JOÃO BOSCO DE OLIVEIRA FILHO

**Mutação em NRAS causa uma síndrome
autoimune linfoproliferativa humana**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte

São Paulo

2008

À minha esposa, **Christianine**, pela infinita paciência, contínuo incentivo e confortante amor; ao meu filho, **Filipe**, por renovar meu amor pela vida; e ao meu **Segundo Filhinho (a)**, ainda na barriga da mamãe, por me mostrar que o que é bom pode ficar melhor ainda.

À minha mãe, **Maria José**, pelo amor com que me alimenta constantemente; ao meu pai, **João Bosco**, pelo repertório de piadas que até hoje repito; e aos meus irmãos, **Janinne**, **Janilton** e **Jarbas**, pela alegria que me trazem diariamente, mesmo à distância.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto Duarte, pela calorosa acolhida no laboratório LIM-56 e por tornar possível manter-me produtivo após meu retorno ao Brasil. Em especial, por ter aceitado me orientar nesta tese.

Ao Dr. Thomas Fleisher, que acreditou no meu potencial como pesquisador, mesmo sem a menor evidência concreta de que daria certo, e me recebeu no NIH.

Ao Dr. Michael Lenardo, que me inspirou a fazer ciência com rigor e responsabilidade.

Ao amigo Nicolas Bidère, pela paciência comigo na bancada, e pelo incentivo nos momentos de desânimo.

A todos do LIM-56, especialmente Dewton Moraes e Anete Grumach, pela amizade e oportunidades de colaboração.

Ao Programa Intramural dos *National Institutes of Health*, USA, que financiou o projeto.

“Somos aprendizes de uma arte na qual ninguém se torna mestre”.

Ernest Hemingway (1898-1961)

“The most beautiful thing we can experience is the mysterious. It is the source of all true art and science”.

Albert Einstein (1879 - 1955)

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1. CAPÍTULO 1: SOBRE APOPTOSE LINFOCITÁRIA E A SÍNDROME AUTOIMUNE LINFOPROLIFERATIVA	1
1.1 Introdução	1
1.2 Formas de Morte Celular Programada	2
1.3 Sinalização da Apoptose em Linfócitos	3
1.3.1 Via Extrínseca de Apoptose	5
1.3.2 Via Intrínseca de Apoptose	6
1.4 Dinâmica da morte de linfócitos durante uma resposta imune	8
1.5 A Síndrome Autoimune Linfoproliferativa (ALPS)	9
1.5.1 Aspectos clínicos e diagnósticos	10
1.5.2 Achados laboratoriais e histopatológicos	13
1.5.3 Etiologia molecular de ALPS	15
1.5.4 Doenças ALPS-símile	18
1.5.5 Síndrome da Deficiência de Caspase-8	19
1.5.6 Tratamento	20
1.6 Conclusão	23
2. CAPÍTULO 2: RESULTADOS EXPERIMENTAIS	24
2.1 Introdução	24
2.2 Resultados	26
2.2.1 Defeito na apoptose induzida pela retirada de IL-2 em um paciente com características clínicas e laboratoriais de ALPS	26
2.2.2 Diminuição dos níveis de BIM em P58	32
2.2.3 P58 tem uma mutação tipo ganho-de-função em <i>NRAS</i>	35
2.2.4 Hiperatividade de <i>NRAS</i> causa supressão de BIM através da via ERK em linfócitos humanos	38
2.2.5 Correção do defeito apoptótico no P58 pelo uso de inibidores de farnesilação e silenciamento de <i>NRAS</i>	42
2.3 Discussão	46
2.4 Métodos	50
2.4.1 Protocolos de cultura e tratamentos celulares	50

2.4.2	Quantificação da morte celular	51
2.4.3	Western blottings	52
2.4.4	Interferência de RNA e transfecção de plasmídeos	53
2.5.5	Imunofluorescência	55
2.5.6	PCR quantitativo em Tempo-Real (qPCR)	56
2.5.7	Imunoprecipitação de NRAS ativo	57
2.5.8	Sequenciamento de DNA.....	57
2.5.9	Análise por Microarranjo	58
2.5.10	Fracionamento Subcelular.....	59
3.	CONCLUSÕES	60
4.	REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

Oliveira Filho JB. *Mutação em NRAS causa uma síndrome autoimune linfoproliferativa humana* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 83p

A subfamília p21 RAS de pequenas GTPases, incluindo KRAS, HRAS e NRAS, participa de muitas redes de sinalização, incluindo proliferação celular, organização do citoesqueleto e apoptose, e é o alvo mais freqüente de mutações ativadoras em câncer. Mutações germinativas em *KRAS* e *HRAS* causam graves anormalidades desenvolvimentais levando às síndromes de Noonan, cárdio-facial-cutânea e Costello, porem mutações ativadoras germinativas em *NRAS* não foram descritas até hoje. A síndrome autoimune linfoproliferativa (ALPS) é o mais comum defeito genético de apoptose linfocitária, cursando com autoimunidade e acúmulo excessivo de linfócitos, particularmente do tipo T $\alpha\beta^+$ CD4⁺ CD8⁻. As mutações causadoras de ALPS descritas até hoje afetam a apoptose mediada por Fas, uma das vias extrínsecas de apoptose. Nós demonstramos aqui que os principais achados clínicos de ALPS, bem como uma predisposição para tumores hematológicos, podem ser causados por uma mutação heterozigota ativadora G13D no oncogene *NRAS*, sem causar prejuízo na apoptose mediada por Fas. O aumento na quantidade intracelular de NRAS ativo, ligado a GTP, induziu a um aumento da sinalização na via RAF/MEK/ERK, o que suprimiu a expressão da proteína pró-apoptótica BIM, e atenuou a apoptose intrínseca mitocondrial. Desta forma, uma mutação germinativa ativadora em NRAS causou um fenótipo clínico diferente do visto em pacientes com mutações em outros membros da família p21 RAS, cursando com um defeito imunológico seletivo, sem distúrbios generalizados do desenvolvimento.

Descritores: 1.Apoptose 2.Autoimunidade 3.Proteínas proto-oncogênicas p21 (ras)
4.BIM 5.Quinases de proteína quinase ativadas por mitógeno

SUMMARY

Oliveira Filho JB. *NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 83p

The p21 RAS subfamily of small GTPases, including KRAS, HRAS, and NRAS, regulates cell proliferation, cytoskeletal organization and other signaling networks, and is the most frequent target of activating mutations in cancer. Activating germline mutations of KRAS and HRAS cause severe developmental abnormalities leading to Noonan, cardio-facial-cutaneous and Costello syndrome, but activating germline mutations of NRAS have not been reported. Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) is the most common genetic disease of lymphocyte apoptosis and causes autoimmunity as well as excessive lymphocyte accumulation, particularly of CD4⁺, CD8⁺ ab T cells. Mutations in ALPS typically affect Fas-mediated apoptosis, but certain ALPS individuals have no such mutations. We show here that the salient features of ALPS as well as a predisposition to hematological malignancies can be caused by a heterozygous germline Gly13Asp activating mutation of the *NRAS* oncogene that does not impair Fas-mediated apoptosis. The increase in active, GTP-bound NRAS augmented RAF/MEK/ERK signaling which markedly decreased the pro-apoptotic protein BIM and attenuated intrinsic, nonreceptor-mediated mitochondrial apoptosis. Thus, germline activating mutations in *NRAS* differ from other p21 Ras oncoproteins by causing selective immune abnormalities without general developmental defects.

Descriptors: 1.Apoptosis 2. Autoimmunity 3.Proto-oncogene proteins p21 (ras) 4.BCL-2-like protein 11 5.Mitogen activated protein kinase kinases

1. CAPÍTULO 1: SOBRE APOPTOSE LINFOCITÁRIA E A SÍNDROME AUTOIMUNE LINFOPROLIFERATIVA*

1.1 Introdução

A manutenção da homeostase do sistema imune depende de um balanço preciso entre proliferação e morte celular. No decorrer da vida um indivíduo encontra numerosos patógenos, e cada encontro perturba a homeostase do sistema imunológico; os mecanismos de morte celular programada desempenham um papel crucial no retorno ao ponto de equilíbrio (1). Durante uma resposta imunológica a um patógeno, linfócitos antígeno-específicos expandem-se rapidamente, com um aumento estimado em 100 a 5000 vezes durante a primeira semana de infecção (2). Uma vez controlada a infecção, o número de células diminui rapidamente nas semanas subseqüentes, restando apenas alguns poucos clones de linfócitos de memória ao final do processo. Essa fase de contração do *pool* linfocitário é extremamente importante, dada a limitação de espaço no sistema imunológico (3). Durante cada novo encontro com antígenos, os linfócitos competem por acesso a células apresentadoras de antígenos, moléculas co-estimuladoras e citocinas. Portanto, a presença de linfócitos previamente expandidos e não eliminados pode potencialmente impedir o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente. Além disso, a presença de células envelhecidas, danificadas ou autoreativas na circulação pode

* OLIVEIRA JB, FLEISHER TA. Distúrbios hereditários da apoptose. In: Alergia e Imunologia na Infância e Adolescência, 2ª edição. Grumach, AS, editor. São Paulo: Atheneu, 2008. *No prelo*.

predispor à autoimunidade ou câncer (3). Estas considerações ajudam a entender a necessidade de existirem mecanismos de morte celular em linfócitos, contrabalanceando crescimento e divisão celular, e eliminando células indesejáveis ou não-funcionantes.

