

Received: 28.07.2017  
Accepted: 24.01.2018  
Published: 17.05.2018

## **Pierwotne niedobory odporności związane z zaburzeniami naprawy pęknięć podwójnej nici DNA (DSBs) i zwiększoną radiowrażliwością: implikacje kliniczne, diagnostyczne i terapeutyczne\***

### **Primary Immunodeficiency with double strand break DNA (DSBs) and radiosensitivity: clinical, diagnostic and therapeutic implications**

**Barbara Pietrucha<sup>1</sup>, Hanna Gregorek<sup>2</sup>, Edyta Heropolitańska-Pliszka<sup>1</sup>, Ewa Bernatowska<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Klinika Immunologii, Instytut „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Instytut „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa

#### **Streszczenie**

Pierwotne niedobory odporności (PNO) to grupa około 300 chorób o podłożu genetycznym, wynikających z braku/zaburzonej funkcji głównych składników układu odporności. Wśród nich ważną podgrupą są niedobory związane z zaburzeniami procesów naprawy pęknięć podwójnej nici DNA (DSBs). Są to przede wszystkim ciężkie złożone niedobory odporności (SCID) i złożone niedobory odporności (CID) przebiegające z nadwrażliwością na promieniowanie jonizujące, których przyczyną jest zaburzenie syntezy białek naprawy DNA niezbędnych w procesie dojrzewania/różnicowania limfocytów T i B. Chorzy ci stanowią szczególne wyzwanie dla klinicystów z powodu zwiększonego ryzyka rozwoju nowotworów złośliwych, głównie wywodzących się z układu krwiotwórczego oraz nadmiernej reakcji na standardowe leczenie przeciwnowotworowe, zwłaszcza radioterapię i chemioterapię. Objawy kliniczno-laboratoryjne mogące wskazywać na zwiększoną radiowrażliwość to m.in.: małopłucie, teleangiektazje, limfopenia czy translokacje chromosomów 7 i 14 w kariotypie. Podstawowym testem wykazującym zwiększoną radiowrażliwość limfoblastoidalnych komórek krwi lub fibroblastów skóry jest ocena ich przeżywalności po zastosowaniu promieniowania jonizującego.

Leczenie chorych z zaburzeniami naprawy DNA zależy od obrazu klinicznego, wyników badań immunologicznych oraz rodzaju niedoboru odporności. Pacjenci z radiowrażliwym SCID wymagają szybkiego przeszczepienia macierzystych komórek krwiotwórczych (HSCT) z zastosowaniem zredukowanego kondycjonowania RIC. U pacjentów z CID, standardowy schemat leczenia nowotworów wymaga modyfikacji oraz unikania radioterapii i radiomimetyków.

**Słowa kluczowe:** Pierwotne niedobory odporności • radiowrażliwość • złamania podwójnej nici DNA • zaburzenia naprawy DNA

\*Praca zrealizowana w ramach zadania statutowego nr S223/2013 oraz grantu wewnętrznego nr S137/2014 - Instytut „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie.

## Summary

Primary Immunodeficiencies (PNO) are a group of about 300 genetic disorders which result from the absence or dysfunction of the major components of the immune system. Among them an important subgroup constitute deficiencies associated with defects in DNA double strand breaks (DSBs) recognition and repair. These are primarily radiation-sensitive severe combined immune deficiencies (SCIDs) and combined immune deficiencies (CIDs) associated with genetic defects in the DNA-repair genes, which encode proteins necessary for T-cell and B cell maturation/differentiation. Due to increased risk of developing malignant neoplasms, mainly from hematopoietic origin, and over-reaction to standard anticancer radiotherapy and chemotherapy, treatment of these patients is a real challenge for clinicians. Clinical and laboratory manifestations, which may indicate increased radiosensitivity include: microcephaly, telangiectasias, lymphopenia, and translocation of chromosomes 7 and 14 in karyotype. A basic test showing increased radiosensitivity of lymphoblastoid cells lines or skin fibroblasts is percentage evaluation of their survival after exposition to ionizing radiation.

Treatment of patients with impaired DNA repair depends on the clinical picture, immunological findings and type of immunodeficiency. Patients with SCID require immediate hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) using reduced intensity conditioning (RIC). In patients with CID, standard treatment regimens require modification and/or avoidance of radiotherapy and some radiomimetic agents.

**Keywords:** primary immunodeficiencies • radiosensitivity • DNA double-strand breaks • DNA repair disorders

**GICID** 01.3001.0012.0547  
**DOI:** 10.5604/01.3001.0012.0547  
**Word count:** 7267  
**Tables:** 1  
**Figures:** 2  
**References:** 63

**Adres autorki:** dr n. med. Barbara Pietrucha, Klinika Immunologii, Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa; e-mail: b.pietrucha@ipczd.pl

## WSTĘP

Pierwotne niedobory odporności (PNO) tworzą heterogenną grupę chorób genetycznych, w których przynajmniej jeden, a często więcej składników układu odporności jest obniżonych, jest ich brak lub wykazują zaburzenie funkcji biologicznych. Częstość występowania PNO określa się średnio 1 : 10 000 i jest zależna od rodzaju występującego niedoboru [52]. Dotychczas opisano prawie 300 jednostek PNO, wśród których szczególnie grupą są choroby spowodowane wrodzonymi defektami genów odpowiedzialnych za zabezpieczenie integracji genomu. Ta grupa chorych stanowi szczególnie trudne wyzwanie dla klinicystów i naukowców z powodu zwiększonego ryzyka rozwoju nowotworów złośliwych, głównie wywodzących się z układu krwiotwórczego oraz nadmiernej reakcji na standardowe leczenie przeciwnowotworowe, zwłaszcza radioterapię i chemioterapię.

Utrzymanie stabilności genomu ma podstawowe znaczenie dla przeżycia organizmu i w zapobieganiu kancerogenezie; procesowi zachodzącemu na poziomie DNA

komórki. Na skutek działania wielu czynników środowiskowych i wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych, codziennie w pojedynczych komórkach organizmu dochodzi do  $10^3$ – $10^6$  złamań DNA [7, 45]. Aby zapobiec dezintegracji genomu, każda komórka jest wyposażona w wiele mechanizmów umożliwiających ich szybką identyfikację i naprawę. Różne rodzaje uszkodzeń DNA wymagają różnych mechanizmów naprawy, w których biorą udział produkty białkowe kilkuset genów [48]. Wiele białek i enzymów jest swoistych dla określonego typu naprawy DNA, natomiast część z nich wykazuje wielofunkcyjność. Defekty białek biorących bezpośredni udział w procesie naprawy DNA, regulacji cyklu komórkowego i/lub apoptozy powodują zaburzenie kluczowych procesów regulacyjnych, a w konsekwencji, występowanie specyficznej kombinacji objawów klinicznych i komórkowych.

W przeciwieństwie do wielu innych uszkodzeń DNA, szczególnie niebezpieczne dla integralności genomu są złamania podwójnej nici DNA (DNA double strand breaks; DNA DSBs), które mogą być indukowane przez wiele różnych czynników środowiskowych (np. promieniowanie jonizujące, UV, czynniki utleniające, alkilujące, środki chemiczne, infek-

cje wirusowe) lub są formą pośrednią w przebiegu naturalnych procesów fizjologicznych (np. podczas replikacji DNA, mejozy, mitozy, rekombinacji V(D)J i przełączania klas immunoglobulin). Nagromadzenie nienaprawionych DSBs może prowadzić do śmierci komórki, ponieważ złamane chromosomy nie są zdolne do prawidłowego rozdzielenia się podczas metafazy. Natomiast źle naprawione złamania mogą być przyczyną powstawania translokacji chromosomów, które są znanym czynnikiem stymulującym rozwój lub progresję nowotworów. Ochrona komórki przed konsekwencjami DNA DSBs wymaga sprawnego działania trzech ważnych mechanizmów: szybkiej identyfikacji uszkodzenia, aktywacji enzymów i białek efektorowych oraz prawidłowo i szybko przebiegającej naprawy DNA.

W komórkach eukariotycznych wykształciły się dwa główne mechanizmy naprawy DNA DSBs: rekombinacja homologiczna (homologous recombination; HR) i niehomologiczne łączenie zakończeń (nonhomologous end joining; NHEJ) [29]. Naprawa HR jest procesem wiernie przywracającym utraconą sekwencję z wykorzystaniem siostrzanej chromatydy jako matrycy do uzyskania dokładnej replikacji. Działa głównie w dzielącej się komórce w fazie S i G2 cyklu komórkowego, podczas których dostępna jest homologiczna sekwencja [51]. Główną zaletą klasycznego mechanizmu HR jest odtworzenie DNA z dużą dokładnością przy minimalnej utracie materiału genetycznego.

