

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA



**Sindrome linfoproliferativa autoimmune
secondaria a mutazione del gene CASP10: nuove
mutazioni e polimorfismi associati a deficit di
apoptosi.**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Roberto Massimo Lemoli

Candidato:

Manuel Ciceri

Correlatore:

Prof. Maurizio Miano

Anno accademico 2020-2021

INDICE GENERALE

Introduzione	I
1 ALPS: definizione e background.....	2
2. FISIOPATOLOGIA.....	4
2.1 Apoptosi.....	4
2.2 Caspasi 10.....	7
2.3 Classificazione.....	10
3 CARATTERISTICHE CLINICHE E IMMUNOLOGICHE	13
3.1 Caratteristiche cliniche.....	13
3.2 Reperti di Laboratorio.....	15
3.3 Caratteristiche Immunologiche.....	16
4 DIAGNOSI E TRATTAMENTO	21
4.1. Criteri Diagnostici.....	21
4.2 Diagnosi differenziale.....	22
4.3 Trattamento.....	23
4.4 Prevenzione delle manifestazioni primari e secondarie.....	26
4.5 Counseling Genetico.....	28
Contributo sperimentale o Revisione Sistemica	II
5. SCOPI DELLO STUDIO	30
6. MATERIALI E METODI.....	30
6.1 Test Genetici	31
6.2 Test Statistici.....	32
6.3 Test Biochimici.....	33
7. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	36
7.1 Descrizione Generale.....	36
7.2 Clinica e Laboratorio.....	36
7.3 Discussione.....	42
8. CONCLUSIONI.....	44
9. RINGRAZIAMENTI.....	45
10.BIBLIOGRAFIA.....	46

1. DEFINIZIONE E BACKGROUND

La Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS), conosciuta inizialmente anche con il nome di sindrome di Canale e Smith, è una rara condizione congenita caratterizzata da un difetto dei meccanismi dell'apoptosi che compromettono l'omeostasi linfocitaria. Questi difetti del processo apoptotico conducono ad una malattia linfoproliferativa che si accompagna a manifestazioni cliniche quali la linfadenopatia, l'epatosplenomegalia e neoplasia secondaria.¹

Tale condizione venne descritta per la prima volta nel 1967, come un complesso di sintomi con inizio nei prime due anni di vita tra cui figuravano epatosplenomegalia, linfadenopatia generalizzata con diminuzione della dimensione dei linfonodi durante episodi infettivi e febbrili, ipercellularità del midollo osseo con blasti occasionali, manifestazioni di malattia autoimmune, alterazione nelle gammaglobuline e decorso cronico.²

La patogenesi di questo processo linfoproliferativo è stata indagata nel 1992 in studi con topi portatori di mutazione linfoproliferativa "lpr", autosomica recessiva, la quale causava una anomalia nella risposta T-linfocitaria responsabile di linfadenopatia e produzione di anticorpi. La causa venne attribuita ad un deficit dell'espressione di FAS (CD95) responsabile dell'apoptosi dei linfociti.³

Tale studio venne ripreso nel 1995, quando venne considerato il caso di 3 bambini con caratteristiche immunologiche e cliniche che richiamavano quelle dei modelli murini: si dimostrò la presenza nel sangue periferico di numerosi linfociti T CD4/CD8 negativi esprimenti il CD3 e il T cell receptor alfa/beta (TCR).⁴ Questi studi suggerivano un ruolo dell'antigene Fas nella selezione negativa delle cellule T autoreattive responsabili della sintomatologia e indicavano che la malattia autoimmune potesse essere mediata da difetti nei geni coinvolti nell'apoptosi.⁵

Ulteriori studi dello stesso anno sull'eziologia hanno chiarito che, a differenza della lpr nella malattia murina, gli alleli Fas mutati erano eterozigoti nei pazienti affetti presi in considerazione e dimostravano un effetto dominante che interferiva con l'apoptosi.⁶ Oggi sappiamo che, nella maggior parte dei casi, nella patogenesi della ALPS gioca un ruolo principale la mutazione germinale eterozigote del gene codificante per la proteina Fas (70%).¹ ma, tra le causa secondarie, sono state riscontrate la mutazione somatica di FAS

(10%)⁷ e, più raramente, mutazioni al FAS-ligando e alla Caspasi 10 a cui bisogna aggiungere ulteriori difetti genetici non ancora identificati

È stato possibile quindi delineare il quadro di questa entità nosologica contraddistinta da due criteri diagnostici primari: la linfoproliferazione cronica e il riscontro dell'espansione dei Linfociti T “doppi negativi”. A questi elementi si accompagnano altri reperti di laboratorio tipici quali l'aumento dei livelli di interleuchina 10 (IL-10), interleuchina 8 (IL-8), vitamina B12, Fas-ligando solubile e immunoglobuline nel plasma.⁸

Abbiamo tuttavia pochi dati sull'incidenza della ALPS e la prevalenza di questa sindrome resta ancora poco conosciuta. Sebbene sia considerata una malattia rara attualmente è diagnosticata molto più frequentemente grazie all'aumento della consapevolezza di questo disordine da parte dei clinici e grazie ai significativi progressi fatti sulla comprensione della sua fisiopatologia che aprono la strada a possibili strategie terapeutiche.

Negli ultimi quindici anni, grazie ai miglioramenti nel campo delle tecnologie genomiche, si sono potute descrivere un certo numero di disordini linfoproliferativi e autoimmuni “Alps-like” che assomigliano clinicamente alla ALPS, ma che si distinguono da questi ultimi per la non totale aderenza ai criteri diagnostici delle ALPS.¹

2. FISIOPATOLOGIA

2.1 Apoptosi

Il meccanismo che risulta essere deficitario nella ALPS, in maniera totale o parziale, è quello dell'apoptosi, processo fondamentale per il controllo della proliferazione linfocitaria e per la tolleranza immunologica. Questa è una via di morte cellulare indotta da un programma suicida strettamente regolato, in cui le cellule destinate a morire attivano enzimi che degradano il DNA nucleare, le proteine nucleari e il citoplasma della cellula stessa. Il processo di apoptosi può essere suddiviso in una fase di inizio, in cui le caspasi si attivano cataliticamente, e in una fase effettrice, in cui altre caspasi innescano la degradazione di componenti cellulari fondamentali. Questa prima fase è mediata fundamentalmente dai segnali di due vie distinte: la via intrinseca, o mitocondriale, e la via estrinseca, innescata dai recettori di morte.

L'alterazione caratteristica nella sindrome ALPS riguarda la via estrinseca dell'apoptosi: questa via metabolica è innescata dal legame dei "recettori di morte", una famiglia di recettori del TNF contenenti un dominio citoplasmatico detto "dominio di morte", indispensabile per liberare segnali apoptotici, e sono presenti sulla membrana plasmatica di diversi tipi cellulari.

Tra i recettori di morte, i più importanti sono il recettore per il TNF di tipo 1 e una proteina correlata chiamata Fas (CD95) che si lega al Fas-ligando espresso da linfociti T in grado di riconoscere gli antigeni self e da alcuni T citotossici.

Una volta che Fas lega il suo ligando, tre o più molecole di Fas si aggregano tra loro, creando un sito di legame per una proteina adattatrice chiamata FADD che lega a sua volta la forma inattiva delle caspasi 8 e 10 (caspasi attivatrici) che scatenano una attivazione a cascata di caspasi tramite autoproteolisi, le quali, a loro volta, agiscono su altre caspasi dette effettrici (Caspasi 6 e 3) attivandole. Queste mediano la fase effettrice dell'apoptosi, clivando un inibitore delle DNasi, determinando l'attivazione enzimatica di quest'ultima che porta al clivaggio del DNA processo che porta rapidamente alla morte cellulare.⁹ (Figura 1)

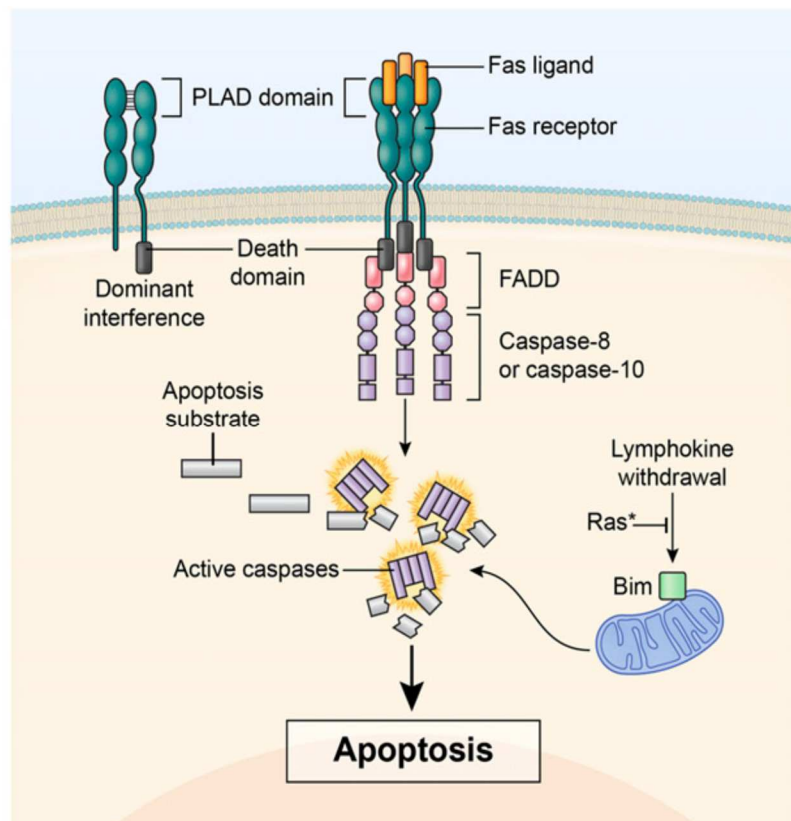


Figura 1. Pathway dell'apoptosi mediata da FAS¹⁰

Nella maggior parte degli individui si riscontrano con maggiore frequenza mutazioni eterozigoti a livello del recettore di Fas (CD95) che generano proteine Fas, spesso con deficienza dei domini di morte con impossibilità di legare la proteina segnale FADD: nonostante la presenza in eterozigosi, i linfociti nella ALPS presentano una diminuzione dell'associazione con FADD e una perdita del reclutamento delle caspasi.¹¹

Nonostante FAS sia stato identificato quindi come il gene critico nella sviluppo della malattia, la mutazione da sola sembrerebbe non essere sufficiente allo sviluppo della malattia, considerazione testimoniata da una grande variabilità nella clinica dei pazienti che possono essere anche asintomatici o avere una sintomatologia blanda.¹

Varie ipotesi suggeriscono che possono essere coinvolti altri geni così come fattori ambientali; oltre a ciò la penetranza del 70% della mutazione Fas eterozigote, suggerisce che possa essere necessario un “second hit” per dare inizio alla malattia.

Più di 70 differenti mutazioni sono state riscontrate in pazienti con ALPS, due terzi delle quali coinvolgono il dominio intracellulare e un terzo quello extracellulare: la maggior parte di queste sono rappresentate da inserzioni, sostituzioni o delezioni di una o due paia di basi nell'esone o siti splice del gene. Approssimativamente, la metà delle mutazioni risulta in una modificazione della sequenza amminoacidica mentre l'altra metà delle mutazioni causa un prematuro troncaggio della proteina.¹² La penetranza clinica è massima con la mutazione di ICD (dominio intracellulare) con mutazione missenso causando sintomi nel 90% contro le mutazioni di ECD (dominio extracellulare) che hanno una penetranza clinica del 30%. (Rieux-Lacat, 1999; Vaishnav, 1999)

Nonostante non sia ancora ben chiaro quale sia il meccanismo esatto per cui Mutazioni in Fas portino all'accumulo di DNTs, molteplici studi dimostrano che i DNTs si associano con iperattività di una chinasi mTOR (Target della Rapamicina nei mammiferi, un potente immunosoppressore) che stimola la captazione di sostanze nutritizie come glucosio e amminoacidi necessari per la crescita cellulare.⁹

2.2 La CASPASI 10

L'apoptosi è determinata quindi dall'attivazione di enzimi denominati "Caspasi", che prendono il loro nome per il fatto di essere delle cistein-proteasi che scindono le proteine tra i residui di cisteina e di acido aspartico. Come altre proteasi, le caspasi esistono sotto forma di proenzimi inattivi chiamati zimogeni che devono subire una scissione enzimatica per diventare attive.

Le Caspasi possono essere suddivise in attivatrici (caspasi 8, 9, 10) e effettrici (caspasi 3, 6 e 7) Quando un'attivata da un segnale di morte, le prime sono attivate e sono in grado di attivare le seconde tramite clivaggio proteolitico.¹³

Negli uomini due caspasi sono implicate nell'innescamento della via estrinseca: la caspasi 8 e la caspasi 10. Queste presentano un'elevata omologia nella sequenza proteica (del 46% identica nel dominio catalitico) e i loro geni sono nella stessa regione del cromosoma 2q33-34¹⁴ suggerendo che abbiano un antenato comune.¹⁵

Tuttavia, dal momento che la caspasi 10 è stata eliminata dal genoma di molti roditori, sono stati condotti pochi studi su di essa e per lungo tempo si è pensato che queste due caspasi fossero interscambiabili nella loro funzione; studi recenti, tuttavia, sembrerebbero smentire questa ipotesi, sebbene rimanga ancora aperta questa controversia nella letteratura medica¹³

Alcuni studi hanno dimostrato come i polimorfismi della caspasi 10 siano associati con la patogenesi di diversi tipi di neoplasia¹⁶: Shin e collaboratori (2002), tra i primi, osservarono come mutazioni inattivanti del gene della CASP10 potessero condurre alla patogenesi di alcuni linfomi non-Hodgkin in 17 casi su 117 (14.5%)¹⁷. Kim e collaboratori (2009) suggerirono la possibilità che una mutazione della caspasi 10 potesse contribuire alla patogenesi di alcuni tipi di leucemia linfoblastica acuta e mieloma multiplo, sebbene questa non fosse riferita come una mutazione troppo comune.¹⁸

Ulteriori studi ipotizzano un contributo importante anche nella patogenesi di alcuni carcinomi del colon (2/47; 4.3%)¹⁹, oltre che in alcuni tipi di carcinomi gastrici (4/26; 15%).

