

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE



CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
MEDICINA E CHIRURGIA

Caratteristiche cliniche ed immunologiche di pazienti
con Sindrome Linfoproliferativa Autoimmune
secondaria a mutazione del gene CASP10

Relatore:

Prof. Angelo Ravelli

Correlatore:

Dott. Maurizio Miano

Candidata:

Sara Ferlinghetti

N° matricola:

4139984

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

INDICE GENERALE

INTRODUZIONE	3
1 FISIOPATOLOGIA	4
2 CASPASI 10	6
3 CLASSIFICAZIONE	10
4 CARATTERISTICHE CLINICHE.....	11
5 CARATTERISTICHE IMMUNOLOGICHE E DI LABORATORIO	13
5.1 LINFOCITI DNTs	13
5.2 IL-10	14
5.3 IL-18	14
5.4 VITAMINA B12.....	14
5.5 FAS Ligando.....	15
6 DIAGNOSI.....	15
7 TRATTAMENTO	17
7.1 I LINEA	17
7.2 II LINEA.....	18
PAZIENTI E METODI	22
8 SCOPI DELLO STUDIO.....	22
9 PAZIENTI E METODI.....	22
9.1 TEST GENETICI	23
9.2 TEST STATISTICI.....	24
9.3 TEST BIOCHIMICI	24
RISULTATI E DISCUSSIONE	26
10 DESCRIZIONE GENERALE.....	26
11 CLINICA E LABORATORIO.....	27
12 DISCUSSIONE	32
CONCLUSIONI	33
RINGRAZIAMENTI	34
BIBLIOGRAFIA	36

INTRODUZIONE

Si definisce Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS) una rara condizione congenita caratterizzata da un disordine dell'omeostasi linfocitaria, che si estrinseca come difetto di apoptosi.

Nel 1967, e successivamente approfondita nel 1992, venne descritta una malattia linfoproliferativa con manifestazioni autoimmuni correlata ad un aumento di una popolazione di linfociti CD4/CD8 negativi esprimenti il CD3 e il T cell receptor alfa/beta, detti linfociti T “doppi negativi” (DNTs), inizialmente conosciuta come sindrome di Canale-Smith¹. Tali quadri trovano un corrispettivo in una malattia murina nella quale i topi, con particolari mutazioni, presentano un deficit dell'espressione di FAS (CD95) recettore o del suo ligando, complesso deputato alla regolazione dell'apoptosi cellulare dei linfociti attivati². Questa ipotesi, in seguito, fu confermata nel 1995, anno nel quale Rieux-Laucat e Fisher³ ne descrissero i meccanismi molecolari, e considerata nuova entità nosologica.

Il difetto di apoptosi, alla base di ALPS, si manifesta con un aumento della sopravvivenza di linfociti in circolo, il quale determina un accumulo di linfociti a livello di linfonodi e milza, causando linfadenomegalia e splenomegalia, e fenomeni autoimmuni, in primis citopenia multilineare; tali fenomeni possono essere ricondotti alla maggior permanenza in circolo di cellule autoreattive⁴. A suddette caratteristiche, inoltre, si associa un maggior rischio di sviluppare sindromi neoplastiche, in particolare Linfoma di Hodgkin e non Hodgkin.

La linfoproliferazione cronica non maligna e la presenza dell'espansione dei DNTs sono infatti criteri diagnostici primari per la determinazione di ALPS, e ad essi si aggiungono

¹ Canale vC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr* 1967.

² Teachey DT, Obzut DA, Axsom K, et al. Rapamycin improves lymphoproliferative disease in murine autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood*. 2006.

³ Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*. 1995.

⁴ Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, et al. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. 1992.

alterazioni laboratoristiche tipiche, che includono aumento dei livelli di interleuchina 10 (IL-10), interleuchina 8 (IL-8), vitamina B12, ligando di FAS e IgG nel plasma⁵.

La causa più comunemente coinvolta nella patogenesi dell'ALPS è rappresentata da una mutazione germinale eterozigote del gene codificante per la proteina FAS (70% dei pazienti), implicata nei meccanismi di regolazione dell'apoptosi cellulare. La seconda più frequente è una mutazione somatica di FAS (10%). Altre alterazioni riscontrate più raramente coinvolgono il FAS ligando e la Caspasi 10 delineando un caratteristico insieme di sindromi linfoproliferative autoimmuni. Rimangono tuttavia molti pazienti in cui non si è ancora identificato il difetto genetico⁶.

La prevalenza dell'ALPS non è nota; è un disordine, comunque, raro sulla cui incidenza ancora oggi non esistono stime definitive. Infatti, soltanto negli ultimi anni si è giunti ad una più accurata definizione delle basi molecolari e del fenotipo clinico di questa patologia. L'ALPS ha una distribuzione in tutto il mondo e senza predilezione razziale o etnica.

1 FISIOPATOLOGIA

L'apoptosi, termine che origina dal greco, il cui significato riflette la caduta delle foglie in autunno, viene definita anche come “morte programmata”. Essa è un processo fondamentale per il controllo della proliferazione linfocitaria e per la tolleranza immunologica, necessaria per la difesa dell'ospite e per la protezione da risposte autoimmuni. Tale meccanismo risulta essere totalmente o parzialmente deficitario nella sindrome ALPS⁷.

Il processo di apoptosi prevede una fase di inizio, durante la quale alcune caspasi si attivano cataliticamente (caspasi iniziatrici), e una fase effettrice in cui altre caspasi (effettrici) innescano la degradazione cellulare. La prima fase si delinea, in seguito a stimoli fisiologici o patologici, attraverso un'attivazione che segue due vie: la via

⁵ Bride K, Teachey D. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease. *F1000Research*. 2017.

⁶ Rao VK, Oliveira JB. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. 2011.

⁷ Nabhani S, Hönscheid A, Oommen PT, et al. A novel homozygous Fas ligand mutation leads to early protein truncation, abrogation of death receptor and reverse signaling and a severe form of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clinical Immunology*. 2014.

estrinseca o Fas-mediata, e la via intrinseca o mitocondriale, le quali, in seguito, convergono sulle stesse proteine effettrici, le caspasi.

L'alterazione caratteristica nell'ALPS si riscontra nella via estrinseca del processo apoptotico. Questa via metabolica si innesca mediante segnali provenienti dall'esterno dell'ambiente cellulare. Uno di questi è rappresentato dal fattore di necrosi tumorale (TNF), gruppo di proteine prodotte da cellule facenti parte del sistema immunitario e da macrofagi stimolati dalla presenza di tossine batteriche. Un altro fattore, di nostro particolare interesse è il ligando di Fas (Fas-L), una proteina della stessa famiglia del TNF, presente sulla membrana dei linfociti T attivati⁸.

Questi "segnali di morte" interagiscono con specifici recettori proteici (recettore del TNF, Fas) e in seguito attivano una via di trasduzione del segnale che porta all'apoptosi della cellula esprimente lo stesso recettore.

I recettori dei segnali di morte della membrana cellulare presentano un dominio esterno alla membrana stessa contenente il sito per il legame della molecola «segnale», un dominio transmembrana e un dominio intracitoplasmatico che sporge nel citosol, detto «dominio di morte». La combinazione del segnale di morte con il dominio extracellulare determina una modificazione conformazionale del dominio intracellulare, il quale determina la formazione di un complesso (DISC) multiproteico con altre proteine citosoliche come FADD (Fas receptor-associated death domain) e specifiche proteasi come caspasi 8 e caspasi 10, note come caspasi iniziatrici.

Le caspasi, di per sé inattive in forma di procaspasi, si attivano con un meccanismo a cascata; il complesso che si forma, infatti, attiva la caspasi 8 e la 10 per autoproteolisi; a sua volta, queste, attivate, attraverso clivaggio, agiscono su altre caspasi definite effettrici, caspasi 3 e caspasi 7, attivandole. Una volta attivate esse penetrano nel nucleo cellulare dove tagliano una proteina nota come ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase). Il taglio di ICAD libera la DNasi che inizia la degradazione del DNA intranucleosomico, una delle fasi terminali del processo, che porta rapidamente alla morte cellulare.

⁸ Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schütze S, et al. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *eMBO J* 2006.

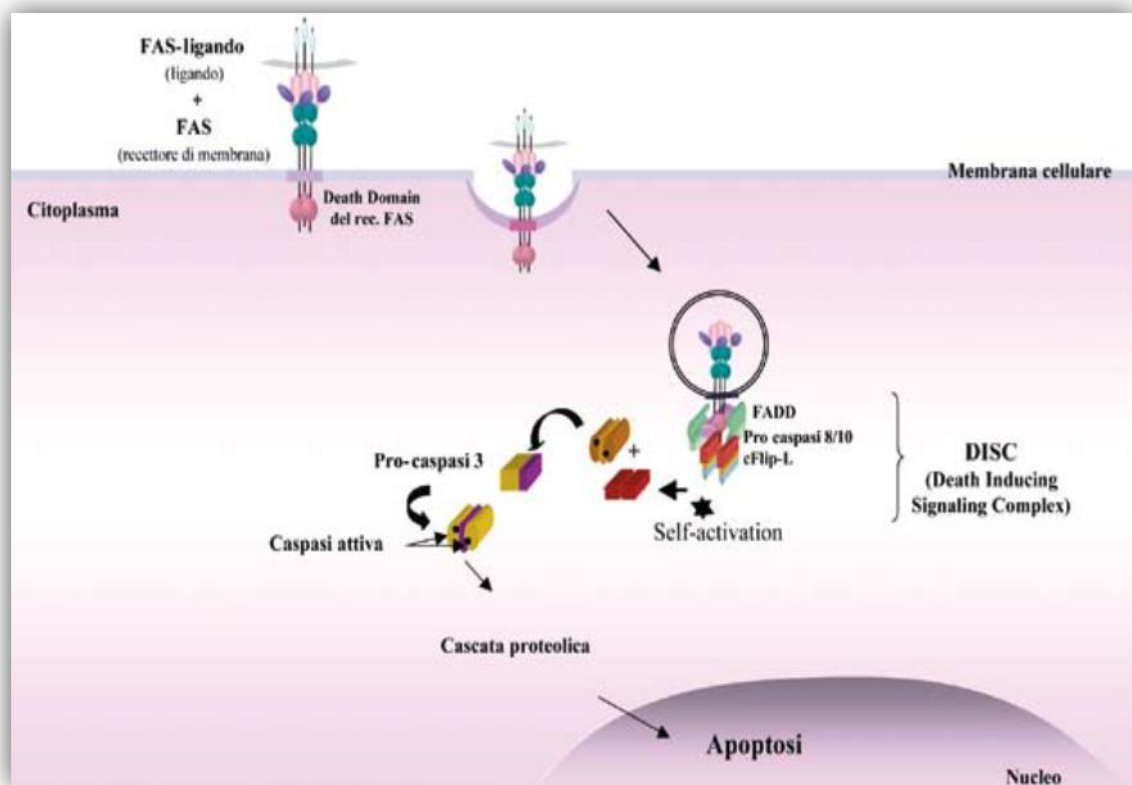


Figura 1: Pathway dell'apoptosi mediata da FAS

Il difetto del gene FAS (TNFRSF6)⁹ è la principale causa della sindrome ALPS, il cui fenotipo può essere variabile, partendo da forme asintomatiche fino a manifestazioni severe e gravi della patologia. Più raramente, difetti che sono associati ad altri geni coinvolti nella via dell'apoptosi sviluppano fenotipo ALPS, come la mutazione del gene della Caspasi 10.

