

# אפיון מעמיק של מערכת החיסון הנרכשת באמצעות Next Generation Sequencing (NGS): חידושים בתחום חסר חיסוני ראשוני ומבט לעתיד

תקציר

עוצמתה של מערכת החיסון הנרכשת, המורכבת מהזרוע התאית (לימפוציטים מסוג D) ומהזרוע ההומורלית (לימפוציטים מסוג B), טמונה ביכולתה לאזהות מגוון אינסופי של אנטיגנים זרים ולางן מפנייהם. היא עשויה על ידי ייצור מגוון קולטניים עצום של תאוי D ו-B, אשר יחד מייצגים את פרטואר מערכת החיסון הנרכשת. שימוש בטכנולוגיה לירצוף גנטי בתפוקה גבוהה ובעלות נמוכה כדוגמת ריצוף גנטי מהדור החדש, Next Generation Sequencing (NGS), הביאה לפריצות דרך ברפואה מולקולרית והעצימה את יכולתנו לאבחן באופן מעמיק ומדויק את הרפרטואר החיסוני של מחלות חסר חיסוני, ולאזהות בין היתר פגמים בתהליכי ייצור הגיוון המשמעותי.

שיגיאות מולדות במערכת החיסון באדם מייצרות למעשה מודל אנושי המאפשר ללמוד על תפקודם של גנים וחלבוניים אשר קרייטיים לפיעליות מערכת החיסון במאבי חוליות ובריאות, ומודל זהה מציג באופן ישיר את ביטויים הקליניים. חקר פרטואר מערכת החיסון הנרכשת בחולמים עם חסר חיסוני לימד אותנו על קשרים בין הממצאים הקליניים לגנטים, מאיינים דומים בין מחלות מנגן דוימה במקביל לאפיון חתימה מולקולרית ייחודית למחלת נחרת. מודיע זה הוא מרכיב חשוב בחקר מחלות חסר חיסוני, ותרם לשיפור יכולות האבחון וליצירת טיפול מותאם אישית. עם זאת, ה-NGS הביא עימו לא מעטאתגרים הקוראים לצורך בשילוב של טכנולוגיות מותאמות, כדוגמת פלטפורמות ענן כמו Kusto המאפשרות הטמעת טכניקות בינה מלאכותית.

**מילות מפתח:** חסר חיסוני; ריצוף גנטי מהדור החדש; רפרטואר מערכת החיסון; מערכת החיסון הנרכשת; מחשוב מבוסס ענן.

**Keywords:** Immunodeficiency; Next generation sequencing; Immune repertoire; Adaptive immune system; Cloud-based platform.

ידי הוספה או החסרה של נוקלאוטידים, היפרמווטציות סומטיות, וקומבינציות שונות של תת-ייחידות/שרשראות [2,1].

טכנולוגיות לריצוף גנטי בתפוקה גבוהה ובעלות נמוכה כדוגמת ריצוף גנטי מהדור החדש, Next Generation Sequencing (NGS), הביאו לפריצות דרך מודיעות במגוון תחומיים בעשורים האחרונים, בין היתר בתחום האימונולוגיה. בקריאת של מיליון רצפים במקביל, ניתן לאפיין את מערכת החיסון ברזולוציה גבוהה ביותר ברמה המולקולרית. נפח המידע הגנטי, בשילוב עם כלים ביואנפורטטיים וסטטיסטיים, הביאו למקופה בחקר הבiology של לימפוציטים בבריאות ובחולי, וזה תרגומה ליישומים קליניים – זיהוי, מעקב והנדוס שבתי תא חיסון, בחינת תגובה חיסונית ועוד [4-1].

## הקדמה

עוצמתה של מערכת החיסון הנרכשת, המורכבת מהזרוע התאית (לימפוציטים מסוג T) ומהזרוע ההומורלית (לימפוציטים מסוג B), טמונה ביכולתה לאזהות מגוון אינסופי של אנטיגנים זרים ולางן מפנייהם. היא עשויה על ידי ייצור מגוון קולטניים עצום של תאוי T cell receptors, TCR (T cell receptors, TCR) ושל תא B (B cell receptors, BCR), אשר יחד מייצגים את פרטואר מערכת החיסון הנרכשת. מספר תהליכי תורמים לייצור המgoון הנחוץ לאותו רפרטואר חיסוני; תהליכי רקובומבינציית גנים J-D - V-D - V-J – (Variable, Diversity and Joining) (Variable, Diversity and Joining) הבונה את האזור הוויריאלי בקולטני תא T ו- B החשוב לקישור האנטיגן, גיוון בצמחי היחסורות בחיבור הגנים הללו על

Flow cytometry Spectratyping, וכן טכניות של TCR Complementarity-determining region 3 (CDR3) ו-BCR. המידע המתקבל משיטות אלו מיעוד: (1) לאפיון כלליל של מידת הקלונליות; (2) לאיתור קלוניים שעברו התפשטות. דהיינו, המידע בעיקרו נמדד באופן אינטימי, לוקה בחסר מבחנית דיק הרפטואר והיקפו, ומוגבל לאפיון פרטוריים בתחום הגיוון בלבד ברזולוציה נמוכה [13,12,2].

