

Hronicna Mukokutana

Kandidijaza:

Uloga IL-17

Desa Lilic

MD MSc DSc FRCPath

**Consultant & Hon Clin Sen Lecturer in Immunology
Newcastle University**

Definicija: HMK/CMC je

DUGOTRAJNA

UPORNA

PONAVLJANA

OZBILJNA

INFEKCIJA KOZE I SLUZOKOZA KVASNICOM *CANDIDA*

- Rec je o *primarnoj* imunodeficijenciji => bez znanog uzroka
- Tu nije ukljucena sekundarna kandidijaza ciji su uzroci poznati (npr AIDs, lecenje citostaticima, vestacke vilice itd)



Mart 2012

CMC – III DTGO Bgd

Desa Lilic



Mart 2012

CMC – III DTGO Bgd

Desa Lilic

Primarne Immunodeficijencije sa CMC:

- Svi ozbiljne ID (SCID, T celijske)
 - Podloznost mnogim microorganismima – uključujući Kandidu = **Ne-selektivna**
- Neki sindromi (HIES, IL-12p40/R β 1)
 - Podloznost nekim microorganismima + Kandida = **delimicno selektivna**
- Sindrom CMC (ova istraživanja)
 - Podloznost samo Kandidi = **selektivna**

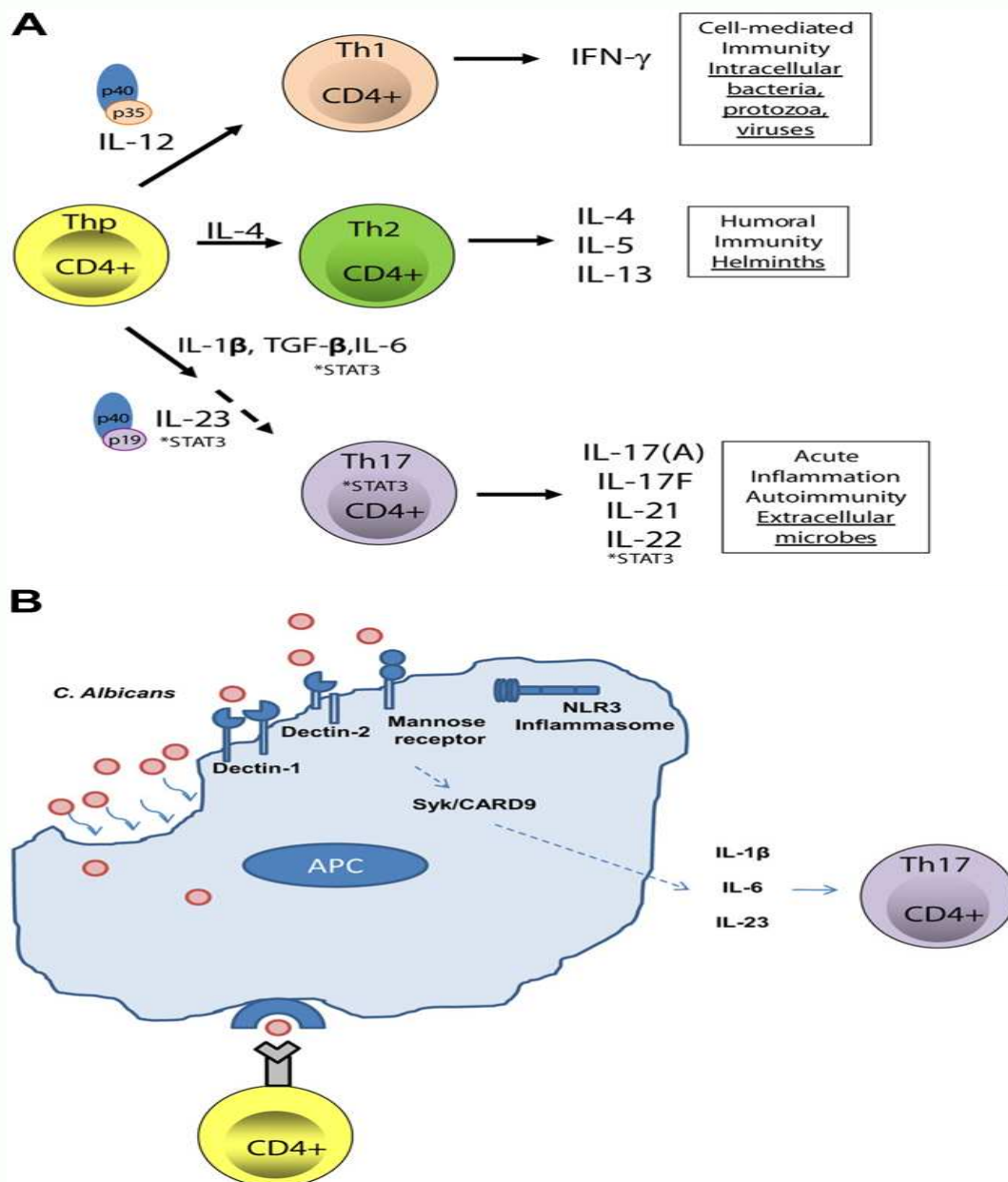
Zasto bas CMC?

CMC je “ne-konvencionalna” PID:

- **Podloznost infekcijama 1/malim brojem oportunistickih ili slabo-patogenih mikroorganizmima kod inace zdravih osoba:**
 - **Defekti IL-12 / IFNg & mikobakterije**
 - **X-vezana limfoproliferativna bolest i & EBV**
- **To su subtilni, monogeniski defekti**
- **Ovakve PID su veoma informative – humani “knock-out”...**
- **Ne-konvencionalne PID su kljuc za razumevanje imunoloskih procesa**
- **CMC omogucava razumevanje procesa koji su bitni u imunoloskom odgovoru na gljive**

Sta se znalo o imunitetu na Kandidu?

- Prvobitno se smatralo da je u pitanju T celijska deficiencija (“rupa u T celijskom repertoaru”)
- **1994: Th1 citokini su neophodni za odbranu of Kandida u miseva** (Romani et al)
- **1996 – 2003: CMC bolesnici pokazuju izmenjen citokinski a ne T celijski odgovor** (“New perspectives in CMC” Curr Opin Infect Dis 2002 Lilic et al)
- **2005: Identifikacija Th-17 celija (osim Th1 & Th2)**
- **2007: Humane T celije specifice za kandidu proizvode IL-17** (Lanzaveccia et al)
- **2008: STAT3 je neophodan za produkciju IL-17** (Grimbacher et al & Casanova et al)



C

- IL-17 je kljucan za odbranu od gljiva
- Aktivacija STAT3 dovodi do produkcije IL-17 production

Microb Infect 2010,12:518

**Poznate primarne immuno-deficijencije (PID)
kod kojih je oštećena odbrana od gljivica
(2010)**

<u>PID sa CMC</u>	<u>Mutacija</u>	<u>Patogeni</u>
Hyper-IgE Sy (HIES)	STAT3	Candida, Staph aureus
Dectin-1 def (1 porodica)	Dectin-1	Candida, Trichophyton rubrum
CARD-9 def (1 porodica)	CARD9	Candida
IL-12p40 deficijencija	IL-12p40	Mycobacteria, Salmonella, ?Candida
IL-12Rb1 deficijencija	IL-12Rb1	Mycobacteria, Salmonella, ?Candida

