



U. Ramenghi
L. Garbarini
C. Alliaudi
E. Garelli
N. Crescenzo
E. Rivetti
P. Quarello
M.F. Campagnoli

Ematologia, Dipartimento
di Scienze Pediatriche,
Università di Torino

Malattia autoimmune linfoproliferativa

A B S T R A C T

La malattia autoimmune linfoproliferativa è una malattia genetica in cui un difetto di attivazione dell'apoptosi conduce alla mancata delezione di cloni di linfociti T, da cui derivano una proliferazione linfocitaria eccessiva con accumulo negli organi linfoidi secondari e la comparsa di manifestazioni autoimmuni, soprattutto ematologiche.

La morte cellulare programmata (apoptosi)

La morte cellulare programmata (MCP) è un fenomeno naturale attraverso il quale i tessuti eliminano le cellule senescenti. Il termine apoptosi definisce le alterazioni morfologiche (riduzione del volume cellulare, condensazione e frammentazione del nucleo e della cromatina) che si associano alla morte cellulare programmata, ma oggi il termine apoptosi è comunemente impiegato come sinonimo di MCP. La morte per apoptosi impedisce alla cellula di rilasciare nel tessuto circostante sostanze con azione tossica e proinfiammatoria.

La MCP ha un ruolo determinante nelle funzioni immunitarie. La maturazione dei linfociti B e T nel midollo osseo e nel timo, il controllo dell'attivazione e dello spegnimento della risposta immune e lo sviluppo di attività effettrici, come l'attività citotossica, sono regolati attraverso la MCP. Vengono così eliminati i linfociti T che riconoscono peptidi autologhi e che sono dannosi perché autoreattivi e potenzialmente in grado di determinare malattie autoimmuni.

L'apoptosi è innescata dall'interazione di recettori specifici sulla membrana cellulare (*death receptors*) coi rispettivi ligandi solubili. Questi recettori appartengono alla famiglia del TNF-R (*tumor necrosis factor receptor*)/NGF-R (*nerve growth factor receptor*) e sono caratterizzati da una parte ricca di residui di cisteina nella regione extracellulare e un dominio funzionale chiamato *death domain* nella regione intracitoplasmatica. Nei linfociti, la via apoptotica più efficiente e meglio caratterizzata è il sistema Fas/FasL.^{1,2} L'attivazione del death receptor Fas (CD95, Apo 1 o TNFRSF6) innescava la formazione di un complesso proteico chiamato DISC (*death inducing signaling complex*) che consente l'interazione tra il FADD (Fas Associated Death Domain) e le procaspasi 8 e 10, conducendo alla loro attivazione. L'attivazione delle caspasi (Cisteina proteasi) 8 e 10, chiamate anche caspasi attivatrici, induce l'attivazione a cascata di altre caspasi come la 3 e la 7, determinando l'attivazione di un complesso proteolitico che ha come effetto finale l'apoptosi della cellula (Figura 1).³

Il difetto di apoptosi e la patologia autoimmune

L'associazione tra difetti genetici di Fas e lo sviluppo di patologie autoimmuni è stata inizialmente identificata nel topo. È stato infatti dimostrato da Nagata che mutazioni nel gene che codifica per Fas erano presenti nei topi *lpr*, un ceppo di topi che presentava un quadro clinico simile al lupus (ipergammaglobulinemia, linfadenopatia e nefrite). Nel sangue periferico dei topi *lpr* erano caratteristicamente presenti numerosi linfociti T che non esprimevano né l'antigene CD4 né l'antigene CD8 (definiti per questo *doppi negativi*).⁴

La corrispondente malattia nell'uomo fu descritta in parallelo nel 1995 da Fisher⁵ e Rieux-Laucat,⁶ che dimostrarono la presenza di mutazioni del gene che codifica per Fas in bambini con manifestazioni autoimmuni asso-

ciate ad adenopatia. Anche in questo caso era presente un incremento dei linfociti T *doppi negativi* circolanti. Questa malattia venne designata con l'acronimo ALPS (autoimmune lymphoproliferative syndrome).

