



## Difetti dei linfociti B: dall'espressione clinica al difetto molecolare

Tiziana Lorenzini  
Raffaele Badolato

Clinica Pediatrica dell'Università  
di Brescia

**Parole chiave:**  
**linfociti B, ipo/  
agammaglobulinemia, geni,  
fenotipo clinico, infezioni**

### Abstract

Nel 1952 il Dottor Colonello Odgen C. Bruton descrisse il primo caso di un difetto congenito dei linfociti B: si trattava dell'Agammaglobulinemia X-linked (XLA), dovuta ad un'alterazione della differenziazione che provocava un'assenza di linfociti B e plasmacellule in circolo. Negli anni successivi furono identificate le forme autosomiche recessive di agammaglobulinemia. Nel 1993 fu scoperto il gene responsabile dell'XLA, denominato BTK (Bruton tirosinchinasi). Da allora molti geni implicati in difetti dei linfociti B sono stati identificati, grazie all'avanzamento delle tecniche di analisi molecolare e all'introduzione delle tecnologie di *Whole exome sequencing* che permettono di analizzare l'intero esoma. La conoscenza dei diversi quadri clinici di presentazione dei difetti B linfocitari e delle rispettive cause molecolari è indispensabile per una diagnosi precoce e per un corretto approccio terapeutico. Lo scopo di questo lavoro è quello di presentare i geni associati ad immunodeficienza B, con i relativi fenotipi clinici, compresi quelli di recente descrizione: tale elenco è destinato ad ampliarsi ulteriormente in futuro.

### I difetti associati ad agammaglobulinemia

Il più comune difetto immunologico, presente nella popolazione con un'incidenza di circa 1:400 individui, è il difetto di IgA, una condizione perlopiù benigna che solo in 1/3 dei casi comporta un'aumentata suscettibilità ad infezioni delle alte e basse vie respiratorie. In pochi casi è stata descritta un'associazione con malattie infiammatorie croniche intestinali, mentre relativamente più frequente è l'occorrenza di una predisposizione all'autoimmunità e a malattie autoimmuni, quali celiachia, tiroiditi, anemia e piastrinopenia immuno-mediate. In rari casi è stata osservata un'evoluzione in Immunodeficienza Comune Variabile.

Una presentazione clinica caratterizzata da infezioni da patogeni extracellulari, delle alte e basse vie respiratorie, gastrointestinali e cutanee a decorso grave, prolungato e complicato, generalmente a partire dalla fine del primo anno di vita, quando viene persa l'immunità passiva materna, deve indurre il sospetto di un difetto anticorpale. Gli esami immunologici, che dimostrano bassi o assenti livelli di immunoglobuline sieriche, in associazione ad un difetto pressoché completo di linfociti B periferici, con le altre linee cellulari generalmente ben rappresentate, e ad una ridotta risposta anticorpale alle vaccinazioni, consentono di confermare la diagnosi di Agammaglobulinemia (Fig. 1). In circa l'85% dei casi la causa dell'Agammaglobulinemia risiede in una mutazione del gene BTK, localizzato a livello del cromosoma X, per cui i maschi che ne sono portatori risultano affetti. BTK codifica per una tirosinchinasi citoplasmatica coinvolta nella trasduzione del segnale a partire dalla stimolazione del