**Medjutim:
Sta je problem kod 2 najbrojnije grupe bolesnika sa CMC?**

Nasa istrazivanja

```
graph TD; A[Nasa istrazivanja] --> B[OMIM 240300]; A --> C[OMIM 606415];
```

OMIM 240300

APS1 / APECED

- **Autoimmune Polyendocrinopathy Syndrome tip I / Autoimmune Polyendocrinopathy Candidasis Ectodermal Dystrophy**
 - **AR / familijalna ili sporadicna**
 - **Mutacija *AIRE* gena, chr21**

OMIM 606415

CMC sa poremećajem stitaste zlezde-hipotireozom (CMC-ht)

- **AD /familijalna**
- **Ponavljjanje infekcije gornjig diasjnih puteva, kozni abscessi/dermatitis, nisko gvozdje, lici na HIES**
 - **Chr2, ?gen**

Pitanje:
Da li je defekt na nivou
Th-17?

**Kulture mononuklearnih celija periferne krvi
stimulisane kandidom i drugim antigenima da bi se
ispitao odgovor Th-17 citokina**

(IL-17, IFN γ IL-6, IL-23)

- **7d, *Candida* hife (CH) & peptidoglycan (PGN) or (1d, CH & LPS)**
- **Intracelularno bojenje na citokine**
- **Produkcija citokina u supernatantima**

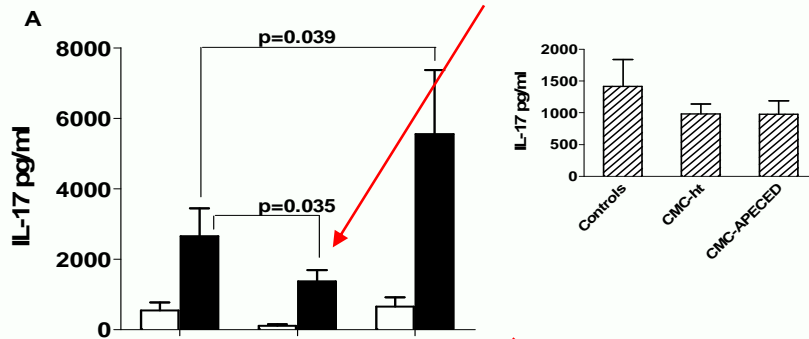
Bolesnici:

10 bolesnika sa CMC i hipotireozom (CMC-ht)