20

Lo studio di revisione e di metanalisi condotto da Yan e collaboratori (2012) confermarono il ruolo dei polimorfismi della CASP10 nella patogenesi di varie neoplasie e, in particolare, dimostrarono come l'allele rs13006529T fosse fortemente associato a questo rischio, in particolar modo, alla predisposizione al tumore al seno.¹⁶

Estremamente significativi sono stati gli studi compiuti a ridosso degli anni duemila relativi ad un ruolo dei difetti della caspasi 10 nella sindrome autoimmune linfoproliferativa: Wang e collaboratori (1999) dimostrarono la co-occorrenza di mutazioni di mutazioni alla CASP10 in due pazienti (una ragazza afroamericana di 11 anni e un ragazzo Ebreo-Ashkenazi di 10 anni presentanti sintomi quali linfadenomegalia ed epatosplenomegalia) associata a difetti dell'apoptosi e anomalie immunologiche.²¹

Questi risultati suggeriscono che anomalie non letali della caspasi causano difetti dell'apoptosi in soggetti affetti sindrome linfoproliferativa: questi risultati sono stato poi confermati da Shu e collaboratori (2006) che, analizzando 32 casi di ALPS che non avevano difetti legati a FAS, riscontrarono che due casi erano portatori della mutazione missenso I406L e L285F alla caspasi 10 che compromettono l'apoptosi.²²

Queste due mutazioni sono inequivocabilmente riconosciute come patogenetiche per ALPS.

Altre mutazioni riscontrate sono state la V410I and Y446C con una frequenza del 3,4% e 1,6% rispettivamente ma, a differenza delle precedenti, non agivano in maniera dominante negativa e anzi V410I aveva un effetto meno severo sull'apoptosi.²² Sebbene quindi in un primo momento V410I fosse stata affiancata a I406L e L285F come mutazione patogenetica, studi successivi la hanno declassificata come comune polimorfismo nella popolazione danese, essendo riscontrata nel 3-5% degli individui abitanti questa zona.²³ (**Figura 2.**)

Anche la mutazione Y446C, riscontrata in altri studi di soggetti con fenotipo ALPS (Dianzani e collaboratori, 1997; Ramenghi e collaboratori, 2000; Campagnoli e collaboratori, 2006; Zhu e collaboratori, 2006) è stata successivamente classificata come variante, essendo riscontrata nell'1-2% della popolazione caucasica.²⁴⁻²⁶ Similmente con quanto riscontrato nella mutazione V401I, questa mutazione è stata riscontrata in pazienti portatori di mutazione anche in Fas. Si ipotizza che l'effetto combinato di queste due alterazioni molecolari potrebbero contribuire al grado di severità della ALPS e che variazioni della caspasi 10 possano influenzare il fenotipo clinico dato da mutazioni di Fas.²⁷

Molto frequente all'interno della popolazione è la variante polimorfica I522L, la quale però si assocerebbe ad una ridotta capacità apoptotica cellulare e sembrerebbe avere un ruolo prognostico negativo.²⁸

Data l'importanza che queste varianti della caspasi 10 sembrano avere risulta cruciale chiarirne il ruolo nella clinica, specialmente considerando che sono coinvolte in una malattia,

i cui fenotipi potrebbero essere il risultato di più di una variazione genetica o epigenetica e le cui mutazioni hanno di per se una penetranza incompleta.²⁹

Per questo motivo è stato condotto uno studio nel 2019 da Miano e collaboratori che si è incaricato di valutare la funzione dell'apoptosi Fas-mediata in pazienti con un fenotipo ALPS-like portatore di varianti patogeniche e polimorfiche di CASP10: sono stati presi sei pazienti tra i 2-12 anni con clinica suggestiva di ALPS (n=2) o ALPS-like (n=4) e portatori in eterozigosi di mutazioni della caspasi-10 quali I406L (n=1), V410I (n=2), Y446C (n=1), L522I (n=2). Dopo aver indotto l'apoptosi (via Fas-L o TRIAL) si è analizzato la morte cellulare e l'attività della CASP10 che risultava diminuita a seguito di una diminuzione del clivaggio della caspasi 8 e della proteina PARP. Il risultato ultimo di questo studio mostra che tutte le varianti erano associate a un deficit dell'apoptosi Fas-mediata, a dispetto del fenotipo clinico e della patogenicità, e un ruolo nello sviluppo della disregolazione immunitaria.

Tuttavia, nonostante sia stato usato un panel abbastanza ampio che includeva 315 geni coinvolti in disordini ematologici, difetti e disregolazione immunitaria, non si possono escludere lesioni genetiche in geni non coperti e che, quindi, possano essere coinvolti fattori genetici ed epigenetici, contribuendo in tal modo a spiegare la penetranza incompleta e questa eterogeneità nel fenotipo.²⁹

Variant Classification	DNA Nucleotide Change	Predicted Protein Change	Refernces Sequences
Benigna	c.1228G>A	p.Val410Ile	NM_032977.3 NP_116759.2
Pathogenic	c.853C>T	p.Leu285Phe (Leu242Phe)	
	c.1216A>T	p.Ile406Leu (Ile363Leu)	
	c.1337A>G	p.Tyr446Cys	

Tabella 1: Varianti patogenetiche CASP10 selezionate ³⁰

2.3 Classificazione

La classificazione molecolare della ALPS si basa sulla mutazione genetica responsabile della malattia e ha subito nel corso degli anni numerosi cambiamenti: la classificazione storica si compone di 6 gruppi:

- ALPS di tipo 0: il paziente soddisfa i criteri diagnostici della ALPS conseguente a mutazioni omozigoti del gene FAS associati ad un severo deficit dell'apoptosi. I pazienti affetti da questa condizione sono caratterizzati da minima espressione di Fas sulle cellule T attivate. Questa forma di malattia, più severa, si manifesta in fase prenatale con linfoproliferazione, idrope fetale, infiltrati linfocitari polmonari e severa citopenia dalla nascita.¹²
- ALPS di tipo Ia: il paziente soddisfa i criteri diagnostici della ALPS conseguente a mutazioni eterozigoti del gene FAS associati ad un moderato deficit dell'apoptosi. La maggior parte dei pazienti ha questo tipo di alterazione (65-70%) con ereditarietà autosomica dominante a penetranza incompleta e, in una percentuale minore, un pattern recessivo. Il grado di inibizione dell'apoptosi è variabile, anche per stesse mutazioni in individui diversi.¹²
- ALPS di tipo Im: il paziente soddisfa i criteri diagnostici della ALPS conseguente a mutazioni somatiche del gene FAS associati ad un moderato deficit dell'apoptosi. Questa categoria è stata introdotta più recentemente dopo l'identificazione di un sottogruppo di pazienti con un fenotipo clinico ALPS-like e aumento dei linfociti T doppio negativi, ma normale apoptosi Fas-mediata. Questa categoria è caratterizzata da mutazioni somatiche delle cellule DNT e da mosaicismo dell'espressione del gene Fas, con alcune popolazioni di cellule esprimenti un gene Fas mutato e altre esprimenti un Fas wild-type.⁷
- ALPS di tipo Ib il paziente soddisfa i criteri diagnostici della ALPS conseguente a mutazione germinale del gene FAS-ligando in assenza di deficit dell'apoptosi Fas mediata. È stato descritto un singolo caso di questo tipo, riscontrato nello screening di un paziente con lupus eritematoso sistemico (LES) il quale non riscontrava aumento dei DNT e nessuna evidenza di citopenia. Il paziente era eterozigote per la mutazione, fatto che suggeriva un'alterazione dominante.³¹ È presente nel 15-20% dei casi.
- ALPS di tipo II: il paziente soddisfa i criteri diagnostici della ALPS conseguente a mutazione germinale di altri geni coinvolti nella via estrinseca dell'apoptosi quali

FADD, Caspasi-8 e Caspasi-10, associati ad un lieve-moderato deficit dell'apoptosi. È presente nel 3-6% dei casi.

Dei due casi di ALPS dovuti a mutazioni di CASP10 descritti, uno era in eterozigosi e uno in omozigosi (Wang e collaboratori, 1999)²¹. L'effetto dominante negativo della mutazione della caspasi 10 dimostra il ruolo centrale che questo enzima gioca nella via di segnalazione dell'apoptosi: ne inibisce l'autoattivazione, ma anche l'attivazione della caspasi 8. Chun e collaboratori (2002) descrissero due fratelli con mutazione in omozigosi della caspasi 8, caratterizzati, oltre che da linfoproliferazione, anche da ricorrenti infezioni da herpes virus, infezioni polmonari e risposte vaccinali ma non autoimmunità.³² Questo caso dimostra il ruolo dell'attivazione di questa caspasi nell'attivazione delle cellule T oltre alla segnalazione dell'apoptosi.¹²

- ALPS di tipo III: il paziente soddisfa i criteri diagnostici della ALPS il cui difetto genetico è tuttavia indeterminato, si associa ad un test dell'apoptosi normale. Rappresenta il 20% dei casi.

Dianzani e collaboratori descrissero una serie di pazienti con una clinica riconducibile alla ALPS con difetto della apoptosi Fas mediata, ma livelli normali di cellule DNT e assenza mutazioni di Fas o Fas ligando e si pensa ad un difetto successivo alla formazione di DISC. Questi pazienti presentano eterogeneità dei difetti funzionali con penetranza variabile, suggerendo un coinvolgimento multiplo del gene.

Nel 2009 è stata proposta una revisione di questa classificazione della ALPS da parte della National Institutes of Health (NIH): è stata abbandonata la nomenclatura numerata prediligendo sottolineare il difetto genetico sottostante. In questa maniera il tipo 0 e Ia sono stati uniti nel sottogruppo "ALPS-FAS", mentre le mutazioni somatiche di FAS rientrano nel sottogruppo "ALPS-sFAS" e quelle del FAS-ligando sono state rinominate "ALPS-FASLG". Infine la ALPS di tipo II e III sono state rinominate rispettivamente "ALPS-CASP10" e "ALPS-U".³³

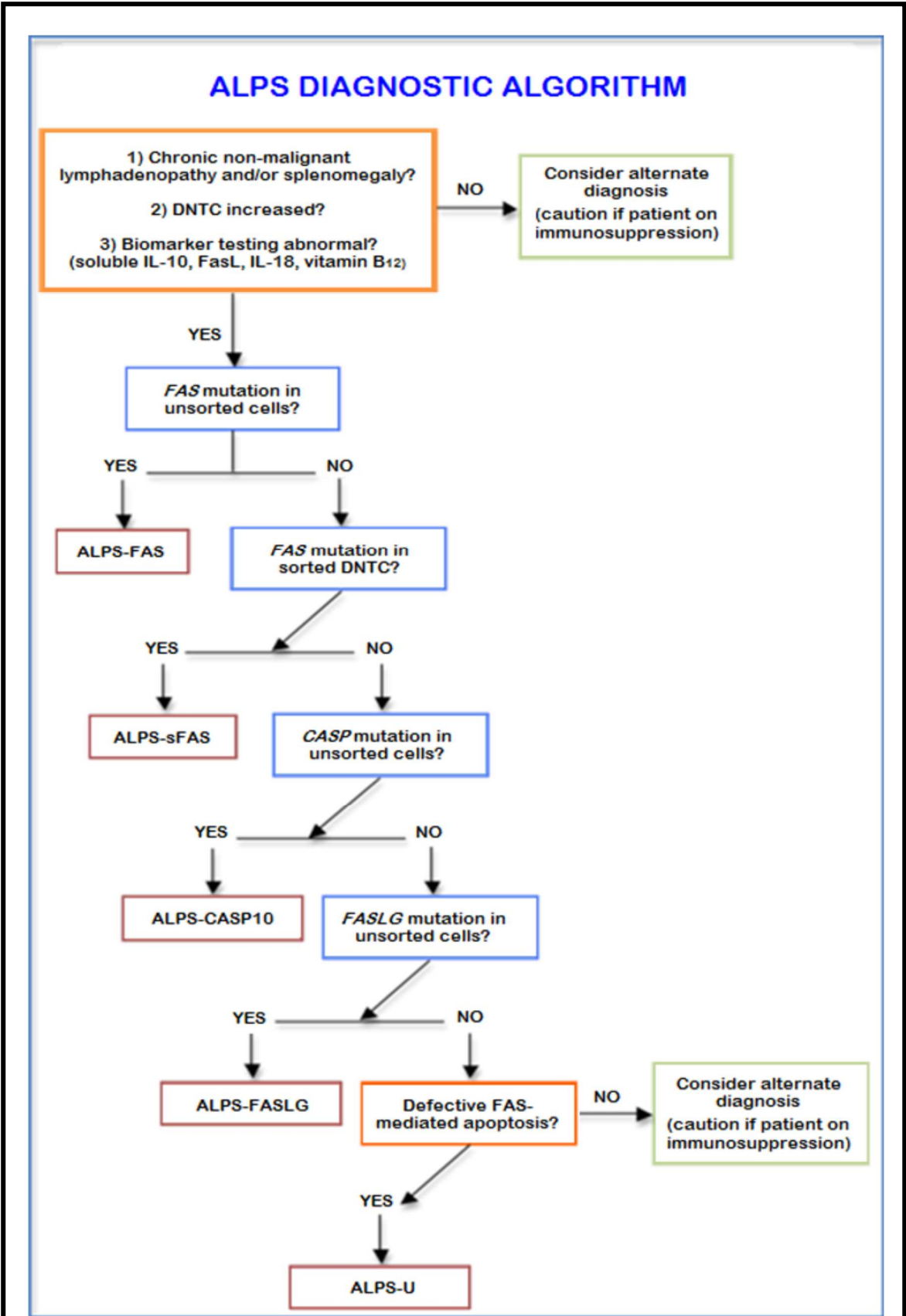


Figura 2. Algoritmo proposto per la valutazione diagnostica di un individuo con il sospetto di avere ALPS³⁰

3. CARATTERISTICHE CLINICHE E IMMUNOLOGICHE

3.1 Caratteristiche Cliniche

La ALPS presenta un ampio range di sintomi e variabilità nella definizione delle caratteristiche tra individui e sottotipi di ALPS. La prevalenza e la vera incidenza sono sconosciute, specialmente dato che molte istanze rimangono non diagnosticate: recenti studi dimostrano che potrebbe essere più comune di quanto precedentemente pensato, dando riconoscimento alla malattia con fenotipo più leggero e con inizio nell'adulto, dato che le manifestazioni più severe sono nel bambino e tendono a risolversi nell'adolescente e nell'adulto.¹