NHEJ jest głównym mechanizmem naprawy DNA DSBs; jest aktywny podczas całego cyklu komórkowego, szczególnie podczas faz cyklu, w których homologiczna matryca nie jest dostępna, może działać zarówno w dzielącej się jak i niedzielącej komórce. W przeciwieństwie do HR, NHEJ jest szybkim procesem, ale narażonym na występowanie błędów, ponieważ niewielka liczba nukleotydów bezpośrednio przylegających do miejsca złamania może zostać utracona [37]. Podczas, gdy głównym celem naprawy DSBs w komórkach somatycznych jest utrzymanie genowej integralności i stabilności, końcowym zadaniem naprawy DSBs powstających w przebiegu fizjologicznych procesów rozwojowych jest stworzenie genetycznej różnorodności.

Głównym celem pracy jest omówienie pierwotnych niedoborów odporności spowodowanych zaburzeniami procesu naprawy DNA DSBs z powodu defektu mechanizmu NHEJ.

## PODSTAWOWE PROCESY DOJRZEWANIA UKŁADU ODPORNOŚCI

Sprawne działanie układu odporności w znacznym stopniu zależy od jego genetycznej różnorodności, dzięki której organizm może rozpoznawać i eliminować ogromną liczbę patogenów chorobotwórczych, zapewniając człowiekowi przeżycie [28].

Limfocyty B i T są głównymi komponentami odporności nabytej (adaptacyjnej), którą cechuje duża swoistość

i pamięć immunologiczna. Różnicowanie prekursorowych komórek limfoidalnych do dojrzałych limfocytów B i T wymaga rearanżacji i ekspresji genów kodujących receptory Ig limfocytów B (sIg; B-cell receptor; BCR) lub limfocytów T (T-cell receptor; TCR). W procesie tym, zachodzącym we wczesnym etapie dojrzewania prekursorów limfocytów B i T w szpiku i grasicy, główną rolę odgrywa rekombinacja V(D)J, polegająca na przypadkowym łączeniu rozproszonych segmentów genów: zmiennego V (variable), różnorodnego D (diversity) i/ lub łącznikowego J (joining) [3]. Receptor limfocytów B (BCR) jest zbudowany z łańcuchów ciężkich utworzonych z połączenia segmentów V, D, J i łańcuchów lekkich, zawierających tylko segmenty V i J. Receptor limfocytów T tworzą heterodimery  $\alpha/\beta$  i  $\gamma/\delta$ . Struktura tych polipeptydów jest identyczna dla wszystkich receptorów antygenowych, wbudowana w błonę komórkową tworzy tzw. „region stały” cząsteczki, który jest połączony z „regionem zmiennym”, odpowiedzialnym za swoistość antygenową receptorów.

Oprócz rekombinacji V(D)J, w dalszym etapie różnicowania, zachodzącym tylko w komórkach B, loci immunoglobulin (Ig) podlega kolejnej modyfikacji podczas rekombinacji przełączania klas (class switch recombination; CSR), w wyniku której następuje zmiana izotypu syntetyzowanych immunoglobulin z IgM do IgG, IgA lub IgE z zachowaniem swoistości antygenowej. Wzrost powinowactwa przeciwciał do antygenów powstaje w procesie somatycznej hipermutacji (somatic hypermutation; SHM), zachodzącej w regionie zmiennym (V) łańcucha ciężkiego i lekkiego cząsteczki BCR.

## BIAŁKA NAPRAWY DNA DSBs W PROCESIE DOJRZEWANIA I RÓŻNICOWANIA LIMFOCYTÓW T I B

W przebiegu rekombinacji V(D)J, CSR i SHM powstają zaprogramowane, fizjologiczne złamania DNA DSBs. Uszkodzenia te są sygnałem dla komórkowego systemu naprawczego DNA (DNA damage response; DDR) do natychmiastowego zatrzymania cyklu komórkowego, naprawy powstałych uszkodzeń albo, gdy uszkodzenia są zbyt duże, skierowania komórki na drogę apoptozy. Głównym mechanizmem naprawy DNA DSBs powstających w przebiegu rekombinacji V(D)J i CSR jest NHEJ, odpowiedzialny za naprawę około 90% nowo powstających DSBs [37].

### Rekombinacja V(D)J

Szczegółowy przebieg procesu został przedstawiony w wielu pracach przeglądowych [3, 29, 37], stąd w niniejszym opracowaniu został przedstawiony w ogólnym zarysie, niezbędnym do zrozumienia zaburzeń powodujących pierwotne niedobory odporności.

Rekombinacja V(D)J jest zapoczątkowywana przez przyłączenie swoistych dla limfocytów białek aktywujących rekombinację: RAG1 i RAG2 (recombination-activating gene proteins) do określonych sekwencji sygnałowych (recombination signal sequences; RSS), znajdujących się

przy zakończeniach wszystkich segmentów V, D, J. Białka te tworzą kompleks precyzyjnie przecinający nić DNA na końcu sekwencji RSS, co powoduje powstanie DNA DSBs. Powstałe złamania aktywują komórkowy system DDR, w którym główną rolę we wczesnej fazie początkowej odgrywa kinaza ATM (ataxia-telangiectasia mutated), która fosforyluje histon H2AX. W wyniku aktywacji następuje przyłączenie białek 53BP1, MDC1 i kompleksu MRE11, RAD50 i NBN (kompleks MRN). Białka te tworzą specyficzne mikrośrodowisko, w którym zakończenia DNA są utrzymywane w bezpośredniej bliskości, ale na tyle oddalone od siebie by ułatwić dostęp białkom biorącym udział w mechanizmie niehomologicznego łączenia zakończeń (NHEJ). Spośród wielu białek biorących udział w NHEJ, siedem wydaje się absolutnie niezbędnych do prawidłowego przebiegu naprawy: kompleks DNA-zależnej kinazy białkowej (DNA-PK), utworzony przez katalityczną podjednostkę DNA-PK (DNA-PKcs) i heterodimer Ku70/Ku80, który bezpośrednio wiąże się z zakończeniami DNA; endonukleaza Artemis, która bierze udział w modyfikacji zakończeń kodujących oraz kompleks DNA ligazy IV (LIG4/XRCC4), który w połączeniu z Cernunnos (Cernunnos/XLF; C-XLF) ponownie wiąże zakończenia kodujące [63]. Defekt któregokolwiek z tych białek powoduje powstawanie pierwotnych złożonych niedoborów odporności [47].

### Rekombinacja przełączania klas immunoglobulin (CRS) i somatyczne hipermutacje (SHM)

W wyniku rekombinacji V(D)J na powierzchni limfocytu B pojawia się receptor antygenowy (powierzchniowa immunoglobulina; sIg) IgM/IgD i taka komórka jest zdolna do syntezy przeciwciał IgM i IgD o tej samej swoistości. Dalszym etapem dojrzewania limfocytu B jest CSR; swoisty dla limfocytów B proces somatycznej rearanżacji DNA, zachodzący podczas aktywacji limfocytów pod wpływem kontaktu z antygenem. Związanie swoistego antygeny przez receptory immunoglobulinowe limfocytu B (BCR) powoduje przełączenie regionu stałego łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (C) od regionu kodowanego przez C $\mu$  do leżących poniżej regionów, tj. C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 1, C $\alpha$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 4, C $\epsilon$  i C $\alpha$ 2, z zachowaniem kompleksu zmiennego V(D)J. Ta rekombinacja zmiany izotypu umożliwia komórce syntezę przeciwciał o odmiennych właściwościach biologicznych z zachowaniem ich swoistości. Ponadto, limfocyty B podlegające antygenowej stymulacji aktywują proces somatycznych hipermutacji (SHR) w regionach zmiennych łańcuchów ciężkich i lekkich BCR, dzięki czemu zwiększa się różnorodność segmentów zmiennych i powinowactwo do antygeny syntetyzowanych immunoglobulin. W obu tych procesach główną rolę odgrywa indukowana przez zaktywowane limfocyty B deaminaza cytydiny (activation-induced cytidine deaminase; AID). W przypadku CSR deaminaza indukuje DNA DSBs, które aktywują zależną od ATM odpowiedź na uszkodzenie DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego i naprawę. W procesie tym istotną rolę odgrywają niektóre białka NHEJ; np. KU70, KU80, DNA ligaza IV, DNA-PKcs, NBN. Sprawny przebieg

SHM i naprawy DNA wymaga obecności helikaz, polimeraz, ligaz DNA i prawdopodobnie kompleksu MRN [3].

Uwzględniając zaangażowanie różnych białek naprawy DNA w licznych procesach rozwoju odporności adaptacyjnej należy się spodziewać, że niedobór poszczególnych biomarkerów będzie miał negatywny wpływ na poszczególne etapy procesu dojrzewania limfocytów T i B. Tak więc należy się spodziewać, że np. defekt ATM, DNA ligazy IV, DNA-PKcs, Cernunnos/XLF czy Artemis będzie negatywnie wpływał na przebieg rekombinacji V(D)J i CSR, podczas gdy niedobór NBN spowoduje zaburzenie CSR i SHM [37].