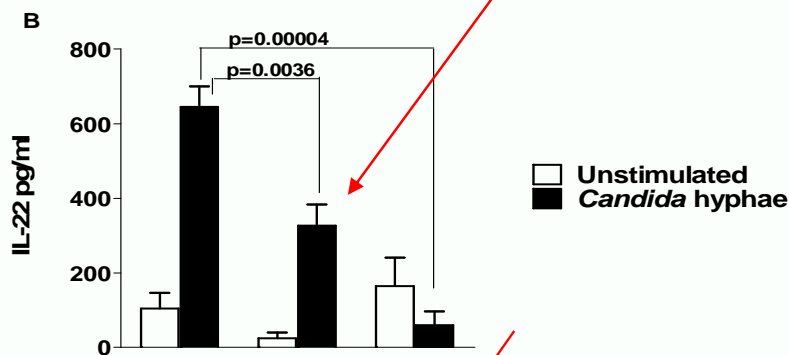
8 bolesnika sa CMC i APECED

11 zdravih kontrola

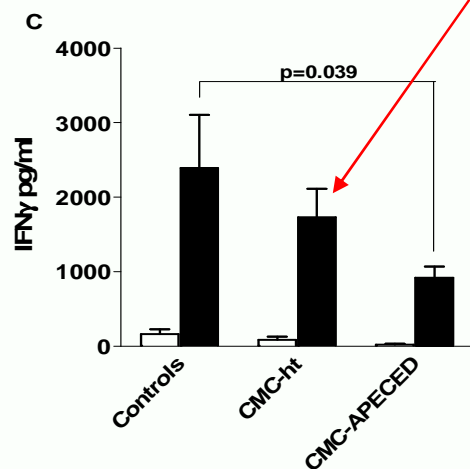
IL-17



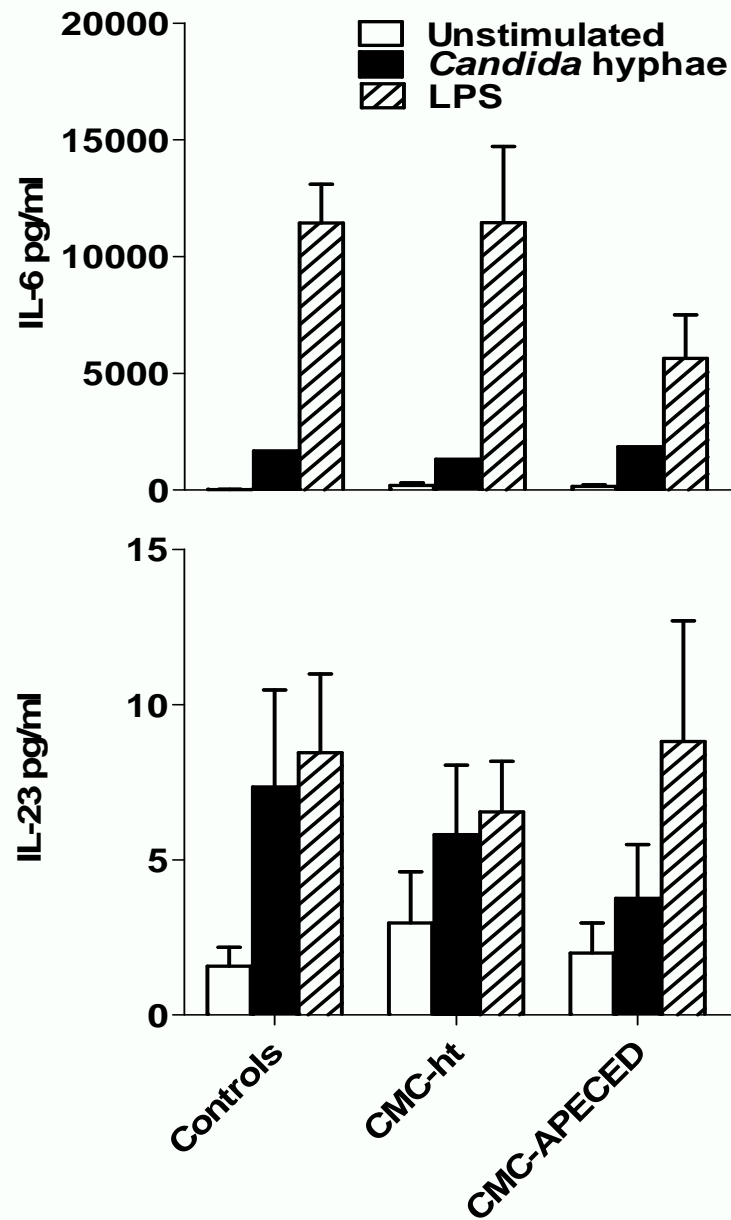
IL-22



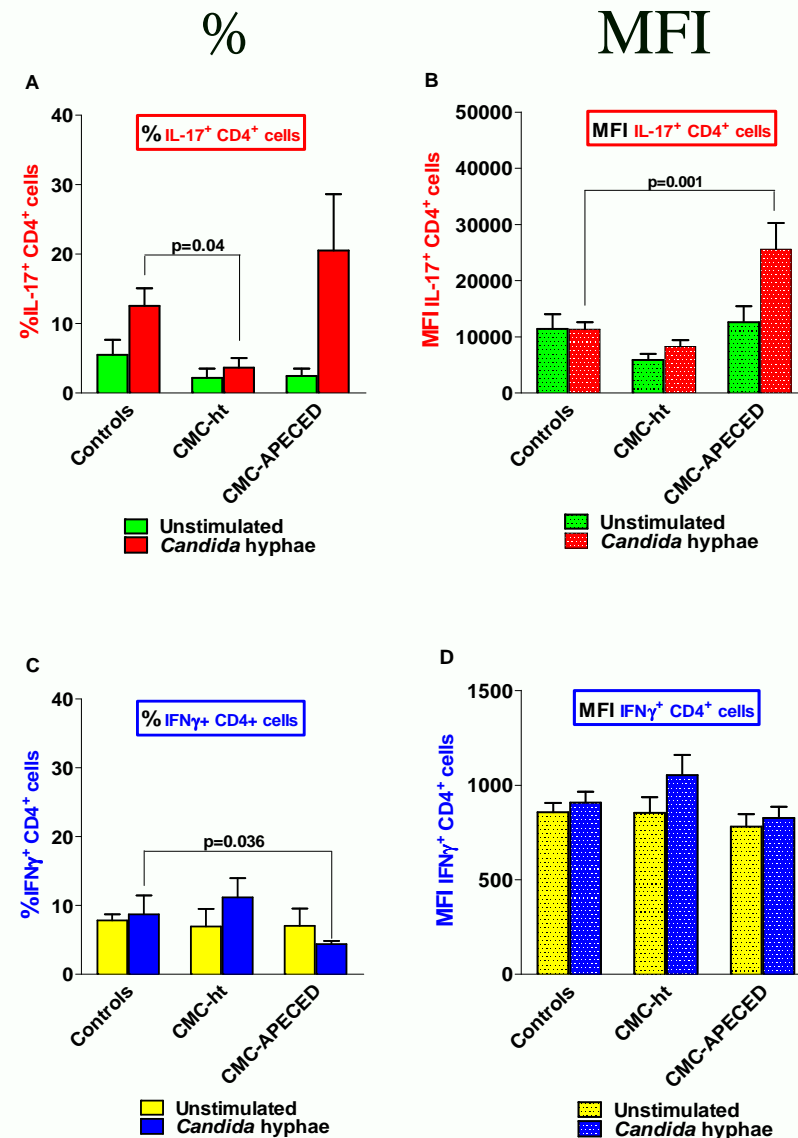
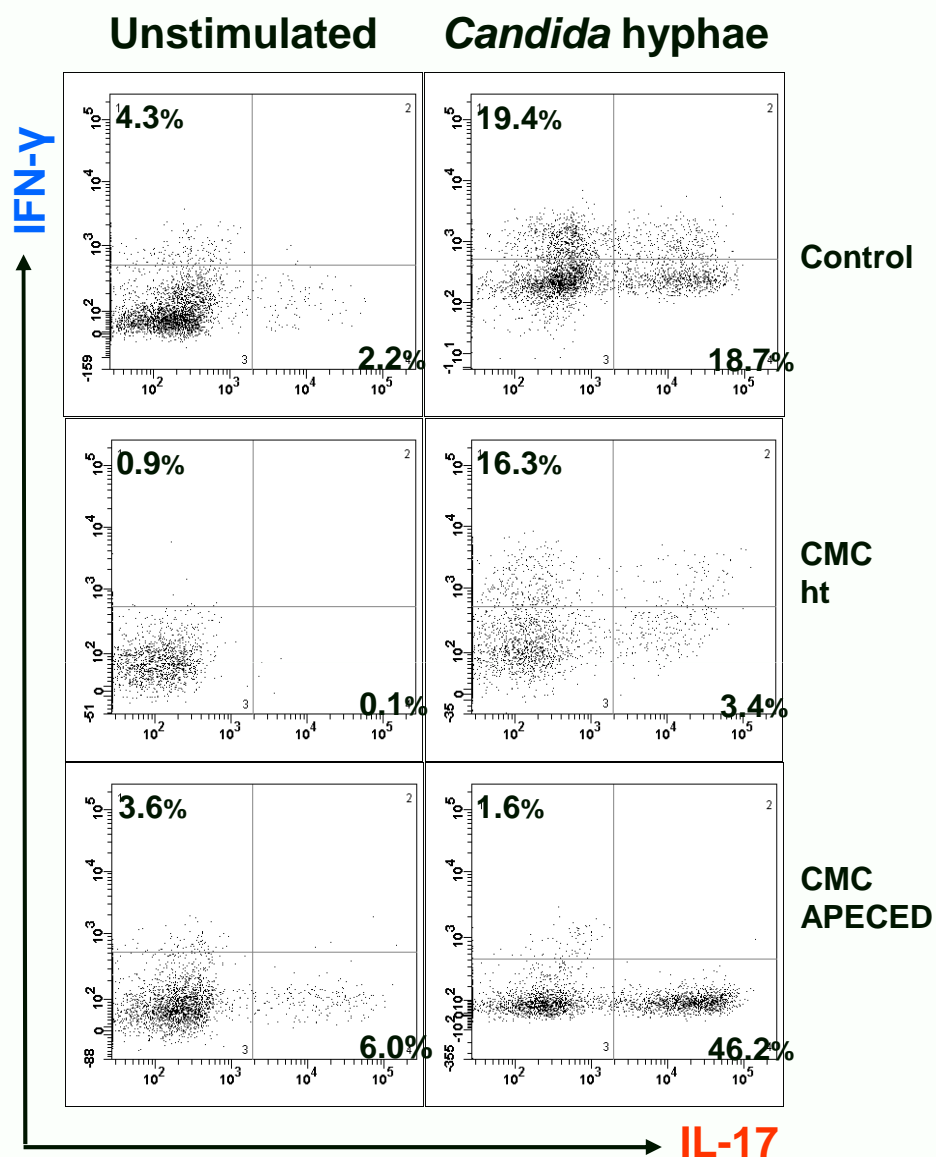
IFN γ



