



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μοριακή Μελέτη του Αυτοάνοσου Λεμφοϋπερπλαστικού Συνδρόμου
(ALPS)**

Σοφία Ραφτοπούλου

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας
- Νικόλαος Γιαννακούλας, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας- Αιματολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής, με εξειδίκευση στην Ανοσολογία

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2018 - Οκτώβριος 2019



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS
Molecular Study of Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
(ALPS)**

Sofia Raftopoulou

Examining Committee:

- Mathaios Speletas, Professor of Medical Immunology, Supervisor
- Efthimia Peteinaki, Professor of Medical Biopathology – Clinical Microbiology
- Nikolaos Giannakoulas, Assistant Professor of Pathology – Hematology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications of Molecular Medicine

Larisa, September 2018 - October 2019

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σπελέτα Ματθαίου.

Αρχικά θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του, τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου μετέδωσε καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γερμενή Αναστάσιο για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει και να μου λύσει οποιαδήποτε πρόβλημα αντιμετώπισα στην πραγματοποίηση των πειραμάτων μου.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον Επίκουρο Καθηγητή Γιαννακούλα Νικόλαο καθώς και την Καθηγήτρια Πετεινάκη Ευθυμία, οι οποίοι δέχτηκαν να γίνουν μέλη της τριμελούς επιτροπής μου.

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω, την Τσιντή Γερασιμίνα, η οποία εκτελεί το διδακτορικό της πρόγραμμα, και με συμβούλευε και με στήριζε καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων και χωρίς τις συμβουλές και τις γνώσεις της δεν θα είχα φτάσει στο τέλος της εκπόνησης αυτής τη εργασίας.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου, δηλαδή την διδάκτορα Σεβδαλή Ειρήνη, τις υποψήφιες μεταπτυχιακούς Τσιάλτα Ιωάννα, Μακρή Σοφία και Περιστέρη Αθανασία-Μαρίνα, τις προπτυχιακές φοιτήτριες Βακαλούλη Ευδοκία και Νικολάου Ευαγγελία καθώς και την παρασκευάστρια του εργαστηρίου Φουσίκα Αθανασία, οι οποίοι με την στήριξή τους αλλά και με το φιλικό κλίμα που δημιουργούσαν στο εργαστήριο βοήθησαν στο έπακρο την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας αλλά και την απόκτηση νέων γνώσεων και εμπειριών καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που ήταν πάντα δίπλα μου με την οικονομική αλλά πάνω από όλα την ψυχολογική στήριξη, την αγάπη, την κατανόηση και την εμπιστοσύνη τους. Μου έδωσαν δύναμη να συνεχίσω και να φτάσω μέχρι το τέλος για αυτό και τους αφιερώνω αυτή την πτυχιακή εργασία.

Περίληψη

Το Αυτοάνοσο Λεμφοϋπερπλαστικό Σύνδρομο (Autoimmune LymphoProliferative Syndrome – ALPS) είναι ένα σπάνιο γενετικό νόσημα, το οποίο χαρακτηρίζεται από συσσώρευση αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων λόγω διαταραχής του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) ο οποίος επάγεται μέσω του υποδοχέα FAS.

Η διαταραχή αυτή οδηγεί στον κλινικό φαινότυπο του νοσήματος, ο οποίος περιλαμβάνει ηπατοσπληνομεγαλία, λεμφαδενοπάθεια και αυτοάνοσες εκδηλώσεις. Το ALPS έχει συσχετιστεί με σημειακές μεταλλάξεις σε τρία γονίδια που κωδικοποιούν για τον υποδοχέα FAS, τον προσδέτη FASL και την Κασπάση 10.

Τα τρία αυτά γονίδια μελετήθηκαν μοριακά σε 16 ασθενείς από 14 οικογένειες με υποψία ALPS μέσω PCR-Sequencing.

Ανιχνεύθηκαν δύο παθογόνες μεταλλάξεις, σε ετερόζυγο μορφή στα εξόνια 7 και 9, αντίστοιχα, του γονιδίου *FAS*, καθώς και μεγάλος αριθμός ετερόζυγων και ομόζυγων πολυμορφισμών σε ιντρονικές περιοχές. Δεν εντοπίστηκαν παθογόνες μεταλλάξεις στα *FASL* και *CASP10*.

Συμπερασματικά, διαπιστώθηκε ότι το ALPS χαρακτηρίζεται τόσο από επικρατή όσο και από υπολλειπόμενη κληρονομικότητα ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης. Επίσης, στους ασθενείς που δεν βρέθηκε παθογόνος μετάλλαξη συμπεραίνεται ότι μπορεί να φέρουν άγνωστη μετάλλαξη.

Abstract

Autoimmune LymphoProliferative Syndrome (ALPS) is a rare genetic disease characterized by accumulation of autoreactive lymphocytes due to a disorder of FAS-mediated apoptosis. This disorder leads to the clinical phenotype of the disease, which includes splenomegaly, hepatomegaly, lymphadenopathy and autoimmune manifestations. ALPS has been associated with mutations in three genes encoding the FAS receptor, FAS ligand and Caspase 10.

Those three genes were studied in 16 patients from 14 suspected of ALPS by PCR-Sequencing methods.

After the analysis, we identified two pathogenic, heterozygous mutations in exons 7 and 9 of *FAS* gene, respectively, as well as a number of heterozygous and homozygous intronic polymorphisms. We didn't find any pathogenic mutations in *FASL* and *CASP10*.

As a result, ALPS can be inherited in either a dominant or recessive manner, depending on the type of the mutation. Also, we determined that patients with no pathogenic mutation in *FAS* may carry an identified mutation.

Περιεχόμενα

Πίνακας Συντμήσεων	7
<u>Γενικό Μέρος</u>	8
A. Εισαγωγή	9
A.1 Γενικές Πληροφορίες	9
A.2 Επιδημιολογία και Παθοφυσιολογία	10
A.3 Κλινική Εικόνα	11
A.3.1 Συμπτώματα	11
A.3.2 Εργαστηριακά Ευρήματα	12
A.4 Διάγνωση	13
A.5 Διαφορική Διάγνωση	15
A.5.1 CEDS	15
A.5.2 PRKCD Deficiency (ALPS III)	15
A.5.3 RALD (ALPS IV)	16
A.5.4 CHAI (ALPS V)	16
A.5.5 FADD Deficiency	16
A.5.6 DALD	16
A.5.7 Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια (CVID)	17
A.5.8 Σύνδρομο Evans (ES)	17
A.5.9 Φυλοσύνδετη Λεμφοϋπερπλαστική Διαταραχή (XLP)	17
A.6 Ταξινόμηση ALPS	18
A.6.1 Τύπου ALPS	18
A.6.2 Μοριακή βάση	18
A.6.3 Γονίδιο <i>APTI</i>	19
A.6.4 Γονίδιο <i>APTL1</i>	22
A.6.5 Γονίδιο <i>CASP10</i>	24
A.7 Μονοπάτι Σηματοδότησης FAS	25
A.8 Θεραπεία	26
B. Σκοπός	26
<u>Ειδικό Μέρος</u>	27
A. Υλικά και Μέθοδοι	28
A.1 Άτομα που μελετήθηκαν	28
A.2 Μεθοδολογία Έρευνας	29
A.2.1 Απομόνωση Ολικού DNA	29
A.2.2 Σχεδιασμός Εκκινητών και PCR	30
A.2.2.1 PCR <i>FAS</i>	30
A.2.2.2 PCR <i>FASL</i>	32
A.2.2.3 PCR <i>CASP10</i>	33
A.2.2.4 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη Αγαρόζης	34

A.2.3 Αλληλούχιση των προϊόντων της PCR	34
A.2.3.1 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR	34
A.2.3.2 Αλληλούχιση	36
B. Αποτελέσματα	38
B.1 Μοριακός Έλεγχος <i>FAS</i>	38
B.2 Μοριακός Έλεγχος <i>CASP10</i>	41
B.3 Μοριακός Έλεγχος <i>FASL</i>	41
Γ. Συζήτηση	42
Δ. Βιβλιογραφία	44

Πίνακας Συντμήσεων

α/β- DNT	α/β Positive, CD4-CD8 Negative T cells	α/β Θετικά, CD4-CD8 Αρνητικά Τ κύτταρα
AIHA	Autoimmune Hemolytic Anemia	Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναμία
ALPS	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome	Αυτοάνοσο Λεμφοϋπερπλαστικό Σύνδρομο
BMT	Bone Marrow Transplant	Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών
CASP8	Caspase 8 gene	Γονίδιο της Κασπάσης 8
CASP10	Caspase 10 gene	Γονίδιο της Κασπάσης 10
CEDS	Caspase 8 Deficiency	Ανεπάρκεια Κασπάσης 8
CHAI	CTLA-4 Haploinsufficiency Autoimmune Infiltration	CTLA-4 απλοανεπάρκεια με αυτοανοσία και λεμφοκυτταρικές διηθήσεις
CTLs	Cytotoxic T Lymphocytes	Κυτταροτοξικά Τ Κύτταρα
CVID	Common Variable Immunodeficiency	Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια
DALD	Danzani Autoimmune Lymphoproliferative Disease	Αυτοάνοση Λεμφοϋπερπλαστική Νόσος Danzani
DD	Death Domain	Περιοχή Θανάτου
DNTs	Double Negative T cells	Διπλά αρνητικά Τ κύτταρα
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
ES	Evans' Syndrome	Σύνδρομο Evans
FADD	FAS-associated protein with death domain	Σχετιζόμενη με τον FAS - Πρωτεΐνη με Περιοχή Θανάτου
FASL	FAS Ligand	Προσδέτης FASL
FASR	FAS Receptor	Υποδοχέας FAS
GVHD	Graft Versus Host disease	Σύνδρομο αντίδρασης μοσχεύματος έναντι του ξενιστή
HCT	Hematopoietic Stem Cell Transplantation	Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Στελεχιαίων Κυττάρων
HETER	Heterozygous	Ετερόζυγος
HOMO	Homozygous	Ομόζυγος
IMPDH	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	Αφυδρογονάση της μονοφωσφορικής ινοσίνης
ITP	Idiopathic Thrombocytopenic Purpura	Ιδιοπαθής Θρομβοπενική Πορφύρα
IVIG	Intravenous Immunoglobulin	Ενδοφλέβια Ανοσοσφαιρίνη
MMF	Mycophenolate Mofetil	
MPA	Mycophenolic Acid	Μυκοφαινολικό Οξύ
NK	Natural Killer Cells	Φυσικά Κυτταροκτόνα Κύτταρα
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
PRKCD Deficiency	Protein Kinase C Delta	Πρωτεϊνική Κινάση C Δέλτα
RALD	Ras- associated Leukoproliferative Disorder	Ras- Σχετιζόμενη Λευκοϋπερπλαστική Διαταραχή
sFASL	Soluble FAS Ligand	Διαλυτή Μορφή του προσδέτη του υποδοχέα FAS
SLE	Systemic Lupus Erythematosus	Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
TMD	Transmembrane Domain	Ενδομεμβρανική Περιοχή
TNF	Tumor Necrosis Factor	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων
TPO	Thyroid peroxidase	Θυροειδική Υπεροξειδάση
WT	Wild Type	Αγρίου Τύπου
XLP	X- Linked Lymphoproliferative Syndrome	Φυλοσύνδετο Λεμφοϋπερπλαστικό Σύνδρομο

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

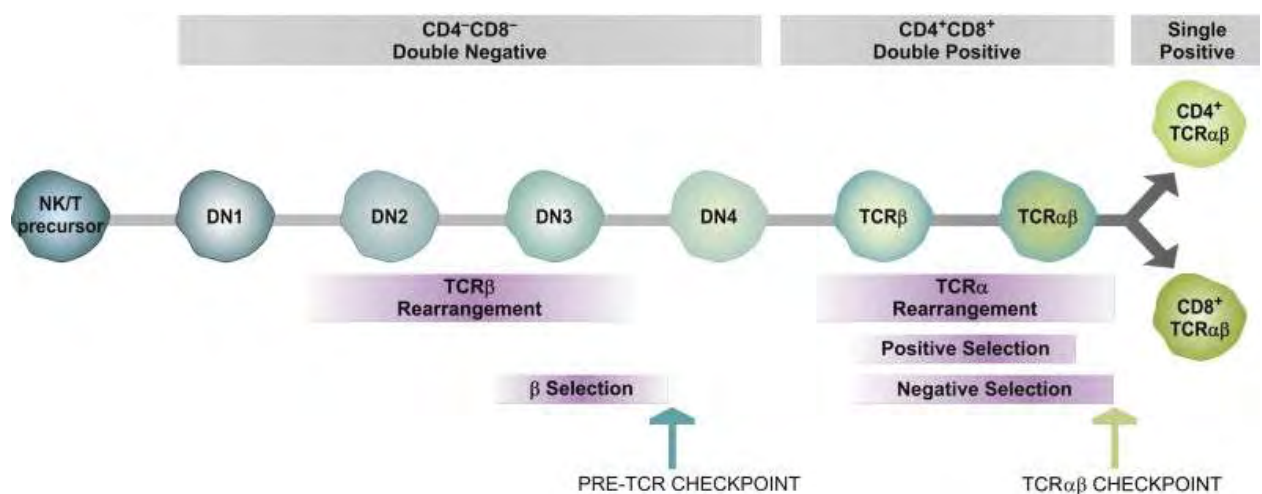
Το Αυτοάνοσο Λεμφοϋπερπλαστικό Σύνδρομο (ALPS) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1967 από τους Canale και Smith (1), οι οποίοι αναφέρθηκαν σε μία λεμφοειδική, υπερπλαστική διαταραχή.

Μελέτες τη δεκαετία του 1990 ανέδειξαν ότι πρόκειται για μία κληρονομική διαταραχή που οδηγεί στην συσσώρευση αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων, η οποία οφείλεται σε διαταραχή των μηχανισμών απόπτωσης που επάγονται από τον υποδοχέα FAS (2).

