

Das Wiskott-Aldrich Syndrom.

**Eine Gegenüberstellung der klinischen Erstbeschreibung (1937) mit dem
aktuellen Wissen über die Rolle des Wiskott-Aldrich Proteins (WASP).**

**Molekulargenetische Untersuchung der erstbeschriebenen Familie in drei
Generationen.**

**Analyse zur Verteilung und Häufigkeit der Mutationen sowie zur Genotyp-
Phänotyp-Korrelation beim Wiskott-Aldrich Syndrom.**

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Dietrich Reinhardt

Das Wiskott-Aldrich Syndrom.

**Eine Gegenüberstellung der klinischen Erstbeschreibung (1937) mit dem
aktuellen Wissen über die Rolle des Wiskott-Aldrich Proteins (WASP).**

**Molekulargenetische Untersuchung der erstbeschriebenen Familie in drei
Generationen.**

**Analyse zur Verteilung und Häufigkeit der Mutationen sowie zur Genotyp-
Phänotyp-Korrelation beim Wiskott-Aldrich Syndrom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Vera Binder

aus

München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. H. Belohradsky

Mitberichterstatter: Prof. Dr. O. Steinlein
Priv. Doz. Dr. M.C.Walter
Priv. Doz. Dr. M. Noterdaeme

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2007

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung und Fragestellung 5
2	Das Wiskott-Aldrich-Syndrom: Klinik und Pathophysiologie 8
2.1	Erstbeschreibung und aktueller Kenntnisstand 8
2.2	Die Rolle des WAS-Proteins 13
2.2.1	Die Rolle des WAS-Proteins bei der Aktinpolymerisation 13
2.2.2	Die Rolle des WAS-Proteins in den einzelnen Zellen des hämatopoetischen Systems 17
2.2.2.1	CD 34+ hämatopoetische Vorläuferzellen 17
2.2.2.2	T-Lymphozyten Signaltransduktion / Formation der Immunsynapse 18
2.2.2.3	T-Lymphozyten-„trafficking“ 21
2.2.2.4	T-Zellentwicklung 22
2.2.2.5	Mikrovilliformation bei T- und B-Lymphozyten 22
2.2.2.6	B-Lymphozyten 23
2.2.2.7	Natürliche Killerzellen 25
2.2.2.8	Monozyten / Makrophagen / Dendritische Zellen / Osteoklasten 26
2.2.2.9	Neutrophile 29
2.2.2.10	Mastzellen 29
2.2.2.11	Thrombozyten 30
2.2.2.12	Zusammenfassung der Rolle des WAS-Proteins 32
2.3	X-chromosomale Thrombozytopenie 33
2.4	X-chromosomale Neutropenie 34
2.5	WAS-assoziierte Autoimmunsyndrome 36
2.6	WAS-assoziierte Malignome 37
2.7	Diagnostik 39
2.8	WAS beim weiblichen Geschlecht 41

2.9	Therapie	42
2.9.1	Symptomatische Therapie	42
2.9.2	Kurative Therapie	43
2.9.2.1	Knochenmarkstransplantation	43
2.9.2.2	Gentherapie	43
3	Genetische Untersuchungen zum Wiskott-Aldrich-Syndrom	46
3.1	Mutationen im WAS-Gen und Genotyp-Phänotyp Korrelation: Literaturübersicht	46
3.2	Die Mutation in der erstbeschriebenen Familie	55
3.3	Mutationen im WAS-Gen und Genotyp-Phänotyp Korrelation: Daten des genetischen Labors der LMU München	58
3.4	Vergleich der Daten aus dem genetischen Labor der LMU München mit der Literatur	63
3.5	Zusammenfassung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation	66
4	Zusammenfassung	68
5	Literaturverzeichnis	70
6	Danksagung	92
7	Lebenslauf	93

1 Einleitung und Fragestellung

Im Jahre 1936 beschrieb Dr. Alfred Wiskott (Hauersche Kinderklinik München) erstmals ein Krankheitsbild mit der Symptomentrias Blutungsneigung bei Thrombozytopenie, Infektanfälligkeit und konstitutionelles Ekzem. Betroffen waren drei Brüder einer Familie, die in den ersten Lebensmonaten an den genannten Symptomen verstarben. Alle sechs Schwestern der drei Jungen waren gesund (1).

Im Jahre 1954 untersuchte der amerikanische Wissenschaftler und Kinderarzt R. A. Aldrich MD die Familie eines Indexpatienten mit der gleichen Symptomentrias. Dabei zeigte sich, dass von 40 untersuchten Knaben 16 bereits im Säuglingsalter verstorben waren, 10 davon waren an Otitiden, Hautekzemen und blutiger Diarrhoe erkrankt. Sämtliche weibliche Familienmitglieder schienen gesund. Aldrich schloß daraus, dass es sich um ein Syndrom mit X-chromosomal rezessivem Erbgang handelt (2).

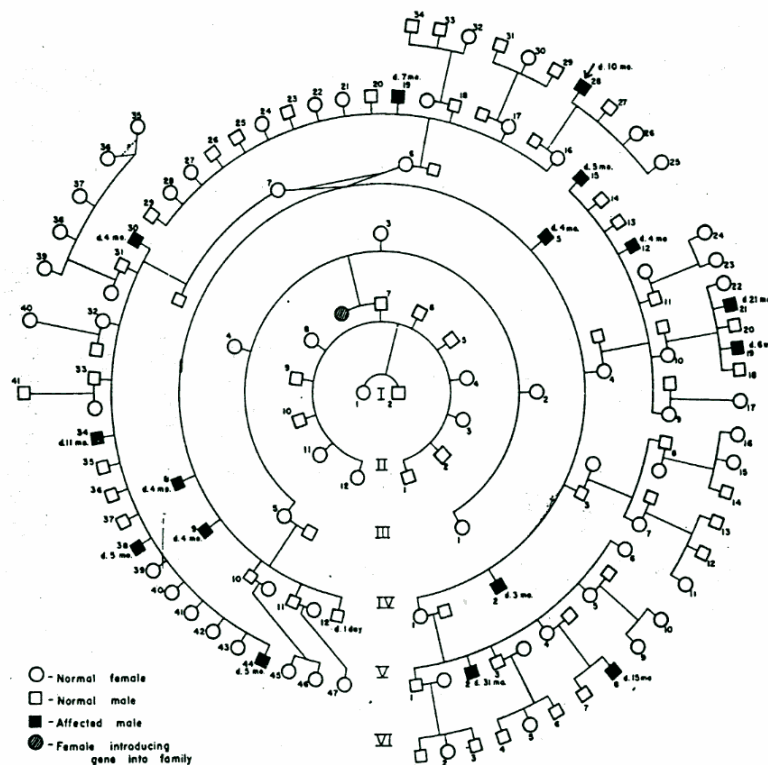


Abbildung 1: Stammbaum der Familie beschrieben von Aldrich M. D. im Jahre 1954 (2)

In einem persönlichen Gespräch teilte Wiskott einem Klinikmitarbeiter mit, dass er Sorge hatte, das Krankheitsbild ausdrücklich als Erbleiden zu beschreiben, um im damaligen

nationalsozialistischen Deutschland die von ihm betreute Familie nicht in Gefahr zu bringen. (Euthanasiegesetz, Zwangssterilisation)(3)

Das nach den beiden Erstbeschreibern benannte Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) ist ein seltenes X-chromosomal vererbtes Krankheitsbild des hämatopoetischen Systems. Es kommt mit einer Häufigkeit von 2-4/1Mio. lebend geborener Jungen vor (4). Das Vollbild der Erkrankung ist charakterisiert durch einen kombinierten Immundefekt, Thrombozytopenie mit kleinen Thrombozyten, ekzematösen Hautveränderungen und dem gehäuften Auftreten von Autoimmunerkrankungen und malignen Erkrankungen v.a. des lymphatischen Systems. Die phänotypische Ausprägung ist allerdings sehr breit gefächert. Sie reicht vom beschriebenen Vollbild des WAS bis hin zur X-chromosomalen Thrombozytopenie (XLT=X-linked thrombocytopenia), die sich durch eine milde Thrombozytopenie bei kleinem Thrombozytenvolumen auszeichnet (5). Auch die X-chromosomale Neutropenie (XLN=X-linked neutropenia) wird als eine eigene phänotypische Ausprägung des WAS diskutiert (6).

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die auf rein klinischer Beobachtung beruhende Erstbeschreibung des WAS mit der genannten Symptomentrias dem aktuellem Wissensstand in der Literatur gegenübergestellt. Hierbei wird besonders auf die aktuellen Kenntnisse zur Rolle des Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteins (WASP) in den einzelnen Zelltypen des hämatopoetischen Systems und damit auf die Pathophysiologie der Erkrankung, die dem Erstbeschreiber noch nicht bekannt war, eingegangen.

Zudem werden dem Erstsbeschreiber ebenfalls noch nicht bekannte, unterschiedliche phänotypische Ausprägungen des WAS beschrieben, wie die X-chromosomale Thrombozytopenie, die X-chromosomale Neutropenie, die Art und Häufigkeit von Autoimmunerkrankungen sowie maligne Erkrankungen bei WAS-Patienten.

Am Ende des ersten Teils folgt eine Übersicht über aktuelle Diagnostik- und Therapieoptionen.

Die mit der Klonierung des Gens von Derry et al. 1994 (7) eröffnete Möglichkeit zur molekulargenetischen Diagnostik wird überleiten auf den zweiten Teil der Arbeit. Hier wird eine Übersicht gegeben über die aktuell beschriebenen Mutationen und deren Position im WAS-Gen und die in der Literatur beschriebenen Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.

Diese werden den Untersuchungsergebnissen des Instituts für Medizinische Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität (Labor Prof. Dr. A. Meindl) gegenübergestellt. Dort wurden Mutationsanalysen in Familien, bei denen ein klinischer Verdacht auf das Vorliegen eines WAS bestand, durchgeführt.

Die Tatsache, dass Prof. Dr. Alfred Wiskott am Dr. von Haunerschen Kinderspital, der Kinderklinik der Ludwig-Maximilians Universität in München, tätig war und seine ehemaligen Aufzeichnungen noch erhalten sind, gab uns die Möglichkeit Kontakt zu den Nachfahren der von ihm beschriebenen Familie aufzunehmen. Es wurde ein Stammbaum angefertigt und einzelne Familienmitglieder genetisch untersucht. Es sollte im Nachhinein gezeigt werden, ob die originäre Familie wirklich vom molekulargenetisch definierten WAS betroffen war und welche Mutation gegebenenfalls vorgelegen hat.

2 Das Wiskott-Aldrich-Syndrom: Klinik und Pathophysiologie

2.1 Erstbeschreibung und aktueller Kenntnisstand

Im Jahre 1936 beschrieb Dr. Alfred Wiskott (Kinderklinik München) erstmals ein Krankheitsbild mit der Symptomentrias Blutungsneigung, Infektanfälligkeit und konstitutionelles Ekzem. Nach Durchsicht der originären Aufzeichnungen werden seine damals gemachten klinischen Beobachtungen den aktuellen Kenntnissen zum klinischen Bild gegenübergestellt.

	<u>Wiskott(1):</u>	<u>Aktuell(4, 8-12)</u>
Thrombozyten	<p>z.T. <u>Thrombozytopenie</u> (35.000-250.000/μl)</p> <p><u>Blutungsneigung</u> (v.a. Darmtrakt, vereinzelt Hautblutungen)</p> <p>z.T. Blutung bei normalen bis leicht erniedrigten Thrombozytenzahlen</p> <p>Normale - kaum verlängerte Blutungszeit,</p> <p>verfrüht aufgegebene Retraktion bei 80.000/μl (normal bei 45.000/μl),</p> <p>fehlende Verklumpung der Plättchen im Blutausschlag nach Fonio: gewisse <u>Funktionsuntüchtigkeit der Plättchen</u>,</p> <p>Plättchen granulafrei -granulaarm</p>	<p>Ca. <u>90%</u> der Patienten haben eine <u>Thrombozytopenie</u> bei Diagnosestellung <u>Thrombozytenzahlen schwanken</u> (<10.000 bis >100.000/), oft Abfall bei Infektionen. (klinisch oft Blutungen: Petechien oder Purpura (78%), Haematemesis und Melaena (28%), Epistaxis (16%), orale Blutungen (6%), intrakranielle Blutungen (2%) andere (5%))</p> <p><u>Thrombozytenvolumen vermindert</u> mit 3,8-5,0 fl (Norm 7,1-10,5 fl),</p> <p>Thrombozytengröße und -zahl können sich nach Splenektomie normalisieren.</p> <p><u>Megakaryozyten</u>: normale Differenzierung, nur kürzere und weniger Filopodienbildung, allerdings normale Migration. Normale Prothrombozytenbildung, normale Anzahl der retikulierten jungen Thrombozyten,</p>

		<p>Die Ursache der Thrombozytopenie und des verminderten Plättchenvolumens ist noch weitgehend unklar, jedoch eher kein Problem der Produktion.</p> <p>Evtl. Veränderungen des Zytoskeletts während der Zirkulation im Blut. Dann erhöhter Abbau in der Milz wegen struktureller Fehlbildung. Die Veränderungen der Zytoarchitektur können zu Störungen der Thrombozytenaggregation führen.</p>
Erythrozyten	Hypochrome Anämie, mäßige Regeneration (Blutungsanämie)	Eisenmangelanämie häufig bei WAS, wegen dem ständigen Verlust an Erythrozyten (hypochrom, mikrozytär). Auftreten von autoimmunhämolytischen Anämien bei WAS (häufigste Form der Autoimmunsynndrome bei WAS (14%))
Leukozyten	Lymphopenie, mäßige Reaktion des Granulozytensystems, z.T. Eosinophilie	<p><u>Hämatopoetische Stammzellen:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> -Verminderte „Homing“-Fähigkeit <p><u>T-Lymphozyten:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> -Veränderte Morphologie -Inadäquate CD3 vermittelte Proliferation -Inadäquate Thymozytenreifung -Inadäquate Zytoskelettveränderung nach Rezeptoraktivierung <p><u>B-Lymphozyten:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> -veränderte Morphologie mit verkürzten Mikrovilli -Migrationsdefekte

		<p>-inadäquate IL-4 und CD-40 vermittelte Polarisation und Verteilung</p> <p>-Inadäquate Antikörperproduktion, v.a. als Antwort auf Polysaccharidantigene</p> <p><u>Monozyten/Makrophagen:</u></p> <p>-Veränderte Morphologie</p> <p>-Fehlen der Podosomen</p> <p>-Chemotaktische/Migrationsdefekte</p> <p>-Adhäsionsdefekte</p> <p>-Phagozytosedefekte</p> <p><u>Dendritische Zellen:</u></p> <p>-Veränderte Morphologie</p> <p>-Chemotaktische/Migrationsdefekte</p> <p>-Adhäsionsdefekte</p> <p><u>Neutrophile:</u></p> <p>-Chemotaktische Defekte</p> <p>-Phagozytosedefekte</p>
Immun-globuline	Noch nicht entdeckt	<p>Bei der Mehrzahl der Patienten:</p> <p>IgG normal</p> <p>IgM erniedrigt</p> <p>IgA erhöht</p> <p>IgE erhöht</p> <p>Erniedrigte Isoagglutinine</p>
Infektionen	Anergie und Resistenzlosigkeit gegenüber Infekten (v.a. Otitiden, Pyodermien, Sepsis)	<p>Gehäuft auftretende bakterielle und virale (v.a. Viren aus der Herpesgruppe)</p> <p>Infektionen von frühester Kindheit an (bei Vollbild des WAS), nehmen an Intensität mit dem Alter zu. Bei Splenektomie zur Verminderung der Blutungsneigung steigt das Risiko für schwere Infektionen, häufig</p>

		opportunistische Infektionen und pathologische Antikörperreaktion auf Polysaccharidantigene, nur 10% der Infektionen sind Pilzinfektionen (V.a. <i>Candida albicans</i>)
Ekzem	Ekzem mit neurodermitischem Einschlag	Ekzeme in unterschiedlich schwerer Ausprägung, oft mit Superinfektion, wie klassische atopische Dermatitis. Auftreten von Eosinophilie, erhöhten IgE-Spiegeln und multiplen Nahrungsmittelallergien, abnormale IgE-induzierte Zytoskelettveränderungen, Degranulation und Zytokinproduktion von WASP-defizienten Mastzellen.
Retikulo- endotheliales System (RES), lymphat. Organe	Milz zeitweilig tastbar, geringfügige bis keine Lymphknotenreaktion, Hypoplasie des RES in Lymphknoten, Milz und Darm	Unterschiedlich stark ausgeprägte Verringerung der T-Zellzone in Lymphknoten und Milz, verringerte Follikelzahl und pathologische Follikelarchitektur: keine Marginalzone, verringerte oder ausgebrannte Keimzentren (Thymus: von normalem Thymus bis zu kompletter Thymusatrophie)
Knochenmark	Megakaryozyten granulaarm-frei, weiße und rote Vorstufen normal	Idem (Ausnahme: bei XLN beobachteter Reifungsstop auf Ebene der Promyelozyten/Myelozyten)
Autoimmun- erkrankungen	Nicht beobachtet.	Bei ca 40-70% der WAS-Patienten, v.a. bei ausgeprägten Phänotypen <u>v.a. hämolytische Anämien</u>

		<p><u>auch:</u> Arthritis, Neutropenie, Vaskulitiden der Haut,</p> <p><u>seltener:</u> inflammatorische Darmerkrankungen, Vaskulitiden der Gehirngefäße, Nierenerkrankungen, Dermatomyositiden, Uveitiden</p>
<p>Maligne Erkrankungen</p>	Nicht beobachtet.	<p>Auftreten bei jungen Erwachsenen (zu beobachten aufgrund der Verlängerung der Überlebenszeit), v.a. ausgehend von lymphatischem Gewebe, oft extranodulär gelegen, schlechte Prognose</p>

Tabelle 1: Gegenüberstellung der von Wiskott gemachten originären klinischen Beobachtungen und dem aktuellen Wissensstand

2.2 Die Rolle des WAS-Proteins

2.2.1 Die Rolle des WAS-Proteins bei der Aktinpolymerisation

WASP ist ein 53 kD großes zytoplasmatisches Protein, das aus 502 Aminosäuren besteht.

Es gehört zur Familie der humanen WAS-Proteine von der bisher fünf Mitglieder bekannt sind: WASP, N-WASP (neuronalen WASP), sowie WAVE-Proteine (WASP-Familie Verprolin-homologous protein, auch genannt Scar-1, -2, -3). WASP wird nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert, die übrigen ubiquitär.

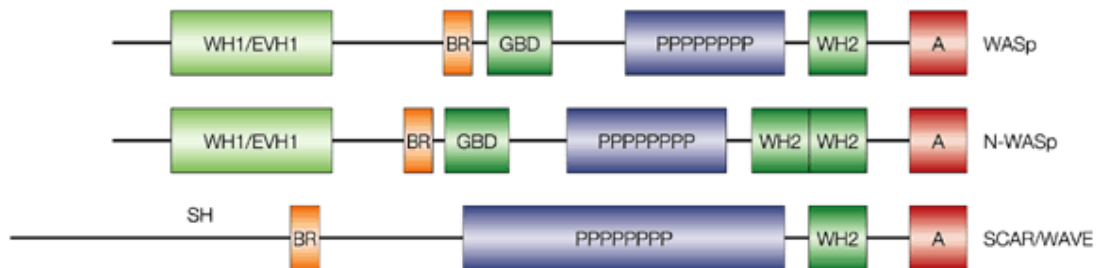


Abbildung 2: Aufbau der unterschiedlichen Mitglieder der Familie der WAS-Proteine (11)

(SH=Scar homology domain, A=acidic domain, BR=basic region, GBD=GTPase binding domain, N-WASp=neuronal WASp, P=proline-rich domain, WAVE=WASp-family verprolin-homologous protein, WH1 /2=WASp-homology domain 1 /2, EVH1=enabled vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-homology 1 domain)

Die Funktion des Proteins ist vielfältig und noch nicht vollständig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass WASP in Verbindung mit anderen Proteinen an der Veränderung des Zytoskeletts der hämatopoetischen Zellen mittels Aktivierung der Aktinpolymerisation beteiligt ist. Es ist damit wichtig für Thrombozytenproduktion und -abbau, und spielt eine Rolle bei der zytoplasmatischen Signaltransduktion, bei Zell- zu Zellinteraktionen, bei der Bildung von Immunsynapsen, bei der Zellmotilität, Phagozytose und Neutrophilenproduktion und -funktion (8, 12, 13).

Leukozyten (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) im Blutstrom sind fähig, auf inflammatorische Stimuli hin mit Extravasation und Einwanderung in umliegendes Gewebe zu antworten. Diese Prozesse erfordern einen koordinierten Ablauf von Adhäsion an aktiviertes Endothel, Polarisation des Zellkörpers und transendothelialer Migration. Adhäsion, Polarisation, Migration aber auch Phagozytose, Bildung von Immunsynapsen und Zell- zu Zellinteraktionen

sind Vorgänge, die eine Veränderung der Zellform erfordern, denen also ein dynamischer, streng regulierter Umbau des Zytoskeletts, insbesondere der Aktinfilamente, zugrunde liegt.

Der Großteil der Aktin-Moleküle liegt in monomerer Form (G-Aktin) und nur ein kleiner Teil in polymerisierter Form in Filamenten bzw. Filament-Netzwerken (F-Aktin) vor. Die Neubildung zu Aktin-Filamenten aus Aktin-Monomeren ist energetisch ungünstig (14).

Der Arp2/3-Komplex ist durch die strukturelle Verwandtschaft der Arp2 und Arp3 Untereinheiten zu Aktin (Arp2/3-Komplex aus 7 UE bestehend mit den beiden Aktin ähnlichen Komponenten actin related protein 2 und 3) in der Lage als Filamentkeim zu dienen und das energetisch ungünstige Anfangsstadium zu überwinden (15, 16). Der Komplex ist jedoch nicht aktiv und muß zur Aktin-Polymerisation stimuliert werden.

Als Stimulator wirken u.a. Proteine der WASP Familie. Sie binden monomeres Aktin und binden und aktivieren somit Arp2/3-Komplex über ihre C-terminale VCA-Domäne (verprolin homology, cofilin homology, acidic region) (17-21). Sie bilden damit die zentrale Einheit der zellulären Aktin-Polymerisation.

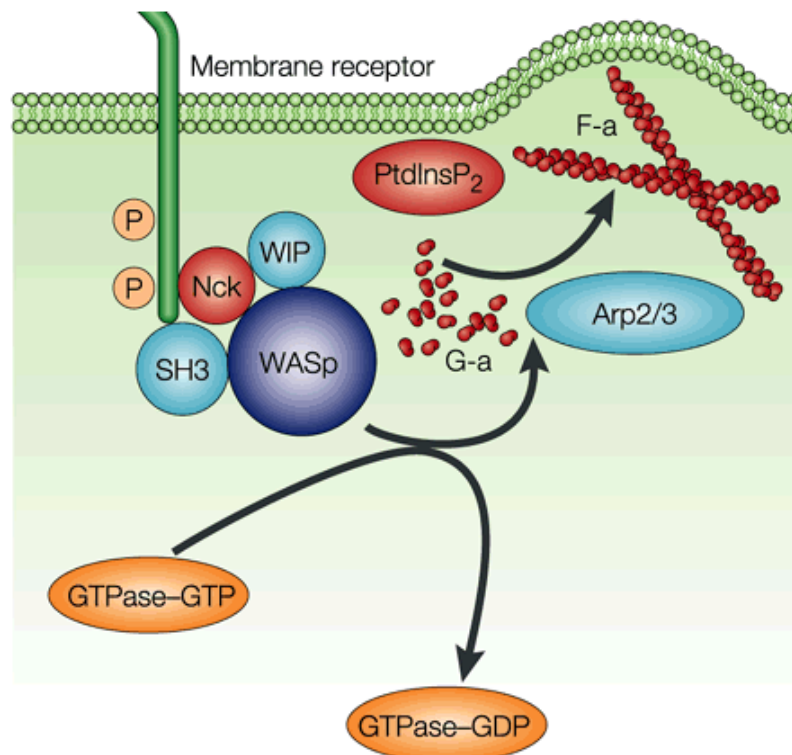


Abbildung 3: Der WASP-Signalkomplex, der zur Aktinpolymerisation führt (11).

(SH3=SRC-homology 3-domain-containing proteins, WIP=WASp-interacting protein, PtdInsP₂= phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonate, Nck=ein Adaptorprotein, F-a=F-Aktin, G-a=G-Aktin)

Proteine der WASP-Familie sind jedoch durch eine intramolekulare Interaktion autoinhibiert. In seiner inaktivierten Form bildet WASP eine autoinhibitorische Schleife indem die C-terminale VCA-Domäne an die GBD-Region (small G protein binding domain) gebunden ist und kann somit den Arp2/3-Komplex nicht binden und aktivieren. Diese Bindung wird noch verstärkt durch die Interaktion der „acidic region“ der VCA-Domäne mit der BR (basic region), welche N-terminal von GBD liegt (22, 23). Extrazelluläre Stimuli, z.B. chemotaktische Faktoren, binden an Rezeptoren der Plasmamembran und führen über Signalwege, die auch Rho-GTPasen (z.B. Cdc42) einschließen, zur Aktivierung von WASP-Proteinen (12, 24, 25).

Rho-GTPasen (z.B. Cdc42) sind zentrale Regulatoren eines Signalnetzwerks, das extrazelluläre Stimuli mit dem Auf- und Abbau von Aktinfilamenten verbindet (26, 27).

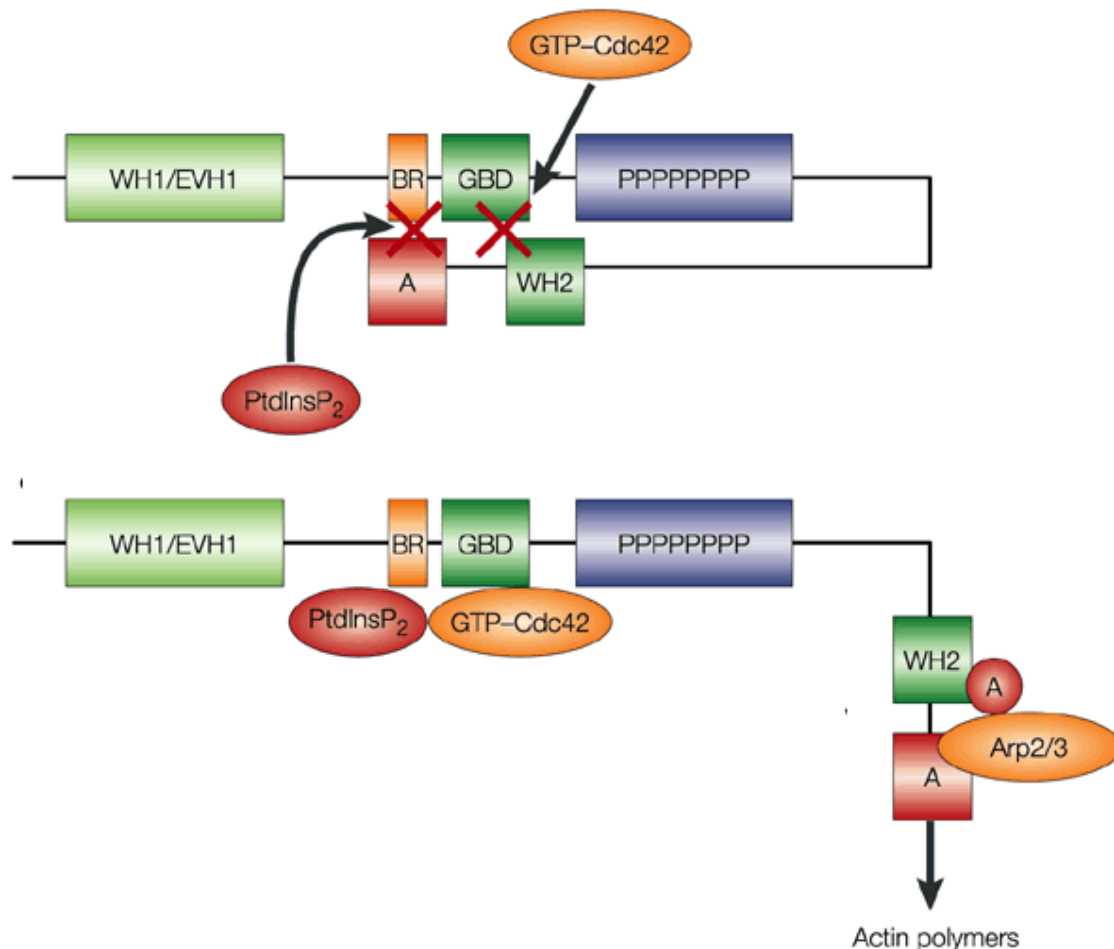


Abbildung 4: Die Autoinhibition des WAS-Proteins und deren Auflösung durch GTP-Cdc42 und z.B. synergistisch durch PtdInsP₂ (11).