Le mutazioni di Fas individuate in soggetti con ALPS sono numerose e di tipo differente, si riscontrano di regola in eterozigosi e per la maggior parte compromettono la capacità di trasmettere il segnale di MCP con meccanismo dominante-negativo (la molecola mutata di Fas interferisce con la funzione del recettore Fas non mutato). Vi sono altresì mutazioni di Fas che riducono l'espressione di membrana del recettore, causando la malattia per aploinsufficienza. Benché la malattia sia geneticamente trasmessa con meccanismo autosomico dominante, spesso il genitore portatore della mutazione non presenta sintomi. Si ritiene, pertan-

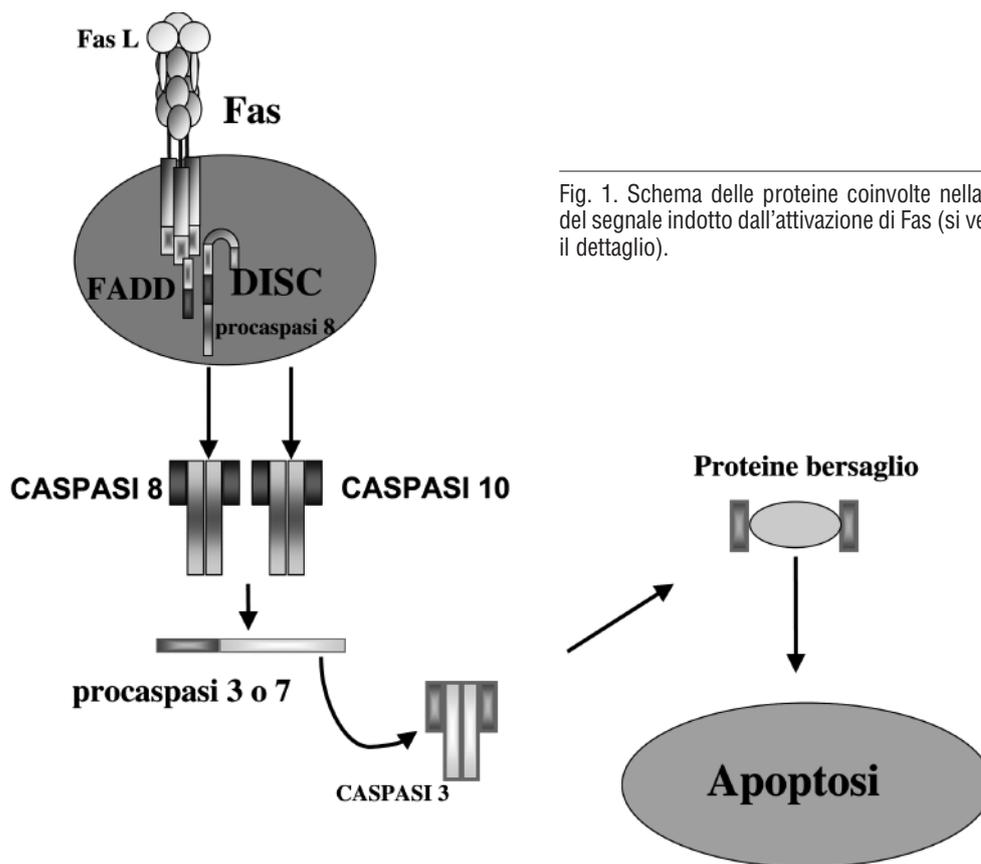


Fig. 1. Schema delle proteine coinvolte nella trasmissione del segnale indotto dall'attivazione di Fas (si veda il testo per il dettaglio).

to, che la sola mutazione del gene Fas non sempre sia sufficiente a produrre la sindrome; in particolare, mentre le mutazioni del *death domain*, più gravi, risultano di per sé sempre associate alla manifestazione di patologia, altre mutazioni più lievi (es. quelle della porzione extracellulare) sembrano determinare il fenotipo solo in presenza di altri fattori. Evidenze sperimentali suggeriscono che alcuni pazienti ALPS possano ereditare due alterazioni genetiche distinte dai due genitori sani: una a carico del Fas, l'altra in un gene coinvolto nella trasduzione del segnale a valle di Fas o in altre vie apoptotiche.⁷⁻⁹