La linfoproliferazione è la più comune manifestazione in ALPS, la quale si presenta come linfadenopatia (>95%), splenomegalia (90-95%) e/o epatosplenomegalia (60%). Si sviluppa in genere in giovane età, in media a undici anni e mezzo, con una clinica che varia da lieve a severa, abbastanza da compromettere gli organi vitali. Successivamente tende a ridursi spontaneamente nella seconda decade di vita, anche senza trattamento³⁰

All'istologia è stata osservata iperplasia follicolare nel 76% e paracorticale nel 67% dei linfonodi con presenza di espansione dei linfociti doppio negativi confermata nel 41% dei campioni. Le dimensioni della milza sono di solito notevoli, aggirandosi in un range tra i 389 e i 1858 mL, senza tuttavia rottura splenica; occasionalmente si può riscontrare espansione della polpa rossa dovuta alla proliferazione T-cellulare, eritropoiesi extramidollare in pazienti con anemia, e grado moderato di iperplasia follicolare con aumento dei DNT e plasmocitosi policlonale.¹

La seconda manifestazione più comune è l'autoimmunità ed è più probabile richieda intervento medico: più del 70% dei pazienti sviluppa malattia autoimmune, più comunemente, citopenia immunomediata che può affettare gli eritrociti (anemia emolitica autoimmune), piastrine (trombocitopenia autoimmune) o neutrofili (neutropenia autoimmune). Il range di severità varia da anomalie di laboratorio asintomatiche alla distruzione cronica, severa, debilitante di multiple linee cellulari.³⁴

Altre forme di autoimmunità possibili sono la glomerulonefrite, l'epatite autoimmune, la gastrite, l'uveite ed iridociclite.³⁰

Altre manifestazioni molto meno frequenti e più rare sono la vasculite, l'orticaria, artriti e artralgie, ulcere orali ricorrenti, la panniculite, la colite, la fibrosi polmonare, l'idrope fetale e l'insufficienza ovarica prematura. Possono essere presenti sintomi simili a quelli presenti nel lupus eritematoso sistemico.³¹

Le complicanze neurologiche sono invece meno frequenti e sono principalmente episodi di cefalea, convulsioni o cambiamenti nello status mentale. Sono stati riportati anche casi di pazienti con complicanze neurologiche autoimmuni, tra cui atassia cerebellare con autoanticorpi positivi, mielite trasversa e Sindrome di Guillan-Barrè.³⁵

Inoltre è dimostrato che pazienti con ALPS abbiano un rischio aumentato di neoplasia secondaria, in particolar modo di linfoma non-Hodgkin (stimato intorno al 10-20%, specie nella ALPS con mutazione FAS), la cui identificazione risulta comunque complicata dal fatto che la sintomatologia della stessa ALPS ha le stesse caratteristiche cliniche del linfoma e anche l'imaging presenta limitazioni, dato che entrambe le patologie si presentano simili alla tomografia a emissione di positroni con fluorodeossiglucosio.³⁶

L'età della diagnosi di linfoma di Hodgkin e non Hodgkin si aggira tra i 5 e i 60 anni (con una media di 18 anni) e con un rapporto tra maschi e femmine di 14:4. I sintomi sono i classici della malattia: febbre, fatica, perdita di peso e perdita dell'appetito. Solo il 25% dei pazienti con ALPS presenta un linfoma con fenotipo severo. Una mutazione di FAS importante può conferire una maggiore propensione alla linfomagenesi.¹⁰

Altre patologie neoplastiche che si possono associare a questa patologia sono il carcinoma della tiroide, al seno, alla pelle, alla lingua e al fegato oltre a lesioni neoplastiche multiple quali gliomi e adenomi del seno o della tiroide.³⁰

3.2 Reperti di laboratorio.

Sebbene nessuna anormalità specifica di laboratorio, da sola, sia diagnostica di ALPS, il ritrovamento di determinati rilievi laboratoristici possono facilitare la diagnosi: tra questi ci sono l'assenza dell'apoptosi in vitro Fas mediata in vitro, l'espressione di linfociti T che esprimono recettori alfa/beta, ma deficitarie di CD4 e CD8, nel sangue periferico rinvenuti tramite citometria a flusso, e l'incremento dei livelli di alcuni biomarker specifici dell'ALPS quali IL-10, IL-18, FasL e vitamina B12.

L'emocromo presenta alcuni costanti quali linfocitosi, linfopenia (primaria o secondaria al trattamento), anemia emolitica Coombs positiva, diseritropoiesi, reticolocitosi, trombocitopenia, neutropenia, eosinofilia.

Altri reperti di laboratorio secondari riscontrabili nella ALPS sono:

- Espansioni dei Linfociti DNT gamma/delta, delle cellule T CD8/CD57, dei linfociti T HLA-DR+ e delle cellule B CD5+.
- Diminuzione del numero di linfociti T CD4/CD25 e dei linfociti B CD27+.
- Aumento concentrazione delle interleuchine 10 e 18 nel siero e nel plasma.
- Aumento della concentrazione di IgG, IgA, IgE con possibile diminuzione delle IgM.
- Autoanticorpi (positivi a test dell'antiglobulina): anticorpi antiplastrine, antineutrofili, antifosfolipidi, antinucleo e fattore reumatoide.
- Patologia dei linfonodi (espansione paracorticale con immunoblasti o plasmacellule e cellule DNT in aree interfollicolari, iperplasia follicolare florida, trasformazione progressiva dei centri germinativi).
- Incremento del CD25, CD27, CD30 e Fas ligando.
- Gammopatia monoclonale.
- Diminuzione della risposta anticorpale agli antigeni polisaccaridi.
- Anormalità funzione epatica (in caso di epatite autoimmune).
- Proteinuria (in caso di glomerulonefrite).
- Elevate concentrazioni sieriche di vitamina B12

Valori che si mantengono normali sono la funzione dei neutrofili, dei linfociti NK e dei T citotossici, oltre che essere presente una normale concentrazione e funzione del complemento; si mantiene la risposta anticorpale verso gli antigeni proteici.

3.3 Caratteristiche Immunologiche

a) DNT

I pazienti con ALPS possono avere linfocitosi che affetta cellule T e B (totali e CD5+) ma non cellule Natural Killer; sebbene siano aumenti in numero assoluto sia le cellule B che T, sono in particolare queste ultime le maggiori responsabili della pronunciata linfoproliferazione, nella loro variante doppio negativa (DNT)¹

Queste sono cellule T mature post timiche che esprimono un recettore CD3/TCR α/β ma che difettano dei corecettori CD4 e CD8, tuttavia si differenziano da altre cellule doppio negative con recettori TCR, presenti anche in altre condizioni. Si pensa che siano delle cellule T senescenti, che abbiano perso i recettori CD4/8 ed esprimono anche CD57+, CD27+, HLA-DR e l'isoforma CD45R B220 tipica dei linfociti B. Ci può essere una espansione dei linfociti CD8+ CD57+, ma non dei CD4+ CD25+; mentre l'espansione delle HLA-DR è aumentata.³⁷

Nel paziente sano le DNT rappresentano meno dell'1% dei linfociti periferici (<18 cellule/mL³) mentre nella ALPS possono arrivare a rappresentare il 40%, oltre a presentarsi nel sangue periferico in malattie autoimmuni come il LES, connettivite mista e artrite idiopatica giovanile.³⁸

Nella ALPS, a differenza delle precedenti, l'elevazione dei DNT è maggiore del 3% dei linfociti totali (o del 5% dei linfociti T), rendendolo un elemento patognomico di questa sindrome (anche se in seguito questo valore è stato riscontrato anche in forme ALPS-like); anche se rimane ancora una incognita la sua correlazione con la severità della malattia.³³

b) LINFOCITI B

Il ruolo di FAS nella selezione delle cellule B umane e nello sviluppo dell'autoimmunità in pazienti portatori di mutazioni FAS è poco chiaro.

Studi condotti da Janda e collaboratori (2016) hanno dimostrato che in pazienti con sindrome linfoproliferativa autoimmune mostravano un accumulo di linfociti B FAS-mutati, un mancato arricchimento dei singoli geni V, D, J e delle combinazioni V-D, D-J della regione variabile del recettore delle cellule B oltre che ad un aumento della frequenza delle regioni

variabili con un alto contenuto di amminoacidi; hanno inoltre un CDR3 più lungo e caratteristiche polireattive.³⁹

In linea con un modello proposto da Goodnow, i linfociti B con Fas deficitario rappresenterebbe il primo evento nella rottura della tolleranza e, l'aggiunta di eventi successivi, sono necessari per la manifestazione della malattia autoimmune.⁴⁰

Sembrerebbe quindi dimostrabile il ruolo di Fas nella prevenzione della comparsa di cellule B del centro germinativo con aberrazioni genomiche e nell'assicurare la trasformazione in cellule B memoria e plasmacellule; mentre il suo difetto porterebbe alla formazione di cellule B autoreattive in ALPS, suggerendo un possibile approccio terapeutico indirizzato contro le plasmacellule, insensibili al trattamento con Rituximab, con effetto benefico.^{30,39}

c) EOSINOFILIA

In uno studio che ha preso in esame 158 pazienti con ALPS e i loro parenti condotto da Kim e collaboratori (2007), sono stati comparati pazienti con eosinofilia e non. L'anormale meccanismo di apoptosi eosinofila Fas-mediata determina un incremento della produzione di citochine eosinofiloipoietica, ed è stata esplorata anche la presenza di autoanticorpi anti-eosinofili. In 68 pazienti presentanti elevata e persistente eosinofilia, associata con aumentato numero di leucociti nel sangue periferico di multiple linee e un trend di aumento dei livelli sierici di IgE. Si è dimostrato che i pazienti con ALPS ed eosinofilia avevano un significativo aumento del rischio di morte per infezioni complicate. Nonostante rimanga ancora incognita l'eziologia dell'eosinofilia, in questi pazienti non sembra essere associata ad un alterazione del profilo delle citochine sieriche, ad un aumento della sopravvivenza in risposta a IL-5, alla apoptosi eosinofila FAS-mediata deficitaria o agli anticorpi anti-eosinofili.⁴¹

d) IL-10

L'interleuchina 10 è una citochina antinfiammatoria., il cui ruolo è quello di inibire la sintesi di altre citochine pro-infiammatorie quali IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF-alfa e GM-CSF, prodotte da macrofagi e linfociti T helper classe 1.

Studi compiuti da Strauss e collaboratori (1997) registrarono un aumento della quantità di interleuchina 10 nel sangue periferico in diversi pazienti con ALPS: indagando l'origine di questo valore biochimico alterato, si riscontrò che i livelli di IL-10 prodotto dai linfociti erano diminuiti ma, al contrario, quelli prodotti dai monociti e dai macrofagi risultarono aumentati.⁴²

Studi successivi hanno rivalutato tuttavia il ruolo dei DNT nella produzione di questa interleuchina, in particolare quelli localizzati in abbondanza nella milza e nelle aree perifollicolari del linfonodo, fatto supportato considerando che sia la popolazione dei macrofagi sia quella dei linfociti DNT sono molto espanse in pazienti con ALPS.⁴³

I valori nel siero di queste interleuchine si aggirano su valori da 10 a 1000 pg/mL (con una media di 166 pg/mL, contro valori normali di 3.4pg/mL).⁴³ Simili rialzi di valori aumentati sono stati riscontrati anche in modelli murini.⁴²

Sebbene rimanga ancora incerta l'eziologia di questo aumento, sembrerebbe giocare un ruolo importante nello sviluppo dell'autoimmunità associata ad ALPS dato che, un aumento dei valori di IL-10 sono stati trovati anche nell'artrite reumatoide e postulati nel Lupus eritematoso sistemico.⁴⁴

Valori elevati di IL-10 si associano ad aumento della sopravvivenza delle cellule B con conseguente produzione di anticorpi e ciò suggerisce che questa interleuchina giochi un ruolo come cofattore nell'espressione della sindrome.

La teoria più accreditata è che piuttosto che coinvolgere una singola popolazione cellulare, IL-10 giochi un ruolo nell'alterare l'equilibrio tra Th1 e Th2 in pazienti con ALPS: più nello specifico IL-10 antagonizza lo sviluppo di Th1 e indirettamente stimola lo sviluppo di Th2, che a sua volta stimola la produzione anticorpale da parte dei linfociti B.

Oltre a ciò, IL-10 stimola direttamente la proteina Bcl2, con funzione anti-apoptotica nei linfociti B e T. Questo difetto dell'apoptosi non può essere associato alla sola mutazione di Fas, dato che valori simili di IL-10 sono stati riscontrati anche in ALPS di tipo III, dove Fas non è alterato. Inoltre, sembrerebbe che la disregolazione di IL-10 possa giocare un ruolo importante nell'espressione clinica delle ALPS in individui con difetto extracellulare di Fas, suggerendo un contributo alla patogenesi della sindrome.⁴³

e) IL-18

Studi condotti da Esfandiari e collaboratori (2001) hanno mostrato che l'interleuchina 18 possedeva un ruolo nell'accelerare i sintomi lupus autoimmune spontaneo, agendo in sinergia con l'azione dell'interleuchina 12 e promuovendo lo sviluppo dei linfociti in senso Th1⁴⁵

Il-18 è una citochina pro-infiammatoria che gioca un ruolo importante nella regolazione della risposta immunitaria innata e specifica ed è prodotto soprattutto da macrofagi e monociti indipendentemente da IL-12. La sua espressione è aumentata in malattie infiammatorie croniche (in particolar modo quelle intestinali e nelle artriti), in infezioni ed è coinvolto in numerose malattie autoimmuni, come ad esempio il LES, e iniezioni di questa interleuchina in associazione o meno con IL-12 hanno dimostrato uno sviluppo dei sintomi classici del Lupus.⁴⁶

Il meccanismo sembrerebbe una induzione della produzione di TNF e interferone, contribuendo ad una attivazione delle cellule T nella risposta infiammatoria cronica: attiva insieme a IL-12 la risposta TH1 e, in contrasto, da solo attiva la risposta Th2.

Questi studi suggeriscono che IL-18 è un potenziale importante target per la terapia dell'autoimmunità spontanea.

