

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK VE LABORATUVAR ÖZELLİKLERİ İLE OTOİMMÜN
LENFOPROLİFERATİF SENDROM (ALPS) DÜŞÜNÜLEN
HASTA VE AİLE BİREYLERİNDE APOPTOZUN
İNCELENMESİ**

Bio. Baran ERMAN

**İmmünoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Ankara-2010

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK VE LABORATUVAR ÖZELLİKLERİ İLE OTOİMMÜN
LENFOPROLİFERATİF SENDROM (ALPS) DÜŞÜNÜLEN
HASTA VE AİLE BİREYLERİNDE APOPTOZUN
İNCELENMESİ**

Bio. Baran ERMAN

**İmmünoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İlhan TEZCAN**

**ORTAK DANIŞMAN
Prof. Dr. Özden SANAL**

Ankara-2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından İmmünoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Özden Sanal
Hacettepe Üniversitesi



Danışman: Prof. Dr. F. İlhan Tezcan
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Sibel Ergüven
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Cemalettin Aybay
Gazi Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Mualla Çetin
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

TESEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde bilgi ve birikimleri ile bana her konuda destek olan danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. İlhan Tezcan'a, başlangıçtan itibaren çalıştığım süre boyunca beni yönlendiren ve katkılarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Özden Sanal'a, Doç. Dr Tuba Turul Özgür'e ve Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi İmmünoloji Ünitesi'ndeki çalışma arkadaşlarıma tesekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Baran, E. Klinik ve laboratuvar özellikleri ile otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS) düşünülen hasta ve aile bireylerinde apoptozun incelenmesi.Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2010. Otoimmün lenfoproliferatif sendrom ilk olarak 1967 yılında Canale ve Smith tarafından tanımlanmıştır. Hastalık lenfadenopati, splenomegali, TCR alfa+ beta+ CD4- CD8- T hücre (*DNT-double negative T cells*) düzeylerinde artış ve otoimmüniteyle karakterizedir.

Hastalıkla ilgili ilk moleküler defekt, Fas aracılı lenfosit apoptozisi bozuk olan bir hastada, ilgili gendeki mutasyonun gösterilmesiyle tanımlanmıştır. Moleküler tanı koyulan hastaların çoğunda TNF reseptör süper protein ailesinin altıncı üyesi olan Fas geninde heterozigot mutasyonlar mevcuttur, fakat Fas-ligand, kaspaz 8, kaspaz 10 gibi Fas aracılı apoptozis mekanizmasında görev alan diğer moleküllerdeki mutasyonlar da gösterilmiştir.

Fas aracılı in vitro apoptozis testiyle gösterilen fonksiyonel defekt ve DNT hücre düzeylerindeki artış ALPS tanısı için kullanılmaktadır. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda ALPS hastalarının plazma Fas-ligand düzeylerinde artış da gösterilmiştir. Çalışmamızda hastanemizde ALPS şüphesiyle izlenen hastalarda in vitro Fas aracılı apoptozis mekanizması ve plazma Fas-ligand düzeyleri araştırılmıştır.

Lenfadenopati, splenomegali ve otoimmün hastalıklara sahip ve ALPS şüphesiyle izlenen toplam 27 hasta, heterozigot Fas mutasyonu saptanmış 4 ALPS tip Ia grubundan hasta ve 30 sağlıklı kontrol çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışma sonunda tip Ia grubundan 4 hastada in vitro fonksiyonel lenfosit apoptozis testi ile Fas aracılı apoptozis mekanizmasında bozukluk saptandı. ALPS şüphesiyle izlenen hastalarda ve kontrol grubunda ise Fas aracılı apoptozis normal olarak saptandı. Çalışmaya katılan tüm hastalar ile sağlıklı kontrol grubunun Fas-ligand düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak bir farklılık saptanmadı. Elde ettiğimiz tüm konsantrasyon düzeyleri normal değer aralığında saptandı.

Anahtar Kelimeler: ALPS, apoptozis, *DNT cells*, Fas

ABSTRACT

Baran, E. Searching apoptosis in suspected ALPS patients with clinical and laboratory findings and their relatives. Hacettepe University Institute of Health Sciences, MD Thesis in Immunology, Ankara, 2005. Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), first described in 1967 by Canale and Smith. The disease is characterized by splenomegaly, lymphadenopathy, hypergammaglobulinemia, accumulation of double-negative TCR α^+ β^+ CD4-CD8- T cells (*DNT cells*) and autoimmunity.

The molecular basis of ALPS was identified in 1995 via the demonstration of mutations in the Fas gene in patients with lymphocyte apoptosis defects. The majority of patients have heterozygous mutations in the Fas (TNFRSF6) gene, but mutations in Fas ligand, caspase 8 and caspase 10 and the other molecules which are involved in Fas mediated signaling, have also been identified.

Previously, DNT cell detection and a functional defect of T cells in a Fas-induced apoptosis test in vitro used for ALPS diagnosis. Also elevated levels of soluble Fas-ligand in the plasma of ALPS patients have been previously reported. In our study, we investigated Fas-induced apoptosis in ALPS suspected patients and we also assessed the soluble Fas-Ligand concentrations in the plasma of suspected patients.

A total of 27 ALPS suspected patients with lymphadenopathy, splenomegaly and autoimmune conditions, 4 ALPS type Ia patients having heterozygous Fas mutations and 30 healthy controls were included in our study.

Overall, we also showed that in 4 ALPS type Ia patients, Fas-induced lymphocyte apoptosis was defective but no Fas-induced apoptosis defect neither in suspected patients nor controls. We couldn't detect any statistically significant differences between soluble Fas-ligand concentrations of patients and controls. All detected concentrations are in normal values.

Key words: ALPS, apoptosis, DNT cells, Fas

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TESEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hücre ölümü ve apoptozis	3
2.1.1. Tanım	3
2.1.2. Apoptozis mekanizmaları	3
2.1.2.1. Ölüm reseptör aracılı apoptozis	5
2.1.2.2. Mitokondriyel apoptozis	8
2.1.2.3. Ölüm Yolağı (Execution Pathway).....	9
2.2. Nekrozis	10
2.3. Otofaji	11
2.4. Otoimmün lenfoproliferatif sendrom	12
2.4.1. Laboratuvar Bulguları	14
2.4.2. ALPS'ye neden olan mutasyonlar ve hastalığın sınıflandırılması	16
2.4.2.1. Mutasyonlar	16
2.4.2.2. ALPS alt grupları	17
2.4.2.2.1. ALPS Tip 0	17

2.4.2.2.2. ALPS Tip Ia	17
2.4.2.2.3. ALPS Tip Ib	18
2.4.2.2.4. ALPS Tip I1a	19
2.4.2.2.5. ALPS Tip I1b	19
2.4.2.2.6. ALPS Tip Im	20
2.4.2.2.7. ALPS Tip III	20
2.4.2.2.8. ALPS Tip IV	21
2.4.3. Tanı ve Tedavi	22
3. HASTALAR ve YÖNTEM	24
3.1. Hastalar	24
3.2. Yöntem	27
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR	37
6. KAYNAKLAR	38

KISALTMALAR

ALPS	: Otoimmün lenfoproliferatif sendrom
DNT	: Double negative T cells
DNA	: Deoksiribonükleik asit
PLAD	: Pre-ligand assembly domain
CRD	: Cystein rich domain
FADD	: Fas associated death domain
DISC	: Death inducing signaling complex
Apaf-1	: Apoptosis activating factor-1
LAP	: Lenfadenopati
OHA	: Otoimmün hemolitik anemi
NRAS	: Neuroblastoma Rat sarcoma
G-CSF	: Granülosit koloni stimüle edici faktör
ANA	: Anti nukleer antikor
D.Coombs	: Direkt coombs
Anti-TPO	: Anti-tiroid peroksidaz
RF	: Romatoid Faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1. Genel apoptozis şeması	4
Şekil 2.2. Fas geni ve Fas molekülünün yapısı	6
Şekil 2.3. Ölüm reseptör aracılı apoptozis.....	7
Şekil 2.4. Mitokondriyal apoptozis	9
Şekil 2.5. Fas molekülünü etkileyen mutasyonlar	18
Şekil 2.6. Fas-ligand geni	18
Şekil 4.1. Çalışma sonunda saptanan ölüm yüzdeleri	30
Şekil 4.2. Çalışma sonunda saptanan plazma Fas-ligand düzeyleri	32

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1.	Apoptozda yer alan kaspaz molekülüleri	5
Tablo 2.2.	Bcl-2 protein ailesi	8
Tablo 2.3.	Apoptoz ve nekroz	10
Tablo 2.4.	ALPS hastalarında görülen klinik bulgular	13
Tablo 2.5.	Çalışmada elde edilen sonuçlar	14
Tablo 2.6.	ALPS hastalarının laboratuvar bulguları	15
Tablo 2.7.	ALPS alt grupları	16
Tablo 2.8.	ALPS alt grupları	21
Tablo 2.9.	Yukarıda belirtilen özelliklerle ilgili Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) ALPS hastalarını tanımlamak için kullandığı tanı kriterleri	22
Tablo 2.10.	NIH'in önerdiği tanı kriterleri	22
Tablo 3.1.	Çalışmaya katılan hastaların yaş ve cinsiyetleri	24
Tablo 3.2.	Çalışmaya katılan hastaların klinik özellikleri	24
Tablo 3.3.	Çalışmaya katılan hastaların klinik özellikleri	25
Tablo 3.4.	Çalışmaya katılan hastaların laboratuvar bulguları	26
Tablo 4.1.	Çalışma sonunda saptanan ölüm yüzdeleri	29
Tablo 4.2.	Çalışma sonunda saptanan Fas-ligand miktarları (ng/ml)	31

1. GİRİŞ

Otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS-*Autoimmune lymphoproliferative syndrome*) nadir görülen ve malign olmayan lenfoproliferasyon ve otoimmün belirtiler ile karakterize olup, diğer bazı hastalıklarla (yaygın değişken immün yetmezlik, Evans Sendromu, Rosai-Dorfman hastalığı, otoimmün hastalıklar gibi) ortak klinik özellikler gösterir. Normal koşullarda, oluşan immünolojik yanıt sonlanmakta ve bu durumda apoptozis mekanizması önemli yer tutmaktadır. Otoimmün lenfoproliferatif sendromu olan hastalarda apoptozis mekanizmalarında yer alan çeşitli moleküllere ait defektler saptanmıştır.

Bu hastalarda klinikte lenfadenopati, splenomegali ve otoimmün sitopeni görülebilir. Bugüne kadar tanı koyulan tüm hastalarda lenfadenopati ve/veya splenomegali görülürken, hastaların yaklaşık %50'sinde hepatomegali de görülmüştür.

Hastalığın en önemli laboratuvar bulgusu TCR alfa+ beta + CD4- CD8- T lenfosit (DNT-*double negative T-cells*) sayısında artıştır. Ancak her zaman belirgin şekilde yüksek olmayabildiği gibi tanı için tek başına yeterli değildir. Ayrıca ALPS hastalarında yapılan çalışmalarda serum ya da plazma Fas-ligand ve IL-10 düzeylerinin de yüksek olduğu saptanmıştır.

Hastalarda görülen lenfoproliferasyonun nedeni ölüm reseptör (Fas) aracılı apoptozis mekanizmasındaki bozukluktur. Apoptozis mekanizmasında yer alan Fas reseptörü ve diğer molekülde çeşitli moleküler bozukluklar saptanmıştır.

Hastalığa kesin tanı koyabilmek için defektif moleküldeki mutasyonun gösterilmesi gerekmektedir. Fakat pahalı ve zaman alıcı moleküler tetkiklerin uygulanması için seçilecek hastaların, çeşitli laboratuvar testleriyle belirlenmesi

oldukça önemlidir. İn vitro fonksiyonel apoptozis testi ALPS tanısı koyulmasında yardımcı bir laboratuvar yöntemi olabilir.