### Corrispondenza

**Raffaele Badolato**  
Clinica Pediatrica  
dell'Università di Brescia  
E-mail: raffaele.badolato@unibs.it

recettore dei linfociti B (pre-BCR/BCR) e nella conseguente differenziazione dei linfociti B. BTK è espresso anche a livello di altre linee cellulari, quali i monociti, i neutrofili, i macrofagi, le cellule dendritiche e le cellule NK, perciò diversi studi recentemente si sono concentrati sul suo ruolo nell'ambito dell'immunità innata <sup>1</sup>. Circa un altro 5-7% dei casi di Agammaglobulinemia è dovuto ad un difetto di uno dei componenti del pre-BCR: la catena pesante  $\mu$  (IGHM),  $\lambda 5$  (IGLL1), Ig $\alpha$  (CD79A) e Ig $\beta$  (CD79B); si tratta di forme autosomiche recessive. Ne consegue un blocco della differenziazione dei linfociti B nella fase di transizione dallo stadio pro-B allo stadio pre-B <sup>2</sup>. Un'altra piccola percentuale di casi è attribuibile ad una mutazione del gene BLNK che codifica per una proteina che funziona da ponte nella trasduzione del segnale tra il BCR attivato e proteine a valle. Anche quest'ultimo gene è associato ad un numero normale di cellule pro-B, in assenza di cellule pre-B e B mature: il blocco coincide con l'espressione del pre-BCR <sup>3</sup>.

Nel 2003 è stato descritto un caso di Agammaglobulinemia associata a dismorfie facciali minori: l'analisi del cariotipo ha mostrato una traslocazione cromosomica bilanciata t(9;20): nel sito della traslocazione era presente il gene LRRC8A che risultava deletato. L'espressione di una forma deletata della proteina *Lrrc8a* nel modello murino ha determinato l'inibizione dello sviluppo dei linfociti B <sup>4</sup>. Infine nel 2012 è stata identificata per la prima volta una mutazione "stop codon" in omozigosi a carico del gene PIK3R1 quale responsabile di un quadro di Agammaglobulinemia e assenza di cellule B. Tale mutazione provoca l'assenza della subunità p85 $\alpha$  del complesso PI3K, con una normale espressione delle subunità p50 $\alpha$  e p55 $\alpha$ . Ne consegue un blocco maturativo più precoce rispetto ai pazienti con un difetto della via di segnale del BCR, essendo marcatamente ridotti o assenti anche i linfociti allo stadio pro-B <sup>5</sup>. Recentemente la mutazione in eterozigosi del gene PIK3R1 è stata identificata in quattro pazienti con una storia di infezioni respiratorie batteriche ad esordio precoce, in assenza di infezioni conclamate virali e opportunistiche e di fenomeni autoimmuni. La conta linfocitaria risulta nella norma, sebbene con alterazioni delle sottopopolazioni linfocitarie; il difetto dei linfociti B si manifesta con ipogammaglobulinemia e necessità di terapia sostitutiva con immunoglobuline per via endovenosa <sup>6</sup> (Tab. I).

**Tabella I.** Geni associati ad Agammaglobulinemia.

Gene	OMIM	Fenotipo
BTK	300755	Agammaglobulinemia, X-linked; XLA
IGHM	601495	Agammaglobulinemia 1; AGM1
IGLL1	613500	Agammaglobulinemia 2; AGM2
CD79A	613501	Agammaglobulinemia 3; AGM3
BLNK	613502	Agammaglobulinemia 4; AGM4
LRRC8A	613506	Agammaglobulinemia 5; AGM5
CD79B	612692	Agammaglobulinemia 6; AGM6
PIK3R1	615214 616005	Agammaglobulinemia 7; AGM7 Immunodeficiency 36; IMD 36

## Ipogammaglobulinemia comune variabile

Qualora gli esami immunologici dimostrino una marcata riduzione di almeno due classi di immunoglobuline (IgG e IgA) e una ridotta risposta anticorpale alle vaccinazioni e l'età d'esordio dei sintomi sia variabile la diagnosi più probabile è quella di Immunodeficienza Comune Variabile (CVID). I pazienti soffrono di infezioni delle vie respiratorie e del tratto gastrointestinale e sono maggiormente a rischio di sviluppare malattie infiammatorie intestinali, neoplasie e fenomeni autoimmunitari (Fig. 1). Si tratta della forma di immunodeficienza primitiva sintomatica più frequente nella popolazione e solo in circa il 10% dei casi diagnosticati c'è la possibilità di giungere alla definizione di un'eziologia genetica <sup>7</sup>.