Valori elevati di IL-18 sono stati riscontrati anche nella ALPS, specie nel tipo Ia e Is con valori prossimi a 1000 pg/ml e 1500 pg/mL rispettivamente; valori maggiori più moderati sono riscontrabili anche in ALPS III.⁴⁷

f) VITAMINA B12

La cobalabina (o vitamina B12) è un micronutriente essenziale che gioca un ruolo fondamentale nella divisione cellulare. (valore di riferimento: 450ng/L). All'interno del siero può trovarsi legato sia alla transcobalamina che all'aptocorrina. Queste proteine circolano nel sangue parzialmente saturate con B12: la transcobalamina, legata a B12, costituisce 20% della B12 circolante, mentre l'aptocorrina lega 80-94% della B12 endogena.

In uno studio condotto da Raffick e collaboratori (2012) riscontrarono un aumento della B12 in pazienti con ALPS, associato a livelli normali della transcobalamina e livelli elevati di aptocorrina (fino a 15 volte i valori normali), dovuta all'aumento dei linfociti circolanti che

la rilasciano: quando l'aptocorrina è rilasciata da queste cellule si lega alla B12 rilasciata dai tessuti e dal pool granulocitario. Rimane ancora sconosciuto se la concentrazione di aptocorrina abbia un valore prognostico.⁴⁸

L'aumento della vitamina B12 può raggiungere valori compresi tra 2259 ng/L e 1635 ng/L in pazienti con ALPS tipi Ia e Is, e valori più modesti (759 ng/L) in pazienti con ALPS tipo III.⁴⁷

g) FAS LIGANDO

Il Fas-ligando è una proteina transmembrana, appartenente alla famiglia del TNF, che viene espressa soprattutto nei linfociti T (valori normali: 104 pg/mL)⁹

Tutti i pazienti portatori di mutazione al gene Fas presentano un aumento del valore della concentrazione del ligando per Fas (Fas-L) e, allo stesso modo, si riscontra un aumento simile in pazienti ALPS-like. I valori sono > 200 pg/mL con una media di 1114 pg/mL in ALPS di tipo Ia e 1329 mg/mL in ALPS di tipo Is. Valori meno elevati, ma comunque rialzati, sono presenti in ALPS di tipo III ma sempre < 200 pg/mL e questo sembra essere un buon biomarker per escludere la diagnosi di ALPS associata a mutazione di FAS.⁴⁷

Il trattamento con regime immunosoppressivo determina una rapida caduta dei valori di Fas-L.

4 DIAGNOSI

4.1 Criteri Diagnostici

Essendo la ALPS una patologia con una espressione clinica altamente eterogenea, la diagnosi viene condotta sulla base dell'osservazione clinica e i reperti di laboratorio.¹

Fino al 2010 la diagnosi di ALPS richiedeva la presenza di 3 criteri mandatori:³³

- Linfoproliferazione cronica non maligna
- Elevati valori di linfociti doppio negativi nel sangue periferico
- Deficit dell'apoptosi in vitro Fas-mediata

La linfoproliferazione deve essere cronica, di durata maggiore di 6 mesi, affetta due regioni linfonodali (con o senza splenomegalia) escludendo eziologia infettiva o neoplastica. I linfociti doppio negativi risultano più del 1,5% dei linfociti totali e più del 2,5% dei linfociti T.¹

Tuttora i primi due criteri rimangono validi mentre il terzo è stato integrato ad una serie di nuovi criteri "accessori" classificati in primari e secondari. Tra i criteri primari abbiamo:³³

- Deficit dell'apoptosi in vitro Fas-mediata
- Mutazione somatica o germinale in FAS, FASL, CASP10

Tra i criteri accessori secondari abbiamo invece:

- Elevazione valore dei biomarkers:
 - sFasI > 200 pg/mL
 - IL-10 > 20 pg/mL
 - Vit B12 > 1500 ng/L
 - Plasma IL-18 > 550pg/ml
- Reperti immunoistologici tipici
- Citopenia autoimmune e ipergammaglobulinemia policlonale
- Storia familiare di ALPS linfoproliferazione non maligna

Per la diagnosi "definitiva" è necessario avere entrambi i criteri principali e almeno uno tra gli accessori primari mentre la diagnosi diventa "probabile" se ci sono almeno due criteri principali e uno accessorio secondario. Il consenso del NIH (National Institute of Health) prevede tuttavia che questa distinzione non si applichi al trattamento.³⁵

4.2 Diagnosi Differenziale

Pazienti con ALPS hanno un fenotipo eterogeneo con reperti clinici che si sovrappongono con condizioni reumatologiche (quali ad esempio il Lupus eritematoso sistemico, l'artrite reumatoide e la sindrome di Felty) autoimmuni, neoplastiche e infettive: tra le queste patologie sono da considerare per la diagnosi differenziale certamente l'infezione da Epstein-Barr, Citomegalovirus, Tubercolosi, Toxoplasmosi, Epatite C e l'HIV.

Da considerare nella diagnostica differenziale anche la possibilità di una espansione dei centri germinali, forme di leucemie e linfomi (in particolare quest'ultimi possono essere scambiati per una ALPS all'imaging con TC e PET).

Diversi disordini linfoproliferativi tra cui la malattia di Castleman, la malattia di Rosai-Dorfman, la malattia linfoproliferativa X-linked (XLP), la malattia linfoproliferativa autoimmune di Danzani (DALD), la malattia di Kikuchi-Fujimoto, la sindrome da deficit Caspasi 8 (CEDS) e il disordine leucoproliferativo RAS-associato (RALD), presentano caratteristiche cliniche simile alla ALPS.³⁵

La CEDS era un tempo classificata come ALPS per le simili funzioni della caspasi 8 e 10: entrambe presentano linfadenopatia e deficit apoptosi Fas mediata, ma la CEDS presenta deficit di apoptosi dei linfociti B, T e NK e una predisposizione a infezione da Herpes virus.

Un altro fatto da considerare è che molti pazienti con citopenia autoimmune (riscontrata comunemente nel 70% delle ALPS) non soddisfano gli altri criteri per essere rientrare nella definizione di ALPS definitiva o probabile. Questi pazienti sono stati pertanto classificati come ALPS-like qualora presentassero, oltre la citopenia autoimmune, entrambi i criteri mandatori, senza tuttavia presentare criteri accessori o che presentassero almeno uno dei criteri principali o un criterio accessorio primario per ALPS.⁴⁹

Secondo uno studio condotto su 90 pazienti da Palmisani e collaboratori, la clinica delle forme ALPS-like (ARS) si caratterizza per una maggiore presenza di citopenia, solitamente di una sola linea cellulare, in particolare Trombocitopenia autoimmune (ITP), mentre sono più frequentemente riscontrate nelle forme ALPS casi di linfadenopatia, splenomegalia, aumento dei DNT, presenza di sintomi extra-ematologici, markers di positività autoimmune e aumento della vitamina B12. Entrambe le forme mostrano una simile refrattarietà al

trattamento con steroideo e con immunoglobuline rispetto alle ITP classiche o alle citopenie idiopatiche⁴⁹

4.3 Trattamento

Il trattamento della ALPS si concretizza nel trattamento delle manifestazioni e delle complicanze, in particolar modo la linfoproliferazione e la citopenia autoimmune. L'unica cura conosciuta è il trapianto di cellule staminali emopoietiche ma, a causa dei rischi associati con questa tecnica è riservata solo ai casi clinici più severi che sono refrattari alla immunosoppressione. Inoltre, la maggior parte dei pazienti con ALPS possono vivere una vita normale, senza la necessità di trapianto.¹

A. SORVEGLIANZA

Consiste in controlli periodici di milza e linfonodi basandosi sul controllo delle loro dimensioni tramite esame obiettivo e imaging, oltre che al controllo dei sintomi e dei reperti di laboratorio.

Nonostante le linfadenopatie siano massive e spesso visibili nei bambini e possano portare ad ansietà ed ostracismo sociale, il trattamento non è specificatamente indirizzato a diminuirne la dimensione per motivi estetici: è importante attuare una sorveglianza sanitaria in questi pazienti con una particolare attenzione al cambiamento di dimensione dei linfonodi, linfadenopatia generalizzata o splenomegalia ingravescente. Per la valutazione dei linfonodi può essere eseguita una TC del collo, del torace, dell'addome e della pelvi.⁵⁰

Clinicamente la milza è controllabile palpando il margine inferiore sotto il margine costale e tramite l'imaging con la TC.

B. PRIMA LINEA DI TRATTAMENTO

Il trattamento iniziale dei pazienti con citopenia autoimmune correlata alla ALPS prevede l'immunosoppressione con uso di corticosteroidi, in particolare metilprednisone ad alte dosi per via endovenosa (5-10 mg/kg) seguita da una dose di prednisone (1-2 mg/kg) come terapia

di mantenimento per 8-12 settimane. In caso di citopenie altamente refrattarie, si può usare metilprednisone con dosaggio 30 mg/kg per 1-3 giorni.⁵⁰

Bisogna tuttavia tenere a mente le comorbidità a breve termine (quali ipertensione, iperglicemia, irritabilità e perdita di peso) e lungo termine quali habitus Cushingoide, ipertensione, cataratta, ipoglicemia, osteopenia e necrosi avascolare dell'anca.⁵¹

Farmaci immunosoppressori quali azatioprine e ciclosporine si sono rivelati inutili nei pazienti affetti da ALPS.

L'utilizzo di immunoglobuline G intravenose (1-2 mg/kg) in concomitanza con metilprednisone può portare beneficio ad alcuni pazienti con anemia emolitica autoimmune severa, al fine di impedire la distruzione dei globuli rossi e permettere la trasfusione di globuli rossi come supporto dell'anemia severa. È meno efficace ed ha una risposta minore del corticosteroide, ad eccezione che nel trattamento della trombocitopenia autoimmune; hanno un'azione rapida e sono ben tollerati.⁵¹

Per i pazienti ALPS con neutropenia isolata e infezioni associate usiamo una bassa dose (1-2 ug/kg) di G-CSF sottocute 2-3 volte a settimana.⁵⁰

C. SECONDA LINEA DI TRATTAMENTO

Prima di iniziare il trattamento di seconda linea bisognerebbe prendere in considerazione il rapporto tra rischi e benefici per ogni singolo paziente con ALPS, dato che consiste in un'esposizione per lungo tempo ad un regime di immunosoppressione per garantire la remissione della citopenia.¹

Il principale trattamento di seconda linea è costituito dal micofenilato mofetile, il cui uso è stato descritto nel 2005 da Allison e collaboratori. Si tratta di un profarmaco derivato dall'acido micofenolico (MPA), un inibitore della inosina-5-monofosfato deidrogenasi (IMP): MPA agisce tramite una deplezione del nucleotide della guanosina nei linfociti T e B che sono quindi costretti a fabbricare de novo le purine, inibendo la loro proliferazione e quindi inibendo la risposta cellulare immuno-mediata. MPA inibisce anche la glicosilazione e l'espressione di molecole di adesione, oltre che il reclutamento dei linfociti e monociti nel sito di infiammazione. Inoltre MPA è anche responsabile della deplezione della

tetraidrobipterina e diminuisce la produzione di ossido nitrico da parte della NO sintetasi che, insieme al meccanismo precedente, porta ad una azione antinfiammatoria.⁵²

Viene dato con dosaggio di 600mg/m² per via orale almeno due volte al giorno ed è utile specie per citopenie croniche, dato che è stato dimostrato abbia efficacia nel mantenere una buona conta eritrocitaria e che possa evitare l'uso prolungato dello steroide in pazienti citopenici a fronte di alcuni effetti collaterali infettivi (specie la correlazione con il rischio di infezione erpetica) e gastrointestinali.⁵³

Altro farmaco utilizzato è la Rapamicina (Sirolimus) un inibitore mTOR introdotto in tempi recenti da Teachey e collaboratori. Molti pazienti mostrano una buona risposta a questo farmaco riuscendo a raggiungere una buona quota di eritrociti. Il secondo vantaggio è che, a differenza del farmaco precedente, la Rapamicina riduce la linfoproliferazione portando ad una diminuzione dei linfociti doppio negativi e ad una riduzione della dimensione dei linfonodi e della milza. Tuttavia anche in questo caso è necessario mantenere per lungo tempo la terapia e assicurare un controllo a lungo termine della funzionalità renale ed epatica, oltre che degli effetti collaterali tra i quali immunosoppressione delle cellule T, ipercolesterolemia e stomatite.⁵⁴

Si usa una dose di attacco di 3 mg/m², seguita da 2,5 mg/m² al giorno per via orale fino a raggiungere un valore costante plasmatico di 5-15 ng/mL, che dovrebbe essere controllato periodicamente due volte a settimane, fino a che si stabilizzi per poi continuare con dosaggio mensile.

È stata utilizzata una dose standard di Rituximab (375 mg/m² a settimana per 4 volte) per il trattamento di citopenia cronica e refrattaria in un campione di bambini con ALPS e trombocitopenia con buoni risultati, ma con scarsa risposta in pazienti con anemia emolitica autoimmune. Importante reazione avversa a questo farmaco è l'ipogammaglobulinemia prolungata.⁵⁵

4.4 PREVENZIONE DELLE MANIFESTAZIONI PRIMARIE E SECONDARIE

➤ *SPLENECTOMIA*

Molti pazienti hanno subito splenectomia come trattamento delle citopenie croniche e refrattarie al trattamento, prima della diagnosi di ALPS. Non porta di solito ad una remissione totale dell'autoimmunità e si associa ad un aumentato rischio di infezione: studi hanno dimostrato un maggior rischio di ricaduta delle citopenie (56%) e devono essere monitorizzati per il rischio di setticemia (29%): infatti, questi pazienti hanno una vulnerabilità maggiore per la minore presenza di cellule B circolanti CD27+ e perciò si dovrebbe porre una terapia antibiotica profilattica a lungo termine con Penicillina V o fluorochinoloni, come la Levofloxacina, accompagnata da sorveglianza sanitaria e re-immunizzazione contro i pneumococchi ogni 4-5 anni. Anche per queste motivazioni, la splenectomia dovrebbe essere evitata se non in caso di gravi citopenie croniche e refrattarie.

