

L'apoptosi nella fisiologia e nella patologia umana

TARCISIO NOT, EMANUELE BURATTI, IRENE BERTI, CHIARA TREVISIOL, ELENA NERI, ALBERTO TOMMASINI

Laboratorio Immunologico, Istituto di Clinica Pediatrica, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un meccanismo basilare nella vita degli organismi multicellulari. La recente scoperta che alterazioni dell'apoptosi possono avere un ruolo nella patologia umana ha suscitato curiosità e interesse in ogni campo specialistico della medicina. Il tentativo di spiegare con l'apoptosi tutte le patologie non comprese sta conducendo a una vera e propria esplosione di studi sull'argomento.

In questa sede tenteremo di rileggere una parte della "patologia generale" attraverso le nuove conoscenze sull'apoptosi e di capire il ruolo di alcune sue alterazioni nella patologia umana.

SIGNIFICATO DELL'APOPTOSI

Il funzionamento di un organismo complesso come l'uomo è basato sull'equilibrio tra processi di migrazione, proliferazione, differenziazione e morte delle cellule di cui è composto. L'attuazione di ciascuno di questi processi deve rispondere a un controllo estremamente raffinato, negli interessi dell'organismo intero. Per questo anche l'eliminazione di singole cellule indesiderate (inutili o danneggiate) avviene in modo regolato, secondo programmi ben definiti e riproducibili. La morte cellulare che si compie in questo contesto è stata denominata apoptosi ("caduta da", come quella delle foglie dal ramo), proprio a sottolinearne la natura fisiologica e benefica, come avviene per gli alberi in autunno. L'apoptosi è un processo attivo che conduce all'eliminazione di una cellula bersaglio senza indurre una risposta infiammatoria (diversamente da quanto avviene per la necrosi). La cellula viene condensata in "corpi apoptotici", simili a sacchetti di rifiuti che vengono prontamente rimossi da parte del sistema macrofagico. Attraverso l'apoptosi gli organismi multicellulari rimodellano i tessuti durante l'embriogenesi, regolano il turnover cellulare, prevengono la trasfor-

mazione neoplastica delle cellule danneggiate ed eliminano quelle infettate. Un alterato funzionamento dei processi di morte cellulare programmata può avere importanti conseguenze sulla crescita dell'individuo, sull'invecchiamento, sulla risposta immune, sui tumori e sulle malattie neurodegenerative^{1,3} (Figura 1).

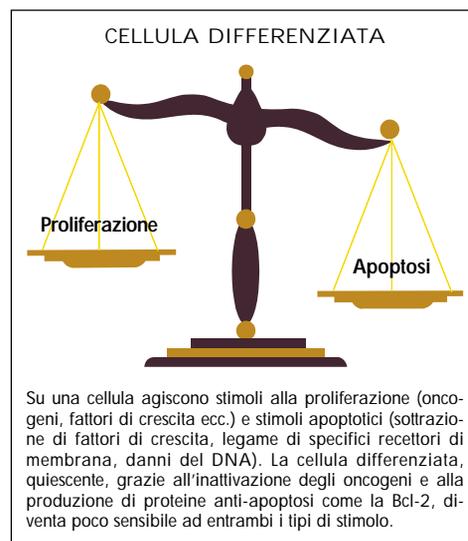
LE MOLECOLE DELL'APOPTOSI NELLA PATOLOGIA UMANA

La morte cellulare programmata può essere scatenata da stimoli di varia natura, sia esterni alla cellula (fattori di crescita, citochine) che interni ad essa (danni del DNA). I segnali esterni, attraverso il legame di diversi recettori (FAS, TNF-r, CD40, ecc.), vengono trasdotti all'interno della cellula in altrettanti percorsi. Tutti questi convergono infine in una cascata di eventi che esita nell'autodigestione cellulare con tipiche alterazioni morfologiche e biochimiche (rimpicciolimento cellulare, vacuolizzazione citoplasmatica, condensazione nucleare, frammentazione dei cromosomi). Qualunque sia lo stimolo, le molecole che agiscono nelle fasi centrali di questo processo hanno un ruolo chiave nel modulare l'apoptosi, e quindi la capacità delle cellule di proliferare o di morire (Figura 2).

