

A cura di Stefania Corrente - Commissione Immunologia

Commento a:

L.D. Notarangelo et al. Primary immunodeficiencies: novel genes and unusual presentations. Hematology, 2019 Dec 6 (1) ;443-448

In questa review, gli autori, descrivono alcune nuove immunodeficienze primitive (IDP), la cui identificazione è stata permessa grazie allo sviluppo della genomica; inoltre, l'identificazione di nuovi geni e di nuove varianti patogenetiche in geni già identificati come responsabili di IDP, ha messo in evidenza il ruolo della disregolazione del sistema immunitario quale fenotipo clinico di esordio di alcune di esse.

Negli ultimi anni, il numero di immunodeficienze primitive inserite nella classificazione internazionale è aumentato, questo grazie anche allo sviluppo, perfezionamento e disponibilità delle analisi genomiche (whole exome sequencing WES e whole genome sequencing WGS). Infatti in questo modo, sono stati identificati più di 330 geni e le loro varianti che sono associate a IDP; inoltre varianti diverse dello stesso gene associato a IDP possono esitare in fenotipi clinici ed immunologici diversi sia per l'effetto sull'espressione che sulla funzione della proteina, come si ben evidenzia nelle mutazioni "loss of function" (LOF) o "gain of function" (GOF).

Storicamente le IDP sono state sempre associate ad una aumentata suscettibilità alle infezioni, ma negli ultimi anni questo concetto è stato in parte superato, in quanto altre manifestazioni quali quelle espressione di disregolazione del sistema immunitario come manifestazioni autoimmuni, complicanze infiammatorie, linfoproliferazione o aumentato rischio di tumori, possono rappresentarne l'esordio e richiedono attenzione nella diagnosi differenziale.

Questo concetto è stato messo in evidenza anche in recenti revisioni quali : 1) Fisher A et al (1), che in uno studio su 2183 pazienti con IDP, hanno messo in evidenza che il 26.2% dei pazienti studiati, ha manifestazioni autoimmuni o infiammatorie; in particolare tra queste, la citopenia è quella che maggiormente colpisce i pazienti con IDP, in tali pazienti il rischio relativo di sviluppare citopenia autoimmune è molto elevato rispetto alla popolazione generale; 2) Hadjadj J et al (2), in uno studio condotto su 80 pazienti pediatrici con sindrome di Evans, hanno messo in evidenza la presenza, in circa 52 pazienti, di varianti genetiche di geni già descritti in forme IDP, suggerendo che la comparsa di citopenia autoimmune che coinvolge più linee cellulari deve sempre far sospettare un più complesso disordine del sistema immunitario e portare ad ulteriori indagini genetiche.

Gli autori, quindi, analizzano alcuni gruppi di IDP, con difetto prevalente del compartimento cellulare T, che possono esordire o presentare manifestazioni cliniche di disregolazione del sistema immune, quale citopenia cronica/ricorrente e sottolineano come la caratterizzazione del difetto molecolare e cellulare così come la comprensione della patofisiologia di alcune IDP abbia portato allo sviluppo di interventi terapeutici mirati e precoci per evitarne le complicanze.

ALPS e diordini ALPS-like.

La sindrome linfoproliferativa autoimmune (ALPS), include un gruppo eterogeneo di disordini genetici, caratterizzati da difetti della via intrinseca ed estrinseca dell'apoptosi. La via estrinseca dell'apoptosi coinvolge molecole FAS, FAS ligando (FASLG) e altre molecole di segnale, con conseguente attivazione delle caspasi 8 e 10 e l'induzione della morte cellulare (AICD). La via intrinseca dell'apoptosi, conosciuta come morte cellulare autonoma attivata da cellule (ACAD), è indotta invece in risposta a citochine o a esposizione ad agenti genotossici, coinvolge IL-2 ed è mediata dal mitocondrio. Nella maggioranza dei pazienti, la malattia ALPS è dovuta ad una mutazione del gene

TNFRSF6 che codifica per il recettore di morte cellulare FS-7 associato all'antigene di superficie (FAS) espresso sulla superficie di linfociti attivati. Generalmente, le mutazioni di *FAS*, *FASLG*, e delle molecole di segnale *FADD* causano alterazioni di AICD con conseguente fenotipo clinico ALPS; mentre mutazioni somatiche dei geni *NRAS* e *KRAS* coinvolti in ACAD sono state riscontrate nelle forme simili all'ALPS (ALPS-like). Questi ultimi disordini sono anche conosciuti come malattie leucoproliferative autoimmuni associate a RAS (RALD).