(Abkürzungen siehe Legende zu Abbildung 1 und 2 und Text)

Die GTP gebundene aktivierte Form von Cdc42 kann die autoinhibitorische Schleife unterbrechen und legt damit die PRR-Domäne (proline rich region) und das C-terminale Ende frei, um monomeres Aktin und den Arp2/3-Komplex zu binden. Der Arp2/3-Komplex initiiert dann die Aktinpolymerisation. WASP bindende Moleküle wie PIP2 (phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate) und Nck (=Adapterprotein) wirken bei der Aktivierung von WASP synergistisch (12, 13, 19, 28, 29).

Die Prolinreiche Region der WAS- und WAVE- Proteine ist zuständig für die optimale Aktinpolymerization durch WASP (30) und für die effiziente Immunsynapsenbildung zwischen T-Lymphozyten und Antigenpräsentierenden Zellen (APC) (31, 32). Die prolinreiche Region bietet Bindungsmöglichkeiten für viele Proteine wie z.B. das „vasodilator stimulated phosphoprotein“ (VASP) was zur Bildung von Filopodien führt (33). Aber auch die SH3 Domäne vieler Tyrosinkinasen (z.B. Btk =Bruton's tyrosine kinase), Adapterproteine wie Nck, Fyn, CrkL, PSTPIP (proline, serine, threonine phosphatase interacting protein) und auch einige zytoplasmatische Proteine wie Syndapin und Intersectin (vermutlich wird WASP durch diese zu Orten mit anstehendem Membranremodeling geführt, Adapterprotein Intersectin 2 für die Endozytose von T-Zell Antigen-Rezeptor) binden an die Prolinreiche Region (12, 23, 28, 34, 35).

Die Tyrosinphosphorylierung ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus für die WASP-Aktivität. Eine Phosphorylierung erfolgt nach Kollagenstimulation von Thrombozyten (36, 37), IgE Rezeptorstimulation von Mastzellen (38), und T-Zellrezeptorstimulation (39). Eine wichtige Stelle für Phosphorylierung befindet sich bei WASP am Tyrosin-Rest 291 (Y291). Hck, eine spezifisch in hämatopoetischen Zellen vorkommende Tyrosinkinase vom Src-Typ bindet und phosphoryliert an dieser Stelle ebenso wie Btk. (40, 41). Die Phosphorylierung an dieser Stelle führt zur Aufhebung der Autoinhibition und somit zur Aktivierung von WASP (42). Andererseits führt die Dephosphorylierung an dieser Stelle durch die Phosphatase PTP-PEST (protein tyrosin phosphatase) zu einer Verstärkung der Autoinhibition (43). Die Prolinreiche Region des WASP kann interagieren mit der SH3 Domäne des linker-Proteins PSTPIP, welches wiederum PTP-PEST binden kann und so eine Verbindung zwischen WASP und PTP-PEST schafft, welches auf diese Weise Einfluß auf die WASP-Aktivität nehmen kann (43). Es konnte auch gezeigt werden, daß die Interaktion zwischen WASP und PSTPIP1 zu einem Komplex

führt, der rekrutiert wird zur Immunologischen Synapse, wo er dann die Aktinpolymerisation aktiviert (32, 39).

Ähnlich führt die Phosphorylierung von Serin 483 und 484 in der Cofilin-Homologen (CH) Domäne (=Teil der VCA-Domäne) des WASP durch Casein Kinase 2 (CK2) zu einer Erhöhung der Affinität des C-terminalen Endes zum Arp2/3 Komplex und ermöglicht so eine effiziente Aktinpolymerisation (in vitro) (44).

WASP hat eine PH/WH1/EVH1 (pleckstrin homology/WASP homology/enabled VASP homology 1) Domäne am N-terminalen Ende. Diese Domäne bindet WIP (WASP-interacting protein), welches zur Stabilisierung der Aktinfilamente und zur Regulation der Aktinpolymerisation, vor allem aber der richtigen Lokalisation der WASP-Aktivität, beiträgt (45-47).

Es erscheint essentiell bei der T-Zellaktivierung über den T-Zellrezeptor (TCR)/CD3-Komplex und der anschließenden Proliferation mit Bildung von Protrusionen und Pseudopodien und IL-2 Sekretion (48, 49).

WIP bindet auch an das Adapterprotein CrkL und bildet einen CrkL-WIP-WASP-Komplex. Stimulierung des T-Zellrezeptors und anschließende Phosphorylierung von ZAP-70 (zeta-associated protein of 70 kDa) führt zur Bindung der SH2 Domäne von CrkL an ZAP-70 und dies initiiert wiederum den Transport des CrkL-WIP-WASP Komplexes zu den „lipid rafts“ (nach Stimulation erfolgt ein Zusammenschluß des TCR-Rezeptors mit Signalmolekülen in Membrankompartimenten, die „lipid rafts“ genannt werden) um die Immunsynapse zu formieren. Nach der Serinphosphorylierung von WIP durch die Proteinkinase C (PKC θ) dissoziiert WASP von WIP und kann aktiviert werden durch membrangebundenes Cdc42 um die Arp2/3 Komplex vermittelte Aktinpolymerisation zu initiieren (48).

2.2.2 Die Rolle des WAS-Proteins in den einzelnen Zellen des hämatopoetischen Systems

2.2.2.1 CD 34+ hämatopoetische Vorläuferzellen

WASP wird bereits exprimiert in den frühesten CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen (bevor sich die Leber als hämatopoetisches Organ etabliert). Es erscheint wichtig zu sein für die Migration von Vorläuferzellen in die fetale Leber und von dort in das Knochenmark. WASP-negative Stammzellen könnten daher weniger in der Lage sein, die geeigneten Nischen zu

finden, in denen die Leber-, und später die Knochenmarkshämatopoese, etabliert werden (11, 50). Neuere Studien bei WASP- negativen Mäusen haben diese Hypothese unterstützt.

WASP- negative hämatopoetische Zellen zeigten deutliche Migrationsdefekte als Antwort auf SDF-1 (stromal derived factor-1) in vitro und verändertes „homing“ zu Orten der Hämatopoese in vivo (11, 51).

Die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) zeigten einen Defekt in der Chemotaxis, sowie eine Verminderung zielgerichteter Bewegung durch einen Adhäsionsdefekt an Kollagen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die fetalen HSC in der Leber von Überträgerinnen eine random X-Inaktivierung aufwiesen, während dann im Knochenmark eine non-random X-Inaktivierung beobachtet werden konnte. Dies könnte hinweisend sein auf einen Migrationsdefekt der HSC mit einem mutierten WASP-Allel, der den Transit dieser Zellen von der fetalen Leber zum Knochenmark verhindert bzw. behindert (52, 53). Zur Zeit ist noch unklar, inwieweit dies zur Pathogenese der Erkrankung beiträgt, da die WAS Patienten keinen globalen Defekt, also keinen kompletten Stop der Migration in der fetalen Entwicklung der Hämatopoese aufweisen (12).

2.2.2.2 T-Lymphozyten Signaltransduktion / Formation der Immunsynapse

T-Zelldysfunktion ist eine Hauptursache des WAS-assoziierten Immundefekts.

Die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts ist wichtig bei der Bildung von Immunsynapsen (IS) zwischen T-Lymphozyten und den antigenpräsentierenden Zellen (APC), ebenso wie zwischen Zytotoxischen T-Zellen und deren Zielzellen. In gesunden Zellen führt die TCR-Bindung zur Formation der Immunsynapse. Diese beinhaltet auf der T-Zellseite einen Zusammenschluß des Rezeptors mit Signalmolekülen in Membrankompartimenten, genannt „lipid rafts“. In diesen Kompartimenten befinden sich zentral der TCR-Komplex sowie CD2 und CD28 Moleküle, am Rand die Adhäsionsmoleküle (54-56).

Die T-Zellerkennung von antigenpräsentierenden Zellen setzt sich also zusammen aus zytoskelettaler Polarisation und der Bereitstellung von membrangebundenen und zytoplasmatischen Molekülen zur Zell-Zellkontaktzone, der Immunsynapse (57, 58).

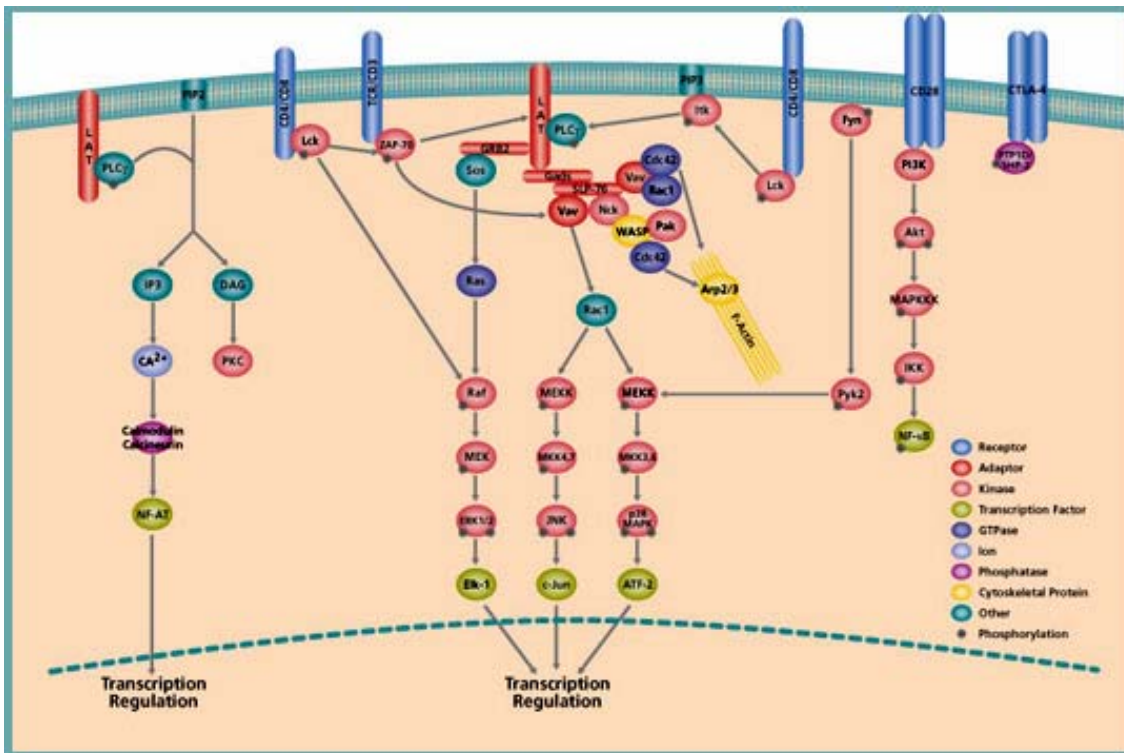


Abbildung 5: T-Zellrezeptorsignalwege (Abkürzungen siehe Legende auf Abbildung und Text)

Die Formation einer Immunsynapse benötigt WASP zur Aktivierung der Aktinpolymerisation. Die Rekrutierung von WASP zur Immunsynapse nach TCR-Aktivierung kann auf verschiedenen Wegen erfolgen (12).

ZAP-70 z.B. kann WASP auf zwei verschiedenen Wegen nach CD3 Stimulation rekrutieren. Zum einen über die PH/WH-1/EVH-1 Domäne durch die Bildung eines Zap70-CrkL-WIP-WASP Komplex (s.o.) (48), zum Anderen über die Tyrosinphosphorylisierung des Adapterproteins SLP-76 durch ZAP-70. Dies führt zu einer Bindung von SLP-76 an die SH2-Domänen von Nck und Vav-1 (Guanin nucleotide exchange factor für die Rho-Familien GTPasen). Nck bindet hierauf WASP an der PRR und rekrutiert es zu der immunologischen Synapse. Vav-1 aktiviert Cdc42, welches wiederum WASP aktiviert (59).

Eine Cdc42 unabhängige Möglichkeit der WASP-Aktivierung kann durch Fyn erfolgen, das WASP bei Y291 nach TCR-Stimulation phosphoryliert. Die WASP-Aktivität kann herunterreguliert werden durch PTP-PEST-vermittelte Dephosphorylierung. (32, 39) (s.o.).

Die Stimulation von CD2 induziert die Formation eines Komplexes aus CD2, CD2AP, PSTPIP1 und WASP. WASP bindet direkt an PSTPIP1 (s.o.), welches wiederum CD2 und CD2AP bindet. Dieser Komplex wird zur Immunsynapse rekrutiert und induziert die Aktinpolymerisation (32).

Beim Fehlen von WASP ist die Formation der Immunsynapse fehlerhaft. WASP-defiziente T-Lymphozyten sind nicht fähig an der T-Zell-APC Kontaktstelle nach einer TCR Bindung über CD3/CD28 oder CD2 Aktin zu polymerisieren. WASP-Defizienz führt zu einer niedrigeren Anzahl an „lipid rafts“ und einer gestörten Hochregulierung dieser nach TCR-Aktivierung über CD3 (60). Zusätzlich zu diesen strukturellen Störungen, oder eher als Ergebnis dieser, ist die T-Zellsignaltransduktion gestört, was zu fehlerhafter Rekrutierung von bestimmten Molekülen (z.B. PKC θ) zur Immunsynapse, zu defekten Kalziumeinstrom nach der T-Zellaktivierung und schließlich zu fehlerhaften Proliferationsantworten führt.

WASP defiziente T-Zellen zeigen einen Defekt in der IL-2 Produktion als Antwort auf TCR-Aktivierung. Sie zeigten eine verminderte Translokation von NF-AT (eine Familie von Transkriptionfaktoren, deren Aktivität für die Expression von Lymphokin-Genen in T-Lymphozyten wichtig ist) zum Zellkern um dort die IL-2 Genexpression zu initiieren. WASP defiziente T-Zellen zeigen normale MAP-Kinasesignale (Mitogen Activated Protein Kinase) aber partielle Defekte im Kalzium –Signalweg (s.o.) und somit der Aktivierung des NF-AT. Vermutlich ist der Defekt der NF-AT-Translokation die Basis für die defekte IL-2 Produktion bei WAS (39, 61, 62).

Diese Defekte könnten eine entscheidende Rolle spielen bei dem Nichtvermögen von WAS-Patienten eine effiziente antigenspezifische T-zellabhängige Immunantwort zu entwickeln (12, 13).

In einer kürzlich erschienenen Studie wurde zwar bestätigt, dass WASP-defiziente T-Zellen Defekte in der IL-2 Produktion zeigen, diese jedoch nicht wie bisher angenommen in dem defekten „Aktinremodeling“ und einer defekten Immunsynapsenbildung (s.o.) begründet liegt. In dieser Studie wurde gezeigt, dass WASP defiziente T-Zellen nach TCR-Stimulation normal antworten indem sie Aktin polymerisieren und PKC θ normal organisieren und eine Immunsynapse formen. Bei niedrigen Peptidkonzentrationen zeigten die WASP defizienten T-Zellen allerdings eine weniger effiziente Polarisation von PKC θ . Dies könnte bedeuten, dass obwohl WASP die Bildung der Immunsynapse unterstützt bei niedrigen Peptidkonzentrationen, WASP nicht zwingend notwendig erscheint für diesen Vorgang. Defekte in der IL-2 Produktion wurden auch beobachtet wenn die Bildung der Immunsynapse normal verlief. Diese Ergebnisse könnten hinweisend darauf sein, dass die Rolle des WASP bei der Regulation der IL-2 Produktion unabhängig ist von seiner Rolle in der Immunsynapsenformation (62).

Eine neue Studie konnte zeigen, dass die Rolle des WAS-Proteins nicht nur in der Verbindung der TCR-Aktivierung mit der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts liegt.

Die Bildung der Immunsynapse z.B. bei CD4⁺ T-Zellen setzt sich zusammen aus der Aktivierung der Zelle (activation synapse) und des Effektorstadiums in dem Zytokine (evtl. aufgeteilt in verschiedene Vesikel) zur Zielzelle geschickt werden (effector synapse) (s.o.). WASP defiziente CD4⁺ Zellen zeigen einen Block in dieser zielgerichteten Zytokinsekretion. Obwohl WASP eine Rolle spielt in TCR vermittelter Transkription von einigen Zytokinen (z. B. Il-2) (s.o.), ist es nicht essentiell für die Aktivierung aller Zytokingene, z.B. für IFN- γ Transkription. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ohne WASP diese Zytokine nicht sezerniert werden können. Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch, dass die Sekretion von Chemokinen und „trafficking“ von Membranproteinen unabhängig von WASP funktioniert (63).

2.2.2.3 T-Lymphozyten-„trafficking“

T-Lymphozyten können in der Mikrozirkulation die Blutbahn verlassen (Diapedese). Dabei nehmen unerfahrene ('naive') T-Lymphozyten andere Wege als erfahrene. Naive T-Lymphozyten haben noch keinen Kontakt mit Antigenen gehabt, d.h. es ist zu keiner Bindung mit ihren spezifischen TC-Rezeptoren gekommen. Erfahrene (aktivierte) T-Lymphozyten verlassen die Blutbahn hingegen gezielt dort, wo sie gebraucht werden. Unter dem Begriff „trafficking“ versteht man in diesem Fall die gezielte Umleitung von T-Lymphozyten, sodass sie die Blutbahn an Orten der Inflammation verlassen.

WASP erscheint auch beteiligt am „trafficking“ der T-Lymphozyten, da SDF-1 (stromal-derived factor), ein T-Zell-Migrationsstimulator, eine Tyrosinphosphorylierung von WASP und einigen anderen Adapterproteinen (z.B. Nck, Cas) induziert, welche an der Zellmigration beteiligt sind (64). In einer Studie wurde gezeigt, dass SDF-1 Cdc42 aktiviert, welches dann wiederum WASP aktiviert (65). WASP-Defizienz könnte daher auch zu einer veränderten T-Zellchemotaxis führen als Reaktion auf SDF-1 Stimulation.

Störungen im T-Lymphozyten-„trafficking“ könnten damit großen Einfluß haben auf die Entwicklung, das Überleben und die Effektoraktivität von T-Lymphozyten (11, 66).

2.2.2.4 T-Zellentwicklung

WASP-Defizienz führt zu einer signifikanten Verminderung von peripheren T-Zellen, die von Kindheit an manifest wird (67), vor allem von naiven CD4⁺ und CD8⁺ Zellen, evtl. bedingt durch abnorme Thymopoese. Allerdings ist die Rolle des WASP in der Thymopoese noch weitgehend unklar. Verschiedene Grade der Thymushypoplasie wurden bei post-mortem Studien beschrieben (68, 69). In verschiedenen Mausmodellen wurde der Effekt von WASP-Defizienz auf die Lymphozytenreifung erforscht. Während eine Studie normale Thymusreifung der Lymphozyten zeigt (70), zeigt eine andere einen Block in der Entwicklung von doppelt negativen (CD4⁻CD8⁻) zu doppelt positiven (CD4⁺CD8⁺) Kompartments und Fehler in der Thymozytenproliferation und dem Kalziumeinstrom nach TCR-Bindung (61). Unterstützend für eine Rolle des WASP in der Thymopoese, zeigen Mäuse mit VCA-Domänen-defizientem WASP ebenfalls eine defekte Thymopoese auf der Ebene zwischen dem doppelt negativen und doppelt positiven Kompartments. Im Gegensatz dazu führt ein PH/WH1/EVH1-Domäne defizientes WASP nicht zu einer Beeinträchtigung der Thymopoese (71). In einigen in vitro Studien zeigten WASP-defiziente Lymphozyten eine erhöhte Apoptoserate (72, 73), in anderen konnte eine normale Überlebensdauer für naive CD4⁺ Zellen gezeigt werden (67).

2.2.2.5 Mikrovilliformation bei T- und B-Lymphozyten

Mikrovilli sind fingerförmige Protrusionen auf der Zelloberfläche von T- und B-Lymphozyten. Es sind dynamische Strukturen bestehend aus parallel gelegenen Bündeln aus Aktinfilamenten. Ihre genaue Aufgabe ist noch nicht geklärt, eine wahrscheinliche Aufgabe ist die Bereitstellung bestimmter Oberflächenrezeptoren (L-selectin und $\alpha\beta7$ Integrin befinden sich an Mikrovillienden). Frühere Studien wiesen darauf hin, dass auf Lymphozyten von WAS-Patienten die Dichte dieser Aktinabhängigen Strukturen vermindert ist (74). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte in elektronenmikroskopischen Untersuchungen von WASP-defizienten Lymphozyten allerdings keine verminderte Mikrovillidichte beobachtet werden. Dies könnte bedeuten, dass WASP bei den dynamischen aktinabhängigen Vorgängen der Mikrovilli entweder nicht oder zumindest vernachlässigbar gering beteiligt ist (75).

2.2.2.6 B-Lymphozyten

Die Aktivierung einer B-Zelle kann T-zellunabhängig oder T-zellabhängig erfolgen. Eine T-zellunabhängige Aktivierung wird in der Regel durch Polysaccharide oder Lipide, also Strukturen mit sich wiederholenden Untereinheiten (Polymere), induziert. Die Polymere verursachen eine Kreuzvernetzung der membrangebundenen Immunglobuline und aktivieren dadurch die B-Zelle. Für eine T-zellabhängige Immunantwort benötigen antigenspezifische B-Zellen zusätzlich die Hilfe von T-Helferzellen um aktiviert zu werden. Dies passiert über die Sekretion von Interleukinen (z.B. IL-4) und über direkten Zell- zu Zellkontakt über CD40-CD40 Ligandeninteraktion. Die aktivierten B-Zellen durchlaufen dann eine Proliferation und formen Keimzentren in den Lymphfollikeln der lymphatischen Organe.

Ob eine WAS-Defizienz tatsächlich eine Auswirkung auf die B-Zellfunktion hat oder eine Störung in ihrer Funktion nur Ausdruck einer T-Helferzelleninsuffizienz ist, bleibt umstritten.

Allerdings konnte gezeigt werden, dass WAS-Patienten auch schlechter auf T-zellunabhängige Antigene antworten, was eine Rolle der B-Zellen in der Krankheitsentstehung von WAS suggeriert (9, 11).

WAS-Patienten haben eine verminderte Anzahl von zirkulierenden B-Lymphozyten bereits in der Kindheit, reduzierte Lymphknotenfollikelreifung und defiziente Immunglobulinantworten, speziell auf Polysaccharidantigene (9, 67).

In einer neuen Studie konnte gezeigt werden, dass B-Zellen von WAS Patienten kleinere Aggregate nach Stimulation mit IL-4 und antiCD40 bildeten. Zusätzlich formten aktivierte B-Zellen kürzere aber dafür mehr Protrusionen. In früheren Studien dieser Gruppe konnte gezeigt werden, dass gesunde B-Zellen über diese Protrusionen gegenseitig Kontakt aufnehmen und dass sie evtl. notwendig sind für die Formation von großen Zellaggregaten (76).

Es ist möglich, dass die verminderte Aggregationsantwort in vitro die verminderte Bildung der Keimzentren in vivo widerspiegelt. Adhäsion von B-Zellen und die Keimzentrenreaktion sind allerdings beide abhängig von T-Zellsignalen, über den IL-4 Rezeptor und CD 40, ebenso wie über die Adhäsionsmoleküle LFA-1 und ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule) (77-79).

Es fand sich eine veränderte Mikrovilliformation bei anti-CD40 plus IL-4, bei LPS (lipopolysaccharide von gramnegativen Bakterien) plus IL-4 jedoch nicht bei LPS allein stimulierten B-Zellen von WASP-

„knockout“-Mäusen (76). Dies zeigt, dass WASP ein wichtiges „downstream“-Signal nach der IL-2, IL-4 und CD40 abhängigen Stimulation von Lymphozyten ist.

Im Rahmen der oben genannten Studie (78) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass WASP-defiziente B-Zellen die Immunglobulinklassen in höherem Maße gewechselt haben (erhöhtes Immunglobulinswitching) als gesunde B-Zellen nach der Stimulation in vitro. Dies korreliert mit der verminderten Aggregatbildung der B-Zellen bei WAS. Es könnte bedeuten, dass die Aggregation von B-Zellen eine Kontaktinhibition induziert, welche wiederum das Immunglobulinswitching oder die Sekretion beeinträchtigt.

Es konnte ebenfalls klar eine defiziente „homing“-Kapazität (Vorgang der richtigen Lokalisation von Lymphozyten) von B-Zellvorläuferzellen in die Milz nachgewiesen werden, ebenso wie in früheren Berichten (52, 80). Dies könnte ebenfalls die reduzierte Größe der B-Zellareale erklären und die abnormale Gewebsstruktur in der Milz und den Lymphknoten der WAS-Patienten ebenso die reduzierte Zahl an zirkulierenden B- und T-Zellen im Blut von WAS-Patienten (67, 81).

WASP-Defizienz führte auch zu einer Verminderung von B-Zellen in den Marginalzonen (=MZ) der Milz. Die wichtigste Aufgabe der MZ B-Zellen ist ihre frühe Teilnahme an der Immunantwort, was sich in der niedrigen Schwelle für ihre Aktivierung zeigt (82, 83).

Die MZ B-Zellentwicklung und -funktion hängt von der Expression verschiedener Signalproteine ab (84-86). Die Reduktion von MZ B-Zellarealen bei WASP knockout Mäusen könnte verursacht sein durch defiziente Migration oder Lokalisationsantworten auf Signalproteine und Chemokine. Allerdings konnte gezeigt werden, dass nicht die Abwesenheit von MOMA-1 (monoklonaler Antikörper) positiven Makrophagen die Ursache dafür ist, da diese Zellen sich in normaler Zahl und Lokalisation in der Milz von WASP-knockout Mäusen befinden. Auch scheint nicht eine ineffiziente Adhäsion der B-Zellen die Ursache (87), da WASP defiziente MZ-B-Zellen normal an die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) adhären. Diese Beobachtungen stimmen mit der Beobachtung von schmälere Marginalzonen von Milz und Lymphknoten bei der Sektion von WAS-Patienten überein. (81)

B-Zellen von WAS-Patienten haben niedrigere Mengen an F-Aktin (88) und WASP B-Zellen zeigten eine veränderte Polarisation nach IL-4 Aktivierung.

Zusammen mit der reduzierten Migrationsantwort von WASP negativen B-Zellen auf Chemokine, suggerieren all diese Beobachtungen eine verminderte Motilität von WASP-defizienten B-Zellen. Da

Zellen migrieren müssen in einem lymphatischen Organ, v.a. während einer Immunantwort, ist es wahrscheinlich, dass die herabgesetzte Motilität zu der verminderten humoralen Immunantwort bei WASP defizienten Mäusen führt. Es konnte gezeigt werden, dass gesunde antigenspezifische T- und B-Zellen chemokinvermittelte Bewegungen an die Ränder der T- und B-Zellareale machen (89, 90). Die verminderte Chemokinantwort der WASP-defizienten T- und B-Zellen führt zu ineffizientem Kontakt und Signalaustausch bei beiden Zelltypen.