### אפיון הרפטואר החיסוני של מערכת NGS

המהפכה ביכולת האבחון הגנטי שהביא עימיו ה-NGS הרחיבה את טווח הגילוי למוטציות פר הרצתה [6]. שילוב טכניות NGS לאפיון הרפטואר של TCR ו-BCR, הוסיף אומדנים במוטיים-סטטיסטים וישומים ייזואליים וביאו אינפורטטיביים לבחינות מגוון הרפטואר, וגם אפשר לאפיון פרטוריים נספחים ברפטואר כתלות בשורשות

**■ המהפכה הגנטית בהובלות Next Generation Sequencing חשפה נדבך מהותי ברפואה מולקולרית, והעצימה את יכולתנו לאפיין באופן עמוק ומדויק את רפטואר הקולטניים במערכת החיסון הנרכשת במצבי בריאות ובמלחמות חסר חיסוני.**

**■** חקר הרפטואר החיסוני בחולים עם חסר חיסוני לימד אותנו על קשרים בין הביטוי הקליני והמצאות הגנטי (גנטיפ-פונטיפ), מנגנוניים שבבסיס מחלות ראשונות של מערכת החיסון והתפקידם של גנים וחלבונים בחולי ובריאות, ואפשר לאפיין חתימה מולקולרית ייחודית למחלות אלו.

**■** הכוח הטמון בשיטה זו מביא עתיד מדעי זה אל מיתת המטופל ומיצר מקום לדרכי אבחון וטיפול חדשות. בו בעת, אותו כוח אינו יכול לנסוק ללא הכרה בעתיד המתהווה בדמות טכנולוגיות ענן וטכנולוגיות בינה מלאכותית, *KuGmaT*.

אותה נבחר לרץ; שרשרת β של TCR (TRB), שרשרת γ של TCR (TRG) ושרשרת כבדה של Immunoglobulin (Ig) של BCR (IGH). דרך הרפטואר של TRB ניתן למדוד על תא T מסווג β<sup>+</sup> המהווים את רוב תא ה-T בدم היקפי, דרך הרפטואר של TRG ניתן למדוד על תא T מסווג δ<sup>+</sup>, ודרך הרפטואר של IGH ניתן למדוד על תא B [16,14,12,2,1].

אנו יכולים למדוד על דרגת גיון רפטואר הקולטניים של תא T ו-B, הן באופן אינטימי והן באופן כמותי. התוצאה האיכותית נקראת Treemap שבה כל ריבוע קטן בתרשים מייצג שבט תא, וגודלו ביחס לשאר הריבועים הקטנים מייצג את מידת התפשטות של אותו שבט תא. המדדים הכמותיים כוללים: כימות מספר הרצפים לפי וקומבינציה

בשנים האחרונות, יישום נרחב של טכניות NGS בוצע גם במחקר מחלת חסר חיסוני ראשוןי, Primary Immunodeficiency (PID), או בשמן הנוסף - Shigaot Inborn Errors of Immunity, Severe (IEI), ובפרט באפיון חסר חיסוני משולב חמור - Combined Immunodeficiency (SCID) מחלות מונogeneיות, המביאות לתחלואה קשה עם שיורי תמורה גבוהה בגיל צעה, ואבחון וטיפול מוקדיים עשויים להציג חיים [8]. התחלואה לעיל כוללת קשיים רחבה של ביוטיים קליניים: אוטופיה, נטייה ליזוהמים, תופעות אוטואימוניות, אוטואינפלמטוריות, בשל לשד העצם וממאורות [7]. הקשר הבלתי אמצעי בין גנטיפ מסויים לפונטיפ קליני מייצר מודל אונשי המאפשר ללמידה על תפקודם של גנים וחלבונים אשר קרייטיים לקיום מערכת חיסון חזקה ובריאה, וمبיא להתקדמות שימושית ברפואה מולקולרית וביבולוגית של האדם [7]. על אף היוטן נדירות, היראוות מחלות חסר חיסוני ראשוני בישראל היא גבוהה, בעיקר עקב ריבוי נישואי קרוביים בקרב קהילות מסוימות; שכיחות אבחנות SCID בילוד היא 1:29,000 – פי 3.4-1.7 מהתיאוריות הועלמיה, לצד דויחות על שכיחות גבוהה ל-SCID שאין יכולות על פני חמישה שנים – פי 11-9 [9].