Da un punto di vista clinico, sia i difetti della via estrinseca che intrinseca dell'apoptosi, a causa della mancata delezione di cloni dei linfociti T, si presentano con manifestazione di linfoproliferazione (con splenomegalia e linfadenite), ipergammaglobulinemia, citopenia autoimmune di più linee cellulari (che sono spesso refrattarie al trattamento convenzionale), e elevato rischio di sviluppare linfoma tipo B. I pazienti con difetto genetico della via estrinseca, spesso hanno un elevato numero di cellule T (dette anche doppi negativi) ($\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-$), ovvero esprimono il recettore- $\alpha\beta$ delle cellule T ma non i marcatori di superficie (CD4 CD8) e un aumentato livello di vitamina B12, IL-10 e FASLG solubile. I pazienti invece con difetto delle via intrinseca spesso presentano monocitosi e una aumentata tendenza a sviluppare leucemia con caratteristiche che ricordano la leucemia giovanile mielomonocitica.

Grazie all'utilizzo delle analisi genomiche (WES e WGS), in alcuni pazienti con quadro clinico ALPS-like, sono state identificate mutazioni dei geni *CTLA4*, *LRBA* e *PIK3CD*.

Il gene *CTLA4* codifica per CTLA-4, un recettore inibitore omodimerico che lega CD80 e CD86; gioca un ruolo cruciale nel mantenere l'omeostasi del sistema immune attraverso la soppressione della proliferazione e attivazione dei T linfociti, promuovendo la funzione T regolatoria (Treg) e modulando l'interazione tra cellule T e cellule dendritiche. Le mutazioni del gene *CTLA4* possono determinare un fenotipo clinico variabile da un quadro grave con manifestazioni autoimmuni coinvolgenti molti organi fino a quadri asintomatici. Le manifestazioni principali sono ipogammaglobulinemia, infezioni ricorrenti, autoimmunità e linfoproliferazione (che si manifesta con splenomegalia, linfadenite e infiltrato linfocitario di alcuni organi bersaglio quali cervello polmoni e intestino). L'esordio in età pediatrica o adolescenza è con citopenia di una o più linee, spesso associata a splenomegalia. In un gruppo di pazienti adulti con deficit di CTLA-4 è stata osservata una ipoplasia progressiva del midollo osseo (associata a infiltrato T cellulare) confermando il dato che il deficit di CTLA-4 è tra le IDP che possono dare anemia aplastica. Molti pazienti con deficit di CTLA-4 affetti da citopenia, una volta posta la diagnosi genetica, hanno beneficiato dell'uso off-label di Abatacept, una proteina di fusione composta dalla regione FC delle immunoglobuline IgG1 e dal dominio extracellulare di CTLA-4 sia in mono-somministrazione che in combinazione con Sirolimus (inibitore del recettore dei mammiferi della rapamicina (mTor)). Tale trattamento è risultato efficace sia per la citopenia che per altre manifestazioni di disregolazione immunitaria. La sicurezza e l'efficacia dell'uso di Abatacept nel trattare la citopenia cronica in pazienti con deficit di CTLA-4 è tutt'ora in fase di studio (3).

LRBA, invece, è una proteina che contribuisce al riciclo di alcuni componenti cellulari compreso CTLA-4, causandone una degradazione lisosomiale, per cui mutazioni genetiche bialleliche di *LRBA* determinano anche alterazione nella espressione di CTLA-4. Infatti il deficit di LRBA presenta le stesse manifestazioni cliniche del deficit di CTLA-4 e per entrambi i disordini è stato usato un analogo approccio terapeutico (4)

I geni *PIK3CD* (fosfatidilinositol 3 kinasi C δ) e *PIK3RI*, codificano per le subunità di PI3K δ (fosfatidilinositol 3 kinasi δ), e le loro varianti genetiche determinano una aumentata attività della via PI3K-AKT-mTOR e sono associate alla forma APDS (sindrome di fosfoinositol 3-chinasi- δ) conosciuta anche come PASLI. Le manifestazioni cliniche di tale forma includono: citopenia di più linee cellulari, linfoproliferazione (con splenomegalia, linfadenite, e iperplasia linfonodale nodulare del

tratto respiratorio e della mucosa gastrointestinale), infezioni ricorrenti e aumentata suscettibilità a linfoma di tipo B. Da un punto di vista immunologico, i pazienti hanno un numero ridotto di cellule T naive, aumento di cellule T senescenti, grado variabile di ipogammaglobulinemia spesso associata a iper IgM, aumento del numero di cellule B transizionali, riduzione di cellule B switched memory e alterata risposta alle vaccinazioni.