In circa l'8-10% dei pazienti con CVID risulta mutato il gene TNFRSF13B che codifica per Taci, un recettore espresso sui linfociti B che ha un ruolo cruciale nella maturazione e nella differenziazione degli stessi, mediante l'interazione con i ligandi BAFF, BCMA e APRIL <sup>8</sup>. Meno frequentemente risulta mutato il gene TNFRSF13C, che codifica per il recettore Baffr, appartenente anch'esso alla famiglia dei recettori TNF-simili, coinvolto nell'attivazione dei linfociti B. Recentemente sono stati descritti casi di Immunodeficienza Comune Variabile in pazienti con difetti a livello delle molecole CD19, CR2 e CD81, che insieme formano il complesso recettoriale dei linfociti B. CD20 è un antigene di membrana dei linfociti B che, se difettivo, determina una compromissione della risposta anticorpale T-indipendente <sup>9</sup>. Un altro gene descritto in associazione

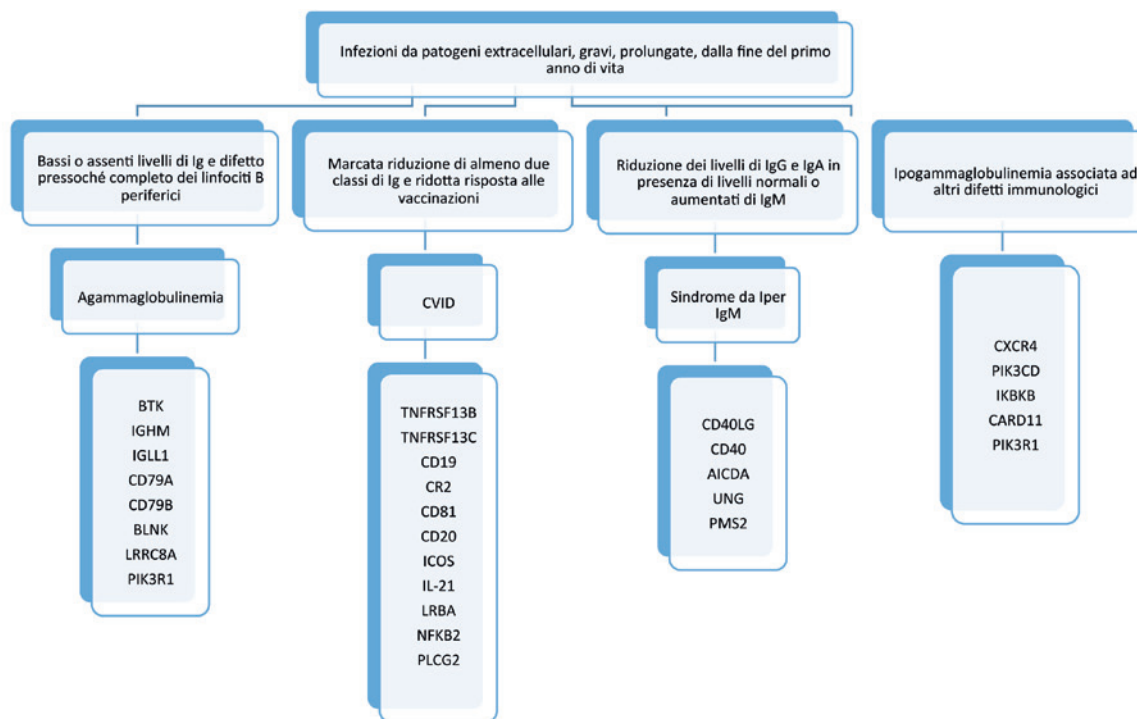


Figura 1. Diagramma di flusso dei difetti anticorpali.

ad Immunodeficienza Comune Variabile è ICOS che appartiene alla famiglia delle molecole costimolatorie CD28 espresse esclusivamente sui linfociti T attivati <sup>10</sup>. Infine il difetto di IL-21 è stato descritto in associazione ad un caso di malattia infiammatoria cronica intestinale associata ad una compromissione della differenziazione dei linfociti B <sup>11</sup>.

