

**Beschreibung einer neuen *FASLG*-Mutation  
und der defekte IL-12 Signalweg als neue  
Ursache des autoimmun-lymphoproliferativen  
Syndroms (ALPS)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Schafiq Nabhani**

aus Köln

Düsseldorf, Oktober 2014

aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie  
des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:

Prof. Dr. Arndt Borkhardt

Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie  
Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Korreferent:

Prof. Dr. William Martin

Institut für Molekulare Evolution

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung:

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Apoptose und Apoptosemediatoren .....	1
1.1.1. Apoptotische und nicht-apoptotische Zelltodmechanismen .....	1
1.1.2. TNF/TNFR-Familie .....	4
1.1.2.1. Fas-Rezeptor .....	5
1.1.2.2. Fas-Ligand .....	6
1.1.2.2.1. Transkriptionelle Regulation von FasL .....	8
1.1.3. Fas-Signalweg .....	9
1.2. ALPS.....	12
1.2.1. ALPS – Historische Perspektive .....	12
1.2.2. ALPS-Typen.....	13
1.2.2.1. ALPS-FAS.....	15
1.2.2.2. ALPS-FASLG .....	17
1.2.2.3. ALPS-CASP10 .....	18
1.2.2.4. Penetranz von ALPS-FAS .....	19
1.2.3. Klinisches Bild .....	20
1.2.4. Laborbefunde .....	21
1.2.4.1. Doppelt-negative T-Lymphozyten.....	21
1.2.4.2. Immunphänotyp .....	22
1.2.4.3. Defekt in der Fas-vermittelten Apoptose .....	23
1.2.4.4. Zirkulierende Biomarker .....	23
1.2.5. ALPS-Diagnosekriterien .....	24
1.2.6. Therapie.....	25
1.2.7. Prognose.....	26
1.2.8. ALPS-ähnliche Syndrome .....	27
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>29</b>
<b>3. Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>31</b>
3.1. Publikation I: 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.....	31
3.1.1. Ergebnisse .....	32
3.1.2. Diskussion.....	35

3.2. Publikation II: Deregulation of Fas Ligand Expression as a novel cause of autoimmune lymphoproliferative syndrome like disease .....	38
3.2.1. Ergebnisse .....	38
3.2.2. Diskussion.....	43
<b>4. Zusammenfassung.....</b>	<b>48</b>
<b>5. Summary.....</b>	<b>51</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>53</b>
<b>7. Abkürzungen .....</b>	<b>66</b>
<b>8. Publikationen.....</b>	<b>69</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>70</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Apoptose und Apoptosemediatoren

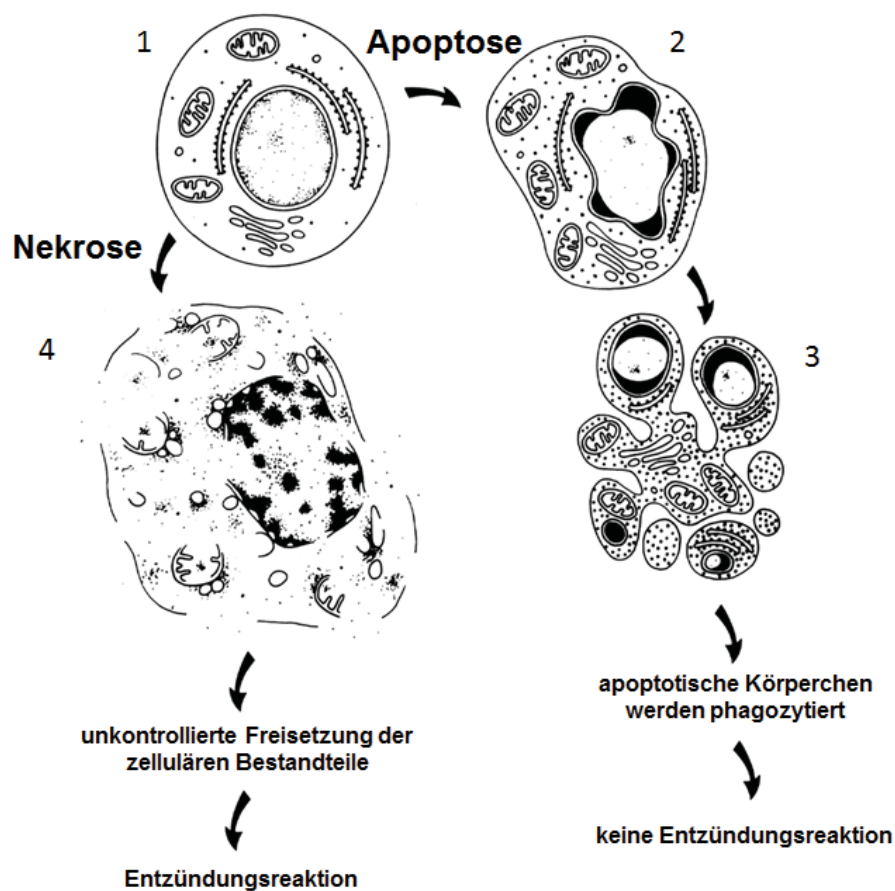
### 1.1.1. Apoptotische und nicht-apoptotische Zelltodmechanismen

*Apoptosis* ist aus dem Altgriechischen entlehnt und bedeutet so viel wie „das Herabfallen der Blätter von den Bäumen“ (griech.: apo = ab/weg, ptosis = Senkung/Niedergang/Fall) [1]. Obwohl der Zelltod als natürlicher physiologischer Vorgang schon seit 1842 durch den deutsch-schweizerischen Naturwissenschaftler Carl Vogt beim Studium der Entwicklung von Kaulquappen der Gemeinen Geburtshelferkröte bekannt war, wurde der Begriff der Apoptose erstmals 1972 von den Pathologen Kerr, Wyllie und Currie geprägt und sollte die morphologischen Veränderungen der Zellen während des Zelltodes beschreiben [2, 3]. Ein Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen kam erst auf, als der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* Mitte der 1980er Jahre in den Fokus der Apoptose-Forschung rückte. Als Modellorganismus war und ist *C. elegans* für die Apoptose-Forschung attraktiv, da während der Entwicklung des somatischen Gewebes 1090 Zellen generiert werden, wovon jedoch genau 131 durch Apoptose sterben [4, 5]. Dieser Vorgang deutete darauf hin, dass die Apoptose ein programmierter Zelltod und genetisch kontrolliert ist [6-8]. Seitdem der Begriff *Apoptose* von Kerr, Wyllie und Currie 1972 geprägt wurde, gab es große Fortschritte in der Apoptose-Forschung und sie gilt heute als rasant wachsendes Forschungsfeld. Besonders für die Krebsforschung und Erforschung von Immundefekten trägt sie zum Verständnis der Ätiologie und Pathogenese maßgeblich bei. 2002 wurde der Medizinnobelpreis an die beiden britischen Forscher Sydney Brenner und John Sulston sowie den amerikanischen Forscher Robert Horvitz für die wichtigen Erkenntnisse bezüglich der genetischen Regulierung der Organentwicklung und des programmierten Zelltodes verliehen [9].

Die Apoptose ist nur eine Art des Zelltodes. Ihr gegenüber gestellt wird unter anderem die Nekrose (griech.: Nékrosis = das Töten/das Absterben einzelner Glieder) (Abb. 1) [10, 11]. Bei der Apoptose handelt es sich um einen physiologisch programmierten Zelltod der zum Wohle des Gesamtorganismus ausgelöst wird, die

Nekrose hingegen bezeichnet den pathologischen, unkontrollierten und passiven Vorgang des Zelltodes, welcher durch exogene Noxen herbeigeführt wird. Die beiden Formen des Zelltodes unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch biochemisch und haben unterschiedliche Auslöser [11]. Die Apoptose kann sowohl durch einen extrinsischen als auch einen intrinsischen Signalweg ausgelöst werden. Der intrinsische Apoptose-Signalweg erfolgt rezeptorunabhängig durch intrinsische Faktoren und führt über die Mitochondrien. Intrinsische Faktoren sind beispielsweise DNS-Schäden, osmotischer Stress oder der Entzug von Wachstumsfaktoren und können unter anderem durch physikalische oder chemische Noxen induziert werden. Auch eine nicht korrekt verlaufene Zellteilung kann zum programmierten Zelltod führen. Der extrinsische Signalweg liegt vor, wenn die betroffene Zelle mittels so genannter Todesrezeptoren wie dem Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR) oder dem Fas-Rezeptor (Fas/CD95/Apo-1/TNFRSF6) externe Signale erhält, die letztendlich den Zelltod herbeiführen [12, 13]. Im Gegensatz dazu, gehen die betroffenen Zellen bei einer Nekrose meist an schädigenden exogenen Faktoren wie beispielsweise Giften, Hitzeeinwirkung, Strahlen oder mechanischen Verletzungen zugrunde. Als Folge einer Nekrose kommt es typischerweise zu einer Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes, da bei dieser Form des Zelltodes die zytoplasmatischen Bestandteile der Zelle unkontrolliert ins externe Milieu freigesetzt werden. Eine Entzündungsreaktion zieht in der Regel eine erhöhte Durchblutung, Vasodilation, Wärmeentwicklung und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie Tumornekrosefaktor (TNF), durch bestimmte Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen etc.) nach sich [10, 11]. Die Apoptose löst im Gegensatz zur Nekrose keine akute Entzündungsreaktion aus. Apoptotische Zellen werden mittels Phagozytose durch Makrophagen oder dendritische Zellen entfernt. So wird die unkontrollierte Freisetzung von entzündlichen Zellinhalten und damit die Schädigung von benachbarten Zellen verhindert. Phagozyten werden durch bestimmte Chemokine („*Find-me*“-Signale) wie beispielsweise Lysophosphatidylcholin, Sphingosin-1-phosphat oder niedrige ATP- und UTP-Konzentrationen angelockt. Spezifische Oberflächensignale, sogenannte „*Eat-me*“-Signale, vermitteln anschließend die Phagozytose apoptotischer Zellen. Darunter fällt z.B. die Exponierung des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) von der zytosolischen Seite der Zelle an die

Zelloberfläche [14-16]. Morphologisch lassen sich nekrotische und apoptotische Zellen klar unterscheiden. Während es bei der Apoptose zur Zellschrumpfung und Abschnürung von apoptotischen Körperchen mit intakter Membran kommt, geht die Nekrose nicht mit einer Vesikelbildung, sondern einem starken Anschwellen der Zelle (Onkose) und schließlich einer völligen Zellyse einher [17]. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Chromatin-Kondensation und die enzymatische Spaltung der DNS in Fragmente definierter Länge in apoptotischen Zellen [18]. In nekrotischen Zellen hingegen kommt es zur Entstehung von DNS-Fragmenten unterschiedlicher Länge, da die Fragmentierung hier an zufälligen Stellen erfolgt [19].



**Abb. 1: Schematische Gegenüberstellung von Apoptose und Nekrose (modifiziert nach Kerr, 1976 [2, 20]).** Eine normale Zelle (1) schrumpft zunächst im frühen Stadium der Apoptose (2). Die Zelle verliert den Kontakt zu den Nachbarzellen, das Chromatin kondensiert und die DNS wird systematisch abgebaut. Der Inhalt der apoptotischen Zelle wird in Membranvesikel (apoptotische Körperchen) verpackt (3) und von bestimmten Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen etc.) phagozytiert. Eine Entzündungsreaktion bleibt aus. Die Nekrose hingegen zeichnet sich durch ein starkes Anschwellen der Zelle, den Verlust der Plasmamembranintegrität und die Freisetzung der entzündlichen intrazellulären Bestandteile in das externe Milieu aus (4). Die Folge ist eine Entzündungsreaktion.

Für das Leben von multizellulären Organismen ist die Apoptose ein unerlässlicher Mechanismus. Sie ist essentiell für viele biologische Prozesse, e.g. für die Embryogenese und zelluläre Homöostase [21, 22]. Sie sorgt auch dafür, dass schädigende oder geschädigte Zellen kontrolliert absterben [23]. Als wichtiger regulatorischer Prozess während der Embryonalentwicklung spielt die Apoptose e.g. bei der Entfernung der Interdigitalhäute eine große Rolle [24]. Lymphozyten die autoreaktiv sind oder keine Antigenpezifität aufweisen, werden ebenfalls durch Apoptose entfernt. Die Apoptose ist auch für die Entfernung von aktivierten T-Lymphozyten nach einer zellvermittelten Immunantwort unerlässlich. Dementsprechend kann ein Defekt im Prozess der Apoptose zu einer Akkumulation von aktivierten T-Lymphozyten und folglich zu autoreaktiven Reaktionen und Autoimmunreaktionen führen [25]. Ein Ausbleiben der Apoptose kann durch eine Dysregulation der zellulären Homöostase auch zur Entstehung von Krebs beitragen. Vermehrter programmierter Zelltod hingegen kann degenerative Erkrankungen fördern, indem es zu unerwünschten Zellverlusten im jeweiligen Gewebe kommt [26].

Morphologisch und biochemisch kann noch eine weitere Zelltodform, der autophagische Zelltod, unterschieden werden [27]. Die Autophagie ist eine Stress- und Anpassungsreaktion der Zelle auf zelluläre Mangelzustände. Bei Mangel an Nährstoffen, Wachstumsfaktoren oder Energie, kommt es durch einen lysosomalen Prozess zum Abbau von eigenen Zellbestandteilen, wie Proteinen, Organellen oder Zytoplasma. So kann die vorübergehende Mangelsituation überwunden und die zelluläre Homöostase gewährleistet werden [28]. Wie Autophagie letztendlich den Zelltod auslöst, ist noch nicht hinreichend geklärt. Es ist denkbar, dass ein massiver Verdau essentieller zellulärer Bestandteile zum Zelltod führen kann. Alternativ könnte Autophagie sekundär zur Auslösung der Apoptose oder Nekrose führen [29].

### **1.1.2. TNF/TNFR-Familie**

Der extrinsische Apoptose-Signalweg erfolgt über transmembrane Todesrezeptoren, die Mitglieder der TNFR-Superfamilie sind. Die Bindung externer, spezifischer Liganden an die Todesrezeptoren aktiviert eine Signalkaskade und führt schließlich zum Zelltod der betroffenen Zelle [30]. Die Mitglieder der TNFR-Familie



unterscheiden sich zwar in ihrer Primärstruktur, besitzen jedoch alle Cystein-reiche extrazelluläre Domänen, welche eine ähnliche Tertiärstruktur annehmen. Die einzigartigen Strukturmerkmale der extrazellulären Domänen einzelner Familienmitglieder erlauben jeweils die spezifische Erkennung ihrer Liganden (Zytokine der TNF-Familie) (Tabelle 1) [12]. Todesrezeptoren besitzen zudem eine konservierte zytoplasmatische Domäne, die sog. Todesdomäne (*Death domain*, DD). Da die Todesrezeptoren selbst keine enzymatische Aktivität aufweisen, interagieren sog. Adapter-Moleküle wie beispielsweise FADD (*Fas-associated protein with death domain*) oder TRADD (*TNFR1-associated death domain*) über ihre Todesdomäne mit der Todesdomäne der Todesrezeptoren und leiten das Signal weiter [31, 32].

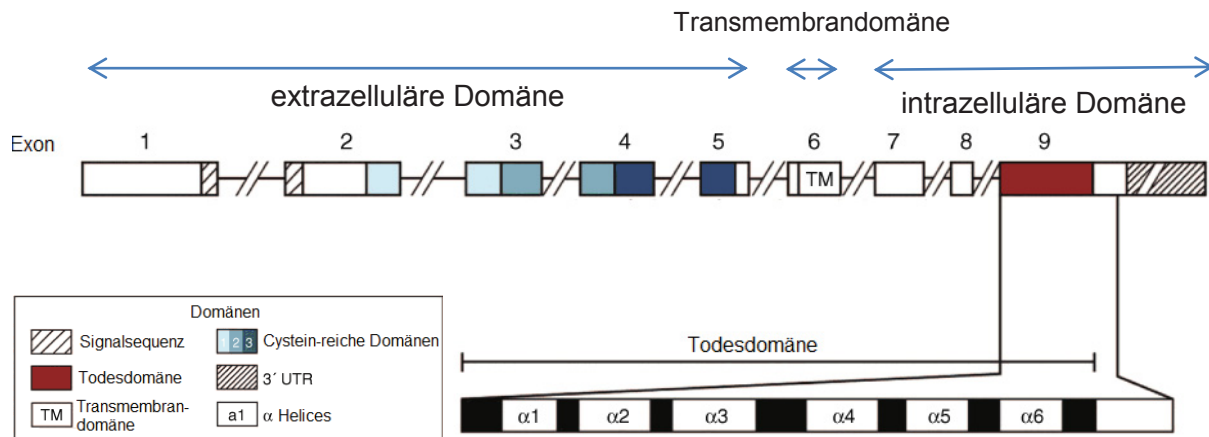
Todesrezeptor	spezifischer Ligand
<b>Fas</b> (CD95/Apo-1/TNFRSF6)	<b>FasL</b> (CD95L)
<b>TNFR1</b> (p55/CD120a)	<b>TNF und Lymphotoxin-<math>\alpha</math></b>
<b>DR3</b> (Apo3/ WSL-1/ TRAMP/ LARD)	<b>Apo3L</b> (TWEAK)
<b>DR4</b> (TRAIL-R1)	<b>TRAIL</b> (Apo2L)
<b>DR5</b> (Apo2/ TRAIL-R2/ TRICK2/ KILLER)	<b>TRAIL</b> (Apo2L)

**Tabelle 1: TNFR-Todesrezeptoren und ihre Liganden.** Alle aufgelisteten Todesrezeptoren und Liganden gehören zur TNF/TNFR-Familie. Es gibt auch andere Mitglieder der TNFR-Familie, die jedoch keine Todesrezeptoren sind. In Klammern befinden sich die jeweils synonymen Bezeichnungen [25].

#### 1.1.2.1. Fas-Rezeptor

Der Fas-Rezeptor wurde 1989 unabhängig von zwei verschiedenen Forschungsgruppen identifiziert (Trauth et al. und Yonehara et al.) [33, 34]. Trauth et al. beschrieben einen, gegen die menschliche B-Lymphoblast-Zelllinie SKW 6.4 gerichteten Antikörper, welcher ein 52 kDa großes Oberflächenprotein erkennt und auf diversen Zelllinien den programmierten Zelltod auslöst. Ähnliche Eigenschaften wurden für den anti-Fas Antikörper von der Gruppe Yonehara et al. gezeigt. Eine intraperitoneale Verabreichung des anti-Fas Antikörpers in Mäusen führte zu einer Apoptose-vermittelten Leberschädigung und schließlich zum Tod der Versuchstiere. Zwei Jahre später konnten Itoh et al. die Fas-kodierende *cDNA* aus der *cDNA*-Bibliothek der KT-3-T-Zell-Lymphomzelllinie isolieren und charakterisieren [35]. Innerhalb der TNFR-Familie gilt der Fas-Rezeptor heute als Prototyp und ist das

bestuntersuchte Mitglied der Familie. Das humane *FAS*-Gen ist auf Chromosom 10q24.1 lokalisiert, umfasst ~25 kb und beinhaltet 9 Exonen, die eine extrazelluläre, transmembranäre und intrazelluläre Domäne des Rezeptors kodieren (Abb. 2) [36, 37].



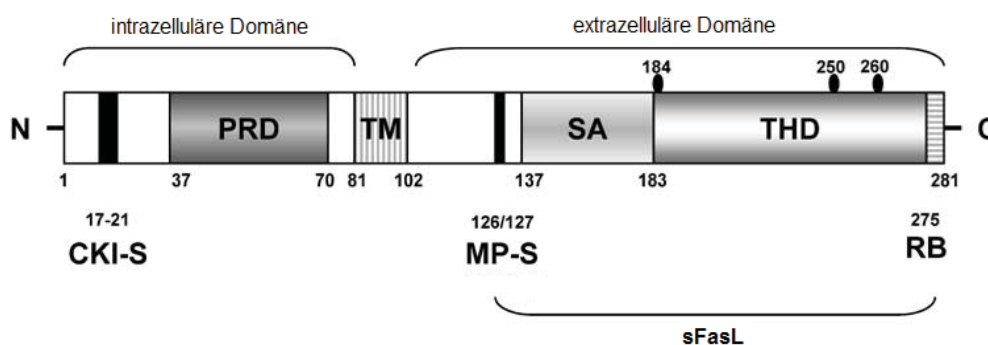
**Abb. 2: Schematische Darstellung des Fas-Gens (modifiziert nach [38]).** *Fas* besteht aus 9 Exonen. Die Exonen 1 und 2 kodieren eine Signalsequenz, die nach dem Transport des Fas-Rezeptors zur Zelloberfläche abgespalten wird. Die Exonen 2,3,4 und 5 kodieren die drei extrazellulären Cystein-reichen Domänen (*Cysteine-rich domains*, CRD), welche typisch für die TNFR-Proteinfamilie sind. Exon 6 kodiert die Transmembrandomäne (TM). Die intrazelluläre Domäne wird von den Exonen 7, 8 und 9 kodiert, wobei Exon 9 allein die Todesdomäne kodiert, über welche die apoptotische Signalkaskade initiiert wird. Die Todesdomäne beinhaltet sechs antiparallele, amphipatische  $\alpha$ -Helices, die zusammen eine übergeordnete Struktur mit einem hydrophoben Zentrum bilden und mit dem Adapter-Molekül FADD interagieren [39]. Der 3' untranslatierte Bereich (3'UTR, *Untranslated Region*) wird ebenfalls von Exon 9 kodiert und beinhaltet drei putative Polyadenylierungssignale [36].

Der Fas-Rezeptor besteht aus 319 Aminosäuren, ist ein Typ-I-Transmembranprotein und wird ubiquitär exprimiert. Die Expression ist auf der Oberfläche von aktivierten T- und B-Lymphozyten besonders hoch [33].

### 1.1.2.2. Fas-Ligand

Der Fas-Ligand (FasL) wurde erstmals 1993 von Suda et al. isoliert und charakterisiert [40]. Die Aminosäuresequenz deutete darauf hin, dass der Fas-Ligand ein Typ-II-Transmembranprotein ist und zur TNF-Familie gehört. Das humane *FASLG*-Gen ist auf Chromosom 1q23 lokalisiert, umfasst ~8 kb und beinhaltet vier Exonen (Abb.3) [41]. Die N-terminale zytoplasmatische Domäne des Proteins umfasst die Aminosäuren 1 – 81 und beinhaltet ein Casein Kinase I (CKI) Substrat Motiv (aa 17 – 21), welches in der retrograden Signaltransduktion involviert ist [42].

Zudem findet sich intrazellulär eine Prolin-reiche Domäne (PRD; aa 37-70), die eine Interaktion mit Proteinen mit einer SH3- (Src-homology 3)- oder WW- (WWP repeating motif) Domäne erlaubt. Es gibt Hinweise darauf, dass die retrograde Signaltransduktion via der intrazellulären Domäne an der Regulation der T-Zell-Proliferation beteiligt ist [43-47]. Die Transmembrandomäne reicht von Aminosäure 81 – 102. FasL kann neben der membranständigen Form auch in löslicher Form vorliegen (soluble FasL, sFasL). Innerhalb der extrazellulären Domäne befindet sich eine Metalloprotease-Schnittstelle (Metalloprotease substrate site, MP-S). Mittels proteolytischer Spaltung durch die Matrix Metalloprotease-7 (MMP-7, Matrilysin) kann sFasL generiert werden (Abb.3). Darüber hinaus kann funktionell aktiver sFasL in lysosomalen Vesikeln gespeichert und so bei Bedarf rasch freigesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass sFasL abhängig vom Zelltyp und der Mikroumgebung der Zellen, sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken kann [48-51]. Die extrazellulär gelegene self-assembly-Domäne (SA) reicht von aa 137 – 183 und ist essentiell für die Trimerisierung des Fas-Liganden. Die C-terminal gelegene INF Homologie-Domäne (THD) ist eine konservierte Domäne in den Mitgliedern der TNF-Familie und bindet an die Cystein-reichen Domänen des Fas-Rezeptors [52]. Die Rezeptorbindestelle findet sich ebenfalls C-terminal.



**Abb. 3: Schematische Darstellung des humanen Fas-Liganden (modifiziert nach [53]).** FasL ist ein Typ-II-Transmembranprotein. Die zytoplasmatische N-terminale Region beinhaltet ein Casein Kinase I Substrat Motiv (CKI-S) und eine Prolin-reiche Domäne (PRD). C-terminal zu der Transmembrandomäne (TM), befinden sich eine Schnittstelle (MP-S; aa S126/127L) für die Matrix Metalloprotease-7 (MMP-7), eine *self-assembly*-Domäne (SA) für die Trimerisierung, die TNF Homologie-Domäne (THD) mit drei putativen Glykolisierungsstellen (N184, N250, N260) und die Rezeptorbindestelle (RB) mit dem kritischen Phenylalanyl-Rest an Position 275. Die lösliche Form des Fas- Liganden (sFasL) entsteht nach Prozessierung der membrangebundenen Form durch MMP-7.

Die Expression von FasL ist auf wenige Zelltypen beschränkt. Diese sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen), aktivierte-Lymphozyten, zytotoxische T-Lymphozyten sowie Zellen von immunprivilegierten Geweben (e.g. Auge, Gerhin, Testes) [54-56]. Immunprivilegierte Gewebe tolerieren keine gewebsschädigende Entzündungsreaktionen und sind deshalb in der Lage einwandernde, immunkompetente Zellen mittels Apoptose zu beseitigen und so eine Immunreaktion zu verhindern.

#### 1.1.2.2.1. Transkriptionelle Regulation von FasL

Nach der klonalen Expansion und Konfrontation mit dem Antigen müssen die aktivierten T-Lymphozyten wieder eliminiert werden (klonale Deletion). Dafür gibt es mehrere Mechanismen. Neben dem Zelltod durch fehlende Reaktion auf ein Antigen oder fehlende kostimulatorische Signale und dem Zelltod durch Mangel an Überlebens- bzw. Wachstumsfaktoren (Konkurrenz von T-Lymphozyten um Zytokine), gibt es den Aktivierungs-induzierten Zelltod (*Activation-induced cell death*, AICD) als wichtigsten Mechanismus für die Beseitigung von aktivierten Lymphozyten [57-60]. Der AICD läuft über den Fas-Signalweg und bedarf daher einer Interaktion zwischen Fas und FasL. Dazu muss zunächst die Expression von Fas/FasL auf der Oberfläche der aktivierten Lymphozyten hochreguliert werden [61-64]. Die Expression von *FASLG* in T-Lymphozyten kann auch in anderen physiologischen Situationen hochreguliert werden. Beispielsweise kann milder Stress (e.g. Hitzeschock, Strahlung oder genotoxische Agenzien) zu einer vermehrten Expression von *FASLG* führen [65-68].

Die Expression von *FASLG* wird durch die Interaktion zwischen dem *FASLG*-Promotor und diversen Transkriptionsfaktoren reguliert [69]. Es wurden eine Reihe von Transkriptionsfaktoren identifiziert, die an der Regulation der *FASLG*-Expression beteiligt sind [70]. Transkriptionsfaktoren wie NFAT (Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen), NF- $\kappa$ B (Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), SP-1 (Specificity protein 1), EGR (Early growth response proteins), IRF (Interferon regulatory factor), c-Myc, FKHRL1 (FOXO3a, Forkhead Box Protein Q3), STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription protein 4) können allein oder

synergetisch und je nach physiologischer Situation die Expression von *FASLG* aktivieren [70, 71].

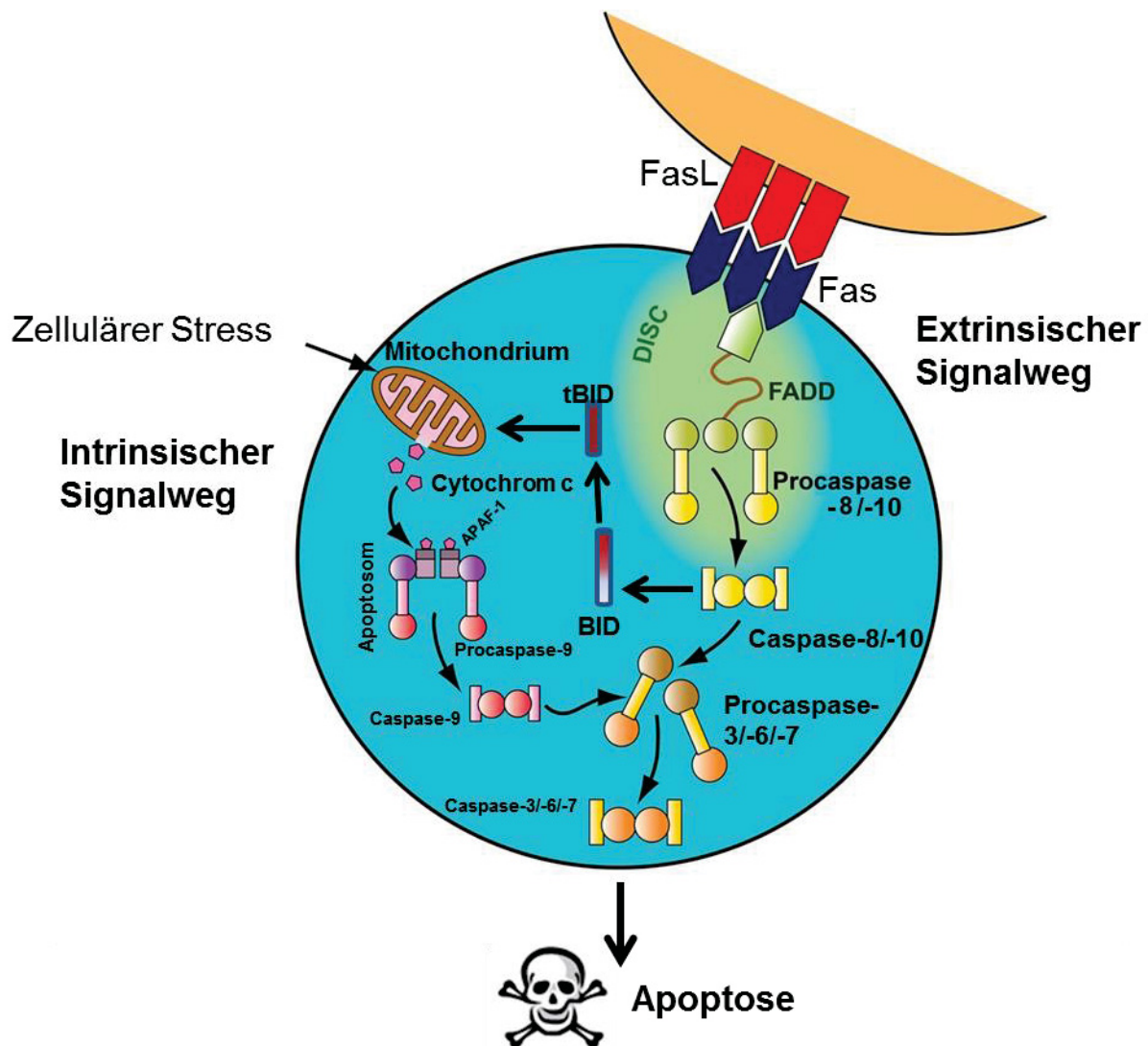
### 1.1.3. Fas-Signalweg

Der Fas-Rezeptor induziert nach der Bindung des Fas-Liganden den apoptotischen Signalweg. Die Fas-FasL Interaktion spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem und ein Defekt in diesem System kann zu lymphoproliferativen Krankheitsbildern und Autoimmunerkrankungen führen; ein Indiz dafür, dass die Fas-vermittelte Apoptose eine essentielle Rolle bei der Beseitigung von autoreaktiven Lymphozyten spielt [72]. Zu Beginn und während der klonalen Expansion sind aktivierte Lymphozyten zunächst resistent gegenüber Fas-vermittelter Apoptose, werden aber zunehmend empfindlicher, je länger sie aktiviert sind und sterben schließlich den programmierten Zelltod. Dieser Prozess ist erforderlich um autoreaktive Lymphozyten zu beseitigen und eine überschießende Immunreaktion zu vermeiden. Es gibt auch Hinweise dafür, dass der Fas-Signalweg bei der Eliminierung von autoreaktiven Lymphozyten während ihrer intrathymischen Selektion eine Rolle spielt [25]. Des Weiteren ist der Fas-Signalweg auch bei der Beseitigung von transformierten (e.g. Tumorzellen) und virusinfizierten Zellen involviert [73].

Chan et. al konnten zeigen, dass TNF-Rezeptoren noch vor der Liganden-Bindung durch homotypische Interaktion mittels ihrer CRD trimerisieren [74]. Auch der Fas-Rezeptor homotrimerisiert vor Bindung von FasL. Die vorangegangene Trimerisierung ist für die Bindung des Fas-Liganden, welcher ebenfalls als Trimer vorliegt, und die Signalweiterleitung notwendig [75]. Nach der Bindung des Fas-Liganden, kommt es zur homotypischen Assoziation der C-terminalen Todesdomäne des Adapter-Proteins FADD mit der zytosolischen Todesdomäne des Fas-Rezeptors. Nachfolgend werden die Procaspase-8 (*FADD-like IL-1 converting enzyme*, FLICE) und Procaspase-10 rekrutiert, indem FADD mittels der N-terminalen sog. Todeseffektordomäne (*Death effector domain*, DED) homotypisch mit der DED der Procaspasen-8 und -10 interagiert [76]. Der Komplex, bestehend aus dem trimeren Fas-Rezeptor, FADD und Caspase-8/10, wird als *Death inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet [77]. Caspasen werden zunächst als inaktive Zymogene (Procaspasen) translatiert. Durch die Bildung des DISCs werden die Initiator-

Caspasen-8 und -10 mittels autokatalytischer Spaltung an Aspartatresten aktiviert. Die aktiven Caspasen-8 und -10 spalten und aktivieren ihrerseits die weiter distal in der Signalkaskade lokalisierten Effektor-Caspasen-3, -6 und -7. Die distalen Effektor-Caspasen führen schließlich durch Spaltung ihrer Zielproteine zu den morphologischen und biochemischen Veränderungen der apoptotischen Zelle und letztlich zum Zelltod [78]. Zu den Zielproteinen der Effektor-Caspasen gehören unter anderem strukturgebende Proteine wie Aktin, Lamine, DNS-Reparaturenzyme (e.g. Poly-ADP-Ribose-Polymerase) und DNase-Inhibitoren. Beispielsweise führt die proteolytische Inaktivierung des DNase-Inhibitors ICAD (*Inhibitor of caspase-activated DNase*) durch die Caspase-3 dazu, dass ICAD nicht mehr als Komplex mit der DNase CAD (*Caspase-activated DNase*) vorliegt. CAD wird somit aktiviert und führt zur apoptotischen DNS-Fragmentierung in der betroffenen Zelle [79]. Eine Querverbindung zum intrinsischen Signalweg, der über die Mitochondrien führt, besteht dadurch, dass Caspase-8 das zytosolische, pro-apoptische Bcl-2-Familienmitglied BID (*BH3 interacting domain death agonist*) spaltet und aktiviert [80]. Die aktive Form tBID (*truncated Bid*) wirkt auf die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (*Mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) und die erhöhte Permeabilität führt letztlich zur Freisetzung von pro-apoptischen Faktoren wie z.B. Cytochrom c aus dem Intermembranraum des Mitochondriums in das Zytosol der betroffenen Zelle [81]. Cytochrom c bildet einen Komplex mit dem pro-apoptischen Adapter-Protein APAF1 (*Apoptotic protease activating factor 1*), dATP und der Procaspase-9. Dieser Komplex wird als Apoptosom bezeichnet und aktiviert die Effektorcaspase-9, die ihrerseits Zielproteine spaltet und den apoptotischen Tod der betroffenen Zelle initiiert [82] (Abb.4).





**Abb. 4: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Signalwegs (modifiziert nach [83]).** Durch die Interaktion des trimeren Fas-Rezeptors (Fas) mit dem trimerisierten Fas-Ligand (FasL) einer anderen Zelle, kommt es zur Bildung eines Protein-Komplexes, bestehend aus dem trimeren Fas-Rezeptor, FADD und Caspase-8 und/oder -10. Der sog. *death inducing signaling complex* (DISC) löst die autokatalytische Spaltung der Caspase-8 und -10 aus und setzt so eine Caspase-Kaskade in Gang. Die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 werden aktiviert und führen dann zur Exekutionsphase der Apoptose. Der extrinsische Signalweg sowie der intrinsische Signalweg sind über Querverbindungen miteinander vernetzt und führen beide zum programmierten Zelltod. So aktiviert die Caspase-8 das pro-apoptotische Bcl-2-Protein BID durch limitierte Proteolyse und das C-terminale Spaltprodukt tBID wirkt auf die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran. Durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran kommt es zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren, wie beispielsweise Cytochrom c, aus den Mitochondrien. Im Zytoplasma der apoptotischen Zelle bildet Cytochrom c einen Komplex mit dem Apoptose-aktivierenden Faktor APAF1, dATP und der Procaspase-9. Durch die Bildung dieses Komplexes, dem Apoptosom, kommt es zur autokatalytischen Umwandlung der Procaspase-9 in die aktive Caspase-9. Die Caspase-9 spaltet und aktiviert ihrerseits die Procaspase-3, -6 und -7, die Zielproteine spalten und zum Ablauf des apoptotischen Programms führen.