Este capítulo discute primariamente os distúrbios genéticos de apoptose, que contribuem para o entendimento da importância desse fenômeno em humanos. As primeiras subseções (1.2-1.4) apresentam conceitos básicos de morte celular em linfócitos, necessários à compreensão das patologias discutidas mais adiante. A subseção seguinte (1.5) descreve aspectos diagnósticos, clínicos e terapêuticos da síndrome autoimune linfoproliferativa e doenças afins.

1.2 Formas de Morte Celular Programada

A forma de morte celular programada mais bem estudada é a **apoptose**, que significa “folhas caindo”, em grego. Este termo foi utilizado pela primeira vez em 1972 por Kerr e colegas (4). Contudo, o fenômeno da apoptose já havia sido descrito morfolologicamente por Virchow, em 1859 (5). Células apoptóticas exibem uma morfologia característica, com diminuição do volume celular, formação de vacúolos e vesículas intracitoplasmáticos, condensação e fragmentação nucleares, formação de bolhas na superfície celular e dismantelamento da célula em corpos apoptóticos (6). Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados in vivo por células da vizinhança, em um processo não-inflamatório (7,8). Bioquimicamente, estas mudanças na estrutura da

célula resultam de uma série de eventos moleculares altamente regulados, descritos mais adiante.

A **necrose** é outra forma de morte celular. Em contraste com a apoptose, a necrose se caracteriza morfológicamente por edema e desintegração celular, com extravasamento do conteúdo citoplasmático, desencadeando uma reação inflamatória (6). Os principais desencadeadores de necrose são causas “externas” à célula, como lesões mecânicas, uso de drogas e hipóxia. Porém, mais recentemente foi descrita uma forma de necrose ‘programada’, desencadeada quando os mecanismos habituais de apoptose são bloqueados, como durante algumas infecções virais (9).

A **autofagia** é uma terceira modalidade de morte celular. Esse fenômeno geralmente é desencadeado pela privação de nutrientes celulares, como aminoácidos, e resulta na degradação de organelas intracelulares para uso como fonte energética (6). Porém, em algumas situações especiais esse mecanismo é subvertido, e induz à degradação de organelas ou proteínas vitais, com conseqüente morte da célula (10,11).

Das três formas usuais de morte celular, a apoptose é a mais bem compreendida, e todos os distúrbios humanos genéticos de morte celular descritos até hoje afetam esse mecanismo (12,13).

1.3 Sinalização da Apoptose em Linfócitos

Os componentes principais das vias de sinalização de apoptose foram descobertos em um organismo-modelo de pesquisa, o nematódeo *Caenorhabditis*

elegans. Pela importância seminal, estas descobertas renderam a Brenner, Horvitz e Sulston o prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina de 2002 (14). As vias de sinalização de apoptose em mamíferos serão discutidas brevemente a seguir.

Os linfócitos possuem duas vias principais de sinalização de apoptose: a **via extrínseca**, mediada por receptores da superfamília TNF (*tumor necrosis factor*); e a **via intrínseca**, ou mitocondrial, controlada por proteínas da família BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Figura 1), discutidas detalhadamente nas próximas seções (9,15). Apesar de apresentarem formas diferentes de ativação e sinalização iniciais, as duas vias convergem na ativação de caspases efetoras, que induzem à morte da célula (Figura 1). As caspases são proteases que existem no citoplasma sob a forma de zimógenos inativos e são ativadas por proteólise, numa cascata semelhante à do sistema complemento (16). De forma geral, vários estímulos intrínsecos ou extrínsecos induzem à formação de plataformas de sinalização ativadoras de caspases. A oligomerização das formas inativas das caspases, chamadas pró-caspases, nestes macrocomplexos sinalizadores ativa as caspases iniciadoras, que por sua vez clivam e ativam as caspases efetoras (Figura 1). As caspases efetoras ativadas clivam então substratos essenciais para a manutenção da célula, como poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), inibidor de DNase ativado por caspase (ICAD), lamininas, actina, fodrina e ceratina, resultando nas alterações morfológicas vistas durante a apoptose, e culminando com a morte celular (16,17).

Figura 1. Vias extrínseca e intrínseca de sinalização de apoptose. Há duas vias principais para a ativação das caspases efetoras indutoras de apoptose. A via extrínseca ativa as caspases iniciadoras 8 e 10, através de um complexo sinalizador de morte (DISC) atrelado ao receptor Fas. A via intrínseca ativa a caspase iniciadora 9 através da formação do apoptossoma. Essa estrutura é organizada quando estímulos induzem à formação de poros na superfície mitocondrial, com vazamento de citocromo c. Bid interliga as duas vias.

1.3.1 Via Extrínseca de Apoptose

A via extrínseca é ativada pela ligação dos receptores da família TNF contendo um domínio de morte (*death domain*, DD) intracelular, chamados de receptores de morte

(*death receptors*, DRs) (18). Entre os DRs incluem-se Fas, TNF-R1 e TRAIL, pra citar os mais conhecidos. Para explicar o processo de sinalização desta via será usado como exemplo o receptor FAS e seu ligante (19). Como os outros DRs, FAS é um receptor trimérico, presente na superfície da célula. A interação com o também trimérico FAS ligante causa uma mudança conformacional na porção intracelular do receptor, induzindo o recrutamento da molécula adaptadora FADD (FAS associated death domain) (Figura 1). FADD, por sua vez, atrai para o complexo as pró-caspases iniciadoras 8 e 10. Esse grupo de proteínas agregadas ao receptor de morte (Fas, FADD e pró-caspases 8/10) é chamado complexo sinalizador indutor de morte (DISC). As pró-caspases 8 e 10 possuem uma baixa atividade proteolítica intrínseca na sua forma inativa, mas a aproximação em um complexo multimérico no receptor amplifica essa atividade proteolítica, induzindo auto-clivagem e completa ativação. As formas ativas das caspases 8 e 10 difundem-se no citoplasma e clivam e ativam as caspases efetoras 3, 6 e 7, entre outras. As caspases efetoras, por sua vez, clivam múltiplos componentes celulares vitais, levando à morte da célula.

1.3.2 Via Intrínseca de Apoptose

A via intrínseca de apoptose, também chamada via mitocondrial, é regulada por proteínas da família BCL-2 (20). Todas as proteínas da família BCL-2 possuem em comum na sua estrutura um motivo chamado *BCL-2 homology domain*, ou BH. Há membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos. Os membros anti-apoptóticos contêm três

ou quatro BH, e compreendem BCL-2, Bcl-X_L, Bcl-W, A1, Boo/Diva e Mcl-1. As proteínas pró-apoptóticas se subdividem em dois subgrupos. O primeiro deles inclui Bax, Bak, Bok, Bcl-X_S, e Bcl-G_L, proteínas com grande semelhança estrutural com os membros anti-apoptóticos da família. O segundo subgrupo contém proteínas chamadas *BH3-only*, por possuírem apenas este domínio BH, e abarca Bad, Bid, Bim, Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, Bcl-G_S, Bmf, Noxa e Puma/Bbc3.

Vários estímulos fisiologicamente relevantes ativam a via intrínseca de apoptose, incluindo a seleção negativa de linfócitos T durante a educação tímica, a privação de fatores de crescimento ou citocinas, a lesão de DNA por radiação e o tratamento com drogas citotóxicas, como agentes quimioterápicos, para citar alguns exemplos (20). Um modelo atual de ativação dessa via é apresentado na Figura 1.