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων το σύνδρομο εκδηλώνεται ως μη κακοήθης λεμφαδενοπάθεια με ηπατομεγαλία και αυτοάνοσες κυτταροπενίες. Χαρακτηριστικό ανοσοφαινοτυπικό εύρημα του ALPS είναι τα αυξημένα επίπεδα DNTs (Double Negative T cells, $TCR\alpha\beta^+/CD4^-/CD8^-$, >5% των λεμφοκυττάρων) (3).

Η προέλευση και η λειτουργία των DNTs είναι ελάχιστα κατανοητή κυρίως επειδή δεν αναπτύσσονται *in vitro* και είναι επομένως δύσκολο να μελετηθούν. Πιστεύεται ότι τα DNT προέρχονται από κυτταροτοξικά CD8 T λεμφοκύτταρα που έχουν χάσει την έκφραση της μεμβρανικής πρωτεΐνης CD8 πριν ακόμα εξέλθουν από τον θύμο στην περιφέρεια (4).

Η εν τω βάθει διερεύνηση της παθοφυσιολογίας του συνδρόμου οδηγεί στην ανάπτυξη πιο στοχευμένων και υποσχόμενων θεραπειών.



Εικόνα 1: Στάδια διαφοροποίησης διπλών αρνητικών T κυττάρων και αναδιάταξη του TCRβ

Από: *Primer to the Immune Response (Second Edition)*, Tak Mak Mry Saunders Bradley Jett

A.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Κατά βάση, το ALPS εμφανίζεται στην παιδική ηλικία, ωστόσο υπάρχουν και αρκετές περιπτώσεις ενήλικων ασθενών (5).

Η ακριβής συχνότητα εμφάνισης και ο επιπολασμός της νόσου είναι άγνωστα μέχρι και σήμερα. Εκτιμάται ότι ο αριθμός των ασθενών με ALPS υπερβαίνει τους 500 παγκοσμίως και χαρακτηρίζει πάσχοντες ευρέως φάσματος ηλικίας και φυλής (6,7).

Επιπλέον, σύμφωνα με το French ALPS Cohort και τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας (NIH), τα αρσενικά άτομα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν ALPS σε σχέση με θηλυκά, και ο λόγος αρσενικών προς θηλυκών ασθενών είναι 2.2 και 1.6 αντίστοιχα όπως αναφέρονται από τους δύο φορείς (5,8).

Στην πλειοψηφία των ασθενών, η παθογένεση του ALPS οφείλεται σε ελαττωματική απόπτωση των λεμφοκυττάρων που διαμεσολαβείται από την οδό σηματοδότησης FAS/ FASL (5). Έτσι, μία διαταραχή σε αυτό το μονοπάτι οδηγεί σε μη κλωνική επέκταση λεμφοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ειδικών για αυτοαντιγόνα πληθυσμών και έχοντας ως επακόλουθο αυτοάνοσες διαταραχές. Επιπροσθέτως, ο υποδοχέας FAS θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην καταστολή των μετασχηματισμών των λεμφοκυττάρων σε κακοήθη, εξηγώντας έτσι τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λεμφώματος που φέρουν οι ασθενείς με ALPS (9). Εντούτοις, η παθογένεια της νόσου δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως.

Περίπου τα δύο τρίτα των ασθενών με ALPS φέρουν αναγνωρισμένη γενετική μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα FAS. Παρόλ'αυτά έχουν ταυτοποιηθεί και σωματικές μεταλλάξεις στον FAS, οι οποίες εντοπίζονται στα DNT κύτταρα (3).

Τέλος σε μερικούς ασθενείς έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις και σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην οδό απόπτωσης που επάγεται από τον υποδοχέα FAS, όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν για τον προσδέτη του FAS (FASL) (10) και την Κασπάση 10 (18).

Ωστόσο, υπάρχει ένας αριθμός ασθενών, για τους οποίους δεν έχουν προσδιοριστεί μεταλλάξεις ενώ αυτοί πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια για ALPS.

Η διάγνωση του ALPS μπορεί να αποτελέσει πρόκληση εξαιτίας της μεγάλης ετερογένειας του φαινοτύπου του αλλά και λόγω της χαμηλής επίγνωσης για αυτό. Η διάγνωση του ALPS μπορεί να καθυστερήσει έως και 20 χρόνια από την εμφάνιση των συμπτωμάτων της νόσου (13).

Επιπλέον, στο σύνδρομο ALPS η σχέση μεταξύ γονότυπου, φαινοτύπου και διείσδυσης είναι πολύπλοκη. Η εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το γενετικό υπόβαθρο. Το 70% των ασθενών που φέρουν ετερόζυγη μετάλλαξη στο γονίδιο *FAS* αναπτύσσουν κλινικά συμπτώματα (14). Ωστόσο, υπάρχουν φορείς μεταλλάξεων, οι οποίοι είναι ασυμπτωματικοί γεγονός που οδηγεί στη διατύπωση της υπόθεσης ότι η εκδήλωση του κλινικού φαινοτύπου επηρεάζεται και από άλλους γενετικούς ή/και περιβαλλοντικούς παράγοντες (15).

A.3 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

A.3.1 Συμπτώματα

Η λεμφοϋπερπλασία αποτελεί την πιο συνήθη κλινική εκδήλωση του συνδρόμου σε ασθενείς και μπορεί να εμφανιστεί με τη μορφή λεμφαδενοπάθειας, ηπατομεγαλίας ή και σπληνομεγαλίας (2).

Ειδικότερα, τουλάχιστον το 80% των ασθενών με ALPS εμφανίζουν λεμφαδενοπάθεια και σπληνομεγαλία, ενώ περίπου το 45% των ασθενών εμφανίζουν ηπατομεγαλία (16–18).

Ο μέσος όρος ηλικίας εκδήλωσης της νόσου είναι οι 11 μήνες (18). Εντούτοις, έχουν περιγραφεί και ασθενείς οι οποίοι ανέπτυξαν συμπτώματα πολύ αργότερα, κατά την εφηβεία (19).

Το δεύτερο πιο σύνηθες σύμπτωμα του συνδρόμου είναι η αυτοανοσία. Το 70% των ασθενών εμφανίζει αυτοανοσία υπό μορφή αυτοάνοσης καταστροφής των κυττάρων του αίματος, είτε ερυθροκυττάρων (αιμολυτική αναιμία) είτε αιμοπεταλίων (άνοση θρομβοπενία) ή ουδετερόφιλων (αυτοάνοση ουδετεροπενία) (17). Επιπλέον, πολλοί ασθενείς εμφανίζουν ταυτόχρονα πενία σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές.

Οι αυτοάνοσες κυτταροπενίες σε ορισμένους ασθενείς αποτελούν τυχαίο εργαστηριακό εύρημα, ενώ σε άλλους εκδηλώνονται ως σοβαρές και χρόνιες, οι οποίες χρήζουν ανοσοκατασταλτικής θεραπείας (20). Παρόλ'αυτά έχει διαπιστωθεί ότι τόσο η λεμφοϋπερπλασία όσο και η αυτοανοσία μπορεί να βελτιωθούν με το πέρασμα της ηλικίας.

Επιπροσθέτως έχουν περιγραφεί και άλλες πιο σπάνιες αυτοάνοσες διαταραχές, οι οποίες επηρεάζουν τους νεφρούς, το ήπαρ, τις αρθρώσεις, τους οφθαλμούς, το νευρικό σύστημα και το έντερο (21). Πιο συχνά εκδηλώνονται κνιδωτικά εξανθήματα αυτοάνοσης αιτιολογίας. Ταυτοχρόνως, σε αυξανόμενη συχνότητα φαίνεται να αναφέρονται και περιπτώσεις ανοσο-μεσολαβούμενης πνευμονικής ίνωσης (22).

Επιπλέον, ασθενείς με ALPS μπορεί να εμφανίσουν δευτεροπαθώς συστηματικό ερυθματώδη λύκο (Systemic Lupus Erythematosus - SLE) πλήττοντας σχεδόν οποιοδήποτε σύστημα οργάνων. Αυτό μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα κατά τη διάγνωση της νόσου καθώς το σύνδρομο μπορεί εσφαλμένα να θεωρηθεί λύκος ή μικτή ασθένεια συνδετικού ιστού (23).

Τέλος, οι ασθενείς με ALPS χαρακτηρίζονται από αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κακόηθων διαταραχών, συνηθέστερα λέμφωμα Hodgkin και non-Hodgkin, αλλά και άλλων νεοπλασμάτων (θυροειδής, μαστοί, δέρμα, γλώσσα και ήπαρ) (22,24).

A.3.2 Εργαστηριακά Ευρήματα

Εκτός από την χρόνια λεμφοϋπερπλασία, το ALPS χαρακτηρίζεται και από αυξημένο αριθμό των DNTs.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα DNTs δεν ξεπερνούν το 5% του ολικού πληθυσμού των λεμφοκυττάρων στον οργανισμό. Εντούτοις, σε ασθενείς τα επίπεδα αυξάνονται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10% (11).

Άλλα εργαστηριακά ευρήματα που αναφέρονται είναι (14):

- Μη φυσιολογικές τιμές βιοδεικτών όπως αυξημένα επίπεδα βιταμίνης B12, διαλυτού προσδέτη του FAS (sFASL), IgG, ιντερλευκίνης 10 (IL-10) και ιντερλευκίνης 18 (IL-18) σε πλάσμα ή ορό

- In vitro ελαττωματική απόπτωση μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα FAS

A.4 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Δεδομένης της ετερογένειας των κλινικών χαρακτηριστικών του συνδρόμου, η διάγνωση του ALPS βασίζεται σε κλινικές παρατηρήσεις, εργαστηριακά ευρήματα συμπεριλαμβανομένων των αυξημένων κυττάρων DNT στο περιφερικό αίμα αλλά και ταυτοποίηση των βλαβών στα γονίδια που έχουν συσχετιστεί με το νόσημα.

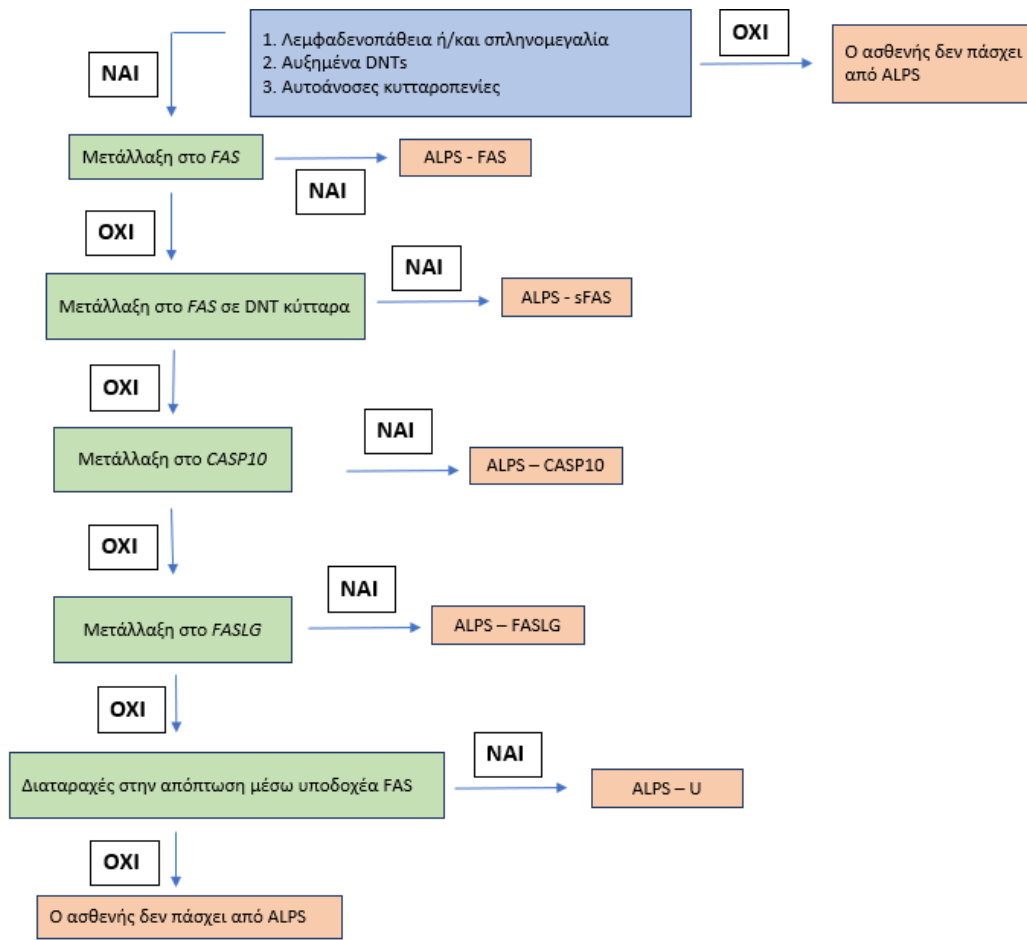
Για την διάγνωση του συνδρόμου έχει προταθεί μια πληθώρα διαγνωστικών κριτηρίων και έχουν διαχωριστεί σε **Απαιτούμενα** και **Συμπληρωματικά** κριτήρια (27).

Τα Απαιτούμενα κριτήρια περιλαμβάνουν χρόνια (> 6 μήνες) μη κακοήθη, μη λοιμώδους αιτιολογίας λεμφαδενοπάθεια ή/και σπληνομεγαλία και αυξημένα επίπεδα κυττάρων α/β-DNT με ταυτόχρονα φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα λεμφοκυττάρων.