Nicht alle der Effekte, die hier beschrieben wurden, können lediglich mit einer verminderten T-Helferzellfunktion erklärt werden. Weiterhin zeigte sich nach dem Transfer von Wildtyp T-Zellen in WASP-„knockout“-Mäusen kein Effekt auf die Antikörper- oder Keimzentrenantwort, suggerierend, dass eine gewisse B-Zelldefizienz bei diesen Effekten eine Rolle spielt (91).

2.2.2.7 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Lymphozyten, die abhängig sind von der Aktivierung oder Inhibition über bestimmte Rezeptoren. Sie haben eine Vielzahl an Effektorfunktionen wie die Produktion von Zytokinen und spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr und der Kontrolle von Krebszellen. Die Zytolytische Funktion von NK-Zellen wird aktiviert nach der Bindung an einen spezifischen Oberflächenrezeptor, was zur Aktivierung einer intrazellulären Kaskade führt, resultierend in einem Kalziumeinstrom, Polarisierung von Granula und anschließendem Freisetzen von lytischen Molekülen. Wichtig in diesen lytischen Abläufen ist Perforin, das Poren in der Zellmembran der Zielzelle formt, was den Eintritt anderer zytolytischer Granula erlaubt. Obwohl manchmal die Aktivierung über einen einzelnen Rezeptor eine Perforinausschüttung bedingt, benötigt die in vivo NK-Zellaktivierung meist den koordinierten Ablauf von mehreren aktivierenden Rezeptoren.

NK-Zellen formen eine immunologische Synapse mit der Zielzelle (NK cell immunologic synapse=NKIS). Die NKIS besteht aus einer zentralen und peripheren Zone (supramolecular activation cluster=SMAC), in der sich verschiedene Oberflächenrezeptoren (CD2, CD11a, CD11b), F-Aktin, WASP und Perforin befinden, wobei CD2, CD11a, CD11b und F-Aktin peripher gelegen sind und Perforin im zentralen SMAC liegt. Die Akkumulation von F-Aktin und den Oberflächenrezeptoren ist sehr schnell und abhängig von WASP gesteuerter Aktinpolymerisation. Die Polarisierung von

Perforin ist etwas langsamer und benötigt intaktes Aktin, WASP und mikrotubuläre Funktionen (92, 93).

WASP wird also benötigt für NK-Zellzytotoxizität. Bei WASP-Defizienz akkumuliert F-Aktin an der Immunsynapse der NK-Zellen und es kommt zu ungenügender Perforinakkumulation. Dies führt zu einer signifikanten Verminderung der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen. Dieser Defekt könnte die Tatsache erklären, dass WAS Patienten anfälliger sind für Infektionen mit Viren aus der Herpesgruppe und für die höhere Rate an malignen Erkrankungen. Funktionelle Defekte könnten z.T. ausgeglichen werden durch erhöhte NK-Zellzahlen, wie sie bei WASP-Patienten beobachtet wurden. (93).

2.2.2.8 Monozyten / Makrophagen / Dendritische Zellen / Osteoklasten

Im Blut zirkulierende Monozyten können auf Entzündungsreize hin an aktiviertes Gefäßendothel adhären und nach transendothelialer Diapedese in umgebendes Gewebe einwandern. Durch gezielte Migration zu Entzündungsherden sowie die Fähigkeit zur Phagozytose sind Monozyten/Makrophagen, aber auch dendritische Zellen (DC) in der Lage, Mikroorganismen, aber auch apoptotische körpereigene Zellen aufzunehmen, zu prozessieren und prozessiertes fremdes Material im Rahmen einer intakten Immunabwehr anderen Zellen zu präsentieren. Die Phagozytose von körpereigenen apoptotischen Zellen ist u. a. wichtig, um von diesen Zellen gebildete proinflammatorische Moleküle zu beseitigen (94). Die beiden wichtigsten Phagozytose-Signalwege werden von Fc γ - bzw. CR3 (=Komplement-Rezeptor)-Rezeptoren vermittelt. Fc-Rezeptoren erkennen die konservierte Fc-Domäne von Immunglobulinen (IgG's), während Komplementrezeptoren Bestandteile des Komplementsystems erkennen. Opsonierung von Partikeln durch IgG bzw. Komplement führt entsprechend zu Fc-Rezeptor- oder CR-vermittelter Phagozytose. Der Vorgang der Phagozytose ist ebenfalls abhängig von Cdc42 und Rac (95-98), von WASP und der Arp 2/3 Komplexaktivierung (99, 100).

Kurz nach Kontakt mit einer Endothelzelle bilden sich auf der Ventralseite des Monozyten/Makrophagen/DC/Osteoklasten punktförmige F-aktinreiche Adhäsionsstrukturen, die sogenannten Podosomen. Podosomen entsprechen Extravasationen der Plasmamembran, die über Integrine (α 4 β 1- und α L/ α M β 2-Integrine) Kontakt zur extrazellulären Matrix aufnehmen (über VCAM=vascular cell adhesion molecule und ICAM-1 und -2=intercellular cell adhesion molecule).

Zudem werden aktinreiche Lamellipodien und Filopodien am Vorderende der Zellen gebildet. Diese dienen der gezielten Migration auf chemotaktische Reize (101, 102).

Adhäsion, Migration und Phagozytose sind zelluläre Prozesse, die Veränderungen der Zellform erfordern, denen ein dynamischer Umbau des Zytoskeletts, insbesondere der Aktin-Filamente zugrunde liegt.

Eine der wichtigsten Aufgaben von WASP in Makrophagen/Monozyten/DC/Osteoklasten besteht also darin, den Arp2/3-Komplex an Orte zu lokalisieren, an denen Aktin-Strukturen wie z.B. Podosomen, Lamellipodien und Filopodien gebildet werden sollen. Der Signaltransduktionsweg Cdc42-WASP-Arp2/3 Komplex spielt auch hier die entscheidende Rolle bei der Regulation des Aktinzytoskeletts (103) (104) (101, 105).

Bei WAS Patienten zeigt sich eine Störung der Zellpolarisation und Migration der Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen, da bei WASP-Defizienz der Arp 2/3 Komplex nicht zu den Podosomen transportiert wird (106).

Bei WASP-Defizienz können diese Podosomen nicht geformt werden und die betroffenen Zellen müssen auf andere Adhäsionsmechanismen zurückgreifen um zu migrieren (11, 107) (102, 108). Die Region des WASP, die benötigt wird für die gerichtete Zellbewegung ist die C-terminale VCA (VH/CH/AR) Domäne, welche auch notwendig ist für die Stimulation der Aktinpolymerisation (30).

Chemotaktische Antworten von WASP defizienten Monozyten und Makrophagen sind bei verschiedensten Stimuli fehlerhaft (z.B. CSF-1=colony-stimulating factor-1) (11, 101, 105, 109, 110). Sie zeigen z.B. eine reduzierte Motilität von Monozyten als Antwort auf fMLP (=formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin), MCP-1 (=monozyten chemotactic protein-1) und MIP-1 α (=makrophagen inflammatory protein-1 α) (11) (101).

Diese zytoskelettalen Anomalien wurden auch für DC-Zellen berichtet, denen auch die Podosomen fehlen (12, 111, 112). WASP-defiziente DC bilden keine β 2-Integrine auf der Podosomenseite, was zu einer gestörten Adhäsion an das endotheliale Adhäsionsmolekül ICAM-1 führt (113). Dies könnte Konsequenzen für die transendotheliale Migration der DC haben, z.B. beim Durchtritt von Haut zu Lymphgefäßen als auch beim „homing“ zu dem drainierenden Lymphknoten.

Dies konnte in vivo gezeigt werden, was die Tatsache bestätigt, dass fehlerhaftes DC- „trafficking“ und die daraus resultierende fehlerhafte Initiierung von Immunreaktionen ein Bestandteil des Immundefekts bei WAS darstellt und evtl. auch zur Entwicklung von Autoimmunphänomenen führt (12, 114).

WASP-negative DC zeigten auch eine verminderte Präsenz in den T-Zellarealen in der Milz. Stattdessen sammelten sie sich in den Marginalzonen. Adhäsion, Migration und „homing“/ „trafficking“ von DC in vivo ist also abhängig von einem normal reguliertem Aktinzytoskelett und somit einem intakten WASP (11, 114).

WASP-defiziente DC entwickeln ebenfalls eine fehlerhafte Antigenpräsentation von nicht löslichen Antigenen (115).

Das Fehlen von Podosomen bei WASP defizienten Murin-Osteoklasten (Mäuseosteoklasten) führt zur defekten Knochenresorption bei Mäusen. Es wird zwar ein physiologischer steady state der Knochenresorption aufrecht erhalten, jedoch kommt es zu ineffektiver Knochenresorption in Fällen von erhöhtem Resorptionsbedarf (116). Ob die daraus resultierenden skelettalen Defekte beim Menschen klinisch von Bedeutung sind ist noch nicht untersucht worden.

Eine wichtige Komponente des komplexen Immundefekts bei WAS ist neben dem defizienten Zellverkehr auch die fehlerhafte „Pathogenclearance“ und Aufnahme einzelner Antigene. Die Bildung des „phagozytic-cup“, die IgG vermittelte und apoptotische Zellphagozytose sind allesamt defekt in WASP-defizienten Makrophagen (94, 99). In gesunden Zellen sammeln sich β 1-Integrine, WASP und der Arp2/3-Komplex in der aktinreichen Phagozytoseregion (phagocytic cup). β 1-Integrine aktivieren die Aktinpolymerisation über Cdc42Hs, dessen Effektor WASP und dem Arp2/3-Komplex in Makrophagen. Blockade von β 1-Integrinen durch bestimmte Antikörper, Inhibition des Arp2/3-Komplexes oder WASP-Defizienz in WASP knockout Mäusen führten zu einer Inhibition der Bildung des „phagocytic cup“ und der Aufnahme (Phagozytose) in Makrophagen (117, 118)

Diese defiziente Phagozytose von apoptotischen Zellen und deren proinflammatorischen Moleküle, könnte eine mögliche Ursache sein für das Auftreten von Autoimmunphänomenen (11, 94, 119). Fehlerhaftes DC Trafficking und die daraus resultierende fehlerhafte Initiierung von Immunreaktionen könnte ebenso zur Entwicklung von Autoimmunphänomenen führen (12, 114).

Podosomenbildung, Migration/Chemotaxis und die Phagozytosefunktion konnten sowohl bei WASP-defizienten Makrophagen als auch Osteoklasten durch lentivirale Transfektion einer normalen Kopie des WAS-Gens wiederhergestellt werden (116, 120).

2.2.2.9 Neutrophile

Die genaue Funktion von WASP in Neutrophilen ist noch kaum geklärt, obwohl es in großen Mengen exprimiert wird (21, 121). Phagozytose von opsonierten Partikeln durch Neutrophile bedarf lokalisierter Veränderungen im Zytoskelett zur Formierung von Pseudopodien und dem „phagozytischen Cup“. Cdc42 ist entscheidend beteiligt an der Initiierung der frühen Phagozytose durch seine Fähigkeit gamma-Pak (=gamma-p21-activated protein kinase) zu aktivieren, ebenso wie WASP, dass die lokalisierte Aktinpolymerisation unterstützt (122).

Da WAS-Patienten unter anderem an Krankheiten leiden, die klassischerweise bei einer Neutrophilendysfunktion auftreten, ist es sehr wahrscheinlich, dass Defekte in dieser Zellreihe vorliegen (9, 110). Obwohl in früheren Studien eine fehlerhafte Chemotaxis von Neutrophilen bei WAS-Patienten beobachtet wurden, war dies zu korrigieren indem gesundes Serum verwendet wurde, was eher einen inhibitorischen Faktor im WAS-Serum implizieren würde als einen intrinsischen Defekt der Neutrophilen selbst (12, 123). Es konnte gezeigt werden, dass Neutrophile mit normaler Chemotaxis reagieren auf fMLP und IL-8 (105). Die Reaktion auf andere „chemoattractants“ wurde bisher noch nicht untersucht. Phagozytosedefekte wurden bisher berichtet bei WASP-defizienten Mäusezellkulturen, jedoch nicht bei menschlichen WASP-defizienten Neutrophilen (12, 61, 124).

2.2.2.10 Mastzellen

WASP-defiziente Mastzellen zeigen abnormale IgE-induzierte Zytoskelettveränderungen, Degranulation und Zytokinproduktion. Die Tyrosinphosphorylierung der Phospholipase Cy und die Kalziummobilisation sind defekt nach der IgE-Rezeptorbindung. IgE abhängige Aktivierung von c-Jun N-terminal Kinase und die Verteilung von F-Aktin in Mastzellen ist vermindert bei WASP-Defizienz. Dies zeigt eine Rolle des WASP im Signaltransduktionsweg nach Aktivierung von FcεRI (= high affinity Rezeptor für IgE in Mastzellen) (12, 125).

2.2.2.11 Thrombozyten

Ca. 90% der WAS-Patienten haben eine Thrombozytopenie bei Diagnosestellung. Die Thrombozytenzahlen können schwanken (<10.000 bis >100.000/), oft zeigt sich ein Abfall bei Infekten.

(klinisch oft Blutungen: Petechien oder Purpura (78%), Haematemesis und Melaena (28%), Epistaxis (16%), orale Blutungen (6%), intrakranielle Blutungen (2%) andere (5%))(9).

Das Thrombozytenvolumen ist vermindert mit 3,8-5,0 fl (Norm 7,1-10,5 fl). Diese Mikrothrombozytopenie ist der häufigste Zelldefekt beim WAS. Das Auftreten der Mikrothrombozytopenie selbst bei den mildesten Phänotypen wird in einer Studie erklärt durch das Fehlen von WASP in den Thrombozyten, unabhängig von teilweiser Expression von WASP in anderen Zelllinien, evtl durch Proteininstabilität in den Thrombozyten (12, 121). Peripherer Abbau durch die Milz ist ein entscheidender Faktor, was sich in der Normalisierung der Thrombozytenzahlen und -größe nach Splenektomie zeigt (8, 126). Hinweisend hierfür könnte ebenfalls sein, dass fremdtransfundierte Thrombozyten bei WAS-Patienten eine normale Überlebensdauer hatten, wohingegen autolog transfundierte Thrombozyten eine verkürzte Lebensdauer hatten (127).

Es ist wahrscheinlich, dass WASP-defiziente Thrombozyten von Milzmakrophagen herausgefiltert werden. In Milzpräparaten von WAS-Patienten konnte mittels Immunfluoreszenzmikroskop eine Kolo-kalisation von CD41 (Thrombozytenoberflächenmarker) und CD68 (Makrophagenoberflächenmarker) gesehen werden. Zudem befinden sich vermehrt Phosphatidylserine an der Oberfläche von WAS-Thrombozyten, ein Signal für Makrophagen zum Abbau der jeweiligen Zelle. WAS-Thrombozyten zeigten eine vermehrte Sekretion von Mikropartikeln, was ihre verminderte Größe erklären könnte. Es zeigten sich erhöhte Kalziumspiegel und damit Verstärkung von Kalzium-abhängigen Vorgängen: Phosphatidylserin-Exposition und Mikropartikelfreisetzung. Dies könnten die Mechanismen sein für die in vivo verminderte Zahl und Größe der Thrombozyten (128).

Es wurde erhöhtes thrombozytenassoziiertes IgG und verminderte Granulierung der WAS-Thrombozyten beobachtet. Die Anzahl der retikulierten jungen Thrombozyten erscheint normal. Die Expression von GPIIb/IIIa und GPIV (Glykoproteine, die Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche formen für Adhäsion und Aggregation) ist vermindert. Die Fähigkeit die Expression von GPIIb/IIIa

nach Thrombinstimulation zu modulieren ist ebenfalls vermindert. Thrombin- und ADP (adenosine diphosphate)-induzierte Expression von CD62P und CD63 ist defekt in WAS-Thrombozyten (129).

WAS-Thrombozyten zeigen Defekte in der Aggregation und Aktinpolymerisation. WASP in Thrombozyten wird v.a. durch Kollagen und weniger durch Thrombopoetin und Thrombin aktiviert (mittels Phosphorylierung durch eine Tyrosinkinase) und hat wohl eine regulatorische Rolle bei den zytoskelettalen Veränderungen in der Aggregation nach Thrombin-Aktivierung der Thrombozyten (36, 37, 130, 131).

Wie kürzlich jedoch gezeigt werden konnte, aktivieren Thrombozyten den Arp2/3-Komplex, bilden Aktin und ändern ihre Form auch ohne WASP. Dies zeigt, dass WASP eine spezialisiertere Rolle in diesen Zellen innehaben muß (12, 132).

Andere Studien vermuten einen Defekt in der Thrombozytenproduktion. Die Differenzierung der Megakaryozyten (MK) und die Prothrombozytenbildung *in vitro* erscheinen jedoch normal. Auch die Megakaryozytenreifung erscheint normal. *In vitro* produzierte Thrombozyten waren normal groß, während Thrombozyten im peripheren Blut der selben Patienten kleiner waren. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Thrombozytenanomalien beim Eintritt der polyploiden Megakaryozyten in das Gefäßsystem durch Migration durch das Endothel oder während der Zirkulation durch die Lungengefäße oder durch beides entstehen (11, 133).

Allerdings zeigte sich eine veränderte Verteilung des F-Aktins in den MK-Zellen. Normalerweise befindet es sich direkt unter der Zellmembran, bei WAS-MK-Zellen fand es sich konzentriert in der Mitte der Zellen. MK-Zellen von WAS Patienten zeigen kürzere und auch weniger Filopodien als gesunde (133). Weiterhin ist die „proplatelet“-Formation, die abhängig ist von einer dynamischen Aktinpolymerisation, und die Größe der Thrombozyten, die dann geformt werden, normal in flüssigem Medium (*in vitro*, ohne physiologischem extrazellulärem und vaskulärem Umfeld). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Megakaryozyten, die sich normalerweise im extravaskulären Raum des Knochenmarks befinden, abhängig sind von der Adhäsion an der äußeren Seite des Endothels und transendothelialer zytoplasmatischer Prozesse für eine effektive Migration in das Lumen und/oder eine effektive „proplatelet“-Formation. Die Defizienz von Aktinstrukturen wie Filopodien und Podosomen könnten zu Defekten in diesem Prozess führen (12, 65, 134). Fehlerhafte chemokinvermittelte Interaktion von MK-Vorläufern mit dem Endothel könnten ebenfalls eine Rolle spielen. Dies zeigt sich auch bei WASP-defizienten T-Lymphozyten, die fehlerhaft reagieren auf SDF-1 (65), welches auch eine Rolle spielt in der MK-Reifung und Thrombopoese (12).

2.2.2.12 Zusammenfassung der Rolle des WAS-Proteins

Es konnte gezeigt werden, dass WASP in Verbindung mit anderen Proteinen entscheidend beteiligt ist an der Veränderung des Zytoskeletts der hämatopoetischen Zellen mittels Aktivierung der Aktinpolymerisation. Es hat einen wichtigen Anteil an einer effektiven Signaltransduktion, Zell- zu Zellinteraktionen, Phagozytose und Zellmigration im hämatopoetischen System. Es ist beteiligt an Thrombozytenproduktion und –abbau und Neutrophilenproduktion und –funktion (8, 12, 13).

Das Vorliegen von chemotaktischen und „homing“-Defekten der WASP-defizienten T-Zellen, B-Zellen, DC, Monozyten/Makrophagen und Stammzellen (52, 65, 91) unterstützt die Theorie, dass ein generalisierter Defekt im Blutzellverkehr die Ursache für die Pathogenese des WAS darstellt (12, 23, 135).

Diese detaillierte Beschreibung der Funktion des WASP in den einzelnen Zellen des hämatopoetischen Systems macht deutlich, wie die einzelnen Mutationen im *WASP-Gen*, die zu verändertem WASP führen, die Breite der phänotypischen Ausprägungen wie dem Vollbild des WASP mit seinem Symptomenspektrum, der X-linked Thrombozytopenie oder der X-linked Neutropenie bewirken können.

2.3 X-chromosomale Thrombozytopenie

Das Vollbild des WAS zeichnet sich aus durch Thrombozytopenie mit kleinen Thrombozyten, einem kombinierten Immundefekt und einer Ekzemeigung. Es gab jedoch auch zahlreiche Fallbeschreibungen von Patienten mit Thrombozytopenie, kleinem Thrombozytenvolumen, die nur vereinzelt oder gar kein Ekzem und lediglich einen leichten oder gar keinen Immundefekt aufwiesen. Nach dem Vererbungsmodus wurde dieses Krankheitsbild als X-chromosomale Thrombozytopenie bezeichnet. Der WAS Genort konnte mittels Kopplungsanalysen mit klonierten polymorphen DNA-Markern dem kurzen Arm des X-Chromosoms zugeordnet werden (136). Kurz darauf konnte gezeigt werden, dass die X-chromosomale Thrombozytopenie ihren Genort ebenfalls in dieser Region hat (137). Nachdem das verantwortliche Gen für WAS 1994 identifiziert werden konnte (7), konnte gezeigt werden, dass es sich bei der X-chromosomalen Thrombozytopenie um einen milden Phänotyp des WAS handelte, da der Gendefekt bei diesen Patienten ebenfalls im *WASP-Gen* zu finden war. Es konnte gezeigt werden, dass XLT häufiger vergesellschaftet ist mit einzelnen Aminosäureaustauschen, bei denen das Leseraster nur wenig verändert wird und es noch zu einem Transkript kommt. Es wurde davon ausgegangen, dass schwerere Mutationen (wie Stopmutationen oder Deletionen) zum Vollbild des WAS führen. Allerdings konnte keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation hergestellt werden (138, 139). In einer Studie z. B. zeigten drei von 20 untersuchten nicht verwandten Patienten die gleiche C290T/Arg86Cys Mutation mit dem XLT Phänotyp (evtl. „hotspot“ (=Genort an dem vermehrt Mutationen auftreten) für XLT). G291T/Arg86Leu und Arg86His führt zum Vollbild des WAS, dagegen Arg86Cys zu XLT. Doch auch Patienten mit einer „frameshift“ (=Leserasterverschiebung)-Mutation (z. B. C1086 Deletion) und Spleißmutationen (z. B. G->A (+1) Intron1) präsentierten sich ebenfalls mit dem milden Phänotyp. Bei einer Spleißmutation kann es zu einem Transkript kommen, was den milden Phänotyp erklären könnte, jedoch läßt eine „frameshift“-Mutation kein voll funktionierendes Protein zu. Daher wird vermutet, dass die Mutation nicht die einzige Rolle bei der Determination des Phänotyps spielt (140). In einer anderen Studie wurden insgesamt 13 nicht verwandte WAS-Patienten untersucht. Davon präsentierten sich vier nicht verwandte Patienten mit X-chromosomaler Thrombozytopenie. Drei davon mit einzelnen Aminosäureaustauschen in Exon 1 und 2 (2x C290T/Arg86Cys, C174A/Ala47Asp), einer mit einer Spleißmutation in Exon 9. Diese Patienten mit dem klassischen Bild des WAS hatten eher Mutationen wie Stop- oder „frameshift“-Mutationen, die in einem schwer

trunkierten Protein resultieren, welches schneller abgebaut wird und sehr in seiner Funktion eingeschränkt ist (5). Auch in anderen Fallbeschreibungen konnte gezeigt werden, dass Spleißmutationen, die lediglich zu geringeren Mengen des normalen WAS-Proteins führen, eher einen milderen Phänotyp bewirken (z.B. Intron 7+5 G>A) (141).

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die meisten Patienten mit XLT einzelne Aminosäureaustausche in Exon 1 und 2 aufweisen, die lediglich zu einer leichten, partiellen Einschränkung der Proteinfunktion führen, im Gegensatz zu stark verminderter bis fehlender Proteinexpression oder schwer trunkiertem Protein, welches in seiner Funktion stark oder gänzlich eingeschränkt ist und schnell abgebaut wird, in den meisten schweren Fällen von WAS.

Die mildeste Form der XLT wurde berichtet für zwei Familien, in denen die betroffenen Männer lediglich intermittierende Phasen von Thrombozytopenien zeigten mit allerdings konstant reduziertem Plättchenvolumen (Familie A: Punktmutation in Exon 2 (C207G/Pro58Arg), Familie B Punktmutation in Exon 11 (T1476A/Ile481Asn)). Diese Mutationen führten zu normaler bis leicht reduzierter Menge an WASP bei allen betroffenen Patienten (142).

Dies zeigt, dass bei Patienten mit konstant niedrigem Plättchenvolumen auch bei normalen Plättchenzahlen an einen milden Phänotyp des WAS gedacht werden und eine Analyse vorgenommen werden sollte.

2.4 X-chromosomale Neutropenie

Im Jahr 2001 erschien die Fallbeschreibung einer Familie in der sich in drei Generationen fünf Männer mit einem X-chromosomalem Immundefekt, charakterisiert durch rezidivierende bakterielle Infekte, mit schwerer angeborene Neutropenie (im Mittel 300/ μ l Neutrophile) und Monozytopenie präsentierten. Sie zeigten erhöhte Spiegel von CD8+ T-Lymphozyten, was zu einer verminderten CD4+/CD8+ Ratio von 0,5 und weniger führte. T-Lymphozytenstimulation war normal, ebenso die Immunglobulinspiegel. Das Plättchenvolumen war nicht erniedrigt und die Thrombozytenzahlen waren normal. Ekzeme oder sonstige Hautbeteiligungen waren bei keinem Patienten aufgetreten. Die

Knochenmarkspunktion zeigte einen Reifungsstopp auf der Stufe der Promyelozyten/Myelozyten, ohne besondere Auffälligkeiten in der Megakaryopoese oder Erythropoese.

Die molekulargenetische Untersuchung zeigte eine Mutation im WAS-Gen (T843C), was zu einem Austausch von Leucin zu Prolin an Aminosäureposition 270 führt. Bei den anderen Phänotypen (XLT, WAS) sind die Neutrophilenzahlen als normal beschrieben.

WAS-Proteine sind durch eine intramolekulare Interaktion autoinhibiert (siehe oben beschrieben). Die beschriebene Mutation liegt in der für die GBD (GTPase Bindungsdomäne) kodierenden Region. In der inaktivierten Form bilden die GBD- und VCA-Region eine Struktur bestehend aus einer β -„hairpin“ und fünf α -Helices. In dieser Form liegt Leucin 270 im Zentrum der α 1-Helix. Der Austausch zu Prolin destabilisiert die α 1-Helix und somit die Tertiärstruktur des WAS-Proteins, was zur Aufhebung der Autoinhibition führt und zur Cdc42Hs unabhängigen Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (in vitro).

WASP ist ubiquitär in hämatopoetischen Zellen von den frühen Vorläuferzellen an. Über seine genaue Funktion in der Myelopoese ist noch wenig bekannt und es ist unklar wie der oben beschriebene Defekt zur Neutropenie führt.

Bei schwerer kongenitaler Neutropenie kommt es ebenso zu einem Stop auf der Promyelozyten/Myelozyten Reifungsstufe. Die Neutrophilen zeigen erhöhte F-Aktinlevel und eine ähnliche F-Aktinerhöhung könnte Ursache sein für die Neutropenie bei unkontrollierter Aktivierung von WASP.

Alle bisher bekannten WAS verursachenden Mutationen sind außerhalb des Autoinhibitions-kerns gelegen, bis auf M307V, welche die WASP Struktur jedoch kaum beeinträchtigt. Ob Mutationen in dem autoinhibitorischen Kern in vivo XLN verursachen ist noch unklar (6).