## 1.2. ALPS

ALPS (Autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom, Synonym Canale-Smith-Syndrom) gehört zu den lymphoproliferativen Erkrankungen (Lymphoproliferative disorders, LPDs) und tritt typischerweise im Kindesalter auf [84]. ALPS ist durch eine Störung der Lymphozyten-Homöostase charakterisiert. Infolge einer Immunantwort wird die gesteigerte Lymphozytenanzahl normalerweise durch eine vermehrte Elimination dieser Zellen wieder ausbalanciert. Bei ALPS hingegen führt ein genetischer Defekt im programmierten Zelltod zu einer Akkumulation autoreaktiver Lymphozyten. Alle bislang aufgeklärten ALPS-Fälle haben einen Defekt im Fas-Signalweg als molekulare Ursache [85]. *In vitro* äußert sich dies durch eine Resistenz der Lymphozyten der ALPS-Patienten gegenüber Fas-vermittelter Apoptose. Die klinische Symptomatik beinhaltet chronische nicht-maligne Krankheitsbilder wie die Vergrößerung von Lymphknoten (Lymphadenopathie), der Milz (Splenomegalie) und Leber (Hepatomegalie). Weitere Manifestationen sind Autoimmunreaktionen (Hämolytische Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie), Hypergammaglobulinämie und eine erhöhte Anzahl der sonst raren „Doppelt-negativen T-Zellen“ (DNT; das sind T-Lymphozyten, die den  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptor aber weder den CD4- noch den CD8-Korezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren). Zudem besteht im Erwachsenenalter ein erhöhtes Risiko für maligne Lymphome [83].

### 1.2.1. ALPS – Historische Perspektive

1967 beschrieben Canale und Smith eine Gruppe von Patienten im Kindesalter, die zu dem Zeitpunkt seit dreizehn Jahren an einer bislang unerfassten lymphoretikulären proliferativen Störung litten [86]. Das Krankheitsbild dieser Patienten war durch eine generalisierte Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie charakterisiert, die mit einer autoimmunhämolytischen Anämie, Thrombozytopenie und Hypergammaglobulinämie einhergingen. 1992 beschrieben Sneller et al. zwei unverwandte Patienten mit ähnlichen Symptomen und konnten erstmals zeigen, dass eine erhöhte Anzahl an  $CD3^+CD4^-CD8^-$  „doppelt-negativen“ T-Lymphozyten mit der beschriebenen lymphoproliferativen Autoimmunstörung einherging. Sneller et al. erkannten auch die Ähnlichkeit dieses Krankheitsbildes mit dem Phänotyp von *lpr-* (*l*ymphoproliferation) und *gld-* (*g*eneralized *l*ymphoproliferative *d*isease) Mausstämmen [87]. 1995 prägten Fisher et al. den Begriff ALPS



(Autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom) und konnten in einer Kohorte von fünf Patienten zeigen, dass sowohl der TZR (T-Zell-Rezeptor)- als auch der Fas-Rezeptor (CD95) vermittelte Apoptose-Signalweg in T-Lymphozyten dieser Patienten beeinträchtigt war. Auf Grund der Präsenz von Mutationen im Fas-Rezeptor in allen fünf Patienten, wurde ein kausativer Zusammenhang zwischen den *FAS*-Mutationen und ALPS postuliert [88]. Drappa et al. konnten 1996 zeigen, dass das Canale-Smith Syndrom identisch mit ALPS ist [89]. Dazu wurden zwei Patienten, welche bereits 1967 von Canale und Smith untersucht wurden, auf ALPS-Kriterien überprüft. Tatsächlich wurden neben einer erhöhten Anzahl an doppelt-negativen T-Lymphozyten und Fas-Rezeptor-vermittelten Apoptoseresistenz auch Mutationen im Fas-Rezeptor gefunden. Im folgenden Jahr brachten Sneller et al. vorerst den Begriff ALPS-Typ II für Patienten mit typischen ALPS Symptomen aber fehlender *FAS*-Mutation ein [90]. Zudem konnten sie zeigen, dass einige Verwandte von ALPS Patienten mit heterozygoten *FAS*-Mutationen, die ebenfalls heterozygote Träger dieser Mutationen sind, zwar einen defekten Fas-induzierten Apoptose-Signalweg aufzeigen, jedoch keine bis kaum klinische Symptome aufzeigen. Sneller et al. schlossen daraus, dass eine heterozygote *FAS*-Mutation alleine für die Entwicklung von ALPS nicht ausreicht. Sie stellten die Hypothese auf, dass Umweltfaktoren, weitere immunregulatorische Defekte oder Mutationen in anderen Genen notwendig seien. Van der Burg et al. berichteten 2000 erstmals von einem Patienten mit einer homozygoten *FAS*-Mutation die zu einem kompletten Verlust der Oberflächenexpression des Fas-Rezeptors und zu stark ausgeprägten ALPS-Symptomen führt [91].

### 1.2.2. ALPS-Typen

Mittlerweile wurden mehrere molekulare Ursachen für ALPS gefunden, welche alle mit einer Störung des Fas-Signalwegs einhergehen (Tabelle 2). Bei ungefähr 70% aller ALPS-Patienten ist die genetische Ursache bekannt. Bei der überwiegenden Mehrheit der Fälle (~60 –70% der Patienten) liegt eine homozygote, heterozygote oder *compound* heterozygote Keimbahn-Mutation in *FAS* vor. Als zweithäufigste Ursache findet sich eine somatische Mutation (~10%) in *FAS* in TCR  $\alpha/\beta^+CD4^-CD8^-$ -T-Lymphozyten („Doppelt-negative T-Zellen“) [85, 92]. Patienten mit homozygoter

oder heterozygoter *FAS*-Mutation wurden ursprünglich dem „ALPS-Typ 0“ bzw. „ALPS-Typ Ia“ zugeordnet. Seitdem erhebliche Fortschritte im Verständnis von ALPS gemacht wurden, revidierten Oliveira et al. 2010 die Diagnosekriterien und das Klassifikationsschema. Patienten mit „ALPS-Typ 0“ und „ALPS-Typ Ia“ werden heute kollektiv dem Erkrankungstyp „ALPS-FAS“ zugeordnet [93]. „ALPS-sFAS“ (früher: „ALPS-Typ Im“) hingegen bezeichnet ALPS-Patienten mit somatischen *FAS*-Mutationen. Bislang wurden nur vier Patienten mit ALPS diagnostiziert, die eine Keimbahn-Mutation in *FASLG* tragen [94-97]. Der relative Anteil der Patienten mit einer *FASLG*-Mutation („ALPS-FASLG“/früher: „ALPS-Typ Ib“) wird auf <5% geschätzt [85, 97, 98]. „ALPS-CASP10“ (früher: „ALPS-Typ IIa“), ist mit Mutationen im Caspase-10-Gen (*CASP10*) assoziiert und kommt selten vor (<5% aller ALPS-Patienten) [85]. Bisher wurden *CASP10*-Mutationen in nur zwei unverwandten Familien gefunden [99, 100]. Somatische Mutationen in *FASLG* oder *CASP10* die mit ALPS assoziiert sind, wurden noch nicht beschrieben. Bei 20 – 30% aller ALPS-Patienten ist die genetische Ursache ungeklärt („ALPS-U“, ALPS-Undetermined; früher: ALPS-Typ III). Die Patienten erfüllen die Kriterien für eine ALPS-Diagnose, jedoch finden sich keine Mutationen in *FAS*, *FASLG* oder *CASP10* [85, 93]. Diese heterogene Gruppe umfasst sicherlich auch Fälle, bei denen ALPS vergesellschaftet mit anderen Immundefekten auftritt [101].

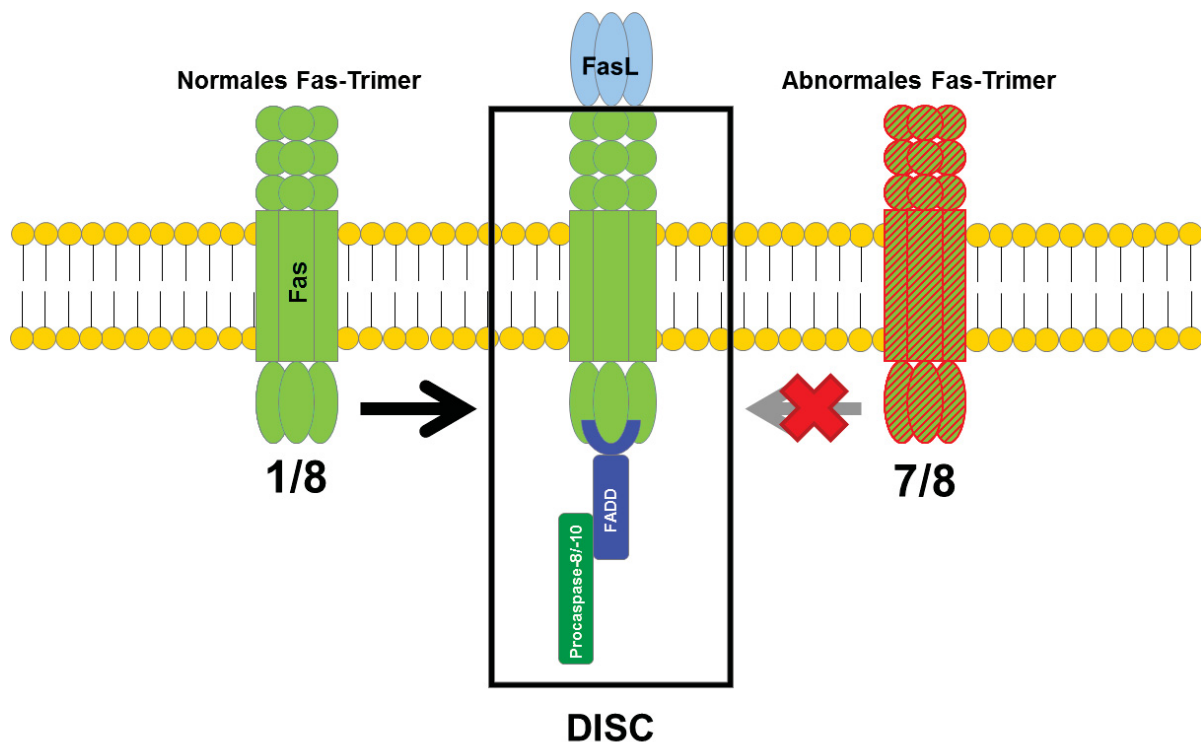
Erkrankungstyp	Gen	Definition	relative Häufigkeit
ALPS-FAS/ ALPS-Typ 0	<i>FAS</i>	Kriterien für ALPS-Diagnose erfüllt und homozygote oder <i>compound</i> heterozygote Keimbahn-Mutation in <i>FAS</i> vorhanden	~60-70%
ALPS-FAS/ ALPS-Typ Ia	<i>FAS</i>	Kriterien für ALPS-Diagnose erfüllt und heterozygote Keimbahn-Mutation in <i>FAS</i> vorhanden	
ALPS-sFAS/ ALPS-Typ Im	<i>FAS</i>	Kriterien für ALPS-Diagnose erfüllt und somatische <i>FAS</i> -Mutation in DNT-Zellen vorhanden	~10%
ALPS-FASLG/ ALPS-Typ Ib	<i>FASLG</i>	Kriterien für ALPS-Diagnose erfüllt und heterozygote oder homozygote Keimbahn-Mutation in <i>FASLG</i> vorhanden	<5%
ALPS-CASP10/ ALPS-Typ IIa	<i>CASP10</i>	Kriterien für ALPS-Diagnose erfüllt und heterozygote Keimbahn-Mutation in <i>CASP10</i> vorhanden	<5%
ALPS-U/ ALPS- Typ III	unbekannt	Kriterien für ALPS-Diagnose erfüllt aber genetische Ursache unbekannt	~20-30%

**Tabelle 2: Erkrankungstypen von ALPS und deren molekulare Ursachen.** Die häufigste molekulare Ursache für ALPS ist eine homozygote (ALPS-Typ 0/ALPS-FAS) oder heterozygote (ALPS-Typ Ia/ALPS-FAS) Keimbahn-Mutationen in *Fas*. Diese ist bei ~70% aller ALPS-Patienten zu finden. Als zweithäufigste genetische Ursache (~10%) lässt sich eine somatische Mutation in der Population von doppelt-negativen (TCR  $\alpha/\beta^+CD4^-CD8^-$ ) T-Lymphozyten finden (ALPS-Typ Im /ALPS-sFAS). Mutationen in *FASLG* und *CASP10* treten als genetische Ursache für ALPS selten auf (je <5%). ALPS-Patienten, bei denen sich keine eindeutigen genetischen Ursachen definieren lassen, werden als ALPS-Typ III bzw. ALPS-U klassifiziert. Ungefähr ein Drittel aller ALPS-Patienten werden diesem Erkrankungstyp zugeordnet [93].

### 1.2.2.1. ALPS-FAS

Bislang wurden 97 verschiedene Mutationen in der ALPS-Datenbank des „Nationalen Instituts für allergische und infektiöse Krankheiten“ in Bethesda (USA) (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*, NIAID, <http://www3.niaid.nih.gov/topics/ALPS/>) registriert. Der Großteil der bereits identifizierten *FAS*-Mutationen betreffen die intrazelluläre Domäne (~70%), wobei die Todesdomäne ein *Hotspot* für Mutationen ist (~60% aller Mutationen) [38, 98, 102, 103]. Ungefähr ein Drittel aller Mutationen betreffen die extrazelluläre Domäne des Fas-Rezeptors [104]. Das Spektrum der Mutationen umfasst *missense*-, *nonsense*-, Spleiß-Mutationen, Insertionen, Deletionen und Duplikationen. ALPS-FAS wird überwiegend autosomal-dominant vererbt, d.h. die meisten ALPS-Patienten haben einen Elternteil mit derselben *FAS*-Mutation. Ein autosomal-rezessiver Erbgang von ALPS-FAS wurde jedoch auch beschrieben. Bei diesen Patienten sind beide Elternteile jeweils heterozygot für eine Mutation in *FAS* und erscheinen klinisch asymptomatisch. Bei den Nachkommen kann es so zu einem homozygoten oder *compound* heterozygoten Zustand und zur Ausprägung von ALPS kommen. Bei

diesen Individuen kann der defekte Fas-Signalweg durch *loss of function* erklärt werden [91]. Beim autosomal-dominanten Erbgang wirken die heterozygoten *FAS*-Mutationen dominant-negativ, indem es zur Beeinträchtigung der Formation von Fas-Trimeren kommt [91, 105]. Es gibt 8 ( $2^3$ ) Möglichkeiten zur Formation eines Fas-Trimers und mit der Annahme, dass das Wildtyp- und das mutierte Allel in derselben Quantität exprimiert werden und die einzelnen Fas-Rezeptoren mit der gleichen Wahrscheinlichkeit aneinander binden, kommt es in einem von acht Fällen zur Formation eines normalen Fas-Trimers (drei normale Proteine) und in sieben von acht Fällen zur Formation eines abnormalen Fas-Trimers (mindestens ein Protein abnormal). Dabei kann die DISC-Formation oder auch die Signalweiterleitung durch DISC beeinträchtigt werden oder gar ganz ausfallen und es kommt zu einer Störung des Fas-Signalwegs. (Abb.5).



**Abb. 5: Schematische Darstellung der dominant-negativen Interferenz von *FAS*-Mutationen.** Der Effekt der dominant-negativen Störung wird dadurch erklärt, dass mit gleicher quantitativer Expression des wildtypischen und des mutierten Allels, nur 1/8 alle Fas-Trimere funktionell normal sind, wohingegen 7/8 aller Fas-Trimere mindestens ein abnormales Fas-Protein beinhalten. Abnormale Fas-Trimere können zu einer Beeinträchtigung der DISC-Formation und damit auch zu einer Beeinträchtigung des Fas-Signalwegs führen.

Diese Form der dominant-negativen Interferenz wurde sowohl für Todesdomäne-betreffende Mutationen und andere Mutationen in der intrazellulären Domäne als

auch für heterozygote Mutationen beschrieben, die die extrazelluläre FasL-bindende Domäne betreffen [75, 105, 106]. Eine andere Möglichkeit wie heterozygote Mutationen in der extrazellulären Region des Fas-Rezeptors zur Ausprägung klinischer ALPS-Symptome führen, ist der Ausfall der Expression eines Allels. Dann reicht die totale Menge an Fas-Rezeptor für die Einleitung der Apoptose nicht mehr aus. Man spricht von Haploinsuffizienz. [104, 107].

#### 1.2.2.2. ALPS-FASLG

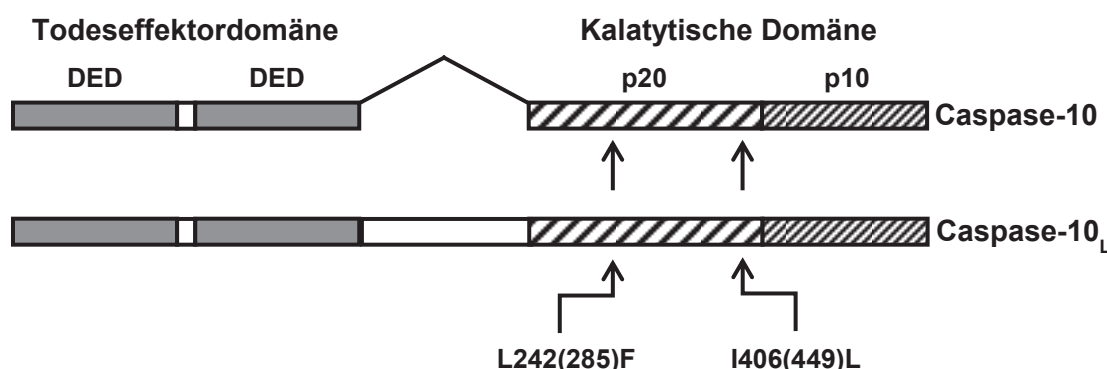
Bislang wurden nur vier ALPS-Patienten mit pathogenen Mutationen in *FASLG* beschrieben (Tab. 3) [94-97]. Der erste ALPS-FASLG-Patient wurde 1996 von Wu et al. beschrieben [94]. Bei diesem Patienten wurde eine heterozygote Mutation identifiziert, die zu einer 28 Aminosäure langen Deletion innerhalb der extrazellulären Domäne von FasL führt. Periphere mononukleäre Zellen (*Mononuclear cells*, MNC) zeigten sowohl eine verminderte *in vitro* FasL-Aktivität als auch eine Beeinträchtigung im Aktivierungs-induzierten Zelltod. Der Aktivierungs-induzierte Zelltod wird durch eine Überstimulation des T-Zell-Rezeptors hervorgerufen und läuft über den Fas-Signalweg mittels Fas/FasL-Interaktion. Die Defekte können durch den Effekt der dominant-negativen Interferenz erklärt werden. Der Fas-Ligand bildet wie der Fas-Rezeptor Trimere. Bei einer heterozygoten Mutation kann es dementsprechend zur Formation abnormaler FasL-Trimere kommen. Del-Rey et al. beschrieben 2006 den ersten ALPS-Patienten mit einer homozygoten *FASLG*-Mutation mit der Konsequenz eines Defekts in der FasL-Aktivität und Beeinträchtigung des Aktivierungs-induzierten Zelltodes [95]. Bi et al. beschrieben einen ALPS-Patienten mit einer heterozygoten *missense*-Mutation in Exon 4 von *FASLG*, welche die extrazelluläre Fas-bindende Region von FasL betrifft und nach dem Modell der dominant-negativen Interferenz zu einer Beeinträchtigung der Fas-vermittelten Apoptose führt [96]. Magerus-Chatinet et al. beschrieben kürzlich (2012) einen schweren ALPS-Fall mit kompletter FasL-Defizienz. Die homozygote Mutation in Exon 1 führte zu einem vorzeitigen Stopcodon und einem kompletten Verlust der *FASLG*-Expression. Die konsanguinen Eltern dieses Patienten waren gesund, daher handelt es sich hier um einen autosomal-rezessiven Erbgang [97].

Mutation	Homozygot/Heterozygot	Aminosäureaustausch	Exon	Proteinexpression	Erbgang	Referenz
c.472_555del	Heterozygot	p.Met158_Glu185del (28-aa Deletion; Trunkierung)	4	Nicht überprüft	Autosomal dominant- negativ	Wu et al., 1996 [94]
c.740C>A	Homozygot	p.Ala247Glu ( <i>Missense</i> )	4	Normal	Autosomal Rezessiv	Del-Rey et al., 2006 [95]
c.466A>G	Heterozygot	p.Arg156Gly ( <i>Missense</i> )	4	Normal	Autosomal dominant- negativ	Bi et al., 2007 [96]
c.259delT	Homozygot	p.F87fsx95 ( <i>Nonsense</i> ; vorzeitiger Stop)	1	Nicht vorhanden	Autosomal Rezessiv	Magerus- Chatinet et al., 2012 [97]

**Tabelle 3: Bislang beschriebene ALPS-FASLG-Fälle.**

### 1.2.2.3. ALPS-CASP10

Bislang wurden ALPS-CASP10-Fälle in nur zwei Familien identifiziert. Die beschriebenen heterozygoten *missense*-Mutationen p.L285F und p.I406L führen zu einer verminderten Caspase-Aktivität und interferieren dominant-negativ mit dem Fas-Signalweg (Abb.6) [99, 100].



**Abb. 6: Schematische Darstellung der zwei Isoformen von Caspase-10 mit den beschriebenen Mutationen (modifiziert nach Wang et al., 1999 [99]).** Caspase-10 existiert durch alternatives Spleißen in zwei Isoformen. Die Isoform Caspase-10<sub>L</sub> ist 43 Aminosäuren größer als die kurze Isoform. Beide beschriebene Mutationen (p.L285F und p.I406L) liegen in der großen Untereinheit der katalytischen Domäne (p20) und führen zu einer verminderten Caspase-Aktivität.

Bei ALPS-CASP10 scheint nicht nur der Fas-Signalweg, sondern auch die durch die Todesrezeptoren TNFR-R1-, DR3- und TRAIL-vermittelte Apoptosewege beeinträchtigt zu sein. Dies deutet darauf hin, dass Caspase-10 in mehreren Todesrezeptor-vermittelten Apoptose-Signalwegen eine Rolle spielt. Der schwere

Phänotyp von ALPS-CASP10-Patienten kann damit erklärt werden, dass neben einer Störung in der Homöostase von Lymphozyten auch eine Akkumulation von dendritischen Zellen in den lymphoiden Organen beschrieben wurde.

#### 1.2.2.4. Penetranz von ALPS-FAS

Bei der Penetranz muss ein Unterschied zwischen der Penetranz des klinischen Phänotyps und der Penetranz des zellulären Phänotyps gemacht werden. Die Penetranz des zellulären Phänotyps beträgt fast 100%, i.e. jede ALPS-assoziierte *FAS*-Mutation führt zu einem Defekt in der Fas-vermittelten Apoptose. Die klinische Penetranz hingegen ist niedriger (~70%), da eine große Variabilität der klinischen Symptome bei heterozygoten Trägern in der Familie von ALPS-Patienten besteht. Es ist noch nicht hinreichend geklärt, welche Faktoren und Mechanismen die klinische Penetranz bestimmen. Es gibt aber Hinweise darauf, dass die klinische Penetranz mit der Position der Mutation in *FAS* zusammenhängt. Am höchsten ist die klinische Penetranz bei *missense*-Mutationen in der intrazellulären Domäne (~90%) des Fas-Rezeptors, gefolgt von Mutationen die zu einer Trunkierung der intrazellulären Domäne (~70%) führen. Die meisten identifizierten Mutationen (~60%) liegen in Exon 9 von *Fas* und haben negative Auswirkungen auf die Funktionalität der Todesdomäne. Im Gegensatz dazu, entwickeln nur ~30% der Träger von Mutationen in der extrazellulären Domäne des Fas-Rezeptors klinische ALPS-Symptome [105, 108, 109]. Diese partielle klinische Penetranz in einigen Familien weist darauf hin, dass neben einer heterozygoten *FAS*-Mutation, zusätzliche Faktoren wie beispielsweise ein *second Hit* (eine Mutation im zweiten Allel von *FAS* oder in einem anderen Gen) oder Umweltfaktoren zur Ausprägung von klinischen Symptomen notwendig sind. Bleesing et al. konnten in einer Studie mit 31 Familien, welche von ALPS-Typ Ia betroffen waren, zeigen, dass die Anzahl der DNT-Zellen auch bei den Familienmitgliedern ohne *FAS*-Mutation und klinische Symptome leicht erhöht ist. Dies stützt die Hypothese eines *second Hits* [98]. Interessant ist auch, dass Mutationen in beiden *FAS*-Allelen (homozygot oder *compound* heterozygot) zu einer kompletten klinischen Penetranz führen. Ähnlich verhält es sich mit Mäusen des *lpr*-Stamms. Nur Mäuse mit homozygoter *FAS*-Defizienz entwickeln die typischen ALPS-Symptome. Andererseits gibt es auch Hinweise darauf, dass bestimmte *FAS*-



Mutationen (e.g. *missense*-Mutationen in Exon 9, welches für die Todesdomäne von Fas kodiert) ausreichend sind, um im heterozygoten Zustand zu einer Ausprägung der klinischen ALPS-Symptome zu führen [98, 102, 105]. 2011 konnten Magerus-Chatinet et al. neue Erkenntnisse bezüglich der klinischen Penetranz von extrazellulären *FAS*-Mutationen beitragen. Sie beschrieben eine kleine Kohorte von Patienten (N=7) und ihren asymptomatischen Familienmitgliedern mit heterozygoten *FAS*-Mutationen in der extrazellulären Domäne. Zusätzlich zur Keimbahn-Mutation in *FAS* wurde in drei Patienten eine zweite heterozygote somatische Mutation in DNT-Zellen und in vier Patienten ein Verlust der Heterozygotie (*Loss of heterozygosity*, LOH) im zweiten Allel von DNT-Zellen gefunden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die *second Hit*-Hypothese Bestand hat und somatische Mutationen in DNT-Zellen zu einem *compound* heterozygoten Zustand führen und zur klinischen Penetranz von ALPS beitragen können [110].

### 1.2.3. Klinisches Bild

Die Angaben zum Durchschnittsalter bei Erstmanifestation variieren in der Literatur, befinden sich aber mit 11 Monaten [111] 1,8 Jahren (<http://www3.niaid.nih.gov/topics/ALPS/>) und 5 Jahren [112] im frühen Kindesalter. ALPS betrifft beide Geschlechter, tritt weltweit auf und gilt als seltene Erkrankung [113]. Es wird aber mittlerweile angenommen, dass die Erkrankung häufiger auftritt als ursprünglich angenommen [114]. Prävalenz und Inzidenz sind nicht bekannt.

Lymphoproliferation von nicht-malignen lymphoiden Zellen ist bei allen ALPS-Patienten zu finden und gehört damit zur gewöhnlichen klinischen Manifestation. Infolge der Lymphoproliferation kommt es bei über 80% der Patienten zur Vergrößerung der Lymphknoten (Lymphadenopathie; zumeist zervikal und axillär), und bei über 85% der Patienten zur Vergrößerung der Milz (Splenomegalie). Weiterhin findet sich bei ~45% der Patienten eine Vergrößerung der Leber (Hepatomegalie) [83, 98, 111, 113]. Zusätzlich werden als zweithäufigste klinische Manifestation Autoimmunreaktionen beobachtet. Bei 70% der ALPS-Patienten kann eine autoimmune hämolytische Anämie (AIHA), eine Autoimmun-Neutropenie (AIN) oder eine Immunthrombozytopenie (ITP) beobachtet werden. Bei diesen



immunologischen Erkrankungen werden die Erythrozyten, neutrophilen Granulozyten oder Thrombozyten der Patienten von eigenen, gegen die Blutzellen gerichteten, Antikörpern zerstört [83]. Die autoimmunen Zytopenien können sowohl mild als auch schwer verlaufen, so dass der Einsatz von Immunsuppressiva notwendig wird [115]. Andere autoimmune Krankheitsbilder wie Glomerulonephritis, Arthritis oder Autoimmunhepatitis (AIH) treten seltener auf [90, 105]. Rötungen werden häufig beschrieben, jedoch ist die Inzidenz nicht bekannt [115-117]. Obwohl die Lymphoproliferation benigne ist, besteht für ALPS-FAS-Patienten ein 14- und 51-fach erhöhtes Risiko für Non-Hodgkin- bzw. Hodgkin-Lymphome. Maligne Lymphome gehören zu den Spätmanifestationen, das Durchschnittsalter der Patienten liegt bei Beginn der malignen Erkrankung bei 28 Jahren [112]. Lymphome haben typischerweise ihren Ursprung in B-Lymphozyten, T-Zell-Lymphome treten seltener auf. Sowohl Hodgkin- als auch Non-Hodgkin-Lymphome machen sich meist durch eine schmerzlose (indolente) Schwellung der Lymphknoten bemerkbar. Andere maligne Erkrankungen bei ALPS-Patienten wurden auch beschrieben. Z.B. wurde ein Patient mit Leberkarzinom in Kombination mit einer Hepatitis C Infektion und ein weiterer Patient mit multiplen Schilddrüsenadenomen und Basalzellkarzinomen von Drappa et. al beschrieben [89].

#### **1.2.4. Laborbefunde**

##### **1.2.4.1. Doppelt-negative T-Lymphozyten**

Bei gesunden Individuen sind DNT-Zellen ( $\text{TCR}\alpha/\beta^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ -Lymphozyten) eigentlich eine rare Zellpopulation und sowohl im Prozess der Immunregulation und Immuntoleranz als auch bei Entzündungsreaktionen und der Abwehr von Pathogenen beteiligt [118-122]. Die Akkumulation von doppelt-negativen T-Lymphozyten im peripheren Blut und lymphoiden Organen (Lymphknoten, Milz) ist ein wichtiges Diagnosekriterium für ALPS. Die Analyse der relativen Häufigkeit von DNT-Zellen wird mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Bei ALPS-Patienten liegt der Anteil dieser Zellpopulation in der Regel bei  $\geq 2,5\%$  von  $\text{CD3}^+$ -Lymphozyten [93, 123]. Bei Patienten mit anderen Immunerkrankungen, e.g. systemischer Lupus erythematodes (SLE) oder idiopathischer Immunthrombozytopenie, sind zwar auch

milde Erhöhungen der Anzahl von DNT-Zellen beschrieben worden, eine signifikante Erhöhung (>5%) jedoch wurde bislang nur bei ALPS gefunden [83, 124, 125]. Die Herkunft und Ontogenese der DNT-Zellen ist immer noch unklar und Gegenstand kontroverser Diskussion. Einige Studien deuten darauf hin, dass periphere DNT-Zellen dem Thymus entstammen [126, 127], andere wiederum weisen auf eine Entwicklung in der Peripherie hin [128, 129]. Eine Hypothese ist, dass DNT-Zellen *de novo* in der Peripherie aus CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-Vorläuferzellen entstehen, welche die Expression des Korezeptors herunterreguliert haben [130-133]. Andere Studien hingegen führen zu der Annahme, dass dies nicht der Fall sei [134, 135]. Bisher wurde die erhöhte Anzahl von DNT-Zellen nur als Epiphänomen von ALPS betrachtet, aber es gibt Hinweise darauf, dass DNT-Zellen einer der Ursachen für die Autoimmunreaktionen und abnormale B-Zell-Aktivität sind [136, 137]. DNT-Zellen exprimieren den Marker B220, eine Isoform von CD45R, und zeichnen sich durch eine hohe Expression von Interleukin-10 (IL-10) aus [134, 136, 138]. Die Expression von B220 wird normalerweise auf T-Lymphozyten hochreguliert wenn die Apoptose eingeleitet wird. Besteht aber wie bei ALPS ein Defekt im Apoptose-Mechanismus, kommt es zu einer Akkumulation von B220<sup>+</sup>-T-Lymphozyten [139].

#### 1.2.4.2. Immunphänotyp

Bleesing et al. untersuchten den Immunphänotyp von ALPS-Typ Ia-Patienten aus 31 Familien und beschrieben neben einer erhöhten Anzahl von DNT- und B220<sup>+</sup>-T-Lymphozyten auch eine Abnahme von CD27<sup>+</sup> *Memory* B-Zellen und ein abnormales Verhältnis in der Anzahl von CD25<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>- zu HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-Zellen [103]. CD25 (α-Kette des IL-2-Rezeptors) gilt als sog. früher Aktivierungsmarker und wird bereits in der frühen Phase nach der Aktivierung von T-Lymphozyten auf der Zelloberfläche exprimiert. HLA-DR hingegen gilt als später Aktivierungsmarker und eine dauerhaft hohe Expression wird mit chronischen Infektionen, Autoimmunerkrankungen oder persistierenden Infekten assoziiert [140-143]. Das *Cincinnati Children's Hospital Medical Center* (Cincinnati, Ohio, Vereinigte Staaten) verwendet diese Kriterien beim *Screening* nach möglichen ALPS-Patienten (≥60% der DNT-Zellen sind B220<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> zu HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-Verhältnis <1, Anteil von CD27<sup>+</sup> B-Zellen an gesamte Lymphozyten-Population <16%) [144-146]. Diese Kriterien erleichtern zwar oft die

Diagnose von ALPS, sind aber nicht immer verlässlich, da die Werte individuell und altersabhängig variieren [146].

#### **1.2.4.3. Defekt in der Fas-vermittelten Apoptose**

Ein Defekt in der Fas-vermittelten Apoptose ist charakteristisch für ALPS mit genetisch bekannter Ursache und kann *in vitro* nachgewiesen werden. Dazu werden T-Lymphozyten aus isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) des Patienten zunächst in Kultur mittels eines Mitogens (z.B. Phytohämagglutinin, PHA) und Interleukin-2 (IL-2) aktiviert und expandiert [147-149]. Die Aktivierung und Expansion führt zudem zur Hochregulation von Komponenten des Fas-Signalwegs [83, 150, 151]. Werden die aktivierten T-Lymphozyten von gesunden Patienten dann mit rekombinantem FasL oder anti-Fas-Antikörper stimuliert, kommt es zur Einleitung der Apoptose in einer großen Zahl von Zellen. T-Lymphozyten von ALPS-Patienten (außer ALPS-FASLG-Patienten) hingegen sind resistent gegenüber FasL- und anti-Fas-Antikörper-vermittelter Apoptose [96, 99, 152]. Da DNT-Zellen kaum auf Mitogene und Antigene reagieren und selbst keine Wachstumsfaktoren wie beispielsweise IL-2 produzieren, sind sie in der Zellkultur nicht überlebensfähig und kultivierbar [114, 153]. Daher kann der Effekt von somatischen *FAS*-Mutationen in DNT-Zellen beim Apoptose-Test nicht ermittelt werden. Auch Patienten mit ALPS-FASLG zeigen bei diesem Test keinen Defekt, da der Fas-Signalweg mit rekombinantem FasL oder anti-Fas-Antikörper stimuliert wird. Der Aufwand und die Kosten für diesen Test sind relativ hoch; es werden immer mehrfache Ansätze angesetzt, negative und positive Kontrollen sowohl mit Patientenzellen als auch mit gesunden Zellen sind notwendig und das Material von primären Zellen ist begrenzt. Deshalb gibt es weltweit nur einige wenige Labore in denen dieser Apoptose-Test durchgeführt wird [83].

#### **1.2.4.4. Zirkulierende Biomarker**

Die Ermittlung des Plasma- und Serumspiegels bestimmter zirkulierender Biomarker wie sFASL, IL-10, IL-18 und Vitamin B<sub>12</sub> kann bei der Diagnose von ALPS hilfreich sein. Es konnte gezeigt werden, dass der Spiegel von sFasL im Plasma von ALPS-

Patienten erhöht ist [154]. Caminha et al. untersuchten 2010 eine große Kohorte von ALPS-Patienten und zeigten, dass die Konzentration von sFasL im Plasma bei 97% aller untersuchten Patienten mit ALPS-Typ Ia und allen Patienten mit ALPS-Typ Im mehr als 200 pg/ml sFasL betrug. Gesunde Verwandte mit derselben *FAS*-Mutation und ALPS-Patienten mit genetisch unbekannter Ursache zeigten dagegen einen mäßigen Anstieg von sFasL. Der erhöhte Spiegel von sFasL im Plasma gilt daher als sensitiver Biomarker und ist hilfreich bei der Diagnose von ALPS [155]. Eine Erhöhung des IL-10- und IL-18-Spiegels im Plasma von ALPS-Patienten wurde auch beschrieben [154, 155]. Überraschenderweise ist auch der Spiegel von Vitamin B<sub>12</sub> im Serum von vielen ALPS-Patienten erhöht. Die Ursache ist jedoch noch nicht bekannt [84, 155, 156].

### 1.2.5. ALPS-Diagnosekriterien

Seitdem das Nationale Gesundheitsinstitut (*National Institute of Health*, NIH) in den Vereinigten Staaten, Kriterien für eine ALPS-Diagnose aufgestellt hat (1999), wurden enorme Fortschritte in der Forschung zum Verständnis der Ätiologie und Pathogenese von ALPS erzielt. Aus diesem Grunde überarbeiteten Oliveira et al. 2010 (auf Basis des „*NIH International Workshops*“ 2009) die Kriterien für eine ALPS-Diagnose [93]. Die revidierten Diagnosekriterien werden dabei in zwei „notwendige“ und sechs „zusätzliche“ Kriterien unterteilt (Tab. 4).