2 CASPASI 10

Le Caspasi sono un gruppo di proteasi aventi la Cisteina nel loro sito attivo, tali enzimi sono fondamentali per il taglio, e quindi per l'attivazione di altre proteine, dopo un residuo di Acido Aspartico. Devono il loro nome, infatti, alle caratteristiche intrinseche:

⁹ Fisher GH, Rosenberg FJ, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995.

C si riferisce al centro reattivo, ossia la Cisteina, ASP corrisponde al sito di taglio, l'acido aspartico, mentre ASI rappresenta la desinenza comune degli enzimi litici. La famiglia delle caspasi comprende tre differenti gruppi, nel primo rientrano quelle che vengono attivate durante l'infiammazione (I gruppo: caspasi infiammatorie), mentre i gruppi II e III sono costituiti dalle caspasi che giocano un ruolo principale nel processo apoptotico¹⁰. (Figura 2)

Le principali caspasi implicate nel pathway estrinseco sono la 8 e la 10; le sequenze amminoacidiche di entrambe mostrano numerose similarità, seppur non sia ancora stata individuata una struttura esatta della Caspasi 10, la quale presenta una minor quantità di studi a riguardo. Esistono però diversi lavori che dimostrano quanto le due caspasi condividano meccanismi di attivazione e substrati¹¹. Mutazioni genetiche di tali Caspasi, con conseguente alterazione della loro funzione, sono alla base di malattie caratterizzate da disregolazione immunitaria il cui deficit di apoptosi diviene preponderante nell'espressione clinica della malattia.

È stato inoltre evidenziato come mutazioni somatiche della Caspasi 10 possano contribuire allo sviluppo di patologie neoplastiche (Oh et al., 2010). Park et al. (2009) hanno confermato che alterazioni del gene che codifica per tale caspasi possa essere implicata nella patogenesi del carcinoma gastrico a causa della perdita di funzione della stessa. Kim et al. (2009) sottolinearono la stretta associazione della mutazione di tale gene con l'aumento della suscettibilità nei confronti di leucemia e mieloma multiplo; anche Shin et al. (2002) analizzarono l'intera regione codificante e i siti di splice del gene Casp-10 individuando differenti mutazioni alla base di 117 casi di linfoma non-Hodgkin, suggerendo così come la disregolazione apoptotica causata dalla mutazione e perdita di attività della caspasi possa mediare la linfomatogenesi¹². Con lo scopo di uniformare le informazioni ottenute dai vari studi, venne fatta una metanalisi (Yan et al. 2012), le cui conclusioni confermano il ruolo di polimorfismi della Caspasi 10 nella patogenesi di vari tumori, in particolare, l'allele rs13006529T potrebbe essere implicato nell'aumento del rischio di tumore al seno, seppur venga espressa la necessità di condurre studi ancora più ampi per ottenere validi e significativi risultati.

¹⁰ Robbins e Cotran. Le basi patologiche delle malattie. Patologia generale.

¹¹ Wachmann K., Pop C., et al. Activation and specificity of humans Caspase-10. *Biochemistry*, 2010.

¹² S. Yan, Y.Z. Li, et al. Role of CASP-10 gene polymorphism in cancer susceptibility: a HuGE review and meta-analysis. *Genetics and molecular research*, 2012.

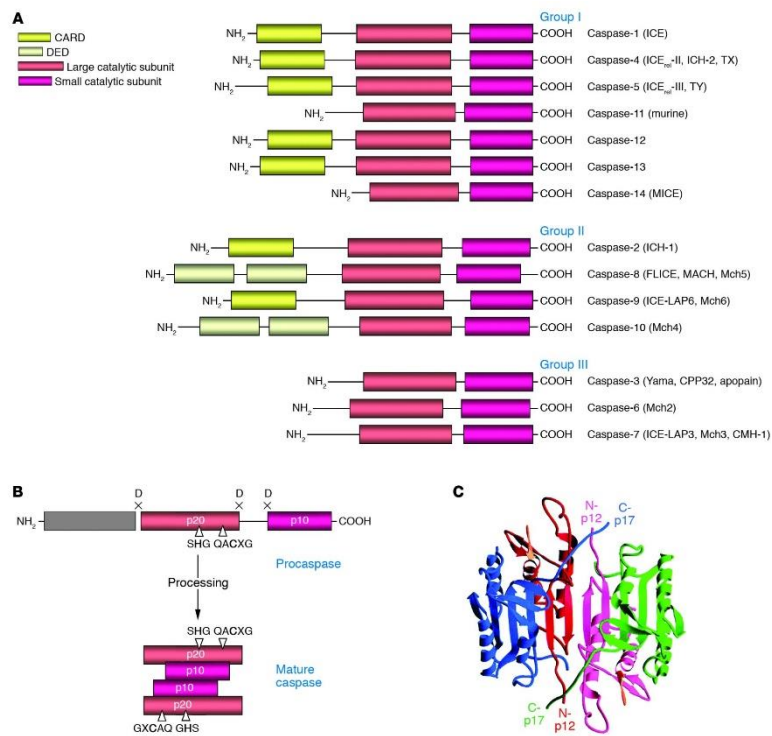


Figura 2: La famiglia delle caspasi

Fonte: Inna N., et al. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *The journal of clinical investigation*, 2005.

Diversi studi (Wang et al, 1999; Zhu et al, 2006) hanno descritto due mutazioni della Caspasi 10 (I406L e L285F) riconoscendole come patogeniche per ALPS. Inizialmente, inoltre, venne individuata un'ulteriore alterazione considerata patogena Val410Ile (Wang et al, 1999), successivamente riclassificata come comune variante polimorfa in una popolazione danese, nel 3-5% degli individui¹³. Tuttavia, la presenza di tale mutazione venne riscontrata in alcuni pazienti portatori di concomitanti alterazioni genetiche, sottolineando così l'impatto di questa variazione sull'espressione clinica di malattia¹⁴. Classificata come variante è anche CASP10 Tyr446Cys, descritta in un numero di soggetti con fenotipo ALPS, nonché in individui sani caucasici nel 1-2%,

¹³ Grønbaek, K., Dalby, T., et al. The V410I (G1228A) variant of the caspase-10 gene is a common polymorphism of the Danish population. *Blood*, 1995.

¹⁴ Cerutti, E., Campagnoli, M.F., Ferretti, et al. Co-inherited mutations of Fas and caspase-10 in development of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *BMC Immunology*, 2007.

mediante studi attraverso i quali si notò una riduzione dell'attività della proteina Casp10^{15,16}. In ultima istanza, Leu522Ile è una variante molto frequente ed è stato dimostrato il suo ruolo probabilmente dannoso sulla prognosi, e la sua associazione con la deficitaria capacità apoptotica tipica della patologia¹⁷.

Un recente studio del 2019, condotto da Miano et al., si è proposto di valutare l'alterazione della funzione apoptotica in pazienti con caratteristiche fenotipiche ALPS/ALPS-like, portatori delle diverse varianti della Caspasi 10, citate precedentemente¹⁸. I ritrovamenti molecolari sono stati ottenuti mediante NGS analisi di pannelli di geni (315) implicati in sindromi da disregolazione immunitaria; parallelamente sono stati realizzati studi funzionali attraverso l'induzione di apoptosi da parte di Fas-L/TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), analizzando così la morte cellulare e l'attività di CASP10, CASP8 e PARP proteina.

Durante tale ricerca sono stati identificati 6 pazienti con fenotipo ALPS (n=2) o ALPS-like (n=4), portatori in eterozigosi di mutazioni della Caspasi 10 quali I406L (n=1), V410I (n=2), Y446C (n=1) o aventi il polimorfismo L522I (n=2) associato ad una variazione polimorfica in omozigosi di Caspasi 8.

Il risultato finale di suddetto lavoro ha evidenziato come queste varianti di CASP10 presentano l'alterazione della via apoptotica FAS mediata e pertanto giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo di disregolazioni immunitarie, seppur altri fattori genetici ed epigenetici, tutt'ora in parte sconosciuti, possano contribuire e spiegando così la penetranza incompleta e la vasta eterogeneità del fenotipo.

¹⁵ Dianzani, U., Bragardo, M., et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood*, 1997.

¹⁶ Ramenghi, U., Bonisconi, et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood*, 2000.

¹⁷ Hu, Z., Li, C., Chen, K., et al. Single nucleotide polymorphisms in selected apoptotic genes and BPDE-induced apoptotic capacity in apparently normal primary lymphocytes: a genotype-phenotype correlation analysis. *Journal of Cancer Epidemiology*, 2008.

¹⁸ Miano et al. FAS-mediated apoptosis impairment in patients with ALPS/ALPS-like phenotype carrying variants on CASP10 gene. *British Journal of haematology*, 2019.

3 CLASSIFICAZIONE

ALPS, in prima istanza, venne classificata¹⁹ in base alla mutazione genetica e al difetto molecolare sottostante. Suddivisa in cinque sottogruppi:

- ALPS di tipo 0: conseguente a mutazioni omozigoti del gene FAS associate ad un deficit dell'apoptosi generalmente di grado severo;
- ALPS di tipo Ia: conseguente a mutazioni eterozigoti del gene FAS associate ad un deficit dell'apoptosi di grado moderato;
- ALPS di tipo Ib: conseguente a mutazioni del gene FAS-ligando in assenza di un deficit di apoptosi;
- ALPS di tipo II caratterizzata da mutazioni a carico di altri geni coinvolti nel signaling pathway mediato da FAS, quali FADD, caspasi-8 e -10, associate ad un deficit dell'apoptosi generalmente di grado lieve-moderato;
- ALPS di tipo III, in cui i pazienti presentano una sequenza wild-type dei geni con ruolo noto nell'ALPS ed un test dell'apoptosi nella norma.

In seguito, è stato introdotto un ulteriore sottogruppo classificativo, denominato ALPS di tipo Im, caratterizzato da una condizione di mosaicismo dell'espressione del gene FAS, derivante dalla coesistenza nello stesso paziente di alcune popolazioni di cellule ematopoietiche portatrici di un gene FAS mutato e di altri tipi cellulari e/o tessuti in cui il gene FAS risulta essere wild-type.

Successivamente, nel 2009 si tenne un workshop internazionale al National Institutes of Health (NIH), durante il quale venne proposta una revisione della prima classificazione biochimica di ALPS²⁰.

Per maggiore chiarezza e semplicità accordarono di non utilizzare numeri, ma di distinguere i sottogruppi della patologia in questione secondo il difetto genetico. Pazienti portatori di mutazioni, omozigoti o eterozigoti, di FAS, precedentemente classificati come ALPS 0 o Ia, rientrano ora nel sottogruppo ALPS-FAS. Così come pazienti con

¹⁹ Worth A, thrasher AJ, gaspar B. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *British Journal of Haematology*. 2006.