As proteínas *BH3-only* agem como sensores para os diferentes estímulos apoptóticos (21). Por exemplo, BIM serve como sensor da privação de citocinas ou fatores de crescimento, e PUMA como sensor de dano ao material genômico (21). Uma vez ativadas pelo estímulo apropriado, as proteínas *BH3-only* inativam as proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2, causando a oligomerização de Bax e Bak na superfície da mitocôndria, levando à formação de poros na membrana mitocondrial externa (22). A abertura destes poros provoca a perda do potencial mitocondrial transmembrana e o vazamento de proteínas apoptogênicas, como SMAC/DIABLO, fator indutor de apoptose (AIF) e citocromo c. O citocromo c liberado vai se oligomerizar no citoplasma com APAF-1 e pró-caspase-9 para formar, na presença de Ca⁺² e ADP, um complexo ativador de caspase-9 chamado apoptossoma (Figura 1). Uma vez ativada, a caspase-9 cliva e ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7, levando à morte da célula. Os membros anti-

apoptóticos promovem a sobrevivência celular pelo seqüestro e inativação de proteínas *BH3-only* ou outras proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bak. Em resumo, o balanço entre os níveis de ativação e a concentração de proteínas anti- e pró-apoptóticas da família BCL-2 decidem o destino da célula (21).

1.4 Dinâmica da morte de linfócitos durante uma resposta imune

Linfócitos periféricos maduros têm diferentes suscetibilidades à apoptose (9). As células *naïve*, durante a ativação inicial, são resistentes à apoptose. Essa propriedade é benéfica, permitindo que uma resposta imune contra patógenos se desenvolva eficazmente. Uma vez que as células são ativadas e proliferam, tornam-se susceptíveis à morte. Essa maior sensibilidade à apoptose ocorre durante o pico da resposta imune e prossegue até seu desfecho, sendo um importante mecanismo de feedback negativo no controle da intensidade de uma resposta imunológica.

As duas vias principais de apoptose, extrínseca e intrínseca, são ativadas em momentos distintos durante uma resposta imune (3). Inicialmente, os altos níveis de antígenos circulantes estimulam a produção de grandes quantidades de interleucina-2 (IL-2), que induz à progressão dos linfócitos pelo ciclo celular. A IL-2 também induz alterações moleculares que torna as células susceptíveis à morte pela via extrínseca (9). Este processo envolve o aumento da expressão de FAS e seu ligante na superfície da célula, bem como a diminuição da expressão de moléculas que bloqueiam a via Fas, como c-FLIP. Conseqüentemente, linfócitos T e B são levados à morte quando os

receptores FAS interagem com FAS ligante, solúvel ou ancorado na superfície da própria célula ou em células vizinhas. Desta forma, a via extrínseca parece limitar a magnitude da resposta imune, protegendo o hospedeiro na presença de estimulação antigênica continuada ou repetida (9).

O segundo mecanismo contributor para a morte dos linfócitos é desencadeado quando a resposta imune está em declínio. A queda dos níveis de antígenos circulantes diminui a quantidade de IL-2 secretado, causando reflexamente uma diminuição da expressão de CD25, a cadeia α do receptor de IL-2 de alta afinidade. Estes dois fatores - pouco IL-2 circulante e menor expressão do seu receptor - induzem à ativação da via intrínseca de apoptose, com conseqüente morte celular. Este mecanismo media, portanto, a contração do *pool* de linfócitos ativados, após a eliminação do patógeno agressor (3).

Em resumo, linfócitos ativados morrem por mecanismos envolvendo receptores de morte, como FAS e TNF, bem como por privação de citocinas linfotróficas. Esses mecanismos complementares limitam a magnitude e duração de uma resposta imune.

1.5 A Síndrome Autoimune Linfoproliferativa (ALPS)

Estudos em animais e humanos com raros defeitos genéticos demonstram que a apoptose é um processo fisiológico que mantém a tolerância imunológica e previne o desenvolvimento de tumores (12,13). O camundongo *lpr* (*lymphoproliferation*) é uma cepa portando uma mutação espontânea no gene codificando o receptor FAS (23). Estes

camundongos desenvolvem esplenomegalia e linfadenopatia acentuadas. Dependendo do background genético, os camundongos podem apresentar ainda hipergamaglobulinemia, autoanticorpos, glomerulonefrite, poliarterite, sialoadenite, artrite ou cirrose biliar primária. Doença similar é vista nos camundongos *gld* (*generalized lymphoproliferative disease*), que possuem mutações homozigóticas no ligante de Fas, FasL (23). Uma síndrome semelhante à vista nestes animais acomete humanos com mutações em genes envolvidos na apoptose, como descrito a seguir.

Em 1992, Sneller e colegas do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH) descreveram uma síndrome infantil caracterizada por linfadenopatia, esplenomegalia, autoimunidade, hipergamaglobulinemia e linfocitose (24). Os pacientes cursavam ainda com expansão de uma população incomum de linfócitos maduros expressando receptores de células T TCR- α/β , mas sem expressar co-receptores CD4 ou CD8, chamados duplo-negativos (DNT). A doença humana foi então chamada síndrome autoimune linfoproliferativa (ALPS), e corresponde muito provavelmente à entidade clínica descrita por Canale e Smith em 1967 (25). Logo após a descoberta, em 1995, do defeito genético causando o fenótipo *lpr* em camundongos, dois estudos seminais demonstraram que humanos com ALPS também portavam mutações no gene codificando o receptor FAS (*TNFRSF6*), levando a um defeito apoptótico em células imunes (26-28).

1.5.1 Aspectos clínicos e diagnósticos

ALPS é uma doença rara com penetrância variável, afetando mais de 300 famílias ao redor do mundo. O grupo de estudos do NIH definiu critérios diagnósticos para ALPS (Tabela 1) (13). Todos os pacientes devem apresentar sinais de acúmulo crônico não-maligno de linfócitos, como linfadenopatia e/ou esplenomegalia, números elevados de DNT em sangue periférico e defeito de apoptose linfocitária demonstrado *in vitro*. Autoimunidade, embora vista na maioria dos doentes, não é critério absoluto, bem como linfoma.

Para o diagnóstico definitivo de ALPS é preciso demonstrar um defeito apoptótico linfocitário *in vitro*, teste realizado em alguns poucos laboratórios especializados. Esse teste consiste na expansão e ativação dos linfócitos do paciente por cerca de uma semana, para que as células se tornem susceptíveis à morte induzida por ativação do receptor Fas, como discutido anteriormente. Após esse período em cultivo, as células são estimuladas com um anticorpo ativador anti-Fas, e o nível de apoptose quantificado por citometria de fluxo. Um controle normal é usado para comparação. Um paciente com ALPS apresenta geralmente 50% ou menos de morte celular quando comparado a um controle normal, e esse é o *cutoff* usado atualmente em nosso serviço e no NIH (12). Há, entretanto, algumas situações onde o teste de apoptose *in vitro* pode ser normal. A primeira exceção é no caso de mutação no ligante de Fas, FasL, onde não haverá defeito apoptótico, pois o receptor está normal (29). Outra situação semelhante é no ALPS causado por mutações somáticas em Fas, afetando apenas alguns tipos celulares (a etiologia molecular e classificação de ALPS serão discutidas adiante). Ainda, no ALPS causado por defeitos na via intrínseca da apoptose, recentemente descrito por este autor e colegas, a apoptose mediada por FAS está intacta (30). Portanto,

caso haja forte suspeita clínica e presença de células DNT, a ausência de defeito apoptótico *in vitro* não invalida o diagnóstico de ALPS.

Tabela 1 - Critérios diagnóstico para ALPS

CRITÉRIOS MAIORES

1. Linfadenopatia e/ou esplenomegalia crônicas não-malignas
2. Aumento acima de 1% do número de células $CD3^{+}TCR\alpha/\beta^{+}CD4^{-}CD8^{-}$ periféricas
3. Defeito de apoptose linfocitária

ACHADOS DE SUPORTE

1. História familiar de ALPS
 2. Manifestações autoimunes
 3. Histopatologia característica
 4. Linfoma
-

NOTA: O diagnóstico de certeza de ALPS requer a presença dos três critérios maiores, ou dos dois primeiros somados ao achado de uma mutação genética.

Os sinais e sintomas de ALPS geralmente se iniciam na infância (média de 24 meses), quando os pacientes são investigados por esplenomegalia ou linfadenopatia inexplicados, ou sintomas de autoimunidade (12,13). Há crescimento de órgãos linfóides periféricos, sem febre ou perda de peso. A presença destes sintomas em pacientes com ALPS deve levantar a suspeita de linfoma. Pode ainda haver hepatomegalia e alargamento do timo. A linfadenopatia flutua e pode melhorar com a idade, mesmo sem tratamento.

Até 80% dos pacientes com ALPS apresentam auto-anticorpos circulantes, embora apenas metade dos pacientes tenha doença autoimune clinicamente detectável

(12,13). Anemia hemolítica Coombs-positiva e púrpura trombocitopênica imune são as manifestações autoimunes mais comuns. Essas manifestações costumam ser graves, exigindo tratamento agressivo. Neutropenia pode ocorrer, tanto autoimune como causada por hiperesplenismo, mas é geralmente leve. A presença de anticorpos anticardiolipina ou anti-neutrófilo é comum, mas não tem correlação clínica com trombose ou neutropenia, respectivamente (31). Manifestações autoimunes fora do sistema hematológico são muito raras, e incluem positividade de FAN ou fator reumatóide, neurite ótica, Guillain-Barré, cirrose biliar primária, anticorpos anti Fator VIII, hepatite autoimune, vasculite e dermatia linear por IgA (12,13).