Ταυτόχρονα, τα Συμπληρωματικά κριτήρια διακρίνονται σε πρωτεύοντα και δευτερεύοντα. Τα πρωτεύοντα περιλαμβάνουν ανίχνευση ελαττωματικής απόπτωσης λεμφοκυττάρων ή/και ανίχνευση κληρονομικής ή επίκτητης (σωματικής) παθολογικής βλάβης στα γονίδια *CASP10*, *FAS*, ή *FASL*. Στα δευτερεύοντα συμπληρωματικά κριτήρια εντάσσονται τα αυξημένα επίπεδα ιντερλευκίνης 10 (IL-10), ιντερλευκίνης 18 (IL-18), βιταμίνης B12 και διαλυτού προσδέτη του FAS (sFASL), τυπικά ανοσοϊστολογικά ευρήματα καθορισμένα από έμπειρο αιματολόγο, αυτοάνοσες κυτταροπενίες με αυξημένα επίπεδα IgG (πολυκλωνικά) και θετικό οικογενειακό ιστορικό.

Για την αποδείξη **επιβεβαιωμένης και αναμφίβολης** διάγνωσης του συνδρόμου, ο ασθενής πρέπει να πληροί τόσο τα απαιτούμενα κριτήρια όσο και ένα πρωτεύον συμπληρωματικό κριτήριο.

Αντίθετα, η **πιθανή** διάγνωση της νόσου προϋποθέτει την ύπαρξη τόσο των απαιτούμενων κριτηρίων όσο και ενός δευτερεύοντος συμπληρωματικού κριτηρίου. Με βάση τα διαγνωστικά κριτήρια και με σκοπό την ευκολότερη διάγνωση αλλά και την αποφυγή σφαλμάτων έχει δημιουργηθεί ένας διαγνωστικός αλγόριθμος.



Εικόνα 2: Διαγνωστικός Αλγόριθμος

Από: Joao B. Oliveira et al. - Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop, 2010

A.5 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Το σύνδρομο ALPS αποτελεί νόσημα με φαινοτυπική ετερογένεια τα κλινικά χαρακτηριστικά του οποίου εντοπίζονται και σε άλλες λοιμώδεις, αυτοάνοσες και ρευματολογικές καταστάσεις. Γι' αυτό το λόγο η διάγνωσή του δεν μπορεί να τεθεί στη βάση ενός συγκεκριμένου εργαστηριακού ευρήματος.

Για παράδειγμα, πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες με αυτοάνοσες και μη-κυτταροπενίες, οι οποίες εκδηλώνονται στο πλαίσιο της ανοσορρυθμιστικής δυσλειτουργίας, έχουν παρόμοια, αν όχι αλληλεπικαλυπτόμενα χαρακτηριστικά με το ALPS (28). Ταυτόχρονα, άλλες λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές, όπως τα σύνδρομα Castleman, Rosai-Dorfman, το φυλοσύνδετο λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο, η αυτοάνοση λεμφοϋπερπλαστική νόσος Dianzani και η ασθένεια Kikuchi-Fujimoto έχουν παρόμοια κλινικά χαρακτηριστικά.

Από την άλλη, έχει ταυτοποιηθεί η γενετική βάση μιας σειράς κληρονομικών διαταραχών που οδηγούν στην εκδήλωση αυτοάνοσων λεμφοϋπερπλαστικών συνδρόμων. Αυτά διαφέρουν από το τυπικό ALPS διότι επηρεάζουν όργανα και κυτταρικές σειρές εκτός από τα DNT κύτταρα και γι' αυτό το λόγο κατατάσσονται ως διακριτά σύνδρομα στην κλινική πράξη. Σύμφωνα με τη βάση της OMIM, ωστόσο, εντάσσονται στην ταξινόμηση του ALPS. Χαρακτηριστικά τα σύνδρομα αυτά είναι:

A.5.1 CEDS

Η CEDS (Caspase 8 Deficiency) ή Αυτοάνοσο Λεμφοϋπερπλαστικό Σύνδρομο τύπου IIB (29), σε αντίθεση με το ALPS, επηρεάζει εκτός από τα T λεμφοκύτταρα και τα B αλλά και τα NK και οφείλεται σε ομόζυγη μετάλλαξη στο γονίδιο *CASP8*, η οποία εμπλέκεται στο μονοπάτι σηματοδότησης του FAS (28).

A.5.2 PRKCD Deficiency (ALPS III)

Η ανεπάρκεια της PKCδ ή αλλιώς Αυτοάνοσο Λεμφοϋπερπλαστικό Σύνδρομο τύπου III επηρεάζει τα B κύτταρα του ανοσιακού συστήματος και είναι μια σωματική υπολειπόμενη διαταραχή απορρύθμισης του ανοσιακού συστήματος, η οποία οφείλεται σε ομόζυγη μετάλλαξη στο γονίδιο *PRKCD* (30).

A.5.3 RALD (ALPS IV)

Η RALD (RAS-associated Leukoproliferative Disorder – ALPS Τύπου IV) (31) είναι μια διαταραχή, η οποία αφορά σε μεταλλάξεις στα γονίδια *NRAS* και *KRAS* (32) και χαρακτηρίζεται από αιμολυτική αναιμία και ιδιοπαθή θρομβοπενική πορφύρα.

A.5.4 CHAI (ALPS V)

Το CHAI (CTLA-4 Haploinsufficiency with Autoimmune Infiltration ή CTLA-4 απλοανεπάρκεια με αυτοανοσία και λεμφοκυτταρικές διηθήσεις), γνωστό και ως ALPS τύπου V, είναι μια πολύπλοκη αυτοάνοση διαταραχή που κληρονομείται με σωματικό επικρατή χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται υπογαμμασφαιριναιμία.

Το CHAI προκαλείται από μεταλλάξεις του γονιδίου *CTLA-4* στη χρωμοσωμική περιοχή 2q33, γονίδιο που έχει συσχετιστεί και με την κοινή ποικίλη ανοσοανεπάρκεια (CVID).

A.5.5 FADD Deficiency

Η ανεπάρκεια του FADD είναι ένα σπάνιο σωματικό υπολειπόμενο σύνδρομο που κατατάσσεται στις πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες.

Η ανεπάρκεια FADD προκαλείται από ομόζυγες μεταλλάξεις στον σηματοδοτικό αντάπτορα FADD.

A.5.6 DALD

Το DALD (Dianzani Autoimmune Lymphoproliferative Disease) περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Dianzani (35), ο οποίος παρατήρησε μια κλινική εικόνα παρόμοια με αυτή του αυτοάνοσου λεμφοϋπερπλαστικού συνδρόμου, με τη διαφορά ότι οι ασθενείς δεν εμφάνισαν επέκταση των DNTs.

Εμβαθύνοντας, παρατήρησε ότι ενώ τα T κύτταρα εμφάνιζαν ελαττωματική απόπτωση μέσω FAS, το ίδιο το γονίδιο δεν έφερε μεταλλάξεις. Το νόσημα προκαλείται από μία μετάλλαξη στο γονίδιο *PRF1* (36).

Τα παραπάνω νοσήματα αφορούν στην κλασσική ταξινόμηση των ALPS και “ALPS-Like” συνδρόμων. Στη συνέχεια, περιγράφεται ένας αριθμός νοσημάτων των οποίων η διερεύνηση είναι απαραίτητη κατά τη διαφορική διάγνωση του ALPS αν και μπορεί να αποπροσανατολίσουν από αυτή.

A.5.7 Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια (Common Variable Immune Deficiency – CVID)

Ένα σύνολο των ασθενών με ALPS εμφανίζουν συν-νοσηρότητα με CVID. Η διάκριση μεταξύ αυτών των δύο ασθενειών μπορεί να είναι δύσκολη καθώς και οι δύο χαρακτηρίζονται από αυτοάνοσες αιματολογικές ανωμαλίες, συγκεκριμένα κυτταροπενίες.

Ταυτόχρονα, ενώ οι περισσότεροι ασθενείς με ALPS εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα IgG, μπορούν επίσης να εμφανίσουν και υπογαμμασφαιριναιμία, χαρακτηριστικό της CVID (37).

A.5.8 Σύνδρομο Evans (ES)

Ομοίως, το σύνδρομο ES, που χαρακτηρίζεται από την αυτοάνοση καταστροφή τουλάχιστον δύο σειρών αιματολογικών κυττάρων, μπορεί να εμφανίζει μία πληθώρα αλληλεπικαλυπτόμενων κλινικών συμπτωμάτων με το ALPS. Αναφέρεται ότι τουλάχιστον το 1/3 των ασθενών που έχουν διαγνωσθεί με ES πληρούν τα κριτήρια για τη διάγνωση του ALPS (6,25).

A.5.9 Φυλοσύνδετη λεμφοϋπερπλαστική διαταραχή (X-Linked Lymphoproliferative Disease - XLP)

Η XLP προκαλείται από ημιζυγωτικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *SH2D1A* και σχετίζεται με μια ανεπαρκή ανοσολογική απάντηση έναντι του ιού Epstein-Barr (EBV), με αποτέλεσμα ασυνήθιστα σοβαρή και συχνά θανατηφόρα μολυσματική μονοκυρήνωση, υπογαμμασφαιριναιμία ή/και λεμφοϋπερπλαστικές διαταραχές που αφορούν κυρίως τα Β κύτταρα (40).

A.6 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ALPS

A.6.1 Τύποι ALPS

Αναφέρθηκε παραπάνω ότι το σύνδρομο ALPS συσχετίστηκε με μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια που κωδικοποιούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες της οδού σηματοδότησης του υποδοχέα FAS. Ανάλογα με το γονίδιο που εντοπίζεται η μετάλλαξη, το ALPS έχει ταξινομηθεί σε τύπους.

Πίνακας 1: Τύποι του ALPS

Τύπος	Γονίδιο	Ασθένεια	Μετάλλαξη	Ποσοστό περιπτώσεων
ALPS 0	FAS	ALPS - FAS	Συγγενής, ομόζυγη	
ALPS IA	FAS	ALPS - FAS	Συγγενής, ετερόζυγη	65-70%
ALPS IM	FAS	ALPS sFAS	Επίκτητη, ετερόζυγη	15-20%
ALPS IB	FASL	ALPS - FASL	Συγγενής	<1%
ALPS II	CASP10	ALPS Caspase 10	Συγγενής	3-6%
ALPS III	Άγνωστο	ALPS - U	Συγγενής	20%

A.6.2 Μοριακή Βάση

Αν και το ALPS μπορεί να προκληθεί από μεταλλάξεις ενός γονιδίου, είναι μια σύνθετη ασθένεια με διείσδυση και σοβαρότητα που μπορούν να ποικίλουν. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 90 μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με το ALPS (41).

Το συγκεκριμένο νόσημα αποτελεί μία από τις πρώτες καλώς μελετημένες γενετικές ασθένειες που αφορούν στην απόπτωση. Ως επί το πλείστον, συναντώνται ετερόζυγες μεταλλάξεις σε κύτταρα γεννητικής σειράς στο γονίδιο του υποδοχέα FAS, οι οποίες κληρονομούνται με σωματικό επικρατή χαρακτήρα σε περίπου 70% των περιγεγραμμένων περιπτώσεων ALPS (14,20). Παράλληλα, υπάρχουν και περιπτώσεις σωματικής υπολειπόμενης κληρονομικότητας. Εκτός από αυτό, έχουν βρεθεί και περιπτώσεις ασθενών όπου ο κλινικός φαινότυπος εκδηλώθηκε μετά από 2 ή περισσότερες μεταλλάξεις (15).

Η επόμενη πιο συχνή μετάλλαξη περιλαμβάνει σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *FAS* (10% των περιπτώσεων) ή μεταλλάξεις σε γονίδια που επηρεάζουν το σχηματισμό του ενζυμικού συμπλόκου DISC μέσω του οποίου επάγεται τελικά η απόπτωση (13).

Τέλος, έχουν βρεθεί και μελετηθεί μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν τον προσδέτη FASL και την Κασπάση 10 (CASP10) και έχουν συσχετιστεί με το νόσημα σε ποσοστό ALPS-FASL (<1%) και ALPS-CASP10 (<3-6%) αντίστοιχα, καθιστώντας αυτές τις περιπτώσεις πολύ πιο σπάνιες (8).

A.6.3 Γονίδιο APT1

Ο φυσιολογικός έλεγχος του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων είναι απαραίτητος τόσο για την άμυνα του ξενιστή όσο και για την προστασία του οργανισμού από αυτοδραστική ανοσολογική επίθεση (46). Αυτή η διαδικασία ελέγχεται σε μεγάλο ποσοστό από τον υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας FAS (CD95).

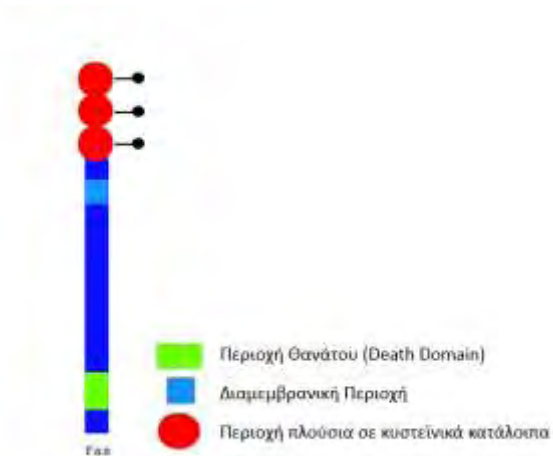
Ο υποδοχέας FAS (CD95) κωδικοποιείται από το γονίδιο *APT1*, ή άλλως *TNFRSF6*, και αποτελεί έναν υποδοχέα κυτταροκινών τρίτης τάξης, η οποία περιλαμβάνει την οικογένεια των παραγόντων νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor - TNF).

Ο υποδοχέας εκφράζεται σε ανώριμα $TCR\alpha\beta^+/CD4^-/CD8^-$ DNT (Διπλά αρνητικά), ενεργοποιημένα T κύτταρα, $TCR\alpha\beta^+/CD4^+/CD8^+$ DPT (διπλά θετικά) κύτταρα σε υψηλά επίπεδα (48) και καρκινικά κύτταρα, γεγονός που εν μέρει εξηγεί γιατί τα συγκεκριμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα έναντι στην απόπτωση που μεσολαβείται από τον υποδοχέα (49). Επίσης, ο υποδοχέας καταστέλλεται σε ώριμα θυμκύτταρα (50).