56

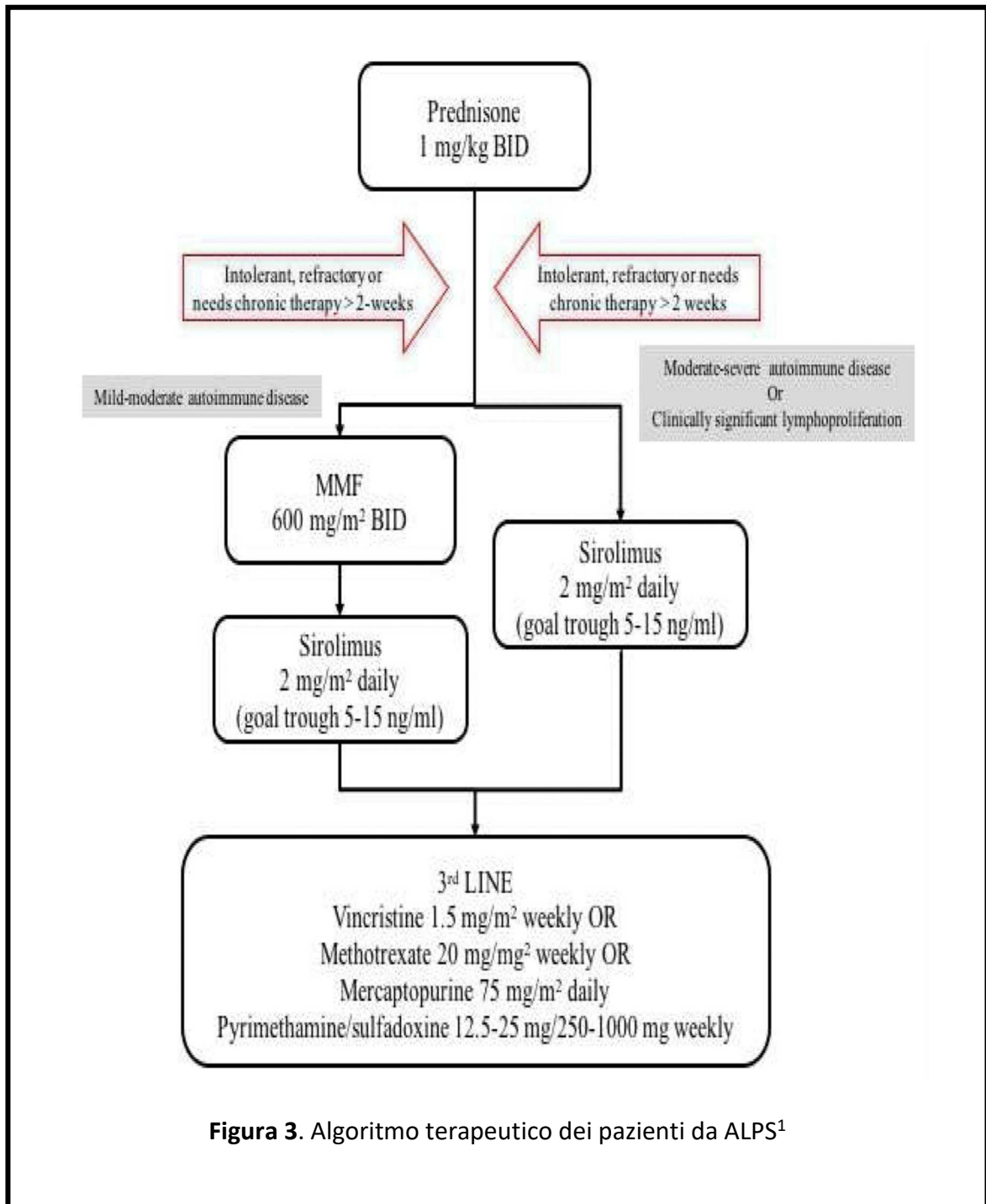
La vaccinazione pre-splenectomia e la profilassi con penicillina sono fortemente raccomandati per tutti coloro che devono subire splenectomia come forma di prevenzione delle complicazioni secondarie, anche se non assicura la totale copertura dal rischio di sepsi.³⁰

➤ *RUOLO DEL TRAPIANTO*

Il trapianto di midollo osseo (BMT/HSCT) è attualmente l'unico trattamento curativo per la ALPS. Dato il rischio associato con questa procedura, si tende a eseguirla in pazienti con un fenotipo clinico severo di ALPS, come la forma omozigote o varianti patogenetiche eterozigoti con citopenia refrattaria, linfoma o con conseguenze a lungo termine della terapia immunosoppressiva.⁵⁷

La prognosi a breve e a lungo termine dei pazienti con ALPS è generalmente buona e la sintomatologia è responsiva al trattamento nella maggioranza dei casi: di conseguenza la necessità di un trapianto allogenico di cellule ematopoietiche (HSCT) è estremamente rara. Tuttavia questo trattamento si è rilevato utile nei pazienti con ALPS che hanno sviluppato

un linfoma, poliartrite nodosa o fenotipo severo con mutazione FAS omozigote e citopenia refrattaria.⁵⁸



4.5 COUNSELING GENETICO

Il counseling genetico è il processo che consiste nel dare al paziente e ai familiari le informazioni sulla natura, ereditabilità e le implicazioni dei disordini genetici. È possibile effettuare test genetici molecolari ai membri della famiglia asintomatici per varianti patogenetiche di FAS, FASLG o CASP10 una volta che sono state dimostrate nel probando.

L'ereditarietà di ALPS-CASP10, ALPS-FAS e alcuni casi di ALPS-FAS ligando sono autosomiche dominanti, mentre la maggior parte delle ALPS-FASLG sono autosomiche recessive.³⁰

Bisogna fare un distinguo tra la penetranza del fenotipo cellulare e quella del fenotipo clinico: la penetranza per il fenotipo cellulare dato dal difetto dell'apoptosi Fas-mediata si avvicina al 100%, mentre la penetranza del fenotipo clinico è minore dato che parenti eterozigoti per la malattia possono non avere manifestazioni cliniche; i reperti laboratoristici di ALPS possono essere presenti anche senza una clinica evidente.^{59,60}

I fattori che determinano la penetranza clinica delle ALPS non sono ben compresi ma sembrano essere legati alla tipologia e localizzazione della variante patogenetica. La penetranza più alta si osserva per mutazioni missenso che riguardano il dominio intracellulare (ICD), mentre quelle che affettano il dominio extracellulare hanno una penetranza stimata al massimo del 30% (Jackson e collaboratori, 1999).⁵⁹ Recenti studi sembrano dimostrare che la malattia si sviluppi come conseguenza di una variante patogenetica eterozigote e di una mutazione somatica nel secondo allele FAS (missenso o non-senso).⁶¹

I pazienti affetti da una ALPS a trasmissione autosomica dominante hanno molto probabilmente un genitore con una variante patogenetica, anche se magari non ne manifestano la clinica; mentre i dati relativi ad ALPS-FASLG e ALPS-CASP10 sono ancora insufficienti. Le percentuali di casi con una mutazione "de novo" è piuttosto rara.

Se il genitore del paziente affetto ha una variante patogenetica, ogni fratello ha il 50% di probabilità di ereditarla; allo stesso modo ogni figlio di un genitore con ALPS ha il 50% di trasmettere la variante patogenetica; tuttavia la probabilità di sviluppare complicanze nei due casi dipende dalla natura della variante.

Invece i genitori di pazienti con ALPS-FAS o ALPS-FASGL dovute a variante patogenetiche bialleliche sono probabilmente eterozigoti per la variante patogenetica; ogni

fratello di un paziente con ALPS-FAS o ALPS-FASLG ha il 50% possibilità di avere una variante patogenetica (che può risultare in manifestazioni cliniche) e il 25% di ereditarle entrambe, situazione che porta all'espressione di un fenotipo severo. Individui con ALPS data da varianti patogenetiche bialleliche hanno una maggiore probabilità di exitus in giovane età.

5. SCOPO DELLO STUDIO

Il presente studio ha lo scopo di valutare le caratteristiche cliniche e immunologiche di pazienti portatori di mutazioni o polimorfismi associati a deficit di apoptosi del gene CASP10 e di validare la patogenicità delle varianti di significato incerto. Lo studio ha inoltre l'obiettivo secondario dello studio di valutare eventuali differenze tra cliniche e immunologiche tra i portatori di mutazioni e di polimorfismi.

6. MATERIALI E METODI

Previa raccolta del consenso informato dei pazienti (in accordo alla dichiarazione di Helsinki del 1964), sono stati studiati i dati clinici di 30 pazienti con ALPS o evidenza clinica di una malattia ALPS-like portatori di una mutazione a livello del gene della CASP10 presenti nel Registro Italiano ALPS e Malattie Correlate (ALPS.IT.NET) del Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica.

La raccolta dei dati si è incentrata sulla ricerca dei seguenti parametri:

- Anagrafica dei pazienti e anamnesi familiare per patologie linfoproliferative.
- Positività o meno al test dell'apoptosi effettuato su due diversi campioni di sangue fresco: il test è stato indotto tramite l'uso di FAS-Ligando (10 ng/ml) o TRAIL (100 ng/ml) per 24 ore e successiva analisi fluorocitometrica.
- Emocromocitometria e presenza di deficit ematologici quali citopenia autoimmune, leucopenia, anemia emolitica, trombocitopenia.
- Sintomi clinici quali linfoproliferazione cronica maggiore di 6 mesi, linfadenopatia e splenomegalia data dalle indagini radiologiche ed ecografiche, e altri sintomi quali febbre, astenia, artralgie e dolore addominale.
- Sottopopolazioni linfocitarie
- Dosaggio Immunoglobuline sieriche
- Bio-markers di ALPS: vitamina B12, IL-10, IL18, FAS-ligando.
- Markers di autoimmunità: test di Coombs, presenza di anticorpi ANA, ENA, ASA, anticorpi anti-gliadina, anti-SML, anti-Gad, IA2 e IAA.

6.1 Test Genetici

Le analisi genetiche sono state eseguite tramite l'utilizzo del metodo Sanger e della Next Generations Sequencing (NGS).

Ideato da Friederick Sanger nel 1977, il sequenziamento di Sanger consiste nell'utilizzo dell'enzima della DNA polimerasi purificata per sintetizzare catene del DNA di varia lunghezza. La caratteristica chiave di questo metodo è l'utilizzo del deossiribonucleotide trifosfato (ddNTP) per interrompere la reazione di sintesi in specifiche posizioni con la conseguente produzione di un numero di frammenti del DNA di varia lunghezza. Ciò è possibile per il fatto che i ddNTP deficitano del gruppo OH in posizione 3, essenziale per formare il legame fosfodiesterico tra un nucleotide e quello successivo durante la sintesi del DNA. Affinchè avvenga questo processo è necessario l'uso, oltre dell'enzima polimerasi, anche di un Primer specifico per far partire la reazione e i quattro deossiribonucleotidi (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

Questi frammenti ottenuti sono successivamente legati ad un marcatore fluorescente di colore diverso per ciascuna delle basi azotate e separati in base alla dimensione tramite elettroforesi con una sensibilità tale da permettere la distinzione dei singoli frammenti anche se differivano di un solo nucleotide. Con questo processo, si possono eseguire quattro sequenze in parallele per sequenziare un singolo campione.⁶²

La "NGS" definisce una collezione di diverse tecniche sviluppatesi nell'ultima decade successivamente al sequenziamento di Sanger. La più grande differenza con quest'ultimo consiste nel fatto che, nella Next Generation Sequencing, possiamo analizzare tantissime sequenze in parallelo con un forte abbattimento di tempi e costi.⁶³ Viene chiamato anche "sequenziamento ad alta resa" perché permette di sequenziare milioni di piccoli frammenti di DNA in parallelo anche in un singolo giorno. Ognuna delle tre miliardi di basi del genoma umano può essere sequenziata multiple volte e, in seguito, tramite analisi bioinformatiche, vengono unite le piccole sequenze del DNA di sintesi ottenute dal sequenziamento creando una mappatura del genoma di riferimento umano.⁶⁴

Nel presente studio le varianti molecolari sono state ricavate tramite l'utilizzo della NGS (Next generation sequencing) includendo nell'analisi 315 geni coinvolti in disordini ematologici, deficit autoimmuni e sindromi di immuno-disregolazione per poi essere confermato con sequenziamento Sanger.

6.2 Test Statistici

I dati qualitativi sono stati espressi in termini di frequenza assoluta o percentuali, mentre i dati quantitativi sono stati espressi tramite mediana e range di valore. Nel qual caso la distribuzione delle variabili fosse difforme, oltre alla mediana e al range, vengono riportati anche il primo e il terzo quartile di distribuzione. La comparazione nella distribuzione delle frequenze è stata analizzata tramite il test del Chi quadrato.

Questo test è usato per comparare la distribuzione di una variabile categoriale in un campione o di un gruppo con la distribuzione in un altro. Se la distribuzione della variabile categorica non è troppo diversa nei diversi gruppi, possiamo concludere che la distribuzione della variabile

categorica non è legata alla variabile dei gruppi: in altre parole, possiamo dire che la variabile categorica e i gruppi sono indipendenti.⁶⁵

Ma, se anche solo una delle sequenze attese è minore di 5, questo test deve essere sostituito con il test esatto di Fisher. Questo test è praticamente applicato solo nell'analisi di piccoli campioni ma è attualmente valido per campioni di ogni dimensione. Mentre il test del chi quadrato si basa sull'approssimazione, il test esatto di Fisher è preciso e, specialmente quando più del 20% delle cellule hanno una frequenza attesa minore di 5, dobbiamo usare questo perché il metodo approssimativo non è adeguato.⁶⁵

Sono stati usati anche test non parametrici per la comparazione dei gruppi: per la comparazione di due gruppi è stato usato il test non parametrico Mann-Whitney, mentre per la comparazione di più gruppi si è optato per il Kruskal-Wallis test. Tutti questi sono a due code ed è stato considerato significativo staticamente per un valore di p-value <0.05.

6.3 Test Citofluorimetrici

1. *Immunofenotipo Linfocitario*

La popolazione linfocitaria nel sangue periferico è stata studiata tramite Citometria a flusso. Questa tecnologia permette di analizzare rapidamente singole cellule o particelle quando queste vengono fatte passare attraverso un raggio luminoso singolo o multiplo mentre sono sospese in una soluzione salina tamponata. Il laser colpisce la cellula la quale devia la luce e ogni deviazione delle particelle è analizzata in base alla dispersione della luce visibile e secondo uno o più parametri di fluorescenza.⁶⁶

I campioni vengono preparati per la misurazione della fluorescenza mediante transfezione e espressione di proteine fluorescenti, colorazione con coloranti o con anticorpi coniugati fluorescenti.⁶⁶

Per la valutazione dei dati è stato usato un pannello con 8 colori, uno per ogni fenotipo linfocitario (tramite la procedura lyse and wash: una tecnica di preparazione delle cellule che vengono lisate e poi lavate prima di analizzarne la fluorescenza), un citometro di flusso FACS Canto II (BD) dotato di tre laser (viola, blu e rosso), il software FacsdivaTM e un grande Pannello di RUO monoclonale anticorpi e fluorocromi uniti in differenti combinazioni per legare i linfociti.