Nel 2012 è stata descritta una forma di CVID associata a fenomeni di autoimmunità e ad enterocolite dovuta a mutazione del gene LRBA. I linfociti B dei pazienti affetti presentavano una ridotta capacità differenziativa, un difetto nell'autofagia e un'aumentata suscettibilità all'apoptosi <sup>12</sup>. Un'altra forma di CVID che si manifesta con fenomeni autoimmunitari, come l'alopecia totale, e con insufficienza surrenalica, definita nel 2013, è attribuibile ad una mutazione in eterozigosi del gene NFKB2 <sup>13</sup>. Infine una sindrome autoinfiammatoria, associata a difetto anticorpale e disregolazione immunitaria è stata descritta nel 2012 come causata da mutazione del gene PLCG2. I pazienti descritti presentavano una malattia infiammatoria cronica intestinale, associata a lesioni cutanee, bronchiolite, ar-

tralgia, uveite ed enterocolite, insieme ad una ridotta risposta anticorpale <sup>14</sup> (Tab. II).

### Ipogammaglobulinemia con Iper IgM

Un quadro clinico di infezioni ricorrenti, respiratorie, gastrointestinali e polmoniti da *Pneumocystis jirovecii*, insieme a livelli sierici molto ridotti di IgG e IgA, in presenza di valori normali o elevati di IgM, deve indurre il sospetto di un difetto dei meccanismi di scambio di classe (Fig. 1). Tale difetto può essere estrinseco rispetto ai linfociti B e in tal caso dipende dalla mutazione, a trasmissione *X-linked* del gene CD40LG, espresso dai linfociti T CD4+ attivati. Il difetto può essere invece intrinseco ai linfociti B, a trasmissione autosomica recessiva, quando è mutato il gene CD40. L'interazione tra CD40 e CD40LG attiva la via di trasduzione intracellulare del segnale NF- $\kappa$ B dipendente nei linfociti B che risulta nell'attivazione dei meccanismi di scambio di classe e di ipermutazione somatica.

**Tabella II.** Geni associati ad Immunodeficienza Comune Variabile.

Gene	OMIM	Fenotipo
ICOS	607594	Immunodeficiency, Common Variable, 1; CVID1
TNFRSF13B	240500/ 609529	Immunodeficiency, Common Variable, 2; CVID2/ Immunoglobulin A Deficiency 2; IGAD2
CD19	613493	Immunodeficiency, Common Variable, 3; CVID3
TNFRSF13C	613494	Immunodeficiency, Common Variable, 4; CVID4
MS4A1	613495	Immunodeficiency, Common Variable, 5; CVID5
CD81	613496	Immunodeficiency, Common Variable, 6; CVID6
CR2	614699	Immunodeficiency, Common Variable, 7; CVID7
LRBA	614700	Immunodeficiency, Common Variable, 8, with autoimmunity; CVID8
NFKB2	615577	Immunodeficiency, Common Variable, 10; CVID 10
IL21	615767	Immunodeficiency, Common Variable 11; CVID11
PLCG2	614878/ 614468	Autoinflammation, Antibody Deficiency, and Immune Dysregulation, PLCG2-associated; APLAID/ Familial Cold Autoinflammatory Syndrome 3; FCAS3

Qualora invece il difetto molecolare risieda nei meccanismi di ipermutazione somatica, l'esordio clinico è generalmente più tardivo con infezioni respiratorie, gastrointestinali, batteriche ma non opportunistiche, linfadenopatia e, meno frequentemente, manifestazioni autoimmuni. Tra i geni da indagare vi sono AICDA e UNG che codificano per due enzimi coinvolti nell'ipermutazione somatica, attraverso la quale mutazioni sono introdotte nella regione V delle immunoglobuline. Si tratta quindi di un processo successivo all'interazione CD40-CD40LG necessaria, oltre che per la risposta anticorpale, anche per la funzionalità dei macrofagi. Si spiega così il motivo per il quale le infezioni opportunistiche sono frequenti nei difetti di CD40 e CD40LG, ma non nei difetti di AICDA e UNG <sup>15</sup>.