Το γονίδιο *APT1* βρίσκεται στην χρωμοσωμική περιοχή 10q23.31 και περιέχει 9 εξόνια που κωδικοποιούν για 335 αμινοξέα. Ο υποδοχέας FAS αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές:

- Μία εξωκυτταρική περιοχή πλούσια σε κυστείνες μέσω της οποίας συνδέεται με τον προσδέτη του και κωδικοποιείται από τα εξόνια 1-5,
- Μία διαμεμβρανική περιοχή TM που κωδικοποιείται από το εξόνιο 6,

- Μία ενδοκυτταρική περιοχή που περιέχει μία Death Domain, μέσω της οποίας ο υποδοχέας μπορεί να συνδεθεί με σηματοδοτικούς αντάπτορες όπως το μόριο FADD και να επάγει απόπτωση. Η ενδοκυτταρική περιοχή κωδικοποιείται από τα εξόνια 7-9.



Εικόνα 3: Υποδοχέας FAS

Από: www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/cell-biology-products

Επιπρόσθετα, ο FAS μεσολαβεί τον αποπτωτικό θάνατο είτε καρκινικών είτε μολυσμένων από ιό κυττάρων, όταν αυτά αλληλεπιδρούν με ένα CD8+ κυτταροτοξικό T λεμφοκύτταρο (51), δρώντας συνεργατικά με το μόριο περφορίνη και διάφορες κυτταροκίνες, όπως ο (TNF α) και η ιντερφερόνη- γ (48).

Επίσης, ο FAS απαιτείται για την αποτελεσματική αναγέννηση του ήπατος έπειτα από μερική ηπατεκτομή (55). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα οδηγεί στην μετανάστευση επιθηλιακών κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από την ιντεργκρίνη β 8 (56) και, ταυτόχρονα, παρέχει ένα μιτογόνο σήμα στα αστροκύτταρα του ήπατος μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor - EGFR) (57).

Επιπλέον, ο υποδοχέας είναι σημαντικός για την ανάπτυξη των νευρώνων (59).

Εκτός από το ALPS, η σηματοδότηση FAS έχει συσχετιστεί και με άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως χαμηλό κίνδυνο για μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (60) και γλοιοβλάστωμα (61).

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί παραπάνω από 50 μεταλλάξεις του γονιδίου *APT1* που έχουν συσχετιστεί με το νόσημα. Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών εντοπίζονται στα εξόνια 7-9, υποδεικνύοντας έτσι την σημασία της Death Domain στην επαγωγή της απόπτωσης (22). Στη συνέχεια, απεικονίζονται οι συχνότερες και πιο επιβλαβείς μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί.

Πίνακας 2: Μεταλλάξεις του Υποδοχέα FAS

Αλλαγή στην αλληλουχία του DNA	Αλλαγή στην πρωτεΐνη	Εξόνιο	Απόπτωση μέσω FAS	TK
c.232delG (43)	p.Asp78Metfs	3	ΜΦ	ΣΥ
c.334+2dup(43)	Splice variant		ΜΦ	ΣΥ
c.721A>C(43)	p.Thr241Pro	4	ΜΦ	ΣΥ
c.569-2A>C(43)	Splice variant	6	ΜΦ	ΣΥ
c.817C>T(43)	p.Gln273Ter	9	ΜΦ	ΣΥ
c.361C>T(62)	p.Arg121Trp	4	ΜΦ	ΣΥ
c.695A>G (62)	p.Tyr232Cys	9	ΜΦ	ΣΥ
c.779A>T(63)	p.Asp260Val	9	ΜΦ	ΣΕ
c.749G>C (64)	p.Arg250Pro	9	ΜΦ	ΣΥ
c.809C>T (64)	p.Thr270Ile	9	ΜΦ	ΣΥ
c.651+2T>A (64)	Splice Variant		ΜΦ	ΣΥ
c.73G>A (22)	p.Ala25Thr	2	ΜΦ	ΣΥ
c.968_987dup(62,65)	p.Glu330Lysfs	9	ΜΦ	ΣΥ
c.763A>G (66)	p.Asn255Asp	9	ΜΦ	ΣΥ
c.353A>G (66)	p.Asn118Ser	4	ΜΦ	ΣΥ
c.532T>C (66)	p.Cys178Arg	6	Άγνωστο	ΣΥ
c.740G>C (67)	p.Gly247Ala	9	ΜΦ	ΣΥ
c.651+2T>C (68)	Splice Variant		ΜΦ	ΣΕ
c.692_693insT (68)	p.Lys231Asnfs	9	ΜΦ	ΣΥ
c.778G>T (68)	p.Asp260Tyr	9	ΜΦ	ΣΥ
c.-1378G>A (69)	Splice Variant		ΜΦ	ΣΥ

Επεξηγήσεις: ΜΦ = Μη φυσιολογικό, ΣΥ = Σωματικό Υπολειπόμενο, ΣΕ = Σωματικό Επικρατές

A.6.4 Γονίδιο *APTL1*

Ο υποδοχέας FAS μπορεί να σηματοδοτήσει την έναρξη ενός καταρράκτη συμβάντων που οδηγούν στην απόπτωση, με την προϋπόθεση ότι θα αλληλεπιδράσει με τον προσδέτη του, τον FASL (CD95L), ο οποίος εκφράζεται σε ενεργοποιημένα Β, Τ και κύτταρα ΝΚ.

Ο FASL συμβάλλει στην εγκαθίδρυση και διατήρηση του ελεύθερου ανοσιακών κυττάρων περιβάλλοντος σε περιοχές που προστατεύονται από αιματολογικούς φραγμούς, όπως ο εγκέφαλος και οι όρχεις. Σε αυτές, η έκφραση του FASL οδηγεί στην απόπτωση των εισβάλλοντων Τ λεμφοκυττάρων (70).

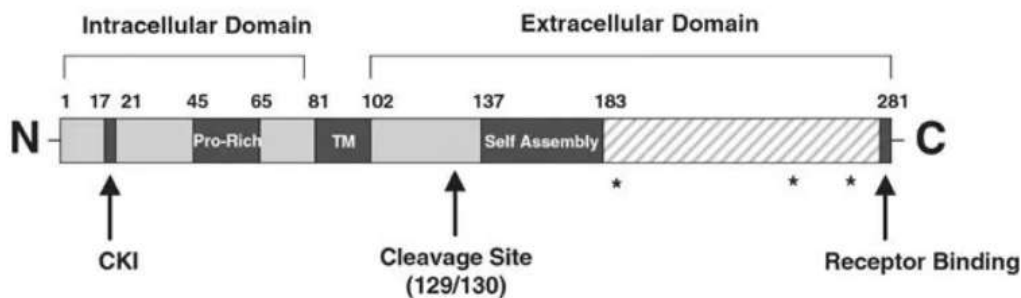
Επιπλέον, ο FASL παίζει κομβικό ρόλο και στην ανοσιακή ανοχή όπως έχει δειχθεί σε οφθαλμούς μετά από μεταμόσχευση κερατοειδούς αλλά και στην ανοχή του εμβρύου (ως ξένο σώμα) από την μητέρα (70,71).

Τέλος, είναι γνωστό ότι οι όγκοι υπερεκφράζουν τον προσδέτη, με αποτέλεσμα την επαγωγή απόπτωσης στα εισβάλλοντα λεμφοκύτταρα, επιτρέποντας έτσι στα καρκινικά κύτταρα να διαφύγουν από την ανοσιακή απάντηση (72).

Ο προσδέτης FASL κωδικοποιείται από το γονίδιο *APT1LG1*, το οποίο εντοπίζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 1q24.3 και αποτελείται από 4 εξόνια που κωδικοποιούν για 281 αμινοξέα.

Ο FASL είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II και ανήκει στην οικογένεια παραγόντων νέκρωσης όγκων. Όπως και ο υποδοχέας του, αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές:

- Μία εξωκυτταρική περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση των σχετικών υποδοχέων
- Μια διαμεμβρανική περιοχή (TMD), η οποία σχετίζεται με την αγκυροβόληση της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη,
- Μια ενδοκυτταρική περιοχή που είναι απαραίτητη για τη μετατόπιση του προσδέτη σε λιπιδικές σχεδίες



Εικόνα 4: Δομή της πρωτεΐνης του FASL

Από: M. Kanurta & L. M. Khachigian - Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression, 2003

Εκτός από τον υποδοχέα FAS, ο FASL μπορεί να αλληλεπιδράσει και με τον υποδοχέα DcR3 (Decoy receptor 3). Ο DcR3 ανήκει στην υπερικογένεια παραγόντων νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factors - TNF) και μπορεί να προσδεθεί με τα μόρια FASL, LIGHT και TL1A. Ωστόσο, ο DcR3 ανευρίσκεται μόνο σε διαλυτή μορφή και χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα μεταγωγής σήματος. Ως αποτέλεσμα, ο κύριος ρόλος του είναι η αλληλεπίδραση με τον FASL, ώστε να δράσει ανταγωνιστικά και να εμποδίσει την αλληλεπίδραση FAS – FASL (73). Οι μεταλλάξεις του προσδέτη που έχουν περιγραφεί και συσχετιστεί με το ALPS παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Μεταλλάξεις του FASL

Αλλαγή στην αλληλουχία του DNA	Αλλαγή στην πρωτεΐνη	Εξόνιο	Πρωτεΐνη	Απόπτωση μέσω FAS	AICD	DNTs	TK
c.203dupT (41)	p.Ala69fsTer138	1	Απουσία	Φ	A	↑	ΣΥ
c.263delT (26)	p.Phe87fsTer95	1	Απουσία	Φ	↓	↑	ΣΥ
c.466A>G (74)	p.Arg156Gly	4	Φ	MΦ	A	Φ	ΣΕ
c. 472_555del (75)	p.Met158_Glu185del	4	A	ND	↓	Φ	ΣΕ
c.605G>C (76)	p.Cys202Ser	4	Φ	Φ	↓	↑	ΣΥ
c.740C>A (10)	p.Ala247Glu	4	Φ	Φ	↓	↑	ΣΥ
c.829G>A (77)	p.Gly277Ser	4	Φ	Φ	↓	↑	ΣΥ

Επεξηγήσεις: AICD = activation-induced cell death, ΣΥ = Σωματικό Υπολειπόμενο, ΣΕ = Σωματικό Επικρατές, A = Απροσδιόριστο, TK = Τρόπος Κληρονομής, Φ = Φυσιολογικό, MΦ = Μη φυσιολογικό, ↑ = Αύξηση, ↓ = Μείωση, Όλες οι μεταλλάξεις έχουν συσχετιστεί με το ALPS εκτός από την p.Met158_Glu185del

A.6.5 Γονίδιο CASP10

Η Κασπάση 10 είναι πρωτεάση κυστεΐνης ειδική για κατάλοιπα ασπαρτικού της οικογένειας ICE/CED3. Η Κασπάση 10 κωδικοποιείται από το γονίδιο *CASP10* που βρίσκεται στην χρωμοσωμική περιοχή 2q33.1 και αποτελείται από 11 εξόνια που κωδικοποιούν για 522 αμινοξέα.

Οι Κασπάσες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ως αδρανή προένζυμα, τα οποία ονομάζονται Προκασπάσες. Η ενεργοποίησή τους περιλαμβάνει την πρωτεόλυση τους από μία άλλη ενεργή Κασπάση, και ακολουθείται από το σχηματισμό μιας μικρής και μιας μεγάλης υπομονάδας, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν την ενεργή Κασπάση. Η Κασπάση 10 πρωτεολύει και ενεργοποιεί τις Κασπάσες 3 και 7, ενώ η ίδια υφίσταται πρωτεόλυση από την Κασπάση 8.



Εικόνα 5: Κασπάση 10

Από: Susan E. Logue, Seamus J. Martin - *Caspase activation cascades in apoptosis*, *Biochemical Society Transactions*, 2008

Πίνακας 4: Μεταλλάξεις του CASP10

Αλλαγή στην αλληλουχία του DNA	Αλλαγή στην πρωτεΐνη	Εξόνιο
c.1228G>A	p.Val410Ile	9
c.853C>T, (724C>T)	p.Leu285Phe, (Leu242Phe)	8
c.1216A>T, (1087A>T)	p.Ile406Leu, (Ile363Leu)	9
c.1337A>G (18), (1208A>G)	p.Tyr446Cys	9

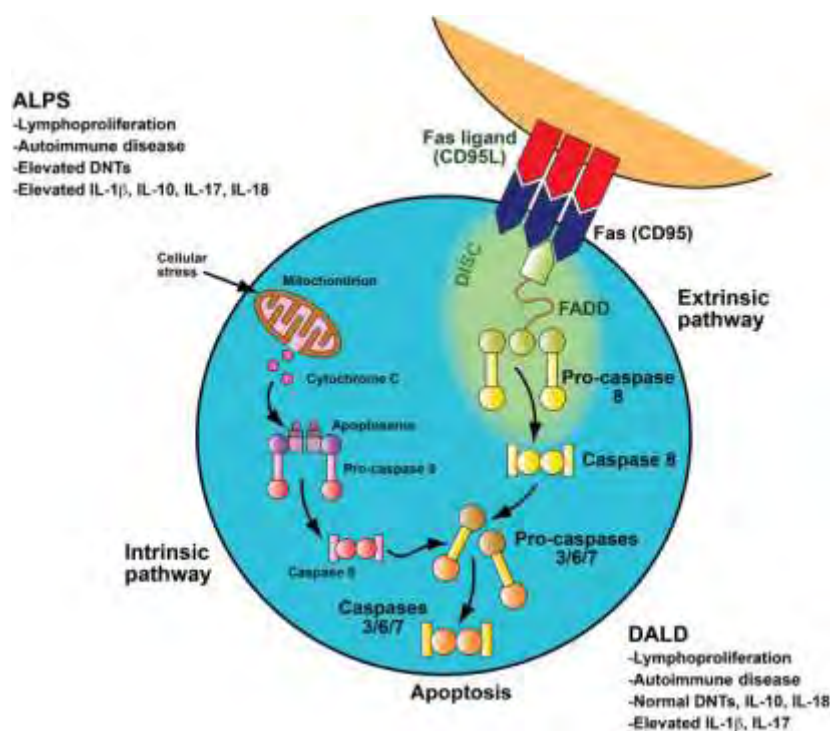
A. 7 ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ FAS

Ο υποδοχέας FAS έπειτα από τη σύνδεση με τον FASL τριμερίζεται και αλληλεπιδρά μέσω της περιοχής DD (Death Domain) με σηματοδοτικούς αντάπτορες όπως ο FAF-1 (FAS-Associated Factor-1), **το μόριο FADD** (FAS-Associated Death Domain), η FAF-1 και η RIP (πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με υποδοχείς).