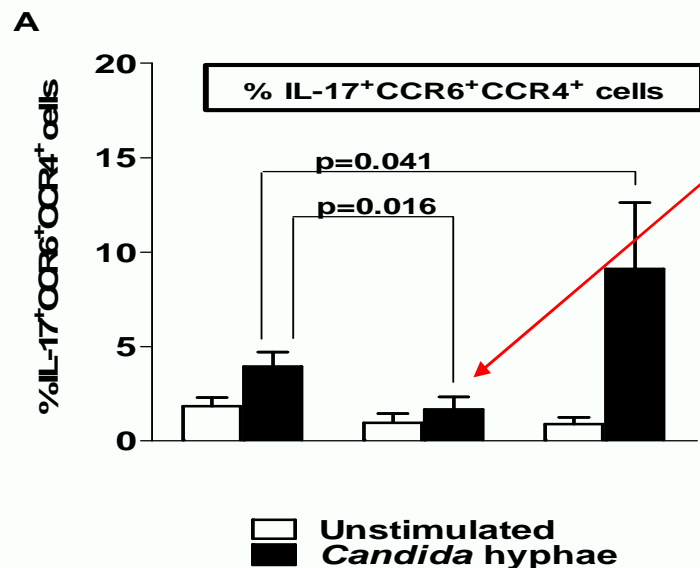
- Snizena produkcija IL-17 u bolesnika sa CMC-ht ali ne i CMC-APECED;
- Obe grupe pokazuju snizenu produkciju IL-22 in u odgovoru na Kandidu
- IFN γ nije snizen kod CMC-ht



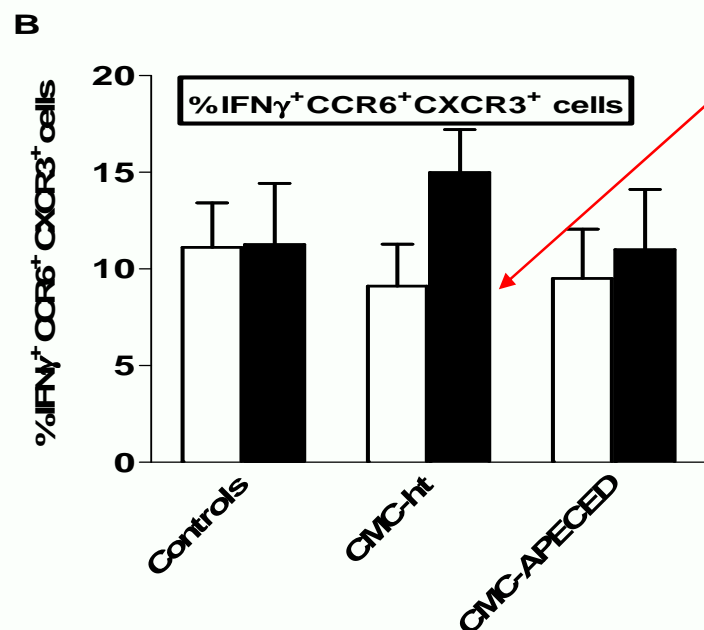
Obe grupe bolesnika (CMC-ht & CMC-APECED) pokazuju normalnu produkciju IL-6 i IL-23 nakon stimulacije s Kandidom



Bolesnici sa CMC-ht ali ne sa CMC-APECED pokazuju znacajno snizene vrednosti **IL-17+CD4+** ali ne i **IFNγ+CD4+** T celija nakon stimulacije sa Kandidom

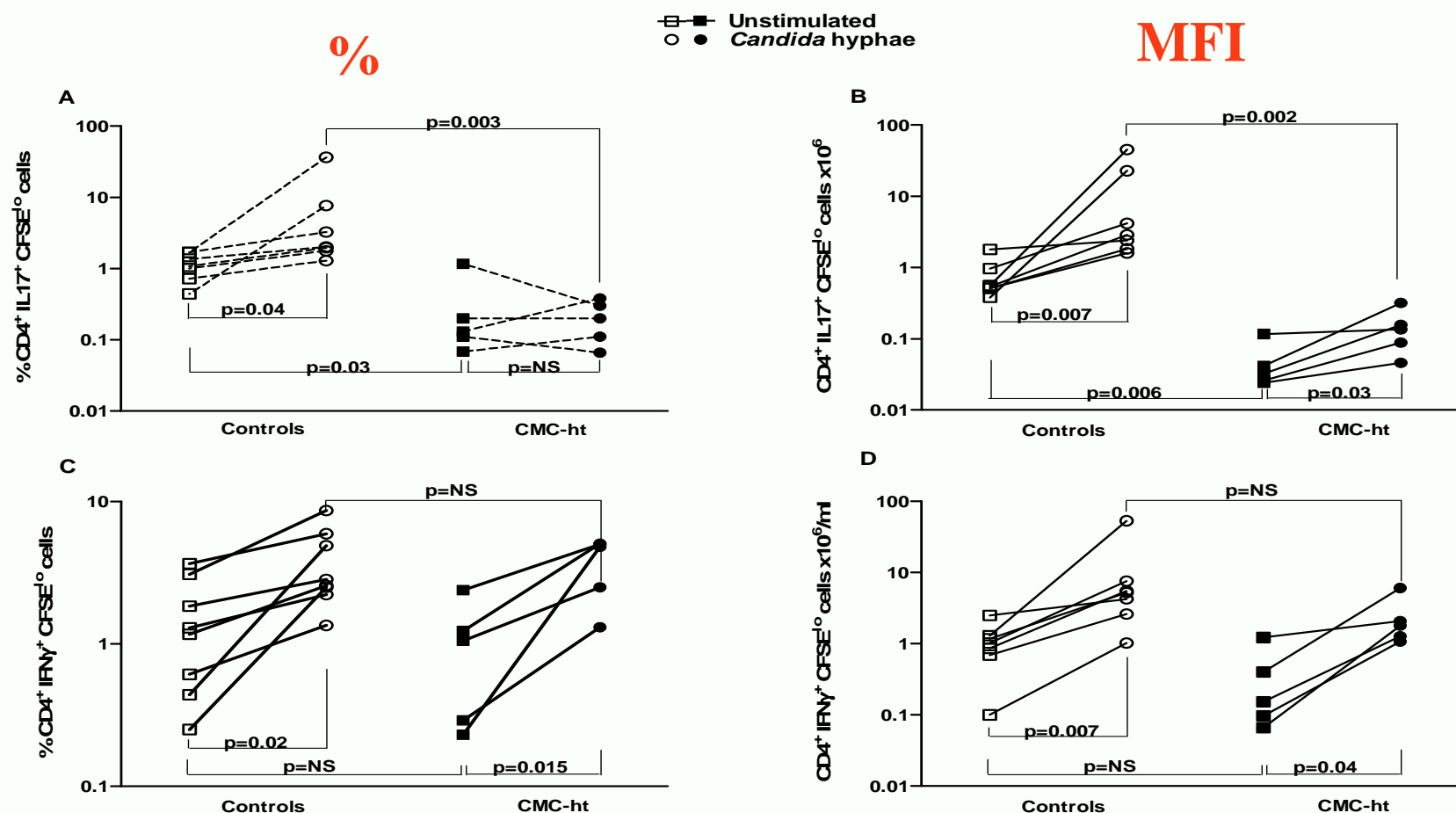


Bolesnici sa CMC-ht ali ne sa CMC-APECED pokazuju znacajno snizene vrednosti **IL-17+CCR6/CCR4+CD4+** T celija nakon stimulacije sa Kandidom