פעמים רבים מאותן מוטציות מובילות לפגמים בזרוע של מערכת החיסון הנרכשת, כאשר תצורת הפגיעה הקשה ביותר היא SCID, שבה יש חסר כמותי ו/או תפקודי החיסוני A ו-Ao B. לפיכך, מחקרים לאפיון הרפטואר החיסוני של חולים אלו דרך NGS היז חלק אינטגרלי בפונוח המנגנון שבסיס מחלות אלו, ותרמו בחלקים לשיפור יכולות האבחון, לאיתור אינדיקטורים פרוגנוטטיבים, וליצירת טיפול מותאם אישית ממוקד מגנון או מסלול תא, תוך למידה לצורך התקדמות לעבר>Edit gene וטיפול גנטי – Gene editing and therapy.

בסקירה זו, נבחן את הערך המוסף שהביא עימיו NGS לאפיון המגוון של מערכת החיסון הנרכשת. נסקור מסקנות וחידושים מהעת האחרונה בתחום החסר החיסוני שנלמדו על ידי אפיון הרפטואר החיסוני דרך NGS. לבסוף, נתיחס לאתגרים שהביאו עימם אותו נפח חסר תקדים של מידע גנטי באשר לאחסון וניתוח המדיע, ונעלה התפתחויות טכנולוגיות בהווה ובעתיד.

### הערכות גיון רפטואר מערכת החיסון הנרכשת בחולי חסר חיסוני טרם הטעמת ה-NGS

ניתן לאפיין את רפטואר הקולטניים של תא T ו-B מתוך דגימות של רכਮות שונות לרבות דם פריפרי, וכן מחומרדים ביולוגים שונים, כגון דן"א, רן"א וחלבון [12]. אמררי סקירה קודמים תיארו באופן מקיף שיוטות להערכות רפטואר מערכות החיסון הנרכשת [13,12,2]. השיטות העיקריות שיושמו טרם הטעמת ה-NGS הן: זיהוי וכימות החלק החיסוני של סוג משפחות מסוימים של TCR לפי האזור הוריאבלי, של שרשרת β באמצעות

בתוך הרחם.

### מיסקנות וחידושים במחקר אפיון הרופטואר NGS החיסוני של חולי חסר חיסוני על ידי J-D-V

את מכלול הגנים הפגומים המובילים לחסר חיסוני משולב ניתן לסתור למספר קטגוריות לפי תהליכיים: תהליך הצגת האנטיגן למערכת החיסון הנרכשת, תהליך העברת האותות בעת קישור האנטיגן לרפטואר תא ה-T או ה-B, תהליך העברת האותות בעת קישור ציטוקין לקולטן שלו על גבי תא ה-T או ה-B, תהליכיים בסיסיים בתוך תא ה-T או ה-B, ותהליך רקובמייצית גנים J-D-V.

Lee וחב' [22] אפיינו את האופן שבו מוטציות בי-RAG1 או RAG2 מעצבות את רפטואר קולטני מערכת החיסון הנרכשת בקרב 12 חולים עם חסר בי-RAG בעלי חומרת מחלת משתנה, בהשוואה לקובצת בקרה. RAG ממלא תפקיד קריטי בתהליך רקובמייצית J-D-V ובהתפתחות תקינה של תא ה-T ו-B. חסר בו מוביל לפגיעה חיסונית עם הטוגניות קלינית, מההופעה החמורה ביותר של SCID Combined Immunodeficiency (CID-G/AI) (with Granulomas or Autoimmunity) (CID-G/AI). שימוש NGS לאפיון הרופטואר ביסס את הקשר בין הגנטיפ לפונטיפ האופיני בי-PID כאשר הקובצת הצינה מתאם (קורלציה) בין אבנורמליות מאפייני הרופטואר לחומרת המחלת הקלינית, וכן הדגימה כי מאפייני רפטואר מסויימים מקושרים לפונטיפים מסוימים.