In 6 pazienti affetti da APDS/PASLI è stato recentemente testato l'uso di Leniolisib (CDZ173), un inibitore orale nuovo e potente di PI3K δ che è stato somministrato per 12 settimane (5). Tale farmaco, è risultato sicuro e ben tollerato, e in tutti i pazienti si è assistito ad un miglioramento della citopenia e riduzione del 40% della dimensione dei linfonodi e milza. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un follow-up molto lungo, ed hanno continuato il trattamento con Leniolisib a basso dosaggio per altri 3 anni, senza effetti collaterali; in tre di questi pazienti si è osservata una normalizzazione della funzione delle cellule B, non c'è stata necessità di supplementazione con immunoglobuline e anche la citopenia è migliorata progressivamente (6).

IPEX e disordini IPEX-like.

La sindrome IPEX è un disordine X-linked, caratterizzato da immunodisregolazione, poliendocrinopatia e enteropatia; è una grave malattia autoimmune sistemica congenita dovuta a mutazione del gene *FOXP3* che controlla lo sviluppo e la funzione delle cellule Treg, una popolazione linfocitaria coinvolta nell'iporegolazione della risposta immunitaria e dell'autotolleranza. La sindrome IPEX si sviluppa di solito nei primi giorni o nelle prime settimane di vita e interessa esclusivamente i maschi, si manifesta con la triade sequenziale composta da enteropatia, endocrinopatia (es. diabete tipo 1) e interessamento cutaneo, anche se i segni clinici e la gravità della malattia possono variare considerevolmente da paziente a paziente. Nel corso degli anni, possono comparire diverse manifestazioni autoimmuni quali citopenia, epatite, nefrite, miopatie e malattie autoimmuni del sistema nervoso centrale. Gli esami di laboratorio dei pazienti con IPEX mostrano una assenza di cellule Treg (CD4⁺FOXP3⁺), tuttavia possono essere presenti cellule Treg prive della funzione soppressoria. Se non trattati, i pazienti con IPEX spesso muoiono precocemente e chi sopravvive ha spesso un danno d'organo.

La terapia medica si basa sull'uso di immunosoppressori, per esempio può essere efficace il Sirolimus, che ha un effetto selettivo sulle cellule T effettrici risparmiando le cellule Treg. Oltre al Sirolimus, potrebbero essere utilizzati altri agenti immunosoppressori delle cellule T come il Micofenolato mofetil (MMF) e Tacrolimus. La cura definitiva rimane però il trapianto di cellule emopoietiche (TCSE), ma spesso non è risolutivo a causa delle complicanze. In recenti studi si è visto che la sopravvivenza a lungo termine è simile sia nei pazienti trattati con TCSE che in quelli trattati con sola terapia immunosoppressiva (7); tuttavia nei pazienti con un decorso clinico meno severo e miglior controllo della malattia, il TCSE dà un migliore outcome.

In alcuni pazienti con aspetti clinici e laboratoristici simili all'IPEX (IPEX-like), ma senza mutazione di *FOXP3*, sono state identificate mutazioni nei geni *IL2RA* e *IL2RB* (che codificano per le catene α e β del recettore IL-2) (il segnale IL-2 è essenziale per la sopravvivenza e l'attivazione delle cellule Treg e nella risposta immune adattativa); tali pazienti presentano un fenotipo clinico caratterizzato da una aumentata suscettibilità a infezioni virali, in particolare da Citomegalovirus (CMV).

Un altro quadro IPEX-like può essere dovuto a mutazioni GOF del gene *STAT3* che è un fattore di trascrizione, attivato in risposta a varie citochine e fattori di crescita. Il fenotipo clinico associato a tali mutazioni, è caratterizzata da autoimmunità (enteropatia, citopenia, diabete tipo 1, ipotiroidismo e danno polmonare interstiziale), linfoproliferazione, eczema, aumentata suscettibilità alle infezioni, tumori e bassa statura. La malattia può essere ereditata con forma autosomica dominante o in forma sporadica. Molti dei pazienti hanno un numero ridotto di cellule Treg con una ridotta attività

soppressoria di tali cellule. Le citopenie osservate in questi pazienti sono spesso responsive a trattamento immunosoppressivo con MMF; tuttavia in alcuni pazienti il progressivo danno fibrotico e ipossico polmonare può portare a morte.

