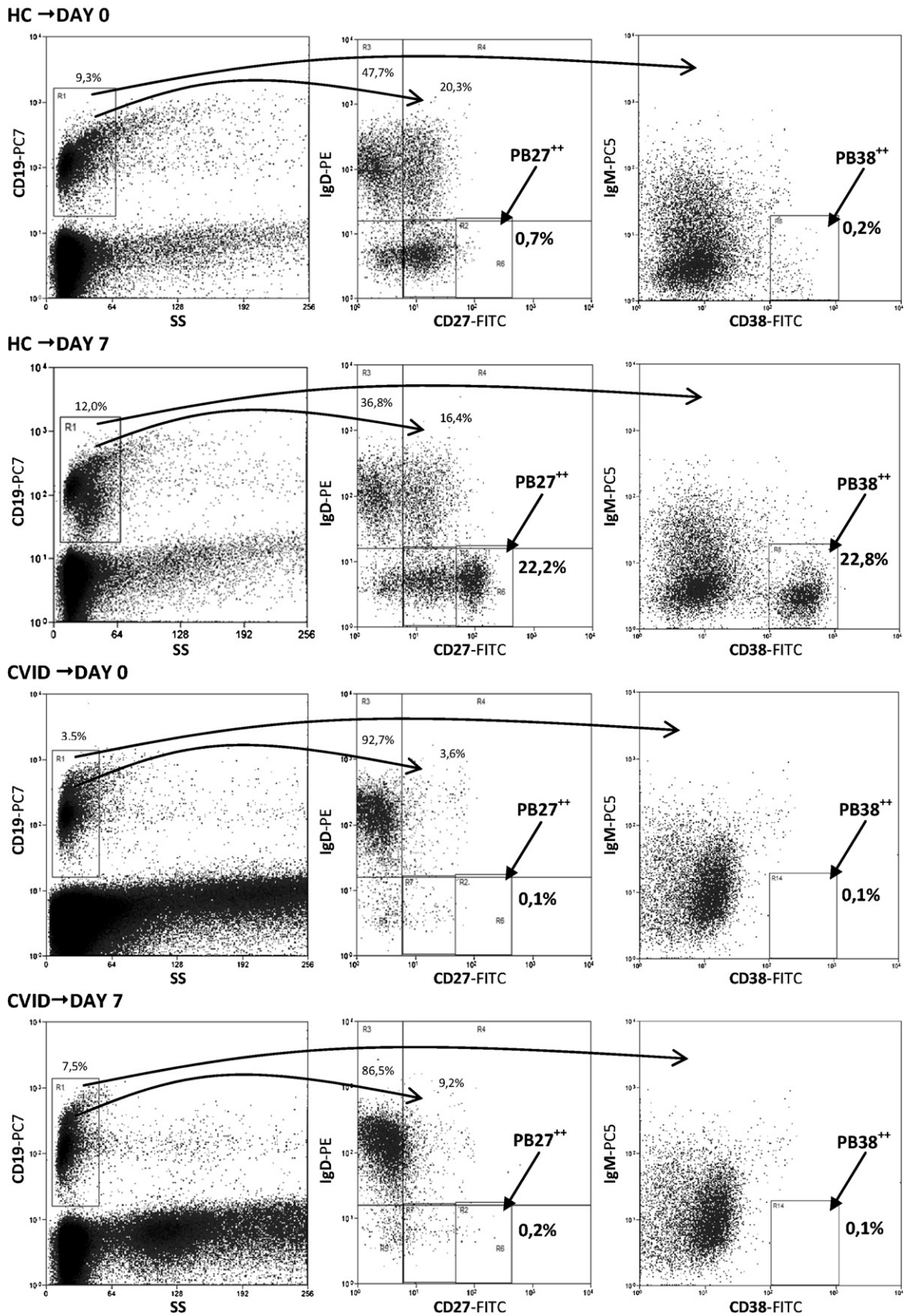


Fig. 3. Development of plasmablasts after vaccination. Plasmablasts (full arrows) were gated from CD19⁺ B cells (gate in column 1) as IgD⁻CD27⁺⁺ (column 2) and IgM⁻CD38⁺⁺ (column 3). The cells were investigated before (day 0) and on day 7 after vaccination. HC: healthy control; CVID: CVID patient; PB27⁺⁺ and PB38⁺⁺: plasmablasts.

charides antigens and therefore both types of vaccines should be used. Our findings are consistent with other studies [29].