<b>Notwendig</b>
1. Chronische (>6 Monate), nicht-maligne, nicht-infektiöse Lymphadenopathie und/oder Splenomegalie
2. Erhöhte Anzahl an CD3 <sup>+</sup> TCRα/β <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> -DNT-Zellen (≥1,5% von der totalen Lymphozyten-Population oder ≥2,5% von CD3 <sup>+</sup> Lymphozyten)
<b>Zusätzlich</b>
<b>Primär</b>
1. Apoptose-Signalweg in Lymphozyten gestört
2. Somatische oder Keimbahn-Mutation in <i>FAS</i> , <i>FASLG</i> oder <i>CASP10</i>
<b>Sekundär</b>
1. Erhöhter sFasL Spiegel im Plasma (>200 pg/ml) ODER Interleukin-10 Spiegel im Plasma (>20 pg/ml) ODER erhöhter Vitamin B <sub>12</sub> Spiegel im Serum oder im Plasma (>1500 ng/l) ODER erhöhter Interleukin-18 Spiegel im Plasma (>500 pg/ml)
2. Typische immunhistologische Befunde
3. Autoimmune Zytopenien (Hämolytische Anämie, Thrombozytopenie oder Neutropenie) UND erhöhter Immunglobulin G Spiegel (polyklonale Hypergammaglobulinämie)
4. Vorkommen von nicht-maligner/nicht-infektiöser Lymphoproliferation mit oder ohne Autoimmunreaktionen im Familienstammbaum

**Tabelle 4: Revidierte ALPS-Diagnosekriterien (modifiziert nach [93]).**

Notwendige Diagnosekriterien beinhalten lymphoproliferative Krankheitsbilder (chronische, nicht-maligne, nicht-infektiöse Lymphadenopathie und/oder Splenomegalie) und eine erhöhte Anzahl von  $CD3^+TCR\alpha/\beta^+CD4^-CD8^-$ -T-Lymphozyten. Diese beiden Kriterien sind typisch für ALPS und daher diagnostisch sehr bedeutsam. Zusätzliche Kriterien werden in primäre (defekter Apoptose-Signalweg in Lymphozyten und Mutationen in klassischen ALPS-Genen) und sekundäre Kriterien (erhöhter Spiegel bestimmter zirkulierender Biomarker, charakteristische Histopathologie, autoimmune Zytopenien mit polyklonaler Hypergammaglobulinämie und vorbelasteter Familienstammbaum mit ALPS-Symptomen) unterteilt. Ursprünglich gehörte ein defekter Apoptose-Signalweg in Lymphozyten zu den notwendigen Kriterien. Nach der Überarbeitung der Diagnosekriterien wird dieses Kriterium jedoch nicht mehr als notwendig erachtet, da somatische *FAS*-Mutationen und Keimbahn-Mutationen von *FASLG* keinen Einfluss auf das Ergebnis eines *in vitro* Apoptose-Tests haben. Das Kriterium einer somatischen oder Keimbahn-Mutation in *FAS*, *FASLG* oder *CASP10* gehört ebenfalls nicht zu den notwendigen-Kriterien, da eine große Kohorte (~20-30%) von ALPS-Patienten zum ALPS-Typ III bzw. ALPS-U gehört und damit noch mit keiner genetischen Ursache assoziiert ist. Bei Mutationen in den klassischen ALPS-Genen (*FAS*, *FASLG*, *CASP10*) muss zudem ausgeschlossen werden, dass es sich um Polymorphismen handelt. Dabei können die Mutationen mit bereits bekannten und ALPS-assoziierten Mutationen in öffentlich zugänglichen Datenbanken (z.B. *National Center for Biotechnology Information NIH ALPS*, <http://www3.niaid.nih.gov/topics/ALPS/>) abgeglichen werden. Bei neuen, unbekanntem Mutationen sollte die funktionale Konsequenz überprüft werden. Eine definitive Diagnose besteht, wenn beide notwendigen Kriterien und ein zusätzliches primäres Diagnosekriterium erfüllt werden. Eine mutmaßliche Diagnose basiert auf dem Vorhandensein von beiden notwendigen Kriterien und einem zusätzlichen sekundären Kriterium.

### 1.2.6. Therapie

Lymphoproliferation wird üblicherweise mit Immunsuppressiva (e.g. Kortikosteroide, Cyclosporin, Tacrolimus, Sirolimus und Mycophenolat-Mofetil) behandelt [84]. Die

verschiedenen Substanzklassen der Immunsuppressiva haben unterschiedliche Wirkmechanismen. Beispielsweise hemmen Calcineurininhibitoren (CNI), zu denen Cyclosporin A und Tacrolimus gehören, die Funktion der Phosphatase Calcineurin, welche eine essentielle Rolle in der Regulation der Immunantwort spielt. Calcineurin kann dann NFAT, eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren in T-Lymphozyten, nicht mehr phosphorylieren. Infolgedessen bleibt die Translokation von NFAT in den Nukleus und so auch die Transkription von IL-2, Interferon gamma (IFN $\gamma$ ), TNF und anderen Zytokinen aus. Dadurch wird die Einleitung einer Immunantwort unterbunden [157, 158]. Sirolimus (Synonym Rapamycin) ist ein Inhibitor der Proteinkinase mTOR (*mechanistic target of Rapamycin*, früher *mammalian target of Rapamycin*) und unterdrückt letztlich die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten [159-161]. Nach Absetzen der Immunsuppressiva kehren jedoch die Manifestationen der Lymphoproliferation wieder (Lymphadenopathie und Organomegalie), daher wird der Einsatz von Immunsuppressiva in vielen Fällen nur bei schweren Komplikationen durch die Lymphoproliferation (z.B. Blockierung der Atemwege) und/oder Manifestationen von Autoimmunreaktionen eingesetzt [98]. Lymphome werden mit konventioneller Therapie behandelt. Eine Indikation zur Splenektomie wird vorsichtig gestellt, da einerseits keine permanente Remission der Autoimmunphänomene erreicht wird und andererseits ein erhöhtes Risiko einer Sepsis besteht [162]. Kurativ lässt sich ALPS derzeit nur mit allogener Knochenmark- oder Stammzelltransplantation behandeln. Dies wird bei Patienten mit einem schweren Phänotyp in Betracht gezogen, wie beispielsweise bei Patienten mit biallelischen Mutationen in *FAS* oder *high-grade* (aggressiven) Lymphomen [163-165].

### **1.2.7. Prognose**

Erst ab Mitte der 1990er Jahre wurde mit einer umfassenden Charakterisierung von ALPS begonnen und damit enorme Fortschritte im Verständnis der Erkrankung erreicht. Trotzdem bestehen noch viele Unklarheiten, u.a. bezüglich der Prognose. Die Prognose kann nicht endgültig abgeschätzt werden, da nur von wenigen ALPS-Patienten im Erwachsenenalter gesicherte Daten vorliegen. Während sich die Manifestationen von nicht-maligner Lymphoproliferation postpubertär merklich

abmildern, scheint es so, dass die Autoimmunreaktionen und das Risiko für die Entwicklung von Lymphomen lebenslang bestehen bleiben [98, 108, 166]. Zwar gibt es noch keine aussagekräftigen Daten bezüglich der Lebenserwartung, aber die kurzfristige und langfristige Prognose scheinen gut zu sein. In einer Kohorte von 257 ALPS-Patienten des Nationalen Instituts für Allergien und infektiöse Krankheiten wurden lediglich 13 Todesfälle beschrieben. Acht Patienten starben an den Folgen einer Post-Splenektomie-Sepsis, ein Patient auf Grund einer schweren hämolytischen Anämie und den Folgen der Behandlung und vier Patienten wegen fortgeschrittenen malignen Erkrankungen [84]. Für die endgültige Klärung der Prognose ist eine Beobachtung größerer Patientenzahlen notwendig.

### 1.2.8. ALPS-ähnliche Syndrome

Chun et al. beschrieben 2002 zwei Geschwister mit einer homozygoten Mutation im Caspase-8-Gen (*CASP8*) [167]. Da typische ALPS-Kriterien wie Lymphadenopathie, Splenomegalie, eine erhöhte Anzahl an DNT-Zellen und ein defekter Fas-Signalweg in Lymphozyten erfüllt waren, wurden diese Patienten ursprünglich dem ALPS-Typ IIb zugeordnet. Im Gegensatz zu den klassischen ALPS-Fällen, zeigten diese Patienten jedoch auch einen Defekt in der T-, B- und NK-Zell-Aktivierung und zusätzlich dazu rezidivierende sinopulmonale und Herpes simplex Virus Infektionen. Auf Grund dieses Unterschieds im Phänotyp, wird heute der Begriff „*Caspase-8 deficiency state*“ (CEDS) für diesen Immundefekt verwendet [168]. Patienten mit klinischen Symptomen einer Autoimmunerkrankung, Lymphozyten-Akkumulation und somatischen *NRAS*-Mutationen als genetische Ursache, wurden anfänglich dem ALPS-Typ IV zugeordnet [169]. Mittlerweile wird die Bezeichnung „*RAS-associated autoimmune leukoproliferative disease*“ (RALD) verwendet, da einerseits somatische *NRAS*-Mutationen nicht immer mit einer erhöhten Anzahl von DNT-Zellen einhergehen und andererseits die Patienten atypische Symptome wie eine erhöhte Anzahl von Zellen myeloiden Ursprungs (Monozystose und Granulozystose) und überlappende Symptome mit der juvenilen *myelomonozytären Leukämie* (JMML) zeigen [93, 170]. Unter RALD fallen auch Patienten mit einer somatischen *KRAS*-Mutation [171]. Bei diesen Patienten wurden autoimmune Zytopenien, Lymphadenopathie und Splenomegalie beschrieben. Eine erhöhte Anzahl von DNT-



Zellen war nicht vorhanden. Bisher wurden weniger als zehn Patienten mit RALD beschrieben [85]. Bei DALD (*Dianzani's autoimmune lymphoproliferative disease*) zeigen sich die gleichen klinischen Symptome wie bei ALPS, mit der Ausnahme jedoch, dass hier keine erhöhte Anzahl von DNT-Zellen zu finden ist. Die genetische Ursache ist bei DALD noch ungeklärt [172]. Weitere ALPS-ähnliche Syndrome sind in Tabelle 5 gelistet.

Ursprüngliche Bezeichnung	Revidierte Nomenklatur	Gen	Definition
ALPS-Typ IIb	CEDS	<i>CASP8</i>	Lymphadenopathie und/oder Splenomegalie, marginal erhöhte Anzahl von DNT-Zellen, rezidivierende Infektionen, defekter Fas-Signalweg, Defekt in der T-, B- und NK-Zell-Aktivierung
ALPS-Typ IV	RALD	<i>NRAS/KRAS</i>	Lymphadenopathie und/oder Splenomegalie, normale oder erhöhte Anzahl von DNT-Zellen, Autoimmunreaktionen, Monozystose und Granulozystose
DALD	DALD	unbekannt	Lymphadenopathie und/oder Splenomegalie, normale Anzahl von DNT-Zellen, Autoimmunreaktionen, defekter Fas-Signalweg
XLP	XLP	<i>SH2D1A</i>	Schwere Epstein-Barr-Virus Infektion, Lymphoproliferation, Hypergammaglobulinämie, Lymphome, defekter TZR-vermittelter Apoptose-Signalweg
CVID	CVID	unbekannt	Lymphadenopathie und/oder Splenomegalie, Lymphoproliferation, Lymphome, rezidivierende Infektionen, Autoimmunreaktionen

**Tabelle 5: ALPS-ähnliche Syndrome.** CEDS: *caspase-8 deficiency state*, RALD: *RAS-associated autoimmune leukoproliferative disease*, DALD: *Dianzani's autoimmune lymphoproliferative disease*, XLP: *X-linked lymphoproliferative disease*, CVID: *Common variable immunodeficiency disease* [93].



## 2. Zielsetzung

Das autoimmune lymphoproliferative Syndrom (ALPS) ist, bedingt durch Mutationen in Genen des Fas-Signalwegs (*FAS*, *FASLG*, *CASP10*) durch eine Dysregulation der lymphozytären Homoöstate charakterisiert. Zu den Folgen zählen lymphoproliferative Krankheitsbilder wie Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie, ein erhöhtes Risiko für Lymphome, Manifestationen von Autoimmunreaktionen, Hypergammaglobulinämie und die Akkumulation von doppelt-negativen T-Zellen, die den  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptor aber weder den CD4- noch den CD8-Korezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren. Bei etwa 20-30% aller Patienten, welche die Diagnosekriterien von ALPS erfüllen, ist die molekulare Ätiologie unbekannt. Diese Patienten werden dem Erkrankungstyp ALPS-U zugeordnet und sind Gegenstand aktueller Forschung. Die Variabilität der Klinik und die unbekannt genenische Ursache erschwert die Diagnose, zudem sind kaum ALPS-U-Fälle beschrieben worden. Da klinische Manifestationen schon sehr früh nach der Geburt auftreten, sind Umweltfaktoren unwahrscheinlich. Zusammenfassend muss man feststellen, dass zwar bedeutende Fortschritte im Verständnis der molekularen Ursachen von ALPS gemacht wurden, dass jedoch die Pathogenese von ALPS-U noch völlig unklar ist und gezielte, therapeutische Optionen fehlen.

Die Expression von Fas und FasL ist von der physiologischen Situation abhängig und unterliegt der Kontrolle zahlreicher Regulatoren. Daher erscheint es plausibel, dass Defekte in Regulatoren des Fas-Signalwegs zu ALPS- oder einem ALPS-ähnlichen Phänotyp führen können. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine forcierte Expression von miR-146a (microRNA mit *FAS*-mRNA als Ziel) in transgenen Mäusen zu einem ALPS-ähnlichen Phänotyp führt [173].

Im Rahmen dieser Arbeit sollen folgende Aspekte untersucht werden:

- Welche neuen Keimbahn-Mutationen in Genen, die an der Regulation des Fas-Signalwegs beteiligt sind, lassen sich mit ALPS-U oder einem ALPS-ähnlichen Phänotyp assoziieren?

- Finden sich noch nicht beschriebene Mutationen in den klassischen ALPS-Genen (*FAS*, *FASLG*, *CASP10*)?

Von den Ergebnissen wird ein besseres Verständnis der an der Pathogenese beteiligten molekularen und zellulären Abläufe von ALPS erwartet. Diese Erkenntnisse könnten zur Entwicklung gezielter Therapiestrategien beitragen.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Publikation I: 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

Schafiq Nabhani\*, Andrea Hönscheid\*, Prasad T. Oommen, Bernhard Fleckenstein, Jörg Schaper, Michaela Kuhlen, Hans-Jürgen Laws, Arndt Borkhardt, and Ute Fischer

\*both authors contributed equally

Accepted for publication in "Clinical Immunology"  
"Clinical Immunology", 3,9; 80%, 1. Autor

---

Das autoimmun-lymphoproliferative Syndrom (ALPS) ist eine vererbare Erkrankung bei welcher ein genetischer Defekt des apoptotischen Zelltodes zu einer Störung der lymphozytären Homöostase führt. ALPS-Patienten zeigen chronische Vergrößerungen der Lymphknoten und der Milz, Manifestationen von Autoimmunreaktionen und eine erhöhte Anzahl von DNT-Zellen (T-Lymphozyten die den  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptor aber weder CD4 noch CD8 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren). Die meisten ALPS-Patienten (~70%) haben Mutationen in *FAS* (ALPS-FAS), dem Gen, welches den Todesrezeptor Fas kodiert. Der Fas-Signalweg spielt eine essentielle Rolle bei der Beseitigung aktiver reifer Lymphozyten und ein Defekt in diesem System kann zu lymphoproliferativen Krankheiten und Autoimmunerkrankungen führen. Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation und funktionelle Charakterisierung noch nicht beschriebener Mutationen in klassischen ALPS-Genen. Hier zeigen wir zwei neue ALPS-FASLG-Fälle und berichten erstmals über eine homozygote Mutation in der intrazellulären Domäne von FasL und deren Effekt auf die retrograde FasL-Signaltransduktion.

### 3.1.1. Ergebnisse

Basierend auf dem klinischen Phänotyp und einer Akkumulation von DNT-Zellen wurde peripheres Blut von 26 Patienten, ihren Verwandten und gesunden Individuen gesammelt. Genomische DNA wurde isoliert und alle Exonen und Exon/Intron-Grenzen von *FAS*, *FASLG* und *CASP10* mittels PCR amplifiziert (*polymerase chain reaction*) und konventionell nach Sanger sequenziert. Bei zwei geschwisterlich verwandten Patienten aus einer libyschen Familie konnte eine noch nicht beschriebene homozygote Mutation in der intrazellulären Domäne von FasL identifiziert werden.

Bei den Patienten handelt es sich um einen sieben Jahre alten Jungen (Patient 1) und seiner vier Jahre alten Schwester (Patient 2), deren Eltern konsanguin sind. Patient 1 stellte sich mit einem massiv geschwellenem Bauch, einer Lymphadenopathie und einem reduzierten Allgemeinzustand vor. Darüber hinaus zeigte der Patient eine Hepatosplenomegalie, Hypergammaglobulinämie und erhöhte Werte von Vitamin B<sub>12</sub>. Patient 2 zeigte abdominale Distensionen, geschwollene Lymphknoten und wiederkehrende Infektionen ab dem Alter von drei Monaten. Der Patient stellte sich im Alter von vier Jahren mit Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie, Hypergammaglobulinämie und einem positiven direkten Coombs-Test vor. Immunologische Untersuchungen ergaben bei beiden Patienten eine erhöhte Anzahl an CD3<sup>+</sup>TCRα/β<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-DNT-Zellen, von denen >70% B220<sup>+</sup> waren, eine reduzierte Anzahl von *Memory* B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) und ein CD25<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> zu HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-Verhältnis von <1. Zum Zeitpunkt der Untersuchung gab es bei beiden Patienten keine Anzeichen für maligne Erkrankungen. Bei Behandlung mit Sirolimus, Prednison und Omeprazol zeigten die Patienten einen stabilen klinischen Zustand. Die Mutter der beiden Patienten war als heterozygoter Träger der Mutation klinisch asymptomatisch und zeigte einen normalen Immunphänotyp. Da beide Patienten klassische ALPS-Symptome zeigten (chronische nicht-maligne, nicht-infektiöse Lymphadenopathie und Splenomegalie, erhöhte Anzahl von DNT-Zellen, Hepatomegalie, autoimmune Zytopenie (hämolytische Anämie) mit polyklonaler Hypergammaglobulinämie und erhöhte Werte von Vitamin B<sub>12</sub>), wurde ALPS diagnostiziert.

Die Insertion eines Basenpaars in Exon 1 von *FASLG* (g.172628545insT) führte zu einer Verschiebung des Leserasters und letztlich zu einem vorzeitigen Stopcodon (p.A69fsX\*138) bei beiden Patienten. Eine Mutation in der intrazellulären Domäne von FasL wurde bislang nicht beschrieben und konnte weder im Datenbestand vom *1000-Genome-Project* (<http://www.1000genomes.org/>), noch vom *International HapMap Project* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>) gefunden werden. Um den biologischen Effekt der Mutation zu prüfen, wurde die Oberflächenexpression von FasL auf aktivierten T-Lymphozyten per FACS-Analyse untersucht. Die Ergebnisse zeigten einen kompletten Verlust der FasL-Oberflächenexpression. Um zu untersuchen, ob die komplette Expression von FasL bei den Patienten ausfällt, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Es wurde ein Antikörper verwendet, welcher sowohl mFasL als auch sFasL bindet. Tatsächlich zeigte die Western Blot-Analyse bei T-Lymphozyten der Patienten nur die Anwesenheit einer trunkierten Form von FasL (~30 kDa), welche bei der Mutter schwächer exprimiert wurde und bei der gesunden Kontrolle abwesend war. *In vitro* Stimulation von aktivierten T-Lymphozyten der Patienten mit rekombinantem FasL zeigte, dass die Einleitung des apoptotischen Zelltodes via Fas-Rezeptor nicht beeinträchtigt war. Die klinischen Symptome von ALPS sind daher die Folgen der *FASLG*-Mutation.

FasL ist hauptsächlich als Zelltod-induzierendes Molekül bekannt, jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass FasL via retrograder Signaltransduktion auch an der Regulation der Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten beteiligt ist [43, 46, 47]. Daher wurde hier der Einfluss der FasL-Stimulation auf die Proliferation von suboptimal CD3/CD28-aktivierten T-Lymphozyten geprüft. Dazu wurden T-Lymphozyten der Patienten und von gesunden Kontrollen mittels Herpesvirus saimiri (HVS) immortalisiert. Zunächst wurde humanes Fas:Fc, ein chimäres Protein der extrazellulären Domäne des humanen Fas-Rezeptors und des Fc-Fragments des humanen Immunglobulins, auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Die HVS T-Lymphozyten der Patienten und der gesunden Kontrollen wurden dann in Anwesenheit von suboptimaler CD3/CD28-Stimulation mit und ohne immobilisiertem Fas:Fc für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl nach Färbung mit Trypanblau und zur Kontrolle mit einem Zellzählgerät bestimmt, eine Zellzyklus-

Analyse nach Nicoletti durchgeführt und per *Real-Time-quantitativer-PCR* der Expressionsunterschied von Proliferations- und Aktivierungs-assoziierten Genen wie *CCND1* (Cyclin-D1), *NFATc1* und *NF-κB1* überprüft. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass immobilisiertes Fas:Fc die suboptimale CD3/CD28-vermittelte Proliferation von gesunden HVS T-Lymphozyten inhibiert, während dieser Effekt bei HVS T-Lymphozyten der Patienten ausbleibt. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass der Fas:Fc-induzierten Inhibition der CD3/CD28-vermittelten Proliferation bei gesunden HVS T-Lymphozyten ein Zellzyklus-Arrest zu Grunde liegt. Es kommt zu einer Erhöhung der Population an sub-G1-Phase Zellen (apoptotisch und nekrotisch) und ein Voranschreiten der Zellen in die S-Phase bleibt aus. Bei HVS T-Lymphozyten der Patienten hingegen bleibt dieser Effekt aus. Zudem konnte via q-PCR beobachtet werden, dass die transkriptionelle Aktivität von *CCND1*, *NFATc1* und *NF-κB1* in suboptimal CD3/CD28-aktivierten T-Lymphozyten der Patienten höher ist als bei aktivierten T-Lymphozyten der gesunden Kontrolle. Diese Ergebnisse konvergieren mit den Ergebnissen von Paulsen et al. und Lückerrath et al. [46, 47]. Sie konnten zeigen, dass zwischen aktivierten B-Zellen von FasLΔIntra-Mäusen (mutierte Mäuse mit trunkiertem FasL ohne N-terminale intrazelluläre Domäne) und aktivierten B-Zellen von Wildtyp-Mäusen signifikante Expressionsunterschiede von Genen, die in der Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten involviert sind, bestehen. Unter anderem war auch die Expression von *NFATc1*, *NF-κB1* und *CCND1* in aktivierten B-Zellen ohne intrazelluläre Domäne von FasL höher als bei Wildtyp-B-Zellen [47]. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von *NFATc1*, *NF-κB1* und *CCND1* in normalen suboptimal CD3/CD28-aktivierten HVS T-Lymphozyten bei Kostimulation mit immobilisiertem Fas:Fc signifikant niedriger war als in Abwesenheit von Fas:Fc. Bei HVS T-Lymphozyten der Patienten konnten jedoch keine signifikanten Expressionsunterschiede beobachtet werden, da hier auf Grund der FasL-Defizienz eine retrograde Signaltransduktion durch FasL ausfällt.

### 3.1.2. Diskussion

Weltweit sind etwa nur 400 ALPS-Fälle beschrieben worden, wovon ca. 2/3 mit einer Mutation in *Fas* assoziiert wurden. Bislang wurden nur vier Patienten mit ALPS diagnostiziert, die eine Keimbahn-Mutation in *FASLG* tragen. Der relative Anteil der Patienten mit einer *FASLG*-Mutation (ALPS-Typ Ib/ALPS-FASLG) wird auf <5% geschätzt. Der letzte ALPS-FASLG Fall wurde 2012 von Magerus-Chatinet et al. beschrieben [97]. Bei drei der bisher beschriebenen ALPS-FASLG Fälle, ist die extrazelluläre Domäne von FasL von einer Mutation betroffen wohingegen beim vierten Fall eine Mutation in der Transmembrandomäne beschrieben wurde. In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal eine Mutation in der intrazellulären Domäne von FasL beschrieben, welche als pathogenetische Ursache von ALPS fungiert. Die Mutation umfasst eine 1-bp-Insertion in Exon 1 von *FASLG* und führt, bedingt durch die Einführung eines vorzeitigen Stopcodons, zu einem kompletten Verlust der FasL-Expression auf der Oberfläche von T-Lymphozyten. Beim konventionellen *in-vitro* Apoptose-Test können Defekte des Fas-Signalwegs, die den Fas-Liganden betreffen nicht ermittelt werden, da die T-Lymphozyten üblicherweise mit rekombinantem FasL oder anti-Fas-Antikörper stimuliert werden. Hier konnte auch gezeigt werden, dass die Fas-vermittelte Apoptose nicht beeinträchtigt ist und der Defekt daher *upstream* von Fas liegt. Die Mutter der beiden Patienten zeigte als heterozygoter Träger der *FASLG*-Mutation keine klinischen Symptome. Daher handelt es sich hierbei um einen autosomal-rezessiven Erbgang mit einer kompletten klinischen Penetranz im homozygoten Zustand. Bei den bislang beschriebenen heterozygoten *FASLG*-Mutationen war der Phänotyp variabel [94, 96], wohingegen homozygote *FASLG*-Mutationen mit frühen und schweren klinischen Manifestationen assoziiert wird [95, 97].

Bezüglich der funktionellen Wirkung der retrograden Signaltransduktion von FasL gibt es widersprüchliche Daten [43-47]. FasL im Zusammenhang mit retrograder Signaltransduktion wurde erstmals 1998 von Suzuki et al. erwähnt [43]. Sie konnten beobachten, dass immobilisiertes Fas:Fc in Kombination mit einer suboptimalen Stimulation des T-Zell-Rezeptors einen positiven Einfluss auf die Proliferation von murinen FasL-positiven aber nicht FasL-defizienten zytotoxischen T-Lymphozyten hat. Im gleichen Jahr, konnten Desbarats et al. jedoch zeigen, dass FasL-Stimulation

die aktivierungs-induzierte Proliferation von murinen CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten hemmt [44]. Die Inhibition der Proliferation ging mit einem Zellzyklus-Arrest und einer erhöhten Anzahl an toten Zellen einher. Paulsen et al. und Lückerath et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup> als auch von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in Anwesenheit von immobilisiertem Fas:Fc gehemmt wird [46, 47]. In allen Studien die bislang veröffentlicht wurden, besteht jedoch Einigkeit darüber, dass eine suboptimale Kostimulation des T-Zell-Rezeptors für die retrograde Signaltransduktion von FasL notwendig ist. Unsere Ergebnisse konvergieren mit denen anderer Studien, die auf einen inhibitorischen Effekt der retrograden Signaltransduktion von FasL hinweisen [44, 46, 47] und stehen im Kontrast zu den Studien die auf eine kostimulatorische Funktion von FasL deuten [43, 45]. Die genaue molekulare Basis der retrograden Signaltransduktion von FasL ist noch ungeklärt und auch dazu bestehen widersprüchliche Daten. Die Ergebnisse von Sun et al. zeigen, dass die prolinreiche Domäne von FasL für die Kostimulation von T-Lymphozyten ausreichend ist und die Signaltransduktion eine verstärkte Phosphorylierung von AKT (Proteinkinase B, PKB), ERK1/2 (Extracellular signal regulated kinase 1/2), JNK (c-Jun N-terminale Kinase) und FasL, die Aktivierung von NFAT und AP-1 (Activating protein-1) und eine vermehrte IFN $\gamma$ -Produktion beinhaltet [45]. Paulsen et al. hingegen berichteten, dass die Inhibition der T-Zell-Aktivierung via retrograder Signaltransduktion durch FasL mit einer reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2, LAT (Linker of activated T cells), PLC $\gamma$  (Phospholipase C1) und ZAP-70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70) assoziiert ist [46]. In Übereinstimmung damit, zeigten Lückerath et al., dass aktivierte B-Zellen von homozygoten FasL $\Delta$ Intra-Mäusen eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 aufweisen und die FasL-abhängige Inhibition der Proliferation über die Regulation der Transkription diverser Gene läuft [47]. So stellte sich heraus, dass insbesondere Gene, die mit der Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten assoziiert werden, in homozygoten FasL $\Delta$ Intra-Mäusen stärker exprimiert werden (e.g. *CCND1*, *NFATc1* und *NF- $\kappa$ B1*). Zum einen wird z.B. *CCND1* transkriptionell positiv durch den ERK1/2-Signalweg reguliert [174], zum anderen sind *CCND1*, *NFATc1* und *NF- $\kappa$ B1* bekannte Zielgene des Transkriptionsfaktor LEF-1 (Lymphoid enhancer-binding factor-1), welcher in



seiner transkriptionellen Aktivität inhibiert wird wenn er mit der intrazellulären Domäne von FasL interagiert [47, 175-177].

In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass die Expression von *CCND1*, *NFATc1* und *NF-κB1* in FasL-defizienten HVS T-Lymphozyten höher ist als in normalen HVS T-Lymphozyten. Zudem führte eine Kostimulation von normalen HVS T-Lymphozyten mit Fas:Fc zu einer niedrigeren Expression von *CCND1*, *NFATc1* und *NF-κB1* als in Abwesenheit von Fas:Fc. Bei HVS T-Lymphozyten der Patienten konnten jedoch keine signifikanten Expressionsunterschiede beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass FasL-Stimulation dem Effekt der Aktivierung und Proliferation einer suboptimalen TZR-Stimulation entgegenwirken kann und stehen auch hier im Einklang mit den Studien, die auf einen inhibitorischen Effekt der retrograden Signaltransduktion von FasL hinweisen [44, 46, 47].

Diese Arbeit beschreibt die retrograde Signaltransduktion durch FasL erstmals in Zusammenhang mit ALPS und trägt zum Verständnis der Ätiologie und Pathogenese von ALPS bei. Bislang wurde der Apoptosedefekt als alleinige Ursache für die Störung der lymphozytären Homöostase betrachtet. Es scheint aber so, dass es sich bei ALPS-FASLG-Fällen, wo die retrograde Signaltransduktion via FasL defekt ist, auch um eine „richtige“ Lymphoproliferation handelt. Alle bislang beschriebenen Patienten mit einer homozygoten *FASLG*-Mutation zeichneten sich, ähnlich wie Patienten mit einer homozygoten *FAS*-Mutation, durch schwere klinische Manifestationen aus [97, 178]. Es ist daher wahrscheinlich, dass bei diesen Patienten neben dem Apoptosedefekt ein Defekt der FasL-retrograden Signaltransduktion auch zur Lymphoproliferation beiträgt. Der genaue molekulare Mechanismus der retrograden Signaltransduktion von FasL muss in Zukunft genauer untersucht werden, zudem ist unklar, welchen Zweck dieser Signalweg erfüllt. Es ist vorstellbar, dass dadurch eine Immunantwort beendet wird und so eine überschießende Immunreaktion und Autoimmunreaktionen vermieden wird.

### 3.2. Publikation II: *Deregulation of Fas Ligand Expression as a novel cause of autoimmune lymphoproliferative syndrome like disease*

Short title: Deregulation of FasL as a cause of ALPS-like disease

**Schafiq Nabhani**, Sebastian Ginzel, Hagit Miskin, Shoshana Revel-Vilk, Dan Harlev, Bernhard Fleckenstein, Andrea Hönscheid, Prasad T. Oommen, Michaela Kuhlen, Ralf Thiele, Hans-Jürgen Laws, Arndt Borkhardt, Polina Stepensky,\* and Ute Fischer\*

\*PS and UF contributed equally to this manuscript

*In revision ("Haematologica")*

**"Haematologica", 5,8; 80%, 1. Autor**

---

Die häufigsten genetischen Ursachen des autoimmun-lymphoproliferativen Syndroms (ALPS) sind Mutationen in Genen, die im Fas-Signalweg involviert sind (*FAS*, *FASLG*, *CASP10*). Die Beeinträchtigung des Fas-Signalwegs geht primär mit einer Störung der lymphozytären Homöostase einher. Bei 20-30% aller ALPS-Patienten ist die molekulargenetische Ätiologie jedoch nicht bekannt (ALPS-U). Es ist vorstellbar, dass Defekte in Regulatoren des Fas-Signalwegs zu ALPS oder einem ALPS-ähnlichen Phänotyp führen können. Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung neuer Keimbahn-Mutationen die mit ALPS oder einem ALPS-ähnlichen Phänotyp assoziiert werden können.

#### 3.2.1. Ergebnisse

Peripheres Blut von 26 Patienten, die mit ALPS diagnostiziert wurden (basierend auf dem klinischen Phänotyp und einer Akkumulation von DNT-Zellen), ihren Verwandten und gesunden Individuen wurde im Laufe der Studie gesammelt. Mittels PCR (*polymerase chain reaction*) und konventioneller Sanger-Sequenzierung wurde nach Mutationen in Genen gesucht, die klassischerweise mit ALPS assoziiert werden. Dazu wurden alle Exonen und Exon/Intron-Übergänge von *FAS*, *FASLG* und *CASP10* sequenziert. Von den 26 Patienten wurden vier Patienten mit bisher nicht beschriebenen heterozygoten Keimbahn-Mutationen in *FAS* identifiziert, welche die

Todesdomäne (p.Q282K, p.R249G, p.NVQ265-267KQT) bzw. extrazelluläre Domäne (p.R101C) des Fas-Rezeptors betreffen. Zwei Geschwister mit einer bislang nicht beschriebenen homozygoten Mutation (p.A69fsX\*138) in *FASLG* wurden ebenfalls identifiziert. Die Insertion führte, bedingt durch eine Leseraster-Verschiebung, zu einem vorzeitigen Stopcodon und einem kompletten Verlust der FasL-Oberflächenexpression. Die heterozygoten Träger der Mutation zeigten zwar eine verminderte Expression von FasL, waren aber klinisch asymptomatisch. Es handelt sich deswegen um einen autosomal-rezessiven Erbgang. Bei den restlichen 20 Patienten, die klassische ALPS-Symptome zeigten, wurden keine Mutationen in *FAS*, *FASLG* oder *CASP10* gefunden. Von diesen Patienten und deren Verwandten wurden die Exome sequenziert. Durch die *whole-exome* Sequenzierung (WES) wurde in einer der Familien eine homozygote Mutation in *IL12RB1* (*Interleukin 12 receptor, beta 1*) gefunden. Eine KEGG-basierte (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) Protein-Protein-Interaktionsanalyse mittels einer eigens entwickelten Applikation (*Single Nucleotide Polymorphism Database*, SnuPy) auf Grundlage der Datenbankverwaltungssystem-Software MySQL, zeigte wegen einer Interaktion zwischen *IL12RB1* und FasL, die höchste Priorität für die Mutation an. Zugleich war es das einzige mutierte Gen mit einer Wechselwirkung mit Komponenten des Fas-Signalwegs. STRING 9.1 wurde dabei genutzt um Interaktionspartner des Fas-Signalwegs mit einem hohen Konfidenzwert ( $\geq 0,900$ ) zu identifizieren [179]. Die identifizierte Punktmutation auf Chromosom 19:18186625 (c.698, G>A, p.R212\*, *IL12RB1*) führt zur Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons und damit zu einer Trunkierung der IL-12-Rezeptorkomponente in der extrazellulären Domäne. Diese Mutation wurde bislang noch nicht beschrieben und konnte weder im Datenbestand vom *1000-Genome-Project* (<http://www.1000genomes.org/>), vom *International HapMap Project* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en>), im *Exome Variant Server* (*NHLBI GO Exome Sequencing Project*, Seattle, WA, USA; <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) noch in unserer eigenen Datenbank mit >300 *whole-exome*-Datensätzen von Patienten und gesunden Kontrollen gefunden werden. Die Durchführung konventioneller Sanger-Sequenzierung ergab, dass sowohl die Eltern als auch die Geschwister heterozygote Träger dieser Mutation sind. Da die Mutation zur Expression eines trunkierten Proteins mit fehlender

Transmembrandomäne führen sollte, untersuchten wir per FACS-Analyse die Expression von IL12RB1 auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten des Patienten. Die Oberflächenexpression von IL12RB1 wird erst hochreguliert, wenn T-Lymphozyten aktiviert werden, daher wurden hier gesunde T-Lymphozyten und Lymphozyten mit der *IL12RB1*-Mutation zunächst mit dem Lektin Phytohämagglutinin (PHA) und IL-2 stimuliert und aktiviert [180]. Während es bei primären T-Lymphozyten gesunder Patienten zu einer Hochregulation der Oberflächenexpression von IL12RB1 kam, blieb die Expression von IL12RB1 auf der Oberfläche von aktivierten primären T-Lymphozyten des Patienten komplett aus. Um zu bestätigen, dass die komplette Expression von IL12RB1 beim Patienten ausfällt, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Dafür wurden T-Lymphozyten des Patienten und eines gesunden Donors isoliert und mit Herpesvirus saimiri immortalisiert. Anschließend wurden die Zellen nach Expansion in Zellkultur lysiert und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Es wurde ein Antikörper verwendet, welcher gegen die C-terminale Region von IL12RB1 gerichtet ist. Tatsächlich zeigte die Western Blot-Analyse eine Abwesenheit des *full-length* IL12RB1-Proteins in den Patientenzellen.