SCID, CID e altre forme di IDP

Nell'ultimo capitolo, gli autori sottolineano che oltre ai disordini ALPS, ALPS-like, IPEX, IPEX-like, le manifestazioni di disregolazione del sistema immune sono presenti anche nelle SCID (immunodeficienza combinata grave) e CID (immunodeficienza combinata che comprende un gruppo eterogeneo di disordini immunologici caratterizzati da una alterazione dello sviluppo e funzione delle cellule T).

Mutazioni ipomorfiche dei geni *RAG1* e *RAG2* (importanti per lo sviluppo dei linfociti T e B) provocano un danno cellulare T e B con ripercussioni sulla tolleranza centrale e periferica e sono causa di SCID atipiche o CID ad esordio tardivo con sintomi di autoimmunità e comparsa di granulomi. In un recente studio (8) condotto su 63 pazienti con forme atipiche di deficit di RAG, è stato visto che circa l'84% dei pazienti presenta manifestazioni di disregolazione immune quali citopenia di più linee cellulari. L'età media di presentazione della citopenia autoimmune è di circa due anni ed in molti casi è preceduta da episodi infettivi. In tali pazienti né il trattamento con immunoglobuline, né l'uso di steroidi o di farmaci immunosoppressivi (MMF, Ciclosporina A, Tacrolimus e Rituximab) sembrano in grado di indurre una remissione, che è stata raggiunta solo con il TCSE. La gestione di tali pazienti rimane problematica, con un elevato rischio di morte anche dopo il trapianto, anche perché spesso la diagnosi è tardiva.

Mutazioni ipomorfiche dei geni *IL2RG*, *IL7R*, *JAK3*, *PRKDC*, *DCLRE1C* e *TRAC* sono implicate in forme atipiche di SCID e possono causare sintomi di disregolazione del sistema immune.

Alcune forme di CID causate da mutazioni di geni che inducono alterazioni del segnale del recettore delle cellule T (TCR) possono esordire con sintomi di disregolazione del sistema immune quali citopenia, vasculite, autoimmunità organo-specifica e formazione di granulomi; questi pazienti sono spesso incapaci di sviluppare una risposta adattativa e per questo sono anche molto suscettibili alle infezioni (in particolare verso Herpesvirus e Papillomavirus) e al linfoma associato a EBV.

Infine, anche mutazioni GOF in eterozigosi di *STAT1* possono causare sintomi di disregolazione del sistema immune. Tali pazienti possono sviluppare, oltre a candidiasi muco-cutanea cronica (CMC) che è una manifestazione classica del deficit di STAT1, altre dermatomiositi superficiali e invasive, infezioni micotiche da coccidi e istoplasma, infezioni senopolmonari, micobatteriosi non tubercolari, infezioni virali (specialmente causate da Herpes virus, JC virus, e Papillomavirus) e manifestazioni autoimmuni (quali citopenia, diabete tipo 1, tiroiditi, alopecia e vasculiti). Questa IDP può essere caratterizzata anche da manifestazioni non immuni quali aneurisma, stenosi esofagee e aumentato rischio di tumori in particolare carcinoma a cellule squamose. I meccanismi molecolari e cellulari di tale forma rimangono ancora mal definiti. L'aumentata suscettibilità alle infezioni è dovuta probabilmente ad una alterazione delle cellule Th17, mentre le manifestazioni di disregolazione immune sono dovute, come in molte interferonpatie, all'aumento del segnale mediato da Interferon. Molti pazienti sono stati trattati con terapia antifungina, antimicrobica e immunosoppressiva. L'uso di Jakinibs (inibitore di Janus kinasi JAK) (9) in alcuni pazienti è stato associato a miglioramento clinico. Questo farmaco, associato ad altri immunosoppressori, può causare un'aumentata suscettibilità alle infezioni, per cui è necessario un monitoraggio attento dei pazienti includendo anche controlli regolari delle viremie di EBV e CMV. In tali pazienti, il TCSE non è risolutivo, infatti in uno studio su 15 pazienti solo il 40% è sopravvissuto (10).