Non tutti i pazienti con ALPS presentano mutazioni del gene che codifica per Fas, pertanto la sindrome è geneticamente eterogenea. Nel 1999 sono state descritte due famiglie con ALPS associata a mutazioni di un altro gene della via apoptotica di Fas, Caspasi 10.¹⁰ La mutazione in omozigosi di Caspasi 8 è stata descritta in una famiglia con quadro clinico parzialmente sovrapponibile all'ALPS (linfoproliferazione, immunodeficienza, assenza di manifestazioni autoimmuni).¹¹

Numerosi pazienti con fenotipo ALPS non presentano mutazioni né in Fas né in Caspasi. Tra i pazienti il cui difetto molecolare non è noto, abbiamo individuato un sottogruppo caratterizzato da quadro autoimmune/linfoproliferativo e ridotta funzionalità del Fas, ma con normali livelli di linfociti T *doppi negativi* circolanti.¹² Abbiamo indicato tale patologia come ALD (autoimmune lymphoproliferative disease); Mc Cusik ha proposto di chiamarla D-ALD (Dianzani -ALD) per evitare confusioni con la più frequente adrenoleucodistrofia. Nelle famiglie ALD entrambi i genitori dei pazienti manifestano una ridotta funzione del Fas, suggerendo che anche in questo caso almeno due mutazioni debbano concentrarsi nello stesso individuo affinché si manifesti la malattia.

L'attuale classificazione della sindrome ALPS, identifica come:

- ALPS 1 le forme in cui è documentata una mutazione nel gene Fas;
- ALPS 2 le forme con mutazione nella caspasi 10;
- ALPS 3 le sindromi autoimmuni-linfoproliferative con difetto funzionale del sistema Fas senza mutazioni identificate, incluso il sottogruppo D-ALD.¹³

Da alcuni autori il gruppo ALPS1 viene ulteriormente suddiviso in ALPS-1a: mutazioni in Fas, ALPS-1b, mutazioni in FasL (1 solo caso in letteratura) e ALPS-0 le rare forme interessanti entrambi gli alleli o con mutazioni nel gene incompatibili con la sintesi della proteina; il gruppo ALPS2 viene anche suddiviso in ALPS-2a da mutazione di Caspasi 10 e ALPS 2b da mutazione di Caspasi 8.

Criteria diagnostici

L'ALPS viene diagnosticata in base alla presenza simultanea dei seguenti 4 criteri: 1. presenza di linfoproliferazione cronica non neoplastica (epato-splenomegalia e/o linfadenopatia); 2. presenza di manifestazioni autoimmuni e/o di marcatori di laboratorio di autoimmunità; 3. deficit di apoptosi linfocitaria Fas mediata (sopravvivenza T-cellulare relativa $\geq 82\%$ in due test indipendenti); 4. espansione dei linfociti T *doppi negativi* (CD4-CD8- $>1\%$ dei linfociti TCR $\alpha\beta$ circolanti).

L'analisi di sequenza dei geni Fas e Caspasi 10 permette la classificazione dei pazienti in ALPS1, 2 e 3; se sono presenti linfoproliferazione, autoimmunità e difetto funzionale della via di Fas in assenza di mutazione dei Fas/Caspasi e in assenza di incremento dei *doppi negativi*, si fa diagnosi di ALPS-3 (o D-ALD).

Quadro clinico e di laboratorio

Il quadro clinico della sindrome è stato descritto per la prima volta da Canale e Smith.¹⁴ La malattia esordisce in età pediatrica; spesso i primi sintomi compaiono in epoca prescolare, ma il quadro clinico completo può evidenziarsi in tempi successivi.