2. *ALPS-Panel*

Nel pannello utilizzato sono stati inclusi parametri citofluorometrici specifici e suggestivi di ALPS, quali linfociti CD3+CD4-CD8-TCR α/β , ovvero linfociti T doppio negativi (DNTs) > 1,5%, DNTs B220+ > 60% e il rapporto CD3+CD25+ / CD3+HLA-DR+ < 1. La presenza della positività 4/4 parametri è fortemente suggestiva di ALPS.

3. *Biomarkers*

Tramite l'utilizzo del metodo ELISA (test di immunoassorbimento enzimatico) sono stati testati alcuni biomarker quali interleuchina 18, 10 e Fas ligando.

Questa tecnica si basa sull'utilizzo di un anticorpo marcato con un enzima in grado di rilevare un antigene immobilizzato su una superficie solida, più comunemente a 96 pozzetti

o piastre in poliestere da 384 pozzetti: è test ad alta affidabilità che prevede che il materiale che non si è legato venga lavato via, permettendo il rilevamento dell'anticorpo marcato con enzima attaccato al proprio antigene.⁶⁷

Il siero FAS-L è stato testato con il kit immunoassorbimento enzimatico (ELISA) di ASLG umano con (Abnova Corporation, Taipei, Taiwan).

L'interleuchina (IL) 18 e IL10 sono stati testati con kit Elisa di IL18 umana (MBL, Medical & Biological Laboratories CO, LTD, Woburn, MA, USA) e con kit Elisa di IL10 umana (Invitrogen Corporation, Waltham, MA, USA), rispettivamente.

4. Test dell'apoptosi sulle linee cellulari

Dopo la raccolta, cellule della linea linfoblastica sono state cresciute in un mezzo RPMI con glutammina e antibiotici a 37°C e CO₂ al 5%. Sia le cellule primarie che i linfoblasti sono stati trattati con 10 ng/ml di FAS-Ligando ricombinante concesso da Enzo Life Science (Farmingdale, NY, USA) e 100 TRAIL concesso da Alexis Biochemicals (Farmingdale) per 24 ore per indurre morte cellulare e apoptosi che sono state misurate con la citofluorimetria. Le cellule sono state incubate per 4 ore e poi lisate con tampone di lisi RIPA, una soluzione tampone che viene utilizzata per l'estrazione di proteine dalle cellule di mammiferi, contenenti proteasi inibitori della fosfatasi. La quantificazione delle proteine nelle cellule lisate è stata fatta con il DC Protein assay Kit (Biorad, Hercules, CA, USA). Un numero eguale di proteine (20ug/lane) sono state elettrotrasferite con gel precast 8% su membrane di fluoruro polivinilidene. Successivamente le membrane sono state sondate durante la notte a 4° con anticorpi monoclonali murini anti-Caspasi 8 (1C12), policlonali anti-PARP di coniglio e monoclonali anti-Caspasi 10 di coniglio. Dopo averle lavate, le membrane sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente con i relativi anticorpi secondari coniugati con perossidasi di rafano (HRP) e le proteine sono state rilevate dal substrato HRP chemiluminescente (Immobilon Western, Millipore, Burlington, MA, USA). Anti-actina coniugato con HRP è stato usato come controllo.

5. Autoimmunità

È stata eseguita una serie di 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.

È stato eseguito anche il test di Coombs diretto e indiretto. Il test di Coombs mostra se il sangue del paziente presenta eritrociti che sono stati attaccati da anticorpi nel sangue. Per eseguire questo test viene mischiata una soluzione chiamata "siero di Coombs", contenente anticorpi contro la globulina umana, è mescolato col sangue del paziente.

Se le cellule del sangue hanno legati anticorpi, avviene il fenomeno dell'agglutinazione con entità proporzionale alla quantità di anticorpi presenti. I livelli sono letti con una scala che va da valori minimi definiti "tracce" fino a +4 (il massimo livello di anticorpi); se l'agglutinazione non avviene il test è letto come negativo.⁶⁸

Il test di Coombs indiretto è eseguito sul siero del paziente invece che sulle cellule del sangue e viene eseguito per determinare se il paziente ha anticorpi che potrebbero reagire contro le cellule del sangue che sta per essergli trasfuso. Il siero del paziente è aggiunto alla trasfusione del sangue del donatore. Se avviene l'agglutinazione, allora il paziente ha anticorpi contro il sangue e perciò non dovrebbe ricevere la trasfusione.

Nel caso in cui all'emocromo dei pazienti sia stata riscontrata la presenza di neutropenia o trombocitopenia, è stata fatta una ricerca, rispettivamente, degli anticorpi anti-neutrofili e anti-piastrine.

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1 Descrizione generale

Tra il 1998-2020 sono stati seguiti 31 pazienti (20 maschi-64,5%, 11 femmine-35,5%) con una mutazione del gene CASP10 di età mediana 24 anni (range 3-58) e con età mediana all'esordio dei sintomi di 10 anni (range 0-53). 21/31 (67%) sono stati diagnosticati presso l'unità di Ematologia dell'Istituto Giannina Gaslini mentre i restanti sono stati diagnosticati in altri centri quali Pescara (10%), Catania (10%), Monza (6%), Torino (3%) e Barcellona (3%). Di questi pazienti 15 (48%) sono portatori di una mutazione patogena sul gene CASP10. In particolare in 5 (33%) casi è stata evidenziata la mutazione Ile406Leu, già nota come patogena, mentre i restanti pazienti sono risultati essere portatori delle seguenti nuove mutazioni, il cui ruolo patogeno è stato validato in vitro [figura 4]: Pro501Leu (3/15 pazienti, 20%), Cys401fs (3/15 pazienti, 20%), Arg104* (2/15, 13%), Ser239Cys (1/15, 6%). Il restante 52% (16/31) dei pazienti presenta invece una delle varianti polimorfiche dello stesso gene note per essere associate ad un deficit di apoptosi: Val410Ile (8/16, 50%) e Tyr446Cys (8/16, 50%),

7.2 Clinica e Laboratorio

All'esordio di malattia 27/31 (87%) pazienti presentavano linfoproliferazione e splenomegalia. 12/31 (39%) pazienti mostravano valori di trombocitopenia, la cui mediana è 11500 (range 1000-97000) mentre 6/31 (19%) presentava leucopenia.

È stato inoltre possibile delineare un quadro di anemia emolitica autoimmune in 5/31 (16%) pazienti all'esordio della sintomatologia con media dei valori minimi di emoglobina di 6 (range 4,2-13).

Associati ai segni clinici sono stati osservati altri sintomi, in particolare 10/31 (32%) pazienti riferiscono una sintomatologia extra-ematologica associata che comprende febbre, astenia, epatopatia, artralgia (specie coxalgia), diarrea, episodi epilettici ed infezioni ricorrenti importanti secondari alla neutropenia.

La tabella 2 mostra le caratteristiche cliniche ed i parametri immunologici tipici della sindrome linfoproliferativa autoimmune presenti nella coorte di pazienti. Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i pazienti portatori di mutazioni patologiche e pazienti con varianti polimorfiche.

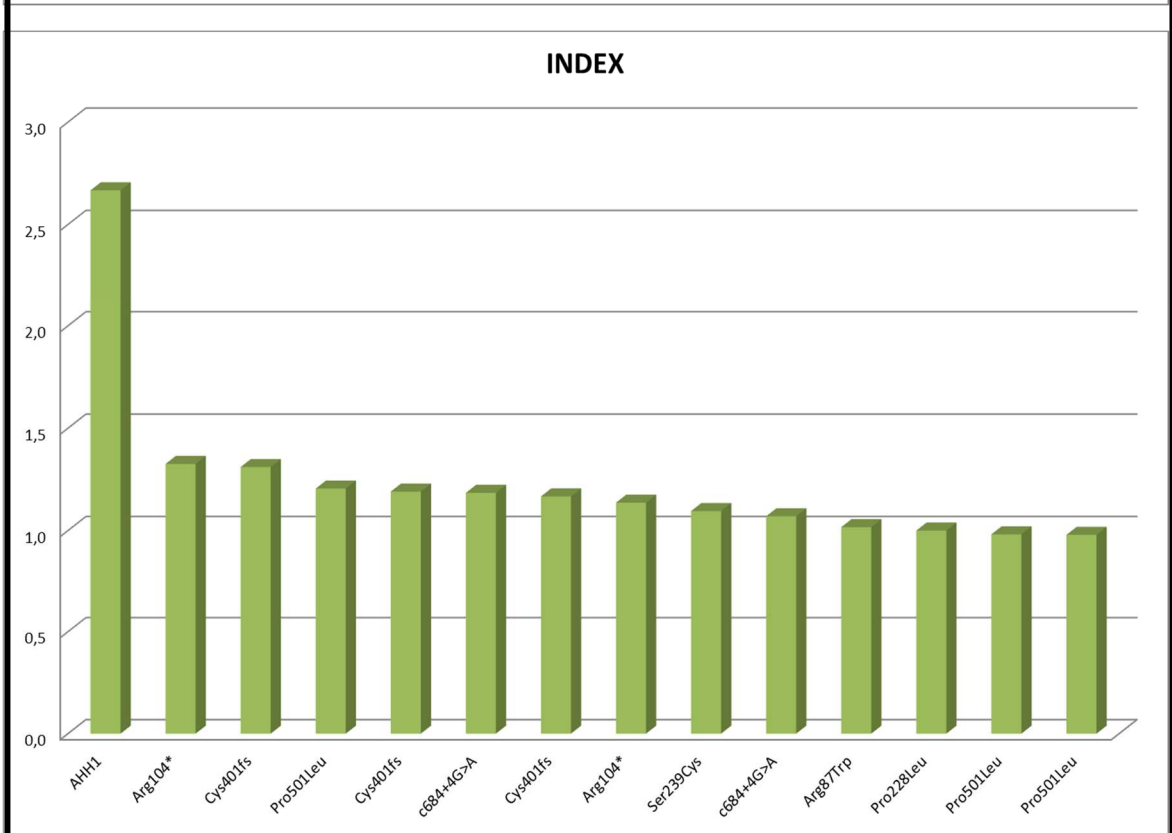
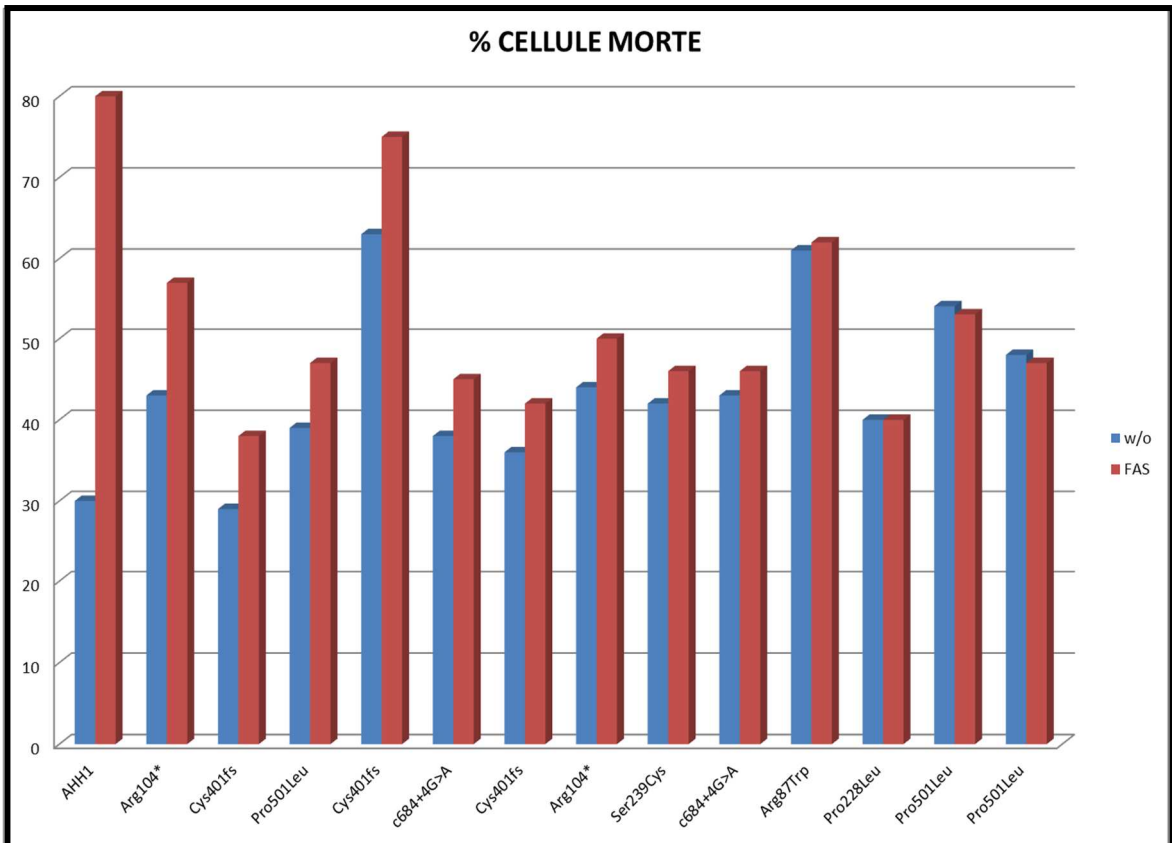


Figura 4: Indice con % di apoptosi (verde) [% morte indotta da Fas (rosso) / % morte spontanea (blu)]