²⁰ Jao B, Oliveira, Jack J, Bleesing, Umberto Dianzani, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*. 2010.

mutazione somatica di FAS possono essere classificati come ALPS-sFAS; i portatori di difetti legati al Fas Ligando appartengono al ALPS-FASLG e, infine, pazienti con mutazione della Caspasi 10 sono ora ALPS-CASP10. I pazienti appartenenti alla vecchia classe III, cioè coloro che, pur soddisfacendo i criteri diagnostici per ALPS, non presentano le mutazioni tipiche, vengono identificati come ALPS-U (undetermined). [Tabella 1]

Nomenclatura precedente	Nomenclatura rivista	Gene	Definizione
ALPS tipo 0	ALPS-FAS	FAS	I pazienti soddisfano i criteri diagnostici di ALPS e hanno una mutazione germinale in omozigosi di FAS.
ALPS tipo Ia	ALPS-FAS	FAS	I pazienti soddisfano i criteri diagnostici di ALPS e hanno una mutazione germinale in eterozigosi di FAS.
ALPS tipo Im	ALPS-sFAS	FAS	I pazienti soddisfano i criteri diagnostici di ALPS e hanno una mutazione somatica di FAS.
ALPS tipo Ib	ALPS-FASLG	FASLG	I pazienti soddisfano i criteri diagnostici di ALPS e hanno una mutazione germinale di FAS Ligando.
ALPS tipo IIa	ALPS-CASP10	CASP10	I pazienti soddisfano i criteri diagnostici di ALPS e hanno una mutazione germinale della Caspasi 10.
ALPS tipo III	ALPS-U	Unknown	I pazienti soddisfano i criteri diagnostici di ALPS: anche se il difetto genetico non è determinato (no FAS, FASL o Caspasi10).

Tabella 1: Classificazione della Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (revisione NIH 2009)

4 CARATTERISTICHE CLINICHE

La sindrome linfoproliferativa rappresenta la manifestazione clinica più importante, tipicamente si palesa nei primi anni di vita e spesso, anche se non trattata, tende a ridursi progressivamente durante la seconda decade²¹. Essa si può presentare con linfadenopatia (>95%), splenomegalia (90%) ed epatomegalia (40-50%)²². La maggior parte dei pazienti sviluppa linfadenopatia cronica non maligna, palpabile e non dolente, molto

²¹ Bleesing JJH, Nagaraj CB, Zhang K. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. *GeneReviews*. 2006.

²² Price S, Shaw PA, Seitz A, et al. Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood*. 2014.

precocemente (mediana: 11,5 mesi), frequentemente in assenza di sintomi costituzionali associati. Se isolata, interessa almeno 2 stazioni linfonodali; nell'ALPS tipicamente ha un andamento fluttuante e multifocale, prediligendo la stazione cervicale, l'ascellare o l'inguinale. La splenomegalia può essere di dimensioni e proporzioni variabili, da massiva (talora fino alla regione pelvica, con distensione della parete addominale) a moderata e con andamento fluttuante anch'essa; in genere essa persiste indefinitamente nei pazienti non sottoposti a splenectomia, intervento a cui vengono sottoposti molti pazienti a causa delle complicanze che si instaurano nel corso degli anni²³. In alcuni casi è possibile osservare un'epatomegalia di grado lieve-moderato, solitamente non associata ad un'alterazione degli indici di funzionalità epatica.

L'autoimmunità è il secondo reperto più comune dell'ALPS, colpendo circa il 70% degli individui affetti. La sua reale incidenza potrebbe essere sottostimata in virtù dell'impossibilità di ricercare nei pazienti tutti gli anticorpi potenzialmente implicati nella patogenesi della malattia, oltre all'estrema variabilità di esordio del quadro clinico, spesso silente durante tutta l'infanzia e l'adolescenza. Di facile riscontro è l'anemia emolitica-Coombs positiva, la quale infatti rappresenta il quadro clinico predominante; seguita dalla trombocitopenia immuno-mediata e dalla neutropenia autoimmune. La citopenia autoimmune può inoltre variare di severità o del tipo di linea cellulare coinvolta con il passare del tempo. È possibile delineare altre manifestazioni di autoimmunità nei pazienti ALPS, le più comuni sono rappresentate da rash cutanei (tipicamente, ma non esclusivamente orticarioidi), seguite da fibrosi polmonari, tiroiditi autoimmuni, uveiti, sindrome di Guillain-Barrè, epatiti, gastriti, nefriti, pancreatiti, coliti, atassia cerebellare, miocarditi e artriti²⁴.

Infine, caratteristica dei pazienti ALPS è l'aumentata suscettibilità a sviluppare patologie neoplastiche maligne, tra le quali spiccano principalmente il linfoma di Hodgkin e di non-Hodgkin. Il rischio è stimato essere da 60 a 150 volte superiore del rischio della popolazione generale, ed ha maggiore prevalenza nei pazienti ALPS con FAS mutato²⁵.

²³ Puck JM, Straus SE, Le deist F, Rieux-Laucat R, Fischer A. Inherited disorders with autoimmunity and defective lymphocyte regulation. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, eds. Primary Immunodeficiency Diseases. A molecular and genetic approach. Oxford: Oxford University Press 1999.

²⁴ Bleesing JJH, Nagaraj CB, Zhang K: Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. In *GeneReviews*®. Adam MP, et al., Editors. 1993.

²⁵ Straus SE, Jaffe ES et al, The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*. 2001 Jul 1.

Recentemente uno studio condotto su alcuni membri sani di una famiglia con mutazione di FAS, in assenza di evidenze cliniche di ALPS, ha dimostrato un aumento del rischio di sviluppo di linfomi, confermando così il ruolo di FAS come onco-soppressore²⁶. Il consenso generale delinea che l'anormale immunoregolazione e il difetto di FAS, caratteristici della sindrome in questione, contribuisce ad un'espansione del pool linfocitario, aumentando così la possibilità di trasformazione neoplastica. Il ritardo temporale tra l'inizio delle manifestazioni di ALPS e l'insorgenza linfoma, suggerisce la necessità della presenza di mutazioni di altri geni oncosoppressori, tra cui C- MYC, CCND1, BCL2 e BCL6, come requisito per lo sviluppo di linfoma. Infatti, è stato notato che, i linfociti con via apoptotica FAS-mediata alterata presentano ipermutazioni somatiche, che determinano reazioni autoimmuni, produzione di immunoglobuline disfunzionali e alterazioni del DNA.

5 CARATTERISTICHE IMMUNOLOGICHE E DI LABORATORIO

5.1 LINFOCITI DNTs

Come già precedentemente accennato, la presenza di cloni linfocitari T CD4-, CD8-, TCR $\alpha\beta$ +, definiti come “doppi negativi” (DNTs), costituisce una caratteristica pressoché costante nei soggetti affetti da ALPS. Tale percentuale può variare dall'1,5% fino al 60% della normale popolazione di linfociti, contrariamente ai soggetti sani in cui si rinvencono valori inferiori al 1,5%. Per porre diagnosi di ALPS, la percentuale di cellule TCR $\alpha\beta$ + DNT necessaria deve essere maggiore o uguale all'1,5% dei linfociti totali (o >2,5% dei linfociti TCD3), in un quadro di conta linfocitaria normale o aumentata. In presenza di linfopenia non si conosce la distribuzione di questa popolazione, per cui tale criterio perde valore. Livelli di queste cellule superiori al 3% sulla conta linfocitaria totale (o > 5% dei linfociti T) sono raramente osservati in condizioni diverse dall'ALPS, possono essere quindi considerati patognomonici di questa malattia²⁷. Il ruolo preciso delle DNT cells non è ancora chiaro e, in particolare, nessuna correlazione è stata riscontrata tra livello di linfociti DNT nel sangue circolante e severità della sindrome.

²⁶ Janda A, Schwarz K et al, Disturbed B-lymphocyte selection in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. 2016 May 5.

²⁷ Brandt D, Hendrick CM, et al. TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells in autoimmunity. *Elsevier*. 2018.

Caratteristiche di laboratorio accessorie nei pazienti ALPS possono essere collegate ad una prognosi peggiore, come l'ipereosinofilia, causata dal difetto di apoptosi, la quale determina un incremento dei livelli sierici di IgE, aumento del numero di leucociti di diverse linee cellulari nel sangue periferico e si collega ad una più alta mortalità a causa del rischio di complicanze di tipo infettivologico²⁸.

Si può inoltre riscontrare un'elevata concentrazione nel plasma di IL-10, IL-18, CD25 solubile e FAS Ligando.

5.2 IL-10

La sovraespressione di IL-10 in pazienti con un difetto ereditario di apoptosi è fortemente associata alla manifestazione palese di ALPS. I livelli sierici di suddetta proteina risultano essere 50 volte superiori rispetto agli individui sani (mediana di 166 pg/mL contro 3,4 pg/mL). La principale fonte di IL-10 è rappresentata dai linfociti DNT, in particolare da quelli localizzati nelle aree perifollicolari di milza e linfonodi; essa infatti, in primo luogo, stimola direttamente la crescita e la sopravvivenza delle cellule B; secondariamente attiva la proteina antiapoptotica Bcl-2 sulle cellule B e T, esacerbando il difetto apoptotico risultato dalla mutazione di Fas e rappresentando così un cofattore fondamentale per l'espressione clinica di tale patologia²⁹.

5.3 IL-18

L'interleuchina 18 è una citochina pro-infiammatoria prodotta principalmente da monociti e macrofagi. Essa rappresenta un importante fattore nella regolazione delle risposte immuni innate e specifiche; viene iperespressa durante stati di infiammazione cronica, nelle malattie infettive e in alcune tipologie di cancro; sottolineando il suo principale ruolo nello sviluppo di malattie autoimmuni³⁰.

5.4 VITAMINA B12

Il profilo sierologico dei pazienti ALPS spesso è caratterizzato inoltre da aumentati livelli di vitamina B12. In particolare, tale vitamina risulta molto elevata nei sottotipi Ia e Is di

²⁸ Kim YJ, Dale JK, Noel P, et al. Eosinophilia is associated with a higher mortality rate among patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *American Journal of Hematology*. 2007.

²⁹ Lopatin U, Yao X, Williams RK, et al. Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with disease expression. *Blood*. 2001.

³⁰ Esfandiari E, McInnes I, et al. A proinflammatory role of IL-18 in the development of spontaneous autoimmune disease. *The Journal of Immunology*. 2001.