Vrednosti **IFN γ +CCR6/CXCR3+CD4+** T celija su bile slicne u svim grupama

CMC-ht only



Bolesnici sa CMC-ht pokazuju snizene procenete i apsolutne vrednosti **IL-17+ CD4+** ali ne i **IFN γ +CD4+** celija koje proliferisu nakon stimulacije sa Kandidom

Prvi zakljucak:



1) APS1 / APECED

ovi bolesnici

nemaju

poremecaj IL-17

2) CMC-ht ovi

ovi bolesnici

imaju

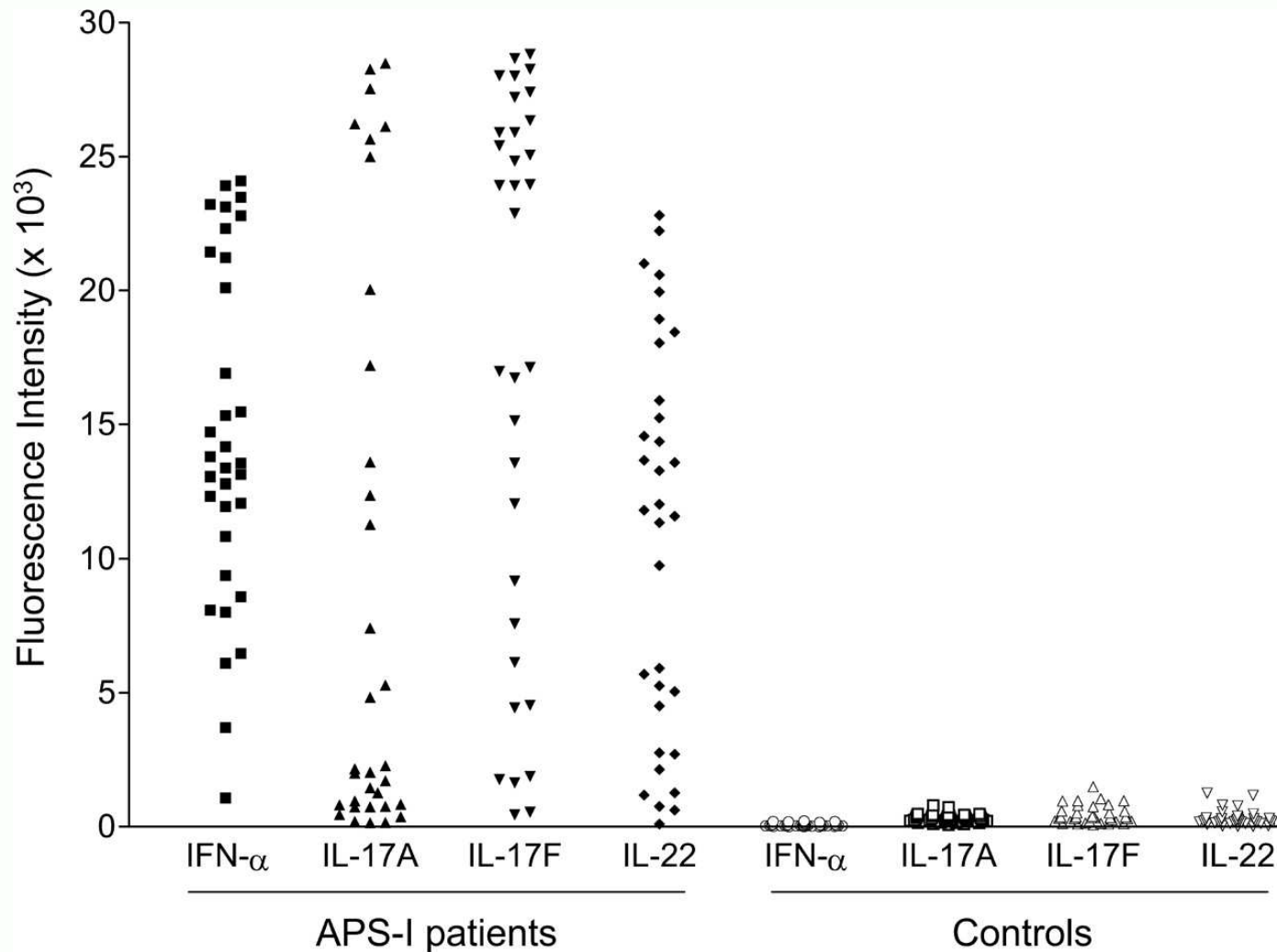
poremecaj IL-17

(Ng et al, J Allergy Clin Immunol 2010)

1) APECED

- Ovi bolesnici imaju organ-specificnu autoimunost (antitela na paratireoidne/adrenalne/gonadalne zlezde ...)
- Kod njih je dokazana mutacija *AIRE* gena (uloga u prezentaciji ektopicnih antigena u timusu i uklanjanju specifičnih tj autoimunih T limfocita)
- Ali zasto imaju Kandidiajazu kad je produkcija IL-17 normalna – cak povisena??
- Da li mozda prave auto-antitela i na citokine?

Figure 1. High titers of auto-Abs against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in the plasma from patients with APS-I