Gli autori concludono il lavoro con un caso clinico di un bambino di 6 anni valutato per pallore cutaneo. Gli esami di laboratorio evidenziavano anemia (Hb 7,7 g/dL) e test di Coombs diretto positivo. L'anamnesi patologica remota era positiva per infezioni respiratorie ricorrenti ed eczema,

responsivi a trattamento con steroidi. Sulla base del quadro clinico e delle analisi genetiche veniva esclusa una ALPS. Due anni dopo, il paziente sviluppava cefalea e convulsioni generalizzate, con evidenza alla RMN encefalo di multiple lesioni con enhancement al mezzo di contrasto, mentre la biopsia cerebrale evidenziava un infiltrato di cellule infiammatorie a livello delle meningi e del parenchima cerebrale. Il bambino, veniva trattato con steroidi con beneficio, tuttavia all'età di 10 anni, sviluppava diarrea associata a perdita di peso; eseguiva pertanto una colonscopia con conseguente diagnosi istologica di colite con infiltrato linfocitario. All'età di 11 anni, durante l'esecuzione di una TAC torace, veniva inoltre evidenziato un nodulo polmonare e la persistenza di splenomegalia. Veniva pertanto avviato il sequenziamento genico che metteva in evidenza una mutazione di CTLA4. Alla luce di ciò, a 13 anni per la ricomparsa di altre lesioni cerebrali, veniva trattato con steroidi e Sirolimus con rapida risoluzione del quadro clinico. Il paziente rimase asintomatico fino all'utilizzo del Sirolimus. Anche al padre che presentava storia di polmoniti ricorrenti, enteropatia e citopenia severa e che aveva necessitato di splenectomia in età adulta, in seguito alla comparsa di malattia polmonare fu diagnosticato un deficit di CTLA4 e iniziato un trattamento con Sirolimus con beneficio. Tuttavia l'enteropatia e l'infiammazione intestinale furono ben controllate solo con Abatacept intravenoso.

In conclusione, gli autori sottolineano, quindi l'importanza di fronte a manifestazioni cliniche di immuno-disregolazione, di porre un sospetto di IDP, al fine di avviare indagini molecolari volte a individuare la mutazione genetica e il meccanismo patogenetico sottostante la malattia. Solo tale conoscenza può permettere una diagnosi precoce e un intervento terapeutico mirato volto ad interferire con il meccanismo chiave della malattia.

1. Fischer A, Provot J, Jais JP, Alcais A, Mahlaoui N; members of the CEREDIH French PID study group. Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Nov;140(5):1388-1393.
2. Hadjadj J, Aladjidi N, Fernandes H, et al; members of the French Reference Center for Pediatric Autoimmune Cytopenia (CEREVANCE). Pediatric Evans syndrome is associated with a high frequency of potentially damaging variants in immune genes. *Blood.* 2019 Jul 4;134(1):9-21.
3. Schwab C, Gabrysch A, Olbrich P, et al. Phenotype, penetrance, and treatment of 133 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-insufficient subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(6):1932-1946.
4. Lo B, Zhang K, Lu W et al AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science.* 2015 Jul 24;349(6246):436-40.
5. Rao VK, Webster S, Dalm VASH, et al. Effective "activated PI3K δ syndrome"-targeted therapy with the PI3K δ inhibitor leniolisib. *Blood.* 2017;130(21):2307-2316.
6. Rao VK, Webster S, Dalm VA, et al. Safety and efficacy of long-term suppression of PI3kinase pathway by small molecule PI3K δ -delta inhibitor, leniolisib in Apds (activated PI3Kd syndrome). *Blood.* 2018;132(suppl 1):3706.
7. Barzaghi F, Amaya Hernandez LC, Neven B et al. Long-term follow-up of IPEX syndrome patients after different therapeutic strategies: An international multicenter retrospective study. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(3):1036-1049.
8. Farmer JR, Foldvari Z, Ujhazi B, et al. Outcomes and Treatment Strategies for Autoimmunity and Hyperinflammation in Patients with RAG Deficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019;7(6):1970-1985.

9. Forbes LR, Vogel TP, Cooper MA et al. Jakinibs for the treatment of immune dysregulation in patients with gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) or STAT3 mutations. *J Allergy Clin Immunol.*2018;142(5):1665-1669.
10. Leiding JW, Okada S, Hagin D et al. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 mutations. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 Feb;141(2):704-717.

A cura della commissione di Immunologia: Stefania Corrente *,Lucia Leonardi, Caterina Cancrini, Giuliana Giardino, Riccardo Castagnoli, Stefano Volpi, Annarosa Soresina, Silvia Federici, Vasilios Lougaris, Francesco La Torre, Fabio Cardinale

*UOC Pediatria, “Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini” Roma