During the last few years a number of studies described differences between B-cell subpopulations of CVID patients and those of healthy volunteers [4–8,43–49] but kinetics of these changes after encounter with an antigen *in vivo* [50] has not previously been explored. We investigated the dynamic changes of CD21^{low} B cells, naïve B cells, marginal zone-like B cells, plasmablasts and switched memory B cells of CVID patients compared to healthy donors. Previous studies showed that memory B cells and plasmablasts have different kinetics in peripheral blood [36]. Plasmablasts reach their peak on day 7 after encounter with the antigen in peripheral blood while switched memory B cells showed a marked increase in number on day 14 after antigen challenge [50]. The absolute number of naïve B lymphocytes is determined by the generation of new naïve B cells from the bone marrow pool (a slow process) and by acute loss of naïve B lymphocytes via further maturation after antigen encounter [51]. Statistically significant up-regulation of naïve B cells and its continued accumulation after antigen challenge in CVID patients indicates disturbed conversion of undifferentiated B cells to more mature B-cell stages in germinal centers. Differentiation is crucially dependent on T-lymphocyte help, suggesting that the basic defects in the majority of CVID patients are not in B cells but in helper T-lymphocytes [10,12].

Also the reduced numbers of switched memory B cells which correlate with clinical complications [52,53] and failure to increase the number of plasmablasts after antigen challenge may be explained by insufficient signals from helper T cells of CVID patients. In previous studies we and others have shown that B cells of CVID patients are able to produce antibodies if they are exposed *in vitro* to helper T-lymphocyte from healthy donors or to appropriate cytokines [10,54–56]. Taubenheim et al. studied B-cell differentiation in lymph nodes from three CVID patients with splenomegaly and found distinct blocks in terminal plasma cell development but normal expression of a key regulator of terminal plasma cell differentiation, Blimp-1 [7].

Additional support for the concept of some immunological competency of B cells from CVID patients is related to the fact that the number of marginal zone-like B cells is comparable to that of healthy populations. Detailed analysis of this compartment of “natural memory” B cells fulfills the interconnection between natural and specific immune response in CVID patients [57].

Among others, the defect in the antibody production and SFC reduction observed in a cohort of CVID patients are not secondary to Ig substitution since the same defects were also seen in four CVID patients before starting Ig replacement therapy. IVIG treated CVID patients were vaccinated exactly one week before administration of immunoglobulin substitution. In this manner the theoretically possible influence of immunoglobulin replacement therapy on the generation of SFC was reduced [58].

Our observation that the majority of CVID patients lack antigen specific spot forming B cells and fail to increase circulating plasmablasts following *in vivo* antigen challenge provides a rapid screening test to demonstrate defective antibody responses in CVID patients, even when on replacement immunoglobulin therapy.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the Ministry of Health of the Czech Republic, Grant no. NR9035-4 and from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007–2013 under grant agreement no. 201549 (EURO-PADnet HEALTH-F2-2008-201549). We thank Prof. Dr. Hans D. Ochs for critical discussions during preparation of the manuscript.