Paciente com ALPS possuem ainda um risco 52 x e 13 x maior de desenvolver linfoma Hodgkin e não-Hodgkin, respectivamente, quando comparados à população em geral. Os linfomas são de variados tipos histológicos, e parecem ter curso clínico similar ao visto em paciente sem a síndrome (32).

1.5.2 Achados laboratoriais e histopatológicos.

A presença de células duplo-negativas é específica para ALPS, e necessária para o diagnóstico dessa patologia. Valores de DNT ($CD3^+ TCR\alpha/\beta^+ CD4^- CD8^-$) acima de 1% dos linfócitos são considerados anormais, e em ALPS com mutações graves não é incomum encontrar-se valores de 30 a 40% (12,33). As células DNT não são semelhantes aos timócitos imaturos duplo-negativos. A origem dessas células é obscura, mas há evidências que sejam geradas de células CD4 e CD8 maduras periféricas que

perderam a expressão dos co-receptores após ativação crônica, mas não foram apropriadamente eliminadas (34). Fenotipicamente, as DNT expressam CD45R B220, além de HLA-DR, CD27 e CD57, e produzem altas quantidades de IL-10 (33,35). Não é sabido se essas células participam ativamente da fisiopatologia da doença ou são apenas um epifenômeno. Pacientes com ALPS também apresentam altos níveis de IL-4 e IL-5 circulantes, e esse perfil Th2 de citocinas provavelmente contribui para a hipergamaglobulinemia policlonal e o desenvolvimento de autoanticorpos (36).

Além da presença de DNT, outras alterações celulares são vistas no ALPS. Os pacientes podem apresentar grande quantidade de linfócitos T, com elevação de células CD8⁺CD57⁺, bem como linfócitos TCR γ/δ ⁺. Há ainda elevação do percentual de linfócitos B expressando CD5. Interessantemente, algumas populações celulares estão diminuídas, como a de linfócitos B de memória (CD20⁺CD27⁺) e as células CD4⁺CD25⁺. Tipicamente não há alterações de células NK ou granulócitos (33). Eosinofilia pode ocorrer, e parece estar associada a um pior prognóstico (37).

A grande maioria dos pacientes cursa com hipergamaglobulinemia policlonal, que pode ser acentuada, com valores ultrapassando 6 g/dL. Apesar da intensidade e frequência da hipergamaglobulinemia, não há relatos de síndrome de hiperviscosidade associada à ALPS (38).

Curiosamente, um achado comum nestes doentes é a elevação dos níveis séricos de Vit. B12 (SE Straus, J Dale, comunicação pessoal). O significado clínico desta anormalidade não é conhecido.

Histopatologicamente, os linfonodos de pacientes com ALPS apresentam algumas alterações típicas, como hiperplasia folicular e plasmocitose policlonal, e expansão da região paracortical por grande número de células DNT (39).

1.5.3 Etiologia molecular de ALPS

Defeitos em diversos componentes da via FAS podem causar ALPS (12). Mais de 70% dos casos são causados por mutações no gene codificando FAS (*TNFRSF6*), e uma minoria têm como causa um defeito em FasL (*TNFSF6*) ou caspase 10 (*CASP10*) (27,29,40,41). Mutações em caspase 8 (*CASP8*) causam uma síndrome com características clínicas algo diferentes de ALPS, que será discutida separadamente adiante (42). Recentemente, o laboratório de Rieux-Laucat publicou um artigo mostrando que mutações somáticas (não-germinativas) em *Fas*, presentes somente nas células duplo-negativas e numa pequena porcentual de outros tipos celulares, também podem ser causa de ALPS (43). Apesar do grande progresso na identificação dos defeitos genéticos causando ALPS, cerca de 20 a 30% dos casos não têm etiologia molecular conhecida.

Todas as mutações atualmente associadas com ALPS afetam componentes da via extrínseca de apoptose. Porém, muito recentemente este autor e colegas descreveram uma mutação no gene *NRAS* como causa de ALPS (30). Este artigo original compõe a base experimental desta tese, e é discutido em detalhes na segunda seção. Baseando-se

nestes defeitos moleculares, a classificação de ALPS proposta atualmente é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação de ALPS baseada no defeito molecular

CLASSIFICAÇÃO	DEFEITO GENÉTICO
Tipo Ia	TNFRSF6 ¹ (FAS)
Tipo Ib	TNFSF6 ² (FASLG)
Tipo Im (mosaico)	Mutação somática em FAS
Tipo II	CASP10 ³
Tipo III	Defeito desconhecido
Tipo IV	NRAS ⁴

¹TNFRSF6, TNF-receptor superfamily 6.

²TNFSF6, TNF superfamily 6.

³CASP10, caspase 10.

⁴NRAS, neuroblastoma-RAS.

A maioria dos pacientes com ALPS possui mutações em *FAS*, transmitidas de modo autossômico dominante. As mutações podem ser encontradas por todo gene, tanto em regiões exônicas quanto em *splice sites* intrônicos, mas 2/3 das mutações concentram-se na região do domínio de morte intracelular (exon 9). Uma descrição de todas as mutações conhecidas em *FAS* pode ser encontrada no ALPS database (ALPSbase: <http://research.nhgri.nih.gov/ALPS/>).

São diversos os efeitos das mutações na biologia de Fas. Mutações no domínio de morte causam um defeito grave de apoptose *in vitro*, pois impedem a interação de FAS com FADD, prevenindo o recrutamento das caspases iniciadoras para a plataforma de sinalização. Algumas mutações tipo perda-de-função causam haploinsuficiência, com

baixa expressão do receptor Fas, e outras podem ainda impedir a formação de macrocomplexos de receptores na superfície da célula, diminuindo a eficiência da sinalização (12). Mutações homozigóticas em FAS são bastante raras, e cursam com sintomas muito graves, desde o nascimento (44).

Apenas uma fração dos pacientes com ALPS possui mutações em outros componentes da via Fas. Um mutação heterozigota no ligante de Fas, FasL, foi descrita em um paciente com quadro clínico semelhante ao lúpus eritematoso sistêmico, que possuía linfadenopatia, esplenomegalia e um defeito de apoptose após estimulação pelo receptor de células T, mas sem aumento de células DNT (40). Desde então, outras mutações heterozigóticas e homozigóticas em FasL foram descritas em pacientes com quadros clínicos típicos de ALPS (29,45).

Mutações heterozigóticas no gene codificando caspase-10 (*CASP10*) foram identificadas em pelo menos 3 pacientes com ALPS (41). O quadro clínico destes doentes é indistinguível do encontrado em pacientes com outros defeitos. Eles apresentam defeitos de apoptose não somente nos linfócitos, mas também em células dendríticas, sugerindo que a não-deleção de células apresentadoras de antígeno pode contribuir para a fisiopatologia da doença (41). Essa idéia foi recentemente corroborada pelos achados de Chen e colegas, que desenvolveram diferentes linhagens de camundongos expressando uma proteína inibidora da sinalização da via FAS apenas em tipos celulares distintos, como linfócitos T, B ou células dendríticas. Interessantemente, os animais que apresentaram doença autoimune mais grave foram aqueles com defeitos de apoptose restritos às células dendríticas (46).

A relação entre genótipo e fenótipo em ALPS é complexa (47). Em famílias com um grande número de membros afetados, familiares com a mesma mutação e o mesmo grau de defeito de apoptose *in vitro* podem apresentar manifestações clínicas muito diversas, variando de completa ausência dos sintomas a ALPS clássico. A penetrância é maior nas mutações afetando o domínio de morte, e menor nas mutações extracelulares. Estes dados sugerem que outros fatores, genéticos ou ambientais, podem contribuir para o fenótipo da doença, como ocorre em muitos outros distúrbios genéticos humanos.

1.5.4 Doenças ALPS-símile

Alguns pacientes apresentam achados clínicos e laboratoriais semelhantes à ALPS, mas não preenchem todos os critérios do NIH para um diagnóstico de certeza. Um exemplo é a variante de ALPS chamada doença autoimune linfoproliferativa de Dianzani (DALD) (48). Estes doentes cursam com linfoproliferação, fenômenos autoimunes, susceptibilidade para tumores linfáticos e defeitos variados de apoptose, mas não apresentam expansão de células DNT. Os defeitos moleculares nesta síndrome não são conhecidos.