Recentemente è stata descritta la mutazione in eterozigosi di PMS2 in tre pazienti con un difetto dei meccanismi di riparo del DNA e di ipermutazione somatica

e suscettibilità all'adenocarcinoma colon-rettale. Gli esami immunologici risultavano parzialmente sovrapponibili alla sindrome da Iper IgM, con bassi livelli sierici di IgG e IgA. Uno dei tre pazienti aveva avuto una storia di infezioni batteriche gravi prima di sviluppare un adenocarcinoma del colon <sup>16</sup> (Tab. III).

### Ipogammaglobulinemia associata ad altri deficit immunologici

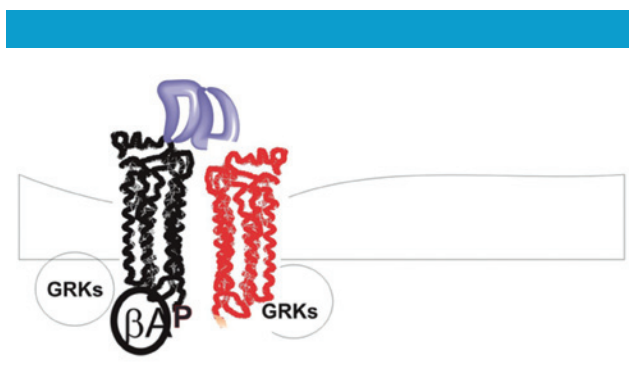
In alcune condizioni l'ipogammaglobulinemia non è isolata, ma si accompagna ad altri difetti immunologici (Fig. 1). Nella sindrome WHIM l'ipogammaglobulinemia di entità variabile si associa ad una linfopenia, soprattutto a carico dei linfociti B di memoria *switched*, e ad una neutropenia periferica a dispetto di un midollo osseo ipercellulare, in cui la linea dei granulociti

**Tabella III.** Geni associati a Sindrome Iper-IgM.

Gene	OMIM	Fenotipo
CD40LG	308230	Immunodeficiency with Hyper-IgM, TYPE 1; HIGM1
AICDA	605258	Immunodeficiency with Hyper-IgM, TYPE 2; HIGM2
CD40	606843	Immunodeficiency with Hyper-IgM, TYPE 3; HIGM3
UNG	608106	Immunodeficiency with Hyper-IgM, TYPE 5; HIGM5
PMS2	276300	Mismatch Repair Cancer Syndrome; MMRCS

neutrofili è ben rappresentata; tale condizione è definita mielocatessi. La conta dei neutrofili nel sangue periferico può transitoriamente aumentare in seguito ad un'infezione. I pazienti affetti presentano infezioni batteriche ricorrenti e sono suscettibili ad infezioni da *Papilloma virus*. Tale predisposizione è attribuibile ad un'alterazione dell'omeostasi delle cellule dendritiche plasmacitoidi<sup>17</sup>. Il difetto molecolare, a trasmissione autosomica dominante, risiede nel gene CXCR4 che determina un'iperfunzione del recettore stesso in risposta alla stimolazione da parte del ligando CXCL12<sup>18</sup> (Fig. 2). Alcuni pazienti possono presentare anche malformazioni cardiache, quali la tetralogia di Fallot, ciò può essere spiegato dal fatto che CXCR4 forma eterodimeri con CXCR7 per regolare la risposta cellulare CXCL12 e l'angiogenesi.