Ein weiterer nicht verwandter Patient mit Neutropenie und einer Myelodysplasie aller drei Zellreihen und einer Punktmutation bei I294T wurde beschrieben. Der Mechanismus erscheint hier ähnlich, da I294 sehr nahe der wichtigen Phosphorylierungsstelle Y291 auf der gleichen Seite der α -Helix im hydrophoben Kern der CRIB-Domäne liegt und die Substitution mit Threonin ebenso die Autoinhibition stört.

Die unkontrollierte Aktivierung von WASP und damit des Arp2/3-Komplexes und der Aktinpolymerisation scheint zu früher Apoptose zu führen, besonders in myeloischen Progenitorzellen (12, 143).

Neuere Studien weisen darauf hin, dass bei allen chronischen bzw. kongenitalen Neutropenien eine erhöhte Apoptoserate der neutrophilen Vorläuferzellen den gemeinsamen Pathomechanismus darstellt (144).

2.5 WAS-assoziierte Autoimmunsyndrome

Autoimmunerkrankungen sind beim Vollbild des WAS eine häufige Komplikation (9, 145, 146). Die Inzidenz wird angegeben mit 40% und 72% in zwei unabhängigen Studien (9, 145) und scheint nicht zwingend mit dem Vollbild des WAS oder völligem Fehlen der WASP-Expression assoziiert zu sein. Autoimmunerkrankungen können auch bei Patienten mit der milden Form des WAS auftreten (13, 110).

In einer japanischen Studie zeigten 22% (6/27) der Patienten mit dem Vollbild des WAS Autoimmunerkrankungen, zwei der sechs Patienten entwickelten Malignome. Die relativ niedrige Inzidenz von Autoimmunerkrankungen in dieser japanischen Studie kann erklärt werden durch das niedrigere Alter der erfassten Patienten und durch den höheren Prozentsatz (52%) an Patienten, bei denen eine Stammzelltransplantation in frühem Alter durchgeführt wurde (mittleres Alter 2,3 Jahre). Von den 23 japanischen Patienten mit dem XLT-Phänotyp hatten sechs (26%) eine Autoimmun- oder inflammatorische Erkrankung, fünf davon eine IgA-Nephropathie (110).

In einer anderen Studie wurden 154 WAS-Patienten beschrieben, von denen 40% (=61 Patienten) eine Autoimmun- oder inflammatorische Erkrankung entwickelten. Autoimmunhämolytische Anämien traten in dieser Kohorte mit einer Häufigkeit von 14% auf. Vaskulitiden mit 13%, Nierenerkrankungen mit 12%, vorübergehende Arthritiden mit 11%, chronische Arthritiden mit 10%, Schönlein-Henoch Purpura mit 5%, entzündliche Darmerkrankungen mit 3%, Dermatomyositiden mit 0,6%. Angioödeme, Neutropenien, Uveitis, cerebrale Vaskulitis, Myositis, Autoimmunhepatitis und kardiale Vaskulitis wurden insgesamt mit 9% beschrieben. Viele Patienten hatten mehr als eine Autoimmunerkrankung: 12 Patienten hatten lediglich eine, 22 Patienten hatten zwei, 11 hatten drei, vier hatten vier und einer hatte fünf verschiedene Autoimmunerkrankungen. Autoimmun- und inflammatorische Erkrankungen wie sie bei anderen immundefizienten Patientenpopulationen beobachtet werden wie z.B. systemischer Lupus erythematosus, Sjögren Syndrom, Autoimmunendokrinopathien und Sarkoidose wurden bei diesen Patienten nicht beobachtet (9).

In einer weiteren Studie hatten von insgesamt 55 untersuchten Patienten 40 (=72%) eine Autoimmun- oder inflammatorische Komplikation. In allen Fällen traten die Komplikationen vor dem fünften Lebensjahr auf. Die häufigste Form war die Autoimmunhämolytische Anämie in 20 Fällen (=36%). Weitere Formen waren die Neutropenie (22%), Arthritis (29%), Hautvaskulitis (22%), zerebrale Vaskulitiden (7%), entzündliche Darmerkrankungen (9%) und Nierenerkrankungen (3%). Die mittlere Überlebensrate der beschriebenen Patienten betrug 14,5 Jahre. Autoimmunhämolytische Anämie, schwere Thrombozytopenie nach Splenektomie und hohe IgM-Serumlevel vor der Splenektomie waren vergesellschaftet mit einer schlechten Prognose (145).

Obwohl sie eine häufige Ursache für Morbidität und Mortalität bei WAS sind, gibt es kaum Daten, die die Entstehung von Autoimmunsyndromen bei WAS erklären. WASP könnte beteiligt sein bei der Thymusreifung und theoretisch könnten autoreaktive T-Lymphozyten der Negativ-Selektion entkommen aufgrund der defekten TCR-induzierten Apoptose, wie sie für WASP-defiziente T-Lymphozyten bei Mäusen beschrieben wird (12, 61). Gestörte Funktion von WASP-defizienten T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen oder DC könnten wichtige Mechanismen destabilisieren, die für die Aufrechterhaltung einer normalen Immuntoleranz verantwortlich sind (11).

Auch die defiziente Phagozytose von apoptotischen Zellen und deren proinflammatorischen Moleküle bei WAS-Patienten könnte eine mögliche Ursache sein für das Auftreten von Autoimmunphänomenen (11, 94, 119), ebenso wie fehlerhaftes DC-„trafficking“ und die daraus resultierende fehlerhafte Initiierung von Immunreaktionen (12, 114) (s.o.).

Chronische Inflammation, Interleukin-2-Defizienz und vermehrte Apoptose könnten ebenfalls eine Rolle spielen beim Verlust der Immuntoleranz gegen eigene Antigene (146).

2.6 WAS-assoziierte Malignome

Von den in einer Studie beobachteten 154 WAS-Patienten entwickelten 21 Patienten (=13%) eine maligne Erkrankung. Das mittlere Alter bei Auftreten lag bei 9,5 Jahren. Der Großteil der Malignome entstand im lymphoretikulären System mit Ausnahme eines Glioms, eines Akustikusneuroms und eines testikulären Karzinoms. Eine Knochenmarkstransplantation wurde in fünf Fällen nach Auftreten eines Malignoms durchgeführt. Keiner dieser Patienten überlebte länger als sechs Monate. Nur ein

Patient war zwei Jahre nach Auftreten eines Malignoms noch am Leben. Patienten die eine Autoimmunerkrankung entwickelten, hatten ein signifikant ($p=0,0009$) höheres Risiko an einem Malignom zu erkranken. 15 (=75%) der 20 Patienten, die an einem Malignom erkrankten, hatten auch eine Autoimmunerkrankung (9).

Die Immundefizienz bei WAS-Patienten erscheint für die Entstehung der lymphoretikulären Malignome verantwortlich, da ein Großteil der Entartungen EBV-assoziiert ist und dafür einige Abwehrdefekte bei WAS-Patienten bestehen, wie defekte NK- oder zytotoxische T-Zell- Zytolyse (93).

Ein hohes Lymphomrisiko (44%) wurde im Rahmen einer retrospektiven Studie beobachtet bei einer bestimmten Spleißmutation, die ansonsten mit einem milden Phänotyp assoziiert ist (intron 6 (+5), g->a (147). Von 158 WAS-Patienten mit Missensmutationen entwickelten fünf (=3%) ein Lymphom, von 163 WAS-Patienten mit Nonsensmutationen entwickelten 15 (=9%) ein Lymphom. In dieser Gruppe liegt die beobachtete Lymphomhäufigkeit vermutlich zu niedrig, da diese Mutationen meist mit einem schweren Phänotyp vergesellschaftet sind und die Patienten früh knochenmarktransplantiert werden oder früh versterben. Patienten mit Spleißmutationen hatten die höchste Inzidenz von Lymphomen (sieben von 58 =12%). Für die Intron 6 Spleißmutationen lag die Inzidenz bei vier von neun Patienten (44%). Für die einzelne Mutation Intron 6 (+5), g->a lag die Inzidenz eines Lymphoms bei drei von sieben Patienten (43%). Die Gruppe die diese Studie durchgeführt hatte, hatte schon früher die Diskordanz der WASP-Expression in den unterschiedlichen Blutzellen von fünf Patienten mit zwei Intron 6-Mutationen beschrieben. Während die T-Zellzahlen dieser Patienten niedrige aber nachzuweisende WASP-Expression zeigten (10-20% der normalen Spiegel) , exprimierten die peripheren B-Zellen dieser Patienten ebenso wie ihre EBV-transformierten B-Zelllinien kein WASP (121). Ähnliche Diskordanz zwischen T- und B-Zellen wurde beobachtet bei einem Patienten mit einer Nonsensmutation im Exon 1, der an einem Lymphom verstarb und zwei Mitgliedern einer Familie mit einer Intron 7-Spleißmutation, die eine mildere Form der Erkrankung zeigten. Evtl. ist diese diskordante Expression von WASP in T- und B-Zellen ein Indikator für das erhöhte Risiko an einem Lymphom zu erkranken, auch für die Patienten, die ansonsten an einer milden Verlaufsform des WAS leiden. Eine Knochenmarkstransplantation sollte laut Autoren erwogen werden in dieser speziellen Untergruppe der milden Phänotypen (147). Diese Aussagen sind jedoch aufgrund der niedrigen Patientenzahlen kritisch zu beurteilen.

Interessanterweise gibt es eine signifikant erhöhte Inzidenz von Myelodysplasien bei schweren Verlaufsformen des WAS (12).

Obwohl die Mechanismen der Malignitätsentstehung weiterhin ungeklärt bleiben, könnte WASP eine Rolle spielen bei der Zellteilung und der Aufrechterhaltung der Genomstabilität (12, 148).

2.7 Diagnostik

Das Wiskott-Aldrich Syndrom ist eine rezessiv vererbte X-chromosomale Erkrankung. Der Gendefekt liegt auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms bei Xp11.22-p11.23 und das Gen genannt *WASP-Gen* konnte 1994 identifiziert werden (7). Das Gen beinhaltet 12 Exone und die 1540 bp lange cDNA kodiert für ein 502 AS-Protein mit einem Molekulargewicht von 65 kD (WASP).

Die Identifizierung des Gendefekts erlaubt eine molekulargenetische Diagnostik der Erkrankung, eine zuverlässige Pränataldiagnostik bei männlichen Feten (149-152) und die Suche nach weiblichen Genträgerinnen und somit Krankheitsüberträgerinnen (53, 153).

Es hat sich gezeigt, daß die einzelnen Mutationen im WASp-Gen zu sehr unterschiedlichen Phänotypen führen. Sie reichen vom Vollbild des WAS bis hin zu der sehr milden Form, der XLT, bei der lediglich eine milde Thrombozytopenie mit kleinen Thrombozyten vorliegen kann. Ein Fallbericht zeigt WAS in einer phänotypischen Ausprägung mit lediglich kleinen Thrombozyten bei normalen Thrombozytenzahlen (142). Bei dem beschriebenen Phänotyp der X-chromosomalen Neutropenie zeigten die Thrombozyten eine normale Größe (6, 143).

Die alleinige Bestimmung der Mutation ist daher nicht ausreichend um eine Prognose zum Verlauf der Erkrankung abgeben zu können. Einige Autoren haben zusätzlich versucht über die Bestimmung der mRNA oder der Proteinexpression in Blutzellen (durch Immunoblot oder Durchflußzytometrie) eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu erarbeiten (154),(13, 110). Während bei WASP-positiven Patienten eher der milde Phänotyp vorherrscht nimmt mit abnehmender Proteinexpression die Schwere des klinischen Verlaufs zu. Allerdings konnte den meisten Mutationen noch keine eindeutige Proteinexpression zugeordnet werden.

Aufgrund der Breite der klinischen Ausprägung kann die frühe Diagnose erschwert sein. Das mittlere Alter bei Diagnose beträgt etwa 20 Monate (9).

Es wurden Diagnostikkriterien zusammengestellt, die die klinische Diagnose eines WAS wahrscheinlich machen (155, 156).

So besteht definitiv die Diagnose eines WAS bei einem männlichen Patienten mit kongenitaler Thrombozytopenie ($< 70.000/l$), kleinen Thrombozyten und einem der folgenden Punkte:

1. Mutation im WASP Gen
2. Keine nachweisbare WASP-mRNA in Lymphozyten
3. Kein nachweisbares WASP in Lymphozyten
4. Männliche Verwandte der Mutter (Brüder, Cousins, Onkel, Neffen) mit kleinen Thrombozyten und Thrombozytopenie

Es besteht sehr wahrscheinlich die Diagnose eines WAS bei einem männlichen Patienten mit kongenitaler Thrombozytopenie (<70.000), kleinen Thrombozyten und einem der folgenden Punkte:

1. Ekzem
2. pathologische Antikörperreaktion auf Polysaccharidantigene
3. wiederholt auftretende bakterielle oder virale Infektionen
4. Autoimmunerkrankungen
5. Lymphome, Leukämie, solide Tumore

Es besteht möglicherweise die Diagnose eines WAS bei einem männlichen Patienten mit Thrombozytopenie (<70.000), und kleinen Thrombozyten, oder einem männlichen Patienten, der wegen Thrombozytopenie splenektomiert wurde und einen der folgenden Punkte aufweist:

1. Ekzem
2. pathologische Antikörperreaktion auf Polysaccharidantigene
3. wiederholt auftretende bakterielle oder virale Infekte
4. Autoimmunerkrankungen
5. Lymphome, Leukämie, solide Tumore

2.8 WAS beim weiblichen Geschlecht

Bei Frauen, in deren Familie an WAS erkrankte männliche Familienmitglieder diagnostiziert werden, sollte der Überträgerinnenstatus geklärt werden. In Studien zur X-Inaktivierung hat sich gezeigt, dass bei weiblichen heterozygoten Trägerinnen der Mutation zu 95% eine „non-random“ (nicht zufällig)-Inaktivierung des betroffenen X-Chromosoms in allen hämatopoetischen Zelllinien vorliegt (157), d.h., dass diese klinisch inapparent bleiben und dennoch Überträgerinnen der Erkrankung sein können. In 5% liegt eine „random“ (zufällig)-X-Inaktivierung vor, was sich klinisch in einer milden chronischen Thrombozytopenie bei kleinem und normalem Thrombozytenvolumen äußern kann (158-160), jedoch auch zu ausgeprägteren klinischen Bildern führen kann im Sinne des klassischen WAS, mit zusätzlicher Immundefizienz und Hautveränderungen (161-163).

Es konnte gezeigt werden, dass die fetalen HSC in der Leber von Überträgerinnen eine „random“-X-Inaktivierung aufwiesen, während dann im Knochenmark eine „non-random“-X-Inaktivierung beobachtet werden konnte. Ein Migrationsdefekt der HSC mit einem mutierten WASP-Allel, der den Transit dieser Zellen von der fetalen Leber zum Knochenmark verhindert, könnte die Ursache für die „random“-X-Inaktivierung bei manchen Überträgerinnen sein (52, 53).

2.9 Therapie

2.9.1 Symptomatische Therapie

Unbehandelte Patienten mit dem Vollbild des WAS haben eine schlechte Prognose.

In den letzten 25 Jahren haben sich jedoch verschiedene therapeutische Optionen aufgetan um das „outcome“ zu verbessern.

Die Splenektomie erhöht im allgemeinen die Thrombozytenzahl und reduziert das Risiko von größeren Blutungen (164). Die Effektivität der Splenektomie wurde in einer retrospektiven Studie an 39 Patienten beschrieben, die sich nicht einer Knochenmarkstransplantation unterziehen konnten und splenektomiert wurden. Die Splenektomie verlängerte hier entscheidend die Überlebensrate. Die Gruppe der Splenektomierten hatte ein mittleres Überlebensalter von 25 Jahren im Gegensatz zu weniger als fünf bis zehn Jahren bei unbehandelten WAS-Patienten (165). Allerdings erhöht sich nach Splenektomie das Risiko von lebensbedrohlichen Sepsen und sollte nur durchgeführt werden wenn es keinen anderen Ansatz für eine kurative Therapie gibt (166) (164, 167).

Da WAS Patienten üblicherweise einen Mangel an Antikörpern haben, kann bei Patienten mit häufigen Infektionen intravenös Gammaglobulin verabreicht werden um die Patienten vor Infektionen zu schützen (9, 164). Diese Therapie verändert nicht die Thrombozytenzahl aber es könnte die Inflammation reduzieren und somit das Risiko für Blutungen (168). Außerdem wurde ein erhöhter Katabolismus für Immunglobuline bei WAS-Patienten beschrieben (169). Immunisierung gegen *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Neisseria meningitidis* sowie prophylaktische Behandlung mit Antibiotika sollte durchgeführt bei splenektomierten Patienten, jedoch auch bei WAS-Patienten mit einer intakten Milz.

Mit dieser rein supportiven Therapie können einige WAS-Patienten das Erwachsenenalter erreichen (164, 165), obwohl ein Großteil der Patienten in einem Alter unter zehn Jahren verstirbt aufgrund von Blutungen und Infektionen (9, 170).

2.9.2 Kurative Therapie

2.9.2.1 Knochenmarkstransplantation

Die Knochenmarkstransplantation ist derzeit der einzig kurative Therapieansatz und zeigt gute Ergebnisse (fünf-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von 87%) bei der Transplantation von HLA-identischen Familienmitgliedern und bei jungen Patienten (in den ersten fünf Lebensjahren) von HLA-identischen Fremdspendern (171), mit allerdings weniger befriedigenden Ergebnissen bei nicht HLA-identischen Spendern, oder Empfängern älter als fünf Jahre (50-70%) (171) (165, 170). Eine weitere Stammzellquelle stellt HLA-identisches Nabelschnurblut von Familien- oder Fremdspendern dar und damit durchgeführte Transplantationen zeigten ebenfalls Erfolg in Einzelfällen (110, 172). Vorteile der Transplantation von Stammzellen aus dem Nabelschnurblut sind eine schnellere Erholung des Immunsystems, niedriges Risiko für GvHD (=graft versus host disease) und eine niedrige Virusübertragungsrate (172), einen Nachteil stellt die geringere Menge an verfügbaren hämatopoetischen Stammzellen dar.

Allerdings birgt die Knochenmarkstransplantation mit all ihren Komplikationen (Infektionen, graft versus host disease) ein hohes Risiko für Morbidität und Mortalität und sollte nur bei Patienten erwogen werden mit einem HLA-identischen Spender, in möglichst frühem Kindesalter und bei Patienten, deren Mutation die Entwicklung eines schweren klinischen Verlaufs befürchten lässt (147)

2.9.2.2 Gentherapie

Viele primäre Immundefekte werden verursacht durch Defekte in einzelnen Genen, exprimiert in Blutzellen. Die Zugabe einer korrekten Kopie des Gens in die hämatopoetischen Stammzellen kann zu Immunzellen mit wiederhergestellter Funktion führen. Hämatopoetische Stammzellen können dem Patienten entnommen werden, außerhalb des Körpers behandelt und dann zurückinfundiert werden. In den letzten Jahren konnten gute Ergebnisse mit der Transfektion von Genen über Retroviren in hämatopoetische Stammzellen in vitro und in klinischen Studien gezeigt werden (z. B. beim XSCID=X-linked severe combined immunodeficiency) (173).

Da häufig kein geeigneter Knochenmarksspender zur Verfügung steht, wurde als alternative kurative Therapie die Gentherapie auch bei WAS in präklinischen Studien in Mäuse- und menschlichen Zellkulturen versucht.

Veränderte X-Inaktivierung (non-random) bei weiblichen Überträgerinnen von WAS (174) und die Beobachtung von spontaner in-vivo Reversion von WASP Mutationen, die die WASP-Funktion wieder herstellten, verbunden mit einer klinischen Verbesserung des Phänotyps (175-177), zeigte einen selektiven Überlebens- oder Wachstumsvorteil für korrigierte lymphatische Zellen gegenüber WASP-defizienten Lymphozyten (11, 13, 173, 178, 179).

Evtl könnte schon eine nur zum Teil suffiziente Stammzelltransduktion ausreichen um eine gesunde Immunabwehr zu erhalten. Limitierter Gentransfer in ex vivo gebrachte T-Zellpopulationen könnten eine Rolle in der Verbesserung der Krankheitssymptome spielen. Ob die alleinige Wiederherstellung eines normalen T-Zellpools ausreichen würde um den Immundefekt adäquat zu behandeln ist allerdings unklar (11).

Um die Durchführbarkeit und Sicherheit der Gentherapie zu testen wurde bei WASP defizienten Mäusen, die genau wie WAS-Patienten eine fehlerhafte T-zellrezeptorinduzierte Proliferation und Zytoskelettveränderungen aufweisen (61, 70), eine Gentherapie durchgeführt (80). Hämatopoetische Stammzellen, gewonnen von WASP-defizienten Mäusen wurden transfiziert mit WASP-exprimierenden Retroviren und zurücktransferiert. Reife B- und T-Lymphozyten entwickelten sich in normaler Anzahl und die TCR-induzierte Proliferation war signifikant verbessert.

Menschliche WASP-defiziente T-Zellen (primäre (180) und HTLV-1(=human T lymphotropic virus-1) transformierte T-Zelllinien (181)) zeigten nach Transfektion mit retroviralen Vektoren, für WASP kodierend, eine WASP Expression, welches wiederum an SH3-enthaltende Proteine binden konnte (z. B. Grb2, Phospholipase C- γ 1 und Fyn). Jedes dieser Proteine ist für sich verbunden mit einem Signaltransduktionsweg der zur Aktinpolymerisation führt. Somit konnte die Aktinpolymerisation aktiviert werden nach anti-CD3 Stimulation, auch wenn die WASP-Spiegel niedriger waren als in gesunden T-Zellen. Die IL-2 Sekretion nach TCR-Stimulation konnte ebenfalls z. T. korrigiert werden (60, 180, 181).

Die gesunden Kontroll-T-Zellen, die mit dem gleichen retroviralen Vektor transfiziert wurden, antworteten normal auf TCR-Stimulation und zeigten keinen Anstieg der WASP-Expression (180). Obwohl transiente ektopische Überexpression von WASP assoziiert ist mit schweren Veränderungen im Aktinzytoskelett (21), scheint retroviral übertragene WASP-Expression diesen toxischen Effekt nicht zu haben (80, 180, 182, 183).

Viele weitere einzelne Zelldefekte bei WAS wie die Makrophagenmigration und die DC-Zytoskelettanordnung konnten in menschlichen und Mäusezellkulturen in vitro per Gentransfer korrigiert werden (112, 120, 176, 184).

Podosomenbildung, Migration/Chemotaxis und die Phagozytosefunktion konnten sowohl bei WASP-defizienten Makrophagen als auch Osteoklasten wiederhergestellt werden durch lentivirale Transfektion einer normalen Kopie des WAS-Gens (116, 120).

Retroviraler WASP-Gentransfer in B-Zellen konnte die Zelloberflächenanomalitäten der Glykoproteine und die defekte Aktinpolymerisation korrigieren (182, 183). Die Korrektur der Thrombozytenfunktionen wird einen effizienten Gentransfer in Stammzellpopulationen verlangen (12).

In all diesen präklinischen Studien konnte gezeigt werden, daß retrovirale Transduktion den immunologischen Defekt bei WASP-„knockout“-Mäusen und in menschlichen Zellkulturen korrigieren kann. Gentherapie in klinischen Studien ist jedoch bei WAS noch nicht durchgeführt worden (173). Klinisch wurde die Gentherapie bisher nur beim XSCID durchgeführt (s.o.). Dem anfänglich gutem Erfolge folgte jedoch das Auftreten von Leukämien in drei von 11 Fällen, vermutlich durch das Einbringen des retroviralen Vektors in oder nahe dem Onkogen LMO2. Dies zeigt, daß das Einbringen von retroviralen Sequenzen in das Genom große Risiken birgt, die in Zukunft sehr genau abgewogen werden müssen (173).

3 Genetische Untersuchungen zum Wiskott-Aldrich Syndrom

3.1 Mutationen im WAS-Gen und Genotyp-Phänotyp-Korrelation:

Literaturübersicht

Aufgrund des breiten Spektrums des klinischen Phänotyps und somit der Prognose für den einzelnen Patienten, wurden zahlreiche Studien durchgeführt um eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu erarbeiten. Diese Korrelation zwischen klinischem Phänotyp und spezifischen Mutationen wurde von einigen Autoren beschrieben (13, 110, 154, 185-187), andere konnten keine eindeutigen Korrelationen beobachten (188, 189).

Die WASP-Mutationen von mehr als 400 Patienten wurden bisher veröffentlicht (5, 7, 110, 138-140, 142, 149, 154, 175, 185, 186, 188-205).

243 verschiedene Mutationen im *WASP-Gen* von 441 Patienten/Überträgerinnen, WASP-Expression und Phänotypen sind aufgelistet in einer „online“-Datenbank (206). Dies ist die derzeit aktuellste und umfassendste Datenbank für WASP-Mutationen und deren klinischen Phänotyp.

Eine einfache Einteilung von Symptomen in einem Punktesystem (154, 207) erlaubt die Einschätzung der Schwere des Phänotyps.

	XLT	aWAS	aWAS	WAS	WAS
Score	1	2	3	4	5
Thrombozytopenie	+	+	+	+	+
Immundefizienz	-	- / +	+	++	- / +
Ekzem	-	- / +	+	++	- / +
Autoimmun- oder maligne Erkrankung	-	-	-	-	+

Tabelle 2: Score-Tabelle Imai (13) Die Einteilung der Symptome in ein Punktesystem/Scoresystem erlaubt die Einschätzung der Schwere des Phänotyps. (- = nicht vorhanden, + = vorhanden, ++ = ausgeprägt vorhanden, XLT = X-linked Thrombozytopenie, aWAS = attenuiertes/abgeschwächtes Wiskott-Aldrich Syndrom)

Alle außer vier der bisher veröffentlichten Patienten mit *WASP*-Mutationen (zwei mit intermittierender XLT, zwei mit XLN) zeigten chronische Mikrothrombozytopenien, welches ein gemeinsames Symptom von WAS (mit Immundefekt, score 3,4) und XLT (ohne Immundefekt, score 1,2) ist.

In einer älteren Studie konnte gezeigt werden, daß unabhängig von der unterschiedlichen Expression von *WASP* in den Lymphozyten, alle Thrombozyten der untersuchten Patienten (18 verschiedene Patienten, WAS und XLT) *WASP*-negativ waren. Das Fehlen von *WASP* in den Thrombozyten ist die molekulare Erklärung für die Thrombozytendysfunktion (121).

Die beiden oben genannten klinischen Phänotypen ohne chronische Mikrothrombozytopenie mit zugrunde liegenden Aminosäureaustausche im *WASP*-Protein wurden kürzlich beschrieben: Zwei italienische Familien in denen die betroffenen Männer sich mit lediglich intermittierender Thrombozytopenie präsentierten, hatten Punktmutationen in Exon 2 (P58R) und Exon 11 (I481N) (142). Die betroffenen Patienten zeigten zum Teil normale Thrombozytenzahlen, gefolgt von Episoden mit Thrombozytopenie bei reduziertem Thrombozytenvolumen. Die Punktmutationen betreffen die PH/WH1/EVH1 und die CH-Domäne. In den B-Zellen und den Thrombozyten der betroffenen Männer konnte eine normale Menge an *WASP*-Protein nachgewiesen werden.

Die beiden Familien mit X-chromosomaler Neutropenie und einem Reifungsstopp auf Promyelozyten/Myelozyten-Ebene ohne Mikrothrombozytopenie oder Ekzem hatten einzelne Aminosäureaustausche in der GBD-Domäne (Exon 2: L270P und I294T) (6, 143), die zu einer Aufhebung der Autoinhibition von *WASP* führen. Die *WASP*-Expression wurde hier nur in EBV-transformierten B-Zelllinien untersucht, wobei sich im Vergleich zum Gesunden eine normale Menge an *WASP*-Protein fand (siehe Kapitel 2.4).

46% der oben genannten 441 Patienten haben Mutationen, die zu einem schwer trunkierten Protein führen (Stopmutationen, Deletionen, Insertionen mit Leserasterverschiebung), 42% haben Punktmutationen, die lediglich zu einzelnen Aminosäureaustauschen führen und 12% haben Spleißmutationen (13, 110).