Considerando que defeitos apoptóticos em células dendríticas podem contribuir para a patogênese da doença, pode-se especular que outras patologias com achados de ALPS, como a doença de Rosai-Dorfman, podem ser causadas por mutações em células apresentadoras de antígenos. Por outro lado, outras formas de doenças ALPS-like podem

representar anomalias em vias não-apoptóticas, que regulam o crescimento e ativação de linfócitos.

1.5.5 Síndrome da Deficiência de Caspase-8

Estudos recentes demonstram de forma inequívoca que certas moléculas envolvidas na apoptose, como a caspase-8, também participam ativamente de vias de sinalização de ativação linfocitária (49,50). A deficiência de caspase-8, encontrada em dois irmãos com mutações homozigóticas no gene correspondente (*CASP8*), causa uma síndrome distinta de ALPS, chamada estado de deficiência de caspase-8 (CEDS) (42). Em concordância com o papel conhecido da caspase-8 na sinalização da via Fas, estes pacientes apresentam moderado defeito de apoptose linfocitária, com linfadenopatia e esplenomegalia leves, e números de células DNT levemente elevados. Contudo, os pacientes com CEDS, diferentemente dos pacientes com ALPS, apresentam sinais de uma imunodeficiência combinada, com infecções sinopulmonares de repetição e ataques recorrentes herpes simplex mucocutâneo. Apresentam ainda baixos níveis séricos de imunoglobulinas, fraca resposta humoral a antígenos polissacarídicos e defeitos de ativação de linfócitos T, B e células NK. Su e colegas demonstraram recentemente que a caspase-8 é necessária para a formação do complexo sinalizador ativador do fator de transcrição NF- κ B, responsável por muitos dos efeitos celulares pós-ativação celular (50) A identificação de outros pacientes com mutações no mesmo gene permitirá a definição do espectro clínico desta doença.

1.5.6 Tratamento

Alguns pacientes com ALPS melhoram espontaneamente com o passar dos anos, mas a maioria requer tratamento continuado para controle das manifestações autoimunes (12). O tratamento das citopenias autoimunes é similar ao adotado nos pacientes sem ALPS. Um pulso com corticosteróides (5- 30 mg/kg de metilprednisolona IV) ajuda a trazer as citopenias autoimunes rapidamente sob controle. A terapia é continuada com corticosteróides orais (1-2 mg/kg/dia de prednisona), que devem ser desmamados lentamente, em um período de meses. A velocidade de desmame vai ser ditada pelos achados clínicos e laboratoriais do paciente. Terapias alternativas incluem o uso de imunoglobulina intravenosa para a trombocitopenia autoimune, e fator estimulador do crescimento de colônias (GM-SCF), para os raros casos de neutropenia autoimune severa refratária.

Alguns pacientes apresentam recaída da citopenia imediatamente após a suspensão dos esteróides, e precisam manter uma dose mínima diária ou em dias alternados. Estes pacientes podem se beneficiar da troca do esteróide pelo imunossupressor micofenolato mofetil ($\sim 600 \text{ mg/M}^2/\text{dose}$, oralmente, duas vezes ao dia), como terapia a longo prazo. O uso de micofenolato ajuda a diminuir a dose e a necessidade de corticosteróides, e reduz a necessidade de esplenectomia, sendo particularmente útil nos pacientes pediátricos (51,52)

Nos pacientes resistentes às terapias discutidas acima, drogas como azatioprina ou vincristina podem ser tentadas, embora não haja evidência experimental extensa indicando estes tratamentos. Mais recentemente, foi demonstrada a eficácia de Rituximab (anti-CD20) nos pacientes com ALPS e citopenias autoimunes refratárias (53,54).

A esplenectomia como recurso de controle das citopenias deve ser evitada sempre que possível. Apesar disso, muitos doentes acabam por necessitar este procedimento, por falência das outras medidas terapêuticas (12). Pacientes com ALPS possuem um risco mais elevado que a população geral de sepse e morte por infecções pneumocócicas após esplenectomia, e estes riscos devem ser cuidadosamente discutidos com o paciente e familiares, antes do procedimento (dados não publicados do autor). Os pacientes devem ser vacinados contra *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis* antes da esplenectomia, e serem re-imunizados após a cirurgia, caso os títulos de anticorpos protetores comecem a diminuir. Antibioticoprofilaxia por toda a vida com penicilina ou fluoroquinolonas é recomendada. Ademais, os pacientes esplenectomizados devem ser orientados a procurar assistência médica imediata em casos de sintomas febris, para descartar bacteremia.

O transplante de medula óssea é empregado apenas em casos muito graves de pacientes com ALPS devido a mutações graves em *FAS* (55,56). O transplante deve ser considerado terapia de última escolha, pelos riscos envolvidos no procedimento.

Apesar do desconforto causado pela esplenomegalia e linfadenopatias, estas manifestações geralmente não necessitam de terapia médica. Os tratamentos atualmente empregados nos pacientes com ALPS objetivam o controle das manifestações

autoimunes, e não existem drogas que controlem a linfoproliferação e previnam linfomagênese. Entretanto, dois pequenos estudos publicados por um grupo holandês sugerem que um regime de sulfadoxina-pirimetamina pode ser útil em pacientes com ALPS ou doenças ALPS-símile (57,58). Regressão da linfadenopatia e esplenomegalia, bem como melhora nas contagens celulares foram observadas em seis de sete pacientes tratados. Apesar disso, estudos mais recentes não demonstraram nenhum benefício do uso isolado de pirimetamina na regressão do tamanho do baço ou linfonodos em pacientes com ALPS, nem em modelos murinos de ALPS (59). Portanto, este regime não é atualmente recomendado como primeira linha para o tratamento de ALPS.

A predisposição para linfomas nestes pacientes representa um desafio clínico único: como diferenciar entre uma linfadenopatia benigna, causada apenas pela infiltração de células DNT, e um linfoma em desenvolvimento, ou recorrente? Pacientes com ALPS requerem exames clínicos periódicos e vigilância por tomografia computadorizada das linfadenopatias torácicas e abdominais. A presença de sintomas gerais como febre, perda de peso ou sudorese noturna deve chamar a atenção para o diagnóstico de linfoma. Linfonodos suspeitos devem ser biopsiados para descartar doença maligna. O uso da tomografia por emissão de pósitrons (PET), que detecta zonas de alta captação de glicose, portanto de alto metabolismo, pode ser útil para identificar e seguir lesões suspeitas (60). Felizmente, os linfomas em pacientes com ALPS respondem às terapias convencionais e não têm um pior prognóstico (32).

1.6 Conclusão

A morte celular programada é um mecanismo regulatório essencial para estabelecer um balanço entre crescimento, proliferação e desaparecimento de linfócitos. Estudos em humanos com a rara doença genética chamada síndrome autoimune linfoproliferativa demonstraram que a apoptose é fisiologicamente importante para manter a homeostase linfocitária, prevenir autoimunidade e suprimir linfomagenese. Estudos em doenças semelhantes à ALPS, como o estado de deficiência de caspase-8, revelaram que moléculas envolvidas na morte celular também podem participar em outras vias de sinalização intracelular necessárias para ativação de linfócitos. A descoberta de outros defeitos genéticos responsáveis por ALPS e doenças relacionadas vai certamente permitir uma maior compreensão dos mecanismos que governam a homeostase de células imunes *in vivo*.

2. CAPÍTULO 2: RESULTADOS EXPERIMENTAIS

O texto a seguir é uma tradução do artigo publicado pelo autor no *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 2007;104 (21):8953-8958, com algumas modificações: (1) as figuras suplementares foram incorporadas ao texto; (2) há algumas mudanças textuais em relação ao original, para aumentar a clareza de certos conceitos. O trabalho original pode ser encontrado no Apêndice 1.

2.1 Introdução

Os genes RAS (*NRAS*, *KRAS* e *HRAS*) codificam proteínas de 21 kDa membros da superfamília de pequenas proteínas ligadoras de GTP, que possuem diversas funções de sinalização intracelular, incluindo o controle da proliferação, crescimento e apoptose celulares (61). Cerca de 30% de todos os cânceres humanos apresentam mutações somáticas ativadoras em genes RAS (62). Mutações germinativas em genes da via RAS foram descritas apenas recentemente, e causam as síndromes de Costello (*HRAS*), Noonan (*PTPN11*, *KRAS*, *SOS1*) e cárdio-facial-cutânea (*KRAS*, *BRAF*, *MEK1* e *MEK2*) (63-67). Indivíduos portando estas síndromes apresentam anormalidades graves de desenvolvimento, combinando defeitos faciais, cardíacos, baixa estatura, anormalidades genitais e cutâneas e retardo mental (68). Não há relatos de defeitos imunológicos nestas síndromes. Pacientes com as síndromes de Costello e Noonan apresentam uma maior

chance de desenvolverem tumores sólidos e hematopoiéticos, respectivamente (69). Mutações germinativas em *NRAS* nunca foram descritas.