Recentemente è stata descritta una nuova immunodeficienza caratterizzata da infezioni delle alte vie respiratorie ad esordio precoce, linfoproliferazione dovuta ad un'alterata risposta delle cellule T di memoria, infezioni croniche da virus *Epstein Barr* e *Cytomegalovirus* e in alcuni casi da citopenia autoimmune. L'ampio spettro di infezioni alle quali i soggetti sono suscettibili è dovuto ad un difetto sia dei linfociti B, con ipogammaglobulinemia e ridotta risposta anticorpale, che dei linfociti T, con linfopenia e ridotta risposta ai mitogeni *in vitro*. Il gene mutato in eterozigosi con effetto *gain-of-function* è PIK3CD che codifica per la subunità p110 $\delta$  del complesso PI3K e ne determina un incremento dell'attività<sup>19</sup>. Nel 2013 è stata descritta una forma di Immunodeficienza Grave Combinata ad esordio precoce in quattro pazienti con polmonite da *Pneumocystis jirovecii*,



**Figura 2.** Rappresentazione grafica del difetto molecolare della sindrome WHIM. Nella figura è rappresentato il recettore CXCR4 nella forma completa (in nero) e in quella mancante della tratto carbossiterminale (in rosso).

sepsi, candidiasi, infezioni croniche da *Cytomegalovirus*, infezioni respiratorie e gastrointestinali virali persistenti e diarrea protratta con difetto di crescita. I pazienti presentavano ipogammaglobulinemia o agammaglobulinemia, con un numero normale di linfociti T e linfociti B ridotti solo in un paziente. Il gene causale identificato, a trasmissione autosomica recessiva, è IKBKB che codifica per la proteina I $\kappa$ B $\beta$ , il cui difetto determina un'alterazione della via di segnale che porta all'attivazione di NF- $\kappa$ B<sup>20</sup>.

Un difetto della via di attivazione di NF- $\kappa$ B si riscontra anche in caso di mutazione in omozigosi di CARD11. La presentazione clinica dei pochi casi descritti è quella di un'immunodeficienza grave combinata. Gli esami immunologici hanno mostrato un'ipogammaglobulinemia, con un numero normale di linfociti B e T, tuttavia vi erano un blocco della differenziazione dei linfociti B, una diminuzione delle cellule T regolatorie e una disfunzione dei linfociti T<sup>21</sup>(Tab. IV).

## Conclusioni

In conclusione, i difetti dei linfociti B si manifestano generalmente dopo il primo anno di vita; prevalentemente con infezioni da parte di patogeni extracellulari. Un semplice dosaggio delle immunoglobuline sieriche può indirizzare la diagnosi. Qualora si dimostri una agammaglobulinemia e il paziente sia maschio andrà indagato il gene BTK, altrimenti andranno valutate le forme a trasmissione autosomica recessiva (Fig. 1). Qualora almeno due classi di immunoglobuline risultino ridotte, ma non assenti, e l'età di esordio sia variabile, potendo riguardare anche soggetti adulti in precedenza apparentemente sani, bisognerà indagare l'ampia e pleomorfa entità dell'Immunodeficienza Comune Variabile. In questo caso sarà difficile giungere ad una

**Tabella IV.** Geni associati ad ipogammaglobulinemia e ad altri difetti immunologici.

Gene	OMIM	Fenotipo
CXCR4	193670	WHIM Syndrome
PIK3CD	615513	Immunodeficiency 14; IMD14
IKBKB	615592	Immunodeficiency 15; IMD15
CARD11	615206	Immunodeficiency 11; IMD11



diagnosi molecolare: andrà esclusa una possibile mutazione del gene TNFRSF13B che codifica per Taci, ma bisognerà anche prestare attenzione alle possibili manifestazioni autoimmuni e di disregolazione immunitaria, che potrebbero indirizzare la diagnosi verso le nuove forme descritte. Inoltre l'evidenza di un'anomalia della risposta B linfocitaria nelle patologie caratterizzate da fenomeni autoimmuni e autoinfiammatori pone in luce il ruolo cruciale della risposta umorale nei meccanismi di immunotolleranza. In questo contesto si inserisce la recente scoperta di una sottopopolazione di linfociti B regolatori in grado di produrre IL-10. Qualora invece il