Bu çalışmada klinik olarak ALPS tanısı düşünülen 27 hasta, sağlıklı kontroller ve heterozigot Fas eksikliği olan bireylerde in vitro fonksiyonel apoptozis testinin değerlendirilmesi amaçlanmış ve laboratuvarımızda bu yöntem kurularak hastalarda uygulanması yapılmıştır. Ayrıca yine aynı hasta ve sağlıklı bireylerin plazma Fas ligand düzeyleri ölçülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre ölümü ve apoptozis

2.1.1.Tanım

Genel olarak memelilerde hücre ölümünün 2 tipi vardır. Apoptozis ve nekrozis.Son yıllarda yapılan çalışmalarda otofaji de bir hücre ölüm mekanizması olarak tanımlanmıştır (1).

Apoptozis enerji harcanan programlı bir hücre ölümüdür ve genetik olarak kontrol edilmektedir. Apoptozis terimi eski Yunancada geçmektedir ve anlamı ağaçlardan kuru yaprakların düşmesidir. Tıpta kullanımı ise 2000 yıl öncesine dayanmaktadır. İlk olarak Hipokrat bu terimi kemiklerin azalması anlamında kullanmıştır. Modern tıpta ise programlı hücre ölümü ilk olarak 1972 yılında Kerr, Wylie ve Currie tarafından tanımlanmıştır (2). Bu bilim adamlarının gösterdiği mekanizmanın “apoptozis” olarak tanımlanmasını ise Prof. James Cormack önermiştir. 1992 yılında ise Cohen, timus hücrelerinin direkt olarak apoptozisi seçmediğini, hücreyi apoptoza götürecek proteinlerin genler tarafından kodlanarak sentezlendiğini göstererek bunun programlı bir hücre ölümü olduğunu kanıtlamıştır (3).

2.1.2. Apoptozis mekanizmaları

Vücutta apoptozis, embriyogenez sırasında, sürekli çoğalan hücre gruplarında (özellikle barsak epiteli), immün sistem hücrelerinde, sinir sisteminde ve mensturasyon döneminde gözlenmektedir.

Apoptozis çeşitli uyarılarla başlatılan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptotik uyarıları alan hücrede çeşitli biyokimyasal

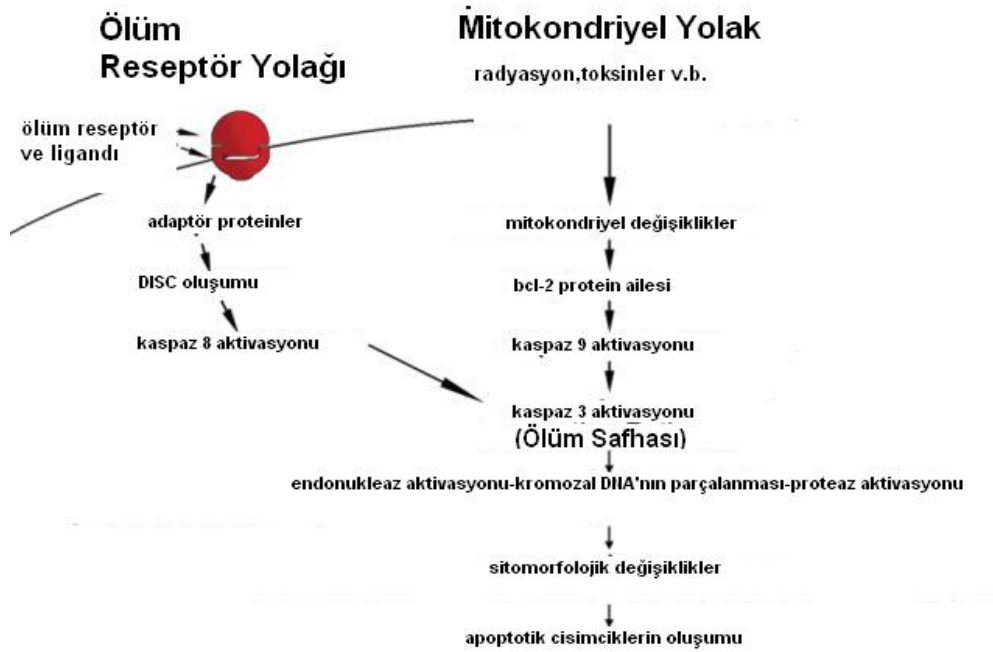
mekanizmalar devreye girmekte ve DNA (Deoksiribonükleik asit) kırıklarının oluşmasıyla hücre apoptotik cisimciklere dönüşmektedir.

Apoptoza giden hücrelerde morfolojik olarak görülen değişiklikler şunlardır (4):

- Hücre yüzeyindeki mikrovilluslar kaybolur
- Sitoplazma yoğunlaşır.
- Çekirdek büzülür ve kromatin yoğunlaşır.
- Hücrede yüzeye doğru tomurcuklanmalar oluşur ve hücre büzülür (*cell shrinkage*).

Genel olarak apoptozis mekanizmaları ikiye ayrılır.

1. Ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı) yolak
2. İntrinsik (mitokondriyel) yolak



(Elmore S: Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495- 516.)

Şekil 2.1. Genel apoptozis şeması

Her iki mekanizmada da hücre dışından alınan çeşitli apoptotik sinyallerle başlatılan hücre içi biyokimyasal olaylar hücreyi apoptoza götürür. Burada kaspaz olarak adlandırılan proteinler önemli rol oynarlar (*caspase-cysteinyl aspartic asid protease*). Kaspazlar hücre içinde bulunan ve birbirlerini aktive ederek kaspaz

kaskadı oluşturan moleküllerdir. Bazıları (kaspaz 2,8,9,10) tetikleyici olarak görev yaparken, bazıları ise efektör (kaspaz 3,6,7) moleküllerdir. Her iki yolakta da çeşitli sinyal iletimleriyle oluşturulan kaspaz kaskadı, efektör kaspazların uyarılmasıyla hücreyi ölüme götürür (5).

Tablo 2.1. Apoptozda yer alan kaspaz molekülleri

Molekül	Diğer Adı	Görevi
Kaspaz-2	ICH-1	Aktivatör
Kaspaz-8	MACH	Aktivatör
Kaspaz-9	ICE_LAP6	Aktivatör
Kaspaz-10	Mch4	Aktivatör
Kaspaz-3	CPP32	Efektör
Kaspaz-6	Mch2	Efektör
Kaspaz-7	Mch3	Efektör

2.1.2.1. Ölüm reseptör aracılı apoptozis

Hücre transmembran reseptörler aracılı etkileşimlerle apoptotik uyarıyı alır ve hücreyi apoptoza götürecek çeşitli biyokimyasal olaylar başlar. Bu reseptörler tümör nekroz faktör reseptör süper ailesinin (TNFRSF) üyesi moleküllerdir (6). Bu protein ailesinin üyeleri birbirine benzer, sistince zengin hücre dışı bölgelere ve ölüm bölgesi denen sitoplazmik dizilere sahiptirler. Ölüm domeyni hücre dışından gelen sinyallerin, hücre içinde gerçekleşecek olan mekanizmalar için iletiminde önemli rol oynamaktadır. Günümüzde en iyi tanımlanan ölüm reseptörleri ve ligandları şunlardır (7,8,9).

·FasL-FasR

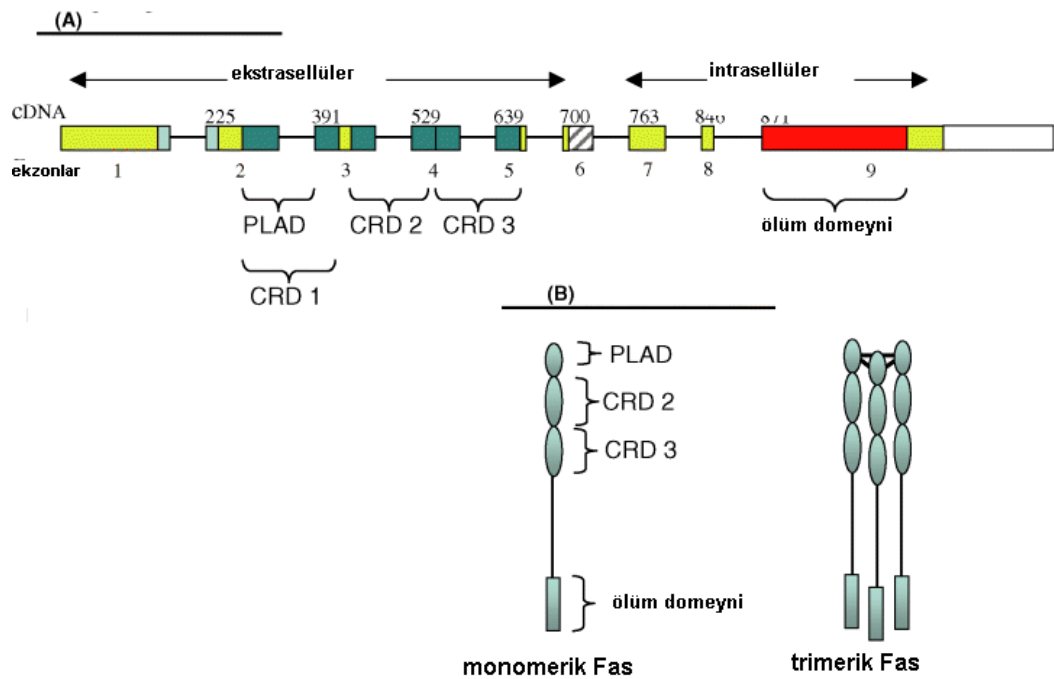
·TNFalfa-TNFR1

·Apo3L-DR3

·Apo2L-DR4

·Apo2L-DR5

Bugün için en iyi bilinen apoptozis mekanizması Fas-FasL aracılı yolaktır. Özellikle immün sistem hücrelerinde görülür ve lenfosit homeostazının sağlanmasındaki önemi büyüktür. Fas molekülü (Apo-1,CD95) 10q24.1’de kodlanır ve 319 aminoasit büyüklüğünde, tip1 transmembran glikoproteinidir. Bu glikoprotein 3 adet sisteince zengin ekstrasellüler bölgeye ve 80 aminoasit büyüklüğünde intrasellüler bölgeye sahiptir. İmmün sistem hücrelerinde (CD4 + T hücreler, CD8 + T hücreler ve NK hücreleri), karaciğer, bazı kardiyak ve akciğer hücrelerinde eksprese edilir (10).



A : Fas geni

B : Fas proteini

PLAD : Pre-ligand assembly domain,

CRD : Cystein rich domain

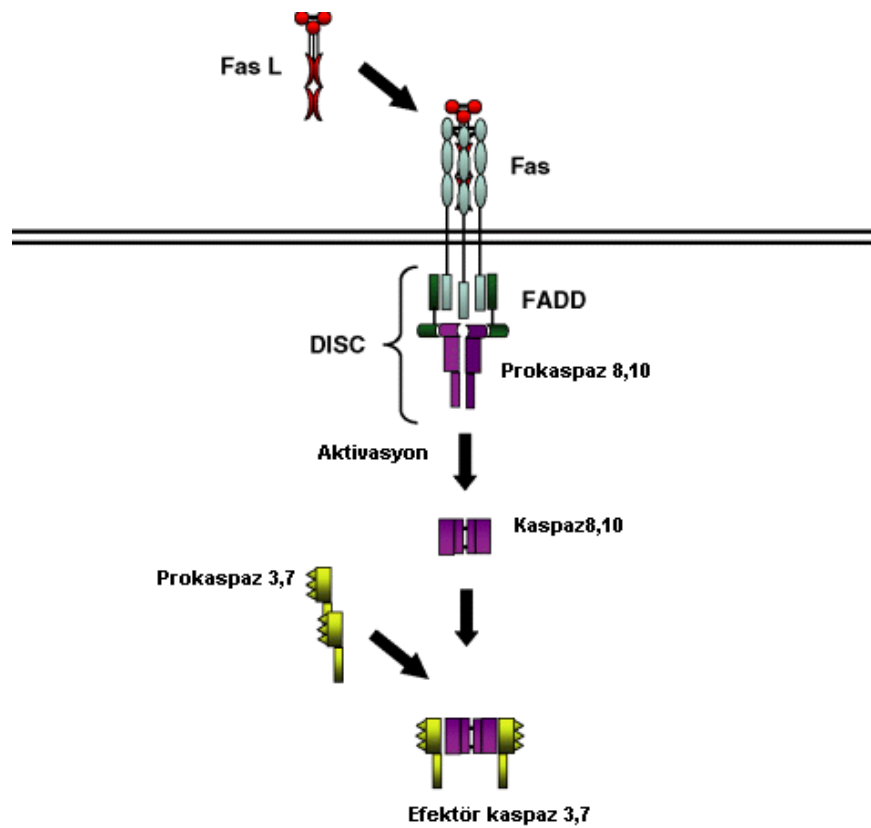
(Worth A, Thrasher AJ, Gaspar HB. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: Molecular Basis of disease and clinical phenotype. Br J Haematol 2006;2:124-40)

Şekil 2.2. Fas geni ve Fas molekülünün yapısı

İmmün sistemde mikroorganizmalara karşı verilen cevap sırasında lenfosit ekspansiyonu olur ve aktive olan lenfositler Fas-ligand molekülünü eksprese ederler. Homeostazın sağlanması için çoğalan bu lenfositlerin Fas-FasL bağlantısıyla apoptoza gitmesi gerekmektedir. Bu bağlantının sağlanmasıyla hücre yüzeyinde

protein oligomerizasyonu olur ve trimerik Fas yapısı oluşur. Apoptozun devam etmesi için bu trimerik yapının oluşması çok önemlidir.