### PIERWOTNE NIEDOBORY ODPORNOŚCI ZWIĄZANE Z DEFEKTEM NAPRAWY DNA

W ostatnich latach, dzięki rozwojowi nowoczesnych technik biologii molekularnej, dokonano znacznego postępu w zrozumieniu roli jaką odgrywa złożony, wewnątrzkomórkowy mechanizm naprawy DNA DSBs w rozwoju i funkcjonowaniu systemu odporności. Zidentyfikowano wiele defektów genetycznych w mechanizmie naprawy DNA, co przyczyniło się do poznania klinicznych następstw spowodowanych zaburzeniami procesów integracji genomu w komórkach układu odporności. Jedną z charakterystycznych cech tych zespołów jest coraz częściej rozpoznawany pierwotny niedobór odporności.

### CIĘŻKIE ZŁOŻONE NIEDOBORY ODPORNOŚCI

Ciężki złożony niedobór odporności (severe combined immunodeficiency, SCID) jest chorobą charakteryzującą się całkowitym brakiem lub głęboką dysfunkcją limfocytów T. Tradycyjnie, pacjenci ze SCID są klasyfikowani na podstawie genetycznego defektu lub na podstawie swobodnego fenotypu immunologicznego, spowodowanego danym defektem.

Na podstawie fenotypu immunologicznego SCID dzieli się na dwie kategorie: T-B+SCID (70%), spowodowany defektem funkcji sygnalizacyjnych limfocytów T lub T-B-SCID (30%), głównie związany z defektem rekombinacji segmentów V(D)J. Obie grupy dzielą się dalej na podgrupę z obecnością lub brakiem naturalnych komórek cytotoksycznych (NK+/NK-). Jednak badania ostatnich lat wykazały, że ten podział oparty na immunofenotypowaniu nie jest wystarczający do celów badawczych i klinicznych. Wykazano bowiem, że SCID może być również spowodowany zaburzeniem funkcji biologicznych limfocytów T lub B przy zachowaniu zdolności komórek do prawidłowego różnicowania się.

Na obraz kliniczny SCID składają się: ciężkie, nawracające zakażenia, zahamowanie przyrostu masy ciała, przewlekła biegunka, objawy ze strony układu oddechowego (pneumocystozowe zapalenie płuc), kandydoza błon śluzowych. Zakażenia ogólne lub miejscowe mogą być spowodowane przez wirusy, bakterie, grzyby lub opor-



tunistyczne patogeny. Choroba może się również ujawnić po szczepieniu żywymi organizmami np. prątkiem BCG, którego rozszanie w organizmie zagraża życiu. W przebiegu naturalnym choroby, dzieci umierają przed ukończeniem drugiego roku życia, głównie z powodu zakażeń, jeśli nie są leczone w warunkach ścisłej izolacji, nie otrzymują leczenia przeszczepieniem macierzystych komórek krwiotwórczych (hematopoietic stem cells transplantation, HSCT) albo terapii genowej.

Na podstawie badań przeprowadzonych w USA, częstość występowania SCID szacuje się na około 1 na 58 000 żywych urodzeń; jest zmienna w zależności od regionu świata i większa w populacjach, w których współczynnik pokrewieństwa jest wyższy [12].

U prawie 70% pacjentów, T-B-NK+SCID jest wywołany mutacjami genów *RAG1* i *RAG2*, co powoduje brak inicjacji rekombinacji V(D)J, zahamowanie rozwoju limfocytów B i T, brak syntezy immunoglobulin i ciężki złożony niedobór odporności.

Odrębną grupę tworzą zespoły T-B-NK+SCID spowodowane mutacjami genów kodujących podstawowe komponenty mechanizmu NHEJ, takie jak: *PRKDC* kodujący fosfokinazę DNA-PKcs, *DCLRE1C* kodujący endonukleazę Artemis, *NHEJ1* kodujący Cernunnos/XLF, *LIG4* kodujący DNA Ligazę IV).

### SCID Z NADWRAŻLIWOŚCIĄ NA PROMIENIOWANIE JONIZUJĄCE

Główna różnica między SCID związanym z defektem *RAG1/RAG2* a SCID spowodowanym defektem mechanizmu naprawy DNA DSBs polega na tym, że komórki pacjentów z defektem NHEJ wykazują zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące i czynniki alkilujące (radiosensitive SCID; RS-SCID), powszechnie stosowane w procesie kondycjonowania przed allogenicznym przeszczepem komórek macierzystych.

ARTEMIS (OMIM#605988) jest zespołem chorobowym należącym do grupy SCID o fenotypie T-B-NK+, po raz pierwszy opisanym u rodowitych amerykańskich Indian ze szczepu Navajo i Apaczów [30]. Przyczyną choroby jest mutacja genu *DCLRE1C* nazwanego Artemis. Białko Artemis tworzy aktywny kompleks enzymatyczny z DNA-PKcs (Artemis/DNA-PKcs), który odgrywa główną rolę w rekombinacji V(D)J przez otwarcie struktury szpilki do włosów utworzonej przez kompleks RAG, a następnie bierze udział w modyfikacji powstałych końców DNA w celu uzyskania jak największej różnorodności receptorów [18]. Większość pacjentów z mutacjami Artemis nie wytwarza żadnych funkcjonalnych immunoglobulin i w konsekwencji prezentuje ciężką postać choroby o fenotypie T-B-NK+ RS-SCID, w której fibroblasty i komórki szpiku wykazują zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące. Podobnie jak w innych postaciach SCID, objawy kliniczne występują we wczesnym niemowlęctwie, zwykle w postaci zakażeń wiru-

sowych, przewlekłych biegunek wirusowych, zapalenia płuc, zaburzenia wzrostu. Oprócz klasycznej postaci opisano dwa inne fenotypy kliniczne o łagodniejszym przebiegu, związane z hipomorficznymi mutacjami Artemis. W jednym z nich występują objawy typowe dla zespołu Omenna, obserwowanego w przebiegu hipomorficznych mutacji genów *RAG*. U pacjentów z drugim fenotypem obserwowano postępujący złożony zespół niedoboru odporności (combined immunodeficiency; CID) ujawniający się w późniejszym dzieciństwie, z nawracającymi zakażeniami dróg oddechowych i przewodu pokarmowego, z limfopenią T i B, hipogammaglobulinemią oraz objawami autoimmunizacyjnymi [18, 39, 58]. U niektórych chorych może dojść do rozwoju chłoniaka spowodowanego zakażeniem wirusem EBV [39]. Ponadto, wykazano występowanie w limfocytach inwersji i translokacji chromosomów 7 i 14, obserwowanych również w innych zespołach z defektem naprawy DNA, ale nie opisywano małogłowia.

NIEDOBÓR DNA LIGAZY IV (OMIM#606593) jest rzadkim zespołem genetycznym dziedziczącym się autosomalnie recesywnie, spowodowanym hipomorficznymi mutacjami w genie *Lig 4* umiejscowionym w chromosomie 13q33-q34. Produktem genu jest enzym DNA ligaza IV (LIG4), która jest głównym komponentem końcowego etapu ponownego łączenia zakończeń DNA w procesie naprawy DSBs przez mechanizm NHEJ. Pierwszy opis pacjenta z niedoborem DNA ligazy IV pochodzi z 1999 r. [44] i dotyczył prawidłowo rozwiniętego 14-letniego chłopca bez małogłowia, bez dysmorfii, u którego rozwinęła się ostra białaczka limfoblastyczna z komórek T (T-ALL). W czasie standardowej chemioterapii wystąpiła ciężka leukopenia, z powodu której ominięto leczenie konsolidacyjne, ale profilaktyczna radioterapia spowodowała ciężkie powikłania. Chory zmarł z powodu popromiennej encefalopatii. Badania molekularne fibroblastów wykazały defekt naprawy DNA spowodowany niewystarczającą aktywnością LIG4. W następnych latach opublikowano dane 27 przypadków, w których występowało bardzo wiele objawów klinicznych [18, 26, 40]. Wiodącym objawem klinicznym obserwowanym u większości pacjentów jest małogłowie, dysmorfia twarzy, zahamowanie wzrostu, opóźnienie intelektualne, nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące, hipogonadyzm, zmiennego stopnia złożone niedobory odporności i zwiększona podatność na rozwój nowotworów. Opisano też nieprawidłowości kostne, takie jak: hipoplazję kości, syndaktylię, polidaktylię i wrodzoną dysplazję biodra. Dziesięciu chorych miało różne zmiany skórne np. wrażliwość na promieniowanie, łuszczycę, wyprysk skórny i hipopigmentację. Niedobory odporności mogą wykazywać szeroki zakres, od umiarkowanych bez towarzyszących zakażeń po bardzo ciężką limfocytopenię, a w niektórych przypadkach pancytopenię spowodowaną hipoplazją szpiku kostnego. Różne fenotypy mogą zależeć od stopnia zachowanej aktywności LIG4 [42, 55].