L'eccessiva sopravvivenza linfocitaria è alla base dell'invasione degli organi linfatici secondari caratteristica di questi pazienti, che si manifesta con un quadro di epatosplenomegalia e/o linfadenopatia persistente, coinvolgente più frequentemente le stazioni laterocervicali ed inguinali. Talvolta la linfadenopatia massiva rende necessaria l'escissione; l'esame istologico dimostra in questi casi iperplasia follicolare reattiva, talvolta con espansione parafollicolare delle cellule doppie-negative.

Per quanto riguarda le manifestazioni autoimmuni, si tratta per lo più di citopenie (anemia emolitica e/o trombocitopenia e/o neutropenia), frequenti rash cutanei, talora vasculite, glomerulonefrite, epatite autoimmune di tipo 2.¹⁵ Possono essere presenti episodi febbrili ricorrenti, che non regrediscono se non con terapia steroidea. Molti pazienti presentano PTT allungato per la presenza di anticorpi anti-cardiolipina e antifosfolipidi. Nella Tabella 1 sono riportate le principali manife-

stazioni autoimmuni e la frequenza con cui sono state osservate nell'ALPS-1 e nell'ALPS-3.¹⁶ Non esiste una chiara correlazione genotipo-fenotipo; tuttavia le mutazioni relative alla porzione intra-citoplasmatica, che modificano il *death domain*, si associano a manifestazioni cliniche particolarmente severe e si trasmettono con meccanismo dominante.

La maggior parte dei pazienti presenta alterazioni dei livelli di immunoglobuline. Si tratta per lo più di incrementi di IgG e/o IgA, talora associati a bassi livelli di IgM. Noi abbiamo osservato pazienti che nel tempo sviluppano deficit di immunoglobuline così grave da richiedere terapia sostitutiva. Il quadro di questi pazienti è sovrapponibile a quello dei pazienti affetti da immunodeficienza comune variabile (CVID). Oltre 1/4 dei pazienti con CVID presenta manifestazioni autoimmuni e molti presentano linfadenopatia.¹⁷ Come l'ALPS III, la CVID è molto eterogenea nelle manifestazioni cliniche e più geni sono coinvolti nella sua patogenesi. Nelle famiglie con CVID, così come in quelle con ALPS vi è un aumento di incidenza di malattie autoimmuni e neoplasie. Noi abbiamo riscontrato una resistenza all'apoptosi Fas mediata in 2/3 dei pazienti CVID esaminati. È verosimile vi sia una sovrapposizione tra alcune forme di CVID e l'ALPS 3, che solo l'identificazione dei geni responsabili potrà chiarire.

Tabella 1. Frequenza delle manifestazioni autoimmuni nella sindrome ALPS

ALPS tipo 1		ALPS tipo 3	
Anemia emolitica autoimmune	40 %	Piastrinopenia	63 %
Piastrinopenia	34 %	Neutropenia	33 %
Neutropenia	18 %	Anemia emolitica autoimmune	33 %
Rash cutaneo, vasculiti	14 %	Febbre ricorrente	18 %
Glomerulonefrite	7 %	Artrite	11 %
Guillain Barrè	6 %	Epatite autoimmune	7 %
Artrite	4 %	Rash cutaneo, vasculiti	4 %
Epatite autoimmune	2 %	Tiroidine	
Vitiligo	2%	Diabete	

I dati relativi all'ALPS-1 sono ottenuti da ref 15 per ALPS-3 da ref 16.

Terapia e prognosi

Le manifestazioni autoimmuni rispondono per lo più bene alla terapia con steroidi, mentre le piastrinopenie sembrano meno responsive al trattamento con Igiv. Nel trattamento delle manifestazioni autoimmuni sono stati impiegati con successo anche altri farmaci immunosoppressivi quali micofenolato, rituximab e un certo numero di pazienti è stato sottoposto a splenectomia.⁹

In alcuni casi, data la gravità del quadro clinico, è stato effettuato con successo un trapianto di midollo osseo da donatore non familiare.