Fas ligandın trimerik Fas'a bağlanmasıyla başlatılan sinyal iletimi sitoplazmada bulunan adaptör protein FADD'ın (*Fas associated death domain*-Fas ilişkili ölüm bölgesi) bu komplekse bağlanmasını sağlar. Yine sitoplazmada bulunan ve inaktif durumda olan prokaspaz 8 ya da 10 FADD'a bağlanmaktadır ve DISC (*Death inducing signaling complex*-Ölüm indükleyici sinyal kompleksi) formasyonu oluşur. Bu formasyonun oluşmasıyla prokaspaz 8 ya da 10 otoproteolitik aktivasyonla parçalanır ve tetramer yapıdaki kaspaz 8 ya da 10 oluşarak kaspaz kaskadı başlatılır. Ölüm reseptör aracılığı yolağın son mekanizması ise kaspaz 8 ya da 10'nun sitoplazmada bulunan prokaspaz 3 ya da 7 (efektör kaspazlar)'yi aktive etmesidir (11).



FADD : Fas associated death domain

DISC : Death inducing signaling complex

(Worth A, Thrasher AJ, Gaspar HB. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: Molecular Basis of disease and clinical phenotype. Br J Haematol 2006;2:124-40)

Şekil 2.3. Ölüm reseptör aracılı apoptozis

2.1.2.2. Mitokondriyel apoptozis

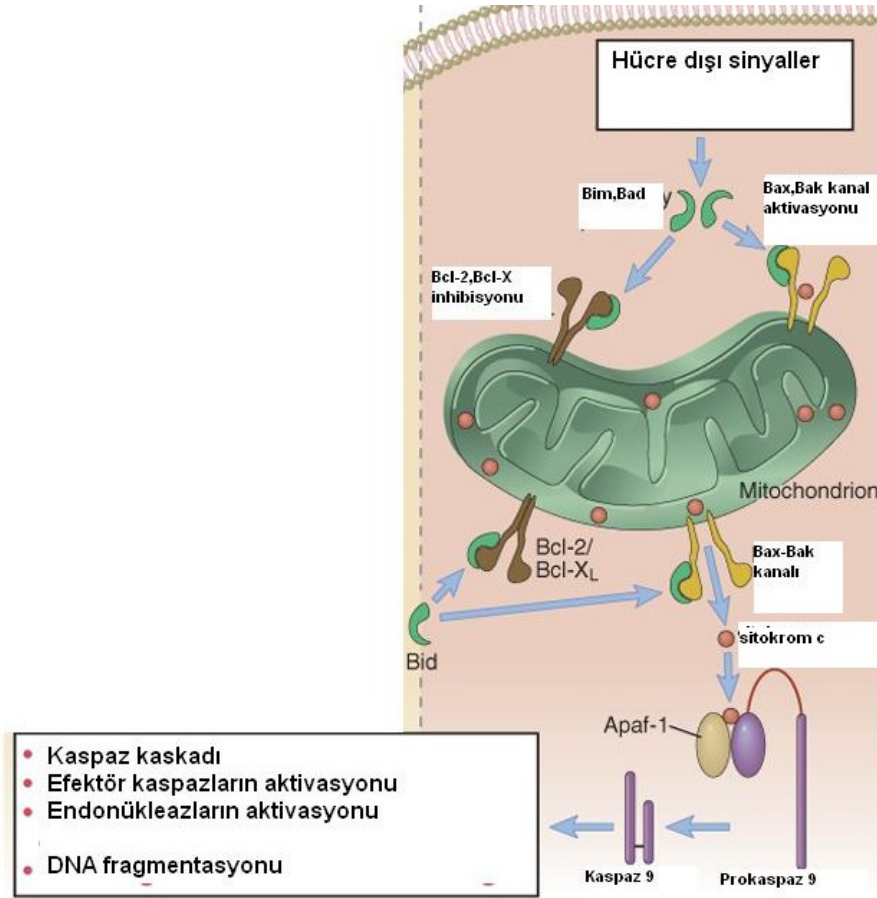
Hücre dışından alınan çeşitli uyarılar (radyasyon, toksinler, büyüme hormonu eksikliği v.b.) hücreyi mitokondriyal yolla apoptoza götürmektedir. Mitokondriyal apoptozda görev alan en önemli moleküller Bcl-2 protein ailesidir. Bu ailenin bazı üyeleri proapoptotikken bazıları apoptoz inhibitörü olarak görev yapmaktadırlar (12,13).

Tablo 2.2. Bcl-2 protein ailesi

Protein	Apoptozdaki rolü	Bcl-2 domeyni
Bcl-2		
Bcl-XL	antiapoptotik	BH1,BH2,BH3,BH4
Mcl-1		
A1		
Bcl-W	antiapoptotik	BH1,BH2,BH3,BH4
Bax		
Bak	proapoptotik	BH1,BH2,BH3
Bok		
Bcl-XS	proapoptotik	BH3,BH4
BIK		
Hrk		
Bim		BH3
Blk	proapoptotik	
Bad		BH3
Bid		

Apoptotik sinyallerin alınmasıyla sitoplazmada bulunan proapoptotik Bcl proteinleri (Bim, Bad, Bid) antiapoptotik olan ve mitokondri membran bütünlüğünü sağlayan molekülleri (Bcl-2, Bcl-X) inhibe etmektedir. Yine aynı proapoptotik proteinler mitokondri membran kanallarını oluşturan Bax ve Bak'ı aktive ederek kanalların açılmasını sağlarlar. Membran bütünlüğünün bozulması ve kanalların açılmasıyla mitokondride bulunan sitokrom c molekülleri sitoplazmaya çıkarlar ve Apaf-1(*Apoptosis activating factor-1*-Apoptozis aktive edici faktör-1)- sitokrom c-

prokaspaz 9 kompleksi oluşur. Bu yapının oluşmasıyla aktive olan kaspaz 9 efektör kaspazlara bağlanarak hücreyi ölüm aşamasına götürür (14,15).



Apaf-1: Apoptosis activating factor-1

(Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Cellular and Molecular Immunology. 6th edition)

Şekil 2.4. Mitokondriyal apoptozis

2.1.2.3. Ölüm Yolağı (Execution Pathway)

Efektör kaspazların aktive olmasıyla sitoplazmada bulunan çeşitli endonükleazlar da bu kaspazlar tarafından aktive edilir. Efektör kaspaz 3 molekülü CAD (*caspase activated DNase*) denen endonükleaz proteinini aktive ederek, bu enzimin çekirdeğe girerek DNA'yı parçalamasını sağlar. DNA fragmentasyonunun gerçekleşmesiyle hücre morfolojik değişikliklere gider ve apoptotik cisimcikler

oluşur. Daha sonra bu apoptotik yapılar çevrede bulunan fagositer hücreler tarafından temizlenmektedirler (16,17,18).

2.2. Nekrozis

Nekroz, hücrelerin geri dönülemez şekilde zarar gördüğü patolojik hücre ölümüdür. Kanseri, iskei, sıcaklık, soğukluk, mekanik şiddet gibi fiziksel durumlar ve membran bütünlüğünü bozan toksinler nekroza yol açmaktadırlar.

Nekrozda apoptozisten farklı olarak hücre şişmekte ve membran yıkılarak hücre içeriği dış ortama çıkarak inflamasyona neden olmaktadır (19,20).

Tablo 2.3. Apoptoz ve nekroz

Özellik	Nekrozis	Apoptozis
Yol açan nedenler	iskei hipertermi hipoksi litik viral enfeksiyon toksik maddeler şiddetli oksidatif stres	Hücre yaşlanması(senesens) büyüme faktörü eksikliği kanseri ilaçları radrasyon ölüm reseptör aktivasyonu sitotoksik T lenfositler
Morfolojik özellikler	Hücre membranının yıkımı Hücre şişmesi(swelling) Organellerin disintegrasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	Apoptotik yapıların oluşumu Kromatin yoğunlaşması Hücre büzüşmesi
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon dengesi Postlitik DNA parçalanması ATP gerekmez	Enzimatik basamaklar ATP ihtiyacı DNA kırıkları Prelitik DNA parçalanması
Diğer özellikler	Hücrelerin gruplar halinde ölmesi Patolojik etkilerle oluşum Lizozomal enzimlerin salınması İnflamasyon oluşumu	Programlı hücre ölüm mekanizması İnflamasyonun oluşmaması

Günümüzde nekrozun düşünülenden daha kontrollü gerçekleşen bir hücre ölüm mekanizması olduğu anlaşılmıştır. Nekroz sırasında çeşitli proteinlerin

(DAMP-damage associated molecular pattern) sirkulasyona girerek doğal immünitede görev yapan hücreleri aktive ettiği gösterilmiştir (21). Bunun yanında çeşitli hücre yüzey reseptörlerinin aktivasyonunun nekroza yol açtığı bilinmektedir. Örneğin yüksek konsantrasyonda TNF hepatosit nekrozunu tetikler (22).

2.3. Otofaji

Otofaji eski yunanca bir kelime olup, kendi kendini (oto) yeme (faji) anlamına gelmektedir. İlk olarak elektron mikroskopuyla gözlenen, içerisinde çeşitli sitoplazmik partiküllerin bulunduğu, tek ya da çift zar yapısına sahip lizozomal veziküller için bu terim kullanılmıştır. Günümüzde otofajinin, hücrelerin gereğinden fazla, kullanılmayan ya da zarar görmüş organel veya makromoleküler komponentlerini yok etmek için kullandıkları bir mekanizma olduğu bilinmektedir.

Otofaji, hücrenin enerji elde etmek için kullandığı besin kaynaklarının yokluğuna karşı geliştirdiği adaptif bir cevaptır. Aynı zamanda tümör gelişiminin baskılanmasında, toksik proteinlerin yok edilmesinde, intasellüler mikroorganizmaların eliminasyonunda ve antijen sunumunda da rol oynamaktadır.

Otofajinin lizozomlarda yıkılan materyalin büyüklüğüne ve taşınmasına göre tanımlanan 3 formu bulunmaktadır. Makrotofajide çift zar yapısında bulunan otofagozomlar yıkılacak materyali taşımakta ve lizozomlarla birleşmektedirler. Mikrotofajide lizozomal membran materyali içine alarak taşımakta ve yıkım lizozomlarda gerçekleşmektedir. Şaperon aracılı otofajide ise *heat-shock* proteinleri substratları lizozomlara taşımaktadırlar (23,24).

Günümüzde otofajinin hücre ölümündeki rolü tartışmaya açık bir konudur. Otofajinin aşırı düzeyde olmasının hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi için gerekli protein ve organelerin yıkımına yol açtığı ve kaspaz bağımsız apoptozisi tetiklediği düşünülmektedir. Ölüme giden bazı hücrelerde otofagozomların sayının arttığı gösterilmiştir. Bunun yanında otofajik genlerin delesyonunun hücre ölümünü artırdığı da kanıtlanmıştır. Sonuç olarak otofajinin baskın olarak hücre ölümünü mü

tetiklediği yoksa besin yokluğuna karşı hücreyi hayatta tutabilmek için geliştirilen adaptif bir yanıt mı olduğu tam olarak anlaşılamamıştır (24,25).