Der männliche Patient mit der homozygoten *IL12RB1*-Mutation stammt von einer konsanguinen Familie palästinensischer Herkunft ab. 1996 wurde er im Alter von 4 Jahren wegen zervikaler Schwellung, Nachtschweiß, Juckreiz und Verdacht auf Lymphome erstmals untersucht. Nachfolgend wurde die Krankengeschichte des Patienten für die nächsten 16 Jahre protokolliert. Der Patient wurde schließlich mit ALPS diagnostiziert, da die beiden notwendigen Kriterien für eine ALPS-Diagnose (1. chronische nicht-maligne, nicht-infektiöse Lymphadenopathie und Splenomegalie und 2. eine erhöhte Anzahl an  $CD3^+TCR\alpha/\beta^+CD4^-CD8^-$  „DN“ T-Zellen) erfüllt waren. Die Anzahl doppelt-negativer T-Zellen war dauerhaft erhöht. Zusätzlich dazu zeigte der Patient sekundäre ALPS-Charakteristika wie Hepatomegalie, autoimmune Zytopenien (hämolytische Anämie) mit polyklonaler Hypergammaglobulinämie und dauerhaft erhöhte Werte von IL-10 und Vitamin B<sub>12</sub>. Im Alter von 11 Jahren kam es zu einer kurzzeitigen Salmonella-Infektion, die bislang nicht wieder auftrat. Die Befunde für eine aktive Mykoplasmen- oder virale Infektion (Epstein-Barr-Virus, Cytomegalovirus, Humanes Immundefizienz-Virus, Hepatitis-B und -C Virus) waren

negativ. Die heterozygoten Eltern und Geschwister waren klinisch asymptomatisch, trotzdem konnten wir via Immunphänotypisierung eine erhöhte Anzahl von DNT-Zellen in zwei der Familienmitglieder feststellen.

Interessanterweise wurde IL-12 (Interleukin-12) als positiver Regulator der *FAS*- und *FASLG*-Expression bereits beschrieben [181-187]. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass primäre T-Lymphozyten von gesunden Kontrollen nach anhaltender IL-12-Stimulation vermehrt FasL auf der Zelloberfläche exprimieren und den apoptotischen Zelltod einleiten. Im Gegensatz dazu, blieb bei primären T-Lymphozyten mit der homozygoten *FASLG*-Mutation p.A69fsX\*138, aber intaktem *IL12RB1*, nach IL-12-Stimulation sowohl eine Hochregulation von FasL als auch die Apoptose aus. Ein heterozygoter Elternteil zeigte eine intermediäre Antwort auf die IL-12-Stimulation. Wir konnten zeigen, dass rekombinantes FasL in der Lage ist, den apoptotischen Zelltod in primären T-Lymphozyten mit homozygoter oder heterozygoter *FASLG*-Mutation (p.A69fsX\*138) einzuleiten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die IL-12-vermittelte Apoptose FasL-abhängig ist und sowohl T-Lymphozyten mit *FASLG*-Mutationen als auch T-Lymphozyten mit einem Defekt im IL-12-Signalweg gegen einen IL-12-abhängigen physiologischen Apoptose-Auslöser resistent sind. Es ist deshalb vorstellbar, dass Defekte im IL-12-Signalweg zu einem ALPS-ähnlichen Phänotyp führen können.

Daher untersuchten wir in diesem Kontext den Effekt der homozygoten *IL12RB1*-Mutation (p.R212\*) auf den IL-12- und Fas-Signalweg. Wir konnten zunächst zeigen, dass T-Lymphozyten des Patienten in der Lage sind *in vitro*, als Antwort auf eine Stimulation mit rekombinantem FasL, den apoptotischen Zelltod einzuleiten. Dies war zu erwarten, da keine Defekte in Komponenten des Fas-Signalwegs vorhanden waren. Weiterhin konnten wir zeigen, dass beim Patienten sowohl die Expression von sFasL im Plasma als auch von FasL auf der Zelloberfläche von aktivierten und expandierten T-Lymphozyten signifikant niedriger war als bei T-Lymphozyten von gesunden Individuen.

IL-12 induziert die Aktivierung und nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors STAT4, einer zentralen Komponente *downstream* im IL-12-Signalweg. Dieser Prozess geht mit einer Phosphorylierung von STAT4 am Tyrosinrest 693 und

Serinrest 721 einher [188, 189]. Tatsächlich konnten wir per Western Blot-Analyse zeigen, dass es bei aktivierten primären T-Lymphozyten eines gesunden Donors nach anhaltender IL-12-Stimulation (bis zu 72 Stunden) zu einer Zunahme von p-STAT4 (Serin 721) kommt. Bei primären T-Lymphozyten des Patienten blieb diese Reaktion aus. Die Aktivierung und nukleäre Translokation von STAT4 führt letztlich unter anderem zur Transkription und Produktion von  $IFN\gamma$ , einem Zytokin mit pleiotroper Wirkung [190, 191]. Beispielsweise ist bekannt, dass  $IFN\gamma$  die Expression von *FASLG* positiv regulieren kann [192, 193]. Deswegen stimulierten wir IL12RB1-defiziente primäre T-Lymphozyten und normale primäre T-Lymphozyten für 24 - 48 Stunden mit IL-12 und analysierten die Expression von  $IFN\gamma$  zunächst auf transkriptioneller Ebene per Real-Time-quantitativer-PCR (q-PCR). Während bei Wildtyp-T-Lymphozyten eine rasche und starke Hochregulation (etwa 500-fach nach 24 Stunden) der *IFN\gamma*-mRNA-Expression zu beobachten war, fiel die Antwort der IL12RB1-defizienten T-Lymphozyten auf die IL-12-Stimulation komplett aus. Per ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) konnten wir die Ergebnisse auf Protein-Ebene bestätigen. Dazu wurden immortalisierte T-Lymphozyten eines gesunden Donors und des Patienten mit IL-12, IL-23 oder IL-2/IL-27 stimuliert. Die IL-23-vermittelte Hochregulation der  $IFN\gamma$ -Expression ist abhängig von IL12RB1, da der zugehörige Rezeptor aus den Untereinheiten IL12RB1 und IL23R gebildet wird [194]. Daher sollte die  $IFN\gamma$ -Sekretion in IL12RB1-defizienten Zellen sowohl auf IL-12- als auch auf IL-23-Stimulation ausfallen. Die IL-2/IL-27-vermittelte  $IFN\gamma$ -Sekretion hingegen verläuft über andere Rezeptoren und ist somit unabhängig von IL12RB1 [195-199]. Dementsprechend konnten wir zeigen, dass es bei T-Lymphozyten des Patienten nach IL-2/IL-27-Stimulation, aber nicht nach IL-12- oder IL-23-Stimulation zu einer Sekretion von  $IFN\gamma$  kommt. Ähnlich verhielt es sich mit der Expression von FasL nach IL-12 Stimulation. Während es bei normalen T-Lymphozyten nach IL-12-Stimulation sowohl zu einer Hochregulation der *FASLG*-mRNA-Expression (qPCR) als auch der FasL-Protein-Expression (FACS) kam, blieb die Hochregulation der FasL-Expression bei IL12RB1-defizienten T-Lymphozyten komplett aus. Weiterhin untersuchten wir die IL-12-induzierte Apoptose in aktivierten primären T-Lymphozyten des Patienten. Nach anhaltender IL-12-Stimulation (bis zu 6 Tage mit 50 – 200 ng/ml) wurde der Anteil spezifisch-apoptotischer Zellen nach Annexin V-

FITC- und Propidiumiodid (PI)-Färbung mittels FACS-Analyse bestimmt. Während es bei der gesunden Kontrolle bei 50 – 100 ng/mL IL-12 zur Induktion der Apoptose kam, blieb diese Reaktion bei den Zellen des Patienten aus. Bei hoher IL-12-Konzentration hingegen (200 ng/mL), konnten wir in geringem Ausmaß auch bei T-Lymphozyten des Patienten eine Apoptose-Induktion beobachten. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass IL12RB2 IL-12 mit schwacher Affinität binden kann [200-202].

### 3.2.2. Diskussion

Die häufigsten genetischen Ursachen des autoimmun-lymphoproliferativen Syndroms (ALPS) sind Mutationen in Genen, die im Fas-Signalweg involviert sind (*FAS*, *FASLG*, *CASP10*). Jedoch ist die molekulare Ätiologie bei etwa 20-30% aller Patienten, welche die Diagnosekriterien von ALPS erfüllen, noch unbekannt (ALPS-U). Es ist vorstellbar, dass Defekte in Regulatoren von Komponenten des Fas-Signalwegs zu einem ALPS-ähnlichen Phänotyp führen können und einen definierten Anteil von ALPS-U ausmachen. In dieser Arbeit beschreiben wir die Beeinträchtigung des IL-12-Signalwegs durch eine *IL12RB1*-Mutation als neue Ursache eines ALPS-ähnlichen Phänotyps, bedingt durch eine Dysregulation der *FASLG*-Expression.

Via *whole-exome* Sequenzierung wurde ein Patient, der keine Mutationen in den klassischen ALPS-Genen hatte, mit einer homozygoten *IL12RB1*-Mutation identifiziert. Diese Mutation führte zu einem vorzeitigen Stop der Protein-Translation infolge eines neu entstandenen Stopcodons und letztlich zum kompletten Verlust der Expression der IL-12/IL-23-Rezeptorkomponente IL12RB1. Der Patient zeigte klassische ALPS-Symptome. Die beiden notwendigen Kriterien für eine ALPS-Diagnose waren erfüllt (1. chronische nicht-maligne, nicht-infektiöse Lymphadenopathie und Splenomegalie und 2. eine erhöhte Anzahl von DNT-Zellen), zudem zeigte der Patient sekundäre Charakteristika wie Hepatomegalie, autoimmune Zytopenien (hämolytische Anämie) mit polyklonaler Hypergammaglobulinämie und dauerhaft erhöhte Werte von IL-10 und Vitamin B<sub>12</sub>.



*IL12RB1*-Mutationen werden auch mit der „Mendelschen Anfälligkeit für Erkrankungen durch Mykobakterien“ (*Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases*, MSMD) assoziiert, bei welcher die Anfälligkeit gegenüber rezidivierenden mykobakteriellen Infektionen erhöht ist [203, 204]. Patienten mit *IL12RB1*-Defizienz sind anfälliger gegenüber *Salmonella*-Infektionen (~43% der Fälle) als Patienten mit anderen MSMD-assoziierten Genmutationen (*STAT1*, *IFNGR1*, *IFNGR2*, *IL12B*) [205]. Im hier untersuchten Fall kam es jedoch nur zu einer einmaligen *Salmonella*-Infektion während einer 16 Jahre langen Beobachtung des Patienten. Daher waren Autoimmunreaktionen und Lymphoproliferation bei diesem Patienten keine sekundären Effekte einer mykobakteriellen Infektion. Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass *IL12RB2*-Knockout-Mäuse, bei welchen der IL-12-Signalweg defekt ist, Lymphoproliferation, Autoimmunreaktionen und B-Zell-Lymphome entwickeln [206]. Dieser Phänotyp wurde nicht durch mykobakterielle Infektionen hervorgerufen, da die Mäuse unter pathogenfreien Bedingungen gehalten wurden. Außerdem sind Infektionen keine ungewöhnliche Befunde in ALPS-Patienten, insbesondere nach einer Splenektomie. Weiterhin berichteten Del Rey et al. von einem ALPS-FASLG-Patienten mit mykobakterieller Infektion [95]. Interessanterweise konnten Guerra et al. zeigen, dass die IL-12-vermittelte Hochregulation der FasL- und CD40L-Expression bei der Kontrolle des Wachstums von *Mycobacterium tuberculosis* durch aktivierte NK-Zellen involviert ist [207]. Daher kann sowohl eine FasL- als auch eine IL-12-Defizienz zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber mykobakterieller Infektionen führen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *IL12RB1*-Mutationen zu einer Störung des IL-12/JAK/STAT- und IL-23-Signalwegs und einem Verlust der IFN $\gamma$ -Expression in T- und NK-Zellen führen [208]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit auch beim Patienten gezeigt werden. Zudem wurde eine niedrige IL-17-Expression beschrieben [208]. Ein ähnlicher Phänotyp wurde für *IL12RB1*-Knockout Mäuse beschrieben [209]. Die klinische Penetranz von *IL12RB1*-Mutationen variiert beim Menschen. Heterozygote Träger erscheinen klinisch asymptomatisch, mit intaktem IL-12/IL-23-Signalweg und IFN $\gamma$ -Produktion [210]. Jedoch zeigten in dieser Arbeit zwei Individuen der untersuchten Familie mit heterozygoter *IL12RB1*-Mutation eine erhöhte Anzahl von DNT-Zellen; ein Indiz dafür, dass heterozygote *IL12RB1*-

Mutationen einen Einfluss auf ALPS-Charakteristika haben. Außerdem konnten wir eine erhöhte Anzahl an doppelt-negativen T-Zellen (14% aus CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten) bei einem Patienten mit einer kompletten Interferon alpha Rezeptor 2 (IFNAR2) - Defizienz beobachten. Hierbei konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Anzahl von DNT-Zellen die Folge einer rezidivierenden Infektion ist (Daten hier nicht gezeigt). Kürzlich konnten Rensing-Ehl et al. zeigen, dass DNT-Zellen von ALPS-Patienten den Transkriptionsfaktor T-bet nicht exprimieren [211]. Interessanterweise ist es bekannt, dass IL-12 die Expression von T-bet hochregulieren kann [212, 213].

Es gibt starke Hinweise darauf, dass IL-12 einen Einfluss auf die Regulation der Fas- und FasL-Expression hat. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung von T- und NK-Zellen via IL-12 zu einer Hochregulation der FasL-Expression führt [181, 183, 184, 214-217]. Yu et al. konnten zeigen, dass von dendritischen Zellen produziertes IL-12 an der Hochregulation der FasL-Expression und der Erhöhung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen beteiligt ist [181]. In der Abwesenheit von Antigen-Stimulation, führt IL-12 zur Hochregulation der FasL-Expression und induziert den apoptotischen Zelltod in T-Lymphozyten. Der IL-12-vermittelte apoptotische Zelltod in T-Lymphozyten konnte durch Zugabe eines Anti-FasL-Antikörpers blockiert werden [183]. Dementsprechend konnten wir auch zeigen, dass IL-12-vermittelte Apoptose FasL-abhängig ist. FasL-defiziente primäre T-Lymphozyten waren resistent gegenüber IL-12-induzierter Apoptose. Bei *in-vivo* Modellen konnte gezeigt werden, dass IL-12 den apoptotischen Zelltod von CD8<sup>+</sup> tumorresidenten T-Lymphozyten via FasL induzieren kann und dass dieser Prozess IFN $\gamma$ -abhängig ist [217]. IL-12 ist auch an der Regulation der FAS-Expression beteiligt. Zhou et al. konnten zeigen, dass IL-12 spezifisch die FAS-Promotoraktivität in Mammakarzinomzellen, Osteosarkomzellen und Ewing-Sarkom-Zellen erhöht und die FAS-Expression induziert. Zudem konnten Zhou et al. demonstrieren, dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B nach IL-12-Stimulation aktiviert wird und das  $\kappa$ B-Sp1-Element (-195 bis -286) des FAS-Promotors für die IL-12-vermittelte Aktivierung des FAS-Promotors notwendig ist [186]. Lafleur et al. konnten auch zeigen, dass IL-12 und ein IL-12-Gentransfer die FAS-Expression in Osteosarkoma- und Mammakarzinomzellen hochreguliert [182].

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass ein Verlust der *IL12RB1*-Expression in einem Patienten zu einer reduzierten Hochregulation der FasL-Expression und Induktion des apoptotischen Zelltodes in T-Lymphozyten nach anhaltender IL-12 Stimulation führt. Weiterhin war die generelle FasL-Expression auf der Zelloberfläche von aktivierten T-Lymphozyten und der FasL-Spiegel im Plasma beim Patienten niedriger als bei gesunden Kontrollen. Dies dürfte auf die fehlende  $IFN\gamma$ -Expression nach IL-12-Stimulation zurückgeführt werden, da die Promotoraktivität und Expression von *FASLG* unter anderem von den Interferon-regulatorischen Faktoren IRF-1 und IRF-2 positiv reguliert wird [218]. IL-12 ist als proinflammatorisches Zytokin bekannt, welches einen Einfluss auf das Wachstum und die Funktion von T- und NK-Zellen hat. Beispielsweise ist IL-12 für eine Th1-Differenzierung von T-Lymphozyten verantwortlich [219]. Es ist auch bekannt, dass eine anhaltende IL-12-Stimulation von T-Lymphozyten während der Aktivierung zu einer Hochregulation der FasL-Expression und Runterregulation von c-FLIP (*Cellular FLICE inhibitory protein*), einem anti-apoptotischen Faktor welcher den Fas-, DR4-, DR5- und TNFR1-vermittelten apoptotischen Zelltod inhibiert, führen kann. Letztlich führt die IL-12-Stimulation zum Aktivierungs-induzierten Zelltod über den Fas-Signalweg [187]. Aus diesem Grunde kann eine IL-12-Defizienz, ähnlich wie ein Defekt im Fas-Signalweg, zu einer Beeinträchtigung des apoptotischen Zelltodes und folglich zu einer Akkumulation von autoreaktiven T-Lymphozyten führen.

Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse *IL12RB1* und den IL-12-Signalweg als neue Faktoren für die Pathogenese einer ALPS-ähnlichen Erkrankung. Es wäre sicherlich interessant, eine umfassende Studie zu Patienten mit *IL12RB1*-Mutationen (oder IL-12-Defizienz) und *IL12RB1*-Knockout-Mäusen bezüglich ALPS-ähnlichen Charakteristika durchzuführen. Bisher beruht das *Screening* nach ALPS-Patienten auf dem klinischen Phänotyp, der Sequenzierung der klassischen ALPS-assoziierten Gene und gelegentlich auf Apoptose-Tests. Unsere Daten zeigen, dass es informativ sein kann, die FasL-Oberflächenexpression via FACS auf aktivierten T-Lymphozyten und den sFasL-Spiegel im Plasma per ELISA (wie 2009 beim „NIH International Workshop“ vorgeschlagen) zu bestimmen, um ALPS oder ALPS-ähnliche Erkrankungen mit einer FasL-Defizienz oder einem Defekt in der Regulation der

FasL-Expression als molekulare Ätiologie zu identifizieren.

## 4. Zusammenfassung

Das autoimmun-lymphoproliferative Syndrom (ALPS) ist eine Erkrankung die typischerweise im Kindesalter auftritt und durch eine Störung der lymphozytären Homöostase charakterisiert ist. Der klinische Phänotyp ist durch lymphoproliferative Krankheitsbilder wie Lymphadenopathie und Hepatomegalie, Autoimmunreaktionen, Hypergammaglobulinämie und eine erhöhte Anzahl von doppelt-negativen T-Zellen geprägt. Zudem besteht im Erwachsenenalter ein erhöhtes Risiko für maligne Lymphome. Alle bislang aufgeklärten molekulargenetischen Ursachen umfassen Mutationen in Genen von Komponenten des Fas-Signalwegs (*FAS*, *FASLG*, *CASP10*), jedoch ist die molekulargenetische Ätiologie bei 20-30% der ALPS-Patienten noch ungeklärt. Die Expression von Fas und FasL ist von der physiologischen Situation abhängig und unterliegt der Kontrolle zahlreicher Regulatoren. Es ist daher vorstellbar, dass Defekte in Regulatoren von Komponenten des Fas-Signalwegs zu ALPS oder einem ALPS-ähnlichen Phänotyp führen können.

Wir identifizierten zwei neue ALPS-FASLG-Fälle und beschreiben erstmals eine homozygote Mutation in der intrazellulären Domäne von FasL. Der sieben Jahre alte Junge und seine vier Jahre alte Schwester stellten sich beide mit massiver Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie, Hypergammaglobulinämie, einer erhöhten Anzahl von doppelt-negativen T-Zellen und erhöhten Vitamin B<sub>12</sub> Werten vor. Wir führten eine konventionelle Sanger-Sequenzierung der klassischen ALPS-Gene durch und konnten bei beiden Patienten eine bislang nicht beschriebene 1 bp-Insertion in der intrazellulären Domäne von FasL identifizieren. Diese führte zu einer kompletten Defizienz der FasL-Oberflächenexpression auf T-Lymphozyten. *In vitro* Stimulation von aktivierten T-Lymphozyten mit rekombinantem FasL zeigte, dass der Fas-Signalweg intakt ist. Die Mutter der beiden Patienten war klinisch asymptomatisch, daher handelt es sich hier um einen autosomal rezessiven Erbgang. FasL induziert nicht nur die Apoptose in Fas-Rezeptor-positiven Zellen, sondern kann über die eigene intrazelluläre Domäne via retrograder Signaltransduktion auch die Proliferation von aktivierten T-Lymphozyten inhibieren. Wir konnten zeigen, dass die CD3/CD28-vermittelte Proliferation von FasL-

defizienten T-Lymphozyten der Patienten im Gegensatz zu FasL-positiven T-Lymphozyten bei FasL-Stimulation nicht inhibiert wird und kein Zellzyklus-Arrest stattfindet. Weiterhin zeigen wir, dass die Expression von Proliferations- und Aktivierungs-assoziierten Genen wie *CCND1* (Cyclin-D1), *NFATc1* und *NF-κB1* bei aktivierten FasL-defizienten T-Lymphozyten der Patienten höher ist als bei aktivierten T-Lymphozyten der gesunden Kontrollen. Zudem zeigen wir, dass die Expression von *NFATc1*, *NF-κB1* und *CCND1* in normalen suboptimal CD3/CD28-aktivierten HVS T-Lymphozyten bei Kostimulation von FasL signifikant niedriger ist als ohne FasL-Stimulation. Bei HVS T-Lymphozyten der Patienten konnten jedoch keine signifikanten Expressionsunterschiede beobachtet werden, da hier auf Grund der FasL-Defizienz eine retrograde Signaltransduktion durch FasL ausfällt. Diese Arbeit beschreibt die retrograde Signaltransduktion durch FasL erstmals in Zusammenhang mit ALPS und trägt zum Verständnis der Ätiologie und Pathogenese von ALPS bei. Es scheint so, dass es sich bei ALPS-FASLG-Fällen, wo die retrograde Signaltransduktion via FasL defekt ist, auch um eine „richtige“ Lymphoproliferation handelt und die Störung der FasL-retrograden Signaltransduktion neben dem Apoptosedefekt zur Akkumulation autoreaktiver Lymphozyten beiträgt.

Weiterhin beschreiben wir in dieser Arbeit die Beeinträchtigung des IL-12-Signalwegs durch eine *IL12RB1*-Mutation als neue Ursache eines ALPS-ähnlichen Phänotyps, bedingt durch eine Dysregulation der FasL-Expression. Via *whole-exome* Sequenzierung wurde ein Patient, der keine Mutationen in den klassischen ALPS-Genen hatte, mit einer homozygoten *IL12RB1*-Mutation (R212\*) identifiziert. Diese Mutation führte zu einem vorzeitigen Stop der Protein-Translation infolge eines neu entstandenen Stopcodons und letztlich zum kompletten Verlust der Expression der IL-12/IL-23-Rezeptorkomponente IL12RB1. Wir konnten zeigen, dass IL-12 via Hochregulation der FasL-Expression den apoptotischen Zelltod in gesunden T-Lymphozyten induziert, während FasL-defiziente T-Lymphozyten von ALPS-FASLG-Patienten resistent gegenüber IL-12-vermittelter Apoptose sind. Wir stellten daher die Hypothese auf, dass Defekte im IL-12-Signalweg zu einem ähnlichen Phänotyp führen können wie *FASLG*-Mutationen. Tatsächlich zeigte der Patient mit der homozygoten *IL12RB1*-Mutation klassische ALPS-Symptome (chronische nicht-maligne, nicht-infektiöse Lymphadenopathie und Splenomegalie, erhöhte Anzahl von

DNT-Zellen, Hepatomegalie, autoimmune Zytopenien mit polyklonaler Hypergammaglobulinämie und dauerhaft erhöhte Werte von IL-10 und Vitamin B<sub>12</sub>). Heterozygote Träger der *IL12RB1*-Mutation waren nur subklinisch betroffen, e.g. eine moderate Erhöhung der Anzahl von DNT-Zellen. Die Beeinträchtigung des IL-12- und IL-23-Signalwegs konnte anhand defizienter STAT4-Phosphorylierung und IFN $\gamma$ -Produktion demonstriert werden. Wie bei FasL-defizienten T-Lymphozyten, war die Hochregulation der FasL-Expression und die Einleitung des apoptotischen Zelltodes nach IL-12 Stimulation in T-Lymphozyten mit der *IL12RB1*-Mutation defizient. Die Ergebnisse zeigen, dass Defekte in positive Regulatoren der FasL-Expression, wie IL-12, zu einem ALPS-ähnlichen Phänotyp führen können.



## 5. Summary

The autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) is a disorder that typically occurs in childhood and is characterized by abnormal lymphocyte homeostasis. The clinical phenotype includes lymphoproliferative disease patterns such as lymphadenopathy and hepatomegaly, autoimmunity, hypergammaglobulinemia, and an increased number of double-negative T cells. Furthermore, in adulthood there is an increased risk for the development of malignant lymphomas. To date, all known genetic defects include mutations in genes involved in the Fas signaling pathway (*FAS*, *FASLG*, *CASP10*). However for 20-30% of all patients who meet the ALPS diagnostic criteria, the genetic cause is still undetermined. The expression of Fas and FasL is dependent on the physiological situation and underlie the control of many regulators. Therefore it is plausible that defects in regulators of components of the Fas signaling pathway can lead to ALPS or an ALPS-like phenotype.

Here we report on two novel ALPS-FASLG cases and describe for the first time a homozygous mutation in the intracellular domain of FasL. The seven-year-old boy and his four-year-old sister presented both with massive lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, hypergammaglobulinemia, increased levels of double negative T cells and vitamin B<sub>12</sub>. We performed conventional Sanger sequencing of *FAS* and *FASLG* and identified a novel homozygous 1 bp insertion in the intracellular domain of the *FASLG* gene in both patients, which results in the absence of FasL protein expression on the surface of T cells. *In vitro* stimulation of activated patients' lymphocytes with recombinant FasL showed normal apoptosis, verifying an intact Fas pathway. The mother of the two patients was clinically asymptomatic, pointing to an autosomal recessive inheritance pattern. FasL does not only induce apoptosis in the Fas-bearing cell, but can also transmit signals into the FasL-expressing cell via its intracellular domain and inhibit the proliferation of activated T lymphocytes. We could show that CD3/CD28-mediated proliferation of FasL-deficient T lymphocytes from the patients, as opposed to FasL-positive T lymphocytes, are not inhibited by FasL stimulation and no cell cycle arrest takes place. Furthermore, we demonstrate that the expression of genes implicated in lymphocyte proliferation and activation such as

*CCND1*, *NFATc1* and *NF-κB1* is higher than in activated T cells of healthy controls. In addition, we show that the expression of *CCND1*, *NFATc1* and *NF-κB1* in normal suboptimally CD3/CD28-activated HVS T cells is significantly lower in costimulation of FasL than without. In contrast patients' HVS T cells show no significant expression differences, due to lack of reverse signaling in FasL deficient T cells. Here we describe FasL reverse signaling for the first time in connection with ALPS and contribute to the understanding of the etiology and pathogenesis of ALPS. It is plausible that in ALPS-FASLG cases, in addition to defective apoptosis, impaired FasL reverse signaling contributes to lymphoproliferation

In this work, we further describe the impairment of the IL-12 signaling pathway as a possible cause of an ALPS-like phenotype, caused by a dysregulation of *FASLG* expression. Via whole-exome sequencing we identified one patient who harbored no mutations in the classical ALPS genes with a homozygous *IL12RB1* mutation (R212\*). This mutation led to a premature stop of protein translation due to a newly created stop codon and ultimately to complete loss of full length IL12RB1-protein expression. We could show that IL-12 induces apoptotic cell death via upregulation of FasL expression in normal T cells, while FasL-deficient T cells from ALPS-patients are resistant to IL-12-mediated apoptosis. We therefore hypothesized that defects in the IL-12 signaling pathway lead to a similar phenotype as *FASLG* mutations. Indeed, the patient with the *IL12RB1* mutation was presented with classical ALPS symptoms such as chronic non-malignant, non-infectious lymphadenopathy and splenomegaly, increased numbers of DNT cells, hepatomegaly, autoimmune cytopenias, polyclonal hypergammaglobulinemia and permanently elevated levels of IL-10 and vitamin B<sub>12</sub>. Heterozygous mutation carriers were sub-clinically affected (e.g. DNT cells moderately elevated). Impairment of IL-12 and IL-23 signaling could be demonstrated by deficient STAT4 phosphorylation and lack of IFN $\gamma$  production. As with FasL deficient T cells, the upregulation of FasL expression and the induction of apoptotic cell death after IL-12 stimulation was deficient in T cells carrying the *IL12RB1* mutation. Our data suggest that defects in positive regulators of FasL expression such as IL-12, can lead to an ALPS-like phenotype.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Formigli L, Conti A, Lippi D: **"Falling leaves": a survey of the history of apoptosis.** *Minerva medica* 2004, **95**(2):159-164.
2. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *British journal of cancer* 1972, **26**(4):239-257.
3. Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO: **Advances in apoptosis research.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(24):12736-12737.
4. Sulston JE, Horvitz HR: **Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*.** *Developmental biology* 1977, **56**(1):110-156.
5. Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN: **The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*.** *Developmental biology* 1983, **100**(1):64-119.
6. Ellis HM, Horvitz HR: **Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*.** *Cell* 1986, **44**(6):817-829.
7. Hedgecock EM, Sulston JE, Thomson JN: **Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*.** *Science* 1983, **220**(4603):1277-1279.
8. Desai C, Garriga G, McIntire SL, Horvitz HR: **A genetic pathway for the development of the *Caenorhabditis elegans* HSN motor neurons.** *Nature* 1988, **336**(6200):638-646.
9. Arvanitis M, Li DD, Lee K, Mylonakis E: **Apoptosis in *C. elegans*: lessons for cancer and immunity.** *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2013, **3**:67.
10. Majno G, Joris I: **Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.** *The American journal of pathology* 1995, **146**(1):3-15.
11. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P: **Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis.** *Methods* 2008, **44**(3):205-221.
12. Ashkenazi A, Dixit VM: **Death receptors: signaling and modulation.** *Science* 1998, **281**(5381):1305-1308.
13. Fulda S, Debatin KM: **Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy.** *Oncogene* 2006, **25**(34):4798-4811.
14. Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S: **Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses.** *Molecular cell* 2004, **14**(3):277-287.
15. Yoshida H, Kawane K, Koike M, Mori Y, Uchiyama Y, Nagata S: **Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells.** *Nature* 2005, **437**(7059):754-758.
16. Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S: **Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008, **22**(8):2629-2638.
17. Van Cruchten S, Van Den Broeck W: **Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis.** *Anatomia, histologia, embryologia* 2002, **31**(4):214-223.
18. Oberhammer FA, Hochegger K, Froschl G, Tiefenbacher R, Pavelka M: **Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase.** *The Journal of cell biology* 1994, **126**(4):827-837.
19. Zhang JH, Xu M: **DNA fragmentation in apoptosis.** *Cell research* 2000, **10**(3):205-211.
20. Fehsel K, Kolb-Bachofen V, Kroncke KD: **Necrosis is the predominant type of islet cell death during development of insulin-dependent diabetes mellitus in BB rats.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2003, **83**(4):549-559.
21. Rathmell JC, Thompson CB: **Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease.** *Cell* 2002, **109** Suppl:S97-107.
22. Henson PM, Hume DA: **Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis.** *Trends in immunology* 2006, **27**(5):244-250.

23. Elmore S: **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicologic pathology* 2007, **35**(4):495-516.
24. Zou H, Niswander L: **Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation.** *Science* 1996, **272**(5262):738-741.
25. Xu G, Shi Y: **Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis.** *Cell research* 2007, **17**(9):759-771.
26. MacFarlane M, Williams AC: **Apoptosis and disease: a life or death decision.** *EMBO reports* 2004, **5**(7):674-678.
27. Klionsky DJ: **Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2007, **8**(11):931-937.
28. Levine B, Klionsky DJ: **Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy.** *Developmental cell* 2004, **6**(4):463-477.
29. Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, Tasmemir E, Maiuri MC, Kroemer G: **To die or not to die: that is the autophagic question.** *Current molecular medicine* 2008, **8**(2):78-91.
30. Andera L: **Signaling activated by the death receptors of the TNFR family.** *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 2009, **153**(3):173-180.
31. Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H: **The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation.** *Annual review of immunology* 2007, **25**:561-586.
32. Fesik SW: **Insights into programmed cell death through structural biology.** *Cell* 2000, **103**(2):273-282.
33. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH: **Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.** *Science* 1989, **245**(4915):301-305.
34. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M: **A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.** *The Journal of experimental medicine* 1989, **169**(5):1747-1756.
35. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S: **The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis.** *Cell* 1991, **66**(2):233-243.
36. Behrmann I, Walczak H, Krammer PH: **Structure of the human APO-1 gene.** *European journal of immunology* 1994, **24**(12):3057-3062.
37. Singh R, Pradhan V, Patwardhan M, Ghosh K: **APO-1/Fas gene: Structural and functional characteristics in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases.** *Indian journal of human genetics* 2009, **15**(3):98-102.
38. Hsu AP, Dowdell KC, Davis J, Niemela JE, Anderson SM, Shaw PA, Rao VK, Puck JM: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome due to FAS mutations outside the signal-transducing death domain: molecular mechanisms and clinical penetrance.** *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2012, **14**(1):81-89.
39. Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW: **NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain.** *Nature* 1996, **384**(6610):638-641.
40. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: **Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family.** *Cell* 1993, **75**(6):1169-1178.
41. Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S: **Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity.** *International immunology* 1994, **6**(10):1567-1574.
42. Watts AD, Hunt NH, Wanigasekara Y, Bloomfield G, Wallach D, Roufogalis BD, Chaudhri G: **A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis**

- factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'**. *The EMBO journal* 1999, **18**(8):2119-2126.
43. Suzuki I, Fink PJ: **Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand**. *The Journal of experimental medicine* 1998, **187**(1):123-128.
  44. Desbarats J, Duke RC, Newell MK: **Newly discovered role for Fas ligand in the cell-cycle arrest of CD4+ T cells**. *Nature medicine* 1998, **4**(12):1377-1382.
  45. Sun M, Lee S, Karray S, Levi-Strauss M, Ames KT, Fink PJ: **Cutting edge: two distinct motifs within the Fas ligand tail regulate Fas ligand-mediated costimulation**. *Journal of immunology* 2007, **179**(9):5639-5643.
  46. Paulsen M, Mathew B, Qian J, Lettau M, Kabelitz D, Janssen O: **FasL cross-linking inhibits activation of human peripheral T cells**. *International immunology* 2009, **21**(5):587-598.
  47. Luckerath K, Kirkin V, Melzer IM, Thalheimer FB, Siele D, Milani W, Adler T, Aguilar-Pimentel A, Horsch M, Michel G *et al*: **Immune modulation by Fas ligand reverse signaling: lymphocyte proliferation is attenuated by the intracellular Fas ligand domain**. *Blood* 2011, **117**(2):519-529.
  48. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD: **Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule**. *Science* 1994, **263**(5154):1759-1762.
  49. Suda T, Tanaka M, Miwa K, Nagata S: **Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand**. *Journal of immunology* 1996, **157**(9):3918-3924.
  50. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S: **Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing**. *The Journal of experimental medicine* 1997, **186**(12):2045-2050.
  51. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J: **Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity**. *The Journal of experimental medicine* 1998, **187**(8):1205-1213.
  52. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J: **The molecular architecture of the TNF superfamily**. *Trends in biochemical sciences* 2002, **27**(1):19-26.
  53. Janssen O, Qian J, Linkermann A, Kabelitz D: **CD95 ligand--death factor and costimulatory molecule?** *Cell death and differentiation* 2003, **10**(11):1215-1225.
  54. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC: **A role for CD95 ligand in preventing graft rejection**. *Nature* 1995, **377**(6550):630-632.
  55. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA: **Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege**. *Science* 1995, **270**(5239):1189-1192.
  56. Saas P, Walker PR, Hahne M, Quiquerez AL, Schnuriger V, Perrin G, French L, Van Meir EG, de Tribolet N, Tschopp J *et al*: **Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain?** *The Journal of clinical investigation* 1997, **99**(6):1173-1178.
  57. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS: **Apoptosis and programmed cell death in immunity**. *Annual review of immunology* 1992, **10**:267-293.
  58. Green DR, Scott DW: **Activation-induced apoptosis in lymphocytes**. *Current opinion in immunology* 1994, **6**(3):476-487.
  59. June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB: **The B7 and CD28 receptor families**. *Immunology today* 1994, **15**(7):321-331.
  60. Van Parijs L, Ibraghimov A, Abbas AK: **The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance**. *Immunity* 1996, **4**(3):321-328.
  61. Ucker DS: **Cytotoxic T lymphocytes and glucocorticoids activate an endogenous suicide process in target cells**. *Nature* 1987, **327**(6117):62-64.



62. Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F, Lynch DH: **Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes.** *The Journal of experimental medicine* 1995, **181**(1):71-77.
63. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF *et al*: **Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas.** *Nature* 1995, **373**(6513):441-444.
64. Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A: **Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation.** *Nature* 1995, **373**(6513):444-448.
65. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM: **Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells.** *Nature medicine* 1996, **2**(5):574-577.
66. Fulda S, Scaffidi C, Pietsch T, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM: **Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells.** *Cell death and differentiation* 1998, **5**(10):884-893.
67. Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR: **DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1.** *Molecular cell* 1998, **1**(4):543-551.
68. Reap EA, Roof K, Maynor K, Borrero M, Booker J, Cohen PL: **Radiation and stress-induced apoptosis: a role for Fas/Fas ligand interactions.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(11):5750-5755.
69. Pinkoski MJ, Green DR: **Fas ligand, death gene.** *Cell death and differentiation* 1999, **6**(12):1174-1181.
70. Kavurma MM, Khachigian LM: **Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression.** *Cell death and differentiation* 2003, **10**(1):36-44.
71. Medvedev AE, Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, Egeberg K, Lynch DH, Sundan A, Espevik T: **Regulation of Fas and Fas-ligand expression in NK cells by cytokines and the involvement of Fas-ligand in NK/LAK cell-mediated cytotoxicity.** *Cytokine* 1997, **9**(6):394-404.
72. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Fischer A: **Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways.** *Cell death and differentiation* 2003, **10**(1):124-133.
73. Waring P, Mullbacher A: **Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology.** *Immunology and cell biology* 1999, **77**(4):312-317.
74. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ: **A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling.** *Science* 2000, **288**(5475):2351-2354.
75. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ: **Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations.** *Science* 2000, **288**(5475):2354-2357.
76. Walczak H, Sprick MR: **Biochemistry and function of the DISC.** *Trends in biochemical sciences* 2001, **26**(7):452-453.
77. Peter ME, Krammer PH: **The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond.** *Cell death and differentiation* 2003, **10**(1):26-35.
78. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K: **Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates.** *Cell death and differentiation* 2003, **10**(1):76-100.
79. Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR: **Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation.** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(43):30651-30656.
80. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J: **Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.** *Cell* 1998, **94**(4):491-501.

81. Shamas-Din A, Bindner S, Zhu W, Zaltsman Y, Campbell C, Gross A, Leber B, Andrews DW, Fradin C: **tBid undergoes multiple conformational changes at the membrane required for Bax activation.** *The Journal of biological chemistry* 2013, **288**(30):22111-22127.
82. Yuan S, Akey CW: **Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation.** *Structure* 2013, **21**(4):501-515.
83. Teachey DT, Seif AE, Grupp SA: **Advances in the management and understanding of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS).** *British journal of haematology* 2010, **148**(2):205-216.
84. Rao VK, Oliveira JB: **How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *Blood* 2011, **118**(22):5741-5751.
85. Teachey DT: **New advances in the diagnosis and treatment of autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *Current opinion in pediatrics* 2012, **24**(1):1-8.
86. Canale VC, Smith CH: **Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma.** *The Journal of pediatrics* 1967, **70**(6):891-899.
87. Sneller MC, Straus SE, Jaffe ES, Jaffe JS, Fleisher TA, Stetler-Stevenson M, Strober W: **A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine lpr/gld disease.** *The Journal of clinical investigation* 1992, **90**(2):334-341.
88. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM: **Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *Cell* 1995, **81**(6):935-946.
89. 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.** *The New England journal of medicine* 1996, **335**(22):1643-1649.
90. Sneller MC, Wang J, Dale JK, Strober W, Middleton LA, Choi Y, Fleisher TA, Lim MS, Jaffe ES, Puck JM *et al*: **Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis.** *Blood* 1997, **89**(4):1341-1348.
91. van der Burg M, de Groot R, Comans-Bitter WM, den Hollander JC, Hooijkaas H, Neijens HJ, Berger RM, Oranje AP, Langerak AW, van Dongen JJ: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in a child from consanguineous parents: a dominant or recessive disease?** *Pediatric research* 2000, **47**(3):336-343.
92. Dowdell KC, Niemela JE, Price S, Davis J, Hornung RL, Oliveira JB, Puck JM, Jaffe ES, Pittaluga S, Cohen JI *et al*: **Somatic FAS mutations are common in patients with genetically undefined autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *Blood* 2010, **115**(25):5164-5169.
93. Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, Rieux-Laucat F, Siegel RM, Su HC, Teachey DT *et al*: **Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop.** *Blood* 2010, **116**(14):e35-40.
94. 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.** *The Journal of clinical investigation* 1996, **98**(5):1107-1113.
95. Del-Rey M, Ruiz-Contreras J, Bosque A, Calleja S, Gomez-Rial J, Roldan E, Morales P, Serrano A, Anel A, Paz-Artal E *et al*: **A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *Blood* 2006, **108**(4):1306-1312.
96. Bi LL, Pan G, Atkinson TP, Zheng L, Dale JK, Makris C, Reddy V, McDonald JM, Siegel RM, Puck JM *et al*: **Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib.** *BMC medical genetics* 2007, **8**:41.
97. Magerus-Chatinet A, Stolzenberg MC, Lanzarotti N, Neven B, Daussy C, Picard C, Neveux N, Desai M, Rao M, Ghosh K *et al*: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a**



- homozygous null FAS ligand (FASLG) mutation.** *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013, **131**(2):486-490.
98. Bleesing JJ: **Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome, online NCBI Bookshelf.**
99. Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ: **Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II.** *Cell* 1999, **98**(1):47-58.
100. Zhu S, Hsu AP, Vacek MM, Zheng L, Schaffer AA, Dale JK, Davis J, Fischer RE, Straus SE, Boruchov D *et al*: **Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *Human genetics* 2006, **119**(3):284-294.
101. Nanan R, Strobel P, Haas JP, Marx A, Kreth HW: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with severe humoral immunodeficiency and monoclonal gammopathy.** *Annals of hematology* 2002, **81**(6):332-335.
102. Infante AJ, Britton HA, DeNapoli T, Middleton LA, Lenardo MJ, Jackson CE, Wang J, Fleisher T, Straus SE, Puck JM: **The clinical spectrum in a large kindred with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a Fas mutation that impairs lymphocyte apoptosis.** *The Journal of pediatrics* 1998, **133**(5):629-633.
103. Wang L, Yang JK, Kabaleeswaran V, Rice AJ, Cruz AC, Park AY, Yin Q, Damko E, Jang SB, Raunser S *et al*: **The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations.** *Nature structural & molecular biology* 2010, **17**(11):1324-1329.
104. Kuehn HS, Caminha I, Niemela JE, Rao VK, Davis J, Fleisher TA, Oliveira JB: **FAS haploinsufficiency is a common disease mechanism in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *Journal of immunology* 2011, **186**(10):6035-6043.
105. Jackson CE, Fischer RE, Hsu AP, Anderson SM, Choi Y, Wang J, Dale JK, Fleisher TA, Middleton LA, Sneller MC *et al*: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance.** *American journal of human genetics* 1999, **64**(4):1002-1014.
106. Martin DA, Zheng L, Siegel RM, Huang B, Fisher GH, Wang J, Jackson CE, Puck JM, Dale J, Straus SE *et al*: **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* 1999, **96**(8):4552-4557.
107. Roesler J, Izquierdo JM, Ryser M, Rosen-Wolff A, Gahr M, Valcarcel J, Lenardo MJ, Zheng L: **Haploinsufficiency, rather than the effect of an excessive production of soluble CD95 (CD95{Delta}TM), is the basis for ALPS Ia in a family with duplicated 3' splice site AG in CD95 intron 5 on one allele.** *Blood* 2005, **106**(5):1652-1659.
108. Rieux-Laucat F, Blachere S, Danielan S, De Villartay JP, Oleastro M, Solary E, Bader-Meunier B, Arkwright P, Pondare C, Bernaudin F *et al*: **Lymphoproliferative syndrome with autoimmunity: A possible genetic basis for dominant expression of the clinical manifestations.** *Blood* 1999, **94**(8):2575-2582.
109. Bleesing JJ, Brown MR, Straus SE, Dale JK, Siegel RM, Johnson M, Lenardo MJ, Puck JM, Fleisher TA: **Immunophenotypic profiles in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *Blood* 2001, **98**(8):2466-2473.
110. Magerus-Chatinet A, Neven B, Stolzenberg MC, Daussy C, Arkwright PD, Lanzarotti N, Schaffner C, Cluet-Dennetiere S, Haerynck F, Michel G *et al*: **Onset of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in humans as a consequence of genetic defect accumulation.** *The Journal of clinical investigation* 2011, **121**(1):106-112.
111. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W: **An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *Annals of internal medicine* 1999, **130**(7):591-601.

112. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rosen-Wolff A, Peters AM, Sneller MC, Hallahan CW, Wang J *et al*: **The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis.** *Blood* 2001, **98**(1):194-200.
113. Jackson CE, Puck JM: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis.** *Current opinion in pediatrics* 1999, **11**(6):521-527.
114. Holzelova E, Vonarbourg C, Stolzenberg MC, Arkwright PD, Selz F, Prieur AM, Blanche S, Bartunkova J, Vilmer E, Fischer A *et al*: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations.** *The New England journal of medicine* 2004, **351**(14):1409-1418.
115. Bleesing JJ, Straus SE, Fleisher TA: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome. A human disorder of abnormal lymphocyte survival.** *Pediatric clinics of North America* 2000, **47**(6):1291-1310.
116. Auricchio L, Vitiello L, Adriani M, Ferri P, Chiocchetti A, Pettinato G, Racioppi L, Maiuri L, Dianzani U, Pignata C: **Cutaneous manifestations as presenting sign of autoimmune lymphoproliferative syndrome in childhood.** *Dermatology* 2005, **210**(4):336-340.
117. Worth A, Thrasher AJ, Gaspar HB: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype.** *British journal of haematology* 2006, **133**(2):124-140.
118. Viret C, Janeway CA, Jr.: **Self-specific MHC class II-restricted CD4-CD8- T cells that escape deletion and lack regulatory activity.** *Journal of immunology* 2003, **170**(1):201-209.
119. Cowley SC, Hamilton E, Frelinger JA, Su J, Forman J, Elkins KL: **CD4-CD8- T cells control intracellular bacterial infections both in vitro and in vivo.** *The Journal of experimental medicine* 2005, **202**(2):309-319.
120. Crispin JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC: **Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys.** *Journal of immunology* 2008, **181**(12):8761-8766.
121. Crispin JC, Tsokos GC: **Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype.** *Journal of immunology* 2009, **183**(7):4675-4681.
122. Riol-Blanco L, Lazarevic V, Awasthi A, Mitsdoerffer M, Wilson BS, Croxford A, Waisman A, Kuchroo VK, Glimcher LH, Oukka M: **IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections.** *Journal of immunology* 2010, **184**(4):1710-1720.
123. 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, **115**(11):2142-2145.
124. Dean GS, Anand A, Blofeld A, Isenberg DA, Lydyard PM: **Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: production of IL-4.** *Lupus* 2002, **11**(8):501-507.
125. Ramenghi U, Bonissoni S, Migliaretti G, DeFranco S, Bottarel F, Gambaruto C, DiFranco D, Priori R, Conti F, Dianzani I *et al*: **Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer.** *Blood* 2000, **95**(10):3176-3182.
126. Egerton M, Scollay R: **Intrathymic selection of murine TCR alpha beta+CD4-CD8-thymocytes.** *International immunology* 1990, **2**(2):157-163.
127. Mixter PF, Russell JQ, Morrissette GJ, Charland C, Aleman-Hoey D, Budd RC: **A model for the origin of TCR-alpha beta+ CD4-CD8- B220+ cells based on high affinity TCR signals.** *Journal of immunology* 1999, **162**(10):5747-5756.
128. Halder RC, Kawamura T, Bannai M, Watanabe H, Kawamura H, Mannoor MK, Morshed SR, Abo T: **Intensive generation of NK1.1- extrathymic T cells in the liver by injection of bone**

- marrow cells isolated from mice with a mutation of polymorphic major histocompatibility complex antigens. *Immunology* 2001, **102**(4):450-459.
129. Johansson M, Lycke N: **A unique population of extrathymically derived alpha beta TCR+CD4-CD8- T cells with regulatory functions dominates the mouse female genital tract.** *Journal of immunology* 2003, **170**(4):1659-1666.
130. Schonrich G, Kalinke U, Momburg F, Malissen M, Schmitt-Verhulst AM, Malissen B, Hammerling GJ, Arnold B: **Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction.** *Cell* 1991, **65**(2):293-304.
131. Fossati L, Takahashi S, Merino R, Iwamoto M, Aubry JP, Nose M, Spach C, Motta R, Izui S: **An MRL/MpJ-lpr/lpr substrain with a limited expansion of lpr double-negative T cells and a reduced autoimmune syndrome.** *International immunology* 1993, **5**(5):525-532.
132. Merino R, Fossati L, Iwamoto M, Takahashi S, Lemoine R, Ibnou-Zekri N, Pugliatti L, Merino J, Izui S: **Effect of long-term anti-CD4 or anti-CD8 treatment on the development of lpr CD4-CD8- double negative T cells and of the autoimmune syndrome in MRL-lpr/lpr mice.** *Journal of autoimmunity* 1995, **8**(1):33-45.
133. Mehal WZ, Crispe IN: **TCR ligation on CD8+ T cells creates double-negative cells in vivo.** *Journal of immunology* 1998, **161**(4):1686-1693.
134. Bleesing JJ, Brown MR, Dale JK, Straus SE, Lenardo MJ, Puck JM, Atkinson TP, Fleisher TA: **TcR-alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T cells in humans with the autoimmune lymphoproliferative syndrome express a novel CD45 isoform that is analogous to murine B220 and represents a marker of altered O-glycan biosynthesis.** *Clinical immunology* 2001, **100**(3):314-324.
135. Marlies A, Udo G, Juergen B, Bernd S, Herrmann M, Haas JP: **The expanded double negative T cell populations of a patient with ALPS are not clonally related to CD4+ or to CD8+ T cells.** *Autoimmunity* 2007, **40**(4):299-301.
136. Ohga S, Nomura A, Takahata Y, Ihara K, Takada H, Wakiguchi H, Kudo Y, Hara T: **Dominant expression of interleukin 10 but not interferon gamma in CD4(-)CD8(-)alphabetaT cells of autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *British journal of haematology* 2002, **119**(2):535-538.
137. Teachey DT, Seif AE, Brown VI, Bruno M, Bunte RM, Chang YJ, Choi JK, Fish JD, Hall J, Reid GS *et al*: **Targeting Notch signaling in autoimmune and lymphoproliferative disease.** *Blood* 2008, **111**(2):705-714.
138. Lopatin U, Yao X, Williams RK, Bleesing JJ, Dale JK, Wong D, Teruya-Feldstein J, Fritz S, Morrow MR, Fuss I *et al*: **Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with disease expression.** *Blood* 2001, **97**(10):3161-3170.
139. Renno T, Attinger A, Rimoldi D, Hahne M, Tschopp J, MacDonald HR: **Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis.** *European journal of immunology* 1998, **28**(2):540-547.
140. Testi R, Phillips JH, Lanier LL: **T cell activation via Leu-23 (CD69).** *Journal of immunology* 1989, **143**(4):1123-1128.
141. Chao KH, Wu MY, Yang JH, Chen SU, Yang YS, Ho HN: **Expression of the interleukin-2 receptor alpha (CD25) is selectively decreased on decidual CD4+ and CD8+ T lymphocytes in normal pregnancies.** *Molecular human reproduction* 2002, **8**(7):667-673.
142. Mannering SI, Zhong J, Cheers C: **T-cell activation, proliferation and apoptosis in primary *Listeria monocytogenes* infection.** *Immunology* 2002, **106**(1):87-95.
143. Poriadin GV, Salmasi Zh M, Kazimiskii AN: **[Activation markers of lymphocytes as indicators of immune system dysregulation in inflammation].** *Patologicheskaja fiziologija i eksperimental'naia terapija* 2006(1):2-7.

144. **Cincinnati Children's Hospital , From the Diagnostic, Immunology Laboratories.** ISSUE 10 | SPRING 2013.
145. **Cincinnati Children's Hospital , From the Diagnostic, Immunology Laboratories.** ISSUE 1 | october 2005.
146. Lenardo MJ, Oliveira JB, Zheng L, Rao VK: **ALPS-ten lessons from an international workshop on a genetic disease of apoptosis.** *Immunity* 2010, **32**(3):291-295.
147. Kurnick JT, Warrens AR, Moscicki RA, Leary CP: **T-cell subsets in human lymphocytes maintained in IL-2 medium after PHA or mixed lymphocyte reaction activation.** *Clinical immunology and immunopathology* 1983, **27**(3):444-451.
148. Habetswallner D, Pelosi E, Bulgarini D, Camagna A, Samoggia P, Montesoro E, Giannella G, Lazzaro D, Isacchi G, Testa U *et al*: **Activation and proliferation of normal resting human T lymphocytes in serum-free culture: role of IL-4 and IL-6.** *Immunology* 1988, **65**(3):357-364.
149. O'Donovan MR, Johns S, Wilcox P: **The effect of PHA stimulation on lymphocyte sub-populations in whole-blood cultures.** *Mutagenesis* 1995, **10**(4):371-374.
150. Leithauser F, Dhein J, Mechtersheimer G, Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin KM, Krammer PH, Moller P: **Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1993, **69**(4):415-429.
151. Ryan AE, Lane S, Shanahan F, O'Connell J, Houston AM: **Fas ligand expression in human and mouse cancer cell lines; a caveat on over-reliance on mRNA data.** *Journal of carcinogenesis* 2006, **5**:5.
152. Puck JM, Sneller MC: **ALPS: an autoimmune human lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis.** *Seminars in immunology* 1997, **9**(1):77-84.
153. Fuss IJ, Strober W, Dale JK, Fritz S, Pearlstein GR, Puck JM, Lenardo MJ, Straus SE: **Characteristic T helper 2 T cell cytokine abnormalities in autoimmune lymphoproliferative syndrome, a syndrome marked by defective apoptosis and humoral autoimmunity.** *Journal of immunology* 1997, **158**(4):1912-1918.
154. Magerus-Chatinet A, Stolzenberg MC, Loffredo MS, Neven B, Schaffner C, Ducrot N, Arkwright PD, Bader-Meunier B, Barbot J, Blanche S *et al*: **FAS-L, IL-10, and double-negative CD4- CD8- TCR alpha/beta+ T cells are reliable markers of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function.** *Blood* 2009, **113**(13):3027-3030.
155. Caminha I, Fleisher TA, Hornung RL, Dale JK, Niemela JE, Price S, Davis J, Perkins K, Dowdell KC, Brown MR *et al*: **Using biomarkers to predict the presence of FAS mutations in patients with features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010, **125**(4):946-949 e946.
156. Bowen RA, Dowdell KC, Dale JK, Drake SK, Fleisher TA, Hortin GL, Remaley AT, Nexo E, Rao VK: **Elevated vitamin B(1)(2) levels in autoimmune lymphoproliferative syndrome attributable to elevated haptocorrin in lymphocytes.** *Clinical biochemistry* 2012, **45**(6):490-492.
157. Sareneva T, Matikainen S, Vanhatalo J, Melen K, Pelkonen J, Julkunen I: **Kinetics of cytokine and NFAT gene expression in human interleukin-2-dependent T lymphoblasts stimulated via T-cell receptor.** *Immunology* 1998, **93**(3):350-357.
158. Chow CW, Rincon M, Davis RJ: **Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression.** *Molecular and cellular biology* 1999, **19**(3):2300-2307.
159. Ballou LM, Lin RZ: **Rapamycin and mTOR kinase inhibitors.** *Journal of chemical biology* 2008, **1**(1-4):27-36.
160. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G: **Immunoregulatory functions of mTOR inhibition.** *Nature reviews Immunology* 2009, **9**(5):324-337.



161. Mourtada-Maarabouni M, Hasan AM, Farzaneh F, Williams GT: **Inhibition of human T-cell proliferation by mammalian target of rapamycin (mTOR) antagonists requires noncoding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5).** *Molecular pharmacology* 2010, **78**(1):19-28.
162. Glerup M, Thelle T, Gronbaek K, Hasle H: **Splenectomy in two children with autoimmune lymphoproliferative syndrome and massive splenomegaly.** *Pediatric blood & cancer* 2009, **53**(6):1124-1126.
163. Benkerrou M, Le Deist F, de Villartay JP, Caillat-Zucman S, Rieux-Laucat F, Jabado N, Cavazzana-Calvo M, Fischer A: **Correction of Fas (CD95) deficiency by haploidentical bone marrow transplantation.** *European journal of immunology* 1997, **27**(8):2043-2047.
164. Sleight BJ, Prasad VS, DeLaat C, Steele P, Ballard E, Arceci RJ, Sidman CL: **Correction of autoimmune lymphoproliferative syndrome by bone marrow transplantation.** *Bone marrow transplantation* 1998, **22**(4):375-380.
165. Dimopoulou MN, Gandhi S, Ghevaert C, Chakraverty R, Fielding A, Webster D, Mackinnon S, Kottaridis PD: **Successful treatment of autoimmune lymphoproliferative syndrome and refractory autoimmune thrombocytopenic purpura with a reduced intensity conditioning stem cell transplantation followed by donor lymphocyte infusion.** *Bone marrow transplantation* 2007, **40**(6):605-606.
166. Rieux-Laucat F, Fischer A, Deist FL: **Cell-death signaling and human disease.** *Current opinion in immunology* 2003, **15**(3):325-331.
167. Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG *et al*: **Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency.** *Nature* 2002, **419**(6905):395-399.
168. Bidere N, Su HC, Lenardo MJ: **Genetic disorders of programmed cell death in the immune system.** *Annual review of immunology* 2006, **24**:321-352.
169. Oliveira JB, Bidere N, Niemela JE, Zheng L, Sakai K, Nix CP, Danner RL, Barb J, Munson PJ, Puck JM *et al*: **NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(21):8953-8958.
170. Niemela JE, Lu L, Fleisher TA, Davis J, Caminha I, Natter M, Beer LA, Dowdell KC, Pittaluga S, Raffeld M *et al*: **Somatic KRAS mutations associated with a human nonmalignant syndrome of autoimmunity and abnormal leukocyte homeostasis.** *Blood* 2011, **117**(10):2883-2886.
171. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T *et al*: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation.** *Blood* 2011, **117**(10):2887-2890.
172. Rieux-Laucat F, Magerus-Chatinet A: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome: a multifactorial disorder.** *Haematologica* 2010, **95**(11):1805-1807.
173. Guo Q, Zhang J, Li J, Zou L, Zhang J, Xie Z, Fu X, Jiang S, Chen G, Jia Q *et al*: **Forced miR-146a expression causes autoimmune lymphoproliferative syndrome in mice via downregulation of Fas in germinal center B cells.** *Blood* 2013, **121**(24):4875-4883.
174. Meloche S, Pouyssegur J: **The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition.** *Oncogene* 2007, **26**(22):3227-3239.
175. Tetsu O, McCormick F: **Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells.** *Nature* 1999, **398**(6726):422-426.
176. Peng SL, Gerth AJ, Ranger AM, Glimcher LH: **NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation.** *Immunity* 2001, **14**(1):13-20.
177. Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB: **Nuclear factor-kappa B: from clone to clinic.** *Current molecular medicine* 2007, **7**(7):619-637.
178. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP: **Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity.** *Science* 1995, **268**(5215):1347-1349.

179. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Lin J, Minguez P, Bork P, von Mering C *et al*: **STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration.** *Nucleic acids research* 2013, **41**(Database issue):D808-815.
180. Wu C, Warriar RR, Wang X, Presky DH, Gately MK: **Regulation of interleukin-12 receptor beta1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells.** *European journal of immunology* 1997, **27**(1):147-154.
181. Yu Y, Hagihara M, Ando K, Gansuud B, Matsuzawa H, Tsuchiya T, Ueda Y, Inoue H, Hotta T, Kato S: **Enhancement of human cord blood CD34+ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells.** *Journal of immunology* 2001, **166**(3):1590-1600.
182. Lafleur EA, Jia SF, Worth LL, Zhou Z, Owen-Schaub LB, Kleinerman ES: **Interleukin (IL)-12 and IL-12 gene transfer up-regulate Fas expression in human osteosarcoma and breast cancer cells.** *Cancer research* 2001, **61**(10):4066-4071.
183. Fan H, Walters CS, Dunston GM, Tackey R: **IL-12 plays a significant role in the apoptosis of human T cells in the absence of antigenic stimulation.** *Cytokine* 2002, **19**(3):126-137.
184. Kitaoura H, Nagata N, Fujimura Y, Hotokezaka H, Yoshida N, Nakayama K: **Effect of IL-12 on TNF-alpha-mediated osteoclast formation in bone marrow cells: apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interaction.** *Journal of immunology* 2002, **169**(9):4732-4738.
185. van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH: **Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae.** *The Lancet Infectious diseases* 2004, **4**(12):739-749.
186. Zhou Z, Lafleur EA, Koshkina NV, Worth LL, Lester MS, Kleinerman ES: **Interleukin-12 up-regulates Fas expression in human osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells by enhancing its promoter activity.** *Molecular cancer research : MCR* 2005, **3**(12):685-691.
187. von Rossum A, Krall R, Escalante NK, Choy JC: **Inflammatory cytokines determine the susceptibility of human CD8 T cells to Fas-mediated activation-induced cell death through modulation of FasL and c-FLIP(S) expression.** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(24):21137-21144.
188. Bacon CM, Petricoin EF, 3rd, Ortaldo JR, Rees RC, Lerner AC, Johnston JA, O'Shea JJ: **Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(16):7307-7311.
189. Visconti R, Gadina M, Chiariello M, Chen EH, Stancato LF, Gutkind JS, O'Shea JJ: **Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity.** *Blood* 2000, **96**(5):1844-1852.
190. Morinobu A, Gadina M, Strober W, Visconti R, Fornace A, Montagna C, Feldman GM, Nishikomori R, O'Shea JJ: **STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN-gamma production but not for cell proliferation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(19):12281-12286.
191. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA: **Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.** *Journal of leukocyte biology* 2004, **75**(2):163-189.
192. Badie B, Schartner J, Vorpahl J, Preston K: **Interferon-gamma induces apoptosis and augments the expression of Fas and Fas ligand by microglia in vitro.** *Experimental neurology* 2000, **162**(2):290-296.
193. Boselli D, Losana G, Bernabei P, Bosisio D, Drysdale P, Kiessling R, Gaston JS, Lammas D, Casanova JL, Kumararatne DS *et al*: **IFN-gamma regulates Fas ligand expression in human CD4+ T lymphocytes and controls their anti-mycobacterial cytotoxic functions.** *European journal of immunology* 2007, **37**(8):2196-2204.
194. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F *et al*: **A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1**

- and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *Journal of immunology* 2002, **168**(11):5699-5708.
195. Kasahara T, Hooks JJ, Dougherty SF, Oppenheim JJ: **Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets.** *Journal of immunology* 1983, **130**(4):1784-1789.
196. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E *et al*: **IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells.** *Immunity* 2002, **16**(6):779-790.
197. Bream JH, Curiel RE, Yu CR, Egwuagu CE, Grusby MJ, Aune TM, Young HA: **IL-4 synergistically enhances both IL-2- and IL-12-induced IFN-gamma expression in murine NK cells.** *Blood* 2003, **102**(1):207-214.
198. Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R, Maier LM, Anderson DE, Weiner HL: **IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4+ T cells.** *Journal of immunology* 2009, **183**(4):2435-2443.
199. Salcedo R, Hixon JA, Stauffer JK, Jalah R, Brooks AD, Khan T, Dai RM, Scheetz L, Lincoln E, Back TC *et al*: **Immunologic and therapeutic synergy of IL-27 and IL-2: enhancement of T cell sensitization, tumor-specific CTL reactivity and complete regression of disseminated neuroblastoma metastases in the liver and bone marrow.** *Journal of immunology* 2009, **182**(7):4328-4338.
200. Presky DH, Minetti LJ, Gillessen S, Wilkinson VL, Wu CY, Gubler U, Chizzonite R, Gately MK: **Analysis of the multiple interactions between IL-12 and the high affinity IL-12 receptor complex.** *Journal of immunology* 1998, **160**(5):2174-2179.
201. Wang X, Wilkinson VL, Podlaski FJ, Wu C, Stern AS, Presky DH, Magram J: **Characterization of mouse interleukin-12 p40 homodimer binding to the interleukin-12 receptor subunits.** *European journal of immunology* 1999, **29**(6):2007-2013.
202. Wu C, Wang X, Gadina M, O'Shea JJ, Presky DH, Magram J: **IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites.** *Journal of immunology* 2000, **165**(11):6221-6228.
203. Bustamante J, Picard C, Fieschi C, Filipe-Santos O, Feinberg J, Perronne C, Chapgier A, de Beaucoudrey L, Vogt G, Sanlaville D *et al*: **A novel X-linked recessive form of Mendelian susceptibility to mycobacterial disease.** *Journal of medical genetics* 2007, **44**(2):e65.
204. Cottle LE: **Mendelian susceptibility to mycobacterial disease.** *Clinical genetics* 2011, **79**(1):17-22.
205. de Beaucoudrey L, Samarina A, Bustamante J, Cobat A, Boisson-Dupuis S, Feinberg J, Al-Muhsen S, Janniere L, Rose Y, de Suremain M *et al*: **Revisiting human IL-12Rbeta1 deficiency: a survey of 141 patients from 30 countries.** *Medicine* 2010, **89**(6):381-402.
206. Airoidi I, Di Carlo E, Cocco C, Sorrentino C, Fais F, Cilli M, D'Antuono T, Colombo MP, Pistoia V: **Lack of IL12rb2 signaling predisposes to spontaneous autoimmunity and malignancy.** *Blood* 2005, **106**(12):3846-3853.
207. Guerra C, Johal K, Morris D, Moreno S, Alvarado O, Gray D, Tanzil M, Pearce D, Venketaraman V: **Control of Mycobacterium tuberculosis growth by activated natural killer cells.** *Clinical and experimental immunology* 2012, **168**(1):142-152.
208. van de Vosse E, Haverkamp MH, Ramirez-Alejo N, Martinez-Gallo M, Blancas-Galicia L, Metin A, Garty BZ, Sun-Tan C, Broides A, de Paus RA *et al*: **IL-12Rbeta1 deficiency: mutation update and description of the IL12RB1 variation database.** *Human mutation* 2013, **34**(10):1329-1339.
209. Miller HE, Robinson RT: **Early control of Mycobacterium tuberculosis infection requires il12rb1 expression by rag1-dependent lineages.** *Infection and immunity* 2012, **80**(11):3828-3841.



210. Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E, Feinberg J, Bustamante J, Breiman A, Altare F, Baretto R, Le Deist F, Kayal S *et al*: **Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications.** *The Journal of experimental medicine* 2003, **197**(4):527-535.
211. Rensing-Ehl A, Volkl S, Speckmann C, Lorenz MR, Ritter J, Janda A, Abinun M, Pircher H, Bengsch B, Thimme R *et al*: **Abnormally differentiated CD4+ or CD8+ T cells with phenotypic and genetic features of double negative T cells in human Fas deficiency.** *Blood* 2014, **124**(6):851-860.
212. Ylikoski E, Lund R, Kylaniemi M, Filen S, Kilpelainen M, Savolainen J, Lahesmaa R: **IL-12 up-regulates T-bet independently of IFN-gamma in human CD4+ T cells.** *European journal of immunology* 2005, **35**(11):3297-3306.
213. Takemoto N, Intlekofer AM, Northrup JT, Wherry EJ, Reiner SL: **Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation.** *Journal of immunology* 2006, **177**(11):7515-7519.
214. Mori S, Jewett A, Murakami-Mori K, Cavalcanti M, Bonavida B: **The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent.** *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 1997, **44**(5):282-290.
215. Leite-de-Moraes MC, Herbelin A, Gouarin C, Koezuka Y, Schneider E, Dy M: **Fas/Fas ligand interactions promote activation-induced cell death of NK T lymphocytes.** *Journal of immunology* 2000, **165**(8):4367-4371.
216. Uno M, Otsuki T, Yata K, Fujii T, Sakaguchi H, Akisada T, Hiratsuka J, Imajo Y, Harada T: **Participation of Fas-mediated apoptotic pathway in KB, a human head and neck squamous cell carcinoma cell line, after irradiation.** *International journal of oncology* 2002, **20**(3):617-622.
217. Kilinc MO, Rowswell-Turner RB, Gu T, Virtuoso LP, Egilmez NK: **Activated CD8+ T-effector/memory cells eliminate CD4+ CD25+ Foxp3+ T-suppressor cells from tumors via FasL mediated apoptosis.** *Journal of immunology* 2009, **183**(12):7656-7660.
218. Chow WA, Fang JJ, Yee JK: **The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells.** *Journal of immunology* 2000, **164**(7):3512-3518.
219. Trinchieri G: **Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity.** *Annual review of immunology* 1995, **13**:251-276.
220. Prando C, Samarina A, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Cobat A, Picard C, AlSum Z, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Frayha H *et al*: **Inherited IL-12p40 deficiency: genetic, immunologic, and clinical features of 49 patients from 30 kindreds.** *Medicine* 2013, **92**(2):109-122.
221. Cardenes M, Angel-Moreno A, Fieschi C, Sologuren I, Colino E, Molines A, Garcia-Laorden MI, Campos-Herrero MI, Andujar-Sanchez M, Casanova JL *et al*: **Oesophageal squamous cell carcinoma in a young adult with IL-12R beta 1 deficiency.** *Journal of medical genetics* 2010, **47**(9):635-637.
222. Hong YH, Lee CK: **Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like syndrome presented as lupus-like syndrome with mycobacterial joint infection evolved into the lymphoma.** *Rheumatology international* 2009, **29**(5):569-573.