Το FADD φέρει μία περιοχή DED και μέσω αυτής αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Προκασπάση 8 που βρίσκεται σε αδρανή κατάσταση. Αυτό το σύμπλεγμα πρωτεϊνών που δημιουργείται είναι γνωστό ως DISC.

Η Προκασπάση 8 ενεργοποιείται πρωτεολυτικά στην Κασπάση 8. Στη συνέχεια, η Κασπάση 8 πρωτεολύει και ενεργοποιεί την Προκασπάση 10.

Τέλος, η Κασπάση 10 επάγει με τον ίδιο τρόπο την ενεργοποίηση των Προκασπασών 3,6 και 7 και επάγεται η απόπτωση.



Εικόνα 6: Μονοπάτι σηματοδότησης FAS-FASL

Από: Teachey DT et al. - Targeting cytokines in ALPS: it's FASHionable, 2014 Feb

A. 8 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η διαχείριση του ALPS εστιάζει στην αντιμετώπιση των πρωτοπαθών παθολογικών εκδηλώσεων, δηλαδή στην λεμφοϋπερπλασία και τις αυτοάνοσες εκδηλώσεις.

Η θεραπεία για τις αυτοάνοσες κυτταροπενίες περιλαμβάνει τη χορήγηση υψηλών δόσεων κορτικοστεροειδών με ή χωρίς ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης (Intravenous Immunoglobulin - IVIG) καθώς και το μονοκλωνικό αντίσωμα Rituximab που χρησιμοποιείται σε πολλές αυτοάνοσες ασθένειες όπως η Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία και η Ιδιοπαθής Θρομβοπενική Πορφύρα (78).

Ένας άλλος θεραπευτικός παράγοντας έναντι του ALPS είναι Mycophenolate Mofetil (MMF)(79) , το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη και των T και B κυττάρων, περιορίζοντας έτσι την αυτοάνοση καταστροφή των υγιειών κυττάρων.

Για την αναστολή του έντονου πολλαπλασιασμού των DNTs χρησιμοποιείται επιτυχώς το Sirolimus (80) και άλλοι ανοσοκατασταλτικοί και χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, όπως η βινκριστίνη και η μερκαπτοπουρίνη (30,77).

B. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής είναι η προτυποποίηση και μοριακή ανάλυση των τριών γονιδίων (*FAS*, *FASL*, *CASP10*) σε άτομα που πιθανολογείται η ύπαρξη Αυτοάνοσου Λεμφοϋπερπλαστικού Συνδρόμου. Να ληφθεί υπόψιν ότι μέχρι στιγμής στην Ελλάδα δεν έχει πραγματοποιηθεί γενετική ανάλυση αυτών των γονιδίων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. 1 ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 16 άτομα από 14 οικογένειες. Δεκατρία άτομα ήταν ασθενείς με πιθανό φαινότυπο ALPS και 3 υγιείς δότες (Πίνακας 5).

Τα δείγματα δόθηκαν με τη συγκατάθεση των γονέων και προήλθαν από το Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και πρόκειται για ασθενείς που είτε παρακολουθούνται από το ίδιο εργαστήριο είτε στάλθηκαν για ανάλυση από άλλα τμήματα, συμπεριλαμβανομένων των Ιπποκράτειο και ΑΧΕΠΑ Νοσοκομείων Θεσσαλονίκης.

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε μια οικογένεια 6 ατόμων (γονείς και τέσσερα παιδιά), εκ των οποίων η μητέρα και οι τρεις γιοι της έπασχαν από Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία, θρομβοπενίες και σπληνομεγαλία, φαινότυπος που υποδεικνύει ALPS. Ταυτόχρονα ο πατέρας των παιδιών και η κόρη δεν εμφάνιζαν συμπτώματα νόσου (P1-6).

Επιπλέον, μελετήθηκαν 2 άτομα (P15-16), ένας πατέρας με το γιο του, εκ των οποίων ο γιος παρουσίαζε πιθανό φαινότυπο ALPS ενώ ο πατέρας ήταν ασυμπτωματικός. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η μητέρα του παιδιού πέθανε από λέμφωμα.

Τέλος, εξετάστηκαν 9 άτομα από διαφορετικές οικογένειες τα οποία εμφάνιζαν αυτοάνοσες εκδηλώσεις, σπληνομεγαλία και αυξημένα επίπεδα DNTs. Στον Πίνακα 5 απεικονίζονται οι ηλικίες (μέση ηλικία 16 έτη), η ύπαρξη ή όχι σπληνοπατομεγαλίας, η ύπαρξη και το είδος λεμφαδενοπάθειας και αυτοάνοσων κυτταροπενιών καθώς και η ύπαρξη άυξης ή μη των επιπέδων των DNTs.

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των ασθενών και των υγείων μαρτύρων της μελέτης

Ασθενής	Ηλικία	Φύλο	Σπληνομεγαλία /Ηπατομεγαλία	DNTs (%)	Λεμφαδενοπάθεια/ Αυτοάνοσες Κυτταροπενίες
(1)	11	Θήλυ	-	Φ	-
(2)	16	Άρρεν	+	↑	ΑΙΗΑ, Θρομβοπενική Πορφύρα
(3)	15	Άρρεν	+	↑	ΑΙΗΑ
(4)	48	Άρρεν	-	Φ	-
(5)	15	Άρρεν	+	↑	Θρομβοπενίες, ΑΙΗΑ
(6)	48	Θήλυ	+	↑	Θρομβοπενίες, ΑΙΗΑ
(7)	6	Θήλυ	+	↑	Θρομβοπενίες
(8)	14	Άρρεν	+	↑	Θρομβοπενίες
(9)	13	Άρρεν	+	↑	ΑΙΗΑ, θρομβοπενία
(10)	14	Άρρεν	+	↑	Θρομβοπενίες
(11)	13	Άρρεν	+	↑	Αυτοάνοση Θυροειδίτιδα
(12)	9	Θήλυ	+	↑	Θρομβοπενίες
(13)	9	Θήλυ	+	↑	Θρομβοπενίες
(14)	11	Άρρεν	+	↑	Θρομβοπενίες
(15)	4	Άρρεν	+	↑	Τραχηλική Λεμφαδενοπάθεια, ΑΙΗΑ
(16)	37	Άρρεν	-	Φ	-

A.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΈΡΕΥΝΑΣ

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την μοριακή μελέτη του συνδρόμου ήταν περιφερικό αίμα. Η εργαστηριακή διαδικασία περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα
2. Σχεδιασμός ειδικών εκκινήτων για κάθε εξόνιων των γονιδίων υπό μελέτη και PCR
3. Sequencing και εντοπισμός γονιδιωματικών αλλαγών

A.2.1 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το PureLink® Genomic DNA Kit (Qiagen & Invitrogen). Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον κατασκευαστή του παρασκευάσματος, το οποίο περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

1. Σε σωληνάριο φυγοκέντρησης των 1.5 mL έγινε προσθήκη 200 µL περιφερικού αίματος.

2. Ακολούθησε η προσθήκη 20 μL πρωτεϊνάσης K και 20 μL RNAάσης και στη συνέχεια ανάδευση και επώαση για 2 min.
3. Ύστερα, προστέθηκαν 200 μL διαλύματος λύσης (PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer) και έπειτα ακολούθησε ανάδευση
4. Κατόπιν, τα διαλύματα επώαστηκαν στους 55° C για 40-60 min.
5. Έπειτα προστέθηκαν 200 μL αιθανόλης 96-100% και ακολούθησε μεταφορά του μείγματος σε ειδική στήλη (PureLink® Spin Column).
6. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 1 min και ακολούθησαν δύο διαδοχικές πλύσεις της στήλης, με προσθήκη 500 μL από τα διαλύματα Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2 και φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 1 min και στα 13.400 rpm για 3 min
7. Τέλος, η στήλη μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο φυγοκέντρησης των 1,5 mL όπου και προστέθηκαν 100 μL διαλύματος έκλουσης (PureLink Genomic Elution Buffer) και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 13.400 rpm για 1 min.
8. Τα δείγματα DNA διατηρούνται στους -20° C για μεγάλο χρονικό διάστημα

A.2.2 Σχεδιασμός εκκινητών και συνθήκες PCR

A.2.2.1 PCR FAS

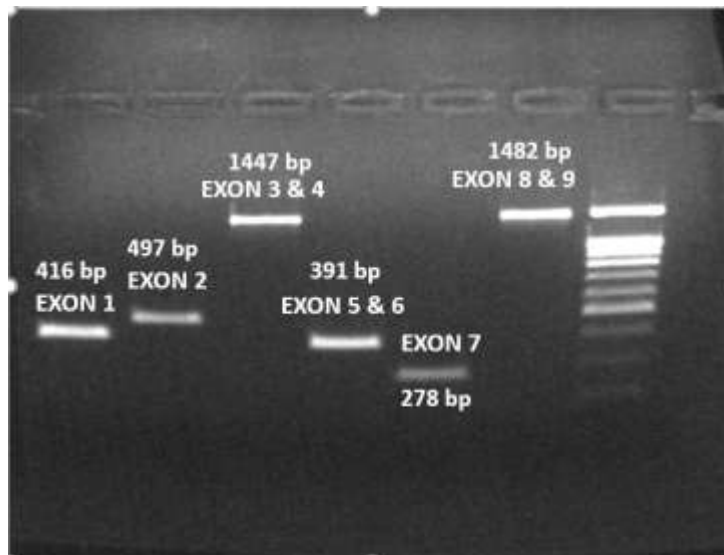
Για την μελέτη του *FAS* χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές με βάση βιβλιογραφία (81) για την ενίσχυση των 9 εξονίων του γονιδίου. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι για κάποια εξόνια συμπίχθηκαν σε μία αντίδραση PCR για εξοικονόμηση χρόνου και πόρων καθώς τα μεταξύ τους ιντρόνια ήταν πολύ μικρά σε μέγεθος. Αυτή η διαδικασία έγινε για τα εξόνια 3-4, 5-6 και 8-9. Παρακάτω απεικονίζονται οι πρόσθιοι και οπίσθιοι εκκινητές για το γονίδιο *FAS* καθώς και οι συνθήκες της PCR για κάθε εξόνιο. Στην Εικόνα 7 απεικονίζονται και τα μεγέθη των προϊόντων.

Πίνακας 6: Εκκινητές FAS

Εξόνιο	Εμπρόσθιος Εκκινητής (F)	Οπίσθιος Εκκινητής (R)
1	5' - CGCGCAGGCCAAGTTGCTGAATCAAT - 3'	5' -CCGGGACTAAGACGGGGTAAGCCTCCAC-3'
2	5' - GGGTTACACGGTTTACAGTTGCTTACTT - 3'	5' -ATGGAGCCAAATAGACCAGTCTTCTCATT -3'
34	5' - CCTGTTACCTGCCGTGTCCTGTTCAAACACTTGCTCCT - 3'	5' -CAAAGCAGGACTAGAACCCCTAA -3'
56	5' - GGCCCTAATTTACAAAG TGCCATTG - 3'	5' -CTGCAGTTTGAACAAAGCAAGAAC-3'
7	5' - CATTCTACAAGCTGAGACCTGAGTTGATA - 3'	5' -CAGCCTGGGCTATGGAGCAAGAC-3'
89	5' - GCCGGAACCTTTCAGAATAA - 3'	5' - AAACATCCTTGGAGGCAGAA-3'

Πίνακας 7: PCR FAS

Στάδιο		Εξόνιο					
		1	2	3-4	5-6	7	8-9
Αρχική αποδιάταξη	Θερμοκρασία Διάρκεια	94° C 2 min					
Αποδιάταξη	Θερμοκρασία Διάρκεια	94° C 30 sec					
Υβριδισμός	Θερμοκρασία Διάρκεια	59° C 30 sec	61° C 30 sec	58° C 30 sec	61° C 30 sec	62° C 30 sec	59° C 30 sec
Επέκταση	Θερμοκρασία Διάρκεια	72° C 1 min				72° C 30 sec	72° C 1 min
Τελική Επέκταση	Θερμοκρασία Διάρκεια	72° C 5 min					72° C 1 min
Κύκλοι		32					



Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση εξονίων του FAS

A.2.2.2 PCR FASL

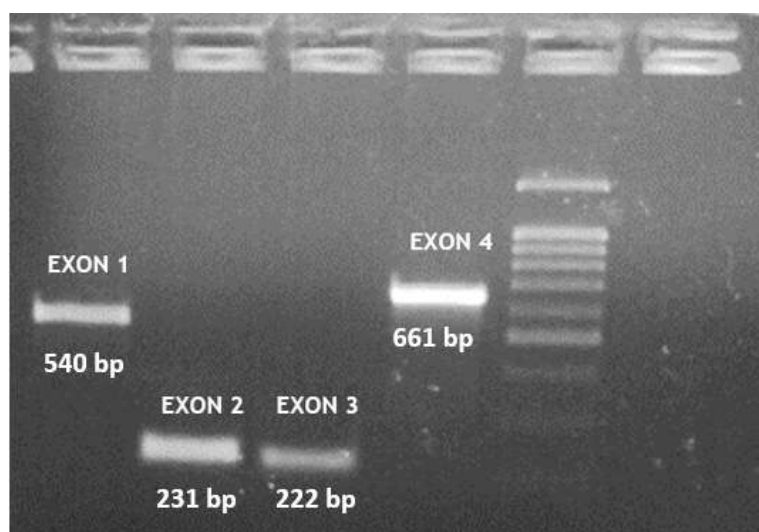
Ομοίως με τον FAS, οι εκκινητές για τον προσδέτη σχεδιάστηκαν με βάση τη βιβλιογραφία (74), ωστόσο οι συνθήκες της PCR προσαρμόστηκαν. Παρακάτω απεικονίζονται πίνακες με τους εκκινητές του FASL και τις συνθήκες για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Πίνακας 8: Εκκινητές FASL