A síndrome autoimune linfoproliferativa (ALPS) (OMIM 601859/603909) é o mais comum distúrbio genético da apoptose linfocitária, e é caracterizada pelo acúmulo não-maligno de linfócitos, pela presença de um defeito apoptótico e pelo risco aumentado de desenvolver tumores hematológicos (13). Um achado típico da doença é o acúmulo de células T expressando receptores $\alpha\beta$ na ausência de coreceptores CD4 e CD8, chamadas de células T “duplo-negativas” (DNTs: $CD4^-CD8^-TCR\alpha\beta^+$). Estas células são distintas das células tímicas imaturas duplo negativas, pois possuem genes de TCR $\alpha\beta$ rearranjados (12). De acordo com o defeito genético subjacente, ALPS pode ser classificado como Tipo Ia, Ib e II, causados por mutações germinativas em FAS (*TNFRSF6*), no ligante de FAS (*TNFSF6*) e caspase 10 (*CASP10*), respectivamente (12,27,28,40,41). Além disso, mutações somáticas em CD95 causam ALPS Tipo Im (mosaico) (43). Todas essas mutações afetam a via extrínseca da apoptose linfocitária mediada por FAS. Pacientes com todas as manifestações clínicas de ALPS, mas que não possuem defeitos na via FAS representam um enigma fascinante, e são classificados como ALPS tipo III. Este grupo abarca um grande número de doentes, e é provavelmente heterogêneo do ponto de vista genético. **Em uma tentativa de descobrir novos defeitos genéticos**, nós investigamos a integridade de vias apoptóticas alternativas (não-extrínsecas) em pacientes com ALPS tipo III e identificamos um indivíduo com um defeito específico na apoptose linfocitária induzida pela retirada de citocinas, causado por uma mutação ativadora em *NRAS*.

2.2 Resultados

2.2.1 Defeito na apoptose induzida pela retirada de IL-2 em um paciente com características clínicas e laboratoriais de ALPS.

Todos os pacientes com ALPS descritos até o momento apresentavam mutações em moléculas envolvidas na via FAS (12,13). Entretanto, um número significativo de pacientes da coorte de ALPS do NIH apresenta características clínicas de ALPS, mas têm apoptose linfocitária mediada por FAS normal *in vitro* e não apresenta mutações em moléculas da via FAS (Fas, FasL, FADD, caspase-8 ou caspase-10). Supomos que alguns destes pacientes poderiam ter alterações na via intrínseca da apoptose, controlada por proteínas da família BCL-2. Para investigar esses pacientes, submetemos linfócitos ativados a vários estímulos apoptóticos que sabidamente agem através da via intrínseca, incluindo o tratamento com drogas citotóxicas (estaurosporina, etoposide, taspargina), irradiação e privação de citocina (dados não mostrados)(70). Os linfócitos de um destes pacientes foram claramente resistentes à morte celular induzida pela retirada de interleucina (IL-2) do meio de cultura (Figura 1 A).

O indivíduo afetado [*National Institutes of Health (NIH) cohort patient 58*, ou P58] é um homem de 49 anos com uma história de linfadenopatia e esplenomegalia desde a infância e relato de dois tumores hematológicos: uma leucemia na infância e um linfoma quando adulto jovem (Tabela 1). A imunofenotipagem de sangue periférico revelou um aumento sustentado do número de células DNT durante vários anos de avaliação, além de outras alterações comumente encontradas em ALPS, incluindo uma

elevação do porcentual de linfócitos B CD5⁺ e baixos números de linfócitos B CD27⁺ (33). Contudo, outros achados freqüentes em ALPS não foram vistos neste paciente, como uma queda da relação CD25/HLA-DR e altos números de CD3⁺CD57⁺. Uma biópsia linfonodal realizada em outro centro e revisada no NIH revelou hiperplasia folicular reativa e histiocitose sinusal, mas sem infiltração pericortical por células DNT. Foram detectados autoanticorpos séricos e elevação de citocinas de perfil Th2, incluindo IL-5, -6, -10 e -13, em sobrenadantes de linfócitos em cultura (Tabelas 1 e 2), outro achado típico de ALPS. Levando-se em consideração os critérios de ALPS definidos pelo NIH, que incluem elevação de DNT em sangue periférico, hiperplasia linfóide crônica não-maligna e defeito na apoptose linfocitária, P58 recebeu um diagnóstico clínico provisório de ALPS, reconhecendo-se que esta não é uma apresentação clínica típica desta doença.

A despeito do importante defeito na apoptose linfocitária induzida pela retirada de IL-2, não houve anormalidade na apoptose induzida por um anticorpo agonista de FAS (anti-APO-1), estaurosporina ou irradiação gama (Figura 1 B a D). Ademais, linfócitos T do P58 não apresentaram aumento espontâneo da proliferação celular ou secreção de citocinas, mas mostraram uma proliferação persistente após a retirada de IL-2, quando comparados com células de controles normais (Figura 2 e dados não mostrados). Em suma, linfócitos do P58 apresentaram um defeito específico na via intrínseca da apoptose.

Tabela 1 - Achados clínicos e laboratoriais no P58**HISTÓRIA CLÍNICA**

Linfadenopatia e esplenomegalia por toda a vida

Leucocitose acentuada ($>100,000 \text{ cells/mm}^3$) com 40% de blastos aos 8 meses de idade, tratada com agentes orais; resolução aos 4 anos de idade

Linfoma não-Hodgkin de células B grandes, não-clivadas, aos 32 anos de idade

Bem aos 49 anos, porém com linfadenopatia persistente

ACHADOS LABORATORIAIS¹

Autoanticorpos circulantes: Coombs positivo, FAN² (1:320), AC³ IgG e IgM, FR⁴.

Leucócitos totais: $9\,220/\text{mm}^3$ (3 300-9 600/ mm^3)

Linfócitos totais: $3\,340/\text{mm}^3$ (460-4 700/ mm^3)

CD3⁺CD4⁺: 19,5%, $650/\text{mm}^3$ (28,6-57,2%, 358-1 259/ mm^3)

CD3⁺CD8⁺: 10,3%, $343/\text{mm}^3$ (12,9-46,9%, 194-836/ mm^3)

CD3⁺CD4⁺CD8⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺: 2,0%, $65/\text{mm}^3$ ($<1\%$, $<20/\text{mm}^3$)

CD20⁺: 50,2%, $1\,678/\text{mm}^3$ (3,7-15,5%, 49-424/ mm^3)

CD20⁺CD5⁺: 36%, $1\,202/\text{mm}^3$ (0,5-8,5%, 13-145/ mm^3)

CD20⁺CD27⁺: 1%, $30/\text{mm}^3$ (0,7-6,3%, 16-118/ mm^3)

CD3⁺CD8⁺CD57⁺: 7,3%, $244/\text{mm}^3$ ($\leq 15,3\%$, $\leq 239/\text{mm}^3$)

CD3⁺HLA-DR⁺: 5,5%, $185/\text{mm}^3$ ($\leq 15,1\%$, $\leq 291/\text{mm}^3$)

CD3⁺CD25⁺: 21,4%, $715/\text{mm}^3$ (14,7-43,2%/193-1 248/ mm^3)

NOTA: Dados à admissão ao NIH.

¹Valores de referência para adultos em parênteses.

²FAN, fator anti-núcleo.

³AC, anticardiolipina.

⁴FR, fator reumatóide.

Tabela 2 - Níveis de citocinas em sobrenadante de culturas do P58

CITOCINA	CONCENTRAÇÃO
IL-1 β	Sem diferença em relação ao controle
IL-2	Sem diferença em relação ao controle
IL-4	Sem diferença em relação ao controle
IL-5	P58, 143,1 pg/ml; Controle, 40,1 pg/ml
IL-6	P58, 35,6 pg/ml; Controle, 11 pg/ml
IL-7	Sem diferença em relação ao controle.
IL-8	P58, 44,8 pg/ml; Controle, 3,82 pg/ml
IL-10	P58, 3,8 pg/ml; Controle, 0,16 pg/ml
IFN- γ	P58, 15,2 pg/ml; Controle, 6,4 pg/ml
TNF α	Sem diferença em relação ao controle.
IL-12	Sem diferença em relação ao controle.
IL-13	P58, 144,8 pg/ml; Controle, 35,1 pg/ml

Durante a retirada de citocina, os membros BAX e BAK da família BCL-2 (*B cell lymphoma 2*) de proteínas pró-apoptóticas são ativados e se oligomerizam sobre a superfície mitocondrial, causando permeabilização da membrana externa e conseqüente vazamento de fatores como citocromo c, que desencadeiam a apoptose (70). Após a retirada de IL-2, notamos que linfócitos desse paciente apresentaram uma diminuição importante na ativação de BAX e na liberação de citocromo c, em paralelo ao decréscimo do número de núcleos apoptóticos encontrados nas lâminas, quando comparados a controles normais e amostras de um paciente com ALPS tipo 1a (Figura 1 E e F, e dados não mostrados). Contudo, a liberação de citocromo c foi normal quando as amostras foram tratadas com estaurosporina, indicando um defeito seletivo da apoptose mitocondrial (Figura 3).