	PAZIENTI TOTALI (31)	MUTAZIONI (15)	POLIMORFISMI(16)
ETA' D'ESORDIO (anni)	10 (0-54)	7 (0-18)	10 (0-54)
LINFOPROLIFERAZIONE	27/28 (96%)	12/12 (100%)	15/16 (94%)
ANEMIA EMOLITICA AUTOIMMUNE	5/28 (18%)	2/12 (17%)	3/16 (19%)
Valore minimo HB (g/dl)	6 (4,2-13)	7,1 (4,2-13)	5,5 (4,3-11,3)
TROMBOCITOPENIA	12/28 (43%)	6/12 (50%)	6/16 (37%)
LEUCOPENIA	6/28 (21%)	3/12 (25%)	3/16 (18%)
LINFOCITI T CD3+ (↓)	10/31 (32%)	6/15 (40%)	4/16 (25%)
Valore medio e range (%)	78,2 (39-89,7)	79 (65,4-89,7)	74 (39-87,8)
LINFOCITI B CD19+ (↓)	9/31 (29%)	4/15 (27%)	5/16 (31%)
Valore medio e range (%)	12,7 (1,9-37)	12,8 (4,6-21,6)	12,4 (1,9-37)
LINFOCITI NK CD56+ (↓)	3/31 (10%)	1/15 (7%)	2/16 (12%)
Valore medio e range (%)	7,3 (2,4-23,4)	6,6 (2,4-17,3)	9,8 (4,5-23,4)
LINFOCITI TOTALI (%) (↓)	6/25 (24%)	3/11 (27%)	3/14 (21%)
Valore medio e range (valore assoluto)	1925 (710-6610)	1820 (1030-3960)	2200 (710-6610)
DNTs >1,5%	18/31 (58%)	9/15 (60%)	9/16 (56%)
Valore medio e range (%)	2 (0,2-5,1)	2,4 (0,46-5,1)	1,95 (0,2-4,2)
DNTs-B220+ >60%	8/29 (28%)	3/13 (23%)	5/16 (31%)
Valore medio e range (%)	36 (13-83,3)	29,5 (13-71,5)	41,6 (13,5-83,8)
RAPPORTO CD3+CD25+/CD3+HLADR+<1%	19/30 (63%)	9/14 (64%)	10/16 (62%)
Valore medio e range (%)	0,78 (0,08-1,83)	0,78 (0,11-1,7)	0,77 (0,08-1,8)
LINFOCITI B MEMORIA (CD27+ <1,5%	18/30 (60%)	7/14 (50%)	11/16 (68%)
Valore medio e range (%)	13,5 (0,3-58)	14 (1,8-46,6)	12,45 (0,3-58)
IL-10 >20pg/ml	2/18 (11%)	0/9 (0%)	2/9 (22%)
Valore medio e range (pg/ml)	3 (1-36)	3,3 (1-6,71)	3 (1,1-36)
IL-18 >550pg/ml	7/24 (29%)	1/12 (8%)	6/12 (50%) (p 0.01)
Valore medio e range (pg/ml)	388 (75-3600)	265 (80-803)	497,5 (75-3600)
sFAS > 200pg/ml	0	0	0
VIT B12 > 663pg/ml	10/21 (48%)	5/9 (56%)	5/13 (38%)
Valore medio e range (pg/ml)	592 (189-1772)	772,5 (189-1550)	493 (318-1772)
IgG <range per età	1/28 (4%)	0/12 (0%)	1/16 (6%)
Valore medio e range (mg/dl)	1012 (80-3851)	988 (817-1551)	1080 (80-3851)
IgA <range per età	8/28 (29%)	2/12 (17%)	6/16 (37%)
Valore medio e range (mg/dl)	129 (4-656)	129,5 (16-289)	112,5 (4-656)
IgM <range per età	6/28 (21%)	1/12 (8%)	5/16 (31%)
Valore medio e range (mg/dl)	90 (21-748)	88,5 (32-134)	88 (21-748)
TEST APOPTOSI	14/19 (74%)	10/11 (91%)	4/8 (50%)

Tabella 2. Caratteristiche cliniche e parametri immunologici
 [DNTs= linfociti doppi negativi; sFAS= Fas solubile; Ig= immunoglobuline,
 IL= interleuchina; VIT= vitamina)

Infine, sulla base dei criteri diagnostici dell'ALPS³³, è stato possibile individuare 9/31 (29%) pazienti che soddisfano tali criteri e per tal motivo ascrivibili a diagnosi di ALPS probabile o definitiva. Di questi 6/9 (80%) presentano un polimorfismo, 3/9 (20%) ha invece una variante patogenetica. Sei pazienti su 31 pazienti (19%) presentavano caratteristiche cliniche ed immunologiche ALPS-like, mentre per i restanti 16/31 (52%) non soddisfano appieno i criteri per rientrare in una delle due categorie sebbene nessun paziente indagato si presenta del tutto asintomatico dal punto di vista clinico e/o laboratoristico.

Le tabelle 3 e 4 mostrano le principali caratteristiche cliniche ed immunologiche dei singoli pazienti.

PZ	MUTAZIONI	SESSO	ETA DIAGNOSI	LINFOPROLI FERAZIONE	ANEMIA EMOLITICA	TROMBOCI TOPENIA	LEUCO PENIA	CITO PENIA	STORIA FAMILIARE LINFOPROLI FERAZIONE	ALTRI SINTOMI
1	<i>Pro501Leu</i>	M	3	SI	NO	SI	NO	SI	NO	NA
2	<i>Pro501Leu</i>	F	3	SI	NO	NO	NO	NO	NO	SI
3	<i>Pro501Leu</i>	M	/	/	/	/	/	/	/	NA
4	<i>Cys401fs</i>	M	16	SI	SI	NO	NO	SI	NO	NA
5	<i>Cys401fs</i>	M	15	NO	NO	NO	SI	NO	NO	NA
6	<i>Cys401fs</i>	M	12	SI	SI	SI	SI	SI	NO	SI
7	<i>Ile406Leu</i>	F	12	SI	NO	SI	NO	SI	NO	NA
8	<i>Ile406Leu</i>	F	6 mesi	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NA
9	<i>Ile406Leu</i>	M	19	SI	NO	NO	SI	NO	NO	SI
10	<i>Ile406Leu</i>	F	8 mesi	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NA
11	<i>Ile406Leu</i>	M	/	/	/	/	/	/	/	NA
12	<i>Ser239Cys</i>	M	8	SI	NO	SI	NO	SI	NO	NO
13	<i>Arg104</i>	M	/	SI	NO	SI	NO	NO	SI	NA
14	<i>Arg104</i>	F	4	NO	NO	SI	NO	SI	NO	NA
15	<i>C684+4g>A</i>	M	/	/	/	/	/	/	/	NA
16	<i>Val410Ile</i>	F	7 mesi	SI	SI	NO	SI	SI	NO	SI
17	<i>Val410Ile</i>	F	9	SI	NO	SI	NO	SI	SI	SI
18	<i>Val410Ile</i>	M	15	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NA
19	<i>Val410Ile</i>	M	3	SI	SI	NO	NO	SI	NO	NA
20	<i>Val410Ile</i>	F	15	SI	NO	NO	SI	NO	NO	NA
21	<i>Val410Ile</i>	M	2	SI	NO	NO	NO	NO	NO	SI
22	<i>Val410Ile</i>	M	17 mesi	NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI
23	<i>Val410Ile</i>	M	/	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NA
24	<i>Tyr446Cys</i>	F	5	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
25	<i>Tyr446Cys</i>	M	13	SI	NO	SI	NO	SI	NO	NO
26	<i>Tyr446Cys</i>	F	54	SI	NO	SI	NO	SI	SI	SI
27	<i>Tyr446Cys</i>	M	11	SI	NO	NO	NO	NO	/	NA
28	<i>Tyr446Cys</i>	F	12	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI
29	<i>Tyr446Cys</i>	M	9	NO	NO	SI	SI	SI	NO	NO
30	<i>Tyr446Cys</i>	M	6 mesi	SI	SI	NO	NO	SI	NO	SI
31	<i>Tyr446Cys</i>	F	/	SI	NO	SI	NO	NO	NO	NA

Tabella 3: Caratteristiche cliniche

PZ	MUTAZIONI	DNTs (%)	B220 (%)	CD27 (%)	RAPPORTO CD3CD25/CD3 HLADR RATIO (%)	LINFO T (%)	LINFO B (%)	LINFO NK (%)	IL-10 (V.n.<1 pg/ml)	IL-18 (<500 pg/ml)	VIT B12 (V.n. 191-663 pg/ml)
1	<i>Pro501Leu</i>	2,6	/	13,6	0,3	68,1	13,9	17,3	3,6	230	592
2	<i>Pro501Leu</i>	2,8	36	8,3	1,5	80,4	12,9	6,2	<1	388	1172
3	<i>Pro501Leu</i>	0,7	13	25	1,8	71,9	21,6	5,5	/	/	/
4	<i>Cys401fs</i>	3	68,2	1,8	0,11	89,1	6,3	2,4	/	/	784
5	<i>Cys401fs</i>	1	29	5,5	1,5	65,4	19,2	15	<1	80	245
6	<i>Cys401fs</i>	1,1	18,5	18,7	0,64	78,94	18,01	2,65	6,71	/	871
7	<i>Ile406Leu</i>	1,9	71,5	46,6	1,12	82,3	9,5	7,4	<1	250	/
8	<i>Ile406Leu</i>	1	30	15,4	0,6	79	12,8	7,1	/	/	1550
9	<i>Ile406Leu</i>	2,5	21,5	21,2	0,45	71,3	21,4	5,7	<1	660	189
10	<i>Ile406Leu</i>	0,7	13	12,4	0,7	70,8	13,7	15	<1	265	444
11	<i>Ile406Leu</i>	4,1	66,4	25,7	1,5	82,4	8,8	7,9	/	/	/
12	<i>Ser239Cys</i>	2,3	59,4	14	0,8	83,1	11,0	3,3	3	125	/
13	<i>Arg104</i>	0,46	/	/	/	78,9	6,5	/	/	/	/
14	<i>Arg104</i>	3,3	14,3	30	0,2	89,7	7	13,9	1	803	761
15	<i>C684+4g>A</i>	5,1	25	6,1	0,9	87,8	4,6	4,4	/	/	/
16	<i>Val410Ile</i>	2,6	62,8	3	0,25	65,5	23	11,1	36	3600	1492
17	<i>Val410Ile</i>	1,1	46	0,3	1,3	64,4	11,7	23,2	1,1	550	388
18	<i>Val410Ile</i>	1,1	61,7	12,4	0,85	77,6	12,3	8,6	<1	75	699
19	<i>Val410Ile</i>	4,2	37,2	11	0,1	73,6	21,7	4,7	<1	2935	1167
20	<i>Val410Ile</i>	0,4	21,7	58	0,9	85	10,3	5	/	/	318
21	<i>Val410Ile</i>	1,5	13,5	13,5	0,6	80,6	13,4	4,5	<1	281	669
22	<i>Val410Ile</i>	2,1	83,8	2,1	0,1	59,1	22,5	16,4	/	/	/
23	<i>Val410Ile</i>	0,6	47	7	0,4	39	37	23,4	/	/	493
24	<i>Tyr446Cys</i>	2,3	81	15,6	0,2	87,8	6,9	4,8	<1	500	393
25	<i>Tyr446Cys</i>	2,7	32	8,3	1,2	65,9	25,3	6,8	3	333	457
26	<i>Tyr446Cys</i>	0,8	15	50	1,8	85,2	1,9	11,5	<1	/	1772
27	<i>Tyr446Cys</i>	1,2	20,2	14	1,8	70,3	10,8	16,5	<1	495	521
28	<i>Tyr446Cys</i>	2	53	22,2	1,1	74,5	11,1	13	<1	110	477
29	<i>Tyr446Cys</i>	1,9	16	12,5	0,1	81,8	10,3	7,3	<1	858	476
30	<i>Tyr446Cys</i>	2	76,2	5,6	0,6	72,5	12,6	14,5	<1	375	/
31	<i>Tyr446Cys</i>	2,5	36,9	17,6	1,1	76,7	15,5	6,9	3	645	/

Tabella 4: Caratteristiche immunologiche

[DNTs= linfociti doppi negativi; Linfo=linfociti,

IL= interleuchina; VIT= vitamina]

Dieci pazienti su 31 (32%) soddisfano almeno 3 su 4 criteri dell'ALPS-panel; 6/31 (19%) pazienti ne mostra 2 su 4; 6/31 (19%) pazienti sono ascrivibili ad un solo criterio; mentre 5/31 (16%) pazienti non ha alcun valore significativo. Quattro pazienti su 31 (13%) presentano tutti i quattro criteri dell'ALPS-panel.

7.3 Discussione

Attualmente i dati disponibili riguardanti il ruolo della mutazione del gene CASP10 nello sviluppo del fenotipo ALPS, nella letteratura medica, sono pochi e unicamente basati su limitati casi clinici.

Questo studio rappresenta la più ampia casistica rispetto a quanto riportata in letteratura ed evidenzia che, in realtà, solo circa il 29% dei pazienti con mutazione di tale gene mostra un fenotipo clinico ed immunologico dell'ALPS.

In particolare, mentre tra i criteri clinici e laboratoristici essenziali per la diagnosi di ALPS, la linfoproliferazione e la splenomegalia risultano presenti nel 96% dei casi, la presenza di linfociti Doppo Negativi superiore all'1,5% del totale risulta rilevabile solo nel 58% dei soggetti indagati; allo stesso modo, altre anomalie cliniche quali trombocitopenia, leucopenia e anemia emolitica si manifestano in meno del 50% casi la prima, e intorno al 20% le rimanenti. Inoltre, solo un terzo dei pazienti presenta almeno 3 su 4 dei criteri citomorfologici dell'ALPS-panel. In particolare, analogamente ai linfociti doppi negativi, anche gli altri parametri del pannello (DNT B220+, Linfociti B CD27+, e rapporto CD3+CD25+/CD3+HLADR+), sono presenti solo in poco più della metà dei casi (60% dei casi analizzati). Tra gli altri valori di laboratorio di rilievo comune, la vitamina B12 si riconferma un biomarker caratteristico, risultando elevata in buona parte dei pazienti CASP10, mentre i valori dell'IL-10 e IL-18 si presentano fuori dai range di normalità solo in una minoranza. Allo stesso modo, le Immunoglobuline (IgG, IgA, IgM) non costituiscono un elemento differenziale perché meno del 30% dei pazienti mostra ipogammaglobulinemia o ipergammaglobulinemia: le IgG, ad esempio, sono risultate alterate solo in un paziente su 3. Analogamente, anche l'alterazione dei valori normali dei linfociti totali, CD3+, B e NK, si presenta attorno al 30% nel totale dei pazienti. Risulta quindi evidente che buona parte dei pazienti presenti un quadro clinico di immuno-disregolazione con caratteristiche riconducibili all'ALPS, ma non sia perfettamente inquadrabile in esso, non potendo soddisfare tutti i criteri diagnostici. Cionondimeno, il test dell'apoptosi eseguito sulle linee cellulari dei pazienti è risultato positivo in una buona percentuale dei casi, confermando, comunque, il ruolo della Caspasi 10 nella determinazione di un deficit dell'apoptosi FAS-mediata, probabilmente non sufficientemente grave da comportare un quadro clinico tipico, come nei casi di ALPS secondari a deficit di FAS. Il test dell'apoptosi ha permesso, inoltre, di validare in vitro la patogenicità di nuove mutazioni inizialmente riportate come di

significato incerto: il test ha dimostrato come il rapporto tra la percentuale di cellule morte indotte da FAS e quella delle cellule morte spontaneamente, si manteneva inferiore a 1,5, confermando il ruolo di dette varianti quali mutazioni patogenetiche.