גנים המעורבים גם הם בתהליך רקובמייצית J-D-V שעוברים תוארו ונחקרו וריאנטים פתוגנים באמצאות NGS הם: LIG4 ו-NHEJ1-Ligase-4. שניים משתתפים בתהליך תיקון דנ"א דו סילילי בתא הנקרוא Non-Homologous End-Joining (NHEJ) הדריש לתהליך רקובמייצית J-D-V. פגם בגנים אלו מוביל ל-SID-Felgentreff. SID-Dיווחו על שלושה חולים מאותה משפחה עם חסר בי-LIG4 בעלי פונטיפ שונה. אנליזת רפטואר קולטני תא ה-T וה-B הדגימה לדאיונה שימוש מוגבר במסלול אלטרנטיבי לתיקון Microhomology-Mediated End-Joining (MHMEJ) (MHMEJ) (באדם בהיעדר LIG4, SMBVIL לירידה בהוספת נוקלאוטידים בין צמתים הסגמנטים בתהליך ה-(D-V) R ו- CDR3 קצר. Frizinsky וחב' [24] דיווחו על ולאורק מוטציה בי-NHEJ1 שלא תועדה בעבר ומובילה לחסר בי-XLF/Cernunnos. אפיון הרופטואר של TCR ו- BCR הדגים בשניהם מגוון קולטנים מצומצם ונוכחות של התפשטות קלונלית, משמע לחסר זה השלכות אפשריות על התפתחות תא ה-T ו-B, בהרת (תימוס) ובלשד העצם, בהתאם.

במחקר אחר של Frizinsky וחב' [25], דיווחו החוקרים על מוטציה שלא תוארה בעבר בגין המקודד לחלבון Mucosa-Associated Lymphoid Tissue lymphoma-translocation gene 1 (MALT1) בשני בני דודים. החלבון לעיל נחוץ למסלול שפיעול (אקטיבציה) תא של NFkB שמלוא תפקיד זה במערכת החיסון המולדת והן במערכת החיסון הנרכשת. החוקר חיזק את הקשר בין MALT1

ייחודית (משמעות מספר סוגים הקלוניים, clonotypes) וככלל (בל תא ה-T, מסוג βγ או γδ, או תא ה-B, שרצוף בדינמה), אינדקס לכימות גיון הרופטואר הנקרוא H Shannon's index ואינדקס לכימות היעדר אחידות הרופטואר הנקרוא index Simpson's D index של: Simpson's D index

$$\text{Shannon's H} = -\sum_{i=1}^R p_i \ln p_i \quad \text{Simpson's D} = \frac{1}{\sum_{i=1}^R p_i^2}$$

R = מספר כל הרצפים; i = מספר הרצפים ייחודיים; pi = החלק היחסי של כל הרצפים ששוויכים ל-*i*.

ניתן ללמוד על מידת התפשטות של שבטי תא חיסון ברופטואר דרך הסתכילות על אינדקס Simpson's D index וכן ביצוע ניתוח נתונים על סוגים הקלוניים שהתרפשטו באופן המשמעותי ביותר ביחס לכל הרצפים. דרך אלו, אנחנו מודים עלlikelihoodים בהתקיימם ההתקפות והאקטיבציה של תא ה-T ו-B.

בנוסף, באמצעות טכניקות טכניות NGS, ניתן לנתח את התהליך רקובמייצית J-D-V באופן שלא ניתן לבחון עד כה. בתהליך יצירת הגיון, כל סגמנט בקובמייציה (D, V, ו-J) כולל אופציית גנים רבות, כאשר גיון מסוים מתחווה בצמחייה החיבור בין הגנים הנבחרים דרך חיתוך לא מדויק שمبיא לתוספת או חסר בנוקלואוטידים. אפיון הרופטואר החיסוני דרך NGS מאפשר להזות העדפה לשימוש בקובמייצית גנים מסוימים במהלך מסויימות או באוצטיציות קליניות מסוימות, וכן ללמידה על ממצאים פתולוגים בצמחייה החיבור בין הגנים. הרקובמייציה של החלק הורייאבלי, מהוות למעשה את האתר הקישור לאנטיגן CDR3. אונלייזות רבות ניתן לבצע על CDR3 מבחינת אורק הסגמנט והרכיב חומצות האmino שלו, כאשר לאלו השפעה אפשרית על תפקוד לקוי, פגיעה ביכולת להבחין בין אנטיגן עצמי לזר ווועד.