## 7. Abkürzungen

aa	amino acid
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AICD	Activation-induced cell death
AIH	Autoimmunhepatitis
AIHA	Autoimmune hämolytische Anämie
AIN	Autoimmune Neutropenie
ALPS	Autoimmunes lymphoproliferatives Syndrom
ALPS-U	ALPS-Undetermined
AP-1	Activating protein-1
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BID	BH3 interacting domain death agonist
bzw.	beziehungsweise
C. elegans	Caenorhabditis elegans
ca.	circa
CAD	Caspase-activaed Dnase
CCND1	Cyclin D1
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	complementary DNA
CEDS	Caspase-8 deficiency state
c-FLIP	Cellular-FLICE inhibitory protein
CKI	Casein Kinase I
CNI	Calcineurininhibitor
CRD	Cystein-rich domain
CVID	Common variable immunodeficiency disease
DALD	Dianzani's autoimmune lymphoproliferative disease
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DISC	Death inducing signaling complex
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNT-Zellen	Doppelt-negative T-Zellen
e.g.	exempli gratia
EGR	Early growth response proteins
ERK1/2	Extracellular signal regulated kinase 1/2
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated protein with death domain
FasL	Fas-Ligand
Fc	Fragment crystallizable
FKHRL1	Forkhead transcription factor inrhabdomyosarcoma like-1

FLICE	FADD- Like IL-1 Converting Enzyme
gld	generalized lymphoproliferative disease
griech.	griechisch
HLA	Human Leukocyte Antigen
HVS	Herpesvirus saimiri
i.e.	id est
ICAD	Inhibitor of caspase-activated Dnase
IFNAR2	Interferon alpha Rezeptor 2
IFNGR1	Interferon gamma receptor 1
IFNGR2	Interferon gamma receptor 2
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL12B	Interleukin 12 subunit beta
IL12RB1	Interleukin 12 receptor, beta 1
IL12RB2	Interleukin 12 receptor, beta 2
IL-x	Interleuin-x
IRF	Interferon regulatory factor
ITP	Immunthrombozytopenie
JAK	Januskinase
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L	Liter
LAT	Linker of activated T cells
LEF-1	Lymphoid enhancer-binding factor-1
LOH	Loss of heterozygosity
LPD	Lymphoproliferative disorder
lpr	lymphoproliferation
mFasL	membrane-bound FasL
ml	milliliter
MMP-7	Matrix Metalloprotease-7
MNC	Mononuclear cells
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MP-S	Metalloprotease substrate site
mRNA	messenger RNA
MSMD	Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin/Mammalian target of Rapamycin
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	nanogramm
NHLBI	NIH Heart, lung and blood Institute
NIH	National institutes of health

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase chain reaction
pg	pikogramm
PHA	Phytohämagglutinin
PKB	Proteinkinase B
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
PRD	Prolin-reiche Domäne
PS	Phosphatidylserin
q-PCR	Quantitative-PCR
RALD	RAS-associated autoimmune leukoproliferative disease
RAS	Rat sarcoma
SA	Self-assembly
sFasL	soluble Fas Ligand
SH3	Src-homology 3
SLE	Systemische Lupus erythematoses
Snupy	Single nucleotide polymorphism database
sog.	sogenannt
SP-1	Specificity protein 1
STATx	Signal transducer and activator of transcription x
Tab.	Tabelle
tBID	truncated BID
TCR	T cell receptor
THD	TNF Homologie-Domäne
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNFRSF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie
TRADD	TNFR1-associated death domain
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TZR	T-Zell-Rezeptor
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
UTP	Uridintriphosphat
UTR	Untranslated Region
WES	Whole-exome sequencing
WW	WWP repeating motif
XLP	X-linked lymphoproliferative disease
z.B.	zum Beispiel
ZAP70	Zeta-chain-associated protein kinase 70

## 8. Publikationen

**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**

**Schafiq Nabhani\***, Andrea Hönscheid\*, Prasad T. Oommen, Bernhard Fleckenstein, Jörg Schaper, Michaela Kuhlen, Hans-Jürgen Laws, Arndt Borkhardt, and Ute Fischer

\*both authors contributed equally

*Accepted for publication in "Clinical Immunology"*

---

**Deregulation of Fas Ligand Expression as a novel cause of autoimmune lymphoproliferative syndrome like disease**

**Schafiq Nabhani**, Sebastian Ginzel, Hagit Miskin, Shoshana Revel-Vilk, Dan Harlev, Bernhard Fleckenstein, Andrea Hönscheid, Prasad T. Oommen, Michaela Kuhlen, Ralf Thiele, Hans-Jürgen Laws, Arndt Borkhardt, Polina Stepensky,\* and Ute Fischer\*

\*PS and UF contributed equally to this manuscript

*In revision ("Haematologica")*

---

**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**

Schafiq Nabhani<sup>a\*</sup>, Andrea Hönscheid<sup>a\*</sup>, Prasad T. Oommen<sup>a</sup>, Bernhard Fleckenstein<sup>b</sup>,  
Jörg Schaper<sup>c</sup>, Michaela Kuhlen<sup>a</sup>, Hans-Jürgen Laws<sup>a</sup>, Arndt Borkhardt<sup>a</sup>, and Ute Fischer<sup>a</sup>  
\*both authors contributed equally

<sup>a</sup>Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, Medical Faculty, Center of Child and Adolescent Health, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany;

<sup>b</sup>Department of Clinical and Molecular Virology, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany;

<sup>c</sup>Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany

**Correspondence should be addressed to:** Ute Fischer, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, Center for Child and Adolescent Health, Heinrich-Heine-University, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany. Phone: 0049-211-811-6568, Fax: 0049-211-811-6436, e-mail: [ute.fischer@med.uni-duesseldorf.de](mailto:ute.fischer@med.uni-duesseldorf.de)

Abbreviations: ALPS, autoimmune lymphoproliferative syndrome; AP-1, activator protein 1; CCND1, cyclin D1; DN T cells, double negative T cells; ERK1/2, extracellular-signal regulated Kinase 1/2; FasL, Fas ligand; Fc, fragment crystallizable; hFas, human Fas; HVS, herpesvirus saimirii; IFN $\gamma$ , interferon gamma; JNK, c-jun n-terminal kinase; LAT, linker for activation of T cells; Lef-1, lymphoid enhancer-binding factor-1; NFATc1, nuclear factor of activated T cells 1; NF- $\kappa$ B1 nuclear factor of kappa light polypeptide 1; PLC $\gamma$ , phospholipase C-gamma; Rb, retinoblastoma; TCR, T cell receptor; ZAP-70, zeta-chain-associated protein kinase 70

**Abstract:**

We report a novel type of mutation in the death ligand FasL that was associated with a severe phenotype of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome in two patients. A frameshift mutation in the intracellular domain led to complete loss of FasL expression. Cell death signaling via its receptor and reverse signaling via its intracellular domain were completely abrogated. In vitro lymphocyte proliferation induced by weak T cell receptor stimulation could be blocked and cell death was induced by engagement of FasL in T cells derived from healthy individuals and a heterozygous carrier, but not in FasL-deficient patient derived cells. Expression of genes implicated in lymphocyte proliferation and activation (CCND1, NFATc1, NF- $\kappa$ B1) was increased in FasL-deficient T cells and could not be downregulated by FasL engagement as in healthy cells. Thus, our data suggest that deficiency in FasL reverse signaling may contribute to the clinical lymphoproliferative phenotype of ALPS.

**Key words:**

Autoimmune lymphoproliferative syndrome; Fas ligand; FasL reverse signaling

**1. Introduction**

The autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) of early childhood is characterized by chronic, nonmalignant lymphoproliferation and autoimmunity accompanied by elevated numbers of double negative (DN) T cells (T-cell receptor  $\alpha/\beta$  +CD4-CD8-) and an increased risk to develop malignancies later in life [1,2]. In about 70% of cases the disease is caused by germline mutations in components of the Fas death receptor signaling pathway leading to defective cell death induction and inefficient clearance of T lymphocytes [3]. Fas is a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. At the cell surface Fas is activated upon binding of the Fas ligand (FasL), a type II transmembrane protein of the same protein superfamily. This triggers the intracellular



activation of caspase-8 and -10 to start a proteolytic cascade resulting in cell death of receptor bearing cells [4]. Apart from cell death induction via its receptor, it was recently demonstrated that FasL also transmits signals back into FasL expressing cells via its intracellular domain, termed reverse or retrograde FasL mediated signaling [5]. Thereby FasL seems to regulate the proliferation of activated T cells [5,6,7,8,9]. Here, we report on two novel ALPS cases and describe for the first time a homozygous mutation in the intracellular domain of FasL and its effect on retrograde FasL signaling. Our results suggest that FasL reverse signaling may contribute to the clinical phenotype of ALPS.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Patients**

Two affected siblings, their mother and healthy donors were enrolled in the study. All experiments were performed after obtaining written informed consent and were approved by the local Ethics committee of the University of Düsseldorf.

### **2.2. DNA isolation and Sanger sequencing**

Genomic DNA was isolated using the DNA Blood kit (Qiagen, Hilden, Germany). Sanger sequencing was performed for the coding sequence of the genes *FAS* and *FASLG*. Primer sequences are provided in the supplementary material and methods section. Sequencing data were compared to the respective reference sequence (*FAS*: Ensembl ENST00000355740; *FASLG*: Ensembl ENST00000367721) employing Sequencher 4.10.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) software.

### **2.3. Isolation of mononuclear cells and primary T cell culture**

Mononuclear cells (MNCs) were derived from peripheral blood by Ficoll (Biochrom AG, Berlin, Germany) density centrifugation. T cells were cultured in medium consisting of RPMI1640 (Life Technologies, Darmstadt, Germany) and Panserin 401 (PAN-Biotech,

Aidenbach, Germany) mixed 1:1, supplemented with 10% FCS, 100 µg gentamycin (both from Life Technologies) and 30 U/ml IL-2 (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany). T cells were activated by addition of 7 µg/ml phytohemagglutinine (PHA, Life Technologies) for four days.

## 2.4. Immunophenotyping

Immunophenotyping was carried out employing the following antibodies: CD3-APC (clone UCHT1), TCR $\alpha/\beta$ -FITC (clone T10B9.1A-31), B220 (clone RA3-6B2), HLA-DR (clone TU36), CD27 (clone M-T271), CD19 (clone HIB19), and CD25 (clone M-A251) (all from Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Germany) and CD4-PerCP (clone VIT4), and CD8-PerCP (clone BW135/80) (both from Miltenyi). Expression of FasL was measured using a CD178/FasL-PE antibody (clone NOK-1, Miltenyi). Measurements were performed employing a FACSCalibur equipped with CellQuestPro software (BD).

## 2.5. Measurement of apoptosis

Activated T cells were stimulated with 50 ng/ml recombinant *SuperFasLigand* (Enzo Life Sciences, Loerrach, Germany) or 1 µM staurosporine (LC Laboratories, Woburn, MA) for 24 h or were left untreated. Cells were incubated for 10 min in hypotonic buffer (0.1% sodium citrate, 0.1% triton X-100, 50 µg/ml propidium iodide). The percentage of apoptotic hypodiploid nuclei was then measured on a FACSCalibur.

## 2.6. Immunoblotting

Cells were lysed in buffer containing 1% NP40, 50 mM Tris, pH 7.5, 350 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Penzberg, Germany). Proteins were separated on 12% polyacrylamide gels, transferred to polyvinylidene fluoride membranes and detected by chemiluminescence (GE Healthcare, Freiburg, Germany). The following primary antibodies were used: anti-tubulin (Santa Cruz Biotechnology) and anti-FasL (Cell Signaling Technology, Danvers, MA).

## **2.7. Immortalization of primary T lymphocytes**

T cells from the patients and healthy controls were immortalized by transformation with Herpes Virus Saimiri (HVS) as described [10].

## **2.8. Stimulation of FasL reverse signaling**

Immortalized T cells ( $10^6$ /ml) were suboptimally activated (1/5 of recommended amount) by CD3/CD28 engagement (T Cell Activation/Expansion Kit®, Miltenyi) and cultured in the presence or absence of immobilized hFas:Fc-protein (BD, Pharmingen) for 72 h.

## **2.9. Measurement of proliferation and cell cycle distribution**

Cell numbers were determined by trypan blue exclusion (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

## **2.10. Cell cycle analysis**

Cells were lysed in hypotonic buffer as described in 2.5. and incubated for 10 min. Cell cycle distribution was then analyzed employing a FACSCalibur.

## **2.11. RealTime PCR**

RNA was isolated following the protocol of the manufacturer (RNeasy Blood kit, Qiagen). Subsequently, cDNA was synthesized employing the QuantiTect Reverse Transcription kit and real time PCR was performed using QuantiTect primers for GAPDH, Cyclin D1, NFATc1 and NF- $\kappa$ B1 and the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit according to the manufacturer's recommendations (all from Qiagen).

### 3. Results

#### 3.1. The patients presented with a severe phenotype of ALPS

Two siblings of a consanguineous Libyan family, a seven year old boy (patient 1) and his four year old sister presented with a severe phenotype of ALPS (clinical and immunological data are summarized in Supplemental Table 1). Patient 1 exhibited a massively swollen abdomen and lymphadenopathy with a reduced general condition. Additionally, he presented with hepatosplenomegaly (Figure 1A), hypergammaglobulinemia and increased levels of vitamin B<sub>12</sub>. Patient 2 showed abdominal distensions, swollen lymphnodes and recurrent infections since she was three months old. She presented with lymphadenopathy, hepatosplenomegaly and hypergammaglobulinemia and a positive direct coombs test. Immunological characteristics were similar to patient 1 and revealed increased double negative (DN) T cells (TCR $\alpha/\beta$ <sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, >70% B220<sup>+</sup>), low number of memory B cells (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>) and a ratio of CD25<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> <1 in both patients. Malignancies were not detected in either patient. They are clinically stable under treatment with sirolimus, prednisone and omeprazole. The pedigree (see figure 1B) shows the consanguineous background of the family with the affected siblings and one healthy brother. The clinical symptoms of both patients pointed to ALPS as the underlying disease. The heterozygous mother of the patients was clinically asymptomatic and had a normal immunophenotype, pointing to an autosomal recessive inheritance pattern.

#### 3.2. Apoptosis signaling downstream of the Fas receptor was functional

*In vitro* stimulation of activated T lymphocytes from the patients with recombinant FasL or staurosporine, a classical apoptosis inducer, demonstrated a normal cell death response (data not shown) indicating an intact signaling pathway downstream of the Fas receptor. This pointed to a defect in FasL expression as a possible cause for the clinical diagnosis of ALPS in both patients.

### **3.3. ALPS was associated with a novel type of *FASLG* mutation**

Sanger sequencing of the coding regions of *FASLG* revealed a homozygous insertion of one base pair in exon 1 (g.172628545insT) in both patients (Figure 1C). The insertion resulted in a frameshift and a truncated protein (p.A69fsX138). The identified variation is the first disease causing mutation detected in the intracellular domain of the Fas ligand (Figure 1D) and has not been observed previously, neither in the 1000 Genomes Project ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)), the HapMap Project ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)), Exome Variant Server (NHLBI GO Exome Sequencing Project, Seattle WA; <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) data sets nor in our in-house database of >300 whole-exome data sets. The mother is a heterozygous carrier of the variation, but phenotypically healthy (data not shown). No mutations were detected by Sanger sequencing of the *FAS* gene.

### **3.4. Complete loss of membrane bound and soluble FasL expression in the patients**

To investigate the effect of the genomic insertion on FasL protein expression we first analyzed the cell surface expression of FasL by flow cytometry (Figure 1F). FasL cell surface expression was completely absent in CD3<sup>+</sup> T cells from both patients. Cells from the heterozygous mother exhibited a decreased expression compared to a healthy control. Immunoblot analysis using an antibody that detects membrane bound as well as soluble FasL confirmed the absence of both forms of FasL in the patients and decreased expression in the heterozygous carrier (Figure 1G).

### **3.5. FasL reverse signaling decreased CD3/CD28-stimulated proliferation in healthy control but not in patient derived T cells**

Recent studies demonstrated that FasL is involved in the regulation of lymphocyte proliferation by reverse signaling [5-9]. As this effect may contribute to the clinical phenotype of ALPS in FasL deficient patients, we tested the influence of FasL-engagement on the proliferation of T lymphocytes weakly activated with suboptimal levels of CD3 and CD28 antibodies (Figure 2A). To this end, T cells of the patients and healthy controls were immortalized by transformation with herpes virus saimiri (HVS) and incubated with immobilized human Fas receptor (hFas:Fc) or left untreated. Vital cells

were counted employing a trypan blue exclusion assay after three days. Incubation with immobilized hFas:Fc reduced the number of vital cells derived from healthy controls but not from FasL deficient cells from the patients. These results indicated that FasL mediated reverse signaling limited T cell expansion in the healthy control and that this regulation was absent in FasL deficient patient derived cells.

### **3.6. FasL reverse signaling induced cell cycle arrest and death of healthy control but not in patient derived T cells**

To investigate the mechanism that leads to the observed decrease in cell proliferation we stimulated FasL bearing T cells with CD3/CD28 in the presence of Fas and measured cell death and the distribution of cells in the cell cycle phases (Figure 2B). Healthy control cells responded to the treatment with an increased rate of cell death and a reduced number of cells in the G0/G1 and S phase. In contrast the patient derived cells showed no increase in cell death and no alteration in the cell cycle distribution.

### **3.7. FasL reverse signaling inhibited expression of genes implicated in T cell activation and proliferation**

We analyzed the expression of known FasL reverse signaling target genes implicated in lymphocyte proliferation and activation. The expression of *CCND1*, *NFATc1* and *NF- $\kappa$ B1* was significantly lower in healthy activated T cells in the presence of immobilized hFas:Fc than in the absence. Expression of these genes was elevated in activated T cells derived from both patients compared to a healthy control (Figure 2C) and was not altered by the presence or absence of immobilized Fas.

#### 4. Discussion

Known *FASLG* mutations demonstrate varying clinical penetrance in the heterozygous state while homozygous mutations show early onset and severe clinical manifestations comparable to homozygous mutations of the *FAS* gene. Our study presents the first cases caused by a mutation in the intracellular domain of the *FASLG* gene that is inherited in an autosomal recessive mode and shows penetrance only in the homozygous state. The mutation led to early truncation of the protein and complete loss of FasL expression. In addition to the resulting defect in Fas death receptor signaling, recent studies suggested that FasL may induce reverse signaling upon binding to its receptor [5,6,7,8,9]. However, there is conflicting data regarding the functional effect. Suzuki et al. observed that immobilized Fas:Fc in combination with a weak stimulation of the T-cell receptor has a positive effect on the proliferation of murine FasL<sup>+</sup> but not FasL<sup>-</sup> cytotoxic T cells [5]. However, Desbarats et al. showed that FasL stimulation inhibits activation-induced proliferation of murine CD4<sup>+</sup> T cells [6]. The inhibition of proliferation was accompanied by a cell cycle arrest and an increased number of dead cells [6]. Paulsen et al. and Luckerath et al. showed that the activation and proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> human T cells are inhibited in the presence of immobilized Fas:Fc [8,9]. In all studies, there is a general agreement that suboptimal TCR-costimulation is necessary for FasL reverse signaling. Our results are in line with those studies that indicate an inhibitory effect of retrograde signaling by FasL [6,8,9].

To date, the underlying pathway of FasL retrograde signal transduction is still unclear and contradictory data exist. The results of Sun et al. show that the intracellular proline-rich domain of FasL is sufficient for reverse signaling and increases phosphorylation of AKT, ERK1/2, JNK, and FasL, activation of NFAT and AP-1 and results in an increased IFN $\gamma$ -production [7]. In contrast, Paulsen et al. reported that the inhibition of T-cell activation via FasL reverse signaling is associated with a reduced phosphorylation of ERK1/2, LAT, PLC $\gamma$  and ZAP-70 [8]. In accordance with this data, Luckerath et al. demonstrated that activated B cells of mice homozygous for a deletion of the intracellular domain (FasL $\Delta$ Intra mice) show an increased phosphorylation of ERK1/2 and FasL-dependent inhibition of proliferation due to transcriptional regulation of various genes associated with the activation and proliferation of lymphocytes (e.g. *CCND1*, *NFATc1* and *NF- $\kappa$ B1*). These genes were upregulated in homozygous FasL $\Delta$ Intra mice [9]. The transcription of *CCND1* is positively



regulated by the ERK1/2 signaling pathway [11] and *CCND1*, *NFATc1* and *NF-κB1* are known target genes of the transcription factor Lef-1 which is inhibited when interacting with the intracellular domain of FasL [9,12,13,14]. Thus, we analyzed the expression of these genes in the present study and could demonstrate that the expression of *CCND1*, *NFATc1* and *NF-κB1* in FasL-deficient HVS transformed T cells was upregulated in comparison to FasL+ HVS T cells. We also show that stimulation of suboptimally activated FasL+ HVS T cells with hFas:Fc led to a lower expression of *CCND1*, *NFATc1* and *NF-κB1* than in the absence of hFas:Fc. In contrast no significant expression differences were observed in FasL- HVS T cells of the patients and a higher steady state expression of these genes was obvious. These results indicate that FasL-stimulation can oppose the effect of activation and proliferation induced by a suboptimal TCR-stimulation and are in line with studies that indicate an inhibitory effect of retrograde signaling by FasL [6,8,9].

The molecular mechanism and physiological purpose of reverse signaling by FasL remains to be determined in future analyses. It may be hypothesized that this pathway serves to shutdown immune reactions in order to avoid excessive responses and/or to limit autoimmune reactions.

#### **4.1. Conclusion**

We describe a novel type of genomic *FASLG* mutation associated with a severe clinical phenotype of ALPS. The mutation causes a defect in Fas death receptor mediated apoptosis of lymphocytes. In addition, our data demonstrate that FasL mediated reverse signaling executes an anti-proliferative function in stimulated healthy T cells that is impaired in the patients' cells. Thus, our study indicates for the first time that impaired FasL reverse signaling, in addition to defective apoptosis, may contribute to the clinical phenotype of lymphoproliferation in FasL deficient patients.

**Conflict of interest statement:**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

**Acknowledgements:**

The authors would like to thank Monika Schmidt for excellent technical assistance. This work was funded by an intramural grant of the research commission of the medical faculty of the Heinrich-Heine-University Duesseldorf.

**References:**

- [1] V.C. Canale, and C.H. Smith, Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma, *J Pediatr* 70 (1967) 891-899.
- [2] B. Neven, A. Magerus-Chatinet, B. Florquin, D. Gobert, O. Lambotte, L. De Somer, N. Lanzarotti, M.C. Stolzenberg, B. Bader-Meunier, N. Aladjidi, C. Chantrain, Y. Bertrand, E. Jeziorski, G. Leverger, G. Michel, F. Suarez, E. Oksenhendler, O. Hermine, S. Blanche, C. Picard, A. Fischer, and F. Rieux-Laucat, A survey of 90 patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome related to TNFRSF6 mutation, *Blood* 118 (2011) 4798-4807.
- [3] J.B. Oliveira, J.J. Bleesing, U. Dianzani, T.A. Fleisher, E.S. Jaffe, M.J. Lenardo, F. Rieux-Laucat, R.M. Siegel, H.C. Su, D.T. Teachey, and V.K. Rao, Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop, *Blood* 116 (2010) e35-40.
- [4] U. Fischer, R.U. Janicke, and K. Schulze-Osthoff, Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates, *Cell Death Differ* 10 (2003) 76-100.
- [5] I. Suzuki, and P.J. Fink, Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand, *J Exp Med* 187 (1998) 123-128.
- [6] J. Desbarats, R.C. Duke, and M.K. Newell, Newly discovered role for Fas ligand in the cell-cycle arrest of CD4<sup>+</sup> T cells, *Nat Med* 4 (1998) 1377-1382.
- [7] M. Sun, S. Lee, S. Karray, M. Levi-Strauss, K.T. Ames, and P.J. Fink, Cutting edge:

two distinct motifs within the Fas ligand tail regulate Fas ligand-mediated costimulation, *J Immunol* 179 (2007) 5639-5643.

- [8] M. Paulsen, B. Mathew, J. Qian, M. Lettau, D. Kabelitz, and O. Janssen, FasL cross-linking inhibits activation of human peripheral T cells, *Int Immunol* 21 (2009) 587-598.
- [9] K. Luckerath, V. Kirkin, I.M. Melzer, F.B. Thalheimer, D. Siele, W. Milani, T. Adler, A. Aguilar-Pimentel, M. Horsch, G. Michel, J. Beckers, D.H. Busch, M. Ollert, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, M. Hrabe de Angelis, F.J. Staal, K. Rajalingam, A.O. Hueber, L.J. Strobl, U. Zimmer-Strobl, and M. Zornig, Immune modulation by Fas ligand reverse signaling: lymphocyte proliferation is attenuated by the intracellular Fas ligand domain, *Blood* 117 (2011) 519-529.
- [10] E. Meini, R. Hohlfeld, H. Wekerle, and B. Fleckenstein, Immortalization of human T cells by Herpesvirus saimiri, *Immunol Today* 16 (1995) 55-58.
- [11] S. Meloche, and J. Pouyssegur, The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition, *Oncogene* 26 (2007) 3227-3239.
- [12] O. Tetsu, and F. McCormick, Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells, *Nature* 398 (1999) 422-426.
- [13] S.L. Peng, A.J. Gerth, A.M. Ranger, and L.H. Glimcher, NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation, *Immunity* 14 (2001) 13-20.

- [14] K.S. Ahn, G. Sethi, and B.B. Aggarwal, Nuclear factor-kappa B: from clone to clinic, *Curr Mol Med* 7 (2007) 619-637.

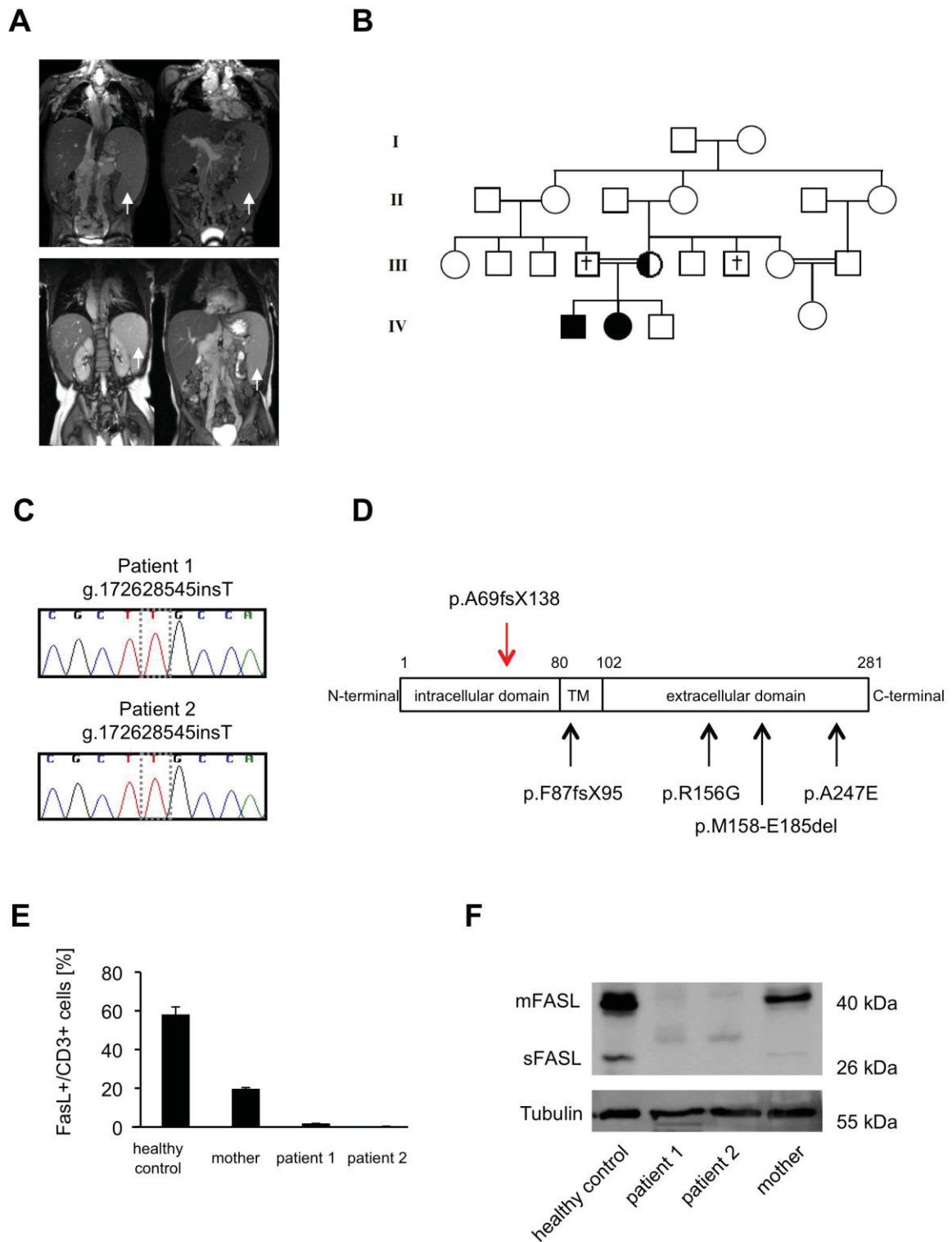


Figure 1: Nabhani et al.

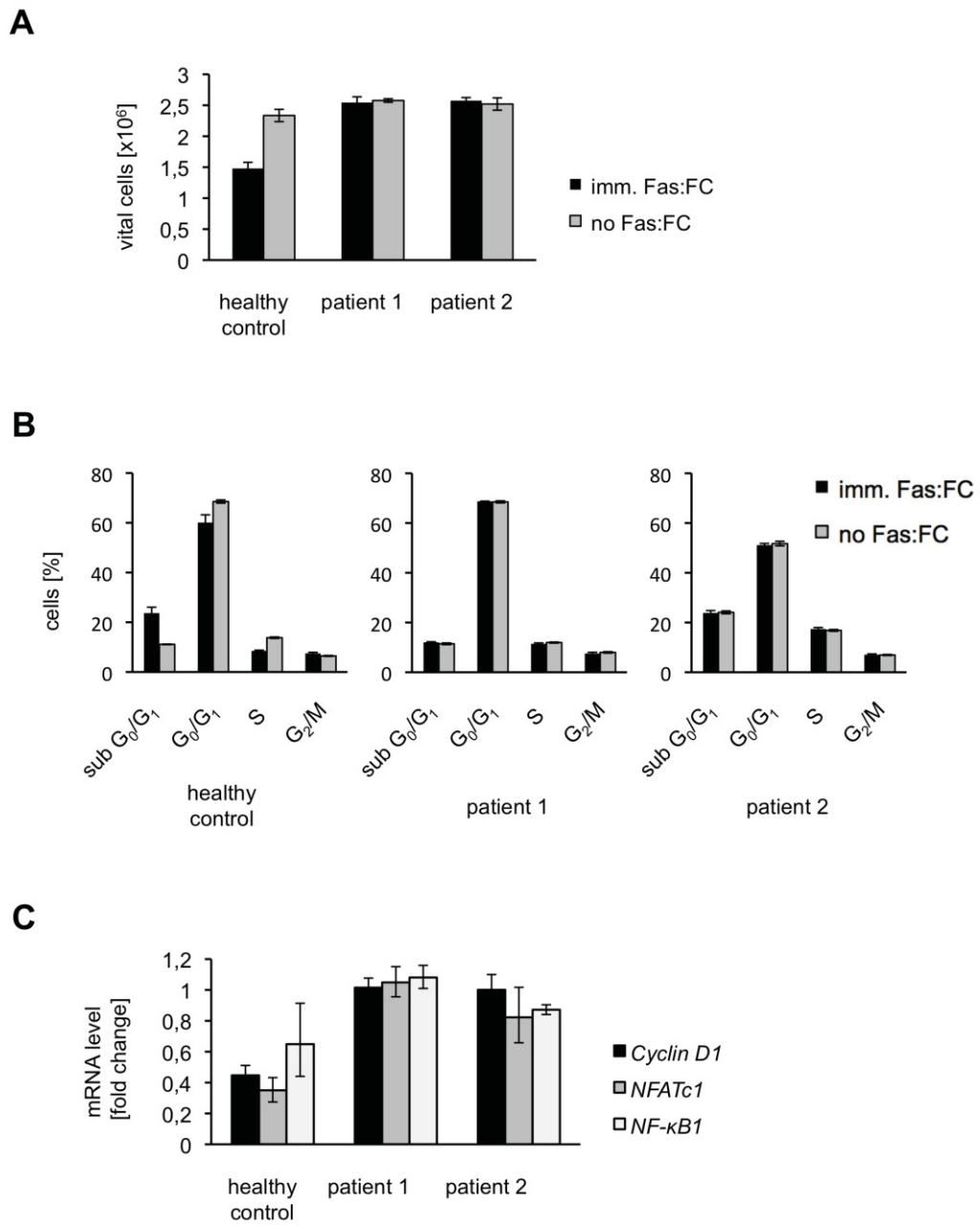


Figure 2: Nabhani et al.



**Figure Legends:**

**Figure 1** Identification of a novel type of FASLG mutation causing ALPS. (A) Coronal truefisp sequence showing hepatosplenomegaly and generalized lymphadenopathy in patient 1 (upper panel) and patient 2 (lower panel). White arrows indicate the enlarged spleen. (B) Pedigree of the affected consanguineous Libyan family. (C) Sanger sequencing chromatograms of genomic *FASLG* exon 1 in patient 1 and 2. The gray rectangle indicates the position of the insertion. (D) Localization of the identified mutation in the FasL protein (indicated by a red arrow). The positions of previously identified ALPS-associated FasL mutations are indicated by black arrows. (E) Cell surface expression of FasL on CD3<sup>+</sup> T cells detected by flow cytometry. (F) Western Blot analysis of protein expression of membrane-bound and soluble FasL protein in the homozygous patients, the heterozygous mother and healthy controls.

**Figure 2** Deficient FasL reverse signaling may contribute to lymphoproliferation. (A) Cell count of vital HVS transformed T cells from the patients and a healthy control after incubation with low dose CD3/CD28-stimulation with or without costimulation with immobilized hFas:Fc for three days. (B) Cell cycle analysis of HVS transformed T cells treated as described in (A). (C) Expression analysis of selected genes implicated in lymphocyte activation and proliferation in HVS transformed cells as described in (A). Expression of the genes was measured by qPCR. Each sample was assessed in quadruplicate and normalized against the housekeeping gene GAPDH.

## Supplements:

Table 1:

	ALPS#1	ALPS#2	reference
<b>Clinical phenotype</b>			
age (years)	7	4	
lymphadenopathy	+	+	
hepatosplenomegaly	+	+	
<b>Autoimmunity</b>			
Clinical features	thrombocytopenia		
Antibodies against	CD16, CD177, gpiib/iiia, gpia/ia	CD16, gpiib/iiia, gpia/ia	
<b>Immunological phenotype</b>			
DNT cells [% of CD3+ cells]	17,39	29,17	5
B220+ [DNT]	70,52	79,54	8-40
CD3+, CD25+ [%]	1,43	1,05	
CD3+, HLA-DR+ [%]	2,51	1,91	6,0-7,0
CD3+CD25/HLA-DR ratio	0,57	0,55	3
CD19+, CD27+ [%]	4,58	5,27	16
CD4/CD8 ratio	0,8	0,7	1,2-1,6
IgG [mg/dL]	4198	3657	572-1474
IgA [mg/dL]	491	984	34-305
IgM [mg/dL]	72	86	31-208
Vitamin B12 [pg/mL]	>2000	>2000	197-866

## Immunologic characteristics

Table 2:

## Primer:

	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Reference
<b>FASLG</b>			
Exon 1	TCCTCTTGAGCAGTCAGCAA	TGAAAAGCACTTTGCAAGC	none
<b>FAS</b>			
Exon 1	GGC CAA GTT GCT GAA TCA AT	GCC TGA GGG AAG GTC CTA AC	none
Exon 2	GGG TTA CAC TTG TTT ACC ACG TTG CTT ACT T	ATG GAG CCA AAT AGA CCA GTC TTC TCA TT	none
Exon 3	CCC CTC CCC TTG TGT TTT AGA AGA GTT TT	TTC TGC GGT ACC CTA GCC ACC TGT CCT	Niemela et al. 2006
Exon 4	CAG CTC CTG CCC ACC ATT TT	GGC AAA GCA GGA CTA GAA CCC TAA	Niemela et al. 2006

Exon 5/6	GGC CCC TAA TTT ACA AAG TGC	GCA TTC AGG GGC AAG AAA T	none
Exon 7	CAT TCT ACA AGG CTG AGA CCT GAG TTG ATA	CAG CCT GGG CTA TGG AGC AAG AC	Niemela et al. 2006
Exon 8	AGG CCG GAA CCT TTC AGA ATA AA	ATA ACA AGA TCC CAT AAT ATG TCA CTG AAA	Niemela et al. 2006
Exon 9	TTC CCC TAG TCA GCT CTT CAT	TAGCTGGCTGTAAATACTGCTTG	none

**Primer**

# **DEREGULATION OF FAS LIGAND EXPRESSION AS A NOVEL CAUSE OF AUTOIMMUNE LYMPHOPROLIFERATIVE SYNDROME LIKE DISEASE**

**Short title: Deregulation of FasL as a cause of ALPS-like disease**

Schafiq Nabhani<sup>1</sup>, Sebastian Ginzel<sup>1,2</sup>, Hagit Miskin,<sup>3</sup> Shoshana Revel-Vilk,<sup>4</sup> Dan Harlev,<sup>3</sup> Bernhard Fleckenstein,<sup>5</sup> Andrea Hönscheid<sup>1</sup>, Prasad T. Oommen<sup>1</sup>, Michaela Kuhlen<sup>1</sup>, Ralf Thiele,<sup>2</sup> Hans-Jürgen Laws,<sup>1</sup> Arndt Borkhardt,<sup>1</sup> Polina Stepensky,<sup>4\*</sup> and Ute Fischer<sup>1\*</sup>

\*PS and UF contributed equally to this manuscript.

<sup>1</sup>Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, University Children's Hospital, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany;

<sup>2</sup>Department of Computer Science, Bonn-Rhein-Sieg University of Applied Sciences, Sankt Augustin, Germany;

<sup>3</sup>Pediatric Hematology Unit, Shaare Zedek Medical Center, Jerusalem, Israel;

<sup>4</sup>Department of Pediatric Hematology-Oncology, Hadassah Hebrew University Medical Center, Jerusalem, Israel;

<sup>5</sup>Department of Clinical and Molecular Virology, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

Correspondence should be addressed to: Ute Fischer, Department of Pediatric Oncology, Hematology and Clinical Immunology, Center for Child and Adolescent Health, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany. Phone: 0049-211-811-6568, Fax: 0049-211-811-6436. E-mail: [ute.fischer@med.uni-duesseldorf.de](mailto:ute.fischer@med.uni-duesseldorf.de)

**Abstract**

Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) is frequently caused by mutations in genes involved in the Fas death receptor pathway (*FAS*, *FASLG* or *CASP10*), but for 20-30% the genetic defect is unknown. We observed that IL12 induces upregulation of FasL and FasL-dependent apoptosis in healthy T cells, whereas FasL-deficient T cells from ALPS patients lack this response. We hypothesized that defects in IL12 signaling may cause a similar phenotype as mutation of FasL. To test this, we analyzed 20 patients with classical ALPS symptoms and unknown genetic cause by whole-exome sequencing. A homozygous nonsense mutation (R212\*) in the IL12/IL23 receptor-component *IL12RB1* was identified in a patient who presented with classical ALPS symptoms (chronic non-malignant, noninfectious lymphadenopathy, splenomegaly, hepatomegaly, elevated DNT-cells, autoimmune cytopenias, increased vitamin B12, IL10 levels). Heterozygous mutation carriers were sub-clinically affected (e.g. DNT-cells moderately elevated). The mutation led to IL12RB1 protein truncation and loss of cell surface expression. IL12 and IL23 signaling was abrogated as demonstrated by deficient STAT4 phosphorylation and IFN $\gamma$  production. The apoptosis defect was upstream of the Fas receptor indicating a direct or indirect defect in FasL expression. Our data reveal deficient regulation of FasL expression by regulators such as IL12, as an alternative cause of ALPS like disease.