Εξόνιο	Εμπρόςθιος Εκκινητής (F)	Οπίσθιος Εκκινητής (R)
1	5'-TTGCCTCCTCTTGAGCAGTCA – 3'	5'- CACTTTGCAAGCCAGGCAGT – 3'
2	5'- GCAGAACTTCTGAGGTATTTGGATTTC – 3'	5'- CATTAACATAGTTCTGTGCTGAGGATCATC – 3'
3	5'- TATGTTAGACTGTTGCCATTTACGG – 3'	5'- AAGCTTTCCCAAATCTCACCTGTA – 3'
4	5'- AGCTGTCATTCTGGGTGAAACATT – 3'	5'- GACATTTTGAACCCTGTGGTCTC – 3'

Πίνακας 9: PCR FASL

Στάδιο		Εξόνιο			
		1	2	3	4
Αρχική Αποδιάταξη	Θερμοκρασία Διάρκεια	94° C 2 min	94° C 2 min	94° C 5 min	94° C 2 min
Αποδιάταξη	Θερμοκρασία Διάρκεια	94° C 30 sec			
Υβριδισμός	Θερμοκρασία Διάρκεια	60° C 30 sec		61° C 30 sec	
Επέκταση	Θερμοκρασία Διάρκεια	72° C 30 sec			
Τελική Επέκταση	Θερμοκρασία Διάρκεια	72° C 1 min			
Κύκλοι		30	30	32	31



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση εξονίων του FASL

A.2.2.3 PCR CASP10

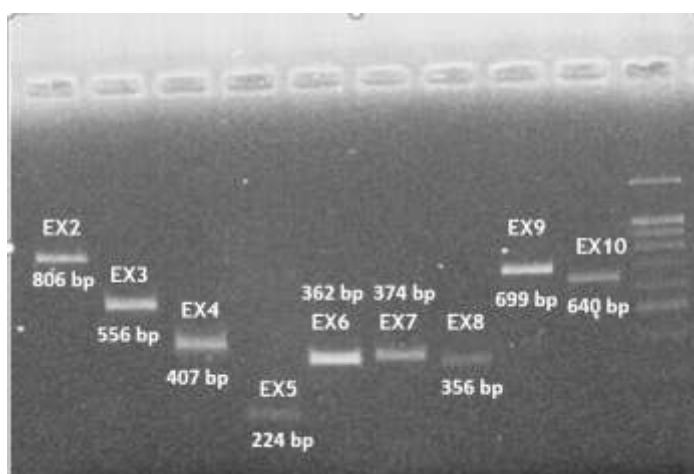
Όσον αφορά την Κασπάση 10, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν από εμάς πλην των εκκινητών για το εξόνιο 5 (82).

Πίνακας 10: Εκκινητές CASP10

Εξόνιο	Εμπρόςθιος Εκκινητής (F)	Οπίσθιος Εκκινητής (R)
2	5'- TTTTGAAGTAGCCTCGCCGTAA- 3'	5'- TAAGCAGGGAAAAACACGGGC- 3'
3	5'- GGAATCAGGAGATGGGAAGGC- 3'	5'- AGCACCAAAGCCAATGTTTCG- 3'
4	5'- CCTGAGCAACTTGAGGGCAG- 3'	5'- CTGGGTGACAGAGTGAGTGAGAC- 3'
5	5' – ACTGCAACCTCCGCCTCTG – 3'	5' – CATTGACCAGCACACCACTGAACC – 3'
6	5'- AATGACCTTTTCTGTGGCTGTG- 3'	5'- ACCCAGCCCTCTCCATACTG- 3'
7	5'- GAATTTGTCTCAGGAGGGCCTTG - 3'	5'- CAGAGAGAGGGAGAAAACAAGTCTG- 3'
8	5' – CTGCTTTCCTCACAGTGGA – 3'	5' – CTCCCAGGGATATATAAGAGGC – 3'
9	5' – TGTGCCCGGCCTTGTTC A – 3'	5' – ACAACGTAGA AACTCTCACCCCTTAC – 3'
10	5' –GTGGTTTCTACCTCCTGACTGAAAA– 3'	5' –ATCAGAATTGACTGTGTTCAGAAAAAC-3'

Πίνακας 11: PCR CASP10

Στάδιο		Εξόνιο									
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Αρχική Αποδιάταξη	Θερμοκρασία	94° C			94° C	94° C	94° C		94° C	94° C	
	Διάρκεια	5 min			2 min	5 min	2 min		5 min	2 min	
Αποδιάταξη	Θερμοκρασία	94° C		94° C	94° C						
	Διάρκεια	30 sec		45 sec	30 sec						
Υβριδισμός	Θερμοκρασία	62° C	56° C	60° C	62° C	60° C	59° C	53° C	54° C	55° C	
	Διάρκεια	30 sec	30 sec	45 sec	20 sec	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	
Επέκταση	Θερμοκρασία	72° C			72° C					72° C	
	Διάρκεια	1 min	30 sec					1 min			
Τελική Επέκταση	Θερμοκρασία	72° C			72° C					72° C	72° C
	Διάρκεια	5 min	1 min					5 min	1 min		
Κύκλοι		30			29	32	30	32		30	



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση εξονίων του CASP10

A.2.2.4 Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Έπειτα από την PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 2% [2 γραμμάρια αγαρόζης (w/v) σε 100 ml ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE]. Η ηλεκτροφόρηση είναι απαραίτητη για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων της PCR καθώς η ύπαρξη και μόνο μιας ζώνης δεν είναι ενδεικτική του ειδικού προϊόντος αφού μπορεί να οφείλεται σε επιμόλυνση των δειγμάτων.

Για τον εντοπισμό των ζωνών DNA στο πήκτωμα, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 0.5 ng/mL. Πρόκειται για μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε μόρια DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Σε κάθε δείγμα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής (loading dye) σε αναλογία 1/6 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται (5 μL δείγματος, 1 μL χρωστική) προκειμένου να είναι διακριτή η μετανάστευσή τους στη γέλη. Κατόπιν, το κάθε μείγμα μεταφέρεται στις οπές της και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V και 400 mA για 30 min.

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μοριακών βαρών ο 100 bp DNA Ladder. Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (UVITEC, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού 'gel capture' (DNR Bioimaging Systems), ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή bitmap.

A.2.3 Αλληλούχιση των Προϊόντων της PCR

A.2.3.1 Καθαρισμός των Προϊόντων της Pcr

Πριν την τελική διαδικασία της αλληλούχισης, τα προϊόντα της PCR καθαρίστηκαν από τους εκκινητές, περίσσεια νουκλεοτιδίων, ενζύμων και αλάτων.

Ο καθαρισμός έγινε με τη χρήση των Extract ME DNA Clean-up kit της Blirt DNA GDANSK και Purelink Quick Gel Extraction Kit/QiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen/Invitrogen).

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Προσθήκη διαλύματος πρόσδεσης που περιέχει ισοπροπανόλη (Binding Buffer, B2) σε κάθε φιαλίδιο με προϊόν PCR, σε όγκο διπλάσιο από αυτόν του προϊόντος (~75 μ L)
2. Μεταφορά σε ειδικές στήλες (Purelink PCR Purification Kit)
3. Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 30 sec και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης
4. Πρώτη πλύση της στήλης με προσθήκη 700 μ L ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer)
5. Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 30 sec
6. Δεύτερη πλύση της στήλης με προσθήκη 700 μ L ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer)
7. Φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 30 sec
8. Ακολουθεί μία ακόμη φυγοκέντρηση (11.000 στροφές για 3 min), χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης από την στήλη.
9. Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 1.5 mL, προστίθενται σε αυτή 30 μ L διαλύματος έκλουσης (10 Mm Tris-HCL, pH 8.5) και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 min.

Για την απομάκρυνση τυχόν παραπροϊόντων, αντί της παραπάνω μεθόδου, ο καθαρισμός πραγματοποιείται με τη χρήση του PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). Αυτή η μέθοδος πραγματοποιήθηκε για το εξόνιο 7 του γονιδίου *FAS* και το εξόνιο 5 της Κασπάσης 10.

1. Αρχικά, το προϊόν της PCR ηλεκτροφορείται για 50 min σε γέλη αγαρόζης 3%
2. Κατόπιν τοποθετείται σε μηχανήμα που εκπέμπει υπεριώδες φως (UV transilluminator, UVITEC, Cat.No. M031308), προκειμένου να απομονωθεί με νυστέρι η επιθυμητή δέσμη
3. Ακολουθεί μεταφορά της σε φιαλίδιο
4. Εκεί προστίθεται το διάλυμα L3 (Gel Solubilization Buffer) σε όγκο τριπλάσιο από αυτόν της γέλης που απομονώθηκε και έπειτα επώαση σε υδατόλουτρο, στους 50^o C για 30-40 min

5. Στη συνέχεια προσθέτουμε στο φιαλίδιο έναν όγκο ισοπροπανόλης, αναδεύουμε και μεταφέρουμε το περιεχόμενο σε ειδική στήλη (Quick Gel Extraction Column, Invitrogen)
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 min, απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρησης και προσθήκη 500 μL διαλύματος πλύσης (Wash Buffer, W1) που περιέχει αιθανόλη.
7. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 min και ακολουθεί ακόμη μία, χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, στις 14.000 στροφές για 2 min, προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα του διαλύματος πλύσης και της αιθανόλης.
8. Τέλος, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 1.5 mL, προστίθενται σε αυτή 30 μL διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer, E5) και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 1 min.

Και στις δύο μεθόδους τα καθαρισμένα προϊόντα ανακτώνται σε τελικό όγκο περίπου 28 μL και κατόπιν ηλεκτροφορούνται, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, για τον έλεγχο και τον προσδιορισμό της ποσότητας και της ποιότητάς τους. Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR αποθηκεύονται στους -20° C, μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της αλληλουχίας τους.

A.2.3.2 Αλληλούχιση

Για την αλληλούχιση των ειδικών προϊόντων χρησιμοποιήθηκε η τυποποιημένη μέθοδος SANGER. Τα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν με χρήση του ABI Prism BigDye (v1.1) και αναλύθηκαν με το ABI 3100 Sequencer. Οι εκκινητές της αλληλούχισης απεικονίζονται στους Πίνακες 12, 13 και 14. Η κωδική αλληλουχία των γονιδίων συγκρίθηκε με τις εξής αλληλουχίες (από την βάση ensemble) [ENST00000652046.1](#) για το γονίδιο *FAS*, [ENST00000286186.10](#) για το γονίδιο *CASP10*, [ENST00000367721.3](#) για το γονίδιο *FASL*. Για την ανάλυση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SNAP GENE VIEWER.

Πίνακας 12: Εκκινητές Αλληλούχισης του FAS

Εξόνιο	Εκκινητής
1	5' – CGCGCAGGCCAAGTTGCTGAATCAAT – 3'
2	5' – ATGGAGCCAAATAGACCAGTCTTCTCATT – 3'
3 & 4	5' - CCTGTTCAAACACTTGCTCCT – 3' 5' – TTCTGGCCTTGACTTACGC – 3'
5 & 6	5' - GGCCCCTAATTTACAAAGTGCCATTG – 3' 5' – CTGCAGTTTGAACAAAGCAAGAAC – 3'
7	5' – CAGCCTGGGCTATGGAGCAAGAC – 3'
8 & 9	5' – GCCGGAACCTTTCAGAATAA – 3' 5' – AAACATCCTTGGAGGCAGAA – 3'

Πίνακας 13: Εκκινητές Αλληλούχισης του CASP10

Εξόνιο	Εκκινητής
2	5'- TAAGCAGGGAAAACACGGGC- 3'
3	5'- AGCACCAAAGCCAATGTTTCG- 3'
4	5'- CTGGGTGACAGAGTGAGTGAGAC- 3'
5	5' – ACTGCAACCTCCGCCTCCTG – 3'
6	5'- AATGACCTTTTCTGTGGCTGTG- 3'
7	5'- GAATTTGTCTCAGGAGGGCCTTG - 3'
8	5' – CTGCTCTTCCTCACAGTGGA– 3'
9	5'-ACAACGTAGAACTCTCACCCTTAC-3'
10	5' –ATCAGAATTGACTGTGTCAGAAAAC– 3'

Πίνακας 14: Εκκινητές Αλληλούχισης του FASL

Εξόνιο	Εκκινητής
1	5'-TTGCCTCCTTTGAGCAGTCA – 3' 5'- CACTTTGCAAGCCAGGCAGT – 3'
2	5'- GCAGAACTTCTGAGGTATTTGGATTC – 3'
3	5'- TATGTTAGACTGTTGCCATTTACGG – 3'
4	5'- AGCTGTCATTCTGGGTGAAACATT– 3' 5'- GACATTTTGAACCCTGTGGTCTC– 3'

B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τα άτομα που μελετήθηκαν, όλοι ελέγχθηκαν για μεταλλάξεις του γονιδίου *FAS* (ασθενείς 1-16) και 2 (ασθενείς 6 και 7) για μεταλλάξεις των γονιδίων *CASP10* και *FASL*. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε μία πληθώρα ετερόζυγων πολυμορφισμών που αφορούσαν ιντρονικές περιοχές στα γονίδια *FAS* και *CASP10*.