ניתן ללמוד על רמות נוכחות היפרמוטציות סומטיות, Somatic Hypermutations (SHM), אשר תורמות לדרגת גיון רפטואר קולטני תא B. זאת, על ידי חישוב ציון שנקרא escore-pid, שמודד את אחוז הזהות של גן ה-D מול הרכבו בתא הנבט [17,4]. ניתן לבצע סוג אונלייזות נוספת על רבדים נוספים של מערכת החיסון. ישום NGS לאפיון רפטואר מערכת החיסון הנרכשת נעשה בחקר תחומיים שונים שבהם קיימת פגיעה במערכת החיסון או השפעה עליה; התפתחות העובר, שינויים בהקשר לגיל, מיקרוביום, זיהומיים, מחלות חסר חיסוני, מחלות אוטואימוניות, מחלות ממאיות, לפני ואחריו טיפולים כגון השתלת לשד עצם, אימונותרפיה ותרופה מדכאות חיסון (אימונוסופרסיביות), וכן בחינת מודלים לעריכה גנטית ex-vivo [4,5,18,19].

לדוגמה, Rechavi וחב' [20] חקרו את האונטוגנוז של מערכת החיסון הנרכשת במהלך ההתפתחות העוברית באדם על ידי אפיון הרופטואר החיסוני על ידי NGS. הם הדגימו כי הבשלה תא ה-T ו-B מבוקרת באופן טופורי ומרחבי במהלך ההתפתחות העוברית, וכי תהליכיים מתקדמים בתא B כגון Class Switch ו- SHM כוגן השתלט לשד עצם, אימונותרפיה ותרופה Recombination (CSR)

של SHM. Somech וחב' [28] דיווחו על שני אחים עם מוטציה ב-*ARPC1B* המובילה לפנווטיפ דומה ל-WAS, אך עיבוד תוצאות רפרטוואר TCR ו-BCR שלהם בהשוואה לקבוצות בקרה, חידד מאפיינים אשר ייחודיים לפגם ב-*ARPC1B*: נטייה למוגן רפרטוואר TCR דל עם התפשטות קלונלית המרמז על פגם בה��פתחות, היררות ו/או תגובה אימונולוגית תקינה בתאי T; שימוש מועדף בגנים מסוימים בתהיליך רקובמיינציית (*J/D*)/*A* אוקולוזיות תא T ו-B אשר עשויים לתורם לביטויים הקליניים של גרב, זיהומים, אבאת אדמנתיית מערכתיות (SLE) והפרעות אוטואימוניות אחרות, וכן יתרון כי הסלקציה הגנטית בהתקפתות תא B היא פעיל יותר מאשר של תא T.

תסমונות מסוימות כגון תסומנות דאון מלוחות בחסר חיסוני Rabinowicz וחב' [29] אפיינו את רפרטוואר TRG בדגימות דן"א מהרת (תמונה) של ארבעה מטופלים עם תסומנות דאון באמצעות NGS בהשוואה למטופלים שאינם תסומנים. הקבוצה מצאה אבנורמלויות מענייניות במטופלים עם תסומנות דאון; דרגות גיוון גבוהה של קולוטני הרפרטוואר לצד התקפות קלונלית חריפה, אשר אלו לא ניתנות להסביר על ידי פגם בתהיליך רקובמיינציית *J/D*.

### אתגרי NGS והעתיד המתהווה לנגד עיניינו

ה-NGS הביא עימיו נפח מידע חדש תקדים המכיב הטמעת טכנולוגיות המותאמות לאחסון ועיבוד כמויות עצומות של נתונים [3,2]. הchallenge כלים מטופלים על מידע הכלל מיליארדי רצפים גנטיים של מטופלים תוך השוואתם לקבוצות בקרה, יצירה צוואר בקבוק. מעבר לניצול זמן לא אפקטיבי לנוכח מגבלת משאבים המאפשרה עבודה על בסיס מטופל יחיד בלבד, ניתן נתונים באופן יומי או מועד לטעויות אנוש. יתרה מכך, שאלות מחקר הנוגעות להשוואה עם קבוצות מטופלים נוספות מעבר לקבוצות בקרה הן מורכבות לביצוע. לפיכך, חשוב מבוסס ענן הופך לכלי אינטגרלי בקשר חוקרם רבים בתחום הゲנטיקה [30,5,2].