Curiosamente, una di queste molecole, denominata Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2), venne scoperta in quanto prodotta in eccesso in linfomi centrofollicolari B⁴. Successivi studi mostrarono che la Bcl-2 non agiva come gli altri oncogeni stimolando la proliferazione cellulare, ma attraverso l'inibizione della morte per apoptosi^{5,6}. Con questo meccanismo la Bcl-2 può conferire una maggior capacità di sopravvivenza a cellule trasformate e favorire la progressione e la resistenza ai farmaci in diverse neoplasie⁷ (leucemia mieloide cronica⁸, microcitoma polmonare⁹, neuroblastoma¹⁰).

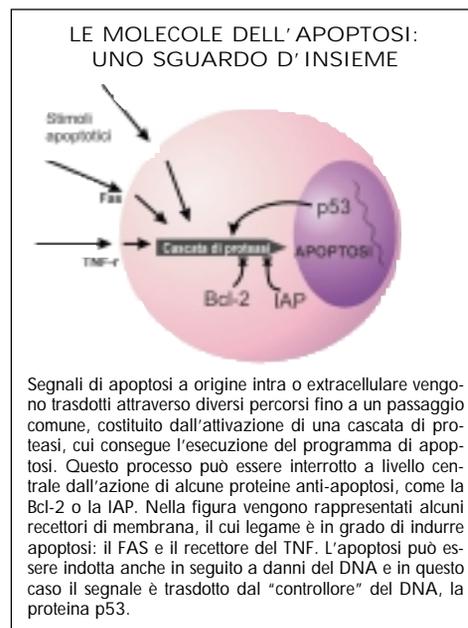
Altre molecole capaci di inibire l'apoptosi, similmente alla Bcl-2, sono state recentemente identificate.

Tra queste ricordiamo le IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein), e in particolare il gene NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein), le cui alterazioni potrebbero avere un ruolo nella patogenesi dell'amiotrofia.



Su una cellula agiscono stimoli alla proliferazione (oncogeni, fattori di crescita ecc.) e stimoli apoptotici (sottrazione di fattori di crescita, legame di specifici recettori di membrana, danni del DNA). La cellula differenziata, quiescente, grazie all'inattivazione degli oncogeni e alla produzione di proteine anti-apoptosi come la Bcl-2, diventa poco sensibile ad entrambi i tipi di stimolo.

Figura 1



Segnali di apoptosi a origine intra o extracellulare vengono trasdotti attraverso diversi percorsi fino a un passaggio comune, costituito dall'attivazione di una cascata di proteasi, cui consegue l'esecuzione del programma di apoptosi. Questo processo può essere interrotto a livello centrale dall'azione di alcune proteine anti-apoptosi, come la Bcl-2 o la IAP. Nella figura vengono rappresentati alcuni recettori di membrana, il cui legame è in grado di indurre apoptosi: il FAS e il recettore del TNF. L'apoptosi può essere indotta anche in seguito a danni del DNA e in questo caso il segnale è trasdotto dal "controllore" del DNA, la proteina p53.

Figura 2

Dal lato opposto una molecola chiave con azione favorente l'apoptosi è la proteina p53, classificata inizialmente come anti-oncogene¹¹.

(NB: Gli anti-oncogeni proteggono la cellula dallo sviluppo di neoplasie¹²; e, in effetti, il gene della proteina p53 è mutato nel 50% dei tumori, e la sua inattivazione favorisce alcune specifiche neoplasie tra cui sarcomi, cancro della mammella e tumori del SNC¹²).

Il compito della p53 è quello di controllare il DNA e, in presenza di danni genetici, disporre il blocco del ciclo cellulare allo scopo di consentire lo svolgimento dei processi di riparazione. Se, nonostante questo, persistono stimoli proliferativi (oncogeni, geni virali), la p53 determina l'apoptosi cellulare¹³. Questo meccanismo di sicurezza è fondamentale.

In effetti, se è vero che gli errori (le mutazioni) nella replicazione del DNA a livello genomico costituiscono un momento necessario per il processo dell'evoluzione, è anche vero che un eccesso di replicazioni a livello somatico costituisce un rischio importante di mutazione e dunque di possibile cancerogenesi. Di fatto, la inattivazione della p53 costituisce un fattore di rischio di progressione del tumore, di secondo tumore¹⁴, e di resistenza del tumore ai farmaci^{15,16}.