Verteilung und Häufigkeit der Mutationen gespeichert in der WASPbase

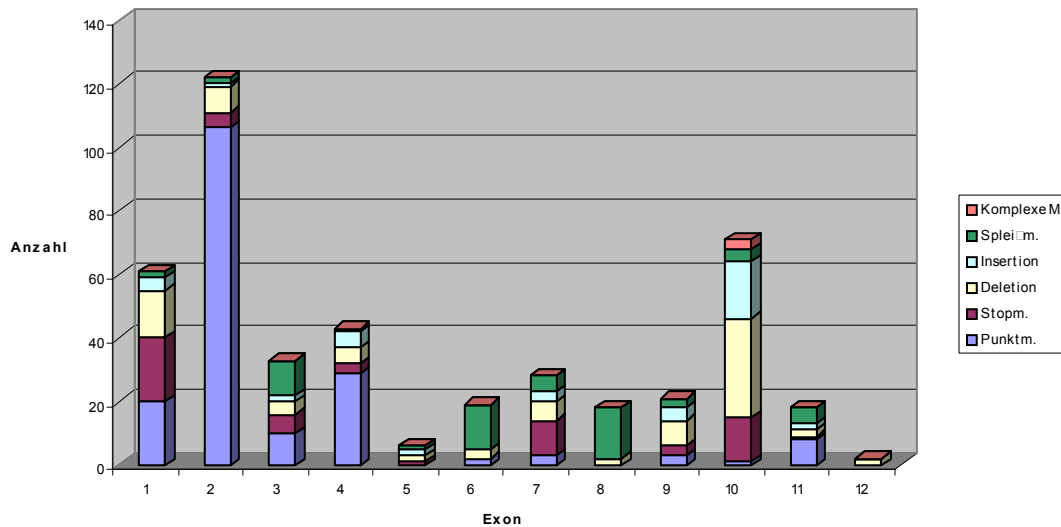


Abbildung 6: Verteilung und Häufigkeit der Mutationen zusammengestellt in der WASPbase (206)

Die meisten Punkt- und Stopmutationen liegen am N-terminalen Ende des Gens. Diese Region kodiert für die PH/WH1/EVH1-Domäne des WAS-Proteins (23, 193). Die EVH1-Domäne beinhaltet die Bindungsdomäne für WIP. Obwohl ursprünglich postuliert wurde, dass die PH/WH1-Domäne nur ein kurzes prolinreiches Polypeptid auf WIP erkennt und bindet, konnte in einer neueren Studie gezeigt werden, dass WIP entlang einer ausgedehnteren Strecke auch an EVH-1 bindet (45). Mutationen im hydrophoben Kern der PH/WH1/EVH1-Domäne können also die WIP-Bindungsstelle verändern, was zu einer gestörten WIP-WASP-Interaktion führen sollte (208). Durch diese Störung könnte die richtige Positionierung von WASP und die anschließende Aktinpolymerisation verhindert werden. Allerdings ist noch unklar, wie Mutationen, die einen ähnlichen biochemischen Effekt haben, zu unterschiedlicher klinischer Ausprägung führen können. In einer Studie zum Beispiel wurden zwei erwachsene Brüder mit schwerer kongenitaler Mikrothrombozytopenie untersucht. Es zeigte sich ein einzelner Basenaustausch in Exon 4 resultierend in einer Substitution von Prolin statt Arginin (R138P). Dies führt zu einer verminderten Expression oder verminderten Stabilität des WAS-Proteins und es konnte gezeigt werden, daß diese Mutation signifikant aber nicht komplett die Interaktion von WASP und WIP störte (wohingegen dies bei der Substitution durch Alanin oder Glutamin in derselben Position nicht der Fall war) (209).

Ein Teil der Antwort könnte sein, dass die einzelnen Mutationen in dieser Domäne zu unterschiedlich ausgeprägter Störung der Bindungsmöglichkeit mit WIP führen. Störung anderer EVH1-Funktionen, wie der Regulierung der Transkriptionsaktivität könnten ebenfalls eine Rolle spielen (12, 45).

Der Großteil (86,4%, bezogen auf WASPbase) der trunkierenden Mutationen (einige Nonsensemutationen, Deletionen, Insertionen) und Spleißmutationen (89,8%, bezogen auf WASPbase) führen zur klassischen Form des WAS und dominieren am C-terminalen Ende (4, 13, 23).

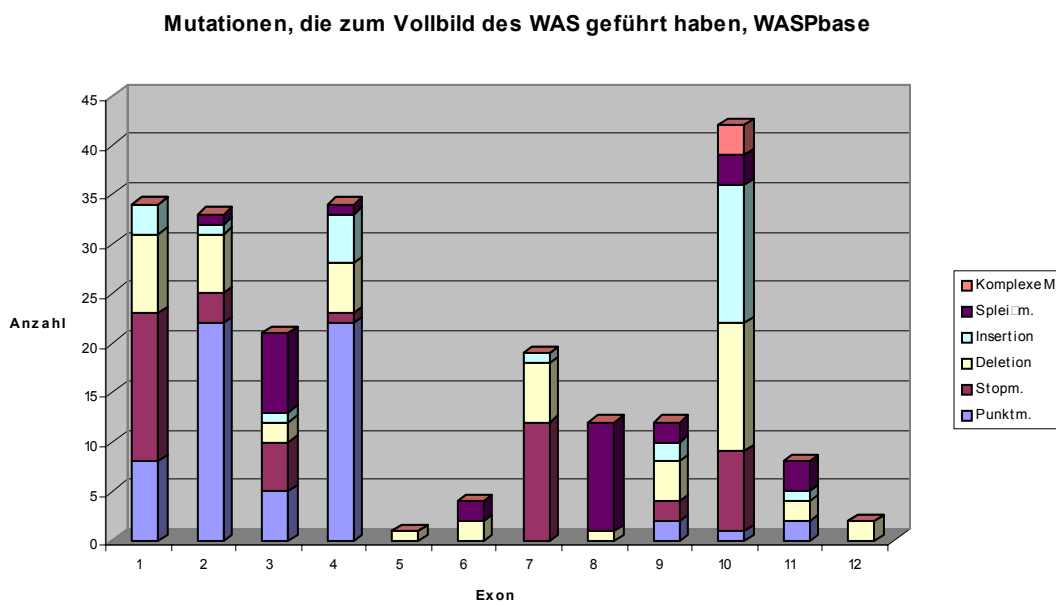


Abbildung 7: Mutationen, die zum Vollbild des WAS geführt haben, gespeichert in der WASPbase (206)

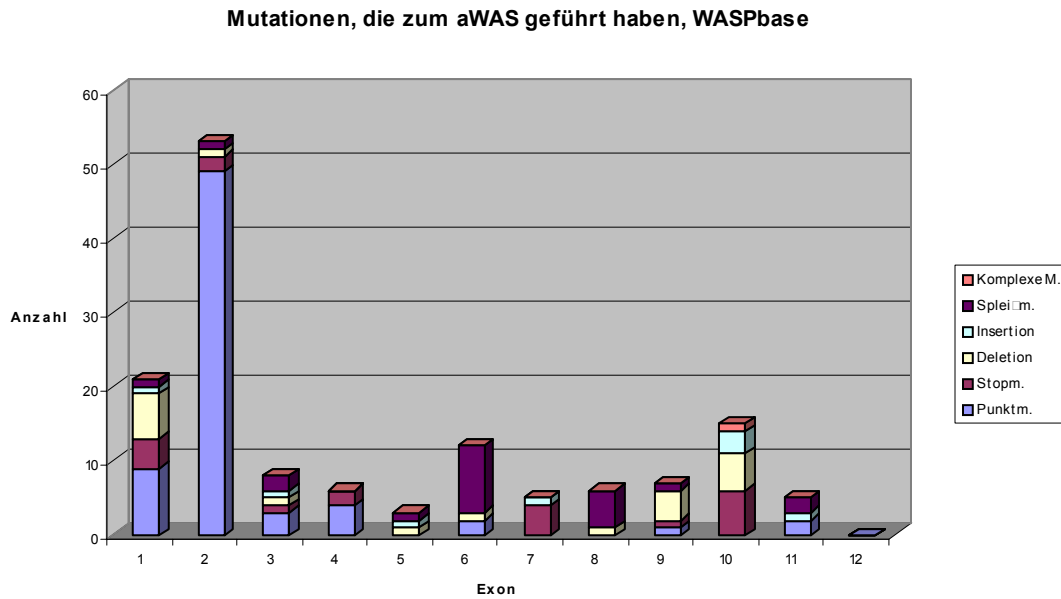


Abbildung 8: Mutationen, die zum aWAS geführt haben, gespeichert in der WASPbase (13)

Obwohl der Großteil der XLT-Patienten (74,6%, 88 von 118 Fällen, bezogen auf WASPbase) Punktmutationen hat, die in einzelnen Aminosäureaustauschen resultieren, zeigt nur die Hälfte aller Patienten mit Punktmutationen den XLT-Phänotyp (52,7%, 88 von 167 Fällen, bezogen auf WASPbase). Dies suggeriert, dass auch Punktmutationen in einem schwer trunkierten WAS-Protein resultieren können, und dann meist im klassischen Vollbild des WAS (13, 110). Punktmutationen, die das N-terminale Ende betreffen, bewirken jedoch üblicherweise nur eine leichte funktionelle Einschränkung des WAS-Proteins und führen zu XLT (13).

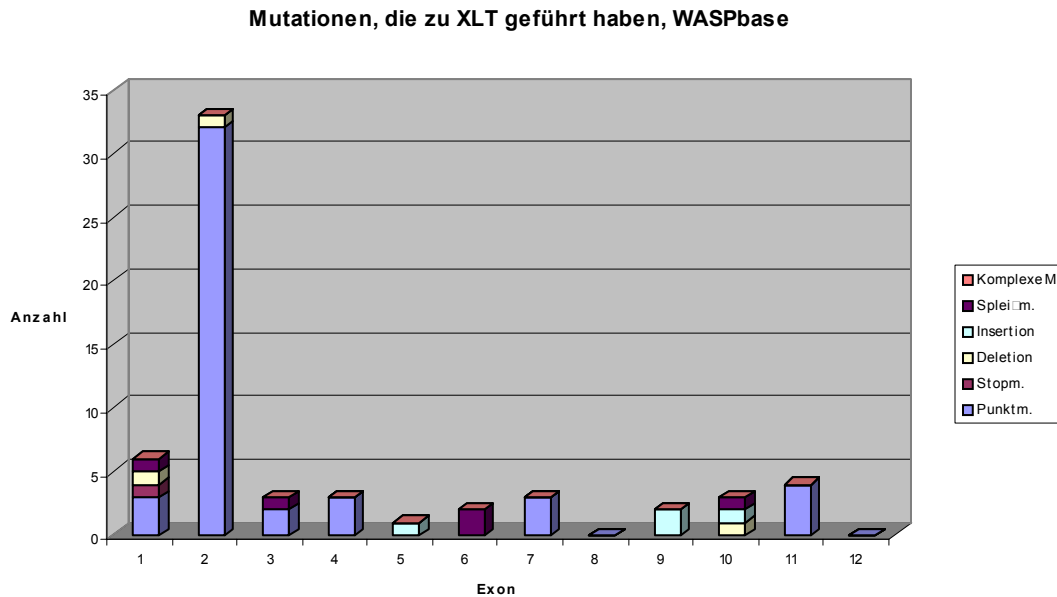


Abbildung 9: Mutationen, die zu XLT geführt haben, gespeichert in der WASPbase (206)

Von Imai et al. wurde beobachtet, dass die WASP-Expression am besten korreliert mit dem klinischen Phänotyp: 74,2% (bezogen auf WASPbase) der Patienten mit positiver WASP-Expression in den Lymphozyten zeigten den XLT-Phänotyp und 86,5% (bezogen auf WASPbase) der Patienten mit negativer WASP-Expression präsentierten sich mit dem Vollbild des WAS (13, 110). So ist z. B. die Bildung der „lipid rafts“ und der Kalziumeinstrom in T-Lymphozyten von Patienten mit klassischem WAS mehr beeinträchtigt als in den T-Zellen der Patienten mit XLT, die noch eine residuelle Expression von WASP haben (60).

In einer kürzlich durchgeführten Studie evaluierte diese Arbeitsgruppe den klinischen Phänotyp, den Genotyp und die WASP-Expression in einer großen Kohorte von 50 japanischen WAS-Patienten. Anfälligkeit für Infekte, ausgeprägte Ekzeme, intestinale Blutungen, Tod durch intrakranielle Blutungen und Malignome waren stark assoziiert mit WASP-negativen Lymphozyten der Patienten. Die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit und die Überlebenswahrscheinlichkeit ohne intrakranielle Blutungen war signifikant niedriger bei WASP-negativen Patienten. Diese Beobachtungen suggerieren, daß der klinische Verlauf stark korreliert mit dem Vorhandensein von WASP (110).

Alle Patienten mit Punktmutationen in dieser Studie waren WASP-positiv. Im Unterschied dazu waren Patienten mit Stopmutationen, großen und kleinen Deletionen und kleinen Insertionen WASP-negativ. Patienten mit Spleißmutationen waren entweder WASP-positiv oder WASP-negativ. Diese

Daten sprechen für eine starke Korrelation von Genotyp und Phänotyp und zeigen, dass die WAS-Proteinexpression einen hilfreichen Prognoseindikator bei WAS/XLT darstellen könnte (110).

Am häufigsten von Aminosäureaustauschen ist die Position R86 betroffen. Allerdings konnte aus den bisher veröffentlichten Daten hier keine klare Korrelation von Genotyp, Proteinexpression und Phänotyp gezeigt werden, da 42% (14 von 33 Fällen, bezogen auf WASPbase) der Patienten mit R86C oder R86H Mutationen zwar WASP-positiv waren, aber den klassischen WAS-Phänotyp zeigten (13, 189). Interessanterweise ist R86 ein wichtiger Ort für eine effektive WIP-WASP Interaktion (23, 45, 208) (s.o.).

Im Gegensatz dazu konnten zwei große Zentren, die das gleiche „Score“-System wie oben beschrieben benutzten, beobachten, dass von 19 Patienten aus 17 unverwandten Familien mit Aminosäureaustauschen R86 betreffend, ein Patient einen Score von 3 hatte (WAS-Phänotyp), zwei einen Score von 2-3 und die verbleibenden 16 Patienten sich klinisch mit dem XLT-Phänotyp präsentierten mit einem Score von 1 (3 Patienten) und 2 (13 Patienten). Alle außer zwei hatten nachweisbares WASP, obwohl die Menge reduziert war (L. Notarangelo, H.D. Ochs, unveröffentlichte Daten) (13).

Wenn man die Patienten mit einer R86 Mutation herausnimmt, verbessert dies die Korrelation zwischen Mutationstyp, dem Vorhandensein von WASP und dem Phänotyp: 83,3% (bezogen auf WASPbase) der Patienten mit einzelnen Aminosäureaustauschen (außer R86), die WASP-positiv sind, zeigen den XLT-Phänotyp (13).

Autoimmunerkrankungen sind eine häufige Komplikation beim Vollbild des WAS (9, 145, 146). Die Inzidenz liegt bei 40% in der einen Studie (9) und bei 72% in einer anderen (145). In einer der Studien von Imai et al. in der die Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei 50 japanischen WAS-Patienten untersucht wurde, zeigten 22% (6/27) der Patienten mit dem Vollbild des WAS Autoimmunerkrankungen und zwei der sechs Patienten entwickelten Malignome. Obwohl einige Fälle von Autoimmunerkrankungen bei XLT berichtet wurden, ist die genaue Inzidenz dieser Komplikation bei XLT unbekannt. Von den 23 japanischen Patienten mit dem XLT-Phänotyp und residueller Proteinexpression bzw. Proteinfunktion hatten sechs (26%) eine Autoimmun- oder inflammatorische Erkrankung, fünf davon eine IgA-Nephropathie (13, 110) (siehe Kapitel 2.5).

Eine deutlich erhöhte Inzidenz an Lymphomen wurde kürzlich berichtet bei WAS/XLT-Patienten mit Spleißmutationen, Stopmutationen und anderen Mutationen, die zu einer Leserasterverschiebung führen, im Gegensatz zu Punktmutationen. Das höchste Lymphomrisiko (44%) scheint jedoch

verursacht zu sein durch eine einzelne Spleißmutation, die ansonsten mit einem milden Phänotyp assoziiert ist (Intron 6 (+5), g->a (147) (siehe Kapitel 2.6). Allerdings handelt es sich hier um sehr geringe Fallzahlen ohne statistische Relevanz.

In der aktuellsten Studie zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation von Jin et al. (187) wurden 141 WASP-Mutationen in 227 unverwandten Familien identifiziert, von denen 71 vorher noch nicht publiziert waren (Vorbeschrieben:(5, 7, 110, 138-140, 142, 149, 154, 175, 185, 186, 188-205)).

Die meisten Mutationen bestanden aus einzelnen Nukleotidsubstitutionen, kleinen Insertionen und Deletionen und Spleißmutationen und waren verteilt über die kodierenden Regionen und die Intron-Exon Übergänge. Ausgenommen einer großen Deletion im 5'UTR, die Exon 1 und 2 einschloss (del 5'UTR[-719]-intron 2+1), wurden keine Mutationen außerhalb von kodierenden Regionen gefunden.

Wie in früheren Studien bereits beobachtet (5, 7, 110, 140, 154, 185, 186, 188-191, 193, 196, 200, 204), waren die vorherrschenden Mutationen Punktmutationen, die typischerweise in den Exons 1-4 lokalisiert waren. Nur fünf Punktmutationen, jeweils eine in Exon 7,8,9,10 und 11, wurden nach Exon 4 beobachtet.

Der zweithäufigste Mutationstyp waren Spleißmutationen und diese traten vorwiegend in der zweiten Hälfte des *WASP-Gens* (Introns 6-11) auf, ähnlich wie in früheren Studien beschrieben (110, 154, 185, 186, 193). Die Mutationen betrafen verschiedene Spleißorte resultierend in vielen Spleißprodukten und führten oft zu kleinen Mengen an strukturell normalem WASP.

Insertionen und Deletionen resultierten mit zwei Ausnahmen in einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigem Stop der Translation. Komplexe Mutationen waren selten und beinhalteten Doppel-Punktmutationen, Punktmutationen gefolgt von einer Deletion oder Kombinationen aus Deletionen und Insertionen.

Von den fünf gefundenen „Hotspots“ (=Orte in der DNA an denen vermehrt Mutationen auftreten), waren drei assoziiert mit einem mildem Verlauf der Erkrankung: Die Substitution von Arginin an der Position 86 (R86) durch eine von fünf verschiedenen Aminosäuren, wurde am häufigsten beobachtet (17 Familien), gefolgt von dem Austausch von Threonin durch Methionin an Position 45 (T45M, sieben Familien) und der Spleißmutation IVS6+5g->a die reduzierte Mengen an strukturell verändertem WASP generierte (sechs Familien). Die anderen beiden „Hotspot“-Mutationen, die Stopmutation R211X und die Spleißmutation (IVS8+1g->n), beide nachgewiesen in jeweils zehn Familien, waren vorherrschend assoziiert mit dem klassischen WAS-Phänotyp.

Es gab keine Assoziation zwischen ethnischer Herkunft oder geographischer Herkunft und es ist unklar, warum diese fünf „Hotspot“-Mutationen in mehr als 20% der hier untersuchten WAS/XLT-Familien vorkamen. Es könnte sein, dass diese Sequenzen zu Fehlern in der DNA-Replikation neigen. Die alternative Erklärung, dass diese „Hotspots“ natürlich vorkommende Polymorphismen repräsentieren, ist sehr unwahrscheinlich, da keine anderen Mutationen innerhalb des WASP-Gens identifiziert werden konnten bei diesen WAS/XLT-Familien und keine dieser „Hotspot“-Mutationen beobachtet wurde in mehr als 300 normalen X-Chromosomen, in denen WASP sequenziert wurde.

Um eine Genotyp/Phänotyp-Korelation zu erarbeiten, wurden die Patienten eingeteilt in zwei Kategorien: WASP-positiv, wenn das Protein vorhanden war und WASP-negativ wenn das Protein fehlte oder funktionell stark eingeschränkt war. Patienten mit Mutationen, die die Expression von normal großem Protein erlaubten, entwickelten den XLT-Phänotyp, während die Patienten, deren Lymphozyten WASP nicht exprimieren konnten oder lediglich eine funktionell stark eingeschränkte Form des WASP, entwickelten eher den klassischen WAS Phänotyp ($p < 0,001$). Die klinischen Symptome wurden in ein Punktesystem ähnlich dem oben gezeigten eingeteilt.

Score

0-1	intermittierende Thrombozytopenie
1	isolierte Mikrothrombozytopenie
2	Mikrothrombozytopenie +lokalisiertes Ekzem, gut behandelbar/ +unkomplizierte IDOL
2-3	Mikrothrombozytopenie +persistierendes Ekzem/+Infektionen mit antibiotischer Behandlung
3	Mikrothrombozytopenie +Ekzem +Infektion mit antibiotischer Behandlung
4	Mikrothrombozytopenie +schwer behandelbaren Ekzem(/)+schwere lebensbedrohliche Infektionen
5	WAS/XLT +Autoimmunerkrankung/maligne Erkrankung

Tabelle 3: Scoretabelle Jin (187)

Vorhandensein eines Scores von 5 mit entweder einer Autoimmunerkrankung oder einem Malignom wurde in beiden Gruppen beobachtet, jedoch deutlich häufiger bei WASP-negativen Patienten. Von den 248 untersuchten Patienten, deren klinische Information eine Einteilung in das Punktesystem erlaubte, zeigten 53 (meist Stop- oder Spleißmutationen resultierend im Fehlen von WASP) einen Score von 5, aufgrund von Autoimmunerkrankungen oder Malignität. Nur sechs der 53 Patienten mit einem Score von 5 hatten Punktmutationen von denen alle außer einer in Exon 4 lagen und kein

WASP exprimierten.

Auch aus dieser Studie kann gefolgert werden, dass der klinische Phänotyp von WAS oder XLT, schwer oder mild, stark abhängt von dem Effekt der Mutation auf die Proteinexpression bzw. -funktion. Die Häufigkeit und Schwere von Infektionen, das Ausmaß von Ekzemen und die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen oder Malignomen korreliert, wenn auch nicht ohne Ausnahmen, mit dem Vorhandensein von WASP in den Lymphozyten. Patienten mit Punktmutationen, die in einzelnen Aminosäureaustauschen resultieren und somit die Expression von mutiertem WASP erlauben, oder mit Spleißmutationen, die in mehreren Produkten resultieren und kleine Mengen an WASP exprimieren, präsentieren sich häufig mit dem milderen XLT-Phänotyp wohingegen Mutationen, die zu einer Leserasterverschiebung führen häufig zu fehlender Proteinexpression bzw. -funktion und zum Vollbild des WAS führen. Wie bereits beschrieben gibt es jedoch Ausnahmen und manche Überlappungen, vor allem bei Kindern unter zwei Jahren (Autoimmunerkrankungen und Malignität treten meist später auf), die es dem behandelnden Arzt schwer machen, das endgültige „Outcome“ bei einem neu diagnostizierten WAS-Patienten aufgrund der Mutation vorherzusagen (187).

3.2 Die Mutation in der erstbeschriebenen Familie

Prof. Dr. Alfred Wiskott war in den 30er Jahren als Oberarzt am Dr. v. Haunerschen Kinderspital in München tätig. In den Jahren 1939-1967 übernahm er als Direktor die Leitung der Kinderklinik. Im Jahr 1936 beschrieb er erstmals ein Krankheitsbild, welches er bei drei Brüdern beobachtet hatte und das sich durch erhöhte Blutungsneigung, auffällige Anergie und Resistenzlosigkeit gegenüber Infekten und einer Ekzemkonstitution der Haut darstellte (1).

Wie im ersten Teil der Arbeit dargestellt, konnte er durch genaue klinische Beobachtung und Dokumentation eine detaillierte Übersicht über dieses Krankheitsbild geben.

Da die Aufzeichnungen zu den erstbeschriebenen Patienten noch vorhanden sind, war es möglich, Kontakt zu den Nachfahren der Familie aufzunehmen. Freundlicherweise erhielten wir von einigen Familienmitgliedern Blutproben zur molekulargenetischen Untersuchung auf eine Mutation im *WASP-Gen*. Erfreulicherweise bekamen wir auch Blutproben einiger der Schwestern der erstbeschriebenen „WAS-Brüder“ (siehe Abbildung 10: Bruder 1-3, III/3, III/4, III/5) zur Verfügung

gestellt. Bei einer der Schwestern (siehe Abbildung 10: III/10) konnte eine Deletion im Exon 1 (2 bp Deletion an Position 73 und 74, c.73-74delAC nach der neuen Nomenklatur) nachgewiesen werden, die zu einer Leserasterverschiebung ab Aminosäure 25 führt und nach 12 Aminosäuren in einem Stopcodon resultiert (p.Thr25ProfsX12, neue Nomenklatur). Diese Mutation kann somit bei den erstbeschriebenen Jungen zum Vollbild des WAS geführt haben.

Die Mutation ist in der WASPbase noch nicht vorbeschrieben. Es ist eine Deletion in Exon 1, was einerseits der Theorie entspricht, dass schwere Mutationen auch zu einem schwereren Verlauf der Erkrankung führen, allerdings widerspricht es der Theorie, dass schwerere Mutationen eher C-terminal liegen (siehe oben).

Bei einem Nachfahren der Familie (siehe Abbildung 10: V/1), der kein direkter Nachkomme von III/10 ist, konnte die gleiche Mutation in Exon 1 nachgewiesen werden. Da der Familie aufgrund genetischer Beratung der Erbmodus und somit die Möglichkeit einer Erkrankung männlicher Nachkommen bekannt war, konnte die Diagnose bei ihm sehr früh gestellt werden und er konnte bereits im zweiten Lebensjahr von einem nicht verwandten HLA-identischen Fremdspender erfolgreich knochenmarkstransplantiert werden. Daher lässt sich keine Angabe zum Verlauf der Schwere der Erkrankung bei ihm machen.

Da die Mutation bei zwei nicht direkt verwandten Familienmitgliedern nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass es sich bei der bei III/10 gefundenen Mutation nicht um eine Spontanmutation handelt, sondern um die bei den erstbeschriebenen Brüdern zur Krankheit führende Mutation. Es konnte hier also die Mutation nachgewiesen werden, die verantwortlich war für die Erkrankung der erstbeschriebenen Patienten mit Wiskott-Aldrich Syndrom (210).