CERNUNNOS (OMIM#611291) (Cernunnos/XLF) jest rzadkim zespołem genetycznym, którego przyczyną

jest mutacja genu *Cernunnos/XLF*, znajdującego się w chromosomie 2q35. *Cernunnos/XLF* pełni podwójną rolę w mechanizmie NHEJ. Główną funkcją *Cernunnos/XLF* jest stymulacja aktywności kompleksu XRCC4/LIG4, który odgrywa istotną rolę w końcowej fazie prawidłowego łączenia zakończeń DNA. Ponadto, pełni rolę wczesnego sensora nowo powstałych DSBs i gromadzi się w miejscach złamań w sposób Ku-zależny. Wykazano, że *Cernunnos/XLF* odgrywa istotną rolę w rekombinacji V(D)J, CRS i prawidłowym przebiegu naprawy DSBs przez mechanizm NHEJ. Dotychczas opisano ośmiu pacjentów z zespołem *Cernunnos* [1, 5]: pierwszych dwoje było rodzeństwem z głębokim niedoborem odporności oraz T i B limfocytopenią z prawidłową liczbą komórek NK [14], kolejnych pięciu miało złożone niedobory odporności (CID) wskazujące na zaburzenie procesu naprawy DNA przez NHEJ. U wszystkich pacjentów rozwinął się RS-SCID o fenotypie T-B-NK<sup>+</sup> z towarzyszącym małogłowiem, niedoborem wzrostu, nadwrażliwością na promieniowanie jonizujące, zaburzeniami układu odporności i występującymi od pierwszych miesięcy życia ciężkimi infekcjami bakteryjnymi, wirusowymi i/lub pasożytniczymi. U niektórych z nich występowały dysmorficzne zmiany twarzy i/lub zmiany kostne, u jednego stwierdzono aplazję szpiku. Dwóch pacjentów spośród tych pięciu zmarło z powodu infekcji, podczas gdy kolejnych trzech otrzymywało profilaktykę antybiotykową i immunoglobuliny. Inny pacjent z podobnymi cechami morfologicznymi, takimi jak: małogłowie, niedobór wzrostu, dysmorfizm twarzy, nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące, zaburzenia układu odporności i nawracające infekcje dróg oddechowych był opisany przez Faraci i wsp. [19].

**DEFICYT DNA-PKcs.** Dotychczas opisano jednego pacjenta pochodzenia tureckiego, dziewczynkę, u której stwierdzono występowanie homozygotycznej hipomorficznej mutacji punktowej (L3062R) w genie *DNA-PKcs*. Pod względem klinicznym pacjentka miała radiowrażliwą postać T-B-NK<sup>+</sup> RS-SCID z objawami klinicznymi podobnymi do obserwowanych u chorych z defektem RAG czy Artemis. Od 3 miesiąca życia chorowała z powodu nawracającej kandydozy jamy ustnej i infekcji dolnych dróg oddechowych, spowodowanych ciężkim niedoborem odporności, związanym z brakiem limfocytów T i B. Nie stwierdzono małogłowia ani upośledzenia umysłowego. W 4 miesiącu życia wystąpiło duże owrzodzenie aftowe jamy ustnej, przypominające zmiany opisywane u Indian Atabasków, pacjentów z deficytem Artemis [32]. U pacjentki wykonano HSCT z użyciem komórek pobranych od identycznego pod względem HLA kuzyna, uzyskując nieoczekiwanie całkowitą odnowę komórek B, co jest rzadkim zjawiskiem w przypadku braku przedtransplantacyjnego kondycjonowania. Biorąc pod uwagę to, że tylko 1 pacjentka została opisana nie wiadomo, jakiego zakresu fenotypowego należy się spodziewać w przypadku łagodniejszej lub cięższej mutacji hipomorficznej czy nieimmunologiczne cechy mogą być związane z tym defektem [56].

### **ZŁOŻONE PIERWOTNE NIEDOBORY ODPORNOŚCI (CID) ZWIĄZANE Z ZABURZENIAMI NAPRAWY DSBs I ZWIĘKSZONĄ WRAŻLIWOŚCIĄ NA PROMIENIOWANIE JONIZUJĄCE**

**ZESPÓŁ NIJMEGEN** (OMIM#251260) (Nijmegen breakage syndrome; NBS) jest rzadką chorobą monogenową dziedziczącą się autosomalnie recesywnie. Przyczyną zespołu jest mutacja w genie *NBN* umiejscowionym w chromosomie 8q21, którego produktem jest białko nibryna (NBN). U ponad 90% pacjentów z NBS w populacji słowiańskiej występuje homozygotyczna delecja 5 par zasad (c.657\_661del5) w eksonie 6 genu *NBN*, którą uznano za tzw. mutację założycielską. W trzech populacjach: polskiej, czeskiej i ukraińskiej, w których zidentyfikowano największą liczbę chorych z NBS częstość występowania heterozygotycznego nosicielstwa tej mutacji szacuje się prawie na 0,5% [57].

NBN wraz z MRE11 i RAD50 tworzy kompleks jądrowy (MRN), który odgrywa kluczową rolę w procesie naprawy DNA jako sensor DSBs. MRN przyłącza się do złamanych zakończeń DNA utrzymując je w bezpośredniej bliskości, zapoczątkowuje gromadzenie i lokalną aktywację ATM wokół miejsca złamania. Zaktywowane białko ATM uruchamia kaskadę procesów prowadzących do nagromadzenia i aktywacji wielu białek naprawy DNA.

Po raz pierwszy zespół NBS opisali w 1981 r. Weemaes i wsp. [59] z Uniwersytetu w Nijmegen w Holandii u pary rodzeństwa z małogłowiem, niedoborem wzrostu, złożonymi niedoborami odporności i upośledzeniem umysłowym, będącego potomstwem spokrewnionych rodziców. W ciągu następnych 30 lat dokonał się ogromny postęp w rozumieniu molekularnej patogenezy choroby, zaburzeń procesów komórkowych i związanych z nimi złożonymi objawami klinicznymi, dzięki czemu w znacznym stopniu wzrosła rozpoznawalność choroby. Pierwszych 11 polskich pacjentów z zespołem Nijmegen zostało opisanych przez Chrzanowską i wsp. w 1995 r. [10]. Obecnie w rejestrze Kliniki Immunologii IPCZD znajduje się 131 pacjentów. Dotychczas, największe opracowania kliniczne opublikowane w literaturze fachowej obejmowały 55 i 57 pacjentów z NBS [23, 27].

Na obraz kliniczny zespołu składają się: znaczne małogłowie obecne od chwili urodzenia i postępujące z wiekiem, charakterystyczny wygląd twarzy (niskie, pochyłe czoło, wydatny nos, cofnięta broda, ryc.1) niedobór wzrostu i masy ciała, lekkie lub umiarkowane obniżenie sprawności intelektualnej, nawracające infekcje bakteryjne, wirusowe i/lub grzybicze spowodowane złożonymi niedoborami odporności komórkowej i humoralnej oraz hipogonadyzm hipergonadotropowy u dziewcząt. U ponad połowy pacjentów występuje niedobór IgG, z których większość wymaga substytucji preparatami immunoglobulin.

U chorych z NBS istnieje znacznie zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworów złośliwych, głównie wywodzących się z układu limfatycznego, wśród których przeważają chłoniaki nieziarnicze z limfocytów T i B, rzadziej

występują białaczki limfoblastyczne lub chłoniaki Hodgkina [8]. Obecnie nowotwory i/lub powikłania po ich leczeniu są główną przyczyną zgonów [9, 61]. Komórki chorych wykazują znacznie zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące. W badaniach laboratoryjnych limfocytów krwi obwodowej stwierdza się spontaniczną łamliwość chromosomów, dotyczącą zwykle pary chromosomów 7 i 14. Złamania występują w miejscach kodowania genów Ig i TCR. Ze względu na znaczne ryzyko nowotworzenia oraz występującą nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące i radiomimetyki (bleomycyna) utrudniające leczenie nowotworów, rokowanie u tych chorych jest przeważnie niepomyślne.

ATAKSJA-TELEANGIEKTAZJA (OMIM#208900) (ataxia telangiectasia; AT) jest wieloukładową chorobą genetyczną dziedziczącą się autosomalnie recesywnie, spowodowaną mutacjami w genie *ATM* (ataxia-telangiectasia mutated) umiejscowionym na chromosomie 11q22.3. Pierwszy opis choroby przedstawili w 1926 r. czescy neurologi Syllaba i Henner, ale jako odrębną jednostkę kliniczną AT zdefiniowali w 1958 r. Boder i Sedgwick [4]. Produktem genu jest kinaza proteinowa ATM, która odgrywa główną rolę w przekazywaniu sygnałów setkom cząsteczek efektorowych, biorących udział w kontroli cyklu komórkowego i procesie naprawy DNA DSBs, z białkiem NBN włącznie [34, 38].

W rejestrze Kliniki Immunologii IPCZD znajduje się 132



Ryc. 1. Charakterystyczny wygląd twarzy pacjenta z zespołem NBS

pacjentów z AT, którzy wspólnie z NBS stanowią najliczniejszą grupę PNO z zaburzeniami naprawy DNA i zwiększoną wrażliwością na promieniowanie jonizujące.