Come risulta da questi esempi, l'apoptosi è un meccanismo complesso, i cui errori in un senso o nell'altro possono rivestire un ruolo nella patologia umana. Sebbene i meccanismi dell'apoptosi si siano evoluti per consentire la vita degli organismi multicellulari, anche forme elementari di vita, quali i virus, hanno imparato a utilizzare geni anti-apoptotici allo scopo di proteggere dalla morte le cellule infettate, e quindi se stessi. Per esempio, la capacità del virus di Epstein-Barr di rendere immortali i linfociti B infettati sembra essere dovuta proprio alla produzione di proteine anti-apoptosi di origine virale, tra cui un analogo della Bcl-2. Dal lato opposto un virus può indurre apoptosi nelle cellule deputate a eliminarlo, e questo sembrerebbe uno dei meccanismi responsabili della diminuzione dei linfociti T nell'AIDS¹⁸.

L'APOPTOSI NEL SISTEMA IMMUNE

Il sistema immune permette l'adattamento dell'organismo nei confronti dell'ambiente attraverso la proliferazione delle sue cellule, i linfociti, allo scopo di creare un vastissimo repertorio di specificità recettoriali (anticorpi e recettore del linfocito T).

APOPTOSI E TUMORI

Una delle più importanti acquisizioni dell'oncologia moderna è la descrizione della cancerogenesi come processo che si svolge in più stadi, che devono essere attraversati in sequenza per svincolare la cellula trasformata dai diversi meccanismi di controllo messi in opera dall'organismo. Per questo motivo lo sviluppo di neoplasie è un fenomeno raro in età pediatrica (minor tempo per accumulare mutazioni). Esistono però vari fattori che possono accelerare il percorso verso lo sviluppo di neoplasie. Tra questi figurano fattori esogeni (sostanze mutanti, virus oncogeni) e fattori endogeni (mutazioni a carico di geni soppressori dei tumori, minore efficienza dei meccanismi di riparazione del DNA e dell'apoptosi).

Il coinvolgimento primitivo di alterazioni dell'apoptosi è dimostrato solo in rari pazienti con mutazione germ-line della proteina p53, che non sono in grado di attivare correttamente i processi di riparazione del DNA in seguito a danni genetici. Soggetti con tale deficit hanno un rischio aumentato di sviluppare diversi tumori (sarcomi, cancro della mammella e tumori del SNC) anche in età precoce, e di sviluppare seconde neoplasie dopo essere stati curati per tumore in età pediatrica.

Molto più frequente è ritrovare alterazioni dell'apoptosi come evento tardivo nella sequenza di mutazioni che si presentano in cellule neoplastiche. In questi casi la perdita del controllo apoptotico permette la sopravvivenza di cellule geneticamente alterate e diminuisce la loro risposta ai farmaci antineoplastici.

Dal punto di vista clinico, l'overespressione del Bcl-2 è un fattore prognostico negativo nel neuroblastoma. Anche lo studio della p53 può essere usato nella stadiazione tumorale: la maggior parte delle mutazioni a suo carico porta infatti alla produzione di una proteina non funzionale che può essere dosata in grande quantità in liquidi biologici (per esempio nel liquido intestinale in caso di carcinoma del colon).

Attualmente sono in corso tentativi di migliorare la terapia dei tumori attraverso una modulazione dell'apoptosi. Un recente studio nell'animale da laboratorio ha permesso di bloccare l'evoluzione di un melanoma sopprimendo la produzione di Bcl-2 attraverso l'uso della tecnologia dei "nucleotidi antisense". Si tratta però di studi sperimentali complessi che difficilmente avranno una ricaduta terapeutica a breve scadenza.

APOPTOSI E MALATTIE NEURODEGENERATIVE

Negli ultimi anni numerosi studi hanno descritto un aumento di apoptosi nelle malattie neurodegenerative. Studi in vitro hanno dimostrato che mutazioni di proteine legate alla malattia di Alzheimer (proteina precursore dell'amiloide, Presenilina 2) sono in grado di indurre apoptosi nelle cellule portatrici²²⁻²⁴. In questi casi però l'apoptosi sarebbe solo la modalità di morte di cellule danneggiate dalla presenza di proteine anomale. Più raramente alterazioni dell'apoptosi avrebbero un ruolo primitivo nella patogenesi di queste malattie. Evidenza di un tale ruolo si ha solo in alcuni casi di amiotrofia spinale, dove si dimostrano delezioni del gene SMN (sopravvivenza dei motoneuroni) e della proteina inibitrice dell'apoptosi NIAP^{25,26}.