Figura 2. Proliferação celular e viabilidade in vitro de linfócitos do P58. (A) Linfócitos ativados de quatro doadores normais (NL 1-4), um paciente com ALPS tipo 1A e P58 foram cultivados em meio de cultura contendo 100 U/mL de IL-2, e a incorporação de $[H^3]$ timidina em um período de 18 h foi medida. (B) Linfócitos ativados de NL1, NL2, um paciente com ALPS 1A e P58 foram cultivados como descrito em A, e os números de células contados diariamente por citometria de fluxo. (C) Incorporação de $[H^3]$ timidina por linfócitos ativados de um controle normal (NL) e P58 cultivados em meio de cultura sem IL-2 por 24 h. (D) Linfócitos ativados de 3 controles normais (NL 1 a 3), um paciente com ALPS 1A e P58 foram cultivados em meio sem IL-2, e a morte celular quantificada após marcação com iodeto de propídio (PI) e iodeto de 3,3'-dihexaloxacarbocianina (DiOC₆), por citometria de fluxo.

Figura 3. Análise da liberação citoplasmática de citocromo *c* e AIF por fracionamento subcelular. Imunoblotting de citocromo *c* (Cyt C), fator indutor de apoptose (AIF), Cox IV e β-actina nas frações citosólicas de linfócitos T ativados de um controle normal, um paciente com ALPS 1A e P58, após retirada de IL-2 por 72 h (A), ou tratamento com 500 nM de estaurosporina (STS) por 2h (B). O grau de pureza das frações citosólicas é demonstrado pela mensuração das proteínas mitocondriais Cox IV (A) ou Oxp4 (B), onde sua ausência indica que não há contaminação mitocondrial. RC, retirada de citocina.

2.2.2 Diminuição dos níveis de BIM (*BCL-2 Interacting Mediator of cell death*) em P58

As moléculas que iniciam a apoptose intrínseca, situadas acima de BAX e BAK na cascata de sinalização celular, são as proteínas da subclasse BH3-*only* (*BCL-2 homology 3-only*) da família BCL-2 (70). Camundongos deficientes em BIM, uma proteína BH3-*only*, manifestam várias anormalidades imunológicas, incluindo acúmulo de linfócitos, autoimunidade e vários defeitos apoptóticos, especialmente na morte celular induzida pela retirada de citocina (71). Dada a similaridade entre o fenótipo celular do P58 e o descrito nos camundongos BIM^{-/-}, decidimos investigar a expressão de BIM após a retirada de citocina em P58. A quantidade da proteína BIM estava

significativamente reduzida nos linfócitos T ativados do P58 ao nível basal e após a retirada de IL-2, quando comparada a controles normais e pacientes com ALPS 1a (Figura 4 A). O defeito de expressão era específico para BIM, visto que o nível de outros membros da família BCL-2, tanto pró-apoptóticos (PUMA, BAX) quanto anti-apoptóticos (BCL-X_L, MCL-1, BCL-2) eram similares aos controles normais (Figura 4 A e dados não mostrados). Também foi observada uma deficiência constitutiva de BIM em células mononucleares em repouso e linfócitos T e B purificados do P58 (Figura 4 B).

Para melhor definir a importância de BIM no controle da apoptose induzida pela retirada de citocina em células humanas, suprimimos a expressão de BIM em linfócitos de doadores normais usando a técnica de interferência de RNA (siRNA) mediada por oligonucleotídeo, e avaliamos o impacto sobre a morte celular. A supressão de BIM induziu resistência à apoptose induzida pela retirada de IL-2, mas não afetou a apoptose mediada por FAS ou estaurosporina (Figura 4 C e dados não mostrados), recapitulando o fenótipo celular visto no P58.

Os dados acima expostos demonstraram que células do P58 apresentam uma diminuição seletiva da expressão da proteína pró-apoptótica BIM, que parece criticamente importante na mediação da morte induzida por retirada de citocina em células humanas.

Figura 4. Supressão de BIM em linfócitos do P58. (A) Análise da expressão de BIM e outros membros da família BCL-2 após a retirada de IL-2 (RC) em linfócitos de controle normal (NL), P58 e um paciente com ALPS 1A. As isoformas BIM EL, L e S estão representadas. (B) Linfomononucleares (LMNs) *ex vivo* e células T e B purificadas de normais (NL) e P58 foram lisadas e a expressão de BIM avaliada. (C) Linfócitos ativados de controles foram transfectados com RNA não-silenciador (nsRNAi) ou interferente dirigido a BIM (BIM RNAi) por 3 dias e submetidos à retirada de IL-2 ou tratamento com anticorpo anti-Fas. A eficiência do silenciamento foi avaliada por western blotting (em baixo, à direita). Dados representativos de 2 ou 3 experimentos independentes. A média $\pm$ SD é mostrada.

2.2.3 P58 tem uma mutação tipo ganho-de-função em *NRAS*

Para descobrir o defeito genético subjacente à expressão defeituosa de BIM nas células do P58, seqüenciamos o locus genômico de BIM e de alguns de seus reguladores, incluindo FOXO3A, FOXO1, FOXO4, ERK1/2 e JNK1/2, mas nenhuma mutação foi detectada (3,70). Investigamos então a rede genética regulatória de BIM usando microarranjos (Affymetrix). Avaliamos simultaneamente a expressão de 42.000 transcritos de mRNA em controles sadios e nos linfócitos do P58 à 0 hora e 24 horas após a retirada de IL-2. Duzentos e cinco genes foram diferencialmente expressos em P58 em comparação aos controles (Figura 5 A e informações depositadas no banco público de dados GEO [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo], número de acesso GSE7345). De forma inesperada, o padrão de expressão gênica em P58 foi consistente com a ativação de uma pequena GTPase, neuroblastoma RAS (*NRAS*) (Figura 5 B). Este padrão incluiu o aumento de duas fosfatases de dupla especificidade (DUSP 4 e 6), que são inibidoras da sinalização de ERK, e que foram previamente descritas como estando aumentadas em linhagem de células tumorais contendo mutações somáticas em *NRAS* (72). Portanto, levantou-se a hipótese que *NRAS* poderia estar mutado em P58, levando à hiperativação da via RAS/RAF/ERK, a qual pode inibir a expressão de BIM.

Seqüenciamos *NRAS* em P58 e encontramos uma substituição de base, causando a troca de um ácido aspártico por uma glicina na posição 13 (G13D). Para excluir a possibilidade de esta mutação ser um evento somático, nós avaliamos DNA genômico de vários tipos celulares, incluindo linfoblastos, células mononucleares não-purificadas,

monócitos purificados, linhagens de linfócitos B transformados por EBV anos antes do estudo, e células epiteliais bucais (Figura 5 C). Todas as amostras apresentaram a mutação, sugerindo uma origem germinativa. Entretanto, como nenhum dos pais do paciente, irmãos ou filhos apresentaram o alelo mutante (dados não mostrados), a mutação ativadora é provavelmente um evento *de novo*, como caracteristicamente observado com *HRAS* e *KRAS* ou, mais remotamente, uma mutação somática embrionária muito prematura, causando mosaicismo. Importaneamente, a mesma mutação em *NRAS* é vista somaticamente em tumores mielóides e linfóides em crianças e adultos, enquanto que mutações germinativas em *NRAS* não foram descritas até hoje (73,74).

Mutações nos códons 12, 13 e 61 de RAS estabilizam estas proteínas em um estado ativo, ligado a GTP, por causarem redução de sua atividade GTPase intrínseca e impedirem sua interação com proteínas auxiliares com atividade GTPase (75,76). Consistente com a alteração genética subjacente, afetando o códon 13, houve níveis elevados de NRAS ativado em linfócitos do P58, especialmente após a retirada do soro fetal bovino do meio de cultura, que normalmente abole toda atividade espontânea de NRAS (Figura 5 D).

Levantou-se então a hipótese que a mutação tipo ganho-de-função em NRAS estaria levando a uma hiperativação da via NRAS/RAF/ERK, com conseqüente supressão de BIM, como descrito em outros sistemas (77-79).