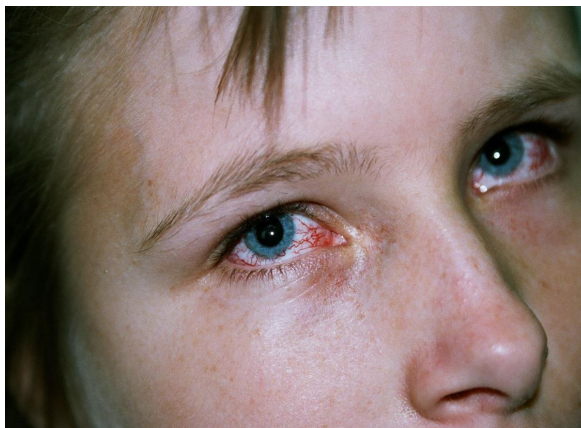
Głównym objawem w AT jest postępująca niezborność mózdkowa (ataksja), obserwowana najczęściej w 12-14 m.ż, kiedy dziecko zaczyna chodzić, a około 6 r.ż. jest obecna u większości chorych; przeważnie w okresie pokwitania chorzy są zależni od wózka inwalidzkiego. Drugi główny objaw zespołu, teleangiektazje (rozszerzenia naczyń włosowatych) pojawiają się nieco później, około 4-6 r.ż. (ryc. 2). Inne cechy charakterystyczne zespołu obejmują: zmiennego stopnia niedobory odporności humoralnej i komórkowej będące przyczyną nawracających zakażeń dróg oddechowych; patognomiczne jest przewlekłe zapalenie oskrzeli i zatok obocznych nosa [35]. Ponadto występują niestabilność genomowa, przedwczesne starzenie i znacznie zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworów złośliwych, wywodzących się głównie z układu limfatycznego, które - oprócz przewlekłych zmian płucnych - są drugą przyczyną zgonów. Ocenia się, że u 15-30% chorych z AT w ciągu życia rozwinię się nowotwór [43]. Ciężkość objawów neurologicznych, zaburzeń odporności i objawów ze strony układu oddechowego oraz stopień progresji choroby znacznie waha się między poszczególnymi pacjentami. Rozwój intelektualny u większości chorych nie odbiega od normy, natomiast u około 30% pacjentów, z wiekiem, występuje umiarkowane obniżenie sprawności intelektualnej lub trudności z uczeniem się.

Podobnie jak u chorych z NBS, w komórkach chorych z AT występują translokacje pary chromosomów 7 i 14, przy czym ich pęknięcia odpowiadają w przybliżeniu umiejscowieniu genów receptorów limfocytów T (TCR) i łańcuchów ciężkich immunoglobulin (IgH). Ponadto, komórki AT wykazują nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące i związki chemiczne o podobnym działaniu (radiomimetyki). Pierwszy opis udokumentowanej reakcji po napromienieniu pacjenta z AT pochodzi z 1967 r. U 10-letniego chłopca, po zastosowaniu promieniowania w dawce 30 Gy z powodu mięsaka limfatycznego gardła (lymphosarcoma), wystąpiła ciężka miejscowa reakcja popromienna okolicy twarzy i szyi. W wyniku powikłań chory zmarł 8 miesięcy później [22].

W badaniach laboratoryjnych charakterystyczne dla AT jest podwyższone stężenie alfa-fetoproteiny (AFP), występujące prawie u 95% chorych oraz niedobór IgA u 70%. Około ¼ pacjentów wymaga substytucji preparatami immunoglobulin [11, 20].

AT jest chorobą postępującą i nie ma jeszcze skutecznych metod leczenia, albo chociażby pozwalających na spowolnienie procesu chorobowego. Pewne nadzieje niesie ze sobą nowatorska metoda podawania deksametazonu w erytrocytach własnych pacjenta, która pozwala na złagodzenie objawów neurologicznych [6, 36].





Ryc. 2. Teleangiektazje na spojówkach u chorego z zespołem AT

W ostatnich latach, dzięki większej świadomości oraz dostępności do badań genetycznych pojawia się coraz więcej opisów pacjentów dorosłych z łagodniejszymi objawami neurologicznymi, ujawniającymi się pod postacią dystonii, choreoatetozy i ataksji mózdkowej, rozpoznawanych w późniejszym okresie życia [16, 62]. Łagodniejsze postaci choroby wiążą się z częściowo zachowaną aktywnością ATM i w wielu przypadkach są rozpoznawane ze znacznym opóźnieniem. Dlatego konieczna jest większa czujność wśród pediatrów i neurologów, aby w każdym przypadku niewyjaśnionej ataksji, dystonii czy choreoatetozy brać pod uwagę rozpoznanie AT.

W diagnostyce różnicowej AT i NBS należy uwzględniać inne zespoły przebiegające z nadwrażliwością na promieniowanie jonizujące o podobnym fenotypie, które zbiorczo przedstawiono w tabeli 1.

## DIAGNOSTYKA I MOŻLIWOŚCI TERAPEUTYCZNE

Omówione wyżej zespoły PNO z zaburzeniami naprawy DNA DSBs należą do grupy chorób rzadkich, które nie dotyczą dużej, ale ciągle zwiększającej się grupy pacjentów. W ostatnich latach dzięki ogromnemu rozwojowi genetyki molekularnej, cytogenetyki, nowoczesnych technik diagnostycznych, a także większej świadomości klinicystów, zdecydowanie poprawiła się rozpoznawalność tych rzadkich zespołów. Wśród nich szczególną grupę tworzą omówione wyżej PNO ze zwiększoną wrażliwością na promieniowanie jonizujące, spowodowane genetycznie uwarunkowanym zaburzeniem naprawy dwuniciowych pęknięć DNA. Ich wczesne rozpoznanie jest niezwykle istotne, bo umożliwia uniknięcie ciężkich, nawracających infekcji, niepotrzebnego narażenia na ekspozycję promieniami jonizującymi w celach diagnostycznych oraz niepożądanych reakcji na radioterapię stosowaną w zwalczaniu nowotworów.

Wstępne podejrzenie ciężkiego złożonego niedoboru odporności opiera się przeważnie na charakterystycznych objawach klinicznych pojawiających się już w pierwszych tygodniach i miesiącach życia; wymaga

pełnej oceny aktualnego stanu układu odporności pacjenta. Trudności w skojarzeniu występujących zaburzeń z defektem genetycznym mogą wynikać z tego, że wiele chorób może mieć bardzo szeroki zakres objawów klinicznych, zarówno immunologicznych, jak i nieimmunologicznych, obserwowanych u indywidualnych pacjentów (warianty Artemis, LIG4, NBS, AT) [41].

Ustalenie podłoża występującego defektu wymaga wykonania badań genetycznych, potwierdzających występowanie mutacji w określonym genie i pozwalających na ustalenie ostatecznego rozpoznania.

Badanie radiowrażliwości polega na ocenie przeżywalności komórek pacjenta po zastosowaniu promieniowania jonizującego. Do badań używa się limfoblastycznych linii komórkowych (lymphoblastoid cell line; LCL) lub hodowli fibroblastów skóry, których zdolność do przeżycia po naświetlaniu *in vitro* ocenia się testem CSA (colony survival assay). Test ten pierwotnie stosowano do wczesnego potwierdzenia diagnozy u chorych z zespołem ataksja-teleangiektazja. Zakres wartości prawidłowych dla CSA ustalono z użyciem LCL fenotypowo zdrowych osobników, z którymi porównano wartości uzyskane u chorych z A-T [54]. Po zastosowaniu promieniowania 1 Gy, wyrażona w procentach frakcja żywych komórek wynosiła <21% u chorych z A-T w porównaniu do >37% w grupie kontrolnej. Strefa obejmująca wartości pośrednie 21-37%, nie miała znaczenia diagnostycznego, ponieważ mogli się w niej znajdować zarówno chorzy z zaburzeniami naprawy DNA, jak i zdrowi nosiciele jednej kopii zmutowanego genu.

W chorobach spowodowanych defektem mechanizmów naprawy NHEJ, w których uzyskanie LCL nie jest możliwe z powodu braku limfocytów B, jedyną metodą oceny radiowrażliwości jest badanie fibroblastów skóry. Jednak hodowla fibroblastów jest procesem czasochłonnym, który zwykle zajmuje 6-8 tyg., co stanowi poważny problem w przypadku SCID, w którym wymagane jest szybkie podjęcie procedury przeszczepienia macierzystych komórek krwiotwórczych korygujących defekt. Wykrywanie radiowrażliwości jest trudne i czasochłonne oraz ograniczone do wysokospecjalistycznych laboratoriów.

Dlatego ważna jest wiedza dotycząca objawów klinicznych, które mogą wskazywać na zwiększoną radiowrażliwość np. małogłowie, teleangiektazje czy profil immunologiczny wskazujący na niedobory odporności (np. limfopenia). Pomocne może być wykrycie w karyotypie translokacji dotyczących pary chromosomów 7 i 14, występujących w AT, NBS czy innych RS-SCID.