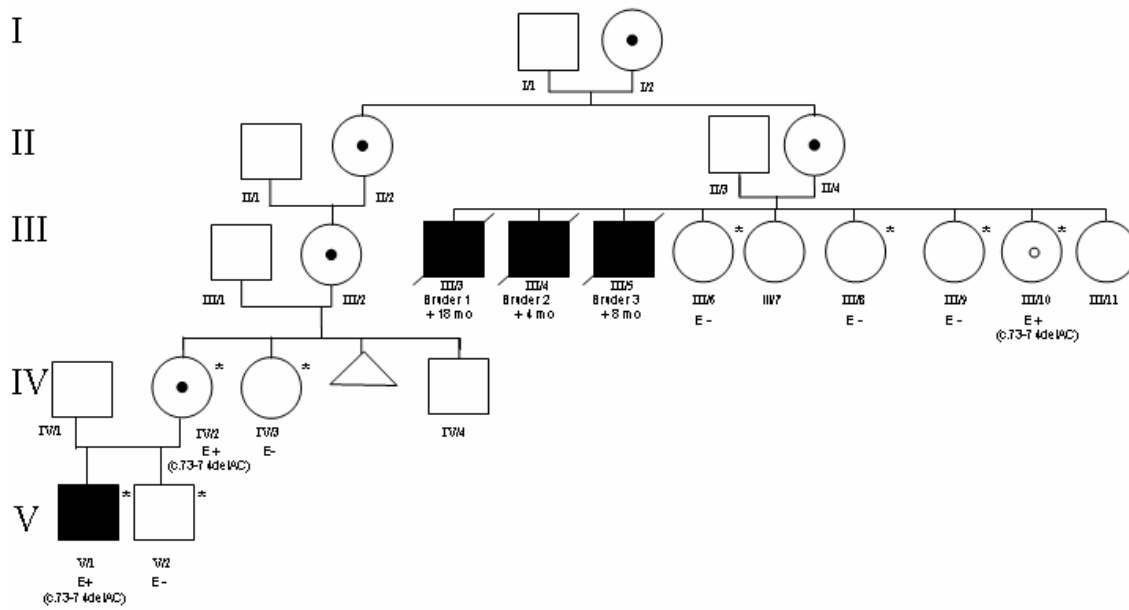


Abbildung 10: Stammbaum der von Wiskott erstbeschriebenen Patienten

3 Mutationen im WAS-Gen und Genotyp-Phänotyp-Korrelation: Daten des genetischen Labors der LMU München

In den Jahren 1995-2004 wurden in dem genetischen Labor der Ludwig-Maximilians Universität in München unter der Leitung von Prof. Meindl 53 verschiedene Patienten mit einer Mutation im *WASP-Gen* identifiziert.

Ca. 38% der Mutationen (jeweils 10/53) liegen in Exon 1 oder 2. Neun der 53 (17%) Mutationen liegen im Exon 10 (welches das längste der 12 Exons ist: bp 966-1372).

Die restlichen Mutationen teilten sich wie folgt auf: fünf Mutationen in Exon 3, vier Mutationen in Exon 4, fünf Mutationen in Exon 6, vier Mutationen in Exon 7, zwei Mutationen in Exon 8, drei Mutationen in Exon 9 und eine Mutation in Exon 11. In Exon 5 und 12 wurden keine Mutationen nachgewiesen.

Verteilung und Häufigkeit der Mutation erhoben durch das Labor für Genetik der LMU München

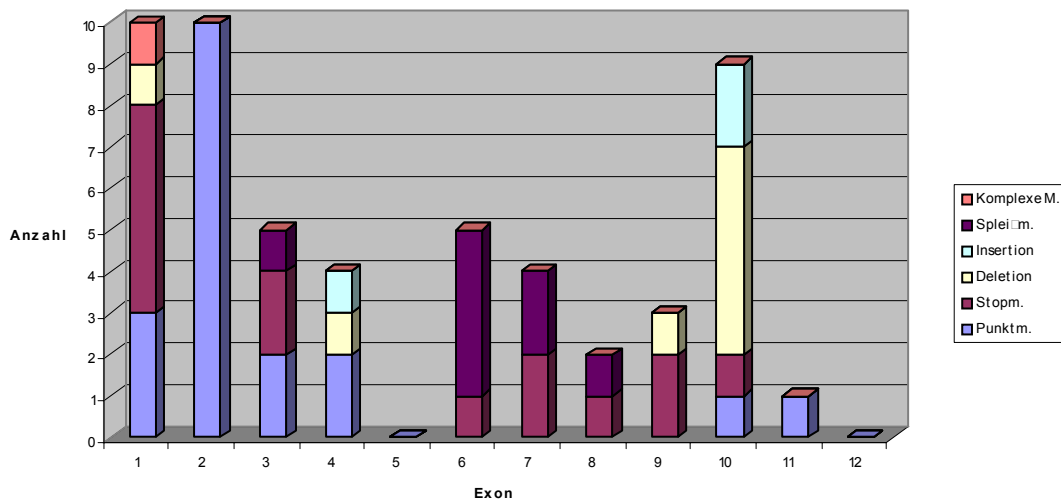


Abbildung 11

Die am häufigsten nachgewiesene Art von Mutation waren Punktmutationen. Insgesamt wurden 19 (36%) Punktmutationen gefunden, von denen drei im ersten Exon liegen, zehn (52,5%) in Exon 2, zwei in Exon 3, zwei in Exon 4, und jeweils eine in Exon 10 und 11.

Stopmutationen waren mit 26% (14/53) der zweithäufigste Mutationstyp, wobei fünf im Exon 1 lagen, zwei in Exon 3, eine in Exon 6, zwei in Exon 7, eine in Exon 8, zwei in Exon 9 und eine in Exon 10.

Mit je 8/53 (15%), waren Spleißmutationen und Deletionen gleich häufig gefunden worden. Von den Deletionen befand sich eine in Exon 1, eine in Exon 4, eine in Exon 9 und fünf in Exon 10.

Die Spleißmutationen befanden sich eher in den mittleren Introns (eine im Intron 3, vier im Intron 6, zwei im Intron 7 und eine im Intron 8).

Von den drei (ca. 6%) gefundenen Insertionen zeigte sich eine im Exon 4 und zwei im Exon 10.

Die einzige komplexe Mutation (Deletion+Insertion) wurde im Exon 1 nachgewiesen.

„Hotspots“ (hier: mehr als einmal bei unverwandten Patienten nachgewiesen) waren R13X (3x), R86C (3x), R86H (2x), V75M (2x), R211X (2x), E31K (2x) und die Spleißmutation Intron 6+5 g->a (4x).

Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation konnte hier nur aufgrund der (oft unvollständigen) klinischen Angaben im Anforderungsschreiben an das genetische Institut erarbeitet werden. Die Einteilung wurde vorgenommen anhand klinischer Angaben über Infektanfälligkeit, Thrombozytenzahlen und Ekzemneigung. Informationen über die WASP-Expression bei den einzelnen Patienten lagen nicht vor. Ebenso gab es in den meisten Fällen keine Angaben zu Lymphozytenstimulationstests, Immunglobulinstatus oder Thrombozytengröße. In die Gruppe mit dem Vollbild des WAS wurden Patienten eingeteilt, bei denen aufgrund der klinischen Angaben eindeutig eine erhöhte Infektanfälligkeit mit schweren Infektionen und eine ausgeprägte Thrombozytopenie (<50.000/ μ l) vorlag in frühem Kindesalter (< 5 Jahre) mit oder ohne Ekzembereitschaft, oder die aufgrund einer schweren Infektion oder Blutung bereits verstorben waren. In die Gruppe mit aWAS (=abgeschwächtes WAS) wurden Patienten eingeteilt, die eine erhöhte Infektanfälligkeit ohne schwere Infektionen und eine chronische Thrombozytopenie mit oder ohne Ekzembereitschaft zeigten. In die Gruppe mit XLT wurden Patienten eingeteilt, bei denen lediglich eine chronische Thrombozytopenie beschrieben wurde. Es zeigte sich, dass insgesamt 27 Mutationen (51%) zum Vollbild des WAS bei den hier erfassten Patienten führten. Zehn davon (37%) waren Punktmutationen von denen wiederum fünf (50%) im Exon 2 lagen, drei (30%) im Exon 4, und jeweils eine in Exon 1 und 10.

Acht (30%) Stopmutationen führten zum Vollbild des WAS. Drei (38%) davon lagen im Exon 1, eine im Exon 3, zwei im Exon 7 und jeweils eine in Exon 8 und 9. Vier Deletionen (15%) führten

zu einem WAS-Phänotyp, von denen jeweils eine in Exon 4 und 9 und zwei im Exon 10 liegen. Weiterhin wurden in der WAS-Gruppe noch drei Spleißmutationen (11%) nachgewiesen (einmal in Intron 3, einmal in Intron 7 und einmal im Exon/Intron 8), sowie zwei (7%) Insertionen (jeweils einmal in Exon 1 und 10).

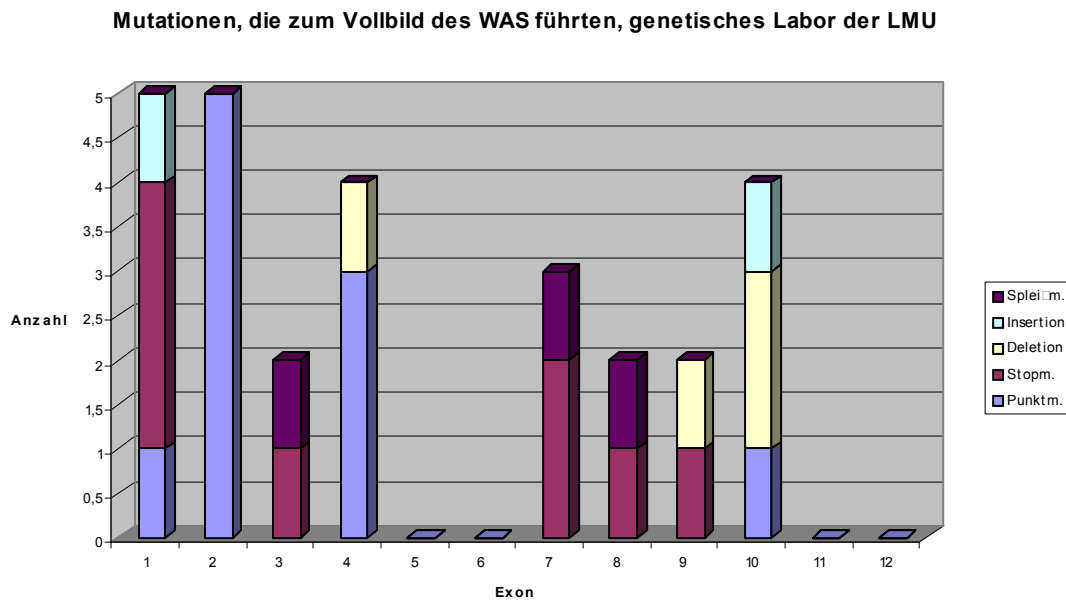


Abbildung 12

17 von den insgesamt 53 Mutationen (32%) führten zum Phänotyp des aWAS. Hier waren die am häufigsten vertretenen Mutationen Punkt- und Spleißmutationen (jeweils $4/17=23,5\%$). Von den Punktmutationen befanden sich eine im Exon 1, zwei im Exon 2 und eine im Exon 3. Es wurde viermal die gleiche Spleißmutation im Intron 6 in vier unverwandten Familien nachgewiesen.

Es wurde dreimal eine Stopmutation (17,5%) nachgewiesen, die zum Phänotyp des aWAS führte (jeweils eine im Exon 3, 9 und 10). Außerdem führten noch drei Deletionen (17,5%) zu diesem Phänotyp (dreimal in Exon 10), ebenso wie zwei Insertionen (jeweils einmal in Exon 4 und 10).

In dieser Gruppe zeigte sich die einzige nachgewiesene komplexe Mutation (Deletion+Insertion) im Exon 1.

Mutationen, die zum aWAS geführt haben, genetisches Labor der LMU

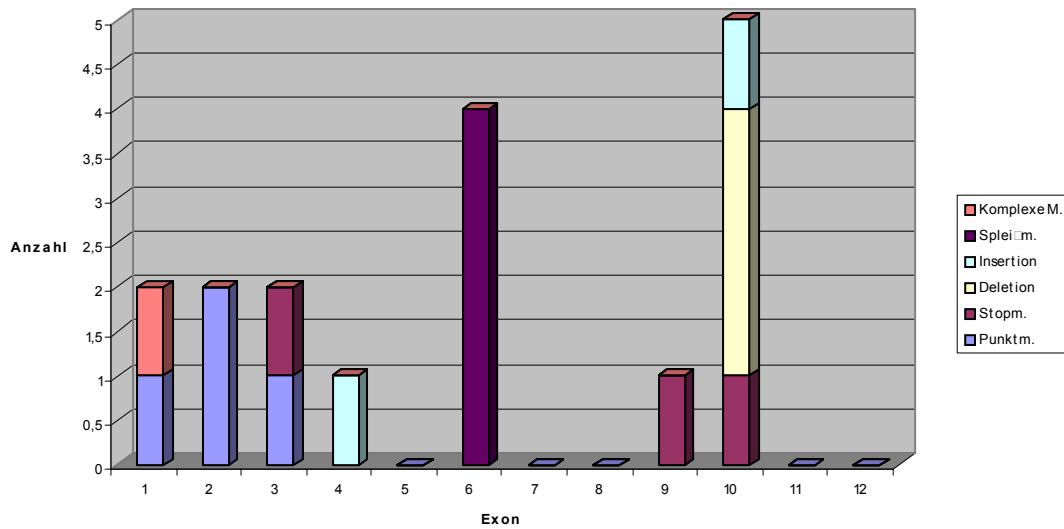


Abbildung 13

Insgesamt führten nur drei der 53 Mutationen (ca. 6%) zum XLT-Phänotyp. Zwei davon waren Punktmutationen und lagen im Exon 2, eine war eine Spleißmutation im Intron 7.

Mutationen, die zu XLT geführt haben, genetisches Labor der LMU

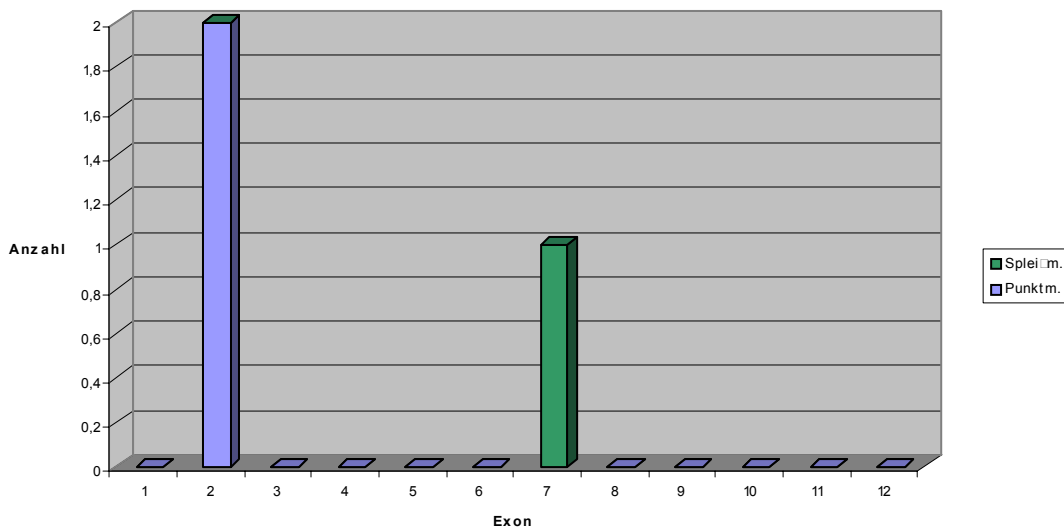


Abbildung 14

Sechs Mutationen konnten keinem eindeutigen Phänotyp zugeordnet werden. Vier davon waren Überträgerinnen, bei denen keine Informationen zum Indexpatienten vorlagen. Eine Mutation wurde aus dem Material einer Chorionzottenbiopsie nachgewiesen. Auch hier gab es keine

Angaben zum Indexpatienten. Eine Variante (P460S in Exon 11) wurde bei der asymptomatischen Schwester eines Patienten (mit der Mutation V75M) nachgewiesen im Rahmen der Überträgerinnendiagnostik. Da die Mutter der beiden Überträgerin der Mutation V75M ist, diese Mutation bei der Tochter jedoch nicht gefunden werden konnte, muß davon ausgegangen werden, dass ihr die Mutation vom Vater vererbt wurde. Es handelt sich hier vermutlich um einen Polymorphismus.

Einige, der im genetischen Institut der Ludwig-Maximilians Universität nachgewiesenen Mutationen sind bisher noch nicht in der WASPbase beschrieben:

EXON :	MUTATION :	PHÄNOTYP :
Exon 1	69 InsG 141/2 DelCA	WAS n. bek.
Exon 2	168 C>A 194 T>G 243 G>A	WAS WAS WAS
Exon 3	389 G>A	aWAS
Exon 4	410 DelC 401 InsC 433 G>T	WAS aWAS WAS
Exon 5		
Exon 6	587 C>T	n. bek.
Exon 7		
Exon 8	789 G>A Intron 8+3-6	WAS WAS
Exon 9	844/5 DelGT 962 C>T	WAS aWAS
Exon 10	1113 DelC 1284 DelC 1153 InsA	aWAS aWAS aWAS
Exon 11	1412 C>T	n. bek.
Exon 12		

Tabelle 4: Mutationen, nachgewiesen im genetischen Labor der LMU München, die in der Literatur und den WASP-Datenbanken (193, 206) noch nicht vorbeschrieben sind.

(n. bek. = nicht bekannt, Ergebnis aus Überträgerinnendiagnostik ohne Angaben zum Indexpatienten)

In den Familien der meisten Patienten wurde im Anschluß an die Diagnose eine Überträgerinnendiagnostik durchgeführt. Interessanterweise konnte die Spleißmutation Intron 6+5 g->a bei drei der vier Mütter der betroffenen Patienten nicht nachgewiesen werden (eine Mutter wurde nicht untersucht). Dies würde bedeuten, dass es sich hier entweder um eine Neumutation bei den betroffenen Patienten handeln könnte oder um ein Keimzellmosaik der Mutter. Da in einer Familie die Mutation auch bei der Schwester des Patienten nachgewiesen werden konnte, liegt in diesem Fall sicher ein Keimzellmosaik bei der Mutter vor. Wie im Kapitel 2.6 beschrieben, scheint mit dieser Mutation ein erhöhtes Lymphomrisiko vergesellschaftet zu sein. Bisher wurde bei keinem der Patienten ein Lymphom diagnostiziert, bzw. liegen keine Informationen darüber vor. Der älteste der vier Patienten war bei Diagnosestellung bereits 26 Jahre alt.

Auch bei den Patienten mit der Mutation E133D und Q310X konnte im Rahmen der Überträgerinnendiagnostik die Mutation nicht bei der Mutter nachgewiesen werden. Da keine weiteren Familienmitglieder untersucht wurden, kann es sich auch hier entweder um Neumutationen oder ein Keimzellmosaik der Mutter handeln.

Im Rahmen der Überträgerinnendiagnostik wurde nur bei einer Schwester eines Patienten (mit komplexer Mutation: Del 6 bp 156-161, Ins 4bp, A61X, Exon 1) eine „random“-X-Inaktivierung beobachtet (40% mutiertes Allel : 60% normales Allel). Die Betroffene präsentierte sich mit einer milden chronischen Thrombozytopenie. Bei den übrigen Überträgerinnen in dieser Familie und auch allen übrigen untersuchten Überträgerinnen lag eine „non-random“-X-Inaktivierung vor.

3.3 Vergleich der Daten aus dem genetischen Labor der LMU München mit der Literatur

Die im genetischen Institut der Ludwig-Maximilians Universität München nachgewiesenen Mutationen in den Jahren 1995-2004 entsprechen in ihrer Verteilung im WASP-Gen der aktuellen Literatur: ca. 19% der Mutationen (jeweils 10/53) liegen jeweils in Exon 1 und 2. Neun der 53 (17%) Mutationen liegen im Exon 10. Dies entspricht auch in etwa dem Verteilungsmuster der Mutationen in der „online“-WASPbase (206) der derzeit umfassendsten und aktuellsten Zusammenstellung an WASP-Mutationen. Von den insgesamt 441

beschriebenen Mutationen befinden sich 61 (14%) im Exon 1, 121 (27%) im Exon 2 und 71 (16%) im Exon 10.

In der 1997 veröffentlichten WASPbase von Schwarz et al. lag ebenfalls der Großteil der Mutationen im Exon 1 und 2, jedoch nur 8% der damals veröffentlichten Mutationen (11/167) in Exon 10 (193).

Von der Verteilung der Art der Mutationen entsprechen die Daten ebenfalls den Angaben der publizierten Literatur: Der Großteil der Punktmutationen liegt eher N-terminal vor allem in Exon 2 (4, 13, 23, 110, 187). Diese Verteilung zeigte sich auch bei den 53 oben genannten Mutationen: 10 von 19 (52,5%) Punktmutationen liegen in Exon 2. In der „online“-WASPbase liegen 106 der insgesamt 182 aufgeführten Punktmutationen (58%) in Exon 2 (206), während in der WASPbase von Schwarz et al. 21 von insgesamt 39 Punktmutationen (54%) im Exon 2 lagen (193). Die trunkierenden Mutationen (Insertionen, Deletionen) verteilen sich eher C-terminal des WASP-Gens (4, 13, 23, 110, 187). So befinden sich z.B. fünf der insgesamt acht nachgewiesenen Deletionen (62,5%) im Exon 10. In der „online“-WASPbase (206) liegen 31 von insgesamt 88 Deletionen im Exon 10 (35%), was ein niedrigerer Anteil ist, jedoch verteilen sich die übrigen Deletionen gleichmäßig auf das WASP-Gen. Ähnlich verhält es sich mit den Verteilungen in der WASPbase von Schwarz et al.: hier befinden sich fünf von insgesamt 23 Deletionen im Exon 10 (22%), die restlichen verteilen sich ebenfalls gleichmäßig auf die übrigen Exons (193).

Es wurden jedoch auch Ausnahmen von dieser groben Regel beobachtet. Spleißmutationen wurden vor allem in der Mitte des WASP-Gens gefunden: Vier von acht (50%) im Exon 6 und zwei (25%) im Exon 7. In der „online“-WASPbase (206) befinden sich 14 der insgesamt 64 beschriebenen Spleißmutationen (22%) im Exon 6 und 16 im Exon 7 (25%). Die restlichen Spleißmutationen verteilen sich gleichmäßig auf das WASP-Gen. Bei Schwarz et al. (193) wurden die Spleißmutationen allerdings eher am Ende des WASP-Gens beschrieben: Jeweils vier der insgesamt 18 Spleißmutationen (22%) liegen im Exon 9 und 11.

Stopmutationen wurden vor allem im Exon 1 gefunden: fünf von insgesamt 14 (36%). Auch in der „online“-WASPbase (206) liegt ein großer Anteil an Stopmutationen N-terminal: 20 der insgesamt 64 Stopmutationen (31%) liegen im Exon 1. Auch bei Schwarz et al. liegen fünf der insgesamt vierzehn beschriebenen Stopmutationen (36%) im Exon 1.

Bei den 53 oben genannten Mutationen ist lediglich eine in Exon 1 gefundene Mutation als komplexe Mutation zu bezeichnen (Deletion+Insertion). In der „online“-WASPbase (206) werden nur drei komplexe Mutationen (1xDeletion+Missensmutation, 2xDeletion+Insertion) im Exon 10 beschrieben, bei Schwarz et al. eine in Exon 1, die der oben in der Tabelle genannten entspricht und zwei im Exon 10 (1xInsertion+Deletion, 1xDeletion+Missensmutation), wobei letztere in die „online“-WASPbase übernommen wurde (193).

An „Hotspots“ für Mutationen werden sowohl bei Schwarz et al (193) als auch in der „online“-WASPbase und der aktuellen Literatur (206), (13, 110, 187) vor allem R86 (mit verschiedenen Aminosäuresubstitutionen), T45M, V75M, R211X und Spleißmutationen im Intron 8 genannt. Diese Mutationen wurden alle bis auf eine (es wurde nur eine Spleißmutation im Intron 8 nachgewiesen) auch bei den 53 oben beschriebenen Mutationen mehr als einmal nachgewiesen. Die Intron 6+5 g->a Mutation, die insgesamt viermal gefunden wurde, wird auch bei Jin et al. (187) als „Hotspot“ beschrieben, nicht jedoch bei Schwarz et al (193), wohingegen es sich bei der Mutation R13X, die dreimal gefunden wurde, andersherum verhält. Die hier zweimal beschriebene Mutation E31K wird in keiner der Literaturangaben als „Hotspot“ angegeben.

Zur Genotyp/Phänotyp-Korrelation des hier untersuchten Patientenkollektivs lässt sich sagen, dass zehn der 27 Mutationen (37%) die zum Vollbild des WAS führten Punktmutationen waren, die zum Austausch einzelner Aminosäuren führen und von denen man annehmen sollte, dass trotzdem ein partiell funktionsfähiges WAS-Protein vorhanden ist. Von den insgesamt 19 gefundenen Punktmutationen führten 10 zum Vollbild des WAS (53%), vier (21%) zum aWAS und zwei (10,5%) zum XLT- Phänotyp.

Es gibt in der oben beschriebenen Gruppe keinen Patienten mit dem XLT-Phänotyp verursacht durch eine schwerere Mutation wie einer Stopmutation, Deletion oder Insertion.

Punktmutationen, die das N-terminale Ende betreffen bewirken üblicherweise nur eine leichte Einschränkung der WASP-Expression bzw. -Funktionalität und führen zu XLT (13). Dies zeigte sich auch bei den oben genannten Patienten, da die beiden Punktmutationen, die zu einem XLT-Phänotyp führten im Exon 2 liegen.

Die jeweils mehrfach beschriebenen Punktmutationen im Exon 2, die zu einzelnen Aminosäureaustauschen führen, lassen erkennen, dass aufgrund der Mutation allein keine genaue Angabe zum Phänotyp gemacht werden kann. So führte der Aminosäureaustausch

V75M bei einem Patienten zum Vollbild des WAS und bei einem anderen unverwandten zum XLT-Phänotyp. Auch bei der dreimal beschriebenen Mutation R86C zeigt einer der betroffenen Patienten eine abgeschwächte Form des WAS, wobei ein anderer verwandter Patient lediglich eine milde chronische Mikrothrombozytopenie entwickelte, der dritte unverwandte Patient präsentierte sich mit dem Vollbild des WAS. Dies korreliert wie im Kapitel 3.1 beschrieben mit den Angaben in der Literatur, dass bei dieser Mutation kaum eine Genotyp-Phänotyp Korrelation beobachtet werden kann.

Bei den restlichen hier beschriebenen „Hotspot“-Mutationen stimmten die Phänotypen überein bzw. handelte es sich zum Teil um Überträgerinnen ohne Angaben zum klinischen Phänotyp des Indexpatienten.

Daß Spleißmutationen sowohl zum Vollbild des WAS als auch zum XLT-Phänotyp führen können, zeigt sich ebenfalls bei den erfassten Mutationen. Eine Spleißmutation im Intron 7 führte zum XLT-Phänotyp, wohingegen eine andere Spleißmutation in Intron 7 zum Vollbild des WAS führte, die vier Spleißmutationen im Intron 6 resultierten im aWAS und zwei weitere Spleißmutationen führten zum Vollbild des WAS (Intron 3, Exon/Intron 8).

3.5 Zusammenfassung zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Die WAS-Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist nicht immer eindeutig und Patienten mit nur leicht eingeschränkter Funktionalität des WAS-Proteins können trotzdem schwere klinische Verläufe zeigen (110) mit der Entwicklung von Autoimmunsyndromen und Malignomen. Gleiche Mutationen können zu veränderter Proteinexpression bzw. unterschiedlich stark trunkiertem Protein und somit zu unterschiedlichen Phänotypen führen. Dies könnte zum Teil von sekundären genetischen Einflüssen oder Umweltfaktoren abhängen (12, 166), die die Proteinexpression mitbeeinflussen (12, 13, 23, 110, 187). Es gibt mehrere Erklärungsansätze für diese gelegentlichen Diskrepanzen. Spleißmutationen, besonders wenn sie verschiedene im Intron gelegene Nukleotidpositionen betreffen, erlauben oft die Generierung von mehreren Spleißprodukten, auch beinhaltend normal gespleißte mRNA resultierend in einer kleinen Menge an normalem WASP.

Ein anderer Mechanismus der den klinischen Phänotyp modifizieren könnte, ist eine „Remutation“ entsprechend einer „in vivo“ somatischen Reversion der angeborenen Mutation.

Dieser Mechanismus wurde beobachtet bei einem Patienten, bei dem zwei Populationen von WASP cDNA und Protein gefunden wurden, mutiert und normal. Im Gegensatz zum XLT-Phänotyp, der bei diesem Patienten beobachtet wurde, zeigte ein nicht verwandter Patient, mit der gleichen Mutation den WAS-Phänotyp.