2.4. Otoimmün lenfoproliferatif sendrom

ALPS, programlanmış hücre ölümünde (apoptozis) görev alan çeşitli moleküllerdeki bozukluklarla ortaya çıkan kronik, malign olmayan bir lenfoproliferatif hastalıktır.

Hastalık ilk olarak 1967 yılında Virginia Canale ve Carl Henry Smith tarafından tanımlanmıştır ve Canale-Smith sendromu olarak da bilinir (26). Genellikle yaşamın erken yıllarında ortaya çıkmaktadır. Bugüne kadar dünya genelinde 400 den fazla hasta tanımlanmıştır (27).

Hastalığın en sık klinik bulguları kronik seyirli lenfadenopati, splenomegali ve reküren otoimmün sitopenidir. Bugüne kadar tanımlanan hastaların hepsinde lenfadenopati ve/veya splenomegali görülmüştür. Lenfadenopati tipik olarak yıllar boyunca devam edebilir. Hastaların bilgisayarlı tomografi ve ultrason görüntülerinde büyümüş olarak bulunan torasik ve abdominal lenf nodları mevcuttur (28,29).

Hastalarda klinik bulgular erken çocukluk döneminde ortaya çıkmaktadır. Bu semptomların başlama yaşı tipik olarak yaklaşık 24 aydır. Fakat bazı çocuklarda hemolitik anemi ve trombositopeniyle beraber daha erken dönemde de görülebilmektedir. Kronik splenomegali tanımlanan vakaların büyük bir çoğunluğunda gözlemlenmiştir. Hepatomegali ise tanımlanan hastaların yaklaşık %50'sinde görülmektedir.

ALPS'de görülen en sık otoimmün bozukluklar hemolitik anemi, trombositopeni ve nütropenidir. Bazı hastalarda Guillian-Barre sendromu, glomerulonefrit ve üveit gibi otoimmün hastalıklar da görülmüştür (30,31).

Otoimmüniteye ek olarak, ALPS tanısı almış hastalarda hematolojik malignansi gelişme riski de taşırlar. Genel popülasyona göre, ALPS hastalarında

Hodgkin lenfoma görülme riski 50 kat, non-Hodgkin lenfoma riski ise 14 kat fazladır. Lenfoma gelişimi genellikle adelösan dönemden sonra ortaya çıkmaktadır (29,32).

Tablo 2.4. ALPS tanısı almış hastalarda görülen klinik bulgular

KLİNİK BULGULAR			
Lenfoproliferasyon	Otoimmünite	Malignite	Diğer
Lenfoid hücre proliferasyonu	OHA	Lenfoma	Ürtiker
LAP	Otoimmün trombositopeni	Karsinom	Vaskülit
Splenomegali	Otoimmün nötropeni	Çok sayıda neoplazik lezyon	Pannükilit
Hepatomegali	Glomerülonefrit		Artrit-artralji
	Otoimmün hepatit		Aplastik anemi
	Guillian-Barre sendromu		Pulmoner infiltrasyon
	Üveit		Prematür ovaryan yetmezliği
			Hidrops fötalis
			Mental durum değişikliği
			Nöbet, baş ağrısı

LAP : Lenfadenopati

OHA : Otoimmün hemolitik anemi

Literatürde bulunan, Amerika Birleşik Devletlerinde ALPS tanısı alan 62 hastayı kapsayan bir çalışmada görülen klinik bulguların yüzdesi şu şekilde saptanmıştır (33).

Tablo 2.5. Çalışmada elde edilen sonuçlar

Klinik bulgular	Vaka ve görülme sayısı	Yüzdesi(%)
Splenomegali	56/62	90
Lenfadenopati	54/62	87
Otoimmün hemolitik anemi	33/62	53
Hepatomegali	28/62	45
Otoimmün trombositopeni	27/62	44
Otoimmün nütropeni	19/62	31
Lenfoma	9/62	14
Karsinom	6/62	10
Glomerulonefrit	5/62	8
Otoimmün hepatit	4/62	6
Gullian-Barr sendromu	3/62	5
Üveit	3/62	5
Splenektomi	20/62	32

2.4.1. Laboratuvar Bulguları

Hastalarda görülen en önemli laboratuvar bulgusu DNT (*double negative T cell*) hücrelerindeki artıştır. Bu hücreler alfa, beta T lenfosit reseptör zinciri ekspres eden fakat CD4 ve CD8 koreseptör ekspresyonu yapmayan hücrelerdir (CD3+ TCR alfa+ beta+ CD4- CD8- T hücreler). Sağlıklı bireylerde dolaşımdaki DNT hücreleri %1'in altındayken, bu oranın ALPS tanısı almış hastalarda %60'a kadar çıkabildiği gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin ALPS patogenezindeki rolü henüz bilinmemektedir. DNT hücreleri CD27, CD57, HLA-DR ve CD45 gibi diğer hücre markırlarını eksprese ederler. Bunun yanında DNT hücreleri yüksek oranda IL-10 salgırlar ve yapılan çalışmalarda ALPS'li hastaların serum ve plazma IL-10 düzeylerinin sağlıklı bireylere göre yüksek olduğu saptanmıştır (34,35,36).

DNT hücrelerindeki artışın yanı sıra CD5 + B hücre, CD57 + T hücre ve TCR gama+ delta + lenfositlerin sayısında da artış görülebilir. Şaşırtıcı olarak bazı hastalarda ise CD4 + CD25 + T hücrelerde ve CD27 + B hücrelerde azalma

görülmüştür. Yüksek euzonofil sayısı ve artan mortalite ilişkisi de ALPS hastalarında tanımlanmıştır (37).

Anti-platelet ve anti-nötrofil antikorları hastaların yaklaşık %40'ında saptanmıştır. Fakat bu otoantikorların varlığının nötropeni ya da trombositopeniyle ilişkisi yoktur. Antikardiyolipin antikorları da sıklıkla görülmektedir, fakat bunun da trombositopeniyle ilişkisi saptanmamıştır. Antinükleer ve anti-DNA antikorları ise genellikle negatiftir (38).

Fas aracılı apoptozis mekanizmasındaki bozukluk in vitro fonksiyonel apoptozis testiyle tespit edilebilir.

Tablo 2.6. ALPS hastalarının laboratuvar bulguları

LABORATUVAR BULGULARI		
Hematolojik	Biyokimya	İmmünolojik
Lenfositoz	Karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk	IgG ve IgA seviyesinde artış
Lenfopeni	Proteinüri	IgM seviyesinde azalma
Anemi	Vitamin B12 seviyesinde artış	DNT hücre düzeylerinde artış
Retikülositoz		CD8+ T hücrelerde artış
Nötropeni		CD8+/CD57+ T hücrelerde artış
Eozinofili		HLADR+ T hücrelerde artış
Trombositopeni		CD5+ B hücrelerde artış
Diseritropoezis		CD4+/CD25+ T hücrelerde azalma
		B hücre CD27 ekspresyonunda azalma
		Serum IL-10 düzeyinde artış
		Serum Fas-L düzeyinde artış
		Otoantikorlar(ANA,RF gibi)

2.4.2. ALPS'ye neden olan mutasyonlar ve hastalığın sınıflandırılması

2.4.2.1. Mutasyonlar

Apoptozis mekanizmalarında görev yapan çeşitli molekülleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar ALPS'ye neden olabilir. Tanımlanan hastaların çoğunda Fas proteinini kodlayan gende mutasyonlar saptanmıştır. İlk olarak 1992 yılında fare modelinde Fas proteininin ölüm bölgesini etkileyen bir mutasyon gösterilmiştir (39). İnsanlarda ise 1995 yılında Fas geninde saptanan bir mutasyonun ALPS'ye neden olduğu gösterilmiştir (40,41). Bugüne kadar yaklaşık 70 farklı Fas gen mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonların çoğu heterozigot, missens, tek ya da çift nükleotid insersiyon ya da delesyon mutasyonlarıdır. Fas geninin dokuzuncu ekzonunda, molekülün intrasellüler kısmının kodlandığı dizilerdeki mutasyonların oranı yaklaşık %65'dir (42,43).

Fas proteini dışında apoptozis mekanizmalarında görev yapan diğer molekülleri etkileyen mutasyonlar da gösterilmiştir ve bu genetik bozuklukların lokalizasyonuna göre hastalık çeşitli alt gruplara ayrılır.

Tablo 2.7. ALPS alt grupları

Sınıflandırma	Genetik defekt
Tip 0	Fas(TNFRSF6)
Tip Ia	Fas(TNFRSF6)
Tip Ib	Fas-Ligand(TNFRSF6)
Tip Im	Somatik Fas mutasyonları
Tip IIa	Kaspaz 10
Tip IIb	Kaspaz 8
Tip III	Bilinmeyen mutasyonlar
Tip IV	NRAS (intrinsik yolak)

NRAS:Neuroblastoma Rat sarcoma

2.4.2.2. ALPS alt grupları

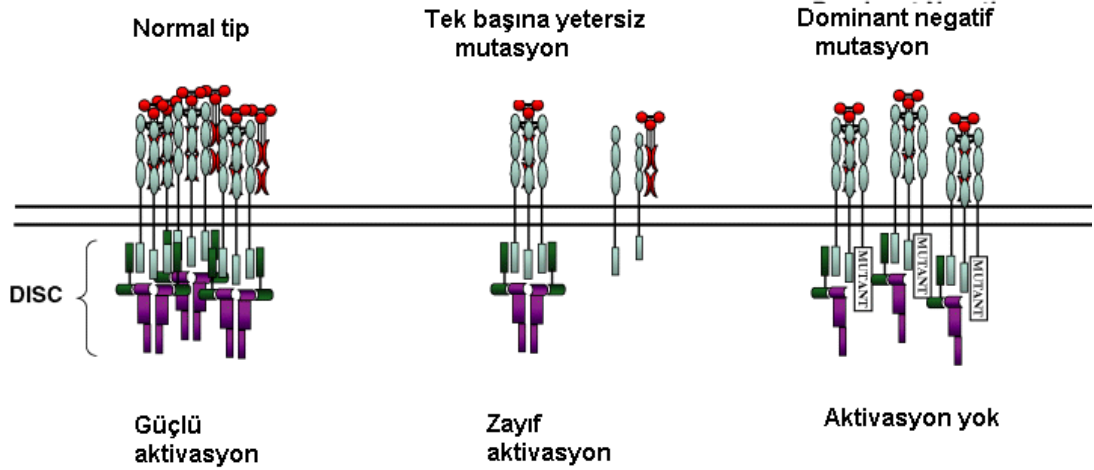
2.4.2.2.1. ALPS Tip 0

Homozigot Fas mutasyonlarına sahip hastalar Tip 0 olarak gruplandırılmaktadır. Günümüze kadar yalnızca 4 vaka saptanmıştır (44,45,46). Bu hastalarda klinik penetrasyon daha şiddetlidir ve doğumdan itibaren ağır sitopeni görülür. Mutasyonlar Fas protein ekspresyonunun olmamasına ya da eksprese edilse bile afonksiyonel olmasına yol açabilir. Tanımlanan hastaların ikisinde molekülün ölüm bölgesini etkileyen mutasyonlar, birinde ekstrasellüler bölgeyi etkileyen bir defekt ve bir hastada ise hücre yüzeyinde Fas ekspresyonunu azaltan bir mutasyon gösterilmiştir.

2.4.2.2.2. ALPS Tip Ia

Otozomal dominant geçişli, heterozigot Fas mutasyonları olan hastalar bu gruptandır. Bugüne kadar tanımlanan hastaların yaklaşık %70'i bu tipte sınıflandırılmışlardır. Fas molekülünün yapısından dolayı (bkz şekil 2.1), mutasyon heterozigot geçişli olmasına rağmen genetik bozukluk dominant etkiye sahiptir. Bilindiği gibi Fas molekülleri, hücre yüzeyinde sinyal iletiminin sağlanması için trimerik bir yapı oluşturur ve yalnızca bir mutant Fas molekülü bile sinyalizasyonun bozuk olmasına yol açar. Buna Fas molekülünün dominant negatif etkisi denir (47,48).