## LECZENIE

Większość pacjentów ze SCID w ciągu kilku miesięcy od urodzenia ma ciężkie nawracające zakażenia, również oportunistyczne, przewlekłą biegunkę i zahamowanie rozwoju. Chorzy wymagają leczenia antybiotykami o szerokim zakresie działania, lekami przeciwwgrzybi-



**Tabela 1.** Pierwotne niedobory odporności z zaburzeniami naprawy DNA i nadwrażliwością na promieniowanie jonizujące

Choroba	Gen	Małogłowie	Ataksja	Teleangiektazje	Objawy kliniczne	Podwyższone AFP
Zespół ataksja-teleangiektazja (AT)	ATM	-	+	+	Apraksja gałkoruchowa, niedobory odporności, nawracające zakażenia układu oddechowego, nowotwory z układu chłonnego, translokacje chromosomów 7 i 14, nadwrażliwość na bleomycynę i środki alkilujące	+
Zespół Nijmegen (NBS)	NBN	++	-	-	Małogłowie, dysmorfia twarzy, zahamowanie rozwoju fizycznego i intelektualnego. Niedobory odporności, nawracające zakażenia układu oddechowego, znaczne ryzyko wystąpienia nowotworów z układu chłonnego, translokacje chromosomów 7 i 14, nadwrażliwość na bleomycynę i środki alkilujące	-
Ataksja-teleangiektazja like (ATLD)	MRE11	+/-	+/-	-	Małogłowie w niektórych przypadkach, ataksja o późnym początku i wolnym przebiegu, apraksja gałkoruchowa, bez niedoborów odporności	-
Zespół Nijmegen like (NBSLD)	RAD50	+	+/-	-	Dysmorfia twarzy, zahamowanie rozwoju, niepostępująca ataksja, prawidłowe dojrzewanie płciowe, bez niedoborów odporności, nadwrażliwość na bleomycynę	-
Zespół RIDDLE	RNF168	+	+/-	+	Dysmorfia twarzy, zahamowanie rozwoju, trudności w uczeniu się, łagodna ataksja	+

czymi, przeciwwirusowymi oraz substytucji preparatami immunoglobulin, jednak jedynym skutecznym leczeniem jest HSCT albo eksperymentalne leczenie terapią genową.

Uzyskanie najlepszych wyników, z chimeryzmem potransplantacyjnym oraz prawidłową odnową układu odporności, zależy od odpowiedniego przygotowania pacjenta przed transplantacją, czyli tzw. mieloablacji. Mieloablacja polega na zniszczeniu układu krwiotwórczego biorcy z jego ew. chorobami za pomocą cytostatyków i/lub napromieniania całego ciała. Zabieg przygotowania chorego do przeszczepu nazywa się kondycjonowaniem biorcy i bezpośrednio poprzedza przeszczepienie. Wyróżnia się dwa rodzaje kondycjonowania: mieloablacyjne i o zredukowanej intensywności. Kondycjonowanie mieloablacyjne (myeloablative conditioning; MAC) polega na stosowaniu dużych dawek środków alkilujących, typowo melfalanu albo busulfanu, thiotepa czy napromienianiu całego ciała. Mała dawka promieniowania 200-400 cGy, chociaż nie jest uważana za mieloablacyjną, to jednak nie powinna być stosowana u pacjentów z nadwrażliwością na promieniowanie jonizujące. Podczas zredukowanego kondycjonowania (reduced intensity conditioning; RIC) nie stosuje się środków alkilujących albo zmniejszone dawki (fludarabina <150 mg/m<sup>2</sup> i cyklofosamid <40mg/kg m.c.) i/lub surowicę antylimfocytarną (ATG), albo alemtuzumab [50].

Kondycjonowanie przed przeszczepieniem jest kontrolowane nawet u pacjentów ze SCID bez radiowrażliwości [17], ponieważ mieloablacyjne dawki chemioterapii mogą się wiązać nie tylko z bezpośrednią toksycznością, taką jak zespołu niedrożności zatok wątrobowych (sinusoidal obstruction syndrome, SOS), ale również niepod-

nością, zaburzeniami hormonalnymi, zahamowaniem wzrastania, opóźnieniem intelektualnym i ryzykiem nowotworzenia [13, 31]. Przeszczepienie macierzystych komórek krwiotwórczych koryguje niedobory odporności i może zapobiegać wystąpieniu nowotworu [51].

W przeciwieństwie do SCID, dotychczas nie ma swobodnego leczenia ani metod terapeutycznych spowalniających proces chorobowy u chorych z AT. Mimo występujących niedoborów odporności nie ma przeciwwskazań do realizacji szczepień ochronnych, zalecane jest szczepienie przeciwko pneumokokom szczepionką skoniugowaną z białkiem i sezonowe szczepienie przeciwko grypie. Pacjenci z hipogammaglobulinemią otrzymują substytucję immunoglobulinami, a w razie wystąpienia przewlekłych zmian w płucach jest wymagana profilaktyka antybiotykowa. Ponieważ objawy neurologiczne u chorych z AT postępują, ważna jest systematyczna rehabilitacja, która pozwala jak najdłużej zachować samodzielność. Wprawdzie nie ma jeszcze skutecznych metod pozwalających na zahamowanie postępu choroby, pewne nadzieje wiąże się z nową terapią, polegającą na podawaniu deksametazonu w erytrocytach własnych pacjenta. Dotychczasowe wyniki badań są obiecujące, ponieważ obserwuje się złagodzenie objawów neurologicznych [6, 36]. Obecnie rozpoczynają się wieloośrodkowe badania kliniczne, o akronimie ATTeST, z podwójnie ślepą próbą i placebo na dużej grupie pacjentów z całego świata (<http://attest-trial.com/>).

W sferze eksperymentu pozostają badania *in vitro*, które powodują korekcję pierwotnego kodonu stop z użyciem read-through compounds i mutacji splice z zastosowaniem antisense oligonukleotydów [21]. Zupełnie teoretyczna wydaje się terapia genowa, ponieważ gen

ATM jest duży, składa się z 63 eksonów i należałoby go wprowadzić do centralnego układu nerwowego [49]. Odrębnym problemem klinicznym jest zwalczanie występujących w AT nowotworów. Ze względu na zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące standardowy schemat wymaga modyfikacji w celu uniknięcia radioterapii i radiomimetyków, które są szczególnie toksyczne dla chorych z AT. Modyfikacja leczenia z zastosowaniem zredukowanych dawek chemioterapeutyków, takich jak: bleomycyna, cyklofosfamid czy actynomycyna D musi być bardzo ostrożnie monitorowana ze względu na możliwość wystąpienia ostrych, toksycznych powikłań. Szczególnie ostrożnie należy stosować bleomycynę, która działa toksycznie również na płuca.

Zastosowanie HSCT w AT jest przedmiotem intensywnej dyskusji i nie jest jeszcze rekomendowane ze względu na bardzo złe wyniki przeżycia obserwowane tylko u 25% leczonych [50].

Podobnie jak w AT, również w NBS nie ma swobodnego programu leczenia. Niedobory odporności humoralnej wymagają substytucji immunoglobulinami i/lub antybiotykoterapii. Dziewczynki wymagają substytucji hormonalnej z powodu stwierdzonego hipogonadyzmu. Ze względu na znacznie zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworów, głównie układu krwiotwórczego, konieczny jest stały nadzór onkologiczny. Leczenie tej grupy pacjentów z nowotworami jest trudne ze względu na złą tolerancję radioterapii/chemioterapii i wymaga zastosowania zmodyfikowanych dawek chemioterapeutyków (np. cyklofosfamid, ifosfamid i epipodofilotoksyn). Intensywność leczenia zwykle dostosowuje się do indywidualnej tolerancji i toksyczności. W ostatnich latach, w przeciwieństwie do AT, coraz częściej rozważa się możliwość zastosowania HSCT u chorych z NBS, jako alternatywnej metody leczenia [61]. Obecne wyniki takiego leczenia są trudne do oceny, ze względu na małą grupę pacjentów i krótki czas obserwacji. Niemniej, są prowadzone intensywne badania retro- i prospektywne u wszystkich dotychczas przeszczepionych pacjentów, które pozwolą odpowiedzieć na pytanie: czy i kiedy należy wykonać przeszczepienie komórek macierzystych u pacjentów z NBS.

## **PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY ROZWOJU DIAGNOSTYKI I LECZENIA**

Leczenie chorych z PNO i zaburzeniami naprawy DNA zależy od obrazu klinicznego i rodzaju występującego niedoboru. Pacjenci z hipogammaglobulinemią, zaburzeniami dojrzewania limfocytów B wymagają substytucji immunoglobulinami i/lub profilaktyki antybiotykowej.