ALPS, con valori mediani rispettivamente di 2300 ng/L e 1500 ng/L confrontati con un valore di riferimento pari a 450 ng/L. Un aumento modesto, ma statisticamente significativo, è stato osservato anche nel fenotipo ALPS III con mediana di 700 ng/L. La vitamina B12 (Cobalamina) è un micronutriente essenziale che gioca un ruolo fondamentale nella divisione cellulare, viene veicolata nel siero mediante Transcobalamina (TC) e Aptocorrina (HC). Studiando coorte di pazienti affetti da ALPS si è potuto evincere che essi presentano livelli di TC nei limiti della norma, mentre i livelli di HC sono aumentati di 15 volte rispetto ai valori normali.³¹

5.5 FAS Ligando

Recenti studi hanno dimostrato la correlazione tra la diagnosi di ALPS ed elevati livelli di Fas Ligando solubile. Il ligando di Fas è una proteina transmembrana, appartenente alla famiglia del TNF, espressa prevalentemente nei linfociti T. Il livello sierico di tale sostanza in soggetti affetti risulta >200 pg/mL (mediana dei valori compresa tra 1114 pg/mL e 1329 pg/mL), rispetto al valore normale di 104 pg/mL. Inoltre, il rilievo di esso <200 pg/mL sembra essere il marker più sensibile per escludere la diagnosi di ALPS associata a mutazione di FAS³².

6 DIAGNOSI

Data l'estrema eterogeneità della sua espressione clinica, la diagnosi di ALPS si fonda sull'osservazione clinica e sulle anomalie di laboratorio³³. Nel corso degli anni si è cercato di delineare in modo più preciso tale sindrome, a ragion di ciò nel 2009, durante un workshop internazionale tenuto presso il National Institutes of Health (NIH), vi fu una revisione dei criteri diagnostici, dapprima stilati nel 1999, ed attualmente vigenti³⁴.

Tale revisione distingue 2 criteri principali e 6 criteri accessori. I criteri principali su cui si fonda la diagnosi di ALPS comprendono la presenza di una linfadenopatia e/o

³¹ Raffick A.R. Bowen, Kennichi C dowdell, et al. Elevated vitamin B12 levels in autoimmune lymphoproliferative syndrome attributable to elevated haptocorrin in lymphocytes. *Clinical Biochemistry*. 2012.

³² Caminha I, Fleisher TA, Hornung RL, et al. Using biomarkers to predict the presence of FAS mutations in patients with features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010.

³³ Bride K, Teachey D, Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease. *F1000Research*. 2017.

³⁴ Jao B. Oliveira, Jack J. Bleesing, Umberto Dianzani, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*. 2010.

splenomegalia, non maligna e cronica (per un tempo > 6 mesi) associate ad un aumento dei livelli di linfociti DNT. Mentre i criteri accessori vengono divisi a loro volta in primari e secondari; i primi includono il difetto di apoptosi linfocitaria e la presenza di una mutazione somatica o germinale di FAS, FASL o Casp10; i secondari sono rappresentati da un significativo aumento dei livelli di biomarkers circolanti, istopatologia caratteristica, citopenia autoimmune associata al rialzo di IgG e storia familiare di una linfoproliferazione non maligna né infettiva con o senza autoimmunità. [Tabella 2]

Criteri principali

1. Linfadenopatia e/o splenomegalia, cronica (>6 mesi), non maligna, non infettiva.
2. Elevati livelli di linfociti DNT (CD3+, TCR $\alpha\beta$ +, CD4-, CD8-) > 1.5% dei linfociti totali, o 2.5% dei linfociti CD3+ con conta linfocitaria normale o aumentata.

Criteri accessori: primari

1. Difetto di apoptosi dei linfociti.
2. Mutazione somatica o germinale di FAS, FASL e Caspasi10.

Criteri accessori: secondari

1. Elevati livelli plasmatici di FAS Ligando solubile (sFASL) > 200 pg/mL o elevati livelli plasmatici di IL-10 o elevati livelli sierici o plasmatici di vit B12 o elevati livelli plasmatici di IL-18.
2. Reperti immunoistologici tipici.
3. Citopenia autoimmune ed elevati livelli di IgG.
4. Storia familiare di linfoproliferazione né maligna né infettiva con o senza autoimmunità.

Tabella 2: attuali criteri diagnostici di ALPS
(revisione NIH 2009)

Affinché si possa porre diagnosi di ALPS è necessario che il soggetto presenti entrambi i criteri principali ed almeno un criterio accessorio primario. L'ultima revisione dei criteri diagnostici permette inoltre di distinguere quella che è una probabile diagnosi di ALPS, contraddistinta dai due criteri principali ed almeno uno dei criteri accessori secondari. Alcuni pazienti con una diagnosi probabile potrebbe presentare una condizione di ALPS-like e dovrebbe essere perciò indagato per tale sospetto.

7 TRATTAMENTO

La gestione della sindrome autoimmune linfoproliferativa si concentra sul trattamento delle manifestazioni e delle complicanze della patologia; in particolare la linfoproliferazione, le citopenie autoimmuni e i sintomi extraematologici, qualora siano presenti. L'unica cura definitiva è rappresentata dal trapianto di cellule staminali, anche se, a causa dei rischi intrinseci a tale trattamento, viene utilizzata solo su coloro i quali presentano un fenotipo di malattia molto severo e refrattari all'immunosoppressione³⁵.

La prognosi generale per i pazienti ALPS è buona, condizionata però dalla responsività delle citopenie. Circa il 50-60% degli affetti necessita di terapie immunosoppressive per controllare l'autoimmunità, seppur la maggioranza di questi pazienti possa essere trattata mediante immunosoppressione con un singolo agente.

7.1 I LINEA

La prima linea di trattamento prevede l'utilizzo di alte dosi di corticosteroidi e immunoglobuline (IVIgG), somministrati per via endovenosa³⁶. Molti pazienti spesso rispondono bene al **corticosteroide**; nel breve periodo le tossicità causate da tale farmaco possono essere lievi (tra cui ipertensione, iperglicemia, irritabilità e aumento di peso.), al contrario, il suo uso prolungato può portare a serie e gravi complicanze. Considerando che la sindrome in esame è una patologia cronica, la maggior parte degli individui deve attenersi ad una terapia in cronico, prolungata; per tal motivo l'obiettivo terapeutico è cercare di limitare l'uso dei corticosteroidi, sostituiti, quando possibile, con altri immunosoppressori³⁷.

Oliveira et al. (*Blood*. 2010) suggeriscono l'utilizzo di una pulse-therapy ad alte dosi di metilprednisone e.v. (5-10mg/Kg), seguita da una dose di 1-2 mg/Kg al giorno di prednisone per os di mantenimento, da scalare in 8-12 settimane. Per pazienti particolarmente gravi con citopenia refrattaria la dose di metilprednisone può arrivare anche a 30mg/Kg/die per 1-3 giorni. La maggior parte dei pazienti risponde solo

³⁵ Bleesing JJH, Nagaraj CB, Zhang K: Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. In *GeneReviews*®. Adam MP, et al., Editors. 1993.

³⁶ Rao VK, Oliveira JB. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. 2011.

³⁷ Teachey DT, Lambert MP. Diagnosis and management of autoimmune cytopenias in childhood. *Pediatr Clin North Am*. 2013 Dec.

transitoriamente alla prima linea di terapia, o sviluppa steroideo-resistenza, ragione per la quale non è sempre possibile attuare lo svezzamento completo in tutti i soggetti.

Le **immunoglobuline** infuse per via endovenosa possono essere somministrate contemporaneamente ai corticosteroidi in coloro che presentano citopenia severa. L'uso di queste da sole però risulta essere meno efficace nel controllo dell'autoimmunità e della citopenia, se non nella trombocitopenia autoimmune isolata³⁸. Hanno un'azione rapida (circa 48h) e sono discretamente tollerate, tuttavia la loro azione è limitata nel tempo, così da rendere necessarie infusioni ripetute. L'utilizzo di immunoglobuline contro il fattore Rh (immunoglobulina anti-D) è discusso e scoraggiato, in quanto i pazienti che risultano positivi al test di Coombs diretto hanno un elevato rischio di sviluppare emolisi.

I pazienti che presentano una neutropenia persistente, causa sottostante di frequenti infezioni non completamente responsive alla terapia antibiotica, possono trarre beneficio dalla somministrazione sottocutanea di **G-CSF** (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) a partire da dosi di 1-2 microgrammi/Kg 2 o 3 volte a settimana.

7.2 II LINEA

I due farmaci immunomodulatori comunemente utilizzati in seconda linea di trattamento nelle ALPS sono il micofenolato mofetile (MMF) e il sirolimus.

Il **micofenolato mofetile** è un immunosoppressore derivato dall'acido micofenolico (MPA), il quale inibisce l'inosina-monofosfato-deidrogenasi (IMP). MPA agisce attraverso una riduzione del nucleotide guanosinico nei linfociti T e B, che sono incapaci di riutilizzare le purine e quindi costretti a sintetizzarle de novo, determinando così un effetto citostatico su tali cellule, portando infine ad un abbassamento dei livelli di autoanticorpi e cellule T citotossiche³⁹. La dose raccomandata di MMF è di 600mg/m² somministrata per via orale due volte al giorno, fino ad un massimo di 2 g al giorno. Gli effetti collaterali più comuni sono un aumentato rischio d'infezioni dovuto alla neutropenia (Herpes Simplex, Herpes Zoster, Sepsi, Candida e infezioni delle vie urinarie), ed effetti sull'apparato digerente, come diarrea, vomito, nausea e dolore addominale ed occasionalmente sul SNC.

³⁸ VK, Rao. Approaches to Managing Autoimmune Cytopenias in Novel Immunological Disorders with Genetic Underpinnings Like Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. *Frontiers in Pediatrics*. 2015.

³⁹ Allison AC. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus*. 2005.

Le potenzialità del MMF vennero inizialmente descritte nel 2005 ad opera di uno studio che ne dimostrò l'efficacia sull'80% dei pazienti presi in esame⁴⁰. Inoltre, tale sostanza non richiede uno stretto monitoraggio terapeutico, non ha significative interazioni con altri farmaci e per questi motivi viene considerato sicuro e ben tollerabile. Tuttavia, è stato osservato che non è in grado di causare morte linfocitaria e non ha effetti né sulla malattia linfoproliferativa, né sulla riduzione dei DNT. Sarebbe opportuno iniziare la terapia con MMF durante il décalage del trattamento cortisonico; la progressiva riduzione di steroide, della durata di circa 8-12 settimane, dovrebbe essere accompagnata dall'introduzione di MMF, il cui tempo per raggiungere la concentrazione terapeutica nel plasma è di circa 2 settimane.

Il **sirolimus** agisce inibendo l'attivazione delle cellule T, interferendo con il meccanismo di trasduzione intracellulare calcio-dipendente e calcio-indipendente. Il sirolimus si lega alla proteina citosolica specifica FKBP 12, successivamente il complesso FKBP 12-sirolimus inibisce il cosiddetto bersaglio della Rapamicina specifico per i mammiferi (mTOR), una chinasi necessaria per la progressione del ciclo cellulare. Quindi il sirolimus è un inibitore di mTOR ed agisce come agente immunoregolatorio aumentando i linfociti T regolatori inducendo, in tal modo, l'apoptosi cellulare nei linfociti anormali⁴¹. Tale farmaco sopprime la linfoproliferazione e normalizza i DNT controllando la distruzione autoimmune delle cellule ematopoietiche⁴². Agendo sia sulla linfoproliferazione che sull'autoimmunità, il sirolimus si è dimostrato un farmaco efficace nel trattamento dell'ALPS soprattutto nei pazienti refrattari ad altre terapie come MMF.