Es wurde berichtet von einem WAS/XLT-Patienten mit deutlicher klinischer Verbesserung nach der Pubertät, bei dem eine Remutation festgestellt wurde (175). Evtl. gibt es andere Gene die verantwortlich sind für die Modulation des klinischen Phänotyps von WAS/XLT-Patienten. Krankheitsmodifizierende Gene wurden z. B. nachgewiesen bei Patienten mit chronischer Granulomatose (CGD), deren klinischer Phänotyp stark beeinflusst wird durch Polymorphismen der Myeloperoxidase und FcγRIIIb (211).

Gene, die die Bereitschaft eines Individuums, an einer atopischen Erkrankung wie Allergien und Ekzemen zu erkranken, kodieren, oder Gene, die die Effektivität der Infektionsabwehr kontrollieren, könnten den WAS/XLT-Phänotyp modifizieren.

Die Podosomenformation von Makrophagen ist beeinträchtigt bei WAS und XLT-Patienten, jedoch verschwindet der Defekt bei XLT wenn die Makrophagen aktiviert werden mit fMLP (ein Bakterienderivat), darauf hinweisend, dass evtl. auch Umweltfaktoren zur Entstehung des Phänotypspektrums dieser Erkrankung beitragen (212).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich beim Wiskott-Aldrich Syndrom um ein Krankheitsbild mit breitester phänotypischer Ausprägung handelt. Viele der aufgeführten Studien sollten eine gewisse Korrelation zeigen zwischen WASP-Expression und klinischem Phänotyp, um dies als Prognosefaktor werten zu können. Da allerdings gleiche Mutationstypen zu unterschiedlicher Proteinexpression bzw. -funktionalität und somit zu unterschiedlichen Phänotypen führen können, scheinen noch andere Faktoren die Proteinexpression bzw. Funktion zu beeinflussen.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deutlich gemacht, dass es sich beim Wiskott-Aldrich Syndrom um ein Krankheitsbild mit breitester phänotypischer Ausprägung handelt. Diese phänotypische Breite lässt sich erklären durch die in der Arbeit detailliert dargestellte Rolle des WAS-Proteins in den unterschiedlichen Zellen des hämatopoetischen Systems. Sie liegt in der Aktivierung der Aktinpolymerisation und ist beteiligt bei allen Vorgängen, bei denen diese Zellen ihre Form, ihre Zytoarchitektur verändern müssen. Eine Defizienz des WAS-Proteins führt, abhängig von der Restfunktion, zu unterschiedlich ausgeprägten Defekten in der Entwicklung und der adäquaten Funktion der Zellen des hämatopoetischen Systems und somit zu den oben beschriebenen phänotypischen Ausprägungen, die zusammengefasst werden unter dem Vollbild des WAS, X-chromosomaler Thrombozytopenie (XLT) und X-chromosomaler Neutropenie (XLN).

Im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchung der Nachfahren der erstbeschriebenen Patienten konnte eine zwei Basenpaare umfassende Deletion in Exon 1 (c.73-74delAC, p.Thr25ProfsX12) nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die auf rein klinischer Beobachtung basierende Vermutung des Erstbeschreibers, es läge ein X-chromosomal gebundener Erbgang vor, eine molekulargenetisch nachzuweisende Grundlage hatte. Diese Mutation führte bei den von Prof. A. Wiskott erstbeschriebenen Brüdern zum Vollbild des WAS.

In den aufgeführten Studien wurde versucht eine Genotyp-WAS-Protein-Phänotyp-Korrelation anzustreben, um dem einzelnen Patienten eine Prognose geben zu können.

Da allerdings, wie gezeigt, gleiche Mutationen zu unterschiedlicher Proteinexpression bzw. -funktionalität und somit zu unterschiedlichen Phänotypen führen können, scheinen noch andere Faktoren, wie modifizierende Gene und Umweltfaktoren, die Proteinexpression bzw. -funktion und somit die Ausprägung der Erkrankung zu beeinflussen.

Es wurden 53 Patienten beschrieben, deren Mutationen im *WASP-Gen* im genetischen Labor der LMU München nachgewiesen wurden. Dargestellt wurde die Verteilung und Häufigkeit der Mutationen im WAS-Gen, die „hotspot“-Mutationen sowie die Art der Mutationen, die zu den jeweiligen Phänotypen geführt haben. Diese Angaben wurden mit der aktuellen Literatur verglichen, und es konnten ähnliche Verteilungen und „hotspot“-Mutationen dargestellt werden.

Zudem wurden 18 nicht vorbeschriebene Mutationen und deren phänotypische Ausprägung genannt.

Es ließ sich ebenfalls für das hier beschriebene Patientenkollektiv von 53 Patienten, in Anlehnung an die aktuelle Literatur (13, 23, 110, 187) zeigen, daß keine eindeutige Vorhersage zum Phänotyp aufgrund der Mutation alleine zu treffen ist.

Auch der in vielen der aufgeführten Studien angestrebte Nachweis von WAS-Protein in den einzelnen Zellen des hämatopoetischen Systems und der Versuch eine Aussage über dessen Funktionalität zu treffen, führte nicht zu einer verlässlichen Aussage über eine Genotyp-WAS-Protein-Phänotyp-Korrelation.

Die erhobenen Daten machen deutlich, wie schwierig es ist, WAS-Patienten aufgrund der Art ihrer Mutation einen verlässlichen Ausblick über den Verlauf ihrer Erkrankung zu geben.

5 Literaturverzeichnis

1. Wiskott, A. Familiärer, angeborener Morbus Werlhofii ? Monatsschr. Kinderheilkd, **68**: 212-216, 1937.
2. Aldrich, R. A., Steinberg, A. G., and Campbell, D. C. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics*, **13**: 133-139, 1954.
3. Belohradsky, B. H. personal communications. 1975.
4. Ochs, H. D., Rosen FS The Wiskott Aldrich syndrome. In *Primary Immunodeficiencies Diseases: A molecular and Genetic Approach*. Edited by Ochs HD, Smith CIE, Puck JM. New York:Oxford University press, 1999: 292-305, 1999.
5. Zhu, Q., Zhang, M., Blaese, R. M., Derry, J. M., Junker, A., Francke, U., Chen, S. H., and Ochs, H. D. The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood*, **86**: 3797-3804, 1995.
6. Devriendt, K., Kim, A. S., Mathijs, G., Frints, S. G., Schwartz, M., Van Den Oord, J. J., Verhoef, G. E., Boogaerts, M. A., Fryns, J. P., You, D., Rosen, M. K., and Vandenberghe, P. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet*, **27**: 313-317, 2001.
7. Derry, J. M., Ochs, H. D., and Francke, U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, **78**: 635-644, 1994.
8. Thrasher, A. J. and Kinnon, C. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Exp Immunol*, **120**: 2-9, 2000.
9. Sullivan, K. E., Mullen, C. A., Blaese, R. M., and Winkelstein, J. A. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr*, **125**: 876-885, 1994.
10. Belohradsky, B. H., Griscelli, C., Fundenberg, H. H., and Marget, W. [The Wiskott-Aldrich syndrome]. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd*, **41**: 85-184, 1978.
11. Thrasher, A. J. WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol*, **2**: 635-646, 2002.

12. Burns, S., Cory, G. O., Vainchenker, W., and Thrasher, A. J. Mechanisms of WASp-mediated haematological and immunological disease. *Blood*, 2004.
13. Imai, K., Nonoyama, S., and Ochs, H. D. WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3: 427-436, 2003.
14. Frieden, C. Polymerization of actin: mechanism of the Mg²⁺-induced process at pH 8 and 20 degrees C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80: 6513-6517, 1983.
15. Machesky, L. M., Reeves, E., Wientjes, F., Mattheyse, F. J., Grogan, A., Totty, N. F., Burlingame, A. L., Hsuan, J. J., and Segal, A. W. Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem J*, 328 (Pt 1): 105-112, 1997.
16. Machesky, L. M. and Gould, K. L. The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 117-121, 1999.
17. Higgs, H. N., Blanchoin, L., and Pollard, T. D. Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry*, 38: 15212-15222, 1999.
18. Higgs, H. N. and Pollard, T. D. Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *J Biol Chem*, 274: 32531-32534, 1999.
19. Higgs, H. N. and Pollard, T. D. Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, 150: 1311-1320, 2000.
20. Higgs, H. N. and Pollard, T. D. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem*, 70: 649-676, 2001.
21. Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., and Abo, A. Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell*, 84: 723-734, 1996.
22. Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A., and Rosen, M. K. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*, 404: 151-158, 2000.

23. Notarangelo, L. D. and Ochs, H. D. Wiskott-Aldrich Syndrome: a model for defective actin reorganization, cell trafficking and synapse formation. *Curr Opin Immunol*, **15**: 585-591, 2003.
24. Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu, G. A., Majumdar, A., Ouerfelli, O., Siminovitch, K. A., and Rosen, M. K. Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature*, **399**: 379-383, 1999.
25. Aspenstrom, P., Lindberg, U., and Hall, A. Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Biol*, **6**: 70-75, 1996.
26. Aepfelbacher, M., Essler, M., Huber, E., Czech, A., and Weber, P. C. Rho is a negative regulator of human monocyte spreading. *J Immunol*, **157**: 5070-5075, 1996.
27. Allen, W. E., Zicha, D., Ridley, A. J., and Jones, G. E. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol*, **141**: 1147-1157, 1998.
28. Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H. Y., Kirschner, M. W., and Mayer, B. J. Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem*, **276**: 26448-26452, 2001.
29. Rozelle, A. L., Machesky, L. M., Yamamoto, M., Driessens, M. H., Insall, R. H., Roth, M. G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A., and Yin, H. L. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol*, **10**: 311-320, 2000.
30. Yarar, D., D'Alessio, J. A., Jeng, R. L., and Welch, M. D. Motility determinants in WASP family proteins. *Mol Biol Cell*, **13**: 4045-4059, 2002.
31. Cannon, J. L. and Burkhardt, J. K. The regulation of actin remodeling during T-cell-APC conjugate formation. *Immunol Rev*, **186**: 90-99, 2002.
32. Badour, K., Zhang, J., Shi, F., McGavin, M. K., Rampersad, V., Hardy, L. A., Field, D., and Siminovitch, K. A. The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity*, **18**: 141-154, 2003.
33. Castellano, F., Le Clainche, C., Patin, D., Carlier, M. F., and Chavrier, P. A WASP-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *Embo J*, **20**: 5603-5614, 2001.

34. Banin, S., Gout, I., and Brickell, P. Interaction between Wiskott-Aldrich Syndrome protein (WASP) and the Fyn protein-tyrosine kinase. *Mol Biol Rep*, 26: 173-177, 1999.
35. McGavin, M. K., Badour, K., Hardy, L. A., Kubiseski, T. J., Zhang, J., and Siminovitch, K. A. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich Syndrome protein (WASp)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis. *J Exp Med*, 194: 1777-1787, 2001.
36. Oda, A., Ochs, H. D., Druker, B. J., Ozaki, K., Watanabe, C., Handa, M., Miyakawa, Y., and Ikeda, Y. Collagen induces tyrosine phosphorylation of Wiskott-Aldrich syndrome protein in human platelets. *Blood*, 92: 1852-1858, 1998.
37. Gross, B. S., Wilde, J. I., Quek, L., Chapel, H., Nelson, D. L., and Watson, S. P. Regulation and function of WASp in platelets by the collagen receptor, glycoprotein VI. *Blood*, 94: 4166-4176, 1999.
38. Guinamard, R., Aspenstrom, P., Fougereau, M., Chavrier, P., and Guillemot, J. C. Tyrosine phosphorylation of the Wiskott-Aldrich syndrome protein by Lyn and Btk is regulated by CDC42. *FEBS Lett*, 434: 431-436, 1998.
39. Badour, K., Zhang, J., Shi, F., Leng, Y., Collins, M., and Siminovitch, K. A. Fyn and PTP-PEST-mediated regulation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) tyrosine phosphorylation is required for coupling T cell antigen receptor engagement to WASp effector function and T cell activation. *J Exp Med*, 199: 99-112, 2004.
40. Baba, Y., Nonoyama, S., Matsushita, M., Yamadori, T., Hashimoto, S., Imai, K., Arai, S., Kunikata, T., Kurimoto, M., Kurosaki, T., Ochs, H. D., Yata, J., Kishimoto, T., and Tsukada, S. Involvement of wiskott-aldrich syndrome protein in B-cell cytoplasmic tyrosine kinase pathway. *Blood*, 93: 2003-2012, 1999.
41. Cory, G. O., Garg, R., Cramer, R., and Ridley, A. J. Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *J Biol Chem*, 277: 45115-45121, 2002.
42. Torres, E. and Rosen, M. K. Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP. *Mol Cell*, 11: 1215-1227, 2003.
43. Cote, J. F., Chung, P. L., Theberge, J. F., Halle, M., Spencer, S., Lasky, L. A., and Tremblay, M. L. PSTPIP is a substrate of PTP-PEST and serves as a scaffold guiding

- PTP-PEST toward a specific dephosphorylation of WASP. *J Biol Chem*, 277: 2973-2986, 2002.
44. Cory, G. O., Cramer, R., Blanchoin, L., and Ridley, A. J. Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP. *Mol Cell*, 11: 1229-1239, 2003.
 45. Volkman, B. F., Prehoda, K. E., Scott, J. A., Peterson, F. C., and Lim, W. A. Structure of the N-WASP EVH1 domain-WIP complex: insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Cell*, 111: 565-576, 2002.
 46. Ramesh, N., Anton, I. M., Hartwig, J. H., and Geha, R. S. WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 14671-14676, 1997.
 47. Moreau, V., Frischknecht, F., Reckmann, I., Vincentelli, R., Rabut, G., Stewart, D., and Way, M. A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat Cell Biol*, 2: 441-448, 2000.
 48. Sasahara, Y., Rachid, R., Byrne, M. J., de la Fuente, M. A., Abraham, R. T., Ramesh, N., and Geha, R. S. Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol Cell*, 10: 1269-1281, 2002.
 49. Anton, I. M., de la Fuente, M. A., Sims, T. N., Freeman, S., Ramesh, N., Hartwig, J. H., Dustin, M. L., and Geha, R. S. WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in T and B cell activation. *Immunity*, 16: 193-204, 2002.
 50. Marshall, C. J. and Thrasher, A. J. The embryonic origins of human haematopoiesis. *Br J Haematol*, 112: 838-850, 2001.
 51. Dumenil, D. American Society for Hematology abstract. 2001.
 52. Lacout, C., Haddad, E., Sabri, S., Svinarchouk, F., Garcon, L., Capron, C., Foudi, A., Mzali, R., Snapper, S. B., Louache, F., Vainchenker, W., and Dumenil, D. A defect in hematopoietic stem cell migration explains the nonrandom X-chromosome inactivation in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 102: 1282-1289, 2003.
 53. Wengler, G., Gorlin, J. B., Williamson, J. M., Rosen, F. S., and Bing, D. H. Nonrandom inactivation of the X chromosome in early lineage hematopoietic cells in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 85: 2471-2477, 1995.
 54. Dustin, M. L. The immunological synapse. *Arthritis Res*, 4 Suppl 3: S119-125, 2002.

55. Delon, J. The immunological synapse. *Curr Biol*, 10: R214, 2000.
56. Delon, J., Stoll, S., and Germain, R. N. Imaging of T-cell interactions with antigen presenting cells in culture and in intact lymphoid tissue. *Immunol Rev*, 189: 51-63, 2002.
57. Delon, J. and Germain, R. N. Information transfer at the immunological synapse. *Curr Biol*, 10: R923-933, 2000.
58. Dustin, M. L. and Cooper, J. A. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol*, 1: 23-29, 2000.
59. Zeng, R., Cannon, J. L., Abraham, R. T., Way, M., Billadeau, D. D., Bubeck-Wardenberg, J., and Burkhardt, J. K. SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol*, 171: 1360-1368, 2003.
60. Dupre, L., Aiuti, A., Trifari, S., Martino, S., Saracco, P., Bordignon, C., and Roncarolo, M. G. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation. *Immunity*, 17: 157-166, 2002.
61. Zhang, J., Shehabeldin, A., da Cruz, L. A., Butler, J., Somani, A. K., McGavin, M., Kozieradzki, I., dos Santos, A. O., Nagy, A., Grinstein, S., Penninger, J. M., and Siminovitch, K. A. Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes. *J Exp Med*, 190: 1329-1342, 1999.
62. Cannon, J. L. and Burkhardt, J. K. Differential roles for Wiskott-Aldrich syndrome protein in immune synapse formation and IL-2 production. *J Immunol*, 173: 1658-1662, 2004.
63. Morales-Tirado, V., Johannson, S., Hanson, E., Howell, A., Zhang, J., Siminovitch, K. A., and Fowell, D. J. Cutting edge: selective requirement for the Wiskott-Aldrich syndrome protein in cytokine, but not chemokine, secretion by CD4⁺ T cells. *J Immunol*, 173: 726-730, 2004.
64. Okabe, S., Fukuda, S., and Broxmeyer, H. E. Activation of Wiskott-Aldrich syndrome protein and its association with other proteins by stromal cell-derived factor-1alpha is associated with cell migration in a T-lymphocyte line. *Exp Hematol*, 30: 761-766, 2002.

65. Haddad, E., Zugaza, J. L., Louache, F., Debili, N., Crouin, C., Schwarz, K., Fischer, A., Vainchenker, W., and Bertoglio, J. The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1-induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood*, *97*: 33-38, 2001.
66. Badolato, R. Leukocyte circulation: one-way or round-trip? Lessons from primary immunodeficiency patients. *J Leukoc Biol*, *76*: 1-6, 2004.
67. Park, J. Y., Kob, M., Prodeus, A. P., Rosen, F. S., Shcherbina, A., and Remold-O'Donnell, E. Early deficit of lymphocytes in Wiskott-Aldrich syndrome: possible role of WASP in human lymphocyte maturation. *Clin Exp Immunol*, *136*: 104-110, 2004.
68. Cooper, M. D., Chae, H. P., Lowman, J. T., Krivit, W., and Good, R. A. Wiskott-Aldrich syndrome. An immunologic deficiency disease involving the afferent limb of immunity. *Am J Med*, *44*: 499-513, 1968.
69. Wolff, J. A. Wiskott-Aldrich syndrome: clinical, immunologic, and pathologic observations. *J Pediatr*, *70*: 221-232, 1967.
70. Snapper, S. B., Rosen, F. S., Mizoguchi, E., Cohen, P., Khan, W., Liu, C. H., Hagemann, T. L., Kwan, S. P., Ferrini, R., Davidson, L., Bhan, A. K., and Alt, F. W. Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity*, *9*: 81-91, 1998.
71. Zhang, J., Shi, F., Badour, K., Deng, Y., McGavin, M. K., and Siminovitch, K. A. WASp verprolin homology, cofilin homology, and acidic region domain-mediated actin polymerization is required for T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*: 2240-2245, 2002.
72. Rengan, R., Ochs, H. D., Sweet, L. I., Keil, M. L., Gunning, W. T., Lachant, N. A., Boxer, L. A., and Omann, G. M. Actin cytoskeletal function is spared, but apoptosis is increased, in WAS patient hematopoietic cells. *Blood*, *95*: 1283-1292, 2000.
73. Rawlings, S. L., Crooks, G. M., Bockstoce, D., Barsky, L. W., Parkman, R., and Weinberg, K. I. Spontaneous apoptosis in lymphocytes from patients with Wiskott-Aldrich syndrome: correlation of accelerated cell death and attenuated bcl-2 expression. *Blood*, *94*: 3872-3882, 1999.
74. Kenney, D., Cairns, L., Remold-O'Donnell, E., Peterson, J., Rosen, F. S., and Parkman, R. Morphological abnormalities in the lymphocytes of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, *68*: 1329-1332, 1986.

75. Majstoravich, S., Zhang, J., Nicholson-Dykstra, S., Linder, S., Friedrich, W., Siminovitch, K. A., and Higgs, H. N. Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) for their morphology. *Blood*, *104*: 1396-1403, 2004.
76. Westerberg, L., Greicius, G., Snapper, S. B., Aspenstrom, P., and Severinson, E. Cdc42, Rac1, and the Wiskott-Aldrich syndrome protein are involved in the cytoskeletal regulation of B lymphocytes. *Blood*, *98*: 1086-1094, 2001.
77. Katada, Y., Tanaka, T., Ochi, H., Aitani, M., Yokota, A., Kikutani, H., Suemura, M., and Kishimoto, T. B cell-B cell interaction through intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte functional antigen-1 regulates immunoglobulin E synthesis by B cells stimulated with interleukin-4 and anti-CD40 antibody. *Eur J Immunol*, *26*: 192-200, 1996.
78. Lindhout, E., Koopman, G., Pals, S. T., and de Groot, C. Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions. *Immunol Today*, *18*: 573-577, 1997.
79. Xu, J., Foy, T. M., Laman, J. D., Elliott, E. A., Dunn, J. J., Waldschmidt, T. J., Elsemore, J., Noelle, R. J., and Flavell, R. A. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity*, *1*: 423-431, 1994.
80. Klein, C., Nguyen, D., Liu, C. H., Mizoguchi, A., Bhan, A. K., Miki, H., Takenawa, T., Rosen, F. S., Alt, F. W., Mulligan, R. C., and Snapper, S. B. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome: rescue of T-cell signaling and amelioration of colitis upon transplantation of retrovirally transduced hematopoietic stem cells in mice. *Blood*, *101*: 2159-2166, 2003.
81. Vermi, W., Blanzuoli, L., Kraus, M. D., Grigolato, P., Donato, F., Loffredo, G., Marino, C. E., Alberti, D., Notarangelo, L. D., and Facchetti, F. The spleen in the Wiskott-Aldrich syndrome: histopathologic abnormalities of the white pulp correlate with the clinical phenotype of the disease. *Am J Surg Pathol*, *23*: 182-191, 1999.
82. Oliver, A. M., Martin, F., and Kearney, J. F. IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol*, *162*: 7198-7207, 1999.

83. Martin, F. and Kearney, J. F. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*, 2: 323-335, 2002.
84. Guinamard, R., Okigaki, M., Schlessinger, J., and Ravetch, J. V. Absence of marginal zone B cells in *Pyk-2*-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol*, 1: 31-36, 2000.
85. Fukui, Y., Hashimoto, O., Sanui, T., Oono, T., Koga, H., Abe, M., Inayoshi, A., Noda, M., Oike, M., Shirai, T., and Sasazuki, T. Haematopoietic cell-specific CDM family protein *DOCK2* is essential for lymphocyte migration. *Nature*, 412: 826-831, 2001.
86. Girkontaite, I., Missy, K., Sakk, V., Harenberg, A., Tedford, K., Potzel, T., Pfeffer, K., and Fischer, K. D. *Lsc* is required for marginal zone B cells, regulation of lymphocyte motility and immune responses. *Nat Immunol*, 2: 855-862, 2001.
87. Lu, T. T. and Cyster, J. G. Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone. *Science*, 297: 409-412, 2002.
88. Facchetti, F., Blanzuoli, L., Vermi, W., Notarangelo, L. D., Giliani, S., Fiorini, M., Fasth, A., Stewart, D. M., and Nelson, D. L. Defective actin polymerization in EBV-transformed B-cell lines from patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pathol*, 185: 99-107, 1998.
89. Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J., and Jenkins, M. K. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science*, 281: 96-99, 1998.
90. Reif, K., Eklund, E. H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Forster, R., and Cyster, J. G. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature*, 416: 94-99, 2002.
91. Westerberg, L., Larsson, M., Hardy, S. J., Fernandez, C., Thrasher, A. J., and Severinson, E. Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B cell adhesion, migration, homing and to a delayed humoral immune response. *Blood*, 2004.
92. Orange, J. S., Harris, K. E., Andzelm, M. M., Valter, M. M., Geha, R. S., and Strominger, J. L. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 14151-14156, 2003.
93. Orange, J. S., Ramesh, N., Remold-O'Donnell, E., Sasahara, Y., Koopman, L., Byrne, M., Bonilla, F. A., Rosen, F. S., Geha, R. S., and Strominger, J. L. Wiskott-Aldrich

- syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*: 11351-11356, 2002.
94. Leverrier, Y., Lorenzi, R., Blundell, M. P., Brickell, P., Kinnon, C., Ridley, A. J., and Thrasher, A. J. Cutting edge: the Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for efficient phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol*, *166*: 4831-4834, 2001.
 95. Chimini, G. and Chavrier, P. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol*, *2*: E191-196, 2000.
 96. Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J. C., and Chavrier, P. Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *Embo J*, *17*: 6219-6229, 1998.
 97. Caron, E. and Hall, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*, *282*: 1717-1721, 1998.
 98. Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P. G., Bokoch, G. M., and Greenberg, S. Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med*, *186*: 1487-1494, 1997.
 99. Lorenzi, R., Brickell, P. M., Katz, D. R., Kinnon, C., and Thrasher, A. J. Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood*, *95*: 2943-2946, 2000.
 100. May, R. C., Caron, E., Hall, A., and Machesky, L. M. Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat Cell Biol*, *2*: 246-248, 2000.
 101. Badolato, R., Sozzani, S., Malacarne, F., Bresciani, S., Fiorini, M., Borsatti, A., Albertini, A., Mantovani, A., Ugazio, A. G., and Notarangelo, L. D. Monocytes from Wiskott-Aldrich patients display reduced chemotaxis and lack of cell polarization in response to monocyte chemoattractant protein-1 and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol*, *161*: 1026-1033, 1998.
 102. Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., and Aepfelbacher, M. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*: 9648-9653, 1999.
 103. Hufner, K., Schell, B., Aepfelbacher, M., and Linder, S. The acidic regions of WASp and N-WASP can synergize with CDC42Hs and Rac1 to induce filopodia and lamellipodia. *FEBS Lett*, *514*: 168-174, 2002.

104. Linder, S., Hufner, K., Wintergerst, U., and Aepfelbacher, M. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J Cell Sci*, *113 Pt 23*: 4165-4176, 2000.
105. Zicha, D., Allen, W. E., Brickell, P. M., Kinnon, C., Dunn, G. A., Jones, G. E., and Thrasher, A. J. Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Br J Haematol*, *101*: 659-665, 1998.
106. Linder, S., Higgs, H., Hufner, K., Schwarz, K., Pannicke, U., and Aepfelbacher, M. The polarization defect of Wiskott-Aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalization of the Arp2/3 complex. *J Immunol*, *165*: 221-225, 2000.
107. Calle, Y., Chou, H. C., Thrasher, A. J., and Jones, G. E. Wiskott-Aldrich syndrome protein and the cytoskeletal dynamics of dendritic cells. *J Pathol*, *204*: 460-469, 2004.
108. Linder, S. and Aepfelbacher, M. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol*, *13*: 376-385, 2003.
109. Altman, L. C., Snyderman, R., and Blaese, R. M. Abnormalities of chemotactic lymphokine synthesis and mononuclear leukocyte chemotaxis in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Clin Invest*, *54*: 486-493, 1974.
110. Imai, K., Morio, T., Zhu, Y., Jin, Y., Itoh, S., Kajiwara, M., Yata, J., Mizutani, S., Ochs, H. D., and Nonoyama, S. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood*, *103*: 456-464, 2004.
111. Binks, M., Jones, G. E., Brickell, P. M., Kinnon, C., Katz, D. R., and Thrasher, A. J. Intrinsic dendritic cell abnormalities in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur J Immunol*, *28*: 3259-3267, 1998.
112. Burns, S., Thrasher, A. J., Blundell, M. P., Machesky, L., and Jones, G. E. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood*, *98*: 1142-1149, 2001.
113. Burns, S., Hardy, S. J., Buddle, J., Yong, K. L., Jones, G. E., and Thrasher, A. J. Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell Motil Cytoskeleton*, *57*: 118-132, 2004.
114. de Noronha, S., Hardy, S., Sinclair, J., Blundell, M. P., Strid, J., Schulz, O., Zwirner, J., Jones, G. E., Katz, D. R., Kinnon, C., and Thrasher, A. J. Impaired dendritic cell homing in vivo in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Blood*, 2004.