difetto anticorpale interessi le IgG e le IgA, ma non le IgM, si porrà la necessità di studiare eventuali difetti dei geni implicati nei meccanismi di scambio di classe e di ipermutazione somatica. Infine, recentemente sono state descritte condizioni caratterizzate da ipogammaglobulinemia non isolata: in questi casi lo studio della funzione degli altri effettori del sistema immunitario e delle manifestazioni cliniche associate può orientare la diagnosi. Una corretta definizione del difetto dei linfociti B può permettere di mettere in atto le opportune strategie terapeutiche, in primo luogo la terapia sostitutiva con immunoglobuline per via endovenosa, quando necessarie.

### Bibliografia

- Lougaris V, Baronio M, Vitali M, et al. Bruton tyrosine kinase mediates TLR9-dependent human dendritic cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1644-50.
- Conley ME. Genes required for B cell development. *J Clin Invest* 2003;112:1636-8.
- Minegishi Y, Rohrer J, Coustan-Smith E, et al. An essential role for BLNK in human B cell development. *Science* 1999;286:1954-7.
- Sawada A, Takihara Y, Kim JY, et al. A congenital mutation of the novel gene LRRC8 causes agammaglobulinemia in humans. *J Clin Invest* 2003;112:1707-13.
- Conley ME, Dobbs AK, Quintana AM, et al. Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the p85-alpha subunit of PI3K. *J Exp Med* 2012;209:463-70.
- Deau M.-C, Heurtier L, Frange P, et al. A human immunodeficiency caused by mutations in the PIK3R1 gene. *J Clin Invest* 2014;124:3923-8.
- Keller MD, Jyonouchi S. Chipping away at mountain: genomic studies in common variable immunodeficiency. *Autoimmun Rev* 2013;12:687-9.
- Salzer U, Chapel HM, Webster AD, et al. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 2005;37:820-8.
- Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA, et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest* 2010;120:214-22.
- Takahashi N, Matsumoto K, Saito H, et al. Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. *J Immunol* 2009;182:5515-27.
- Salzer E, Kansu A, Sic H, et al. Early-onset inflammatory bowel disease and common variable immunodeficiency-like disease caused by IL-21 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1651-9.
- Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarstrom Q, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet* 2012;90:986-1001.
- Chen K, Coonrod EM, Kumanovics A, et al. Germline mutations in NFKB2 implicate the noncanonical NF-kappa-B pathway in the pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 2013;93:812-24.
- Zhou Q, Lee G.-S, Brady J, et al. A hypermorphic missense mutation in PLCG2, encoding phospholipase C-gamma-2, causes a dominantly inherited autoinflammatory disease with immunodeficiency. *Am J Hum Genet* 2012;91:713-20.
- Davies EG, Thrasher AJ. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. *Brit J Haematol* 2010;149:167-80.
- Peron S, Metin A, Gardes P, et al. Human PMS2 deficiency is associated with impaired immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 2008;205:2465-72.
- Tassone L, Moratto D, Vermi W, et al. Defect of plasmacytoid dendritic cells in warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome patients. *Blood* 2010;116:4870-3.
- Dotta L, Tassone L, Badolato R. Clinical and genetic features of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) syndrome. *Curr Mol Med* 2011;11:317-25.
- Lucas CL, Kuehn HS, Zhao F, et al. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110-delta result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nature Immunol* 2014;15:88-97.
- Pannicke U, Baumann B, Fuchs S, et al. Deficiency of innate and acquired immunity caused by an IKKB mutation. *N Engl J Med* 2013;369:2504-14.
- Stepensky P, Keller B, Buchta M, et al. Deficiency of caspase recruitment domain family, member 11 (CARD11), causes profound combined immunodeficiency in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:477-85.