במעבדת המחקר של סומך וחב' במרכז הרפואי שיבא תל השומר, ריצפנו את החלק ההוריאבילי של קולוטני תא T ו-B ממאות דגימות מדם היקפי של מטופלים עם חסרים חיסוניים שונים לצורך אפיון רפרטוואר מערכת החיסון הנרכשת שלהם. דרך Azure Data Explorer - Kusto (ADX) – פלטפורמת ענן ניתוחה כמות גדולה של נתונים המותאמת לשאלות אינטראקטיביות של Microsoft, זכרנו מסד נתונים גדול, Big data, המכיל מידע של מיליארדי רצפים גנטיים עליהם מטופלים, וכן של קבוצות בקרה. ב-*Kusto* ניתן לבצע אוטומציה, ניתוח נתונים, ויזואיזציה, ולשלב טכניקות בינה מלאכותית. הפרמטרים המובילים בבחירה מסד נתונים היו פשוטות, משמע שימוש בשפת שאלות אינטואטיבית שלא מצריכה ידע קודם במידע המחשב, ושימוש זמין ללא עלות עבור מחקר אקדמי. לא ניתן להתעלם מהעובדה כי זהו העתיד.

deficiency TRG באופן ספציפי, כדי ללמידה על הפרעה התפתחותית ראשונית בתאי ה-T, שכן שרשות זו נוצרת לפני שרשות β, על התפשטות קלונלית וכן לנוכח תפקוד מהותי של תא T מסווג β בחיסוניות העור. הקבוצה מצאה, כי רפרטוואר הקולוטניים היה מגוון, עם מצוי מעניין של התפשטות קלונלית אבנורמלית המקושרת לגן *TRGV10*, כאשר ניכר כי הפגם נובע משגשוג פגום בחלקים ההיקפיים (בפרפריה) ולא מבעה בהרתת (תמונה).

Lev וחב' [26] דיווחו על חיסוני מטופלים שעלו בסקר يولדים ל-SCID בישראל, עם מוטציה של תא תוארה קודם לכן בספרות בגין המkode IL-7Ra – קולוטן הקשור לציטוקין (IL-7), Interleukin-7. גם בקולוטן מוביל השתמשו קלינית ומהלך מחלת שונה. פגם בקולוטן מוביל לפגם בתהיליך העברת האותות בעת קישור היצוקין, וכך מוביל לפגם בהתקינות תא T באופן כללי, ולפוגם בהתקיפות ובאחזקה של תא T מסווג β בפרט. לחקר רפרטוואר TRG בקרוב דגימות דם היקפי בחולמים אלו בהשוואה לקבוצות בקרה היה מוקד עניין משמעותי. לצד מגוון קולוטנים מצומצם של תא T מסווג β עם התפשטות קלונלית משמעותית, הרפרטוואר של TRG הדגים מצאים אבנורמלים באזורי ה-CDR3; CDR3; מבחן חיבור הרכב חומצות אמיניות ומבחינות מספר והרכב הנוקלאוטידיים שבין סגנוני J-V. התוצאות לעיל רקסמו התיימה מולקולרית לפגם ב-*IL7RA* המצביעת על נתיחה לפגיעה בשלבי התקפות ריאנסיים של תא T מסווג β, ויחד עם זאת הדגימה דרך שונות מאפייני הרפרטוואר בין הפרטים גם את מרכיבות ההשפעות של גנטיקה-אפיגנטיקת-סביבה על שונות הפנווטיפ הקליני.

שתי מחלות של חסר חיסוני מושלב המלוחות בתромבוציטופניה ומושפעות מפגם ברוגלוציטי האקטין Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS) ו-*ARPC1B deficiency* (WAS). הפגם משפייע על יצירתי הסינפסה האימונולוגית ועל התגובה התקינה של תא T ו-*RBC*. O'Connell וחב' [27] אפיינו את רפרטוואר TRB ו-IGH מרט"א שהופק מדגימות דם היקפי של שמנה חולית WAS בהשוואה לקבוצות בקרה וזיהו התקפות קלונליות בקרוב תא זיכרון מסוג CD4+, תאים נאיביים ותאי זיכרון מסוג CD8+, וכן בתאי B, כאשר בתאי B נמצא גם שימוש מועדף בגנים מסוימים של *L7* ו-*C* באזורי ההוריאבילי ובגנים Palevski וחב' [27] הוציאו נדבך משמעותית להבנת המחללה על ידי הצגת רפרטוואר TRG ו-IGH מרט"א שהופק מדגימות דם היקפי של אربעה מטופלי WAS צעירים (מתחת לגיל שנה) בהשוואה לקבוצות בקרה. מאוחר שפנווטיפ של גרב (אקוזמה) הוא דומיננטי ב-*WAS*, חקר רפרטוואר תא T מסווג β הוא בעל חשיבות גבוהה, שכן גרב מוביל לרמות מוגברות של תאים אלו בפרפריה [27]. באופן לא צפוי, הקבוצה מצאה מספר נמוך של תא T מסווג β בסירוקולציה בחולי WAS. בסתרה למחקר קודם, רפרטוואר IGH הציגים מגוון משמעותי עקב היעדר התקפות קלונליות – אשר מرمץ על שפועל פגום של תא B, עם משנה תוקף המוצג על ידי pid-score גבוה שמתכתב עם שיעור נמוך

בעתיד המתהווה בדמota טכנולוגית ענן וטכניקות בינה מלאכותית, כדוגמת Kusto.