Klinik semptomların görülmesine yol açan en önemli etki, Fas molekülünün intrasellüler kısmındaki ölüm bölgesinin eksik olmasına neden olan misens mutasyonlardır. Bu gruptaki hastalarda hücre yüzeyinde Fas ekspresyonu normal olmasına rağmen molekül afonksiyoneldir (49).

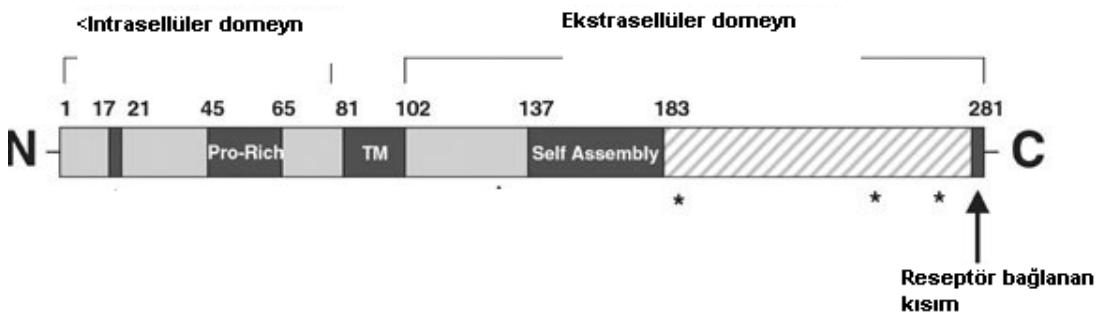


(Worth A, Thrasher AJ, Gaspar HB. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: Molecular Basis of disease and clinical phenotype. Br J Haematol 2006;2:124-40)

Şekil 2.5. Fas molekülünü etkileyen mutasyonlar

2.4.2.2.3. ALPS Tip Ib

Bu gruptaki hastaların Fas-Ligand molekülünü kodlayan gende mutasyonları vardır. Fas-L geni birinci kromozomun uzun kolunda bulunur (1q.23) ve 4 ekzona sahiptir.



(Worth A, Thrasher AJ, Gaspar HB. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: Molecular Basis of disease and clinical phenotype. Br J Haematol 2006;2:124-40)

Şekil 2.6. Fas-ligand geni

Günümüze kadar 3 hasta tanımlanmıştır. İlk olarak 1996 yılında Wu ve arkadaşları tarafından tipik SLE sendromlarıyla izlenen 52 yaşında bir erkek hastada Fas-L geninde heterozigot bir mutasyon gösterilmiştir (50). İkinci olarak tanımlanan hastada ise Fas-L geninde homozigot olan ve molekülün intrasellüler kısmını etkileyerek, ekspresyonun bozuk olmasına yol açan bir mutasyon saptanmıştır (51). Son olarak ise 2007 yılında lenfodenopati, splenomegali, artmış DNT hücreleri ve otoimmün trombositopeniyle izlenen bir hastada heterozigot A539G mutasyonu saptanmıştır (52). Sonuç olarak Fas-L genindeki mutasyonlar homozigot ya da heterozigot olabilir ve bozuk protein ekspresyonuna yol açarlar.

2.4.2.2.4. ALPS Tip IIa

Kaspaz 10 geninde defekt mevcuttur. Bu gen 2q23'de lokalizedir. Kaspaz 10 molekülü ekstrinsik apoptozis yolağında hem kaspaz 8'in hem de efektör kaspazların aktivasyonunu sağlar (53,54).

Günümüze kadar 3 vaka tanımlanmıştır. İlk olarak Wang ve arkadaşları tarafından 1999 yılında 2 hastada gösterilmiştir (55). Hastalardan birinde asemptomatik anneden kalıtılan homozigot kaspaz 10 mutasyonu, diğerinde ise her iki aleli mutant olan homozigot defekt gösterilmiştir. Her iki hasta da yaşamın ilk yılından itibaren lenfoproliferasyon, otoimmün bozukluklar, yüksek DNT hücre düzeyleri ile izlenmiştir. Hastalarda Fas aracılı apoptoziste bozuklukla beraber, TNF aracılı apoptoziste de bozukluk gösterilmiştir. Ayrıca dendritik hücre apoptozunun da bozuk olduğu saptanmıştır ve bu hastalarda görülen otoimmün semptomların bundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

2.4.2.2.5. ALPS Tip IIb

Kaspaz 10 molekülüne homolog yapıda olan kaspaz 8 molekülünü kodlayan gende mutasyonlar mevcuttur. 2002 yılında CVID(*common variable immunodeficiency*-sık görülen değişken immün yetmezlik) tanısıyla izlenen 2

hastada gösterilmiştir (56). Klasik ALPS bulgularının yanında çok şiddetli olmayan rekürren herpes simplex virüs enfeksiyonları ve defektif aşı cevapları gibi klinik semptomlar söz konusudur.

2.4.2.2.6. ALPS Tip Im

Son yıllarda ALPS benzeri klinik fenotip gösteren, DNT hücreleri artmış fakat normal Fas aracılı apoptozise sahip hastalar tanımlanmıştır. Bu hasta grubunda (10 vaka) belli hücre populasyonlarında (özellikle DNT hücreleri, az sayıda olmak üzere CD4 + ve CD8 + lenfositler, monositler ve CD34 + hematopoietik hücre öncülleri) somatik heterozigot Fas mutasyonları saptanmıştır (57).

Normal in vitro lenfosit apoptozis gösteren ve sporadik forma sahip hastalardan DNT hücreleri izole edilerek, somatik mutasyonların gösterilebilmesi için sekans analizleri yapılmalıdır.

2.4.2.2.7.ALPS Tip III

Klasik ALPS bulguları gösteren, apoptozis mekanizmasında bozukluk olan fakat sinyal yollarındaki mutasyonların gösterilemediği hastalar bu gruba dahildir.

İlk olarak Dianzani 1997 yılında, klasik ALPS klinik bulguları gösteren, lenfosit apoptozunda bozukluk olan, normal DNT hücre düzeylerine sahip ve Fas, Fas-L mutasyonu olmayan bir hasta grubu tanımlamıştır (58). Bu hastalarda DISC formasyonunun oluşmasından sonraki apoptozis basamaklarında defekt olabileceği düşünülmektedir.

2.4.2.2.8. ALPS Tip IV

2007 yılında, kronik lenfadenopati ve splenomegalisi olan, DNT hücre düzeyleri yüksek 49 yaşında bir erkek hastada intrinsik apoptozis yolağında bozukluk olduğu saptanmıştır (IL-2 geri çekilmesiyle oluşan mitokondriyel apoptozis mekanizmasının defektif olması) (59). Yapılan moleküler çalışmalarda hastada bir onkogen olan NRAS geninde (RAS gen ailesinin üç üyesinden biri) Gly13Asp mutasyonu gösterilmiştir. Bu mutasyona sahip kişilerde sitoplazmada bulunan proapoptotik Bim proteini sürekli inaktif kalmakta ve hücre apoptoza gidememektedir.

Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün tüm dünyada çeşitli merkezlerde yapılan ortak çalışmalar sonunda yayınladığı rapora göre hastalık alt gruplarının sınıflandırılması şu şekilde revize edilmiştir (66).

Tablo 2.8. ALPS alt grupları

Önceki sınıflandırma	Değiştirilen sınıflandırma
ALPS tip 0	ALPS-Fas
ALPS tip Ia	ALPS-Fas
ALPS tip Im	ALPS-sFas
ALPS Ib	ALPS-Fas-ligand
ALPS IIa	ALPS-CASP10
ALPS III	ALPS-U (ALPS unknown)
ALPS tip IIb	CEDS
ALPS tip IV	RALD

CEDS: *Caspase 8 deficiency state*

RALD: *Ras associated autoimmune leukoproliferative disease*

2.4.3.Tanı ve Tedavi

Hastalık için tanı kriterleri arasında malign olmayan lenfadenopati, 6 aydan fazla süren splenomegali, defektif lenfosit apoptozis ve DNT hücre düzeyinin artışı sayılabilir. Bunların yanında destekleyici kriterler ise aile hikayesi, tipik lenf nodu histopatolojisi ve otoimmün hastalıklardır. Fakat kesin tanının koyulabilmesi için defektif olan gendeki mutasyonun gösterilmesi gerekir.

Tablo 2.9. Yukarıda belirtilen özelliklerle ilgili Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) ALPS hastalarını tanımlamak için kullandığı tanı kriterleri

NIH kriterleri
Lenfadenopati veya hepatosplenomegali ile belirlenen ve malign olmayan lenfoid hücrelerin kronik proliferasyonu
In vitro Fas aracılı lenfosit apoptozis defekti
Periferik kanda CD4- CD8- alfa+ beta + T hücre oranının %1 den fazla olması

2010 yılında yapılan çeşitli revizyonlarla bu tanı kriterleri şu şekilde değiştirilmiştir.

Tablo 2.10. NIH'in önerdiği tanı kriterleri

Gerekli kriterler	Yardımcı kriterler	
	Birincil yardımcı kriterler	İkincil yardımcı kriterler
Kronik, malign olmayan lenfadenopati ve/veya splenomegali	Bozuk lenfosit apoptozis	Artmış plazma Fas-ligand, IL-10, vitamin B12 ya da IL-18 miktarları
Artmış DNT hücre miktarı	Fas, Fas-ligand ya da kaspaz 10 mutasyonu	Tipik immün-histolojik bulgular
		Otoimmün sitopeni ve artmış IgG miktarı
		Aile hikayesi (malign olmayan lenfoproliferasyon)

ALPS hastalarının tedavisinde ise, hastaların klinik durumuna göre (özellikle sitopeniler için) tedaviler uygulanmalıdır. Otoimmün sitopeniler için(otoimmün hemolitik anemi, immün trombositopeni, otoimmün nötropeni), diğer immünolojik sitopenilerin tedavisine benzer yöntemler kullanılmaktadır. Kortikosteroidler ile immün supresyonun sağlanması mümkündür. Yüksek doz (5-30 mg/kg/gün) intravenöz metilprednizolon ve bunu takiben düşük doz (1-2 mg/kg/gün) oral prednizolon tedavisi uygundur. Yüksek doz metil prednizolon ile birlikte IVIG (intravenöz immünglobulin-1-2 gr/kg/gün) kullanımı otoimmün hemolitik anemisi olan hastalar için faydalıdır. Kronik nötropenisi olan hastalar için enfeksiyon sırasında haftada 3 kez düşük doz (1-2 µg/kg) G-CSF (granülosit koloni stimüle edici faktör) kullanılabilir. Anti CD-20 (Rituximab) kullanımı ise refraktör sitopenisi olan 5 hastada uygulanmış ve ikisinde tam cevap alınmıştır. Kronik refrakter sitopenisi olan ALPS'li 13 hastaya Mycophenolate mofetil tedavisi uygulanmış ve sitopeninin uzun süreli düzelmesi sağlanmıştır. Steroide refrakter otoimmün sitopenisi olan hastalarda kullanımı önerilmektedir (60,61,62,63).

Hepatosplenomegali ve lenfadenopati ise kortikosteroidler veya kemoterapötikler ile tedavi edilebilmektedir. Fakat bu ilaçların yan etkileri bulunduğu ve tedavi kesildikten sonra semptomların devam etmesinden dolayı lenfadenopatinin tek başına tedavisinin gerekmediği belirtilmektedir.

Splenektomi ise kronik, tedavilere dirençli ve hayatı tehdit eden sitopeniler gelişmedikçe önerilmemektedir.

Homozigot Fas mutasyonuna sahip, dirençli sitopenisi olan iki hastaya kemik iliği nakli yapılmış ve başarılı olduğu gözlemlenmiştir (64,65).

3. HASTALAR ve YÖNTEM

3.1. Hastalar

Çalışmaya olası ALPS tanısı ile Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi İmmünoloji Ünitesin’de izlenen 27 hasta ile Fas geni ekzon dokuzda bulunan heterozigot I259 mutasyonu gösterilmiş 4 hasta ve 30 sağlıklı kontrol alındı.