115. Westerberg, L., Wallin, R. P., Greicius, G., Ljunggren, H. G., and Severinson, E. Efficient antigen presentation of soluble, but not particulate, antigen in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Immunology*, *109*: 384-391, 2003.
116. Calle, Y., Jones, G. E., Jagger, C., Fuller, K., Blundell, M. P., Chow, J., Chambers, T., and Thrasher, A. J. WASp deficiency in mice results in failure to form osteoclast sealing zones and defects in bone resorption. *Blood*, *103*: 3552-3561, 2004.
117. Wiedemann, A., Linder, S., Grassl, G., Albert, M., Autenrieth, I., and Aepfelbacher, M. *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. *Cell Microbiol*, *3*: 693-702, 2001.
118. Linder, S., Heimerl, C., Fingerle, V., Aepfelbacher, M., and Wilske, B. Coiling phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* by primary human macrophages is controlled by CDC42Hs and Rac1 and involves recruitment of Wiskott-Aldrich syndrome protein and Arp2/3 complex. *Infect Immun*, *69*: 1739-1746, 2001.
119. Botto, M. and Walport, M. J. C1q, autoimmunity and apoptosis. *Immunobiology*, *205*: 395-406, 2002.
120. Jones, G. E., Zicha, D., Dunn, G. A., Blundell, M., and Thrasher, A. Restoration of podosomes and chemotaxis in Wiskott-Aldrich syndrome macrophages following induced expression of WASp. *Int J Biochem Cell Biol*, *34*: 806-815, 2002.
121. Shcherbina, A., Rosen, F. S., and Remold-O'Donnell, E. WASP levels in platelets and lymphocytes of wiskott-aldrich syndrome patients correlate with cell dysfunction. *J Immunol*, *163*: 6314-6320, 1999.
122. Robinson, J. M. and Badwey, J. A. Rapid association of cytoskeletal remodeling proteins with the developing phagosomes of human neutrophils. *Histochem Cell Biol*, *118*: 117-125, 2002.
123. Ochs, H. D., Slichter, S. J., Harker, L. A., Von Behrens, W. E., Clark, R. A., and Wedgwood, R. J. The Wiskott-Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood*, *55*: 243-252, 1980.
124. Krivit, W. and Good, R. A. Aldrich's syndrome (thrombocytopenia, eczema, and infection infants); studies of the defense mechanisms. *AMA J Dis Child*, *97*: 137-153, 1959.

125. Pivniouk, V. I., Snapper, S. B., Kettner, A., Alenius, H., Laouini, D., Falet, H., Hartwig, J., Alt, F. W., and Geha, R. S. Impaired signaling via the high-affinity IgE receptor in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mast cells. *Int Immunol*, *15*: 1431-1440, 2003.
126. Remold-O'Donnell, E., Rosen, F. S., and Kenney, D. M. Defects in Wiskott-Aldrich syndrome blood cells. *Blood*, *87*: 2621-2631, 1996.
127. Murphy, S., Oski, F. A., Naiman, J. L., Lusch, C. J., Goldberg, S., and Gardner, F. H. Platelet size and kinetics in hereditary and acquired thrombocytopenia. *N Engl J Med*, *286*: 499-504, 1972.
128. Shcherbina, A., Rosen, F. S., and Remold-O'Donnell, E. Pathological events in platelets of Wiskott-Aldrich syndrome patients. *Br J Haematol*, *106*: 875-883, 1999.
129. Semple, J. W., Siminovitch, K. A., Mody, M., Milev, Y., Lazarus, A. H., Wright, J. F., and Freedman, J. Flow cytometric analysis of platelets from children with the Wiskott-Aldrich syndrome reveals defects in platelet development, activation and structure. *Br J Haematol*, *97*: 747-754, 1997.
130. Oda, A., Ikeda, Y., Ochs, H. D., Druker, B. J., Ozaki, K., Handa, M., Ariga, T., Sakiyama, Y., Witte, O. N., and Wahl, M. I. Rapid tyrosine phosphorylation and activation of Bruton's tyrosine/Tec kinases in platelets induced by collagen binding or CD32 cross-linking. *Blood*, *95*: 1663-1670, 2000.
131. Oda, A. and Ochs, H. D. Wiskott-Aldrich syndrome protein and platelets. *Immunol Rev*, *178*: 111-117, 2000.
132. Falet, H., Hoffmeister, K. M., Neujahr, R., and Hartwig, J. H. Normal Arp2/3 complex activation in platelets lacking WASp. *Blood*, *100*: 2113-2122, 2002.
133. Haddad, E., Cramer, E., Riviere, C., Rameau, P., Louache, F., Guichard, J., Nelson, D. L., Fischer, A., Vainchenker, W., and Debili, N. The thrombocytopenia of Wiskott Aldrich syndrome is not related to a defect in proplatelet formation. *Blood*, *94*: 509-518, 1999.
134. Avecilla, S. T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D. K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T. E., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Witte, L., Hicklin, D. J., Bohlen, P., Eaton, D., Lyden, D., de Sauvage, F., and Rafii, S. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*, *10*: 64-71, 2004.

135. Thrasher, A. J., Jones, G. E., Kinnon, C., Brickell, P. M., and Katz, D. R. Is Wiskott--Aldrich syndrome a cell trafficking disorder? *Immunol Today*, 19: 537-539, 1998.
136. Peacocke, M. and Siminovitch, K. A. Linkage of the Wiskott-Aldrich syndrome with polymorphic DNA sequences from the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 3430-3433, 1987.
137. Donner, M., Schwartz, M., Carlsson, K. U., and Holmberg, L. Hereditary X-linked thrombocytopenia maps to the same chromosomal region as the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 72: 1849-1853, 1988.
138. Kolluri, R., Shehabeldin, A., Peacocke, M., Lamhonwah, A. M., Teichert-Kuliszewska, K., Weissman, S. M., and Siminovitch, K. A. Identification of WASP mutations in patients with Wiskott-Aldrich syndrome and isolated thrombocytopenia reveals allelic heterogeneity at the WAS locus. *Hum Mol Genet*, 4: 1119-1126, 1995.
139. Derry, J. M., Kerns, J. A., Weinberg, K. I., Ochs, H. D., Volpini, V., Estivill, X., Walker, A. P., and Francke, U. WASP gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Hum Mol Genet*, 4: 1127-1135, 1995.
140. Kwan, S. P., Hagemann, T. L., Blaese, R. M., Knutsen, A., and Rosen, F. S. Scanning of the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) gene: identification of 18 novel alterations including a possible mutation hotspot at Arg86 resulting in thrombocytopenia, a mild WAS phenotype. *Hum Mol Genet*, 4: 1995-1998, 1995.
141. Matzdorff, A., Meindl, A., and Pralle, H. [The Wiskott-Aldrich syndrome in adulthood]. *Dtsch Med Wochenschr*, 125: 147-150, 2000.
142. Notarangelo, L. D., Mazza, C., Giliani, S., D'Aria, C., Gandellini, F., Ravelli, C., Locatelli, M. G., Nelson, D. L., and Ochs, H. D. Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia. *Blood*, 99: 2268-2269, 2002.
143. Ancliff PJ, B. M., Gale RE Activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein may define a sub-group of severe congenital neutropenia (SCN) with specific and unusual laboratory features [abstract]. *Blood*, 98: 439, 2001.
144. Stein, S. M. and Dale, D. C. Molecular basis and therapy of disorders associated with chronic neutropenia. *Curr Allergy Asthma Rep*, 3: 385-388, 2003.
145. Dupuis-Girod, S., Medioni, J., Haddad, E., Quartier, P., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., de Saint Basile, G., Delaunay, J., Schwarz, K., Casanova, J. L., Blanche, S., and

- Fischer, A. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics*, *111*: e622-627, 2003.
146. Schurman, S. H. and Candotti, F. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Rheumatol*, *15*: 446-453, 2003.
147. Shcherbina, A., Candotti, F., Rosen, F. S., and Remold-O'Donnell, E. High incidence of lymphomas in a subgroup of Wiskott-Aldrich syndrome patients. *Br J Haematol*, *121*: 529-530, 2003.
148. Pelham, R. J. and Chang, F. Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Nature*, *419*: 82-86, 2002.
149. Giliani, S., Fiorini, M., Mella, P., Candotti, F., Schumacher, R. F., Wengler, G. S., Lalatta, F., Fasth, A., Badolato, R., Ugazio, A. G., Albertini, A., and Notarangelo, L. D. Prenatal molecular diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome by direct mutation analysis. *Prenat Diagn*, *19*: 36-40, 1999.
150. Puck, J. M. Prenatal diagnosis and genetic analysis of X-linked immunodeficiency disorders. *Pediatr Res*, *33*: S29-33; discussion S33-24, 1993.
151. Wengler, G. S., Notarangelo, L. D., Giliani, S., Pirastru, M. G., Ugazio, A. G., and Parolini, O. Mutation analysis in Wiskott Aldrich syndrome on chorionic villus DNA. *Lancet*, *346*: 641-642, 1995.
152. Siminovitch, K. A. Prenatal diagnosis and genetic analysis of Wiskott-Aldrich syndrome. *Prenat Diagn*, *23*: 1014-1016, 2003.
153. Prchal, J. T., Carroll, A. J., Prchal, J. F., Crist, W. M., Skalka, H. W., Gealy, W. J., Harley, J., and Malluh, A. Wiskott-Aldrich syndrome: cellular impairments and their implication for carrier detection. *Blood*, *56*: 1048-1054, 1980.
154. Zhu, Q., Watanabe, C., Liu, T., Hollenbaugh, D., Blaese, R. M., Kanner, S. B., Aruffo, A., and Ochs, H. D. Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia: WASP gene mutations, protein expression, and phenotype. *Blood*, *90*: 2680-2689, 1997.
155. Conley, M. E. Diagnostic guidelines--An International Consensus document. *Clin Immunol*, *93*: 189, 1999.
156. Conley, M. E., Notarangelo, L. D., and Etzioni, A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency)

- and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol*, *93*: 190-197, 1999.
157. Greer, W. L., Kwong, P. C., Peacocke, M., Ip, P., Rubin, L. A., and Siminovitch, K. A. X-chromosome inactivation in the Wiskott-Aldrich syndrome: a marker for detection of the carrier state and identification of cell lineages expressing the gene defect. *Genomics*, *4*: 60-67, 1989.
158. Inoue, H., Kurosawa, H., Nonoyama, S., Imai, K., Kumazaki, H., Matsunaga, T., Sato, Y., Sugita, K., and Eguchi, M. X-linked thrombocytopenia in a girl. *Br J Haematol*, *118*: 1163-1165, 2002.
159. Andreu, N., Pujol-Moix, N., Martinez-Lostao, L., Oset, M., Muniz-Diaz, E., Estivill, X., Volpini, V., and Fillat, C. Wiskott-Aldrich syndrome in a female with skewed X-chromosome inactivation. *Blood Cells Mol Dis*, *31*: 332-337, 2003.
160. Notarangelo, L. D., Parolini, O., Porta, F., Locatelli, F., Lanfranchi, A., Marconi, M., Nespoli, L., Albertini, A., Craig, I. W., and Ugazio, A. G. Analysis of X-chromosome inactivation and presumptive expression of the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) gene in hematopoietic cell lineages of a thrombocytopenic carrier female of WAS. *Hum Genet*, *88*: 237-241, 1991.
161. Lutskiy, M. I., Sasahara, Y., Kenney, D. M., Rosen, F. S., and Remold-O'Donnell, E. Wiskott-Aldrich syndrome in a female. *Blood*, *100*: 2763-2768, 2002.
162. Parolini, O., Ressmann, G., Haas, O. A., Pawlowsky, J., Gadner, H., Knapp, W., and Holter, W. X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. *N Engl J Med*, *338*: 291-295, 1998.
163. Russell, S. J. and Nisen, P. D. Random X chromosome inactivation in a female with a variant of Wiskott-Aldrich syndrome. *Br J Haematol*, *90*: 210-212, 1995.
164. Litzman, J., Jones, A., Hann, I., Chapel, H., Strobel, S., and Morgan, G. Intravenous immunoglobulin, splenectomy, and antibiotic prophylaxis in Wiskott-Aldrich syndrome. *Arch Dis Child*, *75*: 436-439, 1996.
165. Mullen, C. A., Anderson, K. D., and Blaese, R. M. Splenectomy and/or bone marrow transplantation in the management of the Wiskott-Aldrich syndrome: long-term follow-up of 62 cases. *Blood*, *82*: 2961-2966, 1993.

166. Conley, M. E., Saragoussi, D., Notarangelo, L., Etzioni, A., and Casanova, J. L. An international study examining therapeutic options used in treatment of Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol*, 109: 272-277, 2003.
167. Lum, L. G., Tubergen, D. G., Corash, L., and Blaese, R. M. Splenectomy in the management of the thrombocytopenia of the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med*, 302: 892-896, 1980.
168. Mathew, P. and Conley, M. E. Effect of intravenous gammaglobulin (IVIG) on the platelet count in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Allergy Immunol*, 6: 91-94, 1995.
169. Blaese, R. M., Strober, W., Levy, A. L., and Waldmann, T. A. Hypercatabolism of IgG, IgA, IgM, and albumin in the Wiskott-Aldrich syndrome. A unique disorder of serum protein metabolism. *J Clin Invest*, 50: 2331-2338, 1971.
170. Ozsahin, H., Le Deist, F., Benkerrou, M., Cavazzana-Calvo, M., Gomez, L., Griscelli, C., Blanche, S., and Fischer, A. Bone marrow transplantation in 26 patients with Wiskott-Aldrich syndrome from a single center. *J Pediatr*, 129: 238-244, 1996.
171. Filipovich, A. H., Stone, J. V., Tomany, S. C., Ireland, M., Kollman, C., Pelz, C. J., Casper, J. T., Cowan, M. J., Edwards, J. R., Fasth, A., Gale, R. P., Junker, A., Kamani, N. R., Loechelt, B. J., Pietryga, D. W., Ringden, O., Vowels, M., Hegland, J., Williams, A. V., Klein, J. P., Sobocinski, K. A., Rowlings, P. A., and Horowitz, M. M. Impact of donor type on outcome of bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the International Bone Marrow Transplant Registry and the National Marrow Donor Program. *Blood*, 97: 1598-1603, 2001.
172. Knutsen, A. P., Steffen, M., Wassmer, K., and Wall, D. A. Umbilical cord blood transplantation in Wiskott Aldrich syndrome. *J Pediatr*, 142: 519-523, 2003.
173. Chinen, J. and Puck, J. M. Successes and risks of gene therapy in primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*, 113: 595-603; quiz 604, 2004.
174. Puck, J. M., Siminovitch, K. A., Poncz, M., Greenberg, C. R., Rottem, M., and Conley, M. E. Atypical presentation of Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis in two unrelated males based on studies of maternal T cell X chromosome inactivation. *Blood*, 75: 2369-2374, 1990.

175. Wada, T., Schurman, S. H., Otsu, M., Garabedian, E. K., Ochs, H. D., Nelson, D. L., and Candotti, F. Somatic mosaicism in Wiskott–Aldrich syndrome suggests in vivo reversion by a DNA slippage mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 8697-8702, 2001.
176. Wada, T., Konno, A., Schurman, S. H., Garabedian, E. K., Anderson, S. M., Kirby, M., Nelson, D. L., and Candotti, F. Second-site mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein gene causes somatic mosaicism in two WAS siblings. *J Clin Invest*, **111**: 1389-1397, 2003.
177. Wada, T., Schurman, S. H., Jagadeesh, G. J., Garabedian, E. K., Nelson, D. L., and Candotti, F. Multiple patients with revertant mosaicism in a single Wiskott-Aldrich syndrome family. *Blood*, **104**: 1270-1272, 2004.
178. Konno, A., Wada, T., Schurman, S. H., Garabedian, E. K., Kirby, M., Anderson, S. M., and Candotti, F. Differential contribution of Wiskott-Aldrich syndrome protein to selective advantage in T- and B-cell lineages. *Blood*, **103**: 676-678, 2004.
179. Ariga, T., Kondoh, T., Yamaguchi, K., Yamada, M., Sasaki, S., Nelson, D. L., Ikeda, H., Kobayashi, K., Moriuchi, H., and Sakiyama, Y. Spontaneous in vivo reversion of an inherited mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Immunol*, **166**: 5245-5249, 2001.
180. Strom, T. S., Gabbard, W., Kelly, P. F., Cunningham, J. M., and Nienhuis, A. W. Functional correction of T cells derived from patients with the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) by transduction with an oncoretroviral vector encoding the WAS protein. *Gene Ther*, **10**: 803-809, 2003.
181. Wada, T., Jagadeesh, G. J., Nelson, D. L., and Candotti, F. Retrovirus-mediated WASP gene transfer corrects Wiskott-Aldrich syndrome T-cell dysfunction. *Hum Gene Ther*, **13**: 1039-1046, 2002.
182. Huang, M. M., Tsuboi, S., Wong, A., Yu, X. J., Oh-Eda, M., Derry, J. M., Francke, U., Fukuda, M., Weinberg, K. I., and Kohn, D. B. Expression of human Wiskott-Aldrich syndrome protein in patients' cells leads to partial correction of a phenotypic abnormality of cell surface glycoproteins. *Gene Ther*, **7**: 314-320, 2000.
183. Candotti, F., Facchetti, F., Blanzuoli, L., Stewart, D. M., Nelson, D. L., and Blaese, R. M. Retrovirus-mediated WASP gene transfer corrects defective actin polymerization in

- B cell lines from Wiskott-Aldrich syndrome patients carrying 'null' mutations. *Gene Ther*, 6: 1170-1174, 1999.
184. Strom, T. S., Turner, S. J., Andreansky, S., Liu, H., Doherty, P. C., Srivastava, D. K., Cunningham, J. M., and Nienhuis, A. W. Defects in T-cell-mediated immunity to influenza virus in murine Wiskott-Aldrich syndrome are corrected by oncoretroviral vector-mediated gene transfer into repopulating hematopoietic cells. *Blood*, 102: 3108-3116, 2003.
185. Wengler, G. S., Notarangelo, L. D., Berardelli, S., Pollonni, G., Mella, P., Fasth, A., Ugazio, A. G., and Parolini, O. High prevalence of nonsense, frame shift, and splice-site mutations in 16 patients with full-blown Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 86: 3648-3654, 1995.
186. Lemahieu, V., Gastier, J. M., and Francke, U. Novel mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene and their effects on transcriptional, translational, and clinical phenotypes. *Hum Mutat*, 14: 54-66, 1999.
187. Jin, Y., Mazza, C., Christie, J. R., Giliani, S., Fiorini, M., Mella, P., Gandellini, F., Stewart, D. M., Zhu, Q., Nelson, D. L., Notarangelo, L. D., and Ochs, H. D. Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hot spots, effect on transcription and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood*, 2004.
188. Greer, W. L., Shehabeldin, A., Schulman, J., Junker, A., and Siminovitch, K. A. Identification of WASP mutations, mutation hotspots and genotype-phenotype disparities in 24 patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Genet*, 98: 685-690, 1996.
189. Schindelbauer, D., Weiss, M., Hellebrand, H., Golla, A., Hergersberg, M., Seger, R., Belohradsky, B. H., and Meindl, A. Wiskott-Aldrich syndrome: no strict genotype-phenotype correlations but clustering of missense mutations in the amino-terminal part of the WASP gene product. *Hum Genet*, 98: 68-76, 1996.
190. Villa, A., Notarangelo, L., Macchi, P., Mantuano, E., Cavagni, G., Brugnoli, D., Strina, D., Patrosso, M. C., Ramenghi, U., Sacco, M. G., and et al. X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in the WASP gene. *Nat Genet*, 9: 414-417, 1995.

191. Remold-O'Donnell, E., Cooley, J., Shcherbina, A., Hagemann, T. L., Kwan, S. P., Kenney, D. M., and Rosen, F. S. Variable expression of WASP in B cell lines of Wiskott-Aldrich syndrome patients. *J Immunol*, *158*: 4021-4025, 1997.
192. Stewart, D. M., Treiber-Held, S., Kurman, C. C., Facchetti, F., Notarangelo, L. D., and Nelson, D. L. Studies of the expression of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *J Clin Invest*, *97*: 2627-2634, 1996.
193. Schwarz, K. WASPbase: a database of WAS- and XLT-causing mutations. *Immunol Today*, *17*: 496-502, 1996.
194. Kwan, S. P., Hagemann, T. L., Radtke, B. E., Blaese, R. M., and Rosen, F. S. Identification of mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome gene and characterization of a polymorphic dinucleotide repeat at DXS6940, adjacent to the disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*: 4706-4710, 1995.
195. de Saint Basile, G., Lagelouse, R. D., Lambert, N., Schwarz, K., Le Mareck, B., Odent, S., Schlegel, N., and Fischer, A. Isolated X-linked thrombocytopenia in two unrelated families is associated with point mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene. *J Pediatr*, *129*: 56-62, 1996.
196. Schwartz, M., Bekassy, A., Donner, M., Hertel, T., Hreidarson, S., Kerndrup, G., Stormorken, H., Stokland, T., Tranebjaerg, L., Orstavik, K. H., and Skovby, F. Mutation spectrum in patients with Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia: identification of twelve different mutations in the WASP gene. *Thromb Haemost*, *75*: 546-550, 1996.
197. Chan, K. W., Lee, T. L., Chung, B. H., Yang, X., and Lau, Y. L. Identification of five novel WASP mutations in Chinese families with Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Mutat*, *20*: 151-152, 2002.
198. Thompson, L. J., Lalloz, M. R., and Layton, D. M. Unique and recurrent WAS gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Blood Cells Mol Dis*, *25*: 218-226, 1999.
199. Brooimans, R. A., van den Berg, A. J., Tamminga, R. Y., Revesz, T., Wulffraat, N. M., and Zegers, B. J. Identification of six novel WASP gene mutations in patients suffering from Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Mutat*, *15*: 386-387, 2000.

200. Itoh, S., Nonoyama, S., Morio, T., Imai, K., Okawa, H., Ochs, H. D., Shimadzu, M., and Yata, J. Mutations of the WASP gene in 10 Japanese patients with Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Int J Hematol*, 71: 79-83, 2000.
201. Kanegane, H., Nomura, K., Miyawaki, T., Sasahara, Y., Kawai, S., Tsuchiya, S., Murakami, G., Futatani, T., and Ochs, H. D. X-linked thrombocytopenia identified by flow cytometric demonstration of defective Wiskott-Aldrich syndrome protein in lymphocytes. *Blood*, 95: 1110-1111, 2000.
202. Rottem, M., Alon-Shalev, S., Shneur, Y., and Hujeirat, Y. Wiskott Aldrich syndrome in an Israeli family: identification of a novel G40V mutation. *Hum Mutat*, 16: 448, 2000.
203. Sasahara, Y., Kawai, S., Kumaki, S., Ohashi, Y., Minegishi, M., and Tsuchiya, S. Novel mutations, no detectable mRNA and familial genetic analysis of the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene in six Japanese patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur J Pediatr*, 159: 23-30, 2000.
204. Fillat, C., Espanol, T., Oset, M., Ferrando, M., Estivill, X., and Volpini, V. Identification of WASP mutations in 14 Spanish families with Wiskott-Aldrich syndrome. *Am J Med Genet*, 100: 116-121, 2001.
205. Ho, L. L., Ayling, J., Prosser, I., Kronenberg, H., Iland, H., and Joshua, D. Missense C168T in the Wiskott-Aldrich Syndrome protein gene is a common mutation in X-linked thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 112: 76-80, 2001.
206. Imai, K. WASPbase. Updated 29 april 2004.
<http://homepage.mac.com/kohsukeimai/wasp/WASPbase.html>.
207. Ochs, H. D. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Isr Med Assoc J*, 4: 379-384, 2002.
208. Stewart, D. M., Tian, L., and Nelson, D. L. Mutations that cause the Wiskott-Aldrich syndrome impair the interaction of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) with WASP interacting protein. *J Immunol*, 162: 5019-5024, 1999.
209. Luthi, J. N., Gandhi, M. J., and Drachman, J. G. X-linked thrombocytopenia caused by a mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) gene that disrupts interaction with the WAS protein (WASP)-interacting protein (WIP). *Exp Hematol*, 31: 150-158, 2003.
210. Binder, V., Albert, M. H., Kabus, M., Bertone, M., Meindl, A., and Belohradsky, B. H. The genotype of the original Wiskott phenotype. *N Engl J Med*, 355: 1790-1793, 2006.

211. Foster, C. B., Lehrnbecher, T., Mol, F., Steinberg, S. M., Venzon, D. J., Walsh, T. J., Noack, D., Rae, J., Winkelstein, J. A., Curnutte, J. T., and Chanock, S. J. Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*, *102*: 2146-2155, 1998.
212. Linder, S., Wintergerst, U., Bender-Gotze, C., Schwarz, K., Pannicke, U., and Aepfelbacher, M. Macrophages of patients with X-linked thrombocytopenia display an attenuated Wiskott-Aldrich syndrome phenotype. *Immunol Cell Biol*, *81*: 130-136, 2003.

6 Danksagung

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. B. H. Belohradsky möchte ich mich sehr herzlich bedanken für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung der Originalunterlagen von Prof. A. Wiskott und vieler anderer interessanter und wichtiger Literatur. Besonders möchte ich mich jedoch auch bedanken für die große Geduld, die er mir in der Betreuung entgegengebracht hat und die sehr hilfreichen Besprechungen, nach denen ich das Ziel wieder etwas klarer vor Augen hatte.

Bei meinem Mitbetreuer Herrn Prof. Dr. A. Meindl möchte ich mich herzlichst bedanken für die sehr engagierte Mitbetreuung und die Überlassung der Daten inklusive der nicht veröffentlichten Mutationen. Aber ganz besonders auch für die Bereitstellung seines Labors für die Mutationsanalysen der Nachfahren der von Prof. Wiskott erstbeschriebenen Familie. Hier auch ein besonderer Dank an seinen Mitarbeiter Herrn Bertone für die stets äußerst bereitwillige Unterstützung bei der Zusammenstellung der Daten.

Bei meinen Eltern, meinem Bruder, meinen Freunden Andrea, Babsi, Nico und Sascha möchte ich mich ganz herzlich für die vielen Motivationsversuche und ihre Unterstützung bedanken. Bei Dominik Hartl und Michael Albert möchte ich mich ganz herzlich für ihre Hilfe bei all meinen Formatierungsversuchen bedanken.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Vera Binder
Geburtsdatum	04.02.1971
Geburtsort	München
Nationalität	deutsch
Konfession	röm.-kath.

Schulbildung

1977 - 1980	Grundschule Unterschleißheim
1980 – 1981	Grundschule Kirchheim
1981 – 1983	Gymnasium Markt Schwaben
1983 – 1990	Carl-Orff Gymnasium Unterschleißheim

Universitätsausbildung

Mai 1993 – Dez. 2000	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Dez. 2000	3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

1. Tertial	Innere Medizin, Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
2. Tertial	Chirurgie, Universität Nassau, Bahamas und Krankenhaus München-Harlaching
3. Tertial	Pädiatrie, Kinderklinik und Kinderpoliklinik am Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arzt im Praktikum

01.02.2001 – 31.07.2002 Kinderklinik und Kinderpoliklinik am Dr. von Haunerschen
Kinderspital der Ludwig- Maximilians Universität München
seit 01.08.2002 Vollapprobation

Assistenzarzt in Weiterbildung

seit 01.08.2002 Assistenzärztin an der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
am Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Ludwig-Maximilians-Universität München