La dose di sirolimus deve essere aggiustata individualmente, iniziando con 2-3 mg/m². Il farmaco deve raggiungere un livello plasmatico di 5-15 ng/mL; per tal motivo i livelli di sirolimus nel siero dovrebbero essere misurati frequentemente finché non viene raggiunto un target duraturo, dopodiché è sufficiente eseguire un dosaggio mensile. Numerosi sono gli effetti collaterali che possono seguire ad un trattamento con sirolimus, tra i più comuni è bene sottolineare un aumentato rischio d'infezioni, mucositi, anemia, trombocitopenia, dolore addominale, diarrea, nausea, artralgie, ipertensione, cefalea e acne. Caratteristici

⁴⁰ Rao VK, Dugan F, et al. Use of mycophenolate mofetil for chronic, refractory immune cytopenias in children with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *British Journal of Haematology*. 2005.

⁴¹ Teachey DT, Jubelirer T, Baularte HJ. Treatment with sirolimus ameliorates tacrolimus-induced autoimmune cytopenias after solid organ transplant. *Pediatric Blood & cancer*. 2009.

⁴² Bride KL, Vincent T, Teachey D, et al. Sirolimus is effective in relapsed/refractory autoimmune cytopenias: results of a prospective multi-institutional trial. *Blood*, 2015.

sono anche i possibili effetti sul metabolismo, come per esempio ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia, iperglicemia, ipokaliemia, ipofosfatemia, aumento della LDH e della creatinina ematiche. Per questo motivo è consigliabile eseguire controlli periodici di questi valori.

Il **rituximab** è un anticorpo monoclonale avente come bersaglio il CD20, proteina espressa dai linfociti B, utilizzato in molte patologie maligne e in alcune malattie autoimmuni. Il suo ruolo all'interno della terapia delle ALPS è controverso, in quanto sembrerebbe aumentare ulteriormente il rischio di infezioni, portando così a dover ricorrere all'infusione di IVIgG; per tale ragione l'utilizzo del Rituximab dovrebbe essere preso in considerazione solamente quando gli altri immunosoppressori sono risultati inefficaci⁴³. [Figura 2]

Infine, è importante ricordare il ruolo della splenectomia, utilizzata come via terapeutica per le malattie autoimmuni nell'adulto, mentre risulta essere fortemente contrindicata nei soggetti affetti da ALPS, come dimostrato in numerosi studi. Se sottoposti a tale intervento, infatti, gli individui in esame hanno dimostrato un aumentato rischio di sepsi da pneumococco, nonostante la vaccinazione e la profilassi antimicrobica. Pur considerando unicamente le citopenie refrattarie e resistenti ad ogni altro trattamento farmacologico, la splenectomia presenta comunque rischi significativi, è spesso inefficace e raramente porta a remissioni permanenti⁴⁴.

⁴³ Zecca M, Nobili B, Ramenghi U, et al. Rituximab for the treatment of refractory autoimmune hemolytic anemia in children. *Blood*. 2003.

⁴⁴ Susan Price, Pamela Shaw, Jennifer Kirk, et al. Causes and consequences of splenectomy in ALPS-FAS. *Blood*. 2010.

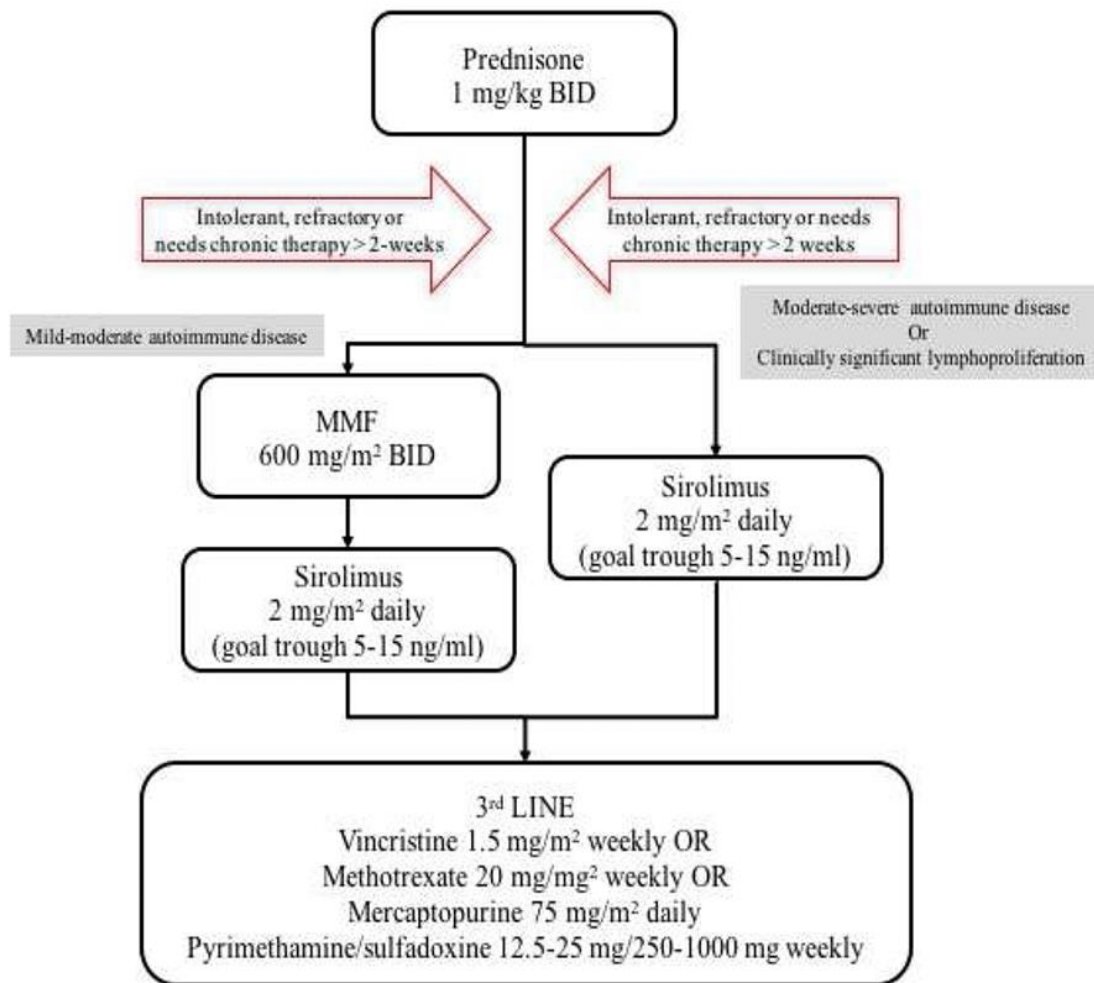


Figura 2: Algoritmo terapeutico dei pazienti da ALPS

Fonte: Bride K. Et al. "Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease. F1000Research, 2017

PAZIENTI E METODI

8 SCOPI DELLO STUDIO

Il presente studio si propone lo scopo di descrivere le caratteristiche cliniche ed immunologiche dei pazienti affetti da sindrome linfoproliferativa autoimmune causata dalla mutazione del gene CASP10.

9 PAZIENTI E METODI

I dati clinici e biochimici dei pazienti sono stati raccolti dalle cartelle cliniche degli stessi, previo ottenimento del consenso informato secondo la dichiarazione di Helsinki. Sono stati considerati eleggibili i pazienti portatori di mutazione del gene CASP10 seguiti presso l'Unità di Ematologia dell'Istituto Giannina Gaslini in un periodo compreso tra febbraio 2009 e marzo 2020.

La raccolta dati si è incentrata sulle seguenti variabili:

- Dati anagrafici del paziente e anamnesi familiare per patologie linfoproliferative.
- Sintomi clinici ematologici: presenza di linfoproliferazione cronica (> 6 mesi), valutata in base alla rilevazione di linfadenopatia e/o splenomegalia sulla base della clinica e di indagini ecografiche o radiologiche.
- Esame emocromocitometrico e formula linfocitaria al fine di definire la citopenia dal punto di vista quali-quantitativo. I criteri di anemia sono definiti secondo CTCAE 4⁴⁵.
- Dati biochimici dei principali markers di malattia (Vitamina B12, Immunoglobuline, sottoclassi di IgG, IL-10, IL-18 e FAS-ligando)
- Markers di autoimmunità: test di Coombs, presenza di autoanticorpi come ANA, ENA, ASMA, Ab anti-gliadina, anti-TPO, anti-neutrofili, anti DNA, anti dsDNA, anti C3d, anti IgG+, e presenza di altre malattie autoimmuni, come la celiachia.
- Valutazione del test dell'apoptosi eseguito su due diversi campioni.

⁴⁵ Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 4.0 (www.ctcae.org)
grado 1: Hb tra 10g/dL e i valori normali. grado 2: Hb compresa tra 8g/dL e 10g/dL. Grado 3 Hb <8g/dL - necessità di trasfusione. Grado 4: minaccia per la vita.

9.1 TEST GENETICI

Le analisi genetiche sono state effettuate tramite tecnica di Sanger PCR e NGS.

Il metodo Sanger, sviluppato da Frederick Sanger nel 1977, permette di sequenziare il DNA e in particolare di riconoscere l'esatta sequenza di nucleotidi che compone una precisa molecola di DNA. Prima di poter studiare il frammento prescelto è necessario effettuare un'amplificazione dello stesso, mediante una reazione di PCR (Polymerase Chain Reaction). Tale procedimento, introdotto solo a metà degli anni 80 ad opera di Kary Mullis, si basa sull'utilizzo dell'enzima DNA polimerasi, creando in tal modo un nuovo filamento di DNA da un filamento stampo, copiandolo interamente, nucleotide per nucleotide. Dalle parole dello stesso Mullis, rivoluzionario della genetica molecolare “un venerdì sera nell'aprile del 1983 [...] escogitai un processo che poteva produrre un numero illimitato di copie di geni.”

Al processo di amplificazione segue quello di denaturazione del frammento di DNA: la miscela viene esposta ad alte temperature, le quali causano l'apertura della doppia elica con rilascio dei due singoli filamenti. Il sequenziamento con metodo Sanger sfrutta nuovamente la capacità della DNA polimerasi di copiare la sequenza e sintetizzare un nuovo filamento complementare. Al procedere della reazione, vengono incorporati nel nuovo filamento sia dNTP normali, che permettono alla reazione di proseguire, sia i **nucleotidi terminatori di catena**, ovvero didesossinucleotidi (ddNTP). Rispetto ai nucleotidi usati dalle cellule per la sintesi del DNA, i ddNTP sono privi del gruppo 3'-OH dello zucchero, che è necessario per formare il legame fosfodiesterico con il nucleotide successivo. La loro introduzione determina così l'interruzione della sintesi e il rilascio di filamenti “monchi”. Inoltre, questi nucleotidi modificati sono legati ad un marcatore fluorescente, di quattro colori diversi, ciascuno corrispondente ad una base azotata. Al termine della reazione, si avrà una miscela di filamenti con lunghezza diversa, a seconda di dove è avvenuto l'inserimento del ddNTP terminatore di catena. Grazie all'elettroforesi capillare i diversi frammenti vengono ordinati in base alla loro lunghezza: la disposizione dei frammenti svelerà la sequenza dei nucleotidi e la stringa del DNA stampo analizzata.