**Keywords:**

autoimmune lymphoproliferative disease, ALPS, IL12, IL12RB1, Fas ligand, IL23

## Introduction

The autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS, Canale-Smith syndrome) of early childhood<sup>1, 2</sup> is caused by disturbance of apoptotic signaling via the Fas death receptor pathway that primarily compromises lymphocyte homeostasis.<sup>3, 4</sup> Fas is a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. At the cell surface Fas is activated upon binding of its specific ligand (Fas ligand, FasL). This triggers the intracellular activation of caspase-8 and -10 to start a proteolytic cascade resulting in cell death.<sup>5</sup> Due to deficient apoptosis T lymphocytes are inefficiently cleared resulting in chronic lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, autoimmune cytopenias, elevated numbers of terminally differentiated, activated, otherwise rare double negative T cells (DNT cells; CD3+, TCR $\alpha/\beta$ + CD4-CD8-). Malignancies, especially B cell lymphomas, may develop later in life.<sup>6</sup> ALPS is a genetically heterogeneous disease. Most patients harbor heterozygous, autosomal dominant or recessive FAS germline mutations (ALPS-FAS<sup>7</sup>), till now 97 unique

mutations are registered in the database of ALPS mutations of the National Institute of Allergy and Infectious Disease, [www.niaid.nih.gov](http://www.niaid.nih.gov)), but also somatic FAS mutations have been reported (ALPS-sFAS).<sup>6, 8-11</sup> A clinically more severe phenotype is the consequence of homozygous or compound heterozygous FAS mutations. Less frequently, FASLG mutations (ALPS-FASLG) or caspase-10 mutations (ALPS-CASP10) were detected.<sup>12</sup> Similar symptoms are caused by mutations in CASP8 (caspase-8 deficiency state, CEDS), KRAS or NRAS (RAS-associated ALPS-like disease, RALD). These cases are not classified as ALPS, because CEDS is additionally characterized by disturbance of T cell activation and immunodeficiency

and RALD by monocytosis.<sup>13-16</sup> For 20-30% of patients with the clinical picture of ALPS, however, the genetic cause is still unknown (ALPS-U).<sup>2</sup>

It is plausible that Fas pathway regulating factors may present novel ALPS causing candidates and potential drug targets. For instance, forced expression of Fas regulating miR-146a caused an immune disorder in transgenic mice similar to ALPS.<sup>17</sup> A factor known to regulate expression of both Fas and FasL is interleukin 12 (IL12).<sup>18-25</sup> The cytokine mediates its effects via binding to a heterodimeric receptor composed of the IL12 receptor  $\beta$ 1 (IL12RB1) and IL12RB2 and subsequent JAK/STAT signaling.<sup>26</sup> The IL12 receptor is mainly expressed on T lymphocytes and natural killer (NK) cells. IL12RB1 deficiency is associated with Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD).<sup>27-30</sup> MSMD predisposes affected individuals to mycobacterial infections (tuberculosis) due to disturbance of IL12/IL23/IFN $\gamma$  signaling. IL12RB1 also associates with IL23R to form the IL23 receptor. Phagocytic cells release both IL12 and IL23 in response to non-viral infections to induce the secretion of IFN $\gamma$  by T and NK cells leading to stimulation of phagocytes to eliminate intracellular pathogens and activation of IFN $\gamma$  secreting T helper cells. Knockout of IL12RB2 predisposes mice to spontaneous autoimmunity, lymphoproliferation and B cell malignancy.<sup>31</sup> In the present study we identified the IL12 signaling pathway that regulates FasL expression on activated T cells as a potential mediator in the pathogenesis of ALPS like disease.



## Methods

### *Patient cohort and DNA isolation*

26 ALPS patients, relatives and healthy controls were enrolled in the study. 4 unrelated patients harbored germline FAS mutations, <sup>2</sup> siblings had a homozygous truncating FASLG mutation (p.A69fsX\*138), 20 patients had no known mutation. All experiments were performed after obtaining written informed consent and were approved by the Ethical Review Boards of Hadassah, the Israeli Ministry of Health and the local Ethics committee of the University of Duesseldorf. MNCs were derived from peripheral blood by Ficoll (Biochrom AG, Berlin, Germany) density centrifugation. TCR $\alpha/\beta$ <sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> T lymphocytes (DNT cells) were magnetically selected employing the double negative T cell isolation kit (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany). Genomic DNA was isolated from whole blood or DNT cells using the DNA Blood kit (Qiagen, Hilden, Germany).

### *Whole-exome sequencing*

Next generation sequencing was carried out after targeted enrichment of whole exonic regions as described <sup>32</sup>. In brief, sequencing libraries of 350 to 400 bp fragments were generated from sheared genomic DNA. Exome capture was performed using SeqCap EZ Exome Library 2.0 kit (Roche/Nimblegen, Madison, WI). 100 bp single-read sequencing was performed on a HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA).

***Primary T cell culture***

Primary T cells were cultured in RPMI1640 (Life Technologies, Darmstadt, Germany) and Panserin 401 (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) mixed 1:1, supplemented with 10% FCS, 100 µg gentamycin (Life Technologies) and 30 U/ml IL2 (Miltenyi). They were activated with 7 µg/ml phytohemagglutinine (PHA, Life Technologies) for four days.

***Immunophenotyping and ELISA***

DNT cells in peripheral blood were measured using a FACSCalibur equipped with CellQuestPro software (Becton Dickinson) employing anti-CD3 and anti-TCR $\alpha\beta$  (both from Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Germany), anti-CD4 and anti-CD8 (both from Miltenyi) antibodies. Further antibodies were used for immunophenotyping: anti-B220, anti-HLA-DR, anti-CD27, anti-CD19, and anti-CD25 (all from BD) and anti-CD45R (Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Expression of Fas, FasL and II12RB1 was measured using anti-CD95 (BD), anti-CD178/FasL (Miltenyi) and anti-CD212-PE antibodies (BD). Levels of FasL, IL10 and IFN $\gamma$  in plasma and cell culture supernatant of activated T cells were measured by ELISA (R&D-Systems, Wiesbaden, Germany) employing an Infinite M200 microplate reader equipped with Magellan software (Tecan, Maennedorf, Switzerland). IFN $\gamma$  production was also measured after stimulation of primary and immortalized T cells with IL12, IL23 and IL2/IL27 (Miltenyi) as indicated.

***Measurement of apoptosis and IL12 induced Fas and FasL expression***

Primary T cells were activated, plated in 96 well plates at a density of  $10^6$  cells/ml on day 10 of culture and stimulated with increasing concentrations of recombinant *SuperFasL* (50-200 ng/ml, Enzo Life Sciences, Loerrach, Germany) or 1  $\mu$ M staurosporine (LC Laboratories, Woburn, MA) or were left untreated. After 24 h cells were stained with Annexin V-FITC (BD) and propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and apoptosis was measured by flow cytometry. IL12-induced apoptosis was measured after stimulation of activated T cells with IL12 (50-200 ng/ml, Miltenyi) in the presence of IL2 by Annexin V-FITC/PI staining. In parallel, IL12-induced upregulation of Fas and FasL expression was measured by FACS analysis. Further methods are detailed in the supplement.

## Results

### ***IL12 induces upregulation of FasL and FasL-dependent apoptosis in healthy T-cells, whereas FasL-deficient T-cells from ALPS patients lack this response.***

Of the 26 analyzed ALPS cases 20 patients had no known mutation. Four unrelated patients harbored heterozygous germline mutations in the death domain of the Fas receptor (p.Q282K, p.R249G, p.NVQ265-267KQT) or the extracellular domain (p.R101C), respectively. Two siblings had a homozygous truncating FASLG mutation (p.A69fsX\*138) that led to complete loss of FasL surface expression (Figure 1A). In contrast, heterozygous carriers showed a similar expression of FasL compared to healthy controls indicating haplosufficiency of FasL. In response to prolonged IL12 treatment healthy T cells upregulated FasL (Figure 1B) and died apoptotically (Figure 1C). In spite of normal expression of IL12 receptor components (Supplemental Figure 1) this response was completely lacking in the two individuals harboring the p.A69fsX\*138 mutation indicating that IL12 induced apoptosis is FasL dependent. Downstream of the Fas receptor these patients and the heterozygous carrier had a functional apoptotic pathway as could be demonstrated by the response of their primary T cells *in vitro* to application of recombinant FasL to the cell culture medium (Figure 1D). These results suggest that IL12 induces FasL dependent apoptosis and that T cells deficient in FasL expression or IL12 signaling may be protected against this physiological apoptosis trigger.

***Identification of a homozygous Arg212\* mutation in the IL12RB1 gene***

To analyze whether mutations in IL12 related pathways or genes may cause a phenotype similar to ALPS, we sequenced the exomes of 20 ALPS patients with classical ALPS symptoms, but unknown genetic cause, and their relatives. Sanger sequencing of all exons and exon/intron boundaries of FAS, FASLG and CASP10 was used to exclude classical disease-causing germline or somatic mutations.

By whole-exome sequencing we identified an IL12RB1 mutation in one of the ALPS families. A KEGG-based protein interaction analysis interface of our in-house developed proprietary MySQL database driven workbench (termed Single Nucleotide Polymorphism Database, SNUPy) gave this candidate disease causing mutation highest priority because of its predicted interaction with FasL (Figure 2A, Supplemental Figure 2). None of the other genes interacted with FasL, Fas, Caspase-10 or other immediate components of the signaling cascade. STRING 9.1<sup>33</sup> was used to identify high confidence ( $\geq 0.900$ ) interaction partners of the Fas pathway.

The mutation on chromosome 19:18186625 corresponded to c.698 G>A, p.R212\* of IL12RB1 and led to a stop codon gain and premature truncation of the receptor component in its extracellular domain (Supplemental Table 4, Figure 2B). Sanger sequencing of IL12RB1 revealed that parents and siblings were heterozygous mutation carriers, whereas the patient was homozygous (Figure 2C, D). This mutation was not observed previously, neither in 1000 Genomes, HapMap, Exome Variant Server (NHLBI GO Exome Sequencing Project, Seattle WA;

<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) data sets nor in our in-house database of >300 whole-exome data sets.

As the mutated sequence seemed to encode a truncated protein that lacks the transmembrane domain necessary for membrane anchorage, we carried out FACS analyses of the patient's lymphocytes to test for IL12RB1 expression on the cell surface. To this end, primary lymphocytes from the patient and healthy individuals were stimulated for 4 days with PHA/IL2. Whereas lymphocytes from healthy individuals upregulated IL12RB1 surface expression, IL12RB1 was absent in the patient's lymphocytes (Figure 2E). To confirm the lack of full-length IL12RB1 expression we performed immunoblot analysis employing an antibody directed against the C-terminal region of IL12RB1. T-lymphocytes from the patient and healthy controls were immortalized using Herpes virus saimirii. Cells were lysed and western blot analysis carried out. Expression was further compared to freshly isolated donor lymphocytes as well as lymphocyte cell lines. Full-length IL12RB1 expression was absent from the patient derived cells (Figure 2F and data not shown).

***The homozygous Arg212\* mutation in the IL12RB1 gene was associated with an ALPS-like phenotype***

The male patient harboring the homozygous IL12RB1 R212\* mutation originated from a consanguineous family of Palestinian descent. He was referred in 1996 at the age of four because of suspicion of lymphoma. In the follow up of this patient for more than 16 years he presented with classical clinical features for the diagnosis of ALPS (Table 1, Figure 3A). The two required criteria for ALPS (1. chronic non-

malignant, noninfectious lymphadenopathy and splenomegaly and 2. elevation of DNT cells) were both fulfilled. DNT cells were persistently increased (Table 1, Figure 3B). In addition, the patient exhibited typical secondary characteristics such as hepatomegaly, autoimmune cytopenias (hemolytic anemia) with polyclonal hypergammaglobulinemia, persistently elevated vitamin B12 and IL10 levels. He had one short episode of Salmonella bacteria group B infection at the age of 11 that did not recur. No indication of active mycoplasma or viral (Epstein-Barr- Virus, Cytomegalovirus, Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis B and C Virus) infection was apparent.

The heterozygous parents and siblings appeared clinically normal, although immune phenotyping revealed increased DNT cell counts in two of them (Table 2) suggesting haploinsufficiency. In vitro the apoptotic response of the patient's lymphocytes to addition of recombinant FasL to the cell culture media and a classical apoptosis inducing agent (staurosporine) was similar compared to age and gender matched healthy blood donors demonstrating functional apoptotic signaling downstream of the Fas receptor (Figure 3C, Table 1) and indicating a FasL or an upstream defect. To analyze whether the defect in IL12RB1 impacts on Fas signaling, we first tested protein expression of FasL. Activation and expansion of T cells usually leads to upregulation of Fas signaling pathway components. However, in the absence of IL12RB1 expression the patient's T lymphocytes showed a significantly lower expression of both membrane bound and soluble FasL protein compared to healthy controls (Figure 3D, E, F).



***The IL12RB1 Arg212\* mutation abrogates responsiveness of T cells to IL12***

To test whether lack of IL12RB1 expression impacts on IL12 signaling we analyzed phosphorylation of STAT4, a crucial downstream component of the pathway (Figure 4A). To this end, we incubated activated T lymphocytes from the patient and a healthy control with or without IL12 (200 ng/ml) for up to 72 hours. Immunoblot analyses of total and phosphorylated STAT4 protein demonstrated an increase in serine 721 phosphorylated STAT4 in lymphocytes of the healthy control. In contrast, this response was completely absent in the patient's lymphocytes indicating deficient IL12 signaling.

STAT4 activation eventually leads to transcription and production of interferon (IFN $\gamma$ ). To test if this is deficient in the patient we measured the induction of IFN $\gamma$  transcription by RealTime PCR after 24 and 48 h of treatment with IL12 (Figure 4B). Whereas the wildtype control rapidly and strongly upregulated IFN $\gamma$  by about 500 fold, there was no response in the IL12RB1 R212\* cells. This could be confirmed on protein level employing ELISA (Figure 4C). The cells were stimulated with IL12, IL23 or IL2/IL27, respectively. In contrast to wildtype T cells, there was no response of the IL12RB1 R212\* cells to treatment with

either IL12 or IL23. An upregulation of IFN $\gamma$  was only detectable after treatment with IL27 that uses a different receptor. Similarly, FasL mRNA levels analyzed by Real Time PCR (Figure 4D) and FasL protein expression analyzed by FACS (Figure 4E) were not induced in response to IL12 treatment in the IL12RB1 R212\* cells, in contrast to the wildtype control.

In addition, we tested the responsiveness of the patient's primary lymphocytes to apoptosis mediated by prolonged IL12 treatment (Figure 4F). Activated T cells were treated with IL12 (50 - 200 ng/ml) for up to 6 days. Specific apoptosis measured by Annexin V-FITC staining was induced upon incubation with 50 and 100 ng IL12/ml in the healthy controls, but not in the patient's cells. At high concentrations (200 ng IL12/ml) specific apoptosis occurred to a lesser extent also in the patient sample. This may be attributed to the low affinity binding of IL12 via IL12RB2 that is still expressed on the cells.

## Discussion

Although ALPS is frequently caused by mutations in known genes, such as *FAS*, *FASLG* or *CASP10*, in 20-30% of cases the defect is still unknown. It is highly likely that defects in or overexpression of regulators of these genes such as miR-146a<sup>17</sup> could result in an ALPS like phenotype and account for a not yet defined percentage of ALPS-U cases. In the present study we identified an IL12RB1 mutation and the IL12 signaling pathway as such an alternative cause of an ALPS like phenotype by regulation of FasL expression. Previously it was shown that activation of T and NK cells by IL12 results in upregulation of FasL<sup>18-21, 23, 34</sup>. In particular, Yu et al. showed that dendritic cell derived IL12 is involved in upregulation of FasL on NK cells leading to cell death<sup>20</sup>. Moreover, in the absence of antigen, IL12 induces apoptosis of T cells via upregulation of FasL that can be blocked by anti-FasL antibodies<sup>21</sup>. In line, we found that primary human T cells deficient in FasL expression were resistant to apoptosis induced by IL12. In vivo models demonstrated that IL12 induces apoptosis

of CD8+ tumor resident T-cells via FasL and showed that IFN $\gamma$  was necessary for this effect <sup>34</sup>. IL12 also regulates Fas expression. Zhou et al. showed that IL12 specifically induces Fas promoter activity in breast carcinoma, osteosarcoma and Ewing tumor cells <sup>24</sup>. IL12 treatment stimulated NF $\kappa$ B, and the  $\kappa$ B-Sp1 motif (-195 to -286) in the Fas promoter sequence was essential for the activation of Fas. Lafleur et al. demonstrated that IL12 and IL12 gene transfer upregulate Fas expression on osteosarcoma and breast cancer cells <sup>25</sup>.

Thus, not unexpectedly we identified a homozygous stop mutation that led to loss of cell surface expression of the IL12/IL23 receptor component IL12RB1 in a patient presenting with classical ALPS symptoms in the absence of germline or somatic mutations in known ALPS genes. The patient presented with chronic non-malignant, noninfectious lymphadenopathy, splenomegaly, hepatomegaly, persistent elevation of DNT cells, autoimmune cytopenias with polyclonal hypergammaglobulinemia, persistently increased vitamin B12 and IL10 levels.

It might be reasoned that the observed autoimmunity and lymphoproliferation are likely a side-effect of recurrent infections, because IL12RB1 mutations have previously been associated with a predisposition to mycobacterial infections. However, the patient experienced only one non-recurrent episode of infection with *Salmonella* in 16 years of follow-up arguing against a secondary effect. Consistently, it was recently demonstrated employing an IL12RB2 knockout mice model that lack of IL12 signaling predisposes to spontaneous lymphoproliferation, autoimmunity and B cell lymphoma <sup>31</sup>. This phenotype was not caused by infections, because the mice were kept under pathogen-free conditions. However, infections are not an uncommon finding also in ALPS patients especially after splenectomy <sup>35</sup> and *Salmonella spp.* S. Nabhani et al. Deregulation of FasL as a cause of ALPS-like disease

and *Klebsiella pneumoniae* infection have also been observed by Del Rey et al.<sup>36</sup> in a FasL deficient patient. In addition, a case of ALPS-like syndrome with mycobacterial infection was reported<sup>37</sup>. Interestingly, Guerra et al. demonstrated that IL12 mediated upregulation of FasL and CD40L was involved in the control of mycobacterium tuberculosis growth by activated natural killer cells<sup>38</sup>.

Therefore, deficiency in both IL12 and FasL expression can contribute to susceptibility to infection. Previous analysis of patients with IL12RB1 mutations demonstrated deficient IL12/JAK/STAT signaling (as could be confirmed for the patient analyzed here), lack of resulting IFN $\gamma$  production by T and NK cells as well as deficient IL23 signaling and low levels of IL17 producing T cells<sup>39</sup>. A similar phenotype is described for targeted IL12RB1 knockout mice<sup>40</sup>. In humans the clinical penetrance of IL12RB1 mutations varies. Heterozygous human carriers appear clinically normal with normal IL12/IL23 signaling and IFN $\gamma$  production<sup>29</sup>. However, in two individuals of the analyzed family DNT cell numbers were slightly increased indicating possible effects of the heterozygous mutation on ALPS characteristics. We also detected increased numbers of DNT cells (14% of gated CD3 cells) in a patient with a complete loss of IFN $\gamma$ R2 expression, however, in this case it could not be ruled out that this increase was a response to his recurrent infections (data not shown).

Our report demonstrates for the first time, that loss of IL12RB1 expression in a patient leads to reduced upregulation of FasL and loss of the apoptotic response of T cells to prolonged treatment with IL12. In addition, the general level of FasL expression in activated T cells and the level of secreted FasL was lower in the patient compared to controls. Lower levels of FasL expression in the patient could possibly be attributed to lack of IFN $\gamma$ , because transcription of the *FASLG* promoter is

S. Nabhani et al. Deregulation of FasL as a cause of ALPS-like disease

amongst others positively regulated by the interferon-regulatory factors IRF-1 and IRF-2<sup>41</sup>. IL12 is known as a T cell stimulating factor, which can stimulate the growth and function of T cells and e.g. the differentiation of naive T cells to Th1 cells. However, prolonged stimulation of T cells with IL12 leads to apoptosis and stimulation of T cells with IL12 during activation enhances the tendency to undergo Fas-mediated activation induced cell death (AICD) due to upregulation of FasL and downregulation of the inhibitor FLIPS<sup>22</sup>. Therefore, absence of IL12 signaling similar to defective Fas/FasL signaling could lead to decreased T cell death and accumulation of autoreactive T cells. In addition, it has been shown that low levels of IL12 drive the differentiation of activated T cells to long-lived self-renewing memory CD8 T cells rather than short-lived effector cells when acute infections resolve<sup>42</sup>. This was dependent on IL12 controlled expression of T-bet and reflected in the phenotype of T-bet knockout mice<sup>42, 43</sup>.

In conclusion, our results identify IL12RB1 as a new gene and IL12 signaling as a new pathway involved in the pathogenesis of ALPS like disease. It would be interesting to comprehensively analyze identified patients with IL12RB1 mutations (or IL12 deficiency) as well as IL12RB1 knockout mice with respect to ALPS-like symptoms in follow-up studies. So far, screening for ALPS in a typical clinical set-up focuses on phenotypic criteria, sequencing of classical genes and occasionally apoptosis tests. Our data suggest to measure FasL by ELISA as recommended by the 2009 NIH International Workshop<sup>7</sup> or to include measurement of FasL expression on activated T cells by FACS in order to identify ALPS or ALPS like disease caused by FasL or by regulatory FasL deficiency.

## **Authorship and Disclosures**

SN performed laboratory work, designed research and analyzed data; SG and RT developed and performed bioinformatics analyses; HM, SR-V, DH, H-JL, PS, MK, PTO, AH recruited the probands, analyzed clinical data and performed laboratory work; BF performed laboratory work, AB designed research and wrote the paper, PS and UF were the principal investigators and take primary responsibility for the paper. They designed research, analyzed data and wrote the paper.

The authors report no potential conflicts of interest.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank Monika Schmidt for excellent technical assistance and the colleagues from the Biomedical Research Center (BMFZ, University of Duesseldorf) for providing support and carrying out the Sanger sequencing analyses.

## References

1. Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr.* 1967;70(6):891-9.
  2. Fleisher TA, Oliveira JB. Monogenic defects in lymphocyte apoptosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2013;12(6):609-15.
  3. 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;81(6):935-46.
  4. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science.* 1995;268(5215):1347-9.
  5. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):76-100.
  6. 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;118(18):4798-807.
  7. 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.* 2009;116(14):e35-40.
  8. Holzelova E, Vonarbourg C, Stolzenberg MC, Arkwright PD, Selz F, Prieur AM, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Engl J Med.* 2004;351(14):1409-18.
  9. 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;115(25):5164-9.
  10. Magerus-Chatinet A, Neven B, Stolzenberg MC, 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;121(1):106-12.
  11. 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;98(3):389-92.
  12. Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, 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;98(1):47-58.
  13. Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature.* 2002;419(6905):395-9.
- S. Nabhani et al. Deregulation of FasL as a cause of ALPS-like disease



14. 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;104(21):8953-8.
  15. 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;117(10):2883-6.
  16. 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;117(10):2887-90.
  17. Guo Q, Zhang J, Li J, Zou L, Zhang J, Xie Z, et al. Forced miR-146a expression causes autoimmune lymphoproliferative syndrome in mice via downregulation of Fas in germinal center B cells. *Blood*. 2013;121(24):4875-83.
  18. Mori S, Jewett A, Murakami-Mori K, Cavalcanti M, Bonavida B. The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent. *Cancer Immunol Immunother*. 1997;44(5):282-90.
  19. Leite-de-Moraes MC, Herbelin A, Gouarin C, Koezuka Y, Schneider E, Dy M. Fas/Fas ligand interactions promote activation-induced cell death of NK T lymphocytes. *J Immunol*. 2000;165(8):4367-71.
  20. Yu Y, Hagihara M, Ando K, Gansuud B, Matsuzawa H, Tsuchiya T, et al. Enhancement of human cord blood CD34+ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells. *J Immunol*. 2001;166(3):1590-600.
  21. Fan H, Walters CS, Dunston GM, Tackey R. IL-12 plays a significant role in the apoptosis of human T cells in the absence of antigenic stimulation. *Cytokine*. 2002;19(3):126-37.
  22. von Rossum A, Krall R, Escalante NK, Choy JC. Inflammatory cytokines determine the susceptibility of human CD8 T cells to Fas-mediated activation-induced cell death through modulation of FasL and c-FLIP(S) expression. *J Biol Chem*. 2011;286(24):21137-44.
  23. Kitaura H, Nagata N, Fujimura Y, Hotokezaka H, Yoshida N, Nakayama K. Effect of IL-12 on TNF-alpha-mediated osteoclast formation in bone marrow cells: apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interaction. *J Immunol*. 2002;169(9):4732-8.
  24. Zhou Z, Lafleur EA, Koshkina NV, Worth LL, Lester MS, Kleinerman ES. Interleukin-12 up-regulates Fas expression in human osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells by enhancing its promoter activity. *Mol Cancer Res*. 2005;3(12):685-91.
  25. Lafleur EA, Jia SF, Worth LL, Zhou Z, Owen-Schaub LB, Kleinerman ES. Interleukin (IL)-12 and IL-12 gene transfer up-regulate Fas expression in human osteosarcoma and breast cancer cells. *Cancer Res*. 2001;61(10):4066-71.
  26. van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(12):739-49.
- S. Nabhani et al. Deregulation of FasL as a cause of ALPS-like disease

27. Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile JF, Lamhamedi S, Le Deist F, et al. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science*. 1998;280(5368):1432-5.
28. de Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, Boer T, van Breda Vriesman PJ, et al. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science*. 1998;280(5368):1435-8.
29. Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E, Feinberg J, Bustamante J, Breiman A, et al. Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency: medical and immunological implications. *J Exp Med*. 2003;197(4):527-35.
30. Fieschi C, Bosticardo M, de Beaucoudrey L, Boisson-Dupuis S, Feinberg J, Santos OF, et al. A novel form of complete IL-12/IL-23 receptor beta1 deficiency with cell surface-expressed nonfunctional receptors. *Blood*. 2004;104(7):2095-101.
31. Airoidi I, Di Carlo E, Cocco C, Sorrentino C, Fais F, Cilli M, et al. Lack of IL12rb2 signaling predisposes to spontaneous autoimmunity and malignancy. *Blood*. 2005;106(12):3846-53.
32. Chen C, Bartenhagen C, Gombert M, Okpanyi V, Binder V, Rottgers S, et al. Nextgeneration-sequencing-based risk stratification and identification of new genes involved in structural and sequence variations in near haploid lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(6):564-79.
33. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D808-15.
34. Kilinc MO, Rowswell-Turner RB, Gu T, Virtuoso LP, Egilmez NK. Activated CD8+ T effector/memory cells eliminate CD4+ CD25+ Foxp3+ T-suppressor cells from tumors via FasL mediated apoptosis. *J Immunol*. 2009;183(12):7656-60.
35. Neven B, Bruneau J, Stolzenberg MC, Meyts I, Magerus-Chatinet A, Moens L, et al. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome is associated with deficiency in antipolysaccharide antibodies production and a disorganisation of the spleen marginal zone. *Blood*. 2014.
36. 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;108(4):1306-12.
37. Hong YH, Lee CK. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like syndrome presented as lupus-like syndrome with mycobacterial joint infection evolved into the lymphoma. *Rheumatol Int*. 2009;29(5):569-73.
38. Guerra C, Johal K, Morris D, Moreno S, Alvarado O, Gray D, et al. Control of Mycobacterium tuberculosis growth by activated natural killer cells. *Clin Exp Immunol*. 2012;168(1):142-52.

S. Nabhani et al.

Deregulation of FasL as a cause of ALPS-like disease

39. van de Vosse E, Haverkamp MH, Ramirez-Alejo N, Martinez-Gallo M, Blancas-Galicia L, Metin A, et al. IL-12Rbeta1 deficiency: mutation update and description of the IL12RB1 variation database. *Hum Mutat.* 2013;34(10):1329-39.
40. Miller HE, Robinson RT. Early control of *Mycobacterium tuberculosis* infection requires il12rb1 expression by rag1-dependent lineages. *Infect Immun.* 2012;80(11):3828-41.
41. Chow WA, Fang JJ, Yee JK. The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells. *J Immunol.* 2000;164(7):3512-8.
42. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, et al. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity.* 2007;27(2):281-95.
43. Takemoto N, Intlekofer AM, Northrup JT, Wherry EJ, Reiner SL. Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. *J Immunol.* 2006;177(11):7515-9.
44. Prando C, Samarina A, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Cobat A, Picard C, et al. Inherited IL-12p40 deficiency: genetic, immunologic, and clinical features of 49 patients from 30 kindreds. *Medicine (Baltimore).* 2013;92(2):109-22.
45. Cardenes M, Angel-Moreno A, Fieschi C, Sologuren I, Colino E, Molines A, et al. Oesophageal squamous cell carcinoma in a young adult with IL-12R beta 1 deficiency. *J Med Genet.* 2010;47(9):635-7.

## Tables

**Table 1: The IL12RB1 deficient patient's clinical and laboratory data**

Trait	Patient's values	Norm values	Unit/value
Age at presentation	4		years
Gender	Male		
Clinical findings on presentation	Lymphadenopathy, splenomegaly, hepato-megaly, night sweats, pruritus	none	na
Clinical findings during the course	Progressive lymphadenopathy and splenomegaly, arthralgia, skin rash (leukocytoclastic vasculitis), livido reticularis	none	na
Laboratory findings during the course	Anemia, intermittent leukocytosis, polyclonal hypergammaglobulinemia	none	na
Detected infections	One episode of <i>Salmonella ssp.</i> (lymph nodes) and another episode of <i>Helicobacter pylori</i> infection	none	na
Autoantibodies	ASCA, Anti-smooth muscle (+1), Coombs (1+), ANA (1:100), Rheumatoid factor (182), Microcytic anemia (MCV 63)	negative	na
HgB	9	12-16	gr/dl
DNT	Chronically elevated, 8-27	<2.5	%, (range, PB)
B220+	92	<60	% (of DNTs)
CD3+CD25+/HLA-DR+	0.58	>1	(ratio)
CD27+	12%	>15%	% (of B-cells)
Vitamin B12	618-1002	200-800	pg/ml (range)
Thrombocytes	510	150-450	x1000/ $\mu$ l
Neutrophils	9,7	2.5-7.5	x1000/ $\mu$ l
Plasma IL10	45	<20	pg/ml
sFasL	<60	$\leq$ 200	pg/ml

(Abbreviations: na, not applies; ASCA, ANA, anti-nuclear antibodies HgB, hemoglobin; DNT, double negative T-cells; recFasL, recombinant FasL; sFasL, soluble FasL.)

**Table 2: Immunophenotyping of heterozygous mutation carriers.**

Parameter	Father	Mother	Sibling	Sibling	Patient	Norm values
<b>DNT cells [CD3+]</b>	1,04%	2,76%	3,6%	1,74%	8-27%	<2.5%
<b>B220+ cells [DNT]</b>	40%	24,11%	12,79%	5,26%	92%	<60%
<b>CD25+/HLA-DR+ ratio</b>	0,98	3,9	1,2	4,7	0.58	>1
<b>CD27+ cells [CD19+]</b>	18,65%	33%	12,47%	12,5%	12%	>15%

(The gated populations are indicated in brackets. In red values deviating from norm values are presented.)

**Table 3: Presentation of disease associated features of ALPS or MSMD, respectively, in the described clinical picture of the other syndrome.**

<b>ALPS/ALPS-like -specific criteria</b>	<b>MSMD</b>	<b>Reference</b>
chronic lymphadenopathy	-	
chronic splenomegaly	-	
chronic hepatomegaly	-	
increased DNT cells	+	
increased B220+ cells	-	
CD3+CD25+/HLA-DR+ >1	-	
low CD27+ cells	-	
increased vitamin B12	-	
increased IL10	-	
increased sFasL	-	
decreased IL12	+	[220]
lymphoma	-	
other tumors	+ (OSCC)	[221]
<b>MSMD-specific criteria</b>	<b>ALPS/ALPS-like</b>	<b>Reference</b>
<i>Mycobacterium bovis</i> (bacille Calmette-Guérin, BCG)	+	[222]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-	
<i>Salmonella</i> ssp. (typhoidal and non-typhoidal)	+	[95]
<i>Klebsiella</i> ssp.	-	
<i>Nocardia</i> ssp.	-	
<i>Candida albicans</i>	-	
low IFN $\gamma$	+	

(Abbreviations: OSCC, oral squamous cell carcinoma)

## Figure legends

**Figure 1:** (A) Premature truncation due to a homozygous nonsense mutation FasL p.A69fsX\*138 leads to loss of FasL protein expression on the cell surface of CD3<sup>+</sup> cells (indicated by solid black arrow). A heterozygous carrier expresses similar levels of FasL (green arrow) as the wildtype control (WT, black arrow, unfilled). Flow cytometric measurements of FasL on primary T cells after 4 days of treatment with PHA (7 µg/ml) in the presence of IL2 (30 U/ml) for 4 days are shown. (B) Individuals carrying the homozygous FasL p.A69fsX\*138 mutation are deficient in upregulation of FasL in response to IL12. Primary T cells of a healthy control, a heterozygous carrier and a patient with the homozygous FasL p.A69fsX\*138 mutation were activated as described in (A). FasL expression on CD3<sup>+</sup> cells was measured employing flow cytometry. Mean values and SD of a representative experiment are shown. (C) Cultivated patient's T cells undergo apoptosis after stimulation with IL12. T cells were activated as in (A). Apoptosis was induced by incubation with 100 ng/ml IL12 for two days and measured employing flow cytometric detection of Annexin V-FITC and PI. The difference in the apoptosis rate compared to an untreated control is depicted. (D) T cells were activated by PHA/IL2 treatment as described in (A). Apoptosis was triggered by application of 100 ng/ml recombinant FasL for 16 hours and apoptosis was measured as in (C).

**Figure 2:** The patient harbored a homozygous stop mutation in the IL12RB1 gene. (A) Detail of the network of interactions between members of the Fas pathway and IL12RB1. (The complete network is shown in Supplemental Figure 1.) STRING 9.1 was used as a resource for protein-protein interactions. High confidence links ( $\geq 0.900$ ) between proteins are shown. Members of the Fas signaling pathway are shown in blue. Gene products bearing homozygous mutations in the patient but not in unaffected family members are shown in red. IL12RB1 was the only candidate showing direct high confidence interaction with FasL. (B) Schematic drawing of the IL12RB1 protein comprising 1989 nucleotides coding for 662 amino acids. The patient's mutation led to a premature stop at codon 212 (exon 7, c.698G>A, p.R212\*; L, leader peptide; EC, extracellular domain; TM, transmembrane domain; IC, intracellular domain). Exons are separated by vertical bars and numbered from 1 to 17. (C) Capillary sequencing of IL12RB1 confirms a heterozygous mutation (A/G) in the parents and the siblings and a homozygous mutation (A/A) in the patient. Representative chromatograms are shown. (D) Family pedigree of the affected patient. The parents and two siblings were asymptomatic, heterozygous carriers of the IL12RB1 R212\* mutation. The patient represents the only affected, homozygous carrier of this mutation. The parents have known consanguinity. (E) Premature truncation leads to loss of cell surface protein expression of IL12RB1 in the patient. Flow cytometric measurement of IL12RB1 surface expression in primary lymphocytes of the patient (filled black histogram) compared to a healthy control (unfilled histogram) after 4 days of treatment with PHA and IL2 as described in Figure 1A. (F) Immunoblot analysis of IL12RB1 protein expression. Protein extracts were prepared from HVS-immortalized T-lymphocytes from the patient and a healthy control.



Western blot analysis was carried out employing an IL12RB1 specific antibody using  $\beta$ -actin as a loading control.

**Figure 3: The IL12RB1-deficient patient presented with classical clinical ALPS symptoms, but functional Fas death receptor signaling.** (A) Splenomegaly and lymphadenopathy of the patient demonstrated by computer tomography. Coronal reformatted image of the abdomen reveals significant splenomegaly (bidirectional dashed arrow) and enlarged retroperitoneal lymph nodes (arrows). (B) Elevated numbers of DNT cells (TCR $\alpha$ / $\beta$ <sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>) in the peripheral blood of the patient (*right panel*, lower right quadrant) compared to a healthy control (*left panel*). CD3<sup>+</sup> cells are shown. (C) Cultivated patient's T cells undergo apoptosis after stimulation with recombinant FasL. T cells were activated as described in Figure 1A. Apoptosis was induced by incubation with 100 ng/ml recombinant FasL for 16 hours. Apoptosis was measured as described in Figure 1C. Apoptotic cells are presented in the lower right quadrant. *Left panel*: untreated, *right panel*: treated patient's cells. (D) Cell surface expression of membrane bound FasL is lower in the patient's lymphocytes. Cells were activated by PHA and IL2 (as described in Figure 1A) and FasL surface staining of CD3<sup>+</sup> T cells measured by flow cytometry on day 4. (E) Soluble FasL (sFasL) concentrations were measured by ELISA. sFasL levels are lower in the supernatant of patient's cells after 4 days of PHA/IL2 treatment compared to control cells. (F) Measurement of sFasL in patient's and control's plasma shows lower sFasL concentrations in the patient's plasma compared to a healthy control.