Δεν βρέθηκε κανένας πολυμορφισμός ή μετάλλαξη στο γονίδιο *FASL*. Επιπροσθέτως, στους ασθενείς 2,3,5,6 και 15 εντοπίστηκε μία σημειακή ετερόζυγη μετάλλαξη σε περιοχή εξόνιου στο γονίδιο *FAS*. Όσον αφορά το γονίδιο της Κασπάσης 10, εντοπίστηκε μία σημειακή ετερόζυγη μετάλλαξη και στους δύο ασθενείς. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες.

B.1 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ *FAS*

Η μοριακή ανάλυση των ατόμων ξεκίνησε με την ανάλυση του γονιδίου *FAS*, αφού μεταλλάξεις σε αυτό αποτελούν την κυριότερη αιτία εμφάνισης της νόσου. Στους παρακάτω πίνακες απεικονίζεται το γενετικό προφίλ κάθε ασθενούς που μελετήθηκε. Αρχικά διατυπώσαμε τις εξής παρατηρήσεις:

- a. Τα άτομα P1-P6 αποτελούσαν οικογένεια 2 γονέων με 4 τέκνα. Οι P1 και P4, ο πατέρας και η κόρη της οικογένειας, αποτελούσαν υγιείς δότες με καμία εκδήλωση νόσου. Αντίθετα, η μητέρα και τα τρία αγόρια (άτομα P2, P3,P5,P6) χαρακτηρίζονταν από συμπτωματολογία ALPS.

Έπειτα από τον μοριακό έλεγχο βρέθηκε ότι ο υγιής δότης P1 έφερε μια συνώνυμη και κατ'επέκταση καλοήγη μετάλλαξη - g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= (rs2234978, 0.24) - στο εξόνιο 7 ενώ ο P4 έφερε αλληλία αγρίου τύπου. Οι ασθενείς P2,P3,P5 και P6 έφεραν την παθογονική σημειακή, ετερόζυγη μετάλλαξη **g. 28661G>A, c.749G>A, p.Arg250Pro** στο εξόνιο 9.

- b. Η δεύτερη οικογένεια που μελετήθηκε αποτελούνταν απο τον ασθενή P15 και τον υγιή πατέρα του P16. Ο ασθενής P15 εμφάνιζε συμπτώματα νόσου ενώ ο P16 ήταν ασυμπτωματικός. Η ανάλυση έδειξε την ετερόζυγη σημειακή μετάλλαξη **g.26480G>A, c.580G>A, p.Glu194Lys** και στα δύο άτομα. Ο

ασθενής P15 έφερε, επίσης, την συνώνυμη μετάλλαξη g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= σε ετερόζυγη κατάσταση στο εξόνιο 7.

- c. Τα υπόλοιπα άτομα χαρακτηρίζονταν από συμπτώματα νόσου αλλά δεν εμφάνιζαν παθογονικές σημειακές μεταλλάξεις σε κωδικές περιοχές. Ωστόσο, εντοπίστηκε μια πληθώρα ετερόζυγων ή ομόζυγων πολυμορφισμών σε μη κωδικές περιοχές καθώς και η συνώνυμη μετάλλαξη g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= στο εξόνιο 7 σε ετερόζυγη ή ομόζυγη κατάσταση.
- d. Όλες οι παθογόνες μεταλλάξεις που βρέθηκαν εμφανίζονται σε ετεροζυγωτία.

Ο πρώτος πίνακας αφορά σε μεταλλάξεις εξονίων ενώ ο δεύτερος αφορά τους πολυμορφισμούς που βρέθηκαν στις ιντρονικές περιοχές.

Πίνακας 15: Σημειακές Μεταλλάξεις στα εξόνια 7 και 9 του γονιδίου FAS

Άτομα	Exon 7	Exon 9
P1 (υγιής δότης)	g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= [Heter]	WT
P2	g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= [Heter]	g. 28661G>A, c.749G>A, p.Arg250Pro
P3	WT	g. 28661G>A, c.749G>A, p.Arg250Pro
P4 (υγιής δότης)	WT	WT
P5	WT	g. 28661G>A, c.749G>A, p.Arg250Pro
P6	WT	g. 28661G>A, c.749G>A, p.Arg250Pro
P7	g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= [Homo]	WT
P8	g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= [Heter]	WT
P9	g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= [Heter]	WT
P10	g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= [Homo]	WT
P11	g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= [Homo]	WT
P12	g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= [Homo]	WT
P13	g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= [Heter]	WT
P14	g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= [Homo]	WT
P15	g.26543T>C, c.642T>C, p.T214= [Heter] g.26480G>A, c.580G>A, p.Glu194Lys	WT
P16 (υγιής δότης)	g.26480G>A, c.580G>A, p.Glu194Lys	WT

Επεξηγήσεις: WT = Wild Type (Αγρίου Τύπου)

Πίνακας 16: Ιντρωνικοί Πολυμορφισμοί του γονιδίου FAS

Άτομα	Intron 1-2	Intron 2-3	Intron 3-4	Intron 5-6	Intron 8-9
P7	WT	g.17840C>T, c.196+176C>T [Heter]	g22953T>C, c.335-406T>C [Heter], g.23132G>A, c.335-227G>A [Heter] g.22353C>T, c.334+46C>T [Heter]	g.25152C>G, c.506-71C>G [Heter]	g.28016A>G, c.676+179A>G [Heter] g.28076C>A, c.676+239C>A [Heter]
P8	WT	WT	g22953T>C, c.335-406T>C [Heter] g23084G>T, c.334-231G>T, [Heter]	g.25152C>G, c.506-71C>G [Heter]	g.28015A>G, c.676+179A>G [Heter] g.28207T>G, c.676+370T>G [Heter]
P9	WT	g.17840C>T, c.196+176C>T [Heter]	g22953T>C, c.335-406T>C [Homo] g.23291G>T (Heter)-novel	g.25152C>G, c.506-71C>G [Heter]	WT
P10	WT	WT	WT	g.25152C>G, c.506-71C>G [Heter]	WT
P11	WT	g.17840C>T, c.196+176C>T (Homo)	WT	g.25152C>G, c.506-71C>G [Homo]	g.28016A>G, c.676+179A>G [Homo] g.28076C>A, c.676+239C>A [Homo]
P12	g.5395G>A, c.30+19G>A [Heter]	WT	g.22353C>T, c.334+46C>T, (Heter)	WT	WT
P13	WT	WT	g.22353C>T, c.334+46C>T, (Heter)	g.25152C>G, c.506-71C>G, [Heter]	WT
P14	WT	WT	WT	g.25152C>G, c.506-71C>G [Heter]	WT
P15	WT	WT	WT	WT	g.28076C>A, c.676+239C>A [Heter]

Επεξηγήσεις: WT = Wild Type (Αγρίου Τύπου), Heter = Heterozygous (Ετερόζυγος), Homo = Homozygous (Ομόζυγος)

B.2 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ CASP10

Η ανάλυση του γονιδίου της Κασπάσης 10 έγινε στους ασθενείς 7 και 8.

Ο ασθενής 7 παρουσίασε τους ετερόζυγους πολυμορφισμούς g.27881A>T, c.813+39A>T και g.27966G>A, c.813+124G>A στο ιντρόνιο 7-8. Επίσης, παρουσίασε μια ετερόζυγη, σημειακή μετάλλαξη στο εξόνιο 10, η οποία, ωστόσο, είναι καλοήθης (g.39605T>A, c.1564T>A, p.Leu522Ile).

Πίνακας 17: Αποτελέσματα Ασθενούς P7

Δείγμα	CASP10 Intron 7	CASP10 EX10
Ασθενής 7	g.27881A>T, c.813+39A>T g.27966G>A, c.813+124G>A	g.39605T>A, c.1564T>A, p.Leu522Ile

Ο ασθενής 8 παρουσίασε τους ίδιους πολυμορφισμούς με την ασθενή 7 στο ιντρόνιο 7-8, ωστόσο ο πολυμορφισμός στη θέση g.27881A>T, c.813+39A>T ήταν σε ομοζυγωτία.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα P8

Δείγμα	CASP10 Intron 7
Ασθενής 8	g.27881A>T, c.813+39A>T g.27966G>A, c.813+124G>A

B.3 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΈΛΕΓΧΟΣ FASL

Η ανάλυση του γονιδίου δεν έδειξε καμία μετάλλαξη ή πολυμορφισμό σε κανέναν από τους δύο ασθενείς (P7-P8) που εξετάστηκαν.

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (ή απόπτωση) είναι μια φυσιολογική διαδικασία, απαραίτητη για την φυσιολογική ανάπτυξη και ομοίωση του ανοσιακού συστήματος. Ο υποδοχέας FAS, ο προσδέτης FASL και η κασπάση 10 διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης. Συνεπώς, μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια οδηγούν στην εμφάνιση παθολογικού φαινοτύπου ή άλλως Αυτοάνοσο Λεμφοϋπερπλαστικό Σύνδρομο (ALPS) (3).

Το συγκεκριμένο σύνδρομο χαρακτηρίζεται από τεράστια ετερογένεια στο φαινότυπο, γεγονός που καθιστά πρόκληση την διάγνωση του (28), και στο μοτίβο κληρονομησης καθώς έχουν περιγραφεί περιπτώσεις τόσο επικρατούς όσο και υπολειπόμενης κληρονομικότητας (65).

Στην συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε μοριακός έλεγχος των τριων γονιδίων (*FAS*, *FASL*, *CASP10*) που σχετίζονται με το νόσημα σε 16 άτομα, απο τους οποίους 13 εμφάνιζαν συμπτωματολογία ALPS ενώ 3 είχαν φυσιολογικό φαινότυπο με σκόπο την τυποποίηση του συνδρόμου αλλά και την πλήρη κατανόηση του μοτίβου κληρονομησης του.

Στην πρώτη οικογένεια που μελετήθηκε, βρέθηκε μία παθογόνος μετάλλαξη στο γονίδιο *FAS* (**g. 28661G>A, c.749G>A, p.Arg250Pro**) τόσο στην μητέρα (P6) όσο και στα τρία από τα τέσσερα παιδιά της (P2,P3,P5), οι οποίοι παρουσίαζαν φαινότυπο ALPS. Παράλληλα, τα άτομα P1 και P6 (κόρη και πατέρας) ήταν ασυμπτωματικά. Σύμφωνα με τους Fisher et al. (43), το 70% των ασθενών με ALPS έχουν κληρονομήσει συγγενή μετάλλαξη στο *FAS* με σωματικό επικρατή χαρακτήρα. Εξετάζοντας τα δεδομένα που ευρέθησαν, καταλήξαμε στο ίδιο συμπέρασμα. Με άλλα λόγια, η μητέρα κληροδότησε την παθογόνο μετάλλαξη στα παιδιά της με σωματικό επικρατή τρόπο.

Ομοίως, στην δεύτερη οικογένεια εντοπίστηκε μία παθογόνος μετάλλαξη σε ετεροζυγωτία στο γονίδιο *FAS* (**g.26480G>A, c.580G>A, p.Glu194Lys**) και στα δύο μέλη (ασθενής γιος - P15, υγιής δότης πατέρας - P16). Μία τέτοια περίπτωση ασθενών περιέγραψαν και οι Chatinet et. al. (15) όπου η ύπαρξη μιας μοναδικής ετερόζυγης μετάλλαξης δεν είναι ικανή να προκαλέσει κλινικό φαινότυπο και απαιτεί την ύπαρξη μίας δεύτερη γενετικής βλάβης (συγγενής ή σωματική) για την εμφάνιση της νόσου.

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να τονιστεί το γεγονός ότι η μητέρα του παιδιού πέθανε από λέμφωμα. Αυτό το στοιχείο οδηγεί στην υπόθεση ότι η ίδια έφερε και κατ'επέκταση κληροδότησε την δεύτερη γενετική βλάβη στο γιο της. Αυτή μπορεί να έδρασε συνεργιστικά με την βλάβη που κληρονόμησε το παιδί από τον πατέρα του με αποτέλεσμα την έκφραση κλινικού φαινοτύπου ALPS.

Σε κανένα από τα 9 μεμονωμένα άτομα (P7-P14) δεν βρέθηκε παθογόνος μετάλλαξη στα τρία γονίδια που μελετήθηκαν, οδηγώντας στην υπόθεση ύπαρξης άγνωστης μετάλλαξης, κατατάσσοντας τις περιπτώσεις αυτών των ασθενών ως ALPS-U (20% των περιστατικών σύμφωνα με την βιβλιογραφία (2)).

Ωστόσο, πλην των μεταλλάξεων, βρέθηκε και ένας σημαντικός αριθμός πολυμορφισμών στα γονίδια *FAS* και *CASP10*, οι οποίοι δεν είναι παθογόνοι και κατ'επέκταση δεν έχουν κλινική σημασία. Εντούτοις, οι Niemela et al. (81) αλληλούχησαν το γονίδιο *FAS* σε 150 Καυκάσιους και 53 Αφροαμερικάνους και εντόπισαν ανισορροπία σύνδεσης στους πολυμορφισμούς με την υψηλότερη συχνότητα. Λόγω της ανισορροπίας σύνδεσης, αυτοί οι πολυμορφισμοί έχουν την τάση να εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στους Καυκάσιους, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι παίζουν ρόλο στην έκφραση του γονιδίου και στη σηματοδότηση *FAS*. Σημειώνεται, επίσης, ότι η συγκεκριμένη ομάδα ερευνητών εντόπισε και τρεις από τους πολυμορφισμούς που βρέθηκαν και στα δικά μας πειράματα (RS2296600, RS2296601, RS2234978). Ως αποτέλεσμα, είναι σημαντική η μελέτη όχι μόνο μεταλλάξεων αλλά και πολυμορφισμών καθώς και αυτοί μπορεί να συμβάλλουν στον τρόπο με τον οποίο η σηματοδότηση *FAS* επηρεάζει την εμφάνιση ALPS αλλά και άλλων πολύπλοκων νοσημάτων.