Çalışmaya katılan hastaların yaş ortalaması 11.9 yıl (3-45), ortanca yaş ise 10 olarak saptandı. ALPS tip Ia grubundan hastaların yaş ortalaması ise 12 idi (8-21) (bkz. tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Çalışmaya katılan hastaların yaş ve cinsiyetleri

	Hasta sayısı	Yüzde (%)	Yaş ortalaması
Erkek	15	48	13,9
Kız	16	52	10,1
Toplam	31		11,9

Tüm hasta grubunda lenfadenopati, hepatosplenomegali, ITP ve OHA görülme yüzdeleri tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmaya katılan hastaların klinik özellikleri

Klinik bulgular	Vaka ve görülme sayısı	Yüzde(%)
LAP	31/31	100
SM	31/24	77
HM	31/13	41
ITP	31/18	58
OHA	31/6	19

LAP:Lenfadenopati

SM:Splenomegali

HM:Hepatomegali

ITP:İmmün trombositopeni

OHA:Otoimmün hemolitik anemi

Ayrıca 5 hastada otoimmün tiroidit, pitriazis rosacea, otoimmün nötropeni, otoimmün hepatit gibi çeşitli otoimmün bulgular saptanmıştır, 2 hastaya ise splenektomi yapılmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Çalışmaya katılan hastaların klinik özellikleri

ALPS şüphesi olan hastalar		Otoimmün bulgular					
Hasta numarası	Yaşı/ilk şikayet yaşı	SM (süresi)	HM	LAP	ITP	OHA	Diğer
1	5/3 ay	+(4 yıl)	+	+	-	-	-
2	8/5	+(3 yıl)	+	+	-	+	Otoimmün tiroidit
3	9/4	+(3 yıl)	+	+	-	-	
4	7/1	+(6 yıl)	+	+	+	-	
5	14/4	-	-	+	+	-	-
6	45/38 *	+(7 yıl)	+	+	+	+	-
7	10/8	-	-	+	-	-	-
8	19/7	+(12 yıl)	+	+	+	-	-
9	11/7	-	-	+	-	-	-
10	9/5	+(4 yıl)	+	+	+	-	-
11	15/10	-	-	+	+	-	-
12	9/2	+(7 yıl)	+	+	+	-	-
13	14/4	-	-	+	+	-	Pitriazis rosea
14	22/15	-	-	+	+	-	
15	12/7	+(1 yıl)	+	+	+	-	Otoimmün nötropeni
16	8/2	+(6 yıl)	+	+	-	+	
17	4/3	+(1 yıl)	-	+	+	-	-
18	14/4	+(10 yıl)	+	+	-	-	Otoimmün hepatit
19	12/12	-	-	+	+	-	
20	19/1	+(18 yıl)	-	+	+	-	Çölyak hastalığı
21	9/6	+(3 yıl)	-	+	-	+	
22	10/8	+(1 yıl)	-	+	+	-	-
23	17/8	+(9 yıl)	+	+	+	+	-
24	5/1*	+(3 yıl)	+	+	+	+	-
25	4/3	+(1 yıl)	-	+	+	-	-
26	5/2	+(3 yıl)	-	+	-	-	-
27	7/3	+(3 yıl)	-	+	+	+	-
ALPS tip Ia							
1	27/5	+(?)	-	+	-	-	-
2	3/1	+(2 Yıl)	-	+	-	-	-
3	4/1	+(3 yıl)	-	+	-	-	-
4	14/3	+(8 yıl)	-	+	-	-	-

* : 6 ve 24 numaralı hastalara splenektomi yapılmıştır.

Çalışmaya katılan hastaların laboratuvar bulguları ise tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.4. Çalışmaya katılan hastaların laboratuvar bulguları

ALPS düşünülen hastalar							
Hasta numarası	DNT(%)	ALS(×1000/μl)	Ig’ler(mg/dl)			Vitamin B12	Otoantikörler
1	4	2.6	A:94	G:811	M:19	>2000	Anti-ds-DNA+
2	2	4.8	A:50	G:1180	M:128	760	D.Coombs+ Anti-TPO+
3	3	2.1	A:154	G:5720	M:45		RF+
4	2	2.2	A:875	G:6450	M:184	418	-
5	5	3.4	A:18	G:340	M:24		-
6	2	2.3	A:33	G:640	M:19	393	D.Coombs+
7	8	2.1	A:114	G:2360	M:368		RF+
8	3	1.4	A:46	G:858	M:19	227	
9	3	1.8	A:91	G:2330	M:248	572	-
10	1	1.5	A:149	G:1180	M:37	>2000	-
11	2	1	A:88	G:1210	M:65	363	-
12	4	1.2	A:46	G:620	M:79	604	-
13	2	2.5	A:80	G:500	M:36		-
14	3	1.8	A:77	G:1540	M:221	363	D.Coombs+
15	3	1.3	A:98	G:1770	M:158	1451	D.Coombs+
16	1	2.6	A:187	G:2210	M:165		-
17	3	1.9	A:76	G:630	M:99		-
18	2	3.2	A:60	G:4710	M:86	627	ANA+
19	4	11.9	A:44	G:544	M:43		D.Coombs+
20	3	1.2	A:45	G:480	M:23	561	-
21	1	5.7	A:154	G:1430	M:165	604	-
22	2	1.8	A:109	G:560	M:84	856	-
23	2	2.5	A:292	G:1140	M:135	604	-
24	3	2.8	A:23	G:1020	M:116		-
25	3	1.3	A:43	G:876	M:79	475	-
26	1	1.7	A:56	G:776	M:65		-
27	2	2.3	A:97	G:1230	M:210		D.Coombs+
ALPS TİP Ia							
1	6.5	>10	A:94	G:2160	M:103		-
2	11	>10	A:65	G:2220	M:79		-
3	12	8.5	A:82	G:2490	M:116		-
4	21	>10	A:102	G:2950	M:112	>800	-

ANA : Anti nuklear antikor
D.Coombs : Direkt coombs
Anti-TPO : Anti-tiroid peroksidaz
RF : Romatoid Faktör

Not: Kalın olarak yazılan IgG ve vitamin B12 düzeyleri normal değerlerden yüksektir.

3.2. Yöntem

İn vitro apoptozis testi için hasta ve sağlıklı gruptan prezervatifsiz heparinli (anti-koagulan) enjektörlere 5'er cc kan alındı ve hücre kültürü şu şekilde yapıldı:

1. Toplanan kanlardan *Ficoll-hystopaque* ile yayma dansite gradient yöntemiyle lenfositler izole edildi.
2. Hücrelerden kültür plaklarına son konsantrasyon 10^6 /ml olacak şekilde ekim yapıldı ve bir mitojen olan PHA (Phytohemagglutinin) ile uyarıldı.
3. 48 saat bekleyen hücreler IL-2 içeren medium ile tekrar kültüre bırakıldı.
4. Her 48 saatte bir *medium* değiştirildi ve 4 değişimden sonra (192 saat) hücrelerde apoptoz mekanizmasının başlaması için anti- Fas monoklonal antikoru eklendi.
5. 48 saatin sonunda hücreler Trypan blue (tripan mavisi) ile boyanarak mikroskopta ölü hücre sayımı yapıldı.

Hücre kültürü sırasında kullandığımız medium şu şekilde hazırlandı:

- 82 ml RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*)
- 15 ml (%15) FCS (*Fetal calf serum*)
- 2 ml (%2) HEPES buffer
- 1 ml (%1) *penicillin streptomycin*

Apoptozu indüklemek için yaptığımız hücre kültüründe amaç, bir mitojen olan PHA ile lenfositleri uyararak bu hücrelerden IL-2 salınımını ve Fas ekspresyonunu artırmaktır. Aktive olarak çoğalan bu hücrelerin apoptoza gitmeleri için anti-Fas monoklonal antikoru ortama eklenmiştir. Lenfosit apoptozisinde bozukluk olmayan bireylerin hücrelerinin 48 saat sonunda büyük oranda ölmeleri beklenmektedir. Bu süre sonunda ölü hücrelerin belirlenebilmesi için, membran bütünlüğü bozulmuş olan apoptotik hücrelerin sitoplazmasına girerek DNA'yı boyayan bir kimyasal olan trypan blue kullanılmıştır. Işık mikroskopunda hasta ve

sağlıklı kontrol hücreleri (200 hücre) ayrı ayrı sayılarak ölü hücre yüzdesi belirlenmiştir.

Hasta ve kontrol grubunun plazma Fas-ligand düzeylerinin çalışılması için ise:

1. EDTA'lı tüplere 3 cc periferik venöz kan alındı.
2. Kanlar 15 dakika 2000 rpm'de santrifuj edilerek plazmalar ayrıldı.
3. Çalışma ELISA yöntemiyle Fas-ligand kiti (Bender-Med Systems) kullanılarak, firmanın belirtmiş olduğu protokole göre yapıldı.

4. BULGULAR

İn vitro fonksiyonel apoptozis testi uygulanan hasta ve kontrol grubunda 48 saat sonunda hücrelerin ölüm yüzdeleri şu şekilde hesaplandı:

$$\frac{\text{Hastada gözlenen ölü hücre sayısı}}{\text{Aynı deneydeki kontrolde gözlenen ölü hücre sayısı}} \times 100$$

Testlerin tümünde sağlıklı bireylerden izole edilen kontrol grubu hücrelerinde ölüm yüzdeleri %80 ve üzeri olarak saptandı.

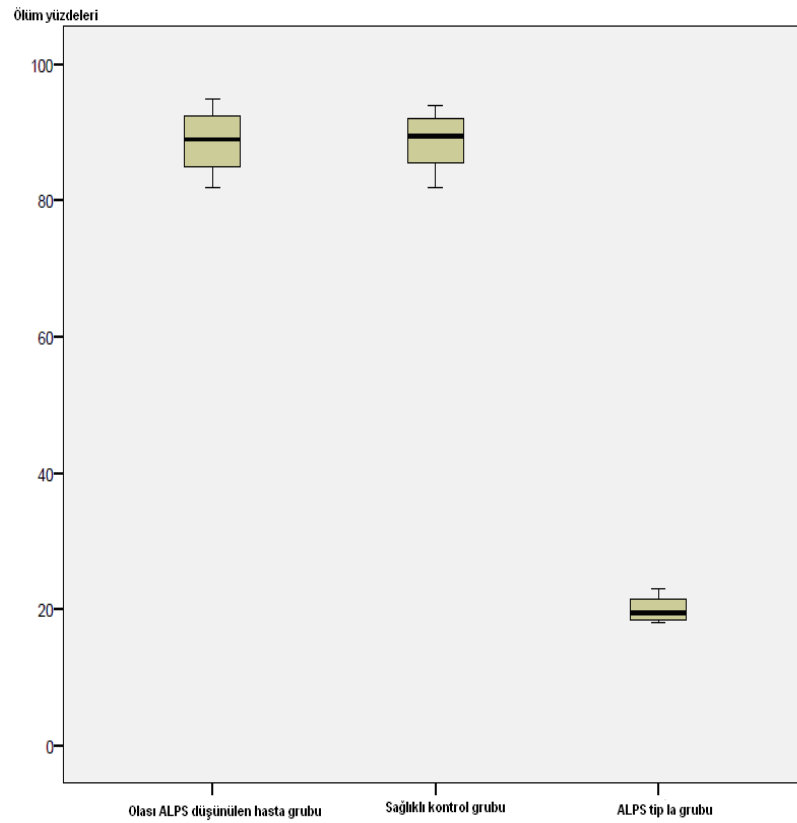
Hesaplamalar yapıldıktan sonra olası ALPS tanısı ile izlenen hastalarda ve tip Ia grubundan olan hastalarda ölüm yüzdeleri şu şekildeydi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışma sonunda saptanan ölüm yüzdeleri

Olası ALPS tanısı ile izlenen hastalar	Ölüm yüzdeleri	ALPS tip Ia grubu hastalar	Ölüm yüzdeleri
1	95	1	26
2	90	2	27
3	91	3	22
4	100	4	20
5	100		
6	100		
7	100		
8	97		
9	97		
10	100		
11	98		
12	100		
13	88		
14	95		
15	88		
16	96		
17	94		
18	96		
19	97		
20	89		
21	96		
22	96		
23	97		
24	98		
25	90		
26	96		
27	96		

Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün 2010 yılı kriterlerine göre, in vitro apoptozis testinde hastalardan elde edilen hücrelerin ölüm oranlarının sağlıklı kontrol hücrelerinin ölüm oranlarının en az %50'si oranında düşük olması apoptozis mekanizmasının bozuk olarak kabul edilmesi için gereklidir (66).