Alla luce di questi dati non sembra ragionevole l'idea di trattare le malattie neurodegenerative attraverso terapie mirate a modulare i processi di apoptosi.

DEFICIT DI APOPTOSI E MALATTIA LINFOPROLIFERATIVA AUTOIMMUNE

Alterazioni del recettore FAS, importante nel controllo periferico dell'omeostasi linfocitaria, sono responsabili di una sindrome linfoproliferativa e autoimmune, descritta per la prima volta da Canale e Smith nel 1967 e successivamente connotata con il nome di sindrome linfoproliferativa-autoimmune (ALPS)²⁷⁻³³.

Questa condizione può essere sospettata in presenza di varie manifestazioni autoimmuni che insorgono in un soggetto con splenomegalia cronica e/o linfadenopatia ricorrente ed ipergammaglobulinemia. Sul fronte del laboratorio il sospetto può essere convalidato da un'espansione della sottopopolazione T "CD4-CD8 negativa", e la diagnosi potrà essere formalizzata con la dimostrazione dello specifico difetto di apoptosi. La terapia si basa sull'uso di steroidi o di altri immunosoppressori (in grado di indurre apoptosi nei linfociti attraverso una via diversa da quella del recettore FAS) e/o sulla splenectomia (per un meccanismo ancora non del tutto noto). È probabile che in soggetti con difetto di FAS percorsi alternativi di apoptosi siano sufficienti in condizioni normali a controllare l'omeostasi linfocitaria, ma che non bastino più in presenza di particolari stimoli infettivi. In queste occasioni il tessuto linfatico andrebbe incontro ad un rapido aumento, evidente nella linfadenopatia che in questi pazienti accompagna ogni episodio infettivo. Una risposta autoimmune transitoria, come quelle che anche nei soggetti normali possono accompagnare banali virali, potrebbe in queste circostanze assumere una "inerzia" immunologica e protrarsi nel tempo. Non si tratterebbe quindi di malattie autoimmuni stabili, ma di risposte esagerate, che possono spesso essere interrotte da appropriati stimoli apoptotici (per esempio attraverso l'uso di cortisone).

APOPTOSI E LUPUS EREMATOSO SISTEMICO

Alcuni dati suggeriscono che alterazioni dell'apoptosi possano avere un ruolo nella patogenesi del LES: 1. topi con difetto nell'apoptosi mediata dal legame del recettore FAS sviluppano una malattia simile al LES umano³⁴; 2. la principale alterazione dipendente dal deficit di apoptosi è l'aumentata sopravvivenza dei linfociti periferici, che potrebbe essere responsabile dell'autoimmunità tipo lupus; 3. gli anticorpi anti-nucleo del LES, sia nel topo che nell'uomo, sono anticorpi altamente specifici, diretti contro complessi macromolecolari esposti durante le reazioni di apoptosi^{35,36}. Lo studio dell'apoptosi in linfociti di pazienti con LES non ha evidenziato però alterazioni riproducibili. Alcuni studi hanno rilevato una diminuita clearance dei corpi apoptotici in pazienti con lupus, suggerendo la possibilità che antigeni nucleari restino esposti in modo anomalo al sistema immune. Gli stessi anticorpi antifosfolipidi, presenti in una larga percentuale di pazienti con LES, potrebbero far parte di misure tese ad eliminare corpi apoptotici difficilmente rimuovibili. Gli anticorpi antifosfolipidi reagiscono infatti per lo più verso lipidi del versante citoplasmatico della cellula, che diventano extracellulari nelle prime fasi dell'apoptosi³⁷. Esperimenti in vitro hanno dimostrato che gli anticorpi antifosfolipidi di soggetti con LES aumentano la clearance dei corpi apoptotici³⁸, ma il significato patogenetico di questi dati è ancora incerto.