Natomiast pacjenci z ciężkimi niedoborami komórek T, wymagają bardziej agresywnego leczenia z przeszczepieniem macierzystych komórek krwiotwórczych włącznie. Ze względu na zwiększoną łamliwość chromosomów u tych chorych nie stosuje się napromieniania całego ciała, celem przygotowania do HSCT. Lepsze rezultaty uzyskuje się stosując zmniejszone kondycjonowanie RIC [2, 24, 25, 53]. Modyfikacji podlega również chemioterapia stosowana w leczeniu nowotworów układu chłonnego z powodu dużej toksyczności standardowego leczenia, nie zaleca się stosowania busulfanu i środków alkilujących [15], należy unikać albo ograniczyć stosowanie radioterapii. Po zakończonym leczeniu chorzy wymagają dalszej, ścisłej opieki ze względu na większe ryzyko wystąpienia powikłań i/lub wtórnego nowotworu. Być może alternatywą dla tych pacjentów będzie terapia genowa. Chociaż są już pierwsze doniesienia o jej przeprowadzeniu u pacjentów z Artemis SCID, to nadal takie postępowanie pozostaje w fazie eksperymentu [46]. Inną alternatywną propozycją jest ostatnio rozwijana metoda z użyciem oligonukleotydów antysensownych, które mogą skorygować takie mutacje jak: „splice”, przesunięcia ramki odczytu, czy missensowną i zwiększyć syntezę brakującego białka [33]. Jeszcze inne podejście terapeutyczne dotyczy zastosowania rybosomalnych środków czytających, w celu sforsowania/przełamania przedwczesnej terminacji kodonu i spowodowania prawidłowej ekspresji proteiny [60].

## **WNIOSKI KOŃCOWE**

Pacjenci z pierwotnymi niedoborami odporności i zaburzeniami naprawy złamań podwójnej nici DNA są grupą chorych, którzy wymagają specjalnej troski z powodu znacznie zwiększonego ryzyka rozwoju nowotworów będących, obok ciężkich infekcji, główną przyczyną zgonów.

U chorych z RS-SCID zaleca się stosowanie RIC podczas kondycjonowania przed przeszczepieniem krwiotwórczych komórek macierzystych; nie zaleca się napromieniania całego ciała.

Nowotwory występujące w tej grupie pacjentów wymagają indywidualnego podejścia, z wyłączeniem radioterapii i zastosowaniem zredukowanych dawek środków alkilujących.

Konieczne jest stałe poszerzanie wiedzy dotyczącej różnorodności klinicznego fenotypu „radiowrażliwego” pacjenta wśród lekarzy, celem ułatwienia wczesnej diagnozy i uniknięcia niepożądanych działań podczas HSCT czy chemioterapii.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Ahnesorg P., Smith P., Jackson S.P.: XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 2006; 124: 301-313
- [2] Albert M.H., Gennery A.R., Greil J., Cale C.M., Kalwak K., Kondratenko I., Mlynarski W., Notheis G., Führer M., Schmid I., Belohradsky B.H.: Successful SCT for Nijmegen breakage syndrome. *Bone Marrow Transplant.*, 2010; 45: 622-626
- [3] Alt F.W., Zhang Y., Meng F.L., Guo C., Schwer B.: Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. *Cell*, 2013; 152: 417-429
- [4] Boder E., Sedgwick R.P.: Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics*, 1958; 21: 526-554
- [5] Buck D., Malivert L., de Chasseval R., Barraud A., Fondanèche M.C., Sanal O., Plebani A., Stéphan J.L., Hufnagel M., le Deist F., Fischer A., Durandy A., de Villartay J.P., Revy P.: Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, 2006; 124: 287-299
- [6] Chessa L., Leuzzi V., Plebani A., Soresina A., Micheli R., D'Agnano D., Venturi T., Molinaro A., Fazzi E., Marini M., Ferremi Leali P., Quinti I., Cavaliere F.M., Girelli G., Pietrogrande M.C. i wsp.: Intra-erythrocyte infusion of dexamethasone reduces neurological symptoms in ataxia telangiectasia patients: results of a phase 2 trial. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2014; 9: 5
- [7] Chistiakov D.A., Voronova N.V., Chistiakov P.A.: Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncol.*, 2008; 47: 809-824
- [8] Chrzanowska K.H.: Zespół Nijmegen – pierwotne małogłowie z wysokim ryzykiem rozwoju nowotworu. *Pediatr. Pol.*, 2001; 76: 327-338
- [9] Chrzanowska K.H., Gregorek H., Dembowska-Bagińska B., Kalina M.A., Digweed M.: Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J. Rare Dis.*, 2012; 7: 13
- [10] Chrzanowska K.H., Kleijer W.J., Krajewska-Walasek M., Białęcka M., Gutkowska A., Goryluk-Kozakiewicz B., Michałkiewicz J., Stachowski J., Gregorek H., Lysón-Wojciechowska G., Janowicz W., Jóźwiak S.: Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency, and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, 1995; 57: 462-471
- [11] Chun H.H., Gatti R.A.: Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair*, 2004; 3: 1187-1196
- [12] Cirillo E., Giardino G., Gallo V., D'Assante R., Grasso F., Romano R., Di Lillo C., Galasso G., Pignata C.: Severe combined immunodeficiency - an update. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2015; 1356: 90-106
- [13] Cohen A., Békássy A.N., Gaiero A., Faraci M., Zecca S., Tichelli A., Dini G., EBMT Paediatric and Late Effects Working Parties: Endocrinological late complications after hematopoietic SCT in children. *Bone Marrow Transplant.*, 2008; 41: S43-S48
- [14] Dai Y., Kysela B., Hanakahi L.A., Manolis K., Riballo E., Stumm M., Harville T.O., West S.C., Oettinger M.A., Jeggo P.A.: Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 2462-2467
- [15] Dembowska-Bagińska B., Perek D., Brożyna A., Wakulinska A., Olczak-Kowalczyk D., Gładkowska-Dura M., Grajkowska W., Chrzanowska K.H.: Non-Hodgkin lymphoma (NHL) in children with Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Pediatr. Blood Cancer*, 2009; 52: 186-190
- [16] Dörk T., Bendix-Waltes R., Wegner R.D., Stumm M.: Slow progression of ataxia-telangiectasia with double missense and in frame splice mutations. *Am. J. Med. Genet. A*, 2004; 126A: 272-277
- [17] Dvorak C.C., Cowan M.J.: Hematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency disease. *Bone Marrow Transplant*, 2008; 41: 119-126
- [18] Evans P.M., Woodbine L., Riballo E., Gennery A.R., Hubank M., Jeggo P.A.: Radiation-induced delayed cell death in a hypomorphic Artemis cell line. *Hum. Mol. Genet.*, 2006; 15: 1303-1311
- [19] Faraci M., Lanino E., Micalizzi C., Morreale G., Di Martino D., Banov L., Comoli P., Locatelli F., Soresina A., Plebani A.: Unrelated hematopoietic stem cell transplantation for Cernunnos-XLF deficiency. *Pediatr. Transplant.*, 2009; 13: 785-789
- [20] Gatti R.A.: Ataxia-telangiectasia. W: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. (red.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8 ed. New York, NY: McGraw-Hill. 2001: 705-732
- [21] Gatti R.A.: SMRT compounds correct nonsense mutations in primary immunodeficiency and other genetic models. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2012; 1250: 33-40
- [22] Gotoff S.P., Amirmokri E., Liebner E.J.: Ataxia telangiectasia. Neoplasia, untoward response to x-irradiation, and tuberous sclerosis. *Am. J. Dis. Child*, 1967; 114: 617-625
- [23] Gregorek H., Chrzanowska K.H., Dzierzanowska-Fangrat K., Wakulińska A., Pietrucha B., Zapaśnik A., Zborowska M., Pac M., Smółka-Afifi D., Kasztelewicz B., Piekutowska-Abramczuk D., Małydk J.: Nijmegen breakage syndrome: long-term monitoring of viral and immunological biomarkers in peripheral blood before development of malignancy. *Clin. Immunol.*, 2010; 135: 440-447
- [24] Gregorek H., Chrzanowska K.H., Michałkiewicz J., Syczewska M., Madaliński K.: Heterogeneity of humoral immune abnormalities in children with Nijmegen breakage syndrome: an 8-year follow-up study in a single centre. *Clin. Exp. Immunol.*, 2002; 130: 319-324
- [25] Gruhn B., Seidel J., Zintl F., Varon R., Tönnies H., Neitzel H., Bechtold A., Hoehn H., Schindler D.: Successful bone marrow transplantation in a patient with DNA ligase IV deficiency and bone marrow failure. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2007; 2: 5
- [26] Grunebaum E., Bates A., Roifman C.M.: Omenn syndrome is associated with mutations in DNA ligase IV. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008; 122: 1219-1220
- [27] Hiel J.A., Weemaes C.M., van Engelen B.G., Smeets D., Ligtenberg M., van Der Burgt I., van Den Heuvel L.P., Cerosaletti K.M., Gabreëls F.J., Concannon P.: Nijmegen breakage syndrome in a Dutch patient not resulting from a defect in NBS1. *J. Med. Genet.*, 2001; 38: E19
- [28] Howard J.C.: Immunology. Disease and evolution. *Nature*, 1991; 352: 565-567
- [29] Iyama T., Wilson D.M.3rd.: DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 2013; 12: 620-636
- [30] Jones J.F., Ritenbaugh C.K., Spence M.A., Hayward A.: Severe combined immunodeficiency among the Navajo. Characterization of phenotypes, epidemiology, and population genetics. *Hum. Biol.*, 1991; 63: 669-682
- [31] Kramer J.H., Crittenden M.R., DeSantes K., Cowan M.J.: Cognitive and adaptive behavior 1 and 3 years following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1997; 19: 607-613
- [32] Kwong P.C., O'Marcaigh A.S., Howard R., Cowan M.J., Frieden I.J.: Oral and genital ulceration: a unique presentation of immunodeficiency in Athabaskan-speaking American Indian children with severe combined immunodeficiency. *Arch. Dermatol.*, 1999; 135: 927-931
- [33] Lai C.H., Chun H.H., Nahas S.A., Mitui M., Gamo K.M., Du L., Gatti R.A.: Correction of ATM gene function by aminoglycoside-induced read-through of premature termination codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 15676-15681
- [34] Lavin M.F.: Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008; 9: 759-769