İn vitro fonksiyonel apoptozis testi sonucunda 48 saat sonunda hasta ve sağlıklı kontrol hücrelerinin ölüm oranlarının ortalamaları ayrı ayrı hesaplandığında şu bulgular elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Çalışma sonunda saptanan ölüm yüzdeleri

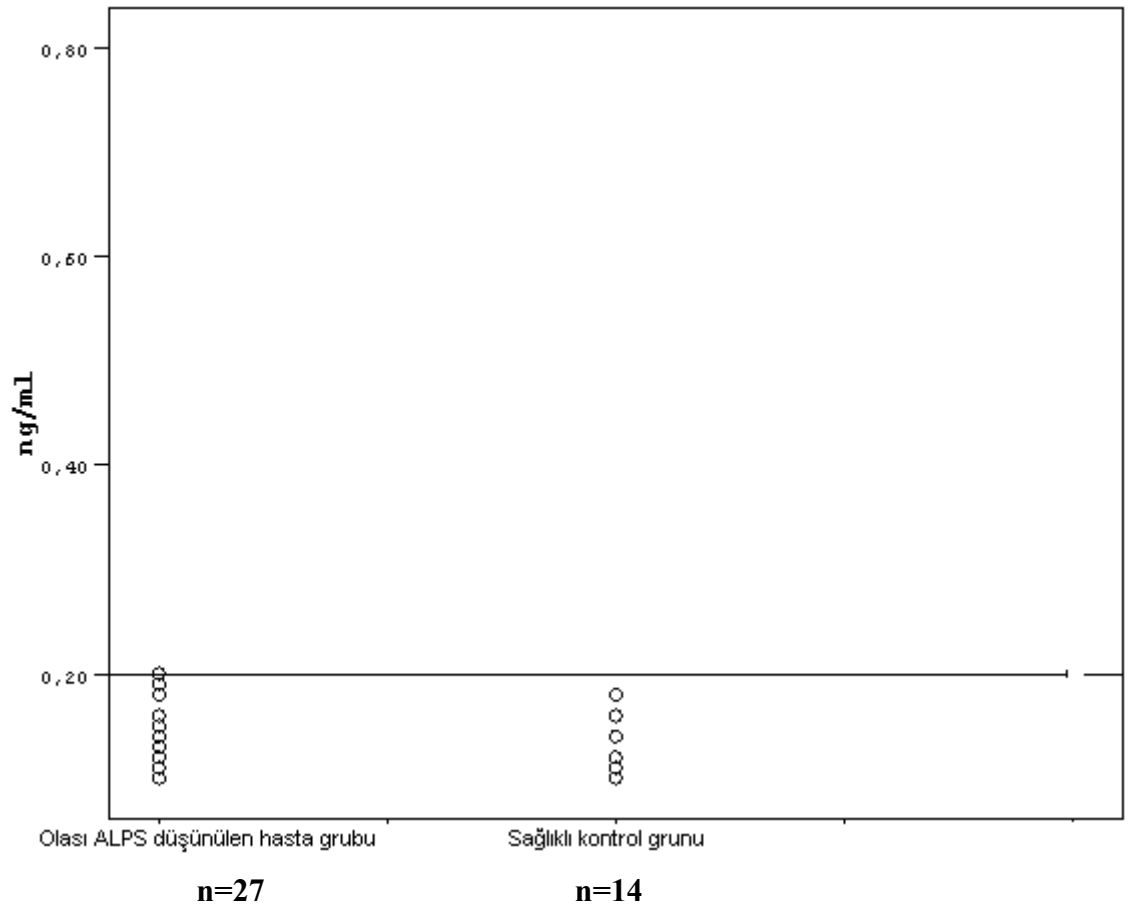
Deney sonuçlarına göre olası ALPS tanısı alan hastalar ve sağlıklı kontrol grubu ölüm oranları ortalamaları arasında fark saptanmazken ($p=0.9$), bu iki grup ile tip Ia grubu arasında belirgin bir fark saptanmıştır ($p=0.001$).

İstatiksel hesaplamalar SPSS.15 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arası değerlendirmeler non-parametrik Kruskal Wallis testi ile yapılmış, ikili gruplar arasında Benforini düzeltmesi uygulanmıştır.

Yine aynı grupların plazma Fas-ligand miktarları Eliza yöntemiyle saptanmış ve şu bulgular elde edilmiştir (Tablo 4.2 ve şekil 4.2).

Tablo 4.2. Çalışma sonunda saptanan Fas-ligand miktarları (ng/ml)

Olası ALPS tanısı ile izlenen hastalar	Sağlıklı kontrol grubu
0.15	0.14
0.16	0.16
0.11	0.10
0.13	0.14
0.12	0.12
0.10	0.11
0.14	0.10
0.16	0.12
0.14	0.16
0.12	0.14
0.11	0.10
0.10	0.12
0.12	0.18
0.12	0.12
0.12	
0.18	
0.19	
0.20	
0.12	
0.14	
0.10	
0.16	



Şekil 4.2. Çalışma sonunda saptanan plazma Fas-ligand düzeyleri

Bütün gruplarda Fas ligand oranları normal değer kabul edilen 0,2 ng/ml'nin altında bulunmuştur ($p=0.522$).

Hesaplamalar SPSS.15 paket programı kullanılarak non-parametrik Kruskal Wallis testi uygulanarak saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS) lenfadenopati, splenomegali, DNT hücre düzeylerinde artış ve otoimmüniteyle karakterizedir. ALPS tanısı almış hastalarda görülen lenfoproliferasyonun nedeni apoptozis mekanizmasındaki bozukluktur. Özellikle ölüm reseptör (Fas-Fas ligand) aracılı apoptozis mekanizmasındaki bozukluk nedeniyle aktive olan lenfositler apoptoza gidememekte ve lenfoproliferasyon ortaya çıkmaktadır (29,35). Fas molekülünün lenfosit homeostazındaki rolü ilk olarak 1992 yılında Nagata ve arkadaşları tarafından fare modelinde tanımlanmıştır (67). Çalışmada Fas molekülünü kodlayan gende resesif bir mutasyon saptanmış ve bu mutasyona sahip farelerde lenfosit apoptozunun defektif olduğu gösterilmiştir. Yine aynı yıl iki farklı grup tarafından ALPS’li hastalarda Fas molekülünü kodlayan gende mutasyonlar saptanmış ve defektif Fas molekülünün ALPS’ye neden olduğu gösterilmiştir. Rieux-Laucat ve arkadaşları (41) tarafından yapılan çalışmada lenfoproliferatif sendrom ve otoimmün bozukluklar görülen iki kardeşte, Fas molükülünü kodlayan gende geniş bir delesyon saptanmış ve mutant gen nedeniyle hücre yüzeyinde Fas ekspresyonunun olmadığı gösterilmiştir. Fisher ve arkadaşları (40) tarafından ise aralarında akrabalık olmayan, ALPS klinik özellikleri gösteren beş çocukta heterozigot dominant Fas mutasyonları saptanmıştır. Bu çalışmalarla beraber ALPS’de tarama testi olarak kullanılabilecek in vitro fonksiyonel apoptozis testi geliştirilmiştir. Bu testin temeli, aktive olan lenfositlerde Fas-fas ligand aracılı yolağın uyarılmasıyla, hücrelerin apoptoz mekanizmasında bozukluk olup olmadığının saptanmasına dayanmaktadır. Biz de son yıllarda klinik özellikleri ALPS’yi düşündüren hastalarımızda bu testi uygulayarak Fas, Fas ligand yönünden genetik çalışma yapılması gereken hastaları seçmek ve negatif bulunan hastaların muhtemel yeni moleküler defektler yönünden incelenmesini sağlamak için bu yöntemin uygulamasını başlattık.

Otoimmün lenfoproliferatif sendromun en önemli laboratuvar bulgusu dolaşımdaki DNT hücre düzeyindeki artıştır. Normalde %1'in altında bulunması gerekirken ALPS'li hastalarda bu oran %60'a kadar çıkabilmektedir (37). Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün 2010 yılı kriterlerine göre ALPS tanısı koyabilmek için gerekli iki ana kriter kronik lenfadenopati ve/veya splenomegali ve DNT hücre düzeylerinde artıştır. Bunlarla beraber primer yardımcı kriterlerden lenfosit apoptozunda bozukluk veya Fas, Fas-ligand ya da kaspaz 10 moleküllerini kodlayan genlerdeki patojenik mutasyonun gösterilmesi gerekmektedir (66). Bu bilgilerin doğrultusunda çalışmamıza Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi İmmünoloji Ünitesinde olası ALPS tanısı ile izlenen 27 hasta, pozitif kontrol olarak Fas geninde heterozigot I259 mutasyonu saptanmış 4 ALPS tip Ia grubundan hasta ve 30 sağlıklı kontrol katılmıştır. Hastaların tamamında DNT hücre düzeyleri normalden yüksek olup, kronik lenfadenopati ve/veya splenomegali bulunmaktadır. Hastalarda in vitro fonksiyonel apoptozis testi yapılmış ve her deneyde kontrol olarak sağlıklı bir bireyden elde edilen lenfositlerde apoptozis değerlendirilmiştir. Deneylerde, hasta ve kontrollerden elde edilen lenfosit ölüm yüzdeleri karşılaştırılmıştır. Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün apoptozisin bozuk kabul edilebilmesi için önerdiği kriter, hastalardan elde edilen hücrelerin ölüm oranlarının sağlıklı bireylerden elde edilen lenfositlerin ölüm oranlarından en az %50 daha az olmasıdır (66). Bizim çalışmamızda sağlıklı bireylerden izole edilen hücrelerin ölüm oranları ise en az %80 olarak saptanmıştır. Olası ALPS tanısı ile izlenen hastaların tümünde bu oran yine %80 ve daha fazla olarak saptanmıştır. Fas geninde heterozigot dominant mutasyonu gösterilmiş 4 hastada ise bu oran %20 ila %27 arasında bulunmuştur. Çalışmada elde edilen bulgular sonucunda, teknik olarak, uygulanan in vitro apoptozis testinin güvenilir olduğu kabul edilebilir. Böylece mutasyonu gösterilmiş ve kesin olarak Fas aracılı apoptozis yolağında bozukluk olduğu bilinen hastaların ölüm yüzdeleri sağlıklı hücrelere göre ortalama %75 oranında daha düşük bulunmuştur.

Dünya genelinde bugüne kadar ALPS tanısı almış ve mutasyonu gösterilmiş hastaların yaklaşık %70'inde Fas aracılı apoptozis yolağında bozukluk olduğu bilinmektedir (37). Bu yüzden laboratuvarlarda teknik olarak daha basit ve daha ucuz olan in vitro fonksiyonel apoptozis testinin uygulanması önemlidir. Daha kapsamlı

ve daha pahalı olan moleküler tanı yöntemlerinin uygulanacağı hastalar bu şekilde belirlenebilir.

Çalışmamıza katılan, olası ALPS tanısı ile izlenen hastalarda Fas aracılı lenfosit apoptozisinde bir bozukluk saptanmamıştır. Bu hastaların klinik bulguları ALPS tanı kriterlerine uygun ve DNT hücre düzeyleri artmış olmasına rağmen Fas aracılı lenfosit apoptozisinde bozukluk olmaması diğer apoptozis mekanizmalarında bozukluk olabileceğini düşündürmektedir. Bu hastaların bazılarında somatik Fas mutasyonu olabileceği gibi apoptozis mekanizmalarında yer alan diğer moleküllerde de bir defekt bulunabilir. Nitekim 2007 yılında Oliveira ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (59) NRAS molekülünü kodlayan gende bir mutasyon saptanmış ve bunun ALPS'ye neden olduğu gösterilmiştir. ALPS klinik özelliklerini taşıyan hastaların önemli bir kısmında bilinen moleküllerde defekt saptanmamış olması, ölüm reseptör aracılı veya mitokondriyel apoptozis yollarında görev alan moleküllerde henüz gösterilmemiş genetik bozukluklar bulunabileceğine işaret etmektedir.

Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün ALPS tanısı için önerdiği ikincil yardımcı kriterleri arasında plazma Fas-ligand düzeylerinde artış da yer almaktadır. Bu oran sağlıklı bireylerde 0.2 ng/ml'nin altındayken ALPS'li hastalarda 170 ng/ml'ye kadar çıkabilmektedir (66). 2009 yılında Magerus-Chatinet ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (68) ALPS'li hastalarda plazma Fas-ligand düzeyleri ölçülmüş ve özellikle mutasyonu belli olan hastalarda bu oran sağlıklı bireylere göre oldukça yüksek çıkmıştır. Mutasyonu gösterilemeyen ALPS tip III grubundan hastalarda ise bu oran normal ya da normale yakın saptanmıştır. Çalışmamızda olası ALPS tanısı ile izlenen ve in vitro apoptozis testi uyguladığımız hastalarda ELISA yöntemiyle Fas-ligand düzeyleri ölçülmüştür. Çalışmaya hastaların yanı sıra 14 gönüllü, sağlıklı birey de katılmıştır. Çalışma sonucunda tüm hastaların ve sağlıklı bireylerin plazma Fas-ligand düzeyleri normal değer olan 0,2 ng/ml'nin altında çıkmıştır. Bu sonuç Fas aracılı apoptozis testinin normal bulunduğu hastalarımızda beklenebilecek bir durumdur.

Sonuç olarak, uyguladığımız bu yöntem Fas aracılı apoptozis testi ile gösterilemeyen, bilinen diğer defektler yönünden taranması gereken hastaların belirlenmesi için ve bir ileri basamakta da yeni moleküler defektlerin bulunması yönünden yararlı olacaktır. Yaptığımız bu çalışmayla in vitro fonksiyonel apoptozis testinin olası ALPS tanısı ile izlenen hastalarda efektif olarak uygulanabileceği gösterilmiştir. İleride daha kapsamlı olarak yapılacak bir çalışmayla bu hastalarda plazma Fas-ligand düzeyleri de tekrar incelendiğinde daha sağlıklı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

1. Laboratuvarımızda kurduğumuz in vitro fonksiyonel apoptozis testinin uygulanabilirliği, pozitif kontrol olarak kullandığımız ALPS tip Ia grubu hastaların sonuçlarına göre güvenilir olarak kabul edilmiştir.
2. İn vitro fonksiyonel apoptozis testi uyguladığımız hastaların hiçbirinde lenfosit apoptozunda bozukluk saptanmamıştır.
3. ALPS tip Ia grubundan hastaların Fas ile indüklenen lenfosit apoptozunda bozukluk olduğu gösterilmiştir.
4. Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun plazma Fas ligand miktarları normal değerlerde saptanmıştır.
5. Saptanan değerler olası ALPS tanısı ile izlenen hastalar için beklenen bir durumdur.

6. KAYNAKLAR

1. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P. et al.(2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death . Cell Death Differ, 6, 3-11.
2. Kerr, JF., Wyllie, AH., Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 26, 239-257.
3. Cohen JJ. (1991). Programmed cell death in the immune system. Adv Immunol, 50, 55–85.
4. Hacker G. (2000). The morphology of apoptosis. Cell Tissue Res, 301, 5–17.
5. Majno, G., Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. Am J Pathol, 146, 3-15.
6. Locksley, RM., Killeen, N., Lenardo MJ. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell, 104, 487–501.
7. Chicheportiche, Y., Bourdon, PR., Xu, H., Hsu, YM., Scott, H., Hession C et al. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. J Biol Chem, 272, 32401–10.
8. Ashkenazi, A., Dixit, VM. (1998). Death receptors: signaling and modulation. Science, 281, 1305–1308.
9. Peter, ME., Krammer, PH. (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. Curr Opin Immunol, 10, 545–551.
10. Wajant H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science, 296, 1635–1636.
11. Elmore, S. (25007). Apoptosis: a review of programmed cell death.Toxicol Pathol, 35, 495-516

12. Marsden, VS., Strasser, A. (2003). Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol*, 21, 71-105
13. Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 5, 189-200
14. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I. et al. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91, 479-489
15. Goldstein, JC., Munoz-Pinedo, C., Ricci, JE. et al. (2005). Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ*, 12, 453-462
16. Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391, 96–99.
17. Slee, EA., Adrain, C., Martin, SJ. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 7320–7326
18. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K. et al. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, 278, 294–298.
19. Majno, G., Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol*, 146, 3-15
20. Kumar, V., Abbas, AK., Fausto, N. (2005). Robbins & Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia: Saunders.
21. Lotze, MT., Tracey, KJ. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*, 5, 331-342
22. Laster, SM., Wood, JG., Gooding LR. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol*, 141, 2629-2634
23. Klionsky, DJ. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 931-937

24. Levine, B., Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 7, 767-777
25. Galluzzi, L., Maiuri, MC., Vitale, I. et al. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ*, 14, 1237-1243
26. Canale, V.C., and Smith C.H. (1967). Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma, *J Pediatr*, 70, 891–899
27. Rao, V.K., and Straus S.E. (2006). Autoimmune lymphoproliferative syndrome. In: N.S. Young, S.L. Gerson and K.A. High, Chapter 58, *Clinical Hematology*
28. Rao, LM., Shahidi, NT., Opitz, JM. (1974). Hereditary splenomegaly with hypersplenism. *Clin Genet*, 5, 379-386.
29. Sneller, MC., Wang, J., Dale, JK. et al. (1997). Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood*, 89, 1341-1348.
30. Gasser, G. (1967). Pseudomononucleosis. *Clinical Pathology*
31. Le Deist, F., Emile, JF., Rieux-Laucat, F. et al. (1996). Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet*, 348, 719-723.
32. Canale, VC., Smith, CH. (1967). Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr*, 70, 891-899
33. Bleesing, JJH., Fleisher, TA. (2004). Autoimmune lymphoproliferative syndrome Stiehm-Ochs-Winkelstein. *Immuneologic Disorders in Infants and Children* 5th edition. Philadelphia: Elsevier-Saunders.
34. Avila, N.A., Dwyer, A.J., J.K. Dale, J.K., Lopatin, UA., Sneller, MC. and Jaffe, ES. et al. (1999). Autoimmune lymphoproliferative syndrome: a syndrome associated with inherited genetic defects that impair lymphocyte apoptosis — CT and US features, *Radiology*, 212, 257–263.

35. Lîm, MS., Straus, SE., Dale, J.K., Fleisher, TA., Stetler-Stevenson, M. and Strober, W. et al. (1998). Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome, *Am J Pathol*, 153, 1541–1550.
36. Bleesing, JJ., Brown, MR., Novicio, C. (2002). A composite Picture of TCR alfa/beta CD4-CD8-T cells in humans with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol*, 104, 21-30
37. Worth, A., Thrasher, AJ., Gaspar, HB. (2006). Autoimmune lymphoproliferative syndrome: Molecular Basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol*, 124, 124-140
38. Kwon, S.W., Procter, J., Dale, J.K., Straus, SE. and Stroncek, DF. (2003) Neutrophil and platelet antibodies in autoimmune lymphoproliferative syndrome, *Vox Sang*, 85, 307–312.
39. Sneller, MC., Straus, SE., Jaffe, ES., et al. (1992). A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine *lpr/gld* disease. *J Clin Invest*, 90, 334-341
40. Fisher, GH., Rosenberg, FJ., Straus, SE., et al. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*, 81, 935-946.
41. Rieux-Laucat, F., Le Deist F., Hivroz, C. et al. (1995) Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*, 268, 1347-1349.
42. Jackson, CE., Fischer, RE., Hsu, AP. et al. (1999). Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am J Hum Genet*, 64, 1002-1124.
43. Rieux-Laucat, F., Blachere, S., Danielan, S. et al. (1999). Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: A possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations. *Blood*, 94, 2575-2528.
44. Kasahara, Y., Wada, T., Niida, Y., Yachie, A., Seki, H., Ishida, Y., Sakai, T. et al. (1998). Novel Fas (CD95/APO-1) mutations in infants with a lymphoproliferative disorder. *International Immunology*, 10, 195–202.

45. Le Deist F., Emile, J.F., Rieux-Laucat, F., Benkerrou, M., Roberts, I., Brousse N. & Fischer, A. (1996). Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet*, 348, 719–723.
46. Sneller, M.C., Dale, J.K., Straus S.E. (2003). Autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Current Opinion in Rheumatology*, 15, 417–421.
47. Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., Lenardo, M.J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288, 2351–2354.
48. Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D. et al. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 288, 2354–2357
49. Martin, D.A., Zheng, L., Siegel, R.M., Huang, B., Fisher, G.H., Wang J et al. (1999). Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 4552–4557.
50. Wu, J., Wilson, J., He, J., Xiang, L., Schur, P.H., Mountz, J.D. (1996). Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *Journal of Clinical Investigation*, 98, 1107–1113.
51. Del-Rey, M., Ruiz-Contreras, J., Bosque, A., Calleja, S., Gomez-Rial, J., Roldan, E. et al. (2006). A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, 108, 1306–1312.
52. Bi, LL., Pan, G., Atkinson, TP., Zheng, L., Dale, JK., Makris, C., Reddy, V. et al. (2007). Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib. *BMC Med Genet*, 8,41.
53. Zhu, S., Hsu, AP., Vacek, MM., Zheng, L., Schaffer, AA., Dale, JK. et al. (2006). Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Hum Genet*, 119, 284–294.

54. Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F.K., Dale, J., Sneller, M. et al. (1999). Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*, 98, 47–58
55. Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F.K., Dale, J., Sneller, M., Yao, X. et al. (1999). Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*, 98, 47–58.
56. Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., Siegel, R.M, Dale. et al. (2002). Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature*, 419, 395–399.
57. Holzelova, E., Vonarbourg, C., Stolzenberg, MC., Arkwright, PD., Selz, F., Prieur, AM. et al. (2004). Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Engl J Med*, 351, 1409–1418.
58. Dianzani, U., Bragardo, M., Difranco, D., Alliaudi, C., Scagni, P., Buonfiglio D. et al. (1997). Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood*, 89, 2871–2879.
59. Oliveira, JB., Bidere, N., Niemela, JE., Zheng, L., Sakai, K., Nix, CP. et al. (2007). NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci*, 104, 8953–8958.
60. Rieux-Laucat, F., Fischer, A. & Deist, F.L. (2003). Cell-death signaling and human disease. *Current Opinion in Immunology*, 15, 325–331.
61. Infante, A.J., Britton, H.A., DeNapoli, T., Middleton, L.A., Lenardo, M.J., Jackson, C.E. et al. (1998). The clinical spectrum in a large kindred with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a Fas mutation that impairs lymphocyte apoptosis. *Journal of Pediatrics*, 133, 629–633.
62. Rao, V.K., Dugan, F., Dale, J.K., Davis, J., Tretler, J., Hurley, J.K., Fleisher, T. et al. (2005). Use of mycophenolate mofetil for chronic, refractory immune cytopenias in children with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *British Journal of Haematology*, 129, 534–538.

63. Heelan, B.T., Tormey, V., Amlot, P., Payne, E., Mehta, A., Webster, A.D. (2002). Effect of anti-CD20 (rituximab) on resistant thrombocytopenia in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *British Journal of Haematology*, 118, 1078–1081.
64. Benkerrou, M., Le Deist, F., De, Villartay, J.P., Caillat-Zucman, S., Rieux-Laucat, F., Jabado, N. et al. (1997). Correction of Fas (CD95) deficiency by haploidentical bone marrow transplantation. *European Journal of Immunology*, 27, 2043–2047.
65. Sleight, B.J., Prasad, V.S., DeLaat, C., Steele, P., Ballard, E., Arceci, R.J. et al (1998). Correction of autoimmune lymphoproliferative syndrome by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 22, 375–380.
66. Oliveira, J.B., Bleesing, J.J., Dianzani, U., Fleisher, T.A., Elaine, S., Lenardo, M.J. et al. (2010). Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*, 116, 280-347
67. Nagata, S., Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, 267, 1449–1456
68. Magerus-Chatinet, A., Stolzenberg, MC., Loffredo, MS., Neven, B., Schaffner, C., Ducrot, N. et al. (2009). FAS-L, IL-10, and double-negative CD4- CD8- TCR alpha/beta+ T cells are reliable markers of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function. *Blood*, 113, 3027-3030.