APOPTOSI E SITI PRIVILEGIATI: L'UVEITE

Da molti anni è noto che in alcuni organi, come il cervello, l'occhio, le gonadi e la placenta, è possibile effettuare trapianti non compatibili senza che si verifichino reazioni di rigetto. È grazie a questo "privilegio immunologico", per esempio, che l'occhio accetta senza problemi il trapianto di cornee. Fino a pochi anni fa si riteneva che questo "privilegio" fosse dovuto solo a barriere meccaniche che non permettesero il ricircolo di linfociti. Recenti studi hanno dimostrato invece che alcuni degli organi "privilegiati", come l'occhio e il testicolo, esprimono in grande quantità la molecola FAS-L, in grado di innescare la morte per apoptosi nei linfociti che penetrano dal circolo ematico. Esperimenti condotti nel topo dimostrano che l'iniezione di un virus nella camera anteriore dell'occhio è seguita da un'infiltrazione linfocitaria che si autolimita rapidamente attraverso meccanismi di apoptosi. In topi con difetto di FAS o FAS-L l'infiammazione non si autolimita, anzi aumenta e si diffonde rapidamente a tutto l'occhio³⁹. È possibile che un'alterata espressione del FAS-L o qualche altro difetto di apoptosi intervengano nella cronicizzazione di processi infiammatori dell'occhio nell'uomo. Lo studio dell'apoptosi in soggetti con diverse patologie oculari ha mostrato l'assenza di FAS-L in due casi di necrosi acuta della retina. È possibile che in questi casi un deficit di apoptosi abbia condizionato l'evoluzione aggressiva dell'infiammazione fino alla necrosi⁴⁰.

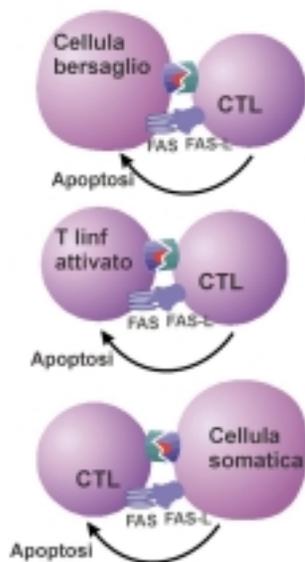
Durante questo processo devono essere eliminate le cellule inutili e quelle potenzialmente dannose, cosicché all'attività proliferativa deve corrispondere una altrettanto vigorosa distruzione di cellule. Questa viene ottenuta attraverso meccanismi di apoptosi, messi a punto in modo particolarmente sofisticato dal sistema immune. Si calcola che circa il 95% dei linfociti che transitano attraverso il timo vadano incontro a morte per apoptosi. Si ottiene in tal modo, a spese di un elevato costo energetico per l'organismo, la selezione dei cloni linfocitari utili per combattere gli agenti estranei e allo stesso tempo si raggiunge la tolleranza verso gli antigeni propri. Il sistema immune utilizza inoltre l'apoptosi per eliminare le cellule infettate o trasformate (i linfociti citotossici agiscono per lo più costringendo al suicidio le cellule bersaglio). E ancora, al termine degli eventi proliferativi che si verificano durante una risposta immune, l'omeostasi linfocitaria viene ristabilita attraverso la morte delle cellule attivate (Figura 3).

Anche se, come abbiamo visto, i suoi eventi centrali sono sempre gli stessi, l'apoptosi può essere indotta da stimoli molto diversi, con il coinvolgimento nelle varie circostanze di altrettanti recettori di membrana e percorsi. Ad esempio, poiché il principale meccanismo di controllo della proliferazione periferica dei linfociti coinvolge il recettore FAS¹⁹ (vedi Figura 3), soggetti con un difetto di questo recettore non sono in grado di controllare ed estinguere efficacemente una risposta immune avviata. Ne risultano un aumento dei linfociti e un'iperplasia degli organi linfoidi (linfonodi, milza), con la possibile comparsa di manifestazioni autoimmuni, in seguito a stimoli anche banali.

La caratterizzazione di questa malattia apre la strada a considerazioni sul possibile ruolo di difetti dell'apoptosi nella genesi delle malattie autoimmuni più in generale. Ad esempio, due modelli di deficit di apoptosi nel topo (topi FAS-negativi o topi con aumentata espressione di Bcl-2) hanno riprodotto una sintomatologia e alterazioni immunologiche assai simili a quelle del lupus eritematoso sistemico (LES) umano (glomerulonefrite, anticorpi anti-DNA e anti-Sm), ma non esistono evidenze di una primitiva alterazione dell'apoptosi in pazienti con LES.