L'evoluzione della malattia è varia: generalmente si osserva un miglioramento del quadro clinico con l'età, specie dell'adenomegalia e della splenomegalia, ma la prognosi è fortemente condizionata dal rischio di sviluppo di neoplasie.

Neoplasie e ALPS

I pazienti ALPS presentano una maggior suscettibilità a sviluppare neoplasie, soprattutto del sistema emopoietico: circa il 10% dei pazienti ha sviluppato un linfoma, ma sono descritti vari tipi di neoplasie. Una maggiore incidenza di tumori rispetto alla popolazione normale è stata dimostrata anche nelle famiglie dei pazienti.^{19,20} È verosimile che la causa risieda nel deficit di induzione della MCP da parte dei linfociti T citotossici.

Noi riteniamo che alterazioni a carico della via di trasduzione del Fas siano uno dei fattori genetici che favoriscono lo sviluppo di malattie autoimmuni differenti dalla ALPS. Nelle famiglie dei pazienti ALPS3 abbiamo osservato una elevata frequenza di patologie autoimmuni;¹⁹ inoltre abbiamo osservato difetto di apoptosi Fas mediata in pazienti pediatriche affetti da poliendocrinopatie (diabete insulino

dipendente + tiroidite + artrite reumatoide e/o celiachia).²¹

In conclusione l'ALPS può essere sospettata quando si osservi l'associazione tra manifestazioni autoimmuni e linfomegalia o splenomegalia, specie se nel soggetto sono presenti alti livelli di immunoglobuline. In questi pazienti occorre ricercare l'eventuale espansione di linfociti T doppi negativi ($\alpha\beta^+$, $CD4^-$, $CD8^-$) e valutare l'apoptosi indotta da attivazione del Fas mediante specifico test di sopravvivenza cellulare. Successivamente verranno condotte le indagini molecolari. La corretta diagnosi permette di inquadrare meglio la malattia, non solo dal punto di vista patogenetico, ma anche prognostico-terapeutico.

Bibliografia

1. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449–1495.
2. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407:789–795.
3. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1–16.
4. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutation. *Immunol Today* 1995;16:39–42.
5. Fisher GH, Rosemberg FJ, Straus SE et al. Dominant interfering Fas gene mutation impair apoptosis in a human lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995;81:935–946.
6. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995;268:1347–1349.
7. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ et al. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med* 1999;130:591–601.
8. Sneller MC, Wang J, Dale JK et al. Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood* 1997;89:1341–1348.
9. Worth A, Thrashen AJ, Gaspar HB. Autoimmune lymphoproliferative syndrome:

- molecular basis of disease and clinical phenotype *Br J Haematol* 2006;133:124–140.
10. Wang J, Zheng I, Lobito A et al. Inherited human caspase-10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 1999;98:47–58.
 11. Chun HJ, Zheng L, Ahmad M et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 2002; 419:395–399.
 12. Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 1997;89:2871–2879.
 13. van der Werff ten Bosch J, Otten J, Thielemans K. Autoimmune lymphoproliferative syndrome type III: an indefinite disorder. *Leuk Lymphoma* 2001;41:55–65.
 14. Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr* 1967;70:891–899.
 15. Rieux-Laucat F, Fischer A, Le Deist F. Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol* 2003;15:325–331.
 16. Campagnoli MF, Garbarini L, Quarello P et al. The broad spectrum of the autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica* 2006;91:538–541.
 17. Di Renzo M, Pasqui AL, Auteri A. Common variable immunodeficiency: a review. *Clin Exp Med* 2004;3:211–217.
 18. Iglesias J, Matamoros N, Raga S et al. CD95 expression and function on lymphocyte subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID); related to increased apoptosis. *Clin Exp Immunol* 1999;117:138–146.
 19. Ramenghi U, Bonisconi S, Migliaretti G et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune disease and cancer. *Blood* 2000;95:3176–182.
 20. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 2001;98:194–200.
 21. DeFranco S, Bonisconi S, Cerutti F et al. Defective function of Fas in patients with type I diabetes associated with other autoimmune diseases. *Diabetes* 2001;50:483–488.