- [35] Lefton-Greif M.A., Crawford T.O., Winkelstein J.A., Loughlin G.M., Koerner C.B., Zahurak M., Lederman H.M.: Oropharyngeal dysphagia and aspiration in patients with ataxia-telangiectasia. *J. Pediatr.*, 2000; 136: 225-231
- [36] Leuzzi V., Micheli R., D'Agnano D., Molinaro A., Venturi T., Plebani A., Soresina A., Marini M., Ferremi Leali P., Quinti I., Pietrogrande M.C., Finocchi A., Fazzi E., Chessa L., Magnani M.: Positive effect of erythrocyte-delivered dexamethasone in ataxia-telangiectasia. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, 2015; 2: e98
- [37] Lieber M.R.: The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, 2010; 79: 181-211
- [38] Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A., McDonald E.R.3rd, Hurov K.E., Luo J., Bakalarski C.E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S.P., Elledge S.J.: ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 2007; 316: 1160-1166
- [39] Moshous D., Pannetier C., Chasseval R., Deist F., Cavazzana-Calvo M., Romana S., Macintyre E., Canioni D., Brousse N., Fischer A., Casanova J.L., Villartay J.P.: Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in *Artemis*. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 381-387
- [40] Murray J.E., Bicknell L.S., Yigit G., Duker A.L., van Kogelenberg M., Haghayegh S., Wieczorek D., Kayserili H., Albert M.H., Wise C.A., Brandon J., Kleefstra T., Warris A., van der Flier M., Bamforth J.S. i wsp.: Extreme growth failure is a common presentation of ligase IV deficiency. *Hum. Mutat.*, 2014; 35: 76-85
- [41] Nahas S.A., Gatti R.A.: DNA double strand break repair defects, primary immunodeficiency disorders, and 'radiosensitivity'. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2009; 9: 510-516
- [42] O'Driscoll M., Cersaletti K.M., Girard P.M., Dai Y., Stumm M., Kysela B., Hirsch B., Gennery A., Palmer S.E., Seidel J., Gatti R.A., Varon R., Oettinger M.A., Neitzel H., Jeggo P.A., Concannon P.: DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell*, 2001; 8: 1175-1185
- [43] Perlman S.L., Boder Deceased E., Sedgewick R.P., Gatti R.A.: Ataxia-telangiectasia. *Handb. Clin. Neurol.*, 2012; 103: 307-332
- [44] Plowman P.N., Bridges B.A., Arlett C.F., Hinney A., Kingston J.E.: An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. *Br. J. Radiol.*, 1990; 63: 624-628
- [45] Puebla-Osorio N., Zhu C.: DNA damage and repair during lymphoid development: antigen receptor diversity, genomic integrity and lymphomagenesis. *Immunol. Res.*, 2008; 41: 103-122
- [46] Punwani D., Kawahara M., Yu J., Sanford U., Roy S., Patel K., Carbonaro D.A., Karlen A.D., Khan S., Cornetta K., Rothe M., Schambach A., Kohn D.B., Malech H.L., McIvor R.S. i wsp.: Lentivirus mediated correction of Artemis-deficient severe combined immunodeficiency. *Hum. Gene Ther.*, 2017; 28: 112-124
- [47] Revy P., Buck D., le Deist F., de Villartay J.P.: The repair of DNA damages/modifications during the maturation of the immune system: lessons from human primary immunodeficiency disorders and animal models. *Adv. Immunol.*, 2005; 87: 237-295
- [48] Ronen A., Glickman B.W.: Human DNA repair genes. *Environ. Mol. Mutagen*, 2001; 37: 241-283
- [49] Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad S., Rotman G., Ziv Y., Vanagaite L., Tagle D.A., Smith S., Uziel T., Sfez S., Ashkenazi M., Pecker I., Frydman M., Harnik R., Patanjali S.R. i wsp.: A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 1995; 268: 1749-1753
- [50] Slack J., Albert M.H., Balashov D., Belohradsky B.H., Bertaina A., Blessing J., Booth C., Buechner J., Buckley R.H., Ouachée-Chardin M., Deripapa E., Drabko K., Eapen M., Feuchtinger T., Finocchi A. i wsp.: Outcome of hematopoietic cell transplantation for DNA double-strand break repair disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018; 141: 322-328
- [51] Slatter M.A., Gennery A.R.: Primary immunodeficiencies associated with DNA-repair disorders. *Expert Rev. Mol. Med.*, 2010; 12: e9
- [52] Starr S.P.: Immunology update: primary immunodeficiency diseases. *FP Essent.*, 2016; 450: 35-53
- [53] Stewart G.S., Maser R.S., Stankovic T., Bressan D.A., Kaplan M.I., Jaspers N.G., Raams A., Byrd P.J., Petrini J.H., Taylor A.M.: The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell*, 1999; 99: 577-587
- [54] Sun X., Becker-Catania S.G., Chun H.H., Hwang M.J., Huo Y., Wang Z., Mitui M., Sanal O., Chessa L., Crandall B., Gatti R.A.: Early diagnosis of ataxia-telangiectasia using radiosensitivity testing. *J. Pediatr.*, 2002; 140: 724-731
- [55] Unal S., Cersaletti K., Uckan-Cetinkaya D., Cetin M., Gumruk F.: A novel mutation in a family with DNA ligase IV deficiency syndrome. *Pediatr. Blood Cancer*, 2009; 53: 482-484
- [56] van der Burg M., Ijspeert H., Verkaik N.S., Turul T., Wiegant W.W., Morotomi-Yano K., Mari P.O., Tezcan I., Chen D.J., Zdzienicka M.Z., van Dongen J.J., van Gent D.C.: A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B-SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. *J. Clin. Invest.*, 2009; 119: 91-98
- [57] Varon R., Vissinga C., Platzer M., Cersaletti K.M., Chrzanowska K.H., Saar K., Beckmann G., Seemanová E., Cooper P.R., Nowak N.J., Stumm M., Weemaes C.M., Gatti R.A., Wilson R.K., Digweed M. i wsp.: Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell*, 1998; 93: 467-476
- [58] Volk T., Pannicke U., Reisli I., Bulashevskaya A., Ritter J., Björkman A., Schäffer A.A., Fliegau M., Sayar E.H., Salzer U., Fisch P., Pfeifer D., Di Virgilio M., Cao H., Yang F. i wsp.: DCLRE1C (ARTEMIS) mutations causing phenotypes ranging from atypical severe combined immunodeficiency to mere antibody deficiency. *Hum. Mol. Genet.*, 2015; 24: 7361-7372
- [59] Weemaes C.M., Hustinx T.W., Scheres J.M., van Munster P.J., Bakkeren J.A., Taalman R.D.: A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr. Scand.*, 1981; 70: 557-564
- [60] Welch E.M., Barton E.R., Zhuo J., Tomizawa Y., Friesen W.J., Trifillis P., Paushkin S., Patel M., Trotta C.R., Hwang S., Wilde R.G., Karp G., Takasugi J., Chen G., Jones S. i wsp.: PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, 2007; 447: 87-91
- [61] Wolska-Kuśnierz B., Gregorek H., Chrzanowska K., Piątoś B., Pietrucha B., Heropolitańska-Pliszka E., Pac M., Klaudel-Dreszler M., Kostyuchenko L., Pasic S., Marodi L., Belohradsky B.H., Čížnár P., Shcherbina A. i wsp.: Nijmegen breakage syndrome: clinical and immunological features, long-term outcome and treatment options - a retrospective analysis. *J. Clin. Immunol.*, 2015; 35: 538-549
- [62] Worth P.F., Srinivasan V., Smith A., Last J.I., Wootton L.L., Biggs P.M., Davies N.P., Carney E.F., Byrd P.J., Taylor A.M.: Very mild presentation in adult with classical cellular phenotype of ataxia telangiectasia. *Mov. Disord.*, 2013; 28: 524-528
- [63] Xu Y.: DNA damage: a trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006; 6: 261-270

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.