**לסיכום**

המהפכה הגנטית בהובלת ה-NGS השפה נדבר מהותי ברפואה מולקולרית, והעכימה את יכולתנו לאפיין באופן מעמיק ומדויק את הרפטואר החיסוני של מחלות חסר חיסוני. בשנים האחרונות בחולים עם חסר חיסוני למד אוטוננו על קשרי גנטיפי-פנוטיפ במחלות עם הסתמנויות קליניות נרחבות (כגון, RAG deficiency ו-IL7Ra deficiency), פתרומכאנזים בסיסים גנטיות ספציפיות (כגון, מאפיניים ILIG4 deficiency, IL7Ra deficiency, WAS משותפים למחלות בעלות מגנון דומה במקביל לאפיון חתימה מולקולרית ייחודית למחלת מסויימת (כגון, WAS ו-ARPC1B deficiency). הכוח העמום בשיטת אפיון רפרטואר מערכת החיסון דרך NGS, מביא עתיד מדעי זה אל מיתת המטופל ומצביע מקום לדרכי אבחון וטיפול חדשניות. בו בעת, אותו כוח אינו יכול לנסוק ללא הכרה

**ביבליוגרפיה**

1. Greiff V, Miho E, Menzel U, Reddy ST. Bioinformatic and Statistical Analysis of Adaptive Immune Repertoires. *Trends Immunol.* 2015;36(11):738-49.
2. Hou XL, Wang L, Ding YL & al. Current status and recent advances of next generation sequencing techniques in immunological repertoire. *Genes Immun.* 2016;17(3):153-64.
3. Yin Y, Butler C, Zhang Q. Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Hum Immunol.* 2021;82(11):812-19.
4. Robins H. Immunosequencing: applications of immune repertoire deep sequencing. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(5):646-52.
5. Watkins TS, Miles JJ. The human T-cell receptor repertoire in health and disease and potential for omics integration. *Immunol Cell Biol.* 2021;99(2):135-45.
6. Nijman IJ, Van Montfrans JM, Hoogstraat M & al. Targeted next-generation sequencing: a novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(2):529-34.
7. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A & al. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J clin Immunol.* 2022; 42(7):1473-1507.
8. Amariglio N, Lev A, Simon A & al. Molecular assessment of thymus capabilities in the evaluation of T-cell immunodeficiency. *Pediatr Res.* 2010;67(2):211-6.
9. Etzioni A. Primary immunodeficiency: The israeli connection. *Isr Med Assoc J.* 2018;20(11):703-6.
10. Rechavi E, Lev A, Saraf-Levy T & al. Newborn screening for severe combined immunodeficiency in Israel. *Int J Neonatal Screen.* 2017;3(2):13.
11. Lev A, Sharir I, Simon AJ & al. Lessons Learned From Five Years of Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in Israel. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2022;10(10):2722-31.
12. Six A, Mariotti-Ferrandiz ME, Chaara W & al. The past, present, and future of immune repertoire biology - the rise of next-generation repertoire analysis. *Front Immunol.* 2013;4:413.
13. Fozza C, Barraqueddu F, Corda G & al. Study of the T-cell receptor repertoire by CDR3 spectratyping. *J Immunol Methods.* 2017;440:1-11.
14. Woodsworth DJ, Castellarin M, Holt RA. Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med.* 2013;5(10):98.
15. Zhang L, Cham J, Paciorek A & al. 3D: Diversity, dynamics, differential testing - A proposed pipeline for analysis of next-generation sequencing T