La Next-Generation Sequencing (NGS) è la metodica di sequenziamento genico più utilizzata attualmente. Tramite essa è possibile sequenziare l'intero genoma umano

nell'arco di un singolo giorno⁴⁶, presenta infatti la capacità di processare milioni di frammenti in parallelo. Il test è in grado di valutare, simultaneamente ed integralmente, oltre 22 000 geni nello stesso individuo, delineando la sostanziale differenza con il metodo Sanger, il quale analizza numeri ristretti di mutazioni o geni e necessita di tempi più lunghi.

Per tale motivo, e per la sua elevatissima accuratezza analitica, NGS è stato utilizzato nel presente studio in prima istanza. Le variazioni molecolari nei pazienti in esame sono state indagate mediante NGS analisi, includendo 315 geni coinvolti in disordini ematologici, sindromi a carattere di immuno-deficienza e immuno-disregolazione; e solo in seguito confermate attraverso sequenziamento di Sanger.

9.2 TEST STATISTICI

La statistica descrittiva è stata riportata come frequenze assolute o percentuali per i dati qualitativi, e in mediana e range per dati quantitativi. Se le distribuzioni delle variabili sono difformi, si riportano la mediana e il range o il primo e il terzo quartile della distribuzione. La comparazione nella distribuzione delle frequenze è stata analizzata per mezzo del test del chi quadro. Se almeno una delle frequenze attese è minore di 5, si sostituisce il test chi quadro con il test esatto di Fisher. Tra i test non parametrici utilizzati si è utilizzato il test non parametrico Mann-Whitney per la comparazione tra due gruppi, se ci fossero stati più di due gruppi a confronto avremmo utilizzato il Kruskal-Wallis test. Tutti i test sono a due code ed è stato considerato statisticamente significativo un p-value <0.05.

9.3 TEST BIOCHIMICI

Immunofenotipo Linfocitario:

I cloni di linfociti periferici sono stati valutati dal sangue intero usando un pannello comprendente otto colori (secondo procedura lyse e wash), citometro di flusso FACS Canto II (BD) dotato di tre laser (blu, rosso, viola), softwareFacsdiva™ (BD) e un grande pannello di RUO monoclonale anticorpi, e fluorocromi uniti in differenti combinazioni.

⁴⁶ S. Behjati, P. S. Tarpey, *What is next generation sequencing?*, 2013.

ALPS-panel:

Sono stati analizzati valori inclusi in un pannello di parametri citofluorimetrici specifici e suggestivi di ALPS (CD3+CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ +, detti “linfociti T doppi negativi” (DNTs), > 1.5%, B220+DNTs > 60%, il rapporto CD3+CD25+/CD3+HLA-DR+ < 1% e le cellule B-memory CD27+<15%).

Interleuchina-18, interleuchina-10 e FASL:

IL-18, IL-10 e ligando FAS sono stati testati utilizzando il metodo ELISA (test di immunoassorbimento enzimatico), tramite kit disponibili in commercio (MBL, Woburn, MA, USA, Invitrogen, Waltham, MA, USA, Abnova, Taipei, Taiwan, rispettivamente).

Autoimmunità:

Sono stati effettuati screening per l'autoimmunità, verificando i valori di anticorpi antinucleo (ANA), antigene nucleare estraibile (ENA), anti-tireo-perossidasi (TPO), anticorpo anti-tireoglobulina (TGA) e anti-transglutaminasi e test di Coombs diretto e indiretto. In caso di riscontro di trombocitopenia e/o neutropenia sono stati ricercati rispettivamente gli anticorpi anti-piastrine e anti-neutrofili.

Test di Apoptosi:

Test eseguito su prelievo fresco di cellule T attivate, colorate ed evidenziate mediante anticorpo monoclonale anti-FAS in immunofluorescenza diretta, analizzate in seguito attraverso citometria. (valori normali <82%)

Test funzionale di Apoptosi, su linee cellulari:

Le varianti di CASP10 sono state validate funzionalmente mediante cellule B immortalizzate con EBV dei pazienti sono state trattate con ligando FAS (10 ng/mL, Enzo Life Science) per 24 ore al fine di indurre l'apoptosi, e la morte cellulare è stata misurata dal citofluorimetro. La funzione della via di apoptosi è stata valutata dall'analisi Western-blot delle proteine CASP10, CASP8 e PARP usando gli anticorpi monoclonali anti-CASP10 del coniglio (Abcam), anti-CASP8 monoclonale del mouse (1C12) e anti-PARP policlonale del coniglio (tecnologia di segnalazione cellulare).

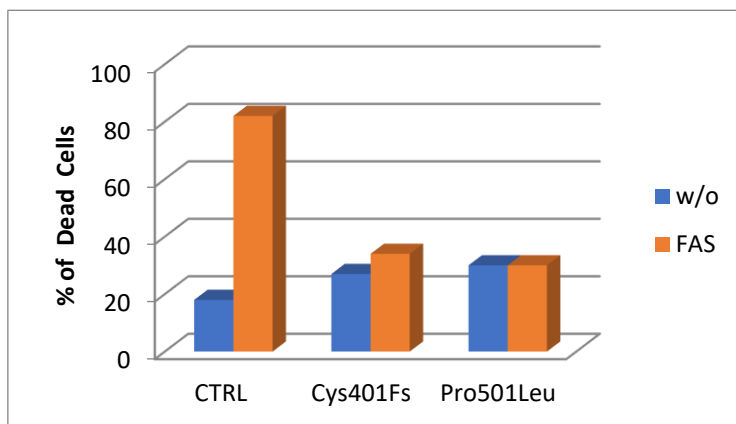
I campioni biologici sono stati forniti da Gaslinibiobank (<http://dppm.gaslini.org/biobank>; Target Biobank P00-IGG-GB, request ID 509 e 620); per i tests che hanno richiesto materiale biologico non congelato, sono stati donati supplementi di campioni di sangue durante il monitoraggio di routine della malattia. Tutti

i campioni sono stati donati con il consenso informato scritto del paziente o del genitore/tutore.

RISULTATI E DISCUSSIONE

10 DESCRIZIONE GENERALE

Per il presente studio sono stati considerati eleggibili 21 pazienti con mutazione del gene CASP10, diagnosticati tra il 2009 e il 2020 presso l'Unità di Ematologia dell'Istituto Giannina Gaslini, di cui 12/21 (57%) sono maschi e 9/21 (43%) sono femmine. Di questi pazienti 8/21 (38%) sono portatori di una mutazione patogena della Caspasi 10, in particolare 5/8 soggetti presentano una mutazione patogena nota (Ile406Leu), mentre in 3/8 sono state identificate due nuove mutazioni patogeniche (Cys401Fs e Pro501Leu), validate funzionalmente [Figura 3,4]. I restanti pazienti 13/21 (62%) presentano varianti polimorfiche dello stesso gene (Tyr446Cys; leu522ile; Val410Ile), note per essere associate ad un deficit di apoptosi. Le mutazioni sono state individuate mediante NGS, e successivamente validate attraverso sequenziamento di Sanger. L'età mediana dei pazienti è 15 anni (range 2-30), l'età mediana dell'esordio dei sintomi è 10,5 anni (range 0-19).



%MORTE	w/o	FAS
CTRL	18	82
Cys401Fs	27	34
Pro501Leu	30	30

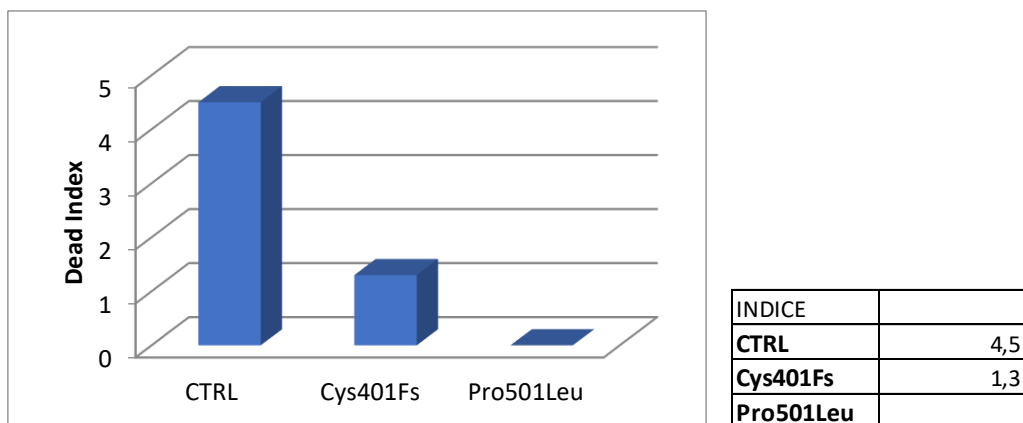


Figura 3,4: Test funzionale di apoptosi su linee cellulari, validazione funzionale di Cys401Fs e Pro501Leu.

11 CLINICA E LABORATORIO

All'esordio di malattia 10/21 (48%) pazienti presentavano linfoproliferazione, tra i quali 8/21 (38%) manifestavano splenomegalia. È stato inoltre possibile delineare un quadro di anemia emolitica in 4/21 (19%) pazienti all'esordio della sintomatologia con mediana dei valori minimi di emoglobina 5,15 (range 4,2-6,6); 8/21 (38%) pazienti mostrava valori di trombocitopenia, la cui mediana è 11500 (range 1000-97000); mentre 9/21 (43%) presentava leucopenia. Associati ai segni clinici sono stati osservati altri sintomi, in particolare 7/21 (33%) pazienti riferiscono una sintomatologia associata che comprende febbre, astenia, artralgia, diarrea, episodi epilettici ed infezioni ricorrenti importanti secondari alla neutropenia.

La tabella 3 mostra le caratteristiche cliniche ed i parametri immunologici caratteristici delle sindromi linfoproliferative autoimmuni.