Τέλος, η μοριακή μελέτη των γονιδίων *FAS*, *FASL*, *CASP10* είναι απαραίτητη σε ασθενείς με υποψία για ALPS. Επιπλέον, είναι σημαντικό να τονιστεί η σημασία του ελέγχου και μελών της οικογένειας για την πλήρη κατανόηση του μοτίβου κληρονομικότητας του συνδρόμου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr.* 1967 Jun;70(6):891–9.
2. Teachey DT, Seif AE, Grupp SA. Advances in the management and understanding of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Br J Haematol.* 2010 Jan;148(2):205–16.
3. Dowdell KC, Niemela JE, Price S, Davis J, Hornung RL, Oliveira JB, et al. Somatic FAS mutations are common in patients with genetically undefined autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood.* 2010 Jun;115(25):5164–9.
4. Crispin JC, Tsokos GC. Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J Immunol.* 2009 Oct;183(7):4675–81.
5. Neven B, Magerus-Chatinet A, Florkin B, Gobert D, Lambotte O, De Somer L, et al. A survey of 90 patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome related to TNFRSF6 mutation. *Blood.* 2011 Nov;118(18):4798–807.
6. Seif AE, Manno CS, Sheen C, Grupp SA, Teachey DT. Identifying autoimmune lymphoproliferative syndrome in children with Evans syndrome: a multi-institutional study. *Blood.* 2010 Mar;115(11):2142–5.
7. Stepensky P, Rensing-Ehl A, Gather R, Revel-Vilk S, Fischer U, Nabhani S, et al. Early-onset Evans syndrome, immunodeficiency, and premature immunosenescence associated with tripeptidyl-peptidase II deficiency. *Blood.* 2015 Jan;125(5):753–61.
8. Price S, Shaw PA, Seitz A, Joshi G, Davis J, Niemela JE, et al. Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood.* 2014 Mar;123(13):1989–99.
9. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rösen-Wolff A, et al. The development of

- lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*. 2001;
10. Del-Rey M, Ruiz-Contreras J, Bosque A, Calleja S, Gomez-Rial J, Roldan E, et al. A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. 2006 Aug;108(4):1306–12.
 11. Zhu S, Hsu AP, Vacek MM, Zheng L, Schaffer AA, Dale JK, et al. Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Hum Genet*. 2006 Apr;119(3):284–94.
 12. Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FKM, Dale J, Sneller M, et al. Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*. 1999;
 13. Lambotte O, Neven B, Galicier L, Magerus-Chatinet A, Schleinitz N, Hermine O, et al. Diagnosis of autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by FAS deficiency in adults. *Haematologica*. 2013 Mar;98(3):389–92.
 14. Rieux-Laucat F, Blachere S, Danielan S, De Villartay JP, Oleastro M, Solary E, et al. Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: A possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations. *Blood*. 1999 Oct;94(8):2575–82.
 15. Magerus-Chatinet A, Neven B, Stolzenberg M-C, Daussy C, Arkwright PD, Lanzarotti N, et al. Onset of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in humans as a consequence of genetic defect accumulation. *J Clin Invest*. 2011 Jan;121(1):106–12.
 16. Jackson CE, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr Opin Pediatr*. 1999 Dec;11(6):521–7.
 17. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med*. 1999 Apr;130(7):591–601.

18. Bleesing JJH. Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Curr Pharm Des.* 2003;9(3):265–78.
19. Wei A, Cowie T. Rituximab responsive immune thrombocytopenic purpura in an adult with underlying autoimmune lymphoproliferative syndrome due to a splice-site mutation (IVS7+2 T>C) affecting the Fas gene. *Eur J Haematol.* 2007;
20. Bleesing JJH, Brown MR, Novicio C, Guarraia D, Dale JK, Straus SE, et al. A composite picture of TcR alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T Cells (alpha/beta-DNTCs) in humans with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol.* 2002 Jul;104(1):21–30.
21. Sneller MC, Wang J, Dale JK, Strober W, Middleton LA, Choi Y, et al. Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood.* 1997 Feb;89(4):1341–8.
22. Jackson CE, Fischer RE, Hsu AP, Anderson SM, Choi Y, Wang J, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am J Hum Genet.* 1999 Apr;64(4):1002–14.
23. Bleesing JJ, Straus SE, Fleisher TA. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. A human disorder of abnormal lymphocyte survival. *Pediatr Clin North Am.* 2000 Dec;47(6):1291–310.
24. Bleesing JJH, Nagaraj CB, Zhang K. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. Seattle (WA); 1993.
25. Teachey DT, Manno CS, Axsom KM, Andrews T, Choi JK, Greenbaum BH, et al. Unmasking Evans syndrome: T-cell phenotype and apoptotic response reveal autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood.* 2005 Mar;105(6):2443–8.
26. Magerus-Chatinet A, Stolzenberg M-C, Lanzarotti N, Neven B, Daussy C, Picard C, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a homozygous null FAS ligand

- (FASLG) mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb;131(2):486–90.
27. Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*. 2010 Oct;116(14):e35-40.
 28. Seidel MG. Autoimmune and other cytopenias in primary immunodeficiencies: pathomechanisms, novel differential diagnoses, and treatment. *Blood*. 2014 Oct;124(15):2337–44.
 29. Puck JM, Straus SE. Somatic mutations--not just for cancer anymore. *N Engl J Med*. 2004 Sep;351(14):1388–90.
 30. Salzer E, Santos-Valente E, Klaver S, Ban SA, Emminger W, Prengemann NK, et al. B-cell deficiency and severe autoimmunity caused by deficiency of protein kinase C delta. *Blood*. 2013 Apr;121(16):3112–6.
 31. Oliveira JB. The expanding spectrum of the autoimmune lymphoproliferative syndromes. *Curr Opin Pediatr*. 2013 Dec;25(6):722–9.
 32. Oliveira JB, Bidere N, Niemela JE, Zheng L, Sakai K, Nix CP, et al. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May;104(21):8953–8.
 33. Niemela JE, Lu L, Fleisher TA, Davis J, Caminha I, Natter M, et al. Somatic KRAS mutations associated with a human nonmalignant syndrome of autoimmunity and abnormal leukocyte homeostasis. *Blood*. 2011 Mar;117(10):2883–6.
 34. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood*. 2011 Mar;117(10):2887–90.
 35. Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, Buonfiglio D, et al. Deficiency of

- the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood*. 1997 Apr;89(8):2871–9.
36. Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferretti M, Orilieri E, et al. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood*. 2006 Nov;108(9):3079–84.
 37. Podjasek JC, Abraham RS. Autoimmune cytopenias in common variable immunodeficiency. *Front Immunol*. 2012;3:189.
 38. Warnatz K, Voll RE. Pathogenesis of autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Front Immunol*. 2012;3:210.
 39. Vignesh P, Rawat A, Singh S. An Update on the Use of Immunomodulators in Primary Immunodeficiencies. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017 Apr;52(2):287–303.
 40. Snow AL, Oliveira JB, Zheng L, Dale JK, Fleisher TA, Lenardo MJ. Critical role for BIM in T cell receptor restimulation-induced death. *Biol Direct*. 2008 Aug;3:34.
 41. Nabhani S, Honscheid A, Oommen PT, Fleckenstein B, Schaper J, Kuhlen M, et al. A novel homozygous Fas ligand mutation leads to early protein truncation, abrogation of death receptor and reverse signaling and a severe form of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol*. 2014 Dec;155(2):231–7.
 42. Rao VK, Oliveira JB. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. 2011 Nov;118(22):5741–51.
 43. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*. 1995 Jun;81(6):935–46.
 44. Volkl S, Rensing-Ehl A, Allgauer A, Schreiner E, Lorenz MR, Rohr J, et al. Hyperactive mTOR pathway promotes lymphoproliferation and abnormal differentiation in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. 2016 Jul;128(2):227–38.

45. Holzelova E, Vonarbourg C, Stolzenberg M-C, Arkwright PD, Selz F, Prieur A-M, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Engl J Med*. 2004 Sep;351(14):1409–18.
46. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, et al. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*. 2000 Jun;288(5475):2354–7.
47. Lenardo MJ. Fas and the art of lymphocyte maintenance. *J Exp Med*. 1996 Mar;183(3):721–4.
48. Peter ME, Legembre P, Barnhart BC. Does CD95 have tumor promoting activities? *Biochim Biophys Acta*. 2005 May;1755(1):25–36.
49. Algeciras-Schimnich A, Pietras EM, Barnhart BC, Legembre P, Vijayan S, Holbeck SL, et al. Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep;100(20):11445–50.
50. Debatin KM, Suss D, Krammer PH. Differential expression of APO-1 on human thymocytes: implications for negative selection? *Eur J Immunol*. 1994 Mar;24(3):753–8.
51. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 2009 Feb;30(2):180–92.
52. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber A-O, Newell MK, et al. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell*. 2007 May;129(3):447–50.
53. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Feb;14(1):53–66.
54. Chen L, Park S-M, Tumanov A V, Hau A, Sawada K, Feig C, et al. CD95 promotes tumour growth. *Nature*. 2010 May;465(7297):492–6.
55. Desbarats J, Newell MK. Fas engagement accelerates liver regeneration after partial

- hepatectomy. *Nat Med*. 2000 Aug;6(8):920–3.
56. Jarad G, Wang B, Khan S, DeVore J, Miao H, Wu K, et al. Fas activation induces renal tubular epithelial cell beta 8 integrin expression and function in the absence of apoptosis. *J Biol Chem*. 2002 Dec;277(49):47826–33.
 57. Reinehr R, Sommerfeld A, Haussinger D. CD95 ligand is a proliferative and antiapoptotic signal in quiescent hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2008 May;134(5):1494–506.
 58. Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme J-S, Newell MK. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol*. 2003 Feb;5(2):118–25.
 59. Zuliani C, Kleber S, Klussmann S, Wenger T, Kenzelmann M, Schreglmann N, et al. Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ*. 2006 Jan;13(1):31–40.
 60. Claessens Y-E, Bouscary D, Dupont J-M, Picard F, Melle J, Gisselbrecht S, et al. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood*. 2002 Mar;99(5):1594–601.
 61. Tachibana O, Nakazawa H, Lampe J, Watanabe K, Kleihues P, Ohgaki H. Expression of Fas/APO-1 during the progression of astrocytomas. *Cancer Res*. 1995 Dec;55(23):5528–30.
 62. Bettinardi A, Brugnoli D, Quiros-Roldan E, Malagoli A, La Grutta S, Corrao A, et al. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis. *Blood*. 1997 Feb;89(3):902–9.
 63. Infante AJ, Britton HA, DeNapoli T, Middleton LA, Lenardo MJ, Jackson CE, et al. The clinical spectrum in a large kindred with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a Fas mutation that impairs lymphocyte apoptosis. *J Pediatr*. 1998

- Nov;133(5):629–33.
64. Vaishnav AK, Orlinick JR, Chu JL, Krammer PH, Chao M V, Elkon KB. The molecular basis for apoptotic defects in patients with CD95 (Fas/Apo-1) mutations. *J Clin Invest*. 1999 Feb;103(3):355–63.
 65. van der Burg M, de Groot R, Comans-Bitter WM, den Hollander JC, Hooijkaas H, Neijens HJ, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in a child from consanguineous parents: a dominant or recessive disease? *Pediatr Res*. 2000 Mar;47(3):336–43.
 66. Lee SH, Shin MS, Kim HS, Park WS, Kim SY, Jang JJ, et al. Somatic mutations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous squamous cell carcinoma arising from a burn scar. *J Invest Dermatol*. 2000 Jan;114(1):122–6.
 67. Martin DA, Zheng L, Siegel RM, Huang B, Fisher GH, Wang J, et al. Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Apr;96(8):4552–7.
 68. Drappa J, Vaishnav AK, Sullivan KE, Chu JL, Elkon KB. Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med*. 1996 Nov;335(22):1643–9.
 69. Zhang X, Miao X, Sun T, Tan W, Qu S, Xiong P, et al. Functional polymorphisms in cell death pathway genes FAS and FASL contribute to risk of lung cancer. *J Med Genet*. 2005 Jun;42(6):479–84.
 70. Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Dec;2(12):917–24.
 71. Guller S, LaChapelle L. The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces. *Semin Reprod Endocrinol*. 1999;17(1):39–44.
 72. Igney FH, Krammer PH. Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunol*

- Immunother. 2005 Nov;54(11):1127–36.
73. Sheikh MS, Fornace AJJ. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia*. 2000 Aug;14(8):1509–13.
 74. Bi LL, Pan G, Atkinson TP, Zheng L, Dale JK, Makris C, et al. Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib. *BMC Med Genet*. 2007 Jul;8:41.
 75. Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest*. 1996 Sep;98(5):1107–13.
 76. Ruiz-Garcia R, Mora S, Lozano-Sanchez G, Martinez-Lostao L, Paz-Artal E, Ruiz-Contreras J, et al. Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B-cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation. *Pediatr Res*. 2015 Dec;78(6):603–8.
 77. Sobh A, Crestani E, Cangemi B, Kane J, Chou J, Pai S-Y, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a homozygous FasL mutation that disrupts FasL assembly. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Jan;137(1):324-327.e2.
 78. Liang Y, Zhang L, Gao J, Hu D, Ai Y. Rituximab for children with immune thrombocytopenia: a systematic review. *PLoS One* [Internet]. 2012 May 30;7(5):e36698–e36698. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666325>
 79. Rao VK, Dugan F, Dale JK, Davis J, Tretler J, Hurley JK, et al. Use of mycophenolate mofetil for chronic, refractory immune cytopenias in children with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br J Haematol*. 2005 May;129(4):534–8.
 80. Teachey DT, Greiner R, Seif A, Attiyeh E, Bleesing J, Choi J, et al. Treatment with sirolimus results in complete responses in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br J Haematol*. 2009;

81. Niemela JE, Hsu AP, Fleisher TA, Puck JM. Single nucleotide polymorphisms in the apoptosis receptor gene TNFRSF6. *Mol Cell Probes*. 2006 Feb;20(1):21–6.
82. Shin MS, Kim HS, Kang CS, Park WS, Kim SY, Lee SN, et al. Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2002 Jun;99(11):4094–9.