Un possibile ruolo dell'apoptosi FAS-mediata nell'autoimmunità viene suggerito anche dagli studi riguardanti i cosiddetti siti "immunolo-

APOPTOSI MEDIATA DALL'INTERAZIONE FAS-FAS-Ligando NEL SISTEMA IMMUNE



Apoptosi nella risposta citotossica contro cellule infettate o trasformate. I linfociti citotossici (CTL) inducono apoptosi nella cellula bersaglio legando il recettore FAS sulla sua superficie.

Apoptosi come controllo dell'attivazione linfocitaria. Il linfocito T citotossico (CTL) induce apoptosi in un linfocito T attivato che esprime il recettore FAS sulla superficie. Con questo meccanismo si mette fine a una risposta immune fisiologica.

Apoptosi nella tolleranza periferica. In corso di infiammazione d'organo, cellule somatiche esprimono il FAS-L, causando la distruzione per apoptosi di eventuali linfociti autoreattivi attivati, esprimenti il recettore FAS sulla superficie.

Figura 3

gicamente privilegiati". Si tratta di organi nei quali è possibile effettuare trapianti non compatibili senza innescare reazioni di rigetto immunologico. Recenti dati suggeriscono che, almeno in qualche caso, questo privilegio potrebbe essere conferito dall'espressione nei suddetti tessuti di FAS-L, molecola in grado di indurre apoptosi nei linfociti attivati (che esprimono il FAS).

Con un meccanismo analogo, linfociti del donatore indurrebbero tolleranza nell'accettore di trapianti. Per esempio allotrapianti cutanei sono tollerati più a lungo in topi che vengono trattati dopo sette giorni con cellule di midollo osseo del donatore. Questo effetto è assente se il donatore ha una mutazione a carico del FAS-L²⁰.

Sembra inoltre che l'espressione di FAS-L entri in gioco durante i processi infiammatori d'organo (ad esempio in corso di un'infezione virale) al fine di eliminare eventuali linfociti autoreattivi. In quest'ottica è possibile rileggere l'ipotesi di Bottazzo riguardo alla patogenesi delle malattie autoimmuni d'organo (diabete, tiroidite ecc.)²¹.

CONCLUSIONI

L'apoptosi è un processo fondamentale alla vita, controllato da diversi strumenti, l'alterazione dei quali può avere un ruolo nella patologia umana.

Nel campo oncologico, lo studio dell'apoptosi ha permesso di approfondire la patogenesi delle neoplasie, di avere ulteriori mezzi di stadiazione in alcuni tumori (neuroblastoma, carcinoma del colon) e di aprire prospettive, anche se non immediate, di terapia.

In immunologia lo studio dell'apoptosi ha permesso di comprendere meglio la dinamica della risposta immune e del suo controllo. Sebbene esperimenti nell'animale suggeriscano fortemente un coinvolgimento di alterazioni dell'apoptosi nelle malattie autoimmuni, nell'uomo i dati sono ancora controversi. L'unica evidenza definitiva a questo proposito emerge dagli studi sulla patogenesi della rara malattia da difetto di apoptosi FAS-mediata (ALPS).

Negli altri campi (malattie neurodegenerative e cardio-vascolari), malgrado la produzione di numerosi studi, le conoscenze riguardo l'apoptosi non si sono arricchite di consistenti risvolti pratici e concettuali.

Dal punto di vista terapeutico un'induzione dell'apoptosi in modo

aspecifico è ottenuta con l'utilizzo di particolari farmaci (citostatici e steroidi). È possibile che in un prossimo futuro si sfruttino i diversi meccanismi fisiologici per indurre un'apoptosi selettiva in determinate cellule bersaglio (ad esempio stimolando specifici recettori con anticorpi monoclonali).