Puel et al. J Exp Med 2010;207:291-297

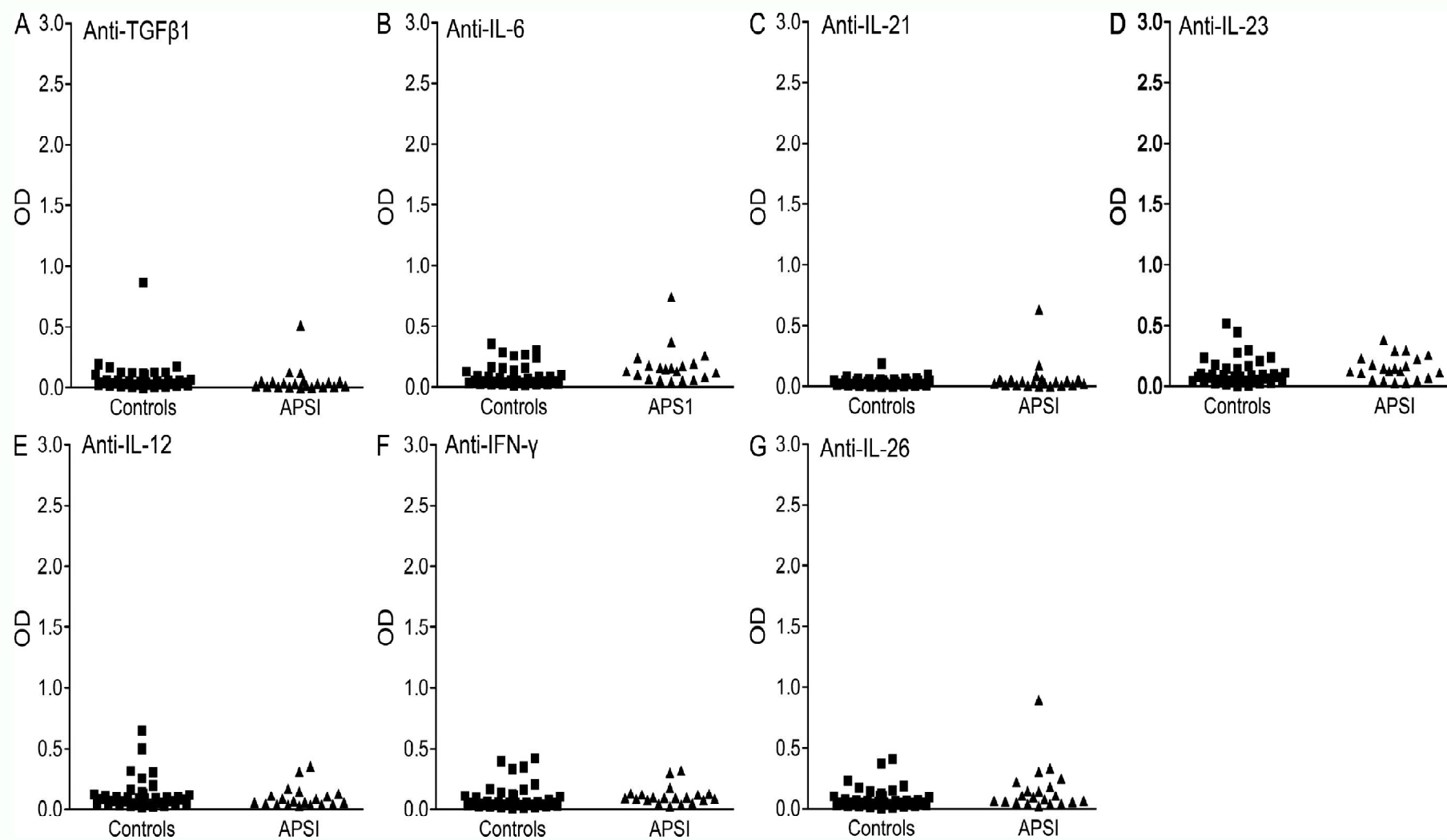


Figure S2. No auto-Abs against TGFβ1, IL-6, IL-21, IL-23, IL-12, IFNγ and IL-26 in the plasma from patients with APS-I.
 (A–G) Anti-TGF- 1, -IL-6, -IL-21, -IL-23, -IL-12, -IFN- , and -IL-26 circulating IgG titers were measured by classical ELISA in 37 samples from healthy controls and 30 samples from patients with APS-I. OD 450–630 is plotted on the y axis.

Puel et al. J Exp Med 2010;207:291-297

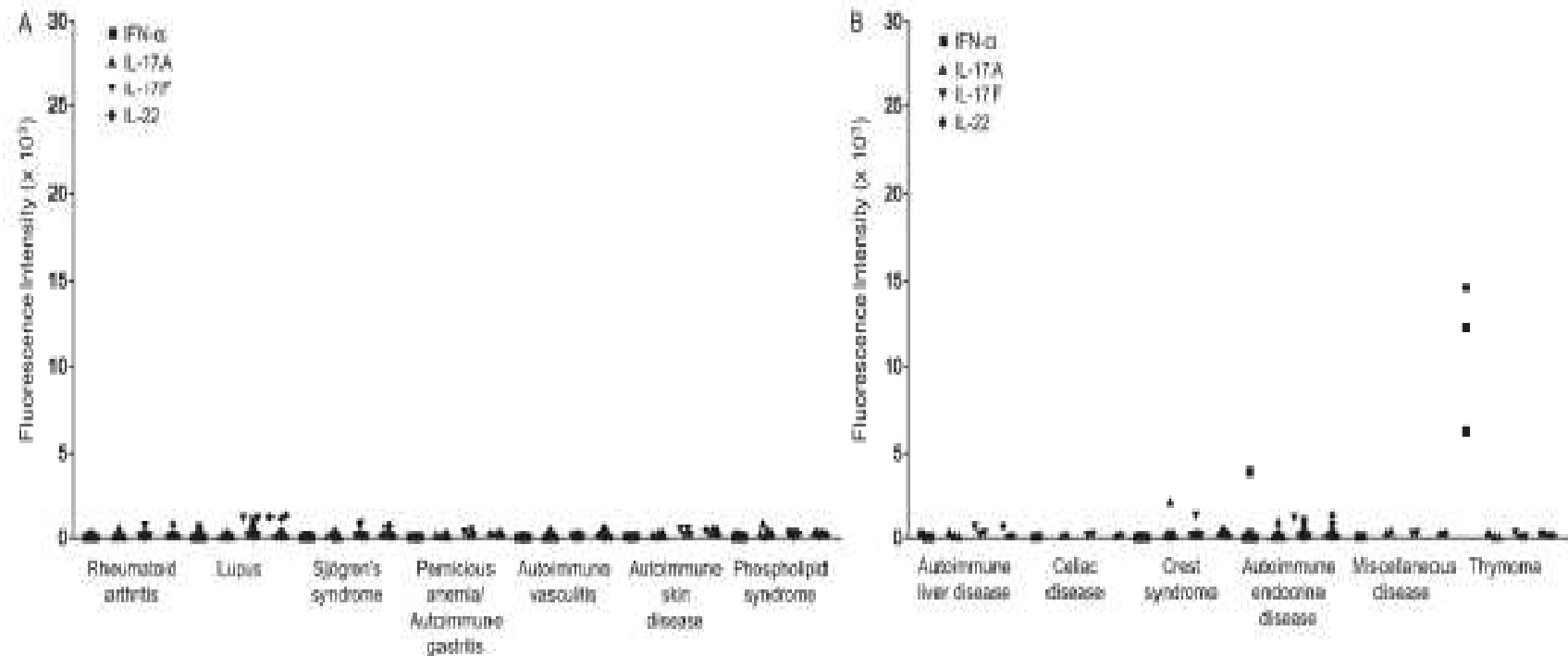


Figure S4. No auto-Abs against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in the plasma from patients with autoimmune and/or endocrine disorders. (A and B) Anti-IFN- α , -IL-17A, -IL-17F, and -IL-22 antibodies were measured in 103 patients suffering from autoimmune and/or endocrine disorders: rheumatoid arthritis ($n = 12$), lupus ($n = 17$), Sjögren's syndrome ($n = 8$), pernicious anemia/autoimmune gastritis ($n = 4$), autoimmune vasculitis ($n = 10$), autoimmune skin diseases ($n = 4$), phospholipid syndrome ($n = 5$), autoimmune liver disease ($n = 3$), celiac disease ($n = 2$), CREST syndrome ($n = 7$), autoimmune endocrine diseases (hypothyroidism, $n = 14$; Graves' disease, $n = 6$; type 1 diabetes, $n = 6$), miscellaneous diseases ($n = 2$), and thymoma ($n = 3$).