References

- [1] Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol* 1999;93:190–7.
- [2] Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* 2008;112:277–86.
- [3] Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999;92:34–48.
- [4] Rakhmanov M, Keller B, Gutenberger S, Foerster C, Hoenig M, Driessen G, et al. Circulating CD21^{low} B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:13451–6.
- [5] Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol* 2003;23:385–400.
- [6] Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)/IgM(-)/IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002;99:1544–51.
- [7] Taubenheim N, von Hornung M, Durandy A, Warnatz K, Corcoran L, Peter HH, et al. Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients. *J Immunol* 2005;175:5498–503.
- [8] Ferry BL, Jones J, Bateman EA, Woodham N, Warnatz K, Schlesier M, et al. Measurement of peripheral B cell subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID) using a whole blood method. *Clin Exp Immunol* 2005;140:532–9.
- [9] Litzman J, Vlkova M, Pikulova Z, Stikarovska D, Lokaj J, T and B lymphocyte subpopulations and activation/differentiation markers in patients with selective IgA deficiency. *Clin Exp Immunol* 2007;147:249–54.
- [10] Thon V, Wolf HM, Sasgary M, Litzman J, Samstag A, Hauber I, et al. Defective integration of activating signals derived from the T cell receptor (TCR) and costimulatory molecules in both CD4+ and CD8+ T lymphocytes of common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clin Exp Immunol* 1997;110:174–81.
- [11] Funauchi M, Farrant J, Moreno C, Webster AD. Defects in antigen-driven lymphocyte responses in common variable immunodeficiency (CVID) are due to a reduction in the number of antigen-specific CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol* 1995;101:82–8.
- [12] Fischer MB, Hauber I, Eggenbauer H, Thon V, Vogel E, Schaffer E, et al. A defect in the early phase of T-cell receptor-mediated T-cell activation in patients with common variable immunodeficiency. *Blood* 1994;84:4234–41.
- [13] Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, et al. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol* 2007;178:3932–43.
- [14] Bryant A, Calver NC, Toubi E, Webster AD, Farrant J. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;56:239–48.
- [15] Fischer MB, Hauber I, Wolf HM, Vogel E, Mannhalter JW, Eibl MM. Impaired TCR signal transduction, but normal antigen presentation, in a patient with common variable immunodeficiency. *Br J Haematol* 1994;88:520–6.
- [16] Farrington M, Grosmaire LS, Nonoyama S, Fischer SH, Hollenbaugh D, Ledbetter JA, et al. CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1099–103.
- [17] Horn J, Manguiat A, Berglund LJ, Kner V, Tahami F, Grimbacher B, et al. Decrease in phenotypic regulatory T cells in subsets of patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 2009;156:446–54.
- [18] Mouillot G, Carmagnat M, Gérard L, Garnier JL, Fieschi C, Vince N, et al. B-cell and T-cell phenotypes in CVID patients correlate with the clinical phenotype of the disease. *J Clin Immunol* 2010;30(5):746–55.
- [19] van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castaño D, van Noesel CJ, van Tol MJ, et al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med* 2006;354:1901–12.
- [20] Salzer U, Maul-Pavicic A, Cunningham-Rundles C, Urschel S, Belohradsky BH, Litzman J, et al. ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2004;113:234–40.
- [21] Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 2003;4:261–8.
- [22] van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandené L, Janssen F, et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest* 2010;120(4):1265–74.
- [23] Sekine H, Ferreira RC, Pan-Hammarström Q, Graham RR, Ziemba B, de Vries SS, et al. Role for Msh5 in the regulation of Ig class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:7193–8.
- [24] Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, et al. TAC1 is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet* 2005;37:829–34.
- [25] Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TAC1 are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 2005;37:820–8.