I 10 pazienti con queste mutazioni, insieme ai 5 soggetti portatori della già nota mutazione Ile406Leu, sono stati messi a confronto con altre varianti presenti in 16 pazienti ed identificate come polimorfismi. Tuttavia, dal confronto dei due gruppi di pazienti non sono state riscontrate differenze significative tra i soggetti portatori di mutazione patogena e quelli con variante polimorfica, ad eccezione dell'interleuchina 18, che risulta più elevata nei pazienti con polimorfismi.

Un altro aspetto caratteristico evidenziabile in questo studio è rappresentato dall'età di esordio nei soggetti con mutazioni CASP10, che è risultata essere più tardiva (con una mediana intorno ai 10 anni) a differenza delle ALPS-FAS che tendono a svilupparsi nei primi anni di vita. Questo dato, unitamente all'eterogeneità del quadro clinico, suggerisce che il deficit di apoptosi secondario a mutazioni CASP10 possa avere un minor impatto nella fisiopatologia dell'ALPS rispetto a quello secondario a mutazioni FAS e conferma quanto sia variabile la penetranza delle mutazioni dei geni coinvolti in questa patologia. Infatti, solo una minoranza dei pazienti rispondeva ai criteri diagnostici dell'ALPS o era inquadrabile come ALPS-like, mentre circa la metà dei casi, presentava un quadro di immunodisregolazione più sfumato con almeno una caratteristica clinica e/o laboratoristica riconducibile a tali patologie. Questa circostanza evidenzia la problematicità posta dalla definizione dell'ALPS, imponendoci di chiarire se essa debba essere definita in base al difetto molecolare/patogenetico o sulla base dell'espressione clinica e suggerendo la necessità di una revisione dei criteri diagnostici. Rimane, comunque, fondamentale il ruolo della diagnosi molecolare soprattutto per impostare un trattamento adeguato.

8. CONCLUSIONI

Questo studio descrive le caratteristiche cliniche e immunologiche della più ampia casistica di pazienti con mutazioni del gene CASP10 che, oltre a svelare 4 nuove varianti patogeniche, dimostra come tali pazienti siano più da inquadrare nell'ambito di una sindrome da immunodisregolazione più che ad ALPS; ciò è dovuto principalmente ad un fenotipo clinico più sfumato ed eterogeneo e a caratteristiche immunologiche variabili che, solo in una piccola percentuale dei casi, rientrano pienamente nei criteri diagnostici dell' ALPS.

Le mutazioni coinvolte nello sviluppo dell'ALPS o in altre sindromi da immunodisregolazione sono note per possedere una penetranza incompleta, che può dipendere da differenti fattori genetici ed epigenetici; tuttavia questi risultati non possono essere giustificati solo dalla penetranza variabile dell'ALPS stessa e, pertanto, si dovrebbe cominciare a considerare l'ALPS come una diagnosi prettamente clinica e non genetica, dato che la maggioranza dei pazienti affetti da mutazione 10 non è affetta da ALPS.

Questa circostanza, unita all'evidenza di un minore impatto patogenico del deficit di CASP10 rispetto alla compromissione di FAS, sottolinea però la necessità di una revisione dei criteri diagnostici dell'ALPS.

9. 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 e per avermi cortesemente accolto in un ambiente fortemente collaborativo.

Un ringraziamento particolare va al Dottor Maurizio Miano, per la sua enorme disponibilità, pazienza e l'attenzione con cui mi ha guidato nello svolgimento di questo lavoro, nonostante le numerose difficoltà di questo specifico momento storico e alla Dott.ssa Elena Palmisani per avermi aiutato nella parte statistica del lavoro.

Ringrazio inoltre il Professor Roberto Lemoli per avermi dato la possibilità di esporre il lavoro in questa sessione di Laurea e l'Università di Genova e l'ospedale San Martino.

Un ringraziamento speciale a tutti coloro che mi sono stati accanto durante l'interno percorso universitario, a tutte le persone che ho avuto l'occasione di conoscere in questi sei anni e, in modo particolare, alla mia Famiglia che mi ha sempre supportato durante questo mio percorso.

Bibliography

1. Bride, K. & Teachey, D. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease. [version 1; peer review: 3 approved]. *F1000Res.* **6**, 1928 (2017).
2. Canale, V. C. & Smith, C. H. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J. Pediatr.* **70**, 891–899 (1967).
3. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Nagata, S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**, 314–317 (1992).
4. Rieux-Laucat, F. *et al.* Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* **268**, 1347–1349 (1995).
5. Nagata, S. & Suda, T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol. Today* **16**, 39–43 (1995).
6. Fisher, G. H. *et al.* Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**, 935–946 (1995).
7. Holzlova, E. *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1409–1418 (2004).
8. Magerus-Chatinet, A. *et al.* FAS-L, IL-10, and double-negative CD4⁻ CD8⁻ TCR alpha/beta⁺ T cells are reliable markers of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function. *Blood* **113**, 3027–3030 (2009).
9. *Robbins e Cotran. Le basi patologiche delle malattie. Patologia generale - Google Libri.*
10. Price, S. *et al.* Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood* **123**, 1989–1999 (2014).
11. Martin, D. A. *et al.* Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4552–4557 (1999).
12. Worth, A., Thrasher, A. J. & Gaspar, H. B. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br. J. Haematol.* **133**, 124–140 (2006).
13. Wachmann, K. *et al.* Activation and specificity of human caspase-10. *Biochemistry* **49**, 8307–8315 (2010).
14. Kischkel, F. C. *et al.* Assignment of CASP8 to human chromosome band 2q33-->q34 and Casp8 to the murine syntenic region on chromosome 1B-proximal C by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **82**, 95–96 (1998).
15. Grenet, J., Teitz, T., Wei, T., Valentine, V. & Kidd, V. J. Structure and chromosome localization of the human CASP8 gene. *Gene* **226**, 225–232 (1999).

16. Yan, S. *et al.* Role of CASP-10 gene polymorphisms in cancer susceptibility: a HuGE review and ' meta-analysis. *Genet. Mol. Res.* **11**, 3998–4007 (2012).
17. Shin, M. S. *et al.* Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **99**, 4094–4099 (2002).
18. Kim, M. S. *et al.* Mutational analysis of CASP10 gene in acute leukaemias and multiple myelomas. *Pathology* **41**, 484–487 (2009).
19. Oh, J. E. *et al.* Mutational analysis of CASP10 gene in colon, breast, lung and hepatocellular carcinomas. *Pathology* **42**, 73–76 (2010).
20. Park, W. S. *et al.* Inactivating mutations of the caspase-10 gene in gastric cancer. *Oncogene* **21**, 2919–2925 (2002).
21. Wang, J. *et al.* Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* **98**, 47–58 (1999).
22. Zhu, S. *et al.* Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Hum. Genet.* **119**, 284–294 (2006).
23. Grønbaek, K., Dalby, T., Zeuthen, J., Ralfkiaer, E. & Guidberg, P. The V410I (G1228A) variant of the caspase-10 gene is a common polymorphism of the Danish population. *Blood* **95**, 2184–2185 (2000).
24. Campagnoli, M. F. *et al.* The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica* **91**, 538–541 (2006).
25. Dianzani, U. *et al.* Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* **89**, 2871–2879 (1997).
26. Ramenghi, U. *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* **95**, 3176–3182 (2000).
27. Cerutti, E. *et al.* Co-inherited mutations of Fas and caspase-10 in development of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *BMC Immunol.* **8**, 28 (2007).
28. Hu, Z. *et al.* Single Nucleotide Polymorphisms in Selected Apoptotic Genes and BPDE-Induced Apoptotic Capacity in Apparently Normal Primary Lymphocytes: A Genotype-Phenotype Correlation Analysis. *J. Cancer Epidemiol.* **2008**, 147905 (2008).
29. Miano, M. *et al.* FAS-mediated apoptosis impairment in patients with ALPS/ALPS-like phenotype carrying variants on CASP10 gene. *Br. J. Haematol.* **187**, 502–508 (2019).
30. Bleesing, J. J. H., Straus, S. E. & Fleisher, T. A. AUTOIMMUNE LYMPHOPROLIFERATIVE SYNDROME. *Pediatr. Clin. North Am.* **47**, 1291–1310 (2000).
31. Wu, J. *et al.* Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J. Clin. Invest.* **98**, 1107–1113 (1996).

32. Chun, H. J. *et al.* Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* **419**, 395–399 (2002).
33. Oliveira, J. B. *et al.* Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood* **116**, e35–40 (2010).
34. Straus, S. E., Sneller, M., Lenardo, M. J., Puck, J. M. & Strober, W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann. Intern. Med.* **130**, 591–601 (1999).
35. Teachey, D. T. New advances in the diagnosis and treatment of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr. Opin. Pediatr.* **24**, 1–8 (2012).
36. Rao, V. K. *et al.* Fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) for monitoring lymphadenopathy in the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Am. J. Hematol.* **81**, 81–85 (2006).
37. Bleesing, J. J. H. *et al.* A Composite Picture of TcR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁺CD8⁻ T Cells (CD4⁺-DNTCs) in Humans with Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. *Clin. Immunol.* **104**, 21–30 (2002).
38. Tarbox, J. A. *et al.* Elevated double negative T cells in pediatric autoimmunity. *J. Clin. Immunol.* **34**, 594–599 (2014).
39. Janda, A. *et al.* Disturbed B-lymphocyte selection in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* **127**, 2193–2202 (2016).
40. Goodnow, C. C. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell* **130**, 25–35 (2007).
41. Kim, Y.-J. *et al.* Eosinophilia is associated with a higher mortality rate among patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am. J. Hematol.* **82**, 615–624 (2007).
42. Fuss, I. J. *et al.* Characteristic T helper 2 T cell cytokine abnormalities in autoimmune lymphoproliferative syndrome, a syndrome marked by defective apoptosis and humoral autoimmunity. *J. Immunol.* **158**, 1912–1918 (1997).
43. Lopatin, U. *et al.* Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with disease expression. *Blood* **97**, 3161–3170 (2001).
44. Cush, J. J. *et al.* Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **38**, 96–104 (1995).
45. Robinson, D. *et al.* IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* **7**, 571–581 (1997).
46. Esfandiari, E. *et al.* A proinflammatory role of IL-18 in the development of spontaneous autoimmune disease. *J. Immunol.* **167**, 5338–5347 (2001).

47. Caminha, I. *et al.* Using biomarkers to predict the presence of FAS mutations in patients with features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, 946–949.e6 (2010).
48. Bowen, R. A. R. *et al.* Elevated vitamin B₁₂ levels in autoimmune lymphoproliferative syndrome attributable to elevated haptocorrin in lymphocytes. *Clin. Biochem.* **45**, 490–492 (2012).
49. Palmisani, E. *et al.* Clinical features and therapeutic challenges of cytopenias belonging to alps and alps-related (ARS) phenotype. *Br. J. Haematol.* **184**, 861–864 (2019).
50. Rao, V. K. & Oliveira, J. B. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* **118**, 5741–5751 (2011).
51. Teachey, D. T. & Lambert, M. P. Diagnosis and management of autoimmune cytopenias in childhood. *Pediatr. Clin. North Am.* **60**, 1489–1511 (2013).
52. Allison, A. C. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus* **14 Suppl 1**, s2–8 (2005).
53. Rao, V. K. *et al.* Use of mycophenolate mofetil for chronic, refractory immune cytopenias in children with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br. J. Haematol.* **129**, 534–538 (2005).
54. Teachey, D. T. *et al.* Treatment with sirolimus results in complete responses in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br. J. Haematol.* **145**, 101–106 (2009).
55. Rao, V. K. *et al.* Use of rituximab for refractory cytopenias associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Pediatr. Blood Cancer* **52**, 847–852 (2009).
56. Price, S. *et al.* Causes and Consequences of Splenectomy In ALPS-FAS. *Blood* **116**, 3908–3908 (2010).
57. Benkerrou, M. *et al.* Correction of Fas (CD95) deficiency by haploidentical bone marrow transplantation. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2043–2047 (1997).
58. Sleight, B. J. *et al.* Correction of autoimmune lymphoproliferative syndrome by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **22**, 375–380 (1998).
59. Jackson, C. E. *et al.* Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 1002–1014 (1999).
60. Infante, A. J. *et al.* The clinical spectrum in a large kindred with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a Fas mutation that impairs lymphocyte apoptosis. *J. Pediatr.* **133**, 629–633 (1998).
61. Magerus-Chatinet, A. *et al.* Onset of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in humans as a consequence of genetic defect accumulation. *J. Clin. Invest.* **121**, 106–112 (2011).
62. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467 (1977).

63. Muzzey, D., Evans, E. A. & Lieber, C. Understanding the basics of NGS: from mechanism to variant calling. *Curr. Genet. Med. Rep.* **3**, 158–165 (2015).
64. Behjati, S. & Tarpey, P. S. What is next generation sequencing? *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* **98**, 236–238 (2013).
65. Kim, H.-Y. Statistical notes for clinical researchers: Chi-squared test and Fisher's exact test. *Restor. Dent. Endod.* **42**, 152–155 (2017).
66. McKinnon, K. M. Flow cytometry: an overview. *Curr. Protoc. Immunol.* **120**, 5.1.1–5.1.11 (2018).
67. Lin, A. V. Direct ELISA. *Methods Mol. Biol.* **1318**, 61–67 (2015).
68. Matthews, J. & Newton, S. The Coombs test. *Clin J Oncol Nurs* **14**, 143–145 (2010).