1) APECED

- **Kod ovih bolesnika, mi smo nasli visoku koncentraciju auto-antitela na Th-17 citokine (IL-17A, IL-17F, IL-22)**
- **Pokazali smo da ova antitela neutralisu IL-17**
- **Neutralizacija IL-17 ostecuje odbranu protiv Kandidate**
- **Ovi nalazi objasnjavaju zasto ovo bolesnici imaju kandidijazu uprkos normalnoj produkciji IL-17**

(Puel et al, JEM 2010;

Puel et al, Curr Opin Immunol 2010, Kisand et al, Eur J Immunol 2011)

2) CMC-ht

- **Pokazali smo da ovi bolesnici imaju defect na nivou proliferacije Th-17 celija i produkcije Th-17 citokina**
- **Zasto – sta je genski defekt?**

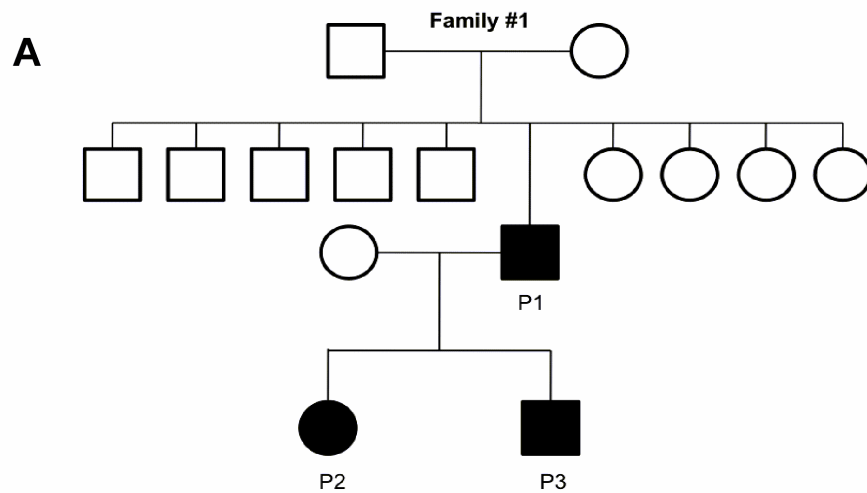
Mutations in the CC-domain of STAT1 in Autosomal Dominant Chronic Mucocutaneous Candidiasis

Frank L. van de Veerdonk^{*1,3}, Theo S. Plantinga^{*1,3}, Alexander Hoischen^{*2}, Sanne P. Smeekeens^{1,3}, Leo A.B. Joosten^{1,3}, Christian Gilissen², Peer Arts², Diana C. Rosentul^{1,3}, A.J Carmichael⁴, Chantal A.A. van der Graaf^{1,3}, Bart Jan Kullberg^{1,3}, Jos W.M. van der Meer^{1,3}, @, Desa Lilic^{#5}, Joris A. Veltman^{#2}, Mihai G. Netea^{#1,3}

*these authors contributed equally to the study; # these authors share senior authorship

Department of Medicine¹ and Human Genetics², Radboud University Nijmegen Medical Centre; Nijmegen Institute for Infection, Inflammation, and Immunity (N4i), The Netherlands³; Department of Dermatology, James Cook University Hospital, Middlesbrough⁴ and Institute for Cellular Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom⁵

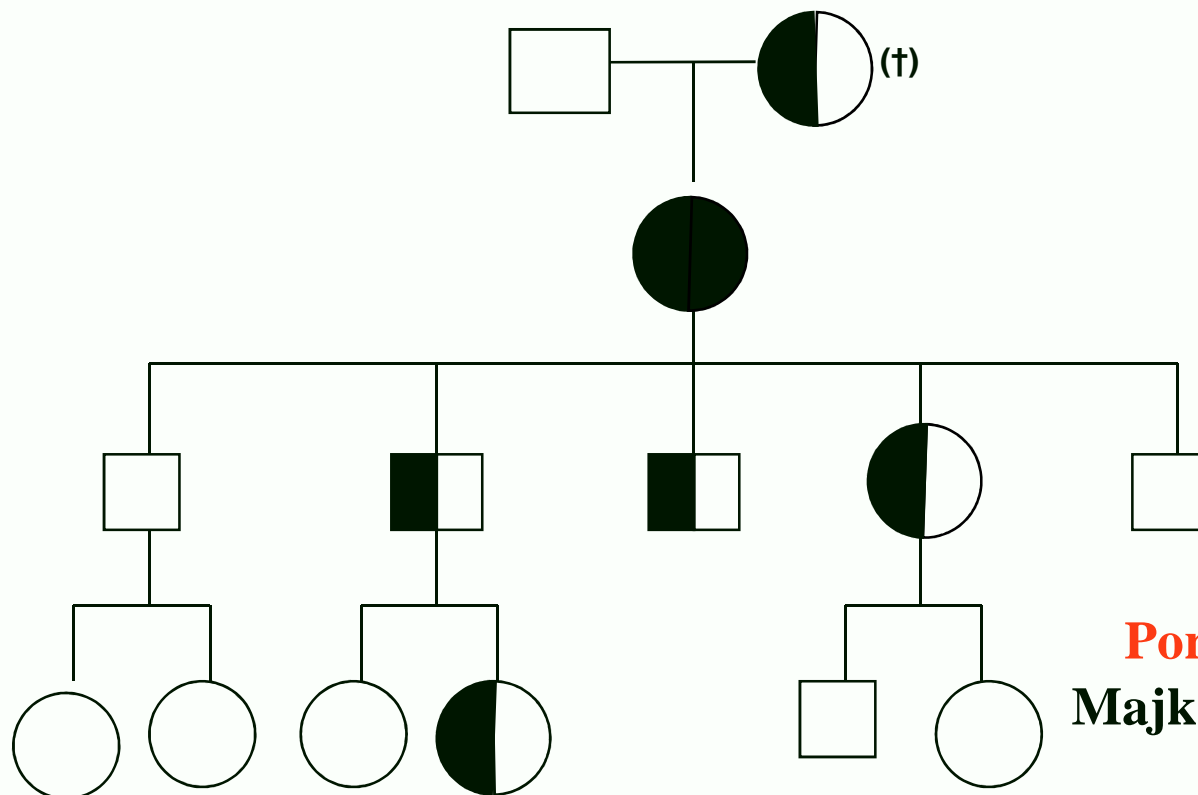
New England Journal of Medicine – in press



Porodica #1 (holandska):
Otac / kcer/ sin

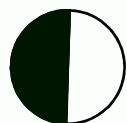


- Kandidijaza od ranog detinjstva (oro-farinks)
- Dermatofitoza + kandidijaza stopala
- Autoimuni hepatitis (otac)
- Autoimuna hemoliticna anemija (kcer)
- Ponavljane plucne infekcije



Porodica #2 (UK, Co Durham)
Majka / 2 sina+kcer/ unuka

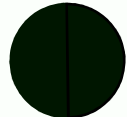
Male Female



Kandida

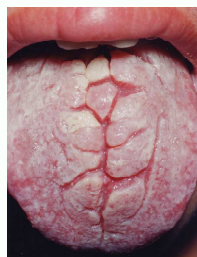
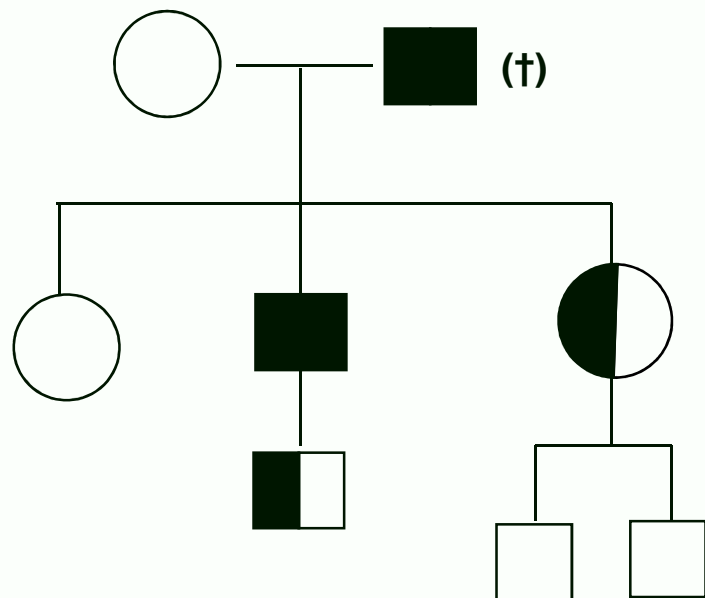