- [26] Mohammadi J, Liu C, Aghamohammadi A, Bergbreiter A, Du L, Lu J, et al. Novel mutations in TACI (TNFRSF13B) causing common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2009;29:777–85.
- [27] Schaffer AA, Salzer U, Hammarstrom L, Grimbacher B. Deconstructing common variable immunodeficiency by genetic analysis. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:201–12.
- [28] Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EURO-class trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008;111:77–85.
- [29] Goldacker S, Draeger R, Warnatz K, Huzly D, Salzer U, Thiel J, et al. Active vaccination in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol* 2007;124:294–303.
- [30] Rezaei N, Aghamohammadi A, Siadat SD, Moin M, Pourpak Z, Nejati M, et al. Serum bactericidal antibody responses to meningococcal polysaccharide vaccination as a basis for clinical classification of common variable immunodeficiency. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:607–11.
- [31] Rezaei N, Siadat SD, Aghamohammadi A, Moin M, Pourpak Z, Norouzi D, et al. Serum bactericidal antibody response 1 year after meningococcal polysaccharide vaccination of patients with common variable immunodeficiency. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:524–8.
- [32] Seidel MG, Grohmann E, Sadeghi K, Pollak A, Heitger A, Forster-Waldl E. Vaccination against tick-borne encephalitis virus tests specific IgG production ability in patients under immunoglobulin substitution therapy. *Vaccine* 2010;28:6621–6.
- [33] Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983;65:109–21.
- [34] Thomson SP, McMahon LJ, Nugent CA. Endogenous cortisol: a regulator of the number of lymphocytes in peripheral blood. *Clin Immunol Immunopathol* 1980;17:506–14.
- [35] Bertouch JV, Roberts-Thomson PJ, Bradley J. Diurnal variation of lymphocyte subsets identified by monoclonal antibodies. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;286:1171–2.
- [36] Stevens RH, Macy E, Morrow C, Saxon A. Characterization of a circulating subpopulation of spontaneous antitetanus toxoid antibody producing B cells following in vivo booster immunization. *J Immunol* 1979;122:2498–504.
- [37] Kodo H, Gale RP, Saxon A. Antibody synthesis by bone marrow cells in vitro following primary and booster tetanus toxoid immunization in humans. *J Clin Invest* 1984;73:1377–84.
- [38] Thiele CJ, Morrow CD, Stevens RH. Human IgA antibody and immunoglobulin production after in vivo tetanus toxoid immunization: size and surface membrane phenotype analysis. *J Clin Immunol* 1982;2:327–34.
- [39] Cunningham-Rundles C, Bodian C, Ochs HD, Martin S, Reiter-Wong M, Zhuo Z. Long-term low-dose IL-2 enhances immune function in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2001;100:181–90.
- [40] Ochs HD, Davis SD, Wedgwood RJ. Immunologic responses to bacteriophage phi-X 174 in immunodeficiency diseases. *J Clin Invest* 1971;50:2559–68.
- [41] Rezaei N, Aghamohammadi A, Read RC. Response to polysaccharide vaccination amongst pediatric patients with common variable immunodeficiency correlates with clinical disease. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2008;7:231–4.
- [42] Alachkar H, Taubenheim N, Haeney MR, Durandy A, Arkwright PD. Memory switched B cell percentage and not serum immunoglobulin concentration is associated with clinical complications in children and adults with specific antibody deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2006;120:310–8.
- [43] Klein U, Kuppers R, Rajewsky K. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood* 1997;89:1288–98.
- [44] Shi Y, Agematsu K, Ochs HD, Sugane K. Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. *Clin Immunol* 2003;108:128–37.
- [45] Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol* 2009;39:2065–75.
- [46] Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, et al. Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 2004;104:3647–54.
- [47] Sanchez-Ramon S, Radigan L, Yu JE, Bard S, Cunningham-Rundles C. Memory B cells in common variable immunodeficiency: clinical associations and sex differences. *Clin Immunol* 2008;128:314–21.
- [48] Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74:261–71.
- [49] Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 2004;197:179–91.
- [50] Pinna D, Corti D, Jarrossay D, Sallusto F, Lanzavecchia A. Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. *Eur J Immunol* 2009;39:1260–70.
- [51] Agenes F, Rosado MM, Freitas AA. Peripheral B cell survival. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1220–8.
- [52] Viallard JF, Blanco P, André M, Etienne G, Liferman F, Neau D, et al. CD8+HLA-DR+ T lymphocytes are increased in common variable immunodeficiency patients with impaired memory B-cell differentiation. *Clin Immunol* 2006;119:51–8.
- [53] Ko J, Radigan L, Cunningham-Rundles C. Immune competence and switched memory B cells in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2005;116:37–41.
- [54] Fischer MB, Wolf HM, Hauber I, Eggenbauer H, Thon V, Sasgary M, et al. Activation via the antigen receptor is impaired in T cells, but not in B cells from patients with common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol* 1996;26:231–7.
- [55] Borte S, Pan-Hammarström Q, Liu C, Sack U, Borte M, Wagner U, et al. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood* 2009;114:4089–98.
- [56] Nonoyama S, Farrington M, Ishida H, Howard M, Ochs HD. Activated B cells from patients with common variable immunodeficiency proliferate and synthesize immunoglobulin. *J Clin Invest* 1993;92:1282–7.
- [57] Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, et al. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol* 2008;180:800–8.
- [58] Bayry J, Fournier EM, Maddur MS, Vani J, Wootla B, Sibérlil S, et al. Intravenous immunoglobulin induces proliferation and immunoglobulin synthesis from B cells of patients with common variable immunodeficiency: a mechanism underlying the beneficial effect of IVIg in primary immunodeficiencies. *J Autoimmun* 2011;36:9–15.