Bibliografia

1. Steller H: Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-9, 1995.
2. Thompson CB: Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science* 267, 1456-62, 1995.
3. Rudin CM, Thompson CB: Apoptosis and disease. *Annu Rev Med* 48, 267-81, 1997.
4. Tsujimoto Y, Croce CM: Analysis of the structure, transcription, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 5214-8, 1986.
5. Strasser A, Huang DCS, Vaux DL: *Biochimica et Biophysica Acta*. 1333, F151-F178, 1997.
6. Kroemer G: The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3, 614-20, 1997.
7. Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, Thompson CB: Expression of Bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 86, 1903-10, 1995.
8. Campos L, Rouault J-P, Sabido O, et al. *Blood* 81, 3091-3096, 1993.
9. Ikegaki N, Katsumata M, Minna J, et al. *Cancer Res* 54, 6-8, 1994.
10. Castle VP, Heidelberger KP, Bromberg J, et al. *Am J Pathol* 143, 1543-1550, 1993.
11. Harris CC, Hollstein M: Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 329, 1318-1327, 1993.
12. Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, et al: Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol* 150, 1-13, 1997.
13. Symonds H, Krall L, Remington L, et al: P53 dependent apoptosis suppress tumor growth and progression in vivo. *Cell* 78, 703-11, 1994.
14. Friend SH, Malkin D, Jolly KW, et al: Germline mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasm. *N Engl J Med* 326, 1309-15, 1992.
15. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE: P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957-67, 1993.
16. Harris CC, Hollstein M: Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 329, 1318-27, 1993.
17. Henderson S, Huen D, Rowe M, et al: Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8479-83, 1993.
18. Gougeon ML, Montagnier L: Apoptosis in AIDS. *Science* 260, 1269-70, 1993.
19. Nagata S, Golstein P: The fas death factor. *Science* 267, 1449-1456, 1995.
20. George JF, Sweeney SD, Kirklín JK, et al: An essential role for Fas ligand in transplantation tolerance induced by donor bone marrow. *Nat Med* 4, 333-5, 1998.
21. Dayan CM: Fas-L expression on epithelial cells: the Bottazzo-Feldmann hypothesis revisited. *Immunol Today* 18, 203, 1997.
22. Yamatsuji T, Matsui T, Okamoto T, et al: G protein mediated neuronal DNA fragmen-

- tation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. *Science* 272, 1349-52, 1996.
23. Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, et al: Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 274, 1710-3, 1996.
24. Troncoso JC, Sukhov RR, Kawas CH, et al: In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease: correlations with senile plaques and disease progression. *J Neuropathol Exper Neurol* 55, 1134-42, 1996.
25. Brache C, Bertini E: Spinal muscular atrophies: recent insight and impact on molecular diagnosis. *J Mol Med* 74, 555-62, 1996.
26. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, et al: The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80, 167-78, 1995.
27. Canale VC, Smith CH: Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr* 70, 891-9, 1967.
28. Elkon KB, Drappa J, Vaishnav AK, et al: Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* 335, 1643-9, 1996.
29. Fisher GH, Rosemberg FJ, Straus SE, et al: Dominant interfering fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935-946, 1995.
30. Sneller MC, Straus SE, Jaffe ES, et al: A novel lymphoproliferative autoimmune syndrome resembling murine lpr/gld disease. *J Clin Invest* 90, 334-341, 1992.
31. de Villartay JP, Rieux-Laucat F, Le Deist F, et al: Mutations in fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-9, 1995.
32. Le Deist F, Emile JF, Rieux-Laucat F, et al: Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet* 348, 719-23, 1996.
33. Dianzani U, Bragardo M, Ramenghi U, et al: Deficiency of the fas apoptosis pathway without fas gene mutation in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 89, 2871-9, 1997.
34. Nagata S, Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, et al: Lymphoproliferative disorder in mice explained by defects in fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317, 1992.
35. Amoura Z, Chabre H, Koutouzov S, et al: Nucleosome restricted antibodies are detected before anti ds-DNA and/or antihistone antibodies in serum of MLR-Mp lpr/lpr mice and +/- mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. *Arthritis Rheum* 37, 1684-8, 1994.
36. Casiano CA, Tan EM: Recent developments in the understanding of antinuclear autoantibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 111, 308-313, 1996.
37. Comfurius P, Bevers EM, Galli M, Zwaal RFA, et al: Regulation of phospholipid asymmetry and induction of antiphospholipid antibodies. *Lupus* 4, S19-S22, 1995.
38. Manfredi A, Rovere P, Galati G, et al: Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. I. *Arthritis Rheum* 41, 205-214, 1998.
39. Ferguson TA, Griffith TS: Cell death and the immune response: a lesson from the privileged. *J Clin Immunol* 17, 1-10, 1997.
40. Chan CC, Matteson DM, Li Q, et al: Apoptosis in patients with posterior uveitis. *Arch Ophthalmology* 115, 1559-67, 1997.