Hypotireoza



Kandida & hipotireoza

- kandidijaza (oro-farinks, nokti)
- Hipotireoza / TPO antitela
- Nisko gvozdje (veoma)
- Dermatitis / akne / kozni abscesi
- Blefaritis / keratitis
- Karcinom skvamoznih celija (SCC)
- Plucne infekcije (but ne pneumatokele)
- Lici na HIES... (HIES = mutacija STAT3)

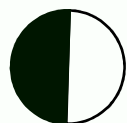


Porodica #3 (UK, Teeside)

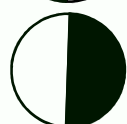
Otac / 1sin / 1kcer/unuk

Male

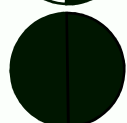
Female



Kandida

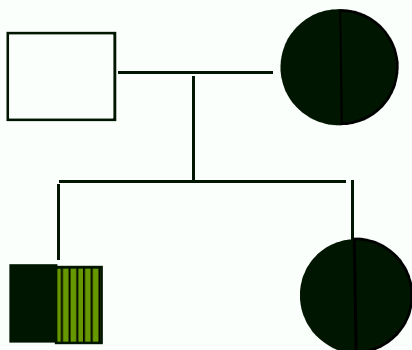


Hipotireoza



Kandida & hipotireoza

- kandidaza (orofarinks / nokti)
- Hipotireoza / nema antitela
- Nisko gvozdje (veoma)
- Dermatitis + aknae / kozni abscesi
- Blefaritis / keratitis
- Karcinom skvamoznih celija (SCC)
- Plucne infekcije (ali ne pneumatkcele)
- Lici na HIES...(HIES = mutacija STAT3)

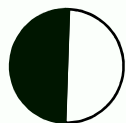


Porodica #4 (UK, Newcastle)

Majka / sin / kcer

- kandidijaza (oro-farinks / nokti / vaginalna)
- Hipotiroza / TPO autoantitela
- Nisko gvozdje (veoma)
- Dermatitis + akne / kozni abscesi
- Autoimuni hepatitis (AIH)
- Plucne infekcije (ali ne pneumatokele)
- Lici na HIES...(HIES = mutacija STAT3)

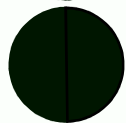
Male Female



Kandida



Hipotireoza



Kandida & Hipotireoza



Autoimuni hepatitis

Identifikacija gena

- Na osnovu prethodnih funkcionalnih citokinskih defekata (Th-17 & Th-1 puteva) izabrano je **100 gena** za sekvenciranje
- **Ispitano je 14 bolesnika iz 5 nesrodnih porodica & 12 clanova porodice bez tegoba**
- **301 nesrodnih, zdravih holandskih kontrola, 179 evropskih & 56 Britanskih kontrola (ukupno 536 kontrola)**
- Uradjeno je sekvenciranje gena (Roche 454 next generation sequencing)
- Uradjena je haplotopska analiza clanova porodica sa i bez tegoba

Genske mutacije:

- Nadjene su 2 heterozigotne mutacije u CC domenu STAT1 gena (chr 2q32.2)
- Porodice #1 (holandija) & #4 (UK) = su imale mutaciju **R274W** (Arg274Trp)
- Porodice #2 (UK), #3 (UK) & #5 (Holandija) = su imale mutaciju **A267V** (Ala267Val)

Sta se zna o mutacijama STAT gena?

- STAT1 = signalni putevi za Th1 citokine (IFN γ & type 1 IFNs)
- STAT3 = signalni putevi za Th-17 citokine (IL-17A, IL-17F, IL-22)
- STAT1 mutacije (SH2 & DNA-binding domena) su nadjene u bolesnika sa PID koji su podložni mikobakterijama i virusnim infekcijama (zavise od IFN γ & IFN type 1)
- STAT3 mutacije = HIES (\downarrow produkcija IL-17)

Sta se zna o novoj mutaciji CC domena STAT1 gena?

- CC domen STAT1 = vazan za dimerizaciju i hetero-dimerizaciju nefosforilisanih molekula
- Bitan za interakciju sa STAT3 (produkcija Th-17 citokina) & STAT4 (produkcija IFN γ)
- Mutacija stoga moze da objasni ostecen Th1 & Th17 odgovor u bolesnika sa CMC-ht

takodje:

- TSH (tireoidni stimulisuci hormon) je negativni regulator aktivacije STAT1 = ?veza sa tireoidnom bolescu?
- Pokazano je da je gubitak funkcije STAT1 vezan za esofagealni karcinom

Zakljucci:

Bolesnici sa razlicitim oblicima CMC imaju razlicite imunske poremećaje koji ostecuju funkciju IL-17, sto dovodi do kandidijaze

- **CMC bolesnici sa hipotireozom slabo produkuju IL-17 jer imaju gensku mutaciju CC domena STAT1 gena**
- **CMC bolesnici sa APECED imaju ocuvanu produkciju IL-17 ali proizvode auto-antitela koja neutralisu IL-17**



Acknowledgements

Research Associates:

Kelli Ryan
Min Hong
Alexei von Delwig
Ian Gravenor

Newcastle Research Collaborators:

Fai-Wang Ng
John Isaacs

Other Research Collaborators

Mihai Netea (Nijmegen)
Jean-Laurent Casanova (Paris & NY)
Anne Puel (Paris)
Frank Veerdonk (Nijmegen)
Bodo Grimbacher (London)
Nick Willcox (Oxford)
Tony Meager (Oxford)
Rainer Doffinger (Cambridge)

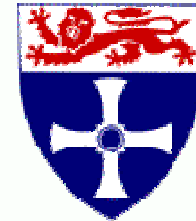
Clinical Collaborators

Mario Abinun (Newcastle)
Peter Arkwright (Manchester)
Vivienne McConnell (Belfast)
David Denning (Manchester)
Colm Costigan (Dublin)
Andrew Cant (Newcastle)
Andy Gennery (Newcastle)
Gavin Spickett (Newcastle)
Stephen Jolles (Cardiff)
Graham Davies (GOS)
Andrew Carmichael (Mbro)

Funding:

- J.G.W Pattinson Trust
- Primary Immunodeficiency Association, UK
- Bubble Appeal, UK
- PFIZER Independent Research Grant Ltd

UNIVERSITY OF
NEWCASTLE



Institute for Cellular
Medicine



Patients & families