**Figure 4: IL12 mediated signaling and apoptosis are disturbed in the patient's cells.** (A) Phosphorylation of STAT4 in response to IL12 stimulation is abrogated in the patient. T cells of the patient and a healthy control were activated with PHA and IL2 as described in Figure 1A. Cell lysates were prepared after 24, 48 and 72 h of incubation with 200 ng/ml IL12. Western Blot was carried out employing specific antibodies against total STAT4, phosphorylated STAT4 (serine 721) and  $\beta$ -actin as a loading control. (B) Primary T cells of the patient and a healthy control were activated by PHA and IL2 treatment and incubated with or without IL12 (100 ng/ml) for 24 or 48 h, respectively. RNA was then extracted and IFN $\gamma$  mRNA expression was measured by RealTime-PCR. The fold change compared to untreated controls is shown, GAPDH expression was used as an internal standard. Mean values of a representative experiment performed in triplicates and corresponding SDs are shown. (C) IFN $\gamma$  production after treatment of immortalized T cells with 100 ng/ml IL12, IL23 or IL2/IL27, respectively, for two days was measured by ELISA. IFN $\gamma$  production in response to IL12 or IL23 is lacking in homozygous IL12RB1 R212\* cells in contrast to control cells. IL2/IL27 treatment induces a slight increase in IFN $\gamma$  production in both wildtype and IL12RB1 mutated T cells. (D) Primary T cells of the patient and a healthy control were activated by PHA and IL2 treatment and incubated with or without IL12 (100 ng/ml) for 2 days. RNA was then extracted and FasL mRNA expression was measured by RealTime-PCR (fold change compared to untreated control). (E) IL12 induced upregulation of FasL expression was measured in T cells by flow cytometry after activation with PHA and IL2, and stimulation with IL12 (50 or 200 ng/ml, respectively) for further 6 days. T cells of the patient lacked upregulation of FasL protein expression in response to IL12 compared to a healthy control. (F) Primary T cells derived from peripheral blood of the patient and a healthy control were activated and expanded by PHA and IL2 treatment and treated with 50, 100 or 200 ng/ml

IL12, respectively, for 3 days. Apoptosis was measured as described in Figure 1C. The bar diagram represents apoptosis specifically induced by IL12 treatment compared to untreated controls (mean values and SDs of a representative experiment performed in duplicate).

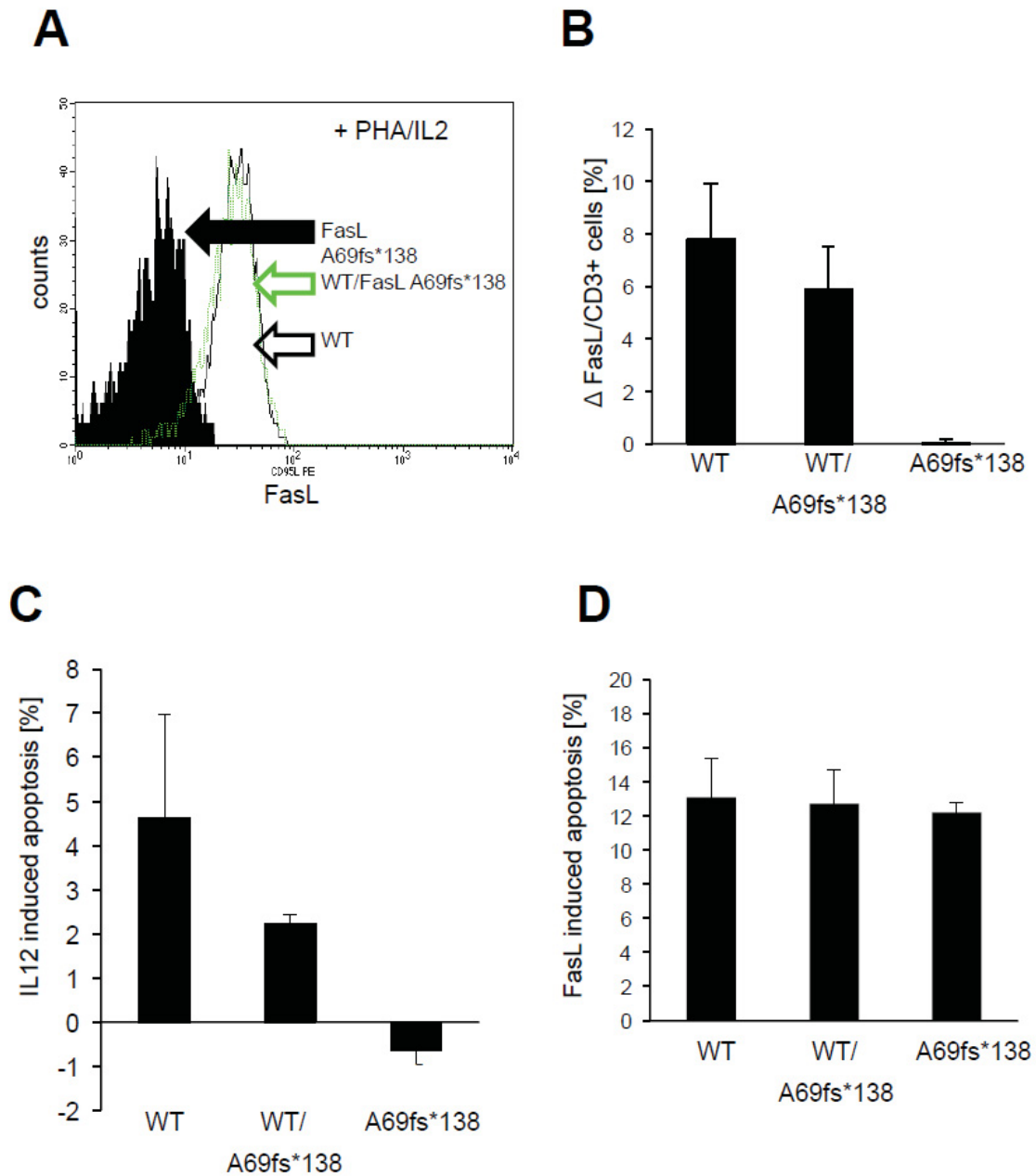


Figure 1: Nabhani *et al.*

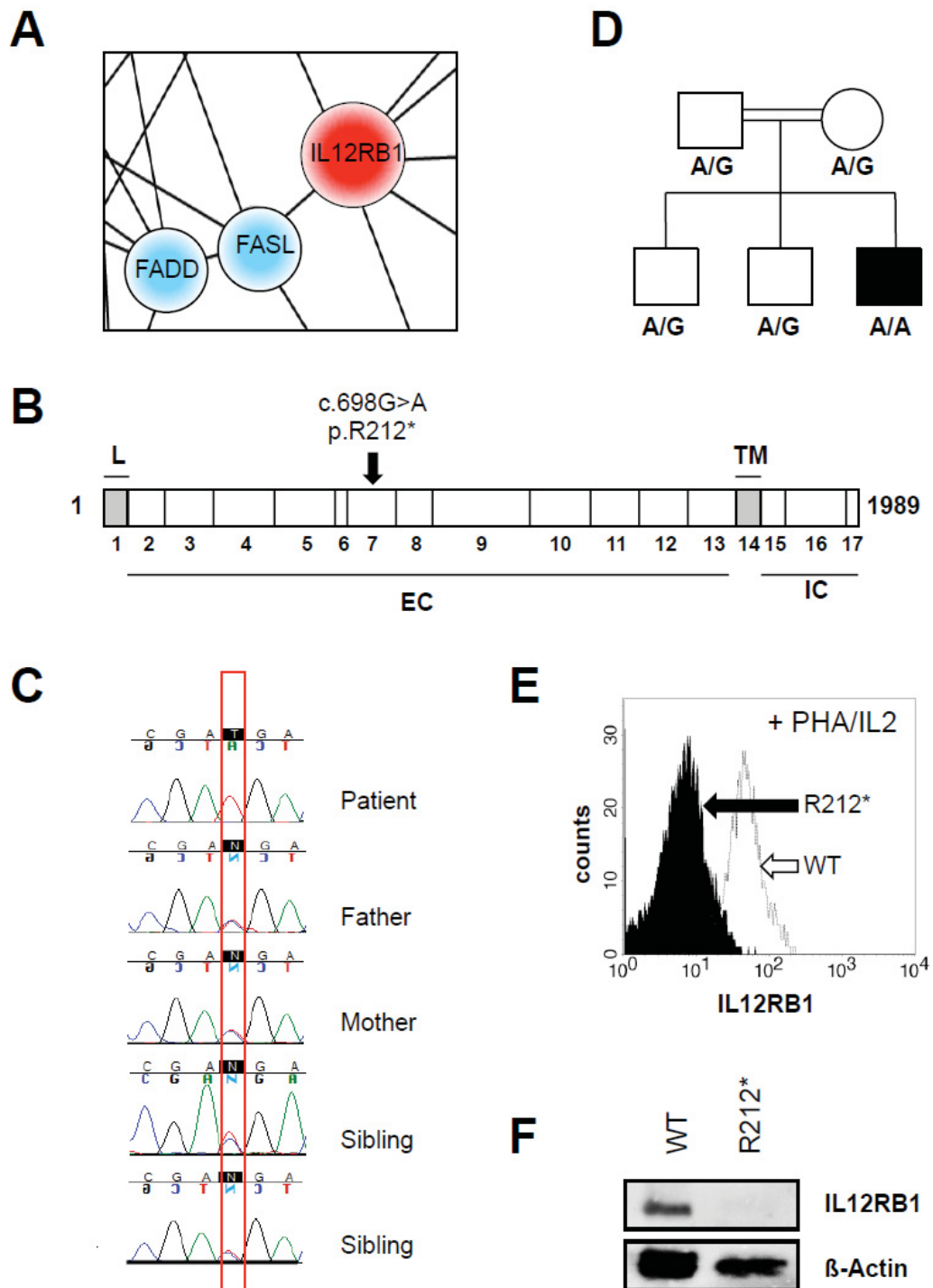


Figure 2: Nabhani *et al.*

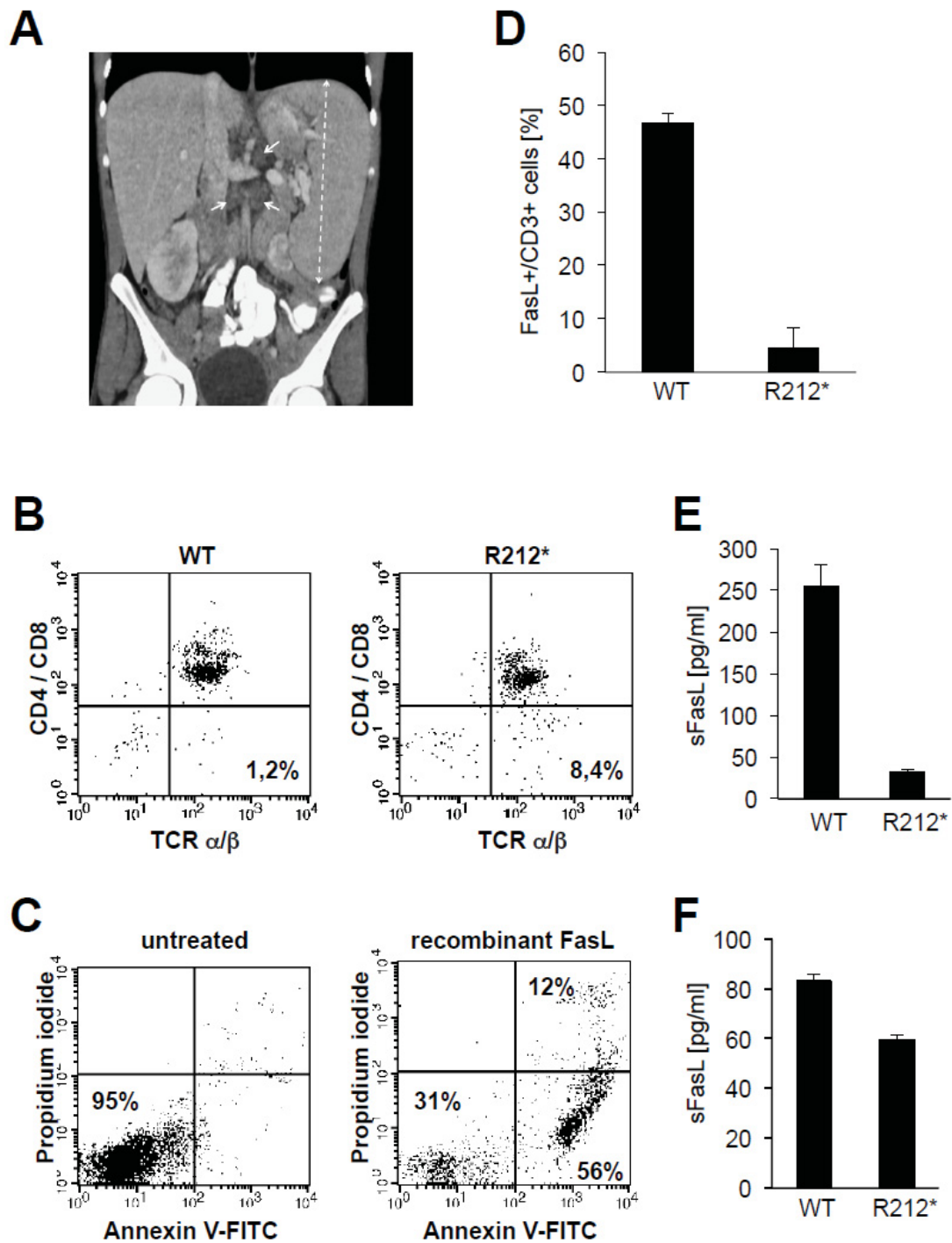


Figure 3: Nabhani *et al.*

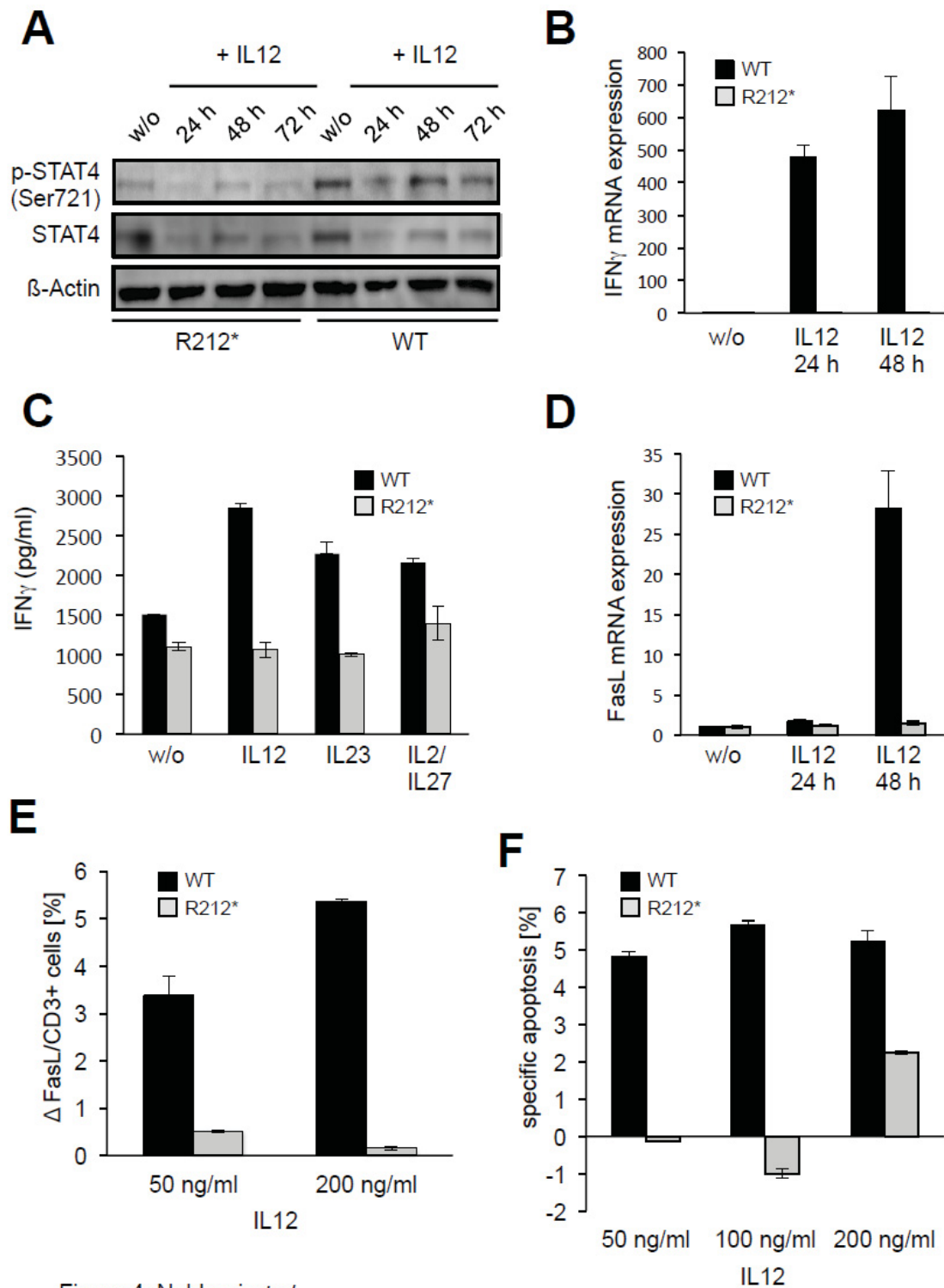


Figure 4: Nabhani *et al.*

## Supplement

### Supplementary Methods

#### ***Sanger sequencing of germline and somatic mutations in classical ALPS genes***

Exons including exon/intron borders of FAS, FASLG and CASP10 were amplified by PCR employing the Phusion High Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs), specific forward and reverse primers (listed in Supplemental Table 1, 0.5  $\mu$ M each) and 20 ng of template DNA. Cycling conditions: 30 seconds at 98°C followed by 30 cycles of 7 seconds at 98°C, 23 seconds at 55-65°C, 30 seconds at 72°C and a final extension of 10 minutes at 72°C. Capillary sequencing was carried out by a core facility at the BMFZ (Biological and Medical Research Center, University of Duesseldorf).

#### ***Validation of the IL12RB1 sequence variation***

Validation of the SNV in the IL12RB1 gene was performed by PCR/Sanger sequencing using genomic DNA from the patient and family members. A 485 bp fragment was amplified by PCR employing the Phusion High Fidelity PCR Master Mix. IL12RB1 exon 7 primers (forward primer 5' GAT CCT GGA GGC CCT AAG AG 3' and reverse primer 5' CCC AGC CCC ATT TTA TTT TA 3', 0.5  $\mu$ M each) and 20 ng of template DNA. Cycling conditions: 30 seconds at 98°C followed by 30 cycles of 7 seconds at 98°C, 23 seconds at 60°C, 30 seconds at 72°C and final extension of 10 minutes at 72°C. Capillary sequencing was carried out by the BMFZ core facility. The SNV was visualized using sequencer software (Gene Codes, Ann Arbor, MI).

***Immortalization of primary B and T lymphocytes***

Immortalized B cell lines were generated by transformation with Epstein-Barr virus (EBV) (ATCC, Wesel, Germany) as described previously<sup>1</sup> and cultured in RPMI1640 supplemented with 20% FCS, 2 mM L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies). Immortalized T cells were generated by HVS (Herpes Virus Saimiri) transformation as described before.<sup>2</sup>

***Immunoblotting***

Cells were lysed in buffer containing 1% NP-40, 50 mM Tris, pH 7.5, 350 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche). Proteins were separated on 8-15% polyacrylamide gels, transferred to polyvinylidene fluoride membranes and detected by chemiluminescence (GE Healthcare, Freiburg, Germany). The following primary antibodies were used: anti- $\beta$ -actin (clone AC-74, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and anti-IL12RB1 (clone C-20), anti-STAT4 (clone C-20), anti-phospho-STAT4 (clone E2) all from Santa Cruz (Santa Cruz, CA).

***RealTime PCR***

RNA was isolated from primary and immortalized T cells according to the manufacturer (RNeasy Blood kit, Qiagen, Hilden, Germany). cDNA was synthesized employing the QuantiTect Reverse Transcription kit and real time PCR was performed using QuantiTect primers for GAPDH, FasL and IFN $\gamma$  and the QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit according to the manufacturer's recommendation.



**Bioinformatic data analysis**

Sequencing data was aligned against the human reference genome hg19 (GRCh37, Supplemental Table 2). Exome sequencing data was converted using Samtools.<sup>3</sup> Variation calls were obtained employing GATK, HapMap, OmniArray and dbSNP134 datasets (The Broad Institute, Cambridge, MA).<sup>4</sup> Single nucleotide variations (SNVs), small insertions and deletions were annotated using Variant Effect Predictor,<sup>5</sup> based on the Ensemble database (v70). Variations were imported into a proprietary MySQL database driven workbench (termed Single Nucleotide Polymorphism Database, SNuPy). STRING 9.1<sup>6</sup> was used to identify high confidence ( $\geq 0.900$ ) interaction partners of the Fas pathway (Supplemental Table 3).

**Supplementary References**

1. Stepensky P, Saada A, Cowan M, Tabib A, Fischer U, Berkun Y, et al. The Thr224Asn mutation in the VPS45 gene is associated with the congenital neutropenia and primary myelofibrosis of infancy. *Blood*. 2013;121(25):5078-87.
2. Meinel E, Hohlfeld R. T cell transformation with Herpesvirus saimiri: a tool for neuroimmunological research. *J Neuroimmunol*. 2000;103(1-7).
3. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-9.
4. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011;43(5):491-8.
5. McLaren W, Pritchard B, Rios D, Chen Y, Flicek P, Cunningham F. Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics*. 2010;26(16):2069-70.
6. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D808-15.

## Supplementary Results

To identify candidate genes associated with the disease we carried out next generation sequencing. DNA samples of the patient and the parents were analyzed by whole-exome sequencing. 95,794 variants were called from the patient's sample. 5,394 of those affected genes involved in the CD95 interaction network. 534 were nonsynonymous variants called with high confidence (phred score >30). 186 were homozygous variants, 16 of those variants were rare in the healthy population (minor allele frequency, MAF, below 15% in HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) and 1000 Genomes ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)) data sets), and 6 were heterozygous in both healthy parents (Supplemental Table 4). Other nonsynonymous homozygous mutations not filtered by our criteria to be known interactors of the CD95 pathway are listed in Supplemental Table 3.

### ***Exclusion of other candidate genes***

Six candidate genes (BNIPL, TRAF3IP2, NCOR2, RBBP6, MAP2K2 and IL12RB1, Supplemental Table 3) were obtained after filtering. The RBBP6 splice donor site deletion (chr. 16:24564879-81, GTA>G, 2 bp deletion) was most likely neutral, because the adjacent nucleotides were synonymous to the deleted TA dinucleotide. Furthermore, the variant was frequently called with the same genotype in our in-house database of >300 whole-exome data sets. This database includes healthy controls, primary immune defects and tumor samples. Likewise, the missense mutation of MAP2K3 and the insertion in NCOR2 were frequently observed in this database. The p.C101R of MAP2K3 was then finally excluded because it was tolerable for protein function as predicted by the tools SIFT and Polyphen. The inframe insertion of NCOR2 was finally excluded because our database suggested that it could be a hotspot for triplet CAG extensions/deletions. The missense mutations of BNIPL1

and TRAF3IP2 were also included in our in-house database, but at lower frequency. Both mutations were predicted to be damaging to the protein function. Nevertheless, in the 1000 genomes database 24 and 21 healthy individuals had the same BNIPL1 or TRAF3IP2 genotype, respectively. In the database of the Exome Variant Server (NHLBI GO Exome Sequencing Project, Seattle WA; <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) 100 and 72 individuals had the same genotype, respectively. Therefore, BNIPL1 and TRAF3IP2 were excluded as potential disease-associated candidates.

## Supplemental Tables

**Supplemental Table 1: Sequences of used primers.**

Gene	Exon	Direction	Sequence (5'→3')	Ref.
Fas	1	fw	GGC CAA GTT GCT GAA TCA AT	none
		rv	GCC TGA GGG AAG GTC CTA AC	none
	2	fw	GGG TTA CAC TTG TTT ACC ACG TTG CTT ACT T	none
		rv	ATG GAG CCA AAT AGA CCA GTC TTC TCA TT	none
	3	fw	CCC CTC CCC TTG TGT TTT AGA AGA GTT TT	Niemela et al. 2006
		rv	TTC TGC GGT ACC CTA GCC ACC TGT CCT	Niemela et al. 2006
	4	fw	CAG CTC CTG CCC ACC ATT TT	Niemela et al. 2006
		rv	GGC AAA GCA GGA CTA GAA CCC TAA	Niemela et al. 2006
	5/6	fw	GGC CCC TAA TTT ACA AAG TGC	none
		rv	GCA TTC AGG GGC AAG AAA T	none
	7	fw	CAT TCT ACA AGG CTG AGA CCT GAG TTG ATA	Niemela et al. 2006
		rv	CAG CCT GGG CTA TGG AGC AAG AC	Niemela et al.

			2006
8	fw	AGG CCG GAA CCT TTC AGA ATA AA	Niemela et al. 2006
	rv	ATA ACA AGA TCC CAT AAT ATG TCA CTG AAA	Niemela et al. 2006
9	fw	TTC CCC TAG TCA GCT CTT CAT	none
	rv	TAGCTGGCTGTAAATACTGCTTG	none
<b>FasL</b>	1 fw	TCC TCT TGA GCA GTC AGC AA	none
	rv	TGA AAA GCA CTT TGC AAG C	none
2	fw	TCT TTC CAG GGC TTG GTT TA	none
	rv	TTC TGA ATT AGC CAG AAT TCC TC	none
3	fw	TGG ATT TAA ATT CCC ACC AAA	none
	rv	CCC AGA GAA TAG GGG ATC AA	none
4	fw	CAG CTG TCA TTC TGG GTG AA	none
	rv	TTG AAC CCT GTG GTC TCA AG	none
<b>Casp10</b>	2 fw	GGGCCATATGTCCTCACTCTC	none
	rv	CTCCCATCTCCACCACAGACC	none
3	fw	TGA AAG CAC TTG ATT GAT TAT GG	none
	rv	CAC CAA AGC CAA TGT TCG TA	none
4	fw	TGAGTGGATAATCAATAGGCAAGT	none
	rv	GTCCAAGTTAGCAATCACAAGC	none
5	fw	GCCTTGGTGTGTTGCTTCAGTAT	none
	rv	GGGCCTCTCTCTCTTTTTCTTT	none
6	fw	GTCCTTCCCTGCATCAAGTC	none
	rv	CCCTACCATAACCGATCTAAGTTGT	none
7	fw	TGGGGAAGATATTTGGAGTCTGAG	none
	rv	GCCCCTAAAGAAACCGTCCTT	none
8	fw	AAGGATTCCTACTAAGTGGCTCTA	none
	rv	GCATTTGATAAACTGTTCCAGA	none

9	fw	TGTGCCCGGCCTTGTTTCAG	none
	rv	TACCAAAGGTGTTGAATGAGAGTA	none
10	fw	AAATTTGTTTTCTTCTTTGTTGC	none
	rv	CAATGATTCGTTTGAGGTCTAAG	none
11	fw	TTCCCCTTTTATTTCTCTTTGTGC	none
	rv	GTCATCTCAGGCGATGTGG	none
<b>IL12RB1</b> 7	fw	GAT CCT GGA GGC CCT AAG AG	none
	rv	CCC AGC CCC ATT TTA TTT TA	none

(Primer sequences for the amplification of Fas exon 3, 4, 7 and 8 were derived from: Niemela JE, Hsu AP, Fleisher TA, Puck JM. Single nucleotide polymorphisms in the apoptosis receptor gene TNFRSF6. Mol Cell Probes. 2006;20:21-26.)

### Supplemental Table 2: Whole-exome sequencing statistics

Sample	Raw reads	Mapped reads	Mapped reads (without duplicates)	Coverage (30x)	SNVs (total)
Patient	197,169,832	83,026,158	80,648,463	93%	95,794
Father	187,440,556	78,455,166	76,447,940	92%	93,972
Mother	172,370,306	83,372,182	81,260,764	92%	95,198

### Supplemental Table 3: Gene candidates not affecting the Fas signaling pathway identified by whole-exome sequencing

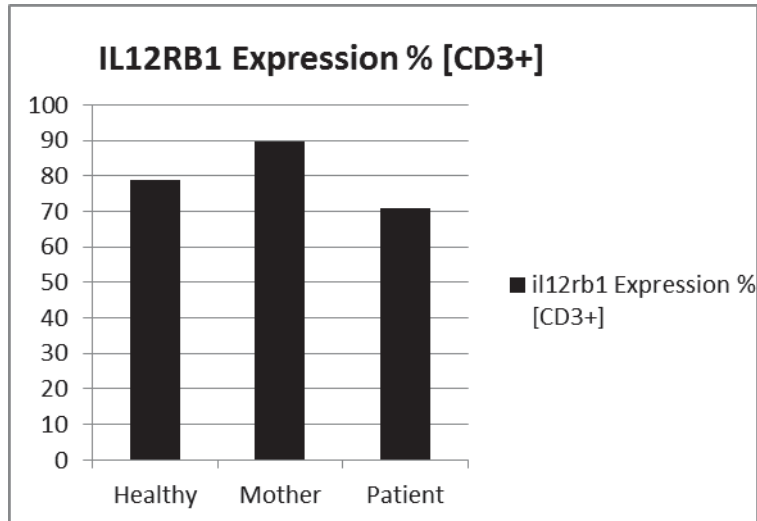
(see separate xls-file for Supplemental Table 3)

**Supplemental Table 4: Gene candidates identified by whole-exome sequencing**

Gene	Localization	Mutation	cDNA	Protein	rs	MAF	Pre-diction	same genotype (healthy)
BNIP (+)	1:151011325	missense	c.256C>T	p.R86C	3830611	0.006	prob. damag.; delet.	24 (1000G); 100 (ESP6500); present in in-house db
TRAF3IP2 (-)	6: 111913262	missense	c.28G>A	p.D10N	33980500	0.082	prob. damag.; delet.	21 TT (1000G); 72 TT (ESP6500); present in in-house db
NCOR2 (-)	12:124887058	inframe insertion	c. 1531->GCT	p.P511PQ	35831183	wo	wo	frequent in in-house db (triplet expansion)
RBBP6 (+)	16:24564879-24564881	splice donor, conservative	Na	na	72133882	wo	wo	frequent in in-house db
MAP2K3 (+)	17: 21216964	missense	c.301T>C	p.C101R	1657686	wo	unknow n; tolerated	frequent in in-house db
IL12RB1 (-)	19:18186625	stop gained	c.698G>A	p.R212X	none	na	wo	not observed

(Abbreviations: (+), located on plus strand of DNA; (-) located on minus strand of DNA; na, not applies; wo, without; prob. damaging, probably damaging, delet., deleterious; 1000G, 1000 genomes project database; ESP6500, exome variant server database; in-house db, in-house database)

## Supplemental Figures



**Supplemental Figure 1: IL12RB1 expression in FasL deficient patient, heterozygous carrier and homozygous wildtype control.** IL12RB1 is normally expressed in a patient harboring the homozygous FasL p.A69fsX\*138 mutation, a heterozygous carrier (mother) and a wildtype control. Another patient with the same mutation had also normal expression of IL12RB1, but was not included in the experiment presented here.





## 9. Anhang

### Lebenslauf

#### Schafiq Nabhani

04.01.1987	geboren in Köln
1993 – 1997	Katholische Grundschule, Köln
1997 – 2006	Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Köln Abschluss: Abitur
2006 – 2010	Studium der Biologie Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
2010 – 2011	Diplomarbeit in der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf Leitung: Prof. Dr. Arndt Borkhardt, Dr. Ute Fischer Thema: „Rolle des TEL-AML1-Fusionsproteins in mesenchymalen Stammzellen von Kindern mit hämatologischen Neoplasien“
2011	Diplombiologe Abschluss: „Ausgezeichnet“
2011 - 2014	Promotion in der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf Leitung: Prof. Dr. Arndt Borkhardt, Dr. Ute Fischer Thema: „Beschreibung einer neuen FASLG-Mutation und der defekte IL-12 Signalweg als neue Ursache des autoimmun-lymphoproliferativen Syndroms (ALPS)“
2014	Fort- und Weiterbildung Interdisciplinary Graduate and Research Academy Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf „Leadership Skills“, „Negotiation Training“ und „Fundamentals of Project Management for Doctoral Researchers“

## Publikationsliste

### **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**

**Schafiq Nabhani\***, Andrea Hönscheid\*, Prasad T. Oommen, Bernhard Fleckenstein, Jörg Schaper, Michaela Kuhlen, Hans-Jürgen Laws, Arndt Borkhardt, and Ute Fischer

\*both authors contributed equally

*Accepted for publication in "Clinical Immunology"*

---

### **Deregulation of Fas Ligand Expression as a novel cause of autoimmune lymphoproliferative syndrome like disease**

**Schafiq Nabhani**, Sebastian Ginzel, Hagit Miskin, Shoshana Revel-Vilk, Dan Harlev, Bernhard Fleckenstein, Andrea Hönscheid, Prasad T. Oommen, Michaela Kuhlen, Ralf Thiele, Hans-Jürgen Laws, Arndt Borkhardt, Polina Stepensky,\* and Ute Fischer\*

\*PS and UF contributed equally to this manuscript

*In Revision ("Haematologica")*

---

### **Early-onset Evans syndrome, immunodeficiency and premature immunosenescence associated with tripeptidyl-peptidase II deficiency**

Polina Stepensky\*, Anne Rensing-Ehl\*, Ruth Gather, Shoshana Revel Vilk, Ute Fischer, **Schafiq Nabhani**, Fabian Beier, Tim H. Brümmendorf, Sebastian Fuchs, Simon Zenke, Elke Firat, Vered Molho Pessach, Arndt Borkhardt, Mirzokhid Rakhmanov, Bärbel Keller, Klaus Warnatz, Hermann Eibel, Gabriele Niedermann, Orly Elpeleg and Stephan Ehl

\*PS and ARE contributed equally to this study.

*In Revision ("Blood")*

---

### **The cell cycle regulator CCDC6 is a key target of RNA-binding protein EWSR1**

Sujitha Duggimpudi, Erik Larsson, **Schafiq Nabhani**, Arndt Borkhardt, Jessica I Hoell

*In Revision ("PLOS ONE")*

---

### **Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease in patients with LRBA mutation**

Shoshana Revel-Vilk\*, Ute Fischer\*, Barbel Keller, **Schafiq Nabhani**, Laura Yaneth Gamez Diaz, Anne Rensing-Ehl, Michael Gombert, Andrea Hönscheid, Hani Saleh, Avraham Shaag, Arndt Borkhardt, Bodo Grimbacher, Klaus Warnatz<sup>§</sup>, Orly Elpeleg<sup>§</sup>, Polina Stepensky<sup>§</sup>.

\*the first two authors had equal contribution to the manuscript

§the last three authors had equal contribution to the manuscript

*Manuscript in preparation*

## Publizierte Abstracts

### **Identification of genetic causes underlying the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type III in children by next-generation-sequencing**

**S. Nabhani**, S. Revel-Vilk, H. Miskin, H.-J. Laws, A. Borkhardt, P. Stepensky, U. Fischer, Germany, Israel

*“Journal of Clinical Immunology“ (2012)*

---

### **Dysregulation of IL12 Signaling As a Novel Cause of an Autoimmune Lymphoproliferative like Syndrome**

**Schafiq Nabhani**, Sebastian Ginzel, Hagit Miskin, Shoshana Revel-Vilk, Dan Harlev, Bernhard Fleckenstein, Andrea Hönscheid, Prasad T. Oommen, Michaela Kuhlen, Ralf Thiele, Hans-Jürgen Laws, Arndt Borkhardt, Polina Stepensky, and Ute Fischer

*“Blood“ (2014)*

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Borkhardt für die Betreuung der Arbeit und die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit im KMT-Labor der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie durchzuführen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Martin für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Ute Fischer für die spannende und interessante Aufgabenstellung, die sehr umfangreiche wissenschaftliche Unterstützung sowie die unermüdliche Diskussionsbereitschaft ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Großer Dank geht auch an Frau Dr. Polina Stepensky aus dem Hadassah Medical Center, Jerusalem für die Kooperation und Bereitstellung der Blutproben.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie, Ameleh und Jafar, meinem Bruder Amil, sowie Olga und meinen Freunden für ihr Verständnis und die immer währende Unterstützung.

Für eine sehr große Unterstützung und Hilfe stehe ich auch Heinz Erfling und Harri Baumann gegenüber in großem Dank und tiefer Schuld.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen des KMT-Labors für den regen wissenschaftlichen Austausch und das gute Arbeitsklima.

## Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der hier vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

---

Schafiq Nabhani