	PAZIENTI TOTALI (21)	PATOGENICHE (8)	VARIANTI (13)
ETÀ D'ESORDIO	10,5 (0-19)	11,5 (0-19)	10 (0-15)
LINFOPROLIFERAZIONE	10/21 (48%)	4/8 (50%)	6/13 (46%)
ANEMIA EMOLITICA	4/21 (19%)	1/8 (13%)	3/13 (23%)
-VALORI MINIMI	5,15 (4,2-6,6)	4,2	6 (4,3-6,6)
TROMBOCITOPENIA	8/21 (38%)	3/8 (38%)	5/13 (38%)
-VALORI MINIMI	11500 (1000-97000)	13000(1000-97000)	10000 (3000-16000)
LEUCOPENIA	9/21 (43%)	5/8 (63%)	4/13 (31%)
AUTOANTICORPI	8/17 (47%)	2/7 (29%)	6/10 (60%)
LINFO B (%)	13,2 (6,1-45,9)	13,45 (6,1-21,4)	13,2 (9-45,9)
LINFO T (%)	74,6 (47,1-88,7)	76,4 (65,4-88,7)	74,5 (47,1-81)
LINFO NK (%)	7,5 (2,4-23,2)	7,3 (4,2-17,3)	7,8 (2,4-23,2)
ALPS-PANEL			
DNT (NR:>1,5%)	10/21 (48%)	4/8 (50%)	6/13 (46%)
-VALORI	1,4 (0,4-4,2)	1,6 (0,9-2,6)	1,4 (0,8-4,2)
B220 (NR:>60%)	5/21 (24%)	1/8 (12,5%)	4/13 (31%)
-VALORI	37,2 (10,4-84,3)	29,45 (10,4-57)	41,5 (26,8-84,3)
RAPPORTO CD3+CD25+/CD3+HLADR+ (NR:<1%)	9/21 (43%)	4/8 (50%)	5/13 (38%)
-VALORI	1,2 (0,1-2,5)	0,9 (0,1-2,4)	1,2 (0,2-2,5)
B-MEMORY (CD27+) (NR:<15%)	11/21 (52%)	3/8 (38%)	8/13 (62%)
-VALORI	13,6 (0,3-58)	16,5 (3,8-49)	11 (0,3-58)
IL10 (NR:>20pg/ml)	2/17 (12%)	0/6	2/11 (18%)
-VALORI	0 (0-101)	0 (0-7,2)	0 (90-101)
IL18 (NR:>500pg/ml)	7/17 (41%)	2/6 (33%)	5/11 (45%)
-VALORI	365 (75-5001)	240 (80-660)	495 (75-5001)
SFAS (NR:>200pg/ml)	0	0	0
VITB12 (NR:191-663pg/ml)	14/20 (70%)	6/7 (86%)	8/13 (62%)
-VALORI	548,5 (245-1550)	547 (245-1550)	550 (313-1492)
IgG	1/21 (5%) iper	1/8 (13%) iper	
-VALORI	1010 (379-3070)	1108 (779-3070)	980 (379-1682)
IgA	1/21 (5%) iper 1/21 (5%) ipo	1/8 (13%) iper	1/13 (8%) ipo
-VALORI	117 (4-940)	115,5 (89-940)	117 (4-290)
IgM	3/21 (14%) ipo	1/8 (13%) ipo	2/13 (15%) ipo
-VALORI	87 (21-240)	87,5 (48-128)	80 (21-240)
TEST DI APOPTOSI	7/9 (78%)	2/2 (100%)	4/7 (57%)

Tabella 3: Caratteristiche cliniche e parametri immunologici

Sei pazienti su 21 (29%) pazienti soddisfano almeno 3 su 4 criteri dell'ALPS-panel; 4/21 (19%) pazienti ne mostra 2 su 4; la maggior parte, ossia 8/21 (38%) pazienti è ascrivibile ad un solo criterio; mentre 3/21 (14%) pazienti non ha alcun valore significativo.

Le tabelle 4 e 5 mostrano le principali caratteristiche cliniche ed immunologiche dei singoli pazienti.

PZ	MUTAZIONE	SESSO	ETÀ ALLA DIAGNOSI	LINFOPROLIFERAZIONE	ANEMIA EMOLITICA	TROMBOCITOPENIA	LEUCOPENIA	AUTOANTICORPI	ALTRI SINTOMI
1	Ile406Leu	F	13	SI	NO	SI	NO	ANA pos; Ab antiPLT pos negativi	
2	Ile406Leu	M	19	NO	NO	NO	SI		
3	Ile406Leu	F	11	NO	NO	NO	SI	Coombs d/i negativo	
4	Ile406Leu	M	8	NO	NO	SI	SI	nd	Artralgie, disturbi gastrointestinali
5	Ile406Leu	F	1	NO	NO	NO	SI	Ab anti neutrofili neg negativi	
6	Cys401Fs	M	16	SI	NO	NO	SI		
7	Cys401Fs	M	16	SI	SI	NO	NO	Coombs d/i pos negativi	
8	Pro501Leu CTLA4: thr17ala	M	12	SI	NO	SI	NO		
9	Val410Ile	F	21	NO	NO	NO	SI	ANA pos, Coombs d/i negativo	
10	Val410Ile PI3K: his273tyr	F	1	SI	SI	NO	SI	Coombs d/i pos; Ab antiPLT e anti neutrofili pos	Infezioni ricorrenti
11	Val410Ile	M	6	SI	SI	NO	NO	Coombs d/i pos	
12	Val410Ile	M	3	NO	NO	NO	NO	nd	
13	Val410Ile	M	4	NO	NO	NO	NO	ANA pos	Artralgie, colite emorragica
14	Val410Ile	F	10	SI	NO	SI	NO	nd	Astenia, artralgie
15	Val410Ile	M	16	NO	NO	NO	NO	nd	
16	Tyr446Cys	M	11	NO	NO	NO	SI	negativi	Artralgie
17	Tyr446Cys	F	14	NO	NO	SI	NO	negativi	Mici
18	Tyr446Cys	F	5	SI	NO	NO	NO	Coombs d/i pos negativi	
19	Tyr446Cys	M	12	NO	NO	SI	NO		
20	Tyr446Cys	M	9	SI	NO	SI	SI	Coombs d/i pos	
21	Leu522Ile +CASP8	F	12	SI	SI	SI	NO	ANA pos; Ab antiPLT pos	Epilessia

Tabella 4: Caratteristiche cliniche.

PZ	MUTAZIONE	DNTS (N.R. >1,5% LINFOCITI TOT)	DN B220 (N.R. >60%)	CD27+ (N.R. <15%)	CD3CD25/CD3 HLADR RATIO (N.R. <1%)	LINF OT (%)	LINFO B (%)	LINF O NK (%)	TEST APOPTOSI	IL-10 (N.R. >20pg/ml)	IL-18 (N.R. >500pg/ml)	SFASL (N.R. >200pg/ml)	VITB12 (N.R. 191-663pg/ml)	IgG	IgA	IgM
1	Ile406Leu	1,9	42	49	1,4	83	11,2	4,8	positivi:2 a Tor; negativi:2 a Nov	0,9	250	0	547	1010	89	88
2	Ile406Leu	2,5	21,5	21,2	0,7	71,3	21,4	5,7		<1	660	0	Nd	1272	109	128
3	Ile406Leu	1,3	24	17,6	2,4	76,3	13,7	7,5		<1	168	0	425	779	92	80
4	Ile406Leu	3	57	23,6	0,7	76,5	13,2	8,5		<1	500	0	583	1106	121	148
5	Ile406Leu	1	30	15,4	1,1	79	12,8	7,1		Nd	Nd	0	1550	964	110	111
6	Cys401Fs	1	28,9	5,5	1,4	65,4	19,2	15		<1	80	0	245	1270	223	80
7	Cys401Fs	0,9	64	3,8	0,1	88,7	6,1	4,2		Nd	Nd	0	344	1110	233	48
8	Pro501Leu CTLA4: thr17ala	2,6	10,4	13,6	0,3	68,1	13,9	17,3	positivo	7,2	230	0	585	3070	940	87
9	Val410Ile	0,4	21,7	58	0,9	78,8	13,2	8,8		Nd	Nd	0	313	903	290	240
10	Val410Ile PI3K: his273tyr	4,1	62,8	7,1	0,3	74,6	9	12,5	positivo	90	5001	0	1492	1596	117	69
11	Val410Ile	4,2	37,2	11	0,1	73,6	21,7	4,7		<1	2935	0	1167	980	76	65
12	Val410Ile	0,9	34,7	7	1,2	47,1	45,9	7,5		Nd	Nd	0	492	379	32	21
13	Val410Ile	1,4	26,8	10,3	1,2	75,2	18,5	5		<1	281	0	669	1002	117	80
14	Val410Ile	1,2	46	0,3	1,3	64,4	11,7	23,2	positivo	101	550	0	1014	805	130	101
15	Val410Ile	1,1	61,7	12,4	2,2	77,6	12,3	8,6	positivo	<1	75	0	660	1154	68	99
16	Tyr446Cys	1	41,5	18,2	2,5	71,9	9,4	16,5		0	495	0	521	972	119	44
17	Tyr446Cys	2	53	22,2	1,2	74,5	11,1	2,4	positivo	4	110	0	325	1058	153	116
18	Tyr446Cys	2,3	81	15,6	0,2	81	10,5	7,8	negativo	<1	1050	0	393	1094	64	140
19	Tyr446Cys	2,7	32	8,3	1,3	65,9	25,3	6,8		3	333	0	513	1682	4	61
20	Tyr446Cys	2	28,2	3,9	0,1	80,9	13,6	4,7		<1	858	0	728	798	147	58
21	Leu522Ile +CASP8	0,8	84,3	36,3	2,5	68,5	16,9	13,6	negativo	4	365	0	550	904	176	101

Tabella 5: Caratteristiche immunologiche.

Infine, sulla base dei criteri diagnostici dell'ALPS [tabella 2] è stato possibile individuare 5/21 (24%) pazienti che soddisfano tali criteri e per tal motivo ascrivibili a diagnosi di ALPS probabile o definitiva. Di questi 4/5 (80%) presentano un polimorfismo, 1/5 (20%) ha invece una variante patogena. I restanti 16/21 pazienti (76%) presentavano caratteristiche cliniche ed immunologiche ALPS-like; nessun paziente indagato si presenta del tutto asintomatico dal punto di vista clinico e/o laboratoristico.

12 DISCUSSIONE

In letteratura medica sono pochi i dati disponibili riguardanti il ruolo della mutazione del gene CASP10 nello sviluppo del fenotipo ALPS unicamente basati su pochi casi clinici⁴⁷. Questo studio rappresenta la più ampia casistica mai riportata e mostra che solo circa il 25% dei pazienti con mutazione di tale gene mostra un fenotipo ALPS. In particolare, la linfoproliferazione e la presenza di linfociti Doppo Negativi >1,5%, considerati criteri clinici obbligatori per una diagnosi di ALPS, risultano essere presenti solo nella metà dei soggetti indagati; e così anche altre anomalie immunologiche tipiche sono mancanti. Di conseguenza la maggior parte dei pazienti presenta un quadro clinico di immunodisregolazione ALPS-like. Cionondimeno, il test dell'apoptosi è risultato positivo nella grande maggioranza dei casi, confermando comunque il ruolo della Caspasi 10 nel determinare un deficit di apoptosi FAS-mediata, anche se forse non sufficientemente grave per comportare un quadro clinico tipico come nei casi di ALPS secondari a deficit di FAS. Inoltre, anche la vitamina B12 è risultata elevata nella maggior parte dei pazienti CASP10 e pertanto si conferma biomarker caratteristico sia per quanto riguarda gli individui portatori di una mutazione patogena sia per coloro che presentano una variante polimorfica, mentre i valori dell'IL-10 e IL-18 non sono risultati significativi a ragione del fatto che si riscontrano alterati, quindi ascrivibili ad un immunofenotipo ALPS, in una percentuale troppo bassa di pazienti. In ugual modo le Immunoglobuline (IgG, IgA, IgM) non costituiscono un elemento differenziale perché solo circa il 5% mostra ipogammaglobulinemia o ipergammaglobulinemia. Un'altra caratteristica

⁴⁷ Miano et al. FAS-mediated apoptosis impairment in patients with ALPS/ALPS-like phenotype carrying variants on CASP10 gene. *British Journal of haematology*, 2019

peculiare di ALPS-CASP10 evidenziata in questo studio è rappresentata dall'età di esordio che è risultata essere più tardiva, intorno ai 10 anni, a differenza di ALPS-FAS che si sviluppa nei primi anni di vita.