- cell repertoire data. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):129.
16. *Trück J, Eugster A, Barennes P & al.* Biological controls for standardization and interpretation of adaptive immune receptor repertoire profiling. *Elife*. 2021;10:e66274.
  17. *Palevski D, Simon A, Lev A & al.* Inadequate Activation of γδT- and B-cells in Patient with Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS) Portrayed by TRG and IGH Repertoire Analyses. *J Clin Immunol*. 2023;43(1):109-22.
  18. *Ichinohe T, Miyama T, Kawase T & al.* Next-generation immune repertoire sequencing as a clue to elucidate the landscape of immune modulation by host-gut microbiome interactions. *Front Immunol*. 2018;9:668.
  19. *Schultheiß C, Paschold L, Simnica D & al.* Next-Generation Sequencing of T and B Cell Receptor Repertoires from COVID-19 Patients Showed Signatures Associated with Severity of Disease. *Immunity*. 2020;53(2):442-55.
  20. *Rechavi E, Lev A, Lee YN & al.* Timely and spatially regulated maturation of B and T cell repertoire during human fetal development. *Sci Transl Med*. 2015;7(276):276ra25.
  21. *Lancu O, Allen D, Knop O & al.* Multiplex HDR for disease and correction modeling of SCID by CRISPR genome editing in human HSPCs. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022;31:105-21.
  22. *Lee YN, Frugoni F, Dobbs K & al.* Characterization of T and B cell repertoire diversity in patients with RAG deficiency. *Sci Immunol*. 2016;1(6):eaah6109.
  23. *Felgentreff K, Baxi SN, Lee YN & al.* Ligase-4 Deficiency Causes Distinctive Immune Abnormalities in Asymptomatic Individuals. *J Clin Immunol*. 2016;36(4):341-53.
  24. *Frizinsky S, Rechavi E, Barel O & al.* Novel *NHEJ1* pathogenic variant linked to severe combined immunodeficiency, microcephaly, and abnormal T and B cell receptor repertoires. *Front Pediatr*. 2022;10:883173.
  25. *Frizinsky S, Rechavi E, Barel O & al.* Novel *MALT1* Mutation Linked to Immunodeficiency, Immune Dysregulation, and an Abnormal T Cell Receptor Repertoire. *J Clin Immunol*. 2019;39(4):401-13.
  26. *Lev A, Simon AJ, Barel O & al.* Reduced function and diversity of t cell repertoire and distinct clinical course in patients with *IL7RA* mutation. *Front Immunol*. 2019;10:1672.
  27. *O'Connell AE, Volpi S, Dobbs K & al.* Next generation sequencing reveals skewing of the T and B cell receptor repertoires in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Front Immunol*. 2014;5:340.
  28. *Somech R, Lev A, Lee YN & al.* Disruption of Thrombocyte and T Lymphocyte Development by a Mutation in *ARPC1B*. *J Immunol*. 2017;199(12):4036-45.
  29. *Rabinowicz S, Lev A, Lee YN & al.* Immune and TRG repertoire signature of the thymus in Down syndrome patients. *Pediatr Res*. 2021;89(1):102-9.
  30. *Langmead B, Nellore A.* Cloud computing for genomic data analysis and collaboration. *Nat Rev Genet*. 2018;19(4):208-19.

## כرونיקה



## חיסון לתוך הוריד ב-BCG מ健全 הגנה צולבת בפני שפעת בעכברים

החוקרים זיהו שגשוג של תא T מסוג CD4CX3CR1 בנסיון העכברים לאחר החיסון. תאים אלה הם תת קבוצה של תא זיכרון בעלי יכולת לייצר אינטראפרון גמא. החיסון גרם גם ליכולת נזיפה של תאים אלה, כולל לפארנכיימה, דבר המסביר את ההגנה בפני הדבקה במערכת הנשימה. המחברים סוברים כי רמה גבוהה של אינטראפרון שיוצר בתאי T הנו"ל אף מלמדת את תא T מערכת החיסון בריאות להtagונן בפני נגיף השפעת [Nat. Immunol. (2024) z-01739-z]. (<https://doi.org/10.1038/s41590-023-01739-z>)

**איתן ישראלי**

טראן וח'ב ניסו לבדוק האם חיסון בתרcitיב הח'י נגד שחפת, BCG, עשוי לתת הגנה צולבת בפני הדבקה נגיפית, במקורה זה שפעת מסוג *H1N1*, פנדמית. החוקרים חיסו עכברים בתרcitיב זה, הן במתן לתות עור והן במתן לתוך הוריד. קבוצה בקרה טיפולה באינבו. הממצאים הצבעו כי העכברים שחו טו לתוכה היי מוגנים בצרה משמעותית בפני הדבקה תגר בנגיר השפעת, בהשוואה לקבוצת הבקרה ולקבוצת החיסון התת עור. לא נצפתה הגנה של התרcitיב בפני שפעת בין עכברים החסרים תא T או B בוגרים, דבר המעיד על התפקיד החשוב של מערכת החיסון הנלמדת בהגנה צולבת בפני זיהומיים.