Facendo successivamente un confronto tra i soggetti portatori di mutazione patologica e quelli con variante polimorfica non è emersa alcuna differenza significativa. È stato interessante però notare come in due pazienti, in cui la mutazione del gene CASP10 è associata ad un'ulteriore mutazione vengano rispettati almeno 3 su 4 dei criteri citomorfologici dell'ALPS-panel. Tuttavia questo particolare riferimento non è stato sufficientemente approfondito e pertanto saranno necessari ulteriori e nuovi studi per capire il ruolo di varianti su altri geni coinvolti nelle sindromi da immunodisregolazione nell'espressione del fenotipo clinico.

I risultati ottenuti da tale studio confermano che la penetranza delle mutazioni dei geni correlati ad ALPS è molto variabile. In particolare, i pazienti ALPS-CASP10 nel complesso presentano un quadro clinico per lo più riconducibile ad un disturbo ALPS-like, anche se secondario ad un disturbo dell'apoptosi FAS-mediata, evidenziando la necessità di chiarire se l'ALPS debba essere definita sulla base del fenotipo clinico o del difetto molecolare e patogenico. Ulteriori studi su più ampie casistiche ed una revisione dei criteri diagnostici potrebbero rispondere a tale quesito, fermo restando che la diagnosi molecolare rappresenta un obiettivo imprescindibile al fine di poter impostare una terapia target.

CONCLUSIONI

Questo studio rappresenta la più ampia caratterizzazione clinica e immunologica di pazienti con sindrome linfoproliferativa autoimmune causata da mutazioni del gene CASP10 e mostra che tali pazienti dovrebbero essere classificati come affetti da una sindrome da immunodisregolazione a se stante, alla luce del fenotipo sfumato ed eterogeneo che solo in una minoranza dei casi rientra nei criteri diagnostici dell'ALPS. Per confermare tale affermazione saranno comunque necessari ulteriori studi su casistiche più numerose che possano portare ad una nuova revisione della classificazione della patologia e dei criteri diagnostici.

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo elaborato e del lavoro su cui esso si fonda vorrei ringraziare in prima istanza l'intera Unità di Ematologia dell'Istituto Giannina Gaslini, il Dottor Carlo Dufour e tutta l'equipe del reparto, per avermi dato l'opportunità di svolgere questo progetto di tesi, per avermi cortesemente accolta in una realtà ospedaliera ricca di stimoli, in un ambiente in cui si può crescere, imparare, non solo nozioni tecniche, ma anche il valore della collaborazione.

Ringrazio inoltre il Professor Ravelli per avermi dato la possibilità di esporre il lavoro.

Un ringraziamento particolare va al Dottor Maurizio Miano, per la sua grande disponibilità, la pazienza e la cura con cui mi ha aiutata nello svolgimento di questo lavoro, nonostante le numerose difficoltà di questo specifico momento storico.

Infine, ringrazio l'Università di Genova e l'ospedale San Martino per il percorso formativo e le opportunità create.

Un grazie immenso e dovuto va alla città di Genova, e alla regione Liguria, mi è stata data l'opportunità di conoscere davvero questa città così ricca di storia, una città particolare, una città con carattere, un carattere tutto suo. È stato facile innamorarsi delle coste liguri e dei colori brillanti, tra l'azzurro limpido del cielo, il blu intenso del mare e il verde delle colline che circondano la città. Sicuramente meno facile trovarsi in una realtà così diversa da quella a cui ero abituata, diversi ritmi, orari e distanze; e in non poche occasioni i 228 km che separano Brescia e Genova si sono rivelati quasi insostenibili. Nonostante tutto Zena è stata la mia casa per questi sei anni ed ora un pezzo del mio cuore appartiene a lei.

Vorrei ringraziare tutti coloro che mi sono stati accanto durante l'interno percorso universitario, e anche chi ha camminato al mio fianco solo per un periodo più breve.

Un grazie speciale ai miei coinquilini e compagni di viaggio, Chiara, Giorgio e Roberto. Grazie a Riccardo per avermi sopportato e supportato fin dal primo giorno, per essere il mio ragazzo, compagno, complice, amico e guida.

Grazie alla mia famiglia, a mia sorella Giorgia, la mia prima e vera amica, a mia mamma Elena e a mio papà Ezio, affinché possano essere orgogliosi di me almeno quanto io lo

sono di loro, per aver sempre creduto in me, per avermi tracciato una strada che ora possono percorrere sicura, seguendo i loro passi.

“...Un sogno, fu un sogno, ma non durò poco, per questo giurai che avrei fatto il dottore, e non per un dio, ma nemmeno per gioco perché i ciliegi tornassero in fiore...”

BIBLIOGRAFIA

1. Canale vC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatric*, 1967.
2. Teachey DT, Obzut DA, Axsom K, et al. Rapamycin improves lymphoproliferative disease in murine autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood*, 2006.
3. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*, 1995.
4. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, et al. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 1992.
5. Bride K, Teachey D, Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease. *F1000Research*, 2017.
6. Rao VK, Oliveira JB. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, 2011.
7. Nabhani S, Hönscheid A, Oommen PT, et al. A novel homozygous Fas ligand mutation leads to early protein truncation, abrogation of death receptor and reverse signaling and a severe form of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clinical Immunology*, 2014.
8. Lee KH, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schütze S, et al. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *eMBo J*, 2006.
9. Fisher GH, Rosenberg FJ, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*, 1995.
10. Robbins e Cotran. Le basi patologiche delle malattie. Patologia generale.
11. Wachmann K., Pop C., et al. Activation and specificity of humans Caspase-10. *Biochemistry*, 2010.
12. S. Yan, Y.Z. Li, et al. Role of CASP-10 gene polymorphism in cancer susceptibility: a HuGE review and meta-analysis. *Genetics and molecular research*, 2012.
13. Grønbaek, K., Dalby, T., et al. The V410I (G1228A) variant of the caspase-10 gene is a common polymorphism of the Danish population. *Blood*, 1995.

14. Cerutti, E., Campagnoli, M.F., Ferretti, et al. Co-inherited mutations of Fas and caspase-10 in development of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *BMC Immunology*, 2007.
15. Dianzani, U., Bragardo, M., et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood*, 1997.
16. Ramenghi, U., Bonisconi, et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood*, 2000.
17. Hu, Z., Li, C., Chen, K., et al. Single nucleotide polymorphisms in selected apoptotic genes and BPDE-induced apoptotic capacity in apparently normal primary lymphocytes: a genotype-phenotype correlation analysis. *Journal of Cancer Epidemiology*, 2008.
18. Miano et al. FAS-mediated apoptosis impairment in patients with ALPS/ALPS-like phenotype carrying variants on CASP10 gene. *British Journal of haematology*, 2019.
19. Worth A, thrasher AJ, gaspar B. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *British Journal of Haematology*, 2006.
20. Jao B, Oliveira, Jack J, Bleesing, Umberto Dianzani, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*, 2010.
21. Bleesing JJH, Nagaraj CB, Zhang K. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. *GeneReviews*, 2006.
22. Price S, Shaw PA, Seitz A, et al. Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood*, 2014.
23. Puck JM, Straus Se, Le deist F, Rieux-Laucat R, Fischer A. Inherited disorders with autoimmunity and defective lymphocyte regulation. In: ochs Hd, Smith Cie, Puck JM, eds. Primary Immunodeficiency Diseases. A molecular and genetic approach. *oxford: oxford university Press*, 1999.
24. Bleesing JJH, Nagaraj CB, Zhang K: Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. In *GeneReviews* ®. Adam MP, et al.,Editors.1993.

25. Straus SE, Jaffe ES et al, The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*, 2001 Jul 1.
26. Janda A, Schwarz K et al, Disturbed B-lymphocyte selection in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, 2016 May 5.
27. Brandt D, Hendrick CM, et al. TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells in autoimmunity. *Elsevier*, 2018.
28. Kim YJ, Dale JK, Noel P, et al. Eosinophilia is associated with a higher mortality rate among patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *American Journal of Hematology*, 2007.
29. Lopatin U, Yao X, Williams RK, et al. Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with disease expression. *Blood*, 2001.
30. Esfandiari E, McInnes I, et al. A proinflammatory role of IL-18 in the development of spontaneous autoimmune disease. *The Journal of Immunology*, 2001.
31. Raffick A.R. Bowen, Kennichi C dowdell, et al. Elevated vitamin B12 levels in autoimmune lymphoproliferative syndrome attributable to elevated haptocorrin in lymphocytes. *Clinical Biochemistry*, 2012.
32. Caminha I, Fleisher TA, Hornung RL, et al. Using biomarkers to predict the presence of FAS mutations in patients with features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2010.
33. Bride K, Teachey D, Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease. *F1000Research*, 2017.
34. Jao B. Oliveira, Jack J. Bleesing, Umberto Dianzani, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*, 2010.
35. Bleesing JJH, Nagaraj CB, Zhang K: Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. In *GeneReviews* ©. Adam MP, et al.,Editors.1993.
36. Rao VK, Oliveira JB. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, 2011.

37. Teachey DT, Lambert MP. Diagnosis and management of autoimmune cytopenias in childhood. *Pediatr Clin North Am*, 2013 Dec.
38. VK, Rao. Approaches to Managing Autoimmune Cytopenias in Novel Immunological Disorders with Genetic Underpinnings Like Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. *Frontiers in Pediatrics*, 2015.
39. Allison AC. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus*. 2005.
40. Rao VK, Dugan F, et al. Use of mycophenolate mofetil for chronic, refractory immune cytopenias in children with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *British Journal of Haematology*, 2005.
41. Teachey DT, Jubelirer T, Baularte HJ. Treatment with sirolimus ameliorates tacrolimus-induced autoimmune cytopenias after solid organ transplant. *Pediatric Blood & cancer*, 2009.
42. Bride KL, Vincent T, Teachey D. et al. Sirolimus is effective in relapsed/refractory autoimmune cytopenias: results of a prospective multi-institutional trial. *Blood*, 2015.
43. Zecca M, Nobili B, Ramenghi U, et al. Rituximab for the treatment of refractory autoimmune hemolytic anemia in children. *Blood*, 2003.
44. Susan Price, Pamela Shaw, Jennifer Kirk, et al. Causes and consequences of splenectomy in ALPS-FAS. *Blood*, 2010.
45. Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 4.0 (www.ctcae.org).
46. S. Behjati, P. S. Tarpey, What is next generation sequencing?, 2013.
47. Miano et al. FAS-mediated apoptosis impairment in patients with ALPS/ALPS-like phenotype carrying variants on CASP10 gene. *British Journal of haematology*, 2019