Figura 5. Identificação de uma mutação tipo ganho-de-função em NRAS em P58. (A) Heat map e dendrograma relacional demonstrando os 205 genes diferencialmente expressados em P58 quando comparado a controles normais (NL1 e NL2). Linfócitos ativados foram lisados 0 e 24 h após a retirada de IL-2, e a expressão de mRNA analisada usando microarrays (Affymetrix U133 plus 2.0). (B) Diagrama simplificado demonstrando a expressão de genes da via NRAS/RAF/ERK em células do P58. Setas vermelhas e verdes indicam genes sobre ou sub-regulados, respectivamente, em P58, quando comparados aos controles. (C) Sequenciamento de NRAS em P58 usando DNA genômico de linfoblastos, monócitos purificados e células epiteliais bucais, todos demonstrando a troca de G para A, que muda glicina por aspartato no códon 13. (D) NRAS ativo, ligado a GTP, foi imunoprecipitado antes e após a retirada de soro fetal bovino em um controle normal (NL) e P58, usando uma proteína de fusão Raf-1 (RBD)-GST como isca. A quantidade celular total de NRAS também é mostrada.

2.2.4 Hiperatividade de NRAS causa supressão de BIM através da via ERK em linfócitos humanos

Para demonstrar a ligação entre a hiperatividade de NRAS e a inibição de BIM, algumas linhagens de células linfóides humanas foram transfectadas com NRAS tipo-selvagem (NRAS^{WT}) ou mutante (NRAS^{G13D}). A super-expressão de NRAS^{WT} ou, especialmente, de NRAS^{G13D} induziu à inibição dose-dependente de BIM em células H-9 e Jurkat A3 (Figura 6 A e dados não mostrados), consistente com o efeito da super-expressão de HRAS em células epiteliais (80). Houve uma redução de 3 a 4 vezes no nível de BIM após as transfecções, embora esse número possa estar subestimado, visto que a eficiência de transfecção não alcançou 100% em todos os casos. Para confirmar estes achados em um modelo mais fisiológico, linfócitos primários humanos de controles normais foram transfectados com NRAS tipo-selvagem ou mutante e novamente foi observada uma forte redução no nível de BIM, especialmente com NRAS^{G13D} (Figura 6 B).

Os efetores mais conhecidos de RAS são a via RAF/MEK/ERK e a via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) (61,62). As duas vias foram testadas no P58. Notamos que a inibição química de MEK1/2, a MAP cinase cinase (MAPKK) imediatamente acima de ERK1/2 na cascata de sinalização, usando as drogas PD98059 ou U0126, induziu à elevação da expressão da proteína BIM em linfócitos do P58 e células H9 sobre-expressando NRAS (Figura 6 C e dados não mostrados). Ainda, de forma marcante, o tratamento com PD98059 restaurou a sensibilidade à morte pela retirada de IL-2 em linfócitos do P58 (Figura 6 D).

Figura 6. Supressão de BIM por NRAS através de ERK. Plasmídios expressando NRAS wild-type (WT) ou mutante (G13D) com uma cauda de hemaglutinina (HA) foram transfetados em células linfóides H-9 (A) ou linfócitos humanos ativados (B), e a expressão de BIM foi analisada 48 h mais tarde. (C) Linfócitos ativados de 2 controles normais (NL) e 58 foram privados de IL-2 e tratados com o veículo dimethyl sulfoxide vehicle (DMSO) ou com os inibidores de MEK1 PD98059 (PD) (20 μ M) ou U0126 (10 μ M) por 18 h, e a expressão de BIM e BAX analisada. (D) Linfócitos do P58 e controles normais (NL ou NC) foram privados de IL-2 e tratados diariamente com DMSO ou PD98059 (20 μ M). Apoptose foi medida por citometria de fluxo. Dados representativos de 3 experimentos independentes. A média $\pm$ SD é mostrada. Os números na parte de baixo dos géis em A e B representam a intensidade de BIM quando normalizada para actina.

A despeito do aumento dos níveis protéicos de BIM após inibição de MEK, BIM mRNA variou muito pouco sob as mesmas circunstâncias, sugerindo uma regulação pós-traducional de BIM por ERK (Figura 7 A). O mesmo foi observado quando linfócitos naive do P58 foram tratados com inibidores de MEK1/2 em condições de cultura ricas em IL-2, e os níveis de mRNA e proteína de BIM foram medidos (Figura 7 B e C). Por outro lado, os inibidores da via PI3K, LY294002 e wortmanina, não causaram alteração nos níveis intracelulares de BIM no P58, sugerindo que esta via não está envolvida no defeito apoptótico observado (Figura 8 e dados não mostrados). Analisados em conjunto, estes achados indicaram que NRAS suprime BIM e induz resistência à apoptose no P58 e células normais por hiperativação da via RAF/MEK/ERK.

Figura 7. A inibição de MEK1/2 não aumenta os níveis de BIM mRNA em linfócitos do P58, apesar do aumento nos níveis de BIM proteína. (A) Linfócitos ativados de controles normais (NL) e P58 foram submetidos à retirada de IL-2 e tratados com DMSO ou inibidores de MEK1/2 PD98059 (PD) (20 μ M) ou U0126 (10 μ M) por 18 h, e a expressão de BIM avaliada por imunoblotting. (B) Linfócitos de controles saudáveis (NL) e P58 foram mantidos em meio rico em IL-2 e tratados com DMSO ou PD98059 por 18 h, e a expressão de BIM avaliada por imunoblotting. (C) Quantificação de BIM mRNA por PCR em tempo real em amostras de um controle normal (NL) e P58 provenientes do experimento descrito em B. Resultados são representativos de 3 experimentos. Barras de erro mostram média $\pm$ SD das triplicatas.

Figura 8. Inibição química da via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) não modifica os níveis de BIM em P58. Linfócitos ativados de um controle normal (NL), um paciente com ALPS 1A e P58 foram cultivados nas condições descritas na presença ou ausência de LY294002, um inibidor de PI3K. A expressão de BIM, BCL-2 e p27^{kip1} foi analisada por western blotting. O aumento da expressão de p27^{kip1} após retirada de IL-2 e inibição de PI3K serve como um controle positivo para estes tratamentos.

2.2.5 Correção do defeito apoptótico no P58 pelo uso de inibidores de farnesilação e silenciamento de NRAS

Duas abordagens foram utilizadas para demonstrar de forma mais definitiva o papel causativo de NRAS na diminuição de BIM e conseqüente defeito apoptótico por retirada de citocina. Primeiramente, foram utilizados inibidores químicos das farnesiltransferases (FTIs), que bloqueiam a palmitoilação das proteínas RAS, impedindo sua inserção nas membranas e abolindo sua função. Esses inibidores estão atualmente sob investigação em protocolos clínicos para o tratamento de câncer (81). O tratamento com um destes compostos, FTI-277, corrigiu o defeito apoptótico e aumentou os níveis

de BIM em linfócitos do P58 (Figura 9 A). Esta droga teve um efeito desprezível na apoptose e expressão de BIM em células de controles normais (Figura 9 A).

Em uma segunda abordagem, a expressão de NRAS foi suprimida nos linfócitos do P58 usando-se siRNA. Todos os três siRNA oligonucleotídeos testados reduziram a expressão de NRAS e restauraram o nível de BIM em células do P58 (Figura 9 B). Mais importante, a redução da expressão de NRAS restaurou a sensibilidade das células do P58 para a apoptose induzida pela retirada de IL-2 (Figura 9 C). Em contraste, o silenciamento de NRAS em células de controles normais não causou alterações na expressão de BIM ou na sensibilidade para a morte por retirada de IL-2 (Figura 10). Estes resultados confirmaram que a mutação heterozigota em NRAS causou um ganho-de-função que pode ser revertido por silenciamento de RNA ou inibição das farnesiltransferases.

Figura 9. Correção do defeito apoptótico em P58 por inibição da farnesilação e silenciamento de RNA. (A) Linfócitos ativados do P58 e um controle normal (NL) foram privados de IL-2 e tratados diariamente com DMSO ou FTI-277 (5 μ M). (Inseto) Linfócitos em repouso do P58 e controles normais (NL) foram tratados com DMSO (-) ou 10 μ M FTI-277, a expressão de BIM analisada por imunoblotting. (B) Linfócitos ativados do P58 e controles normais (NL) foram transfectados com RNAi não-silenciador (nsRNAi) ou três oligos diferentes dirigidos para NRAS (NRAS#1/2/3), e a expressão de BIM analisada 3 dias depois por imunoblotting (C) Linfócitos ativados do P58 e controles normais (NL) foram transfectados como descrito em B, privados de IL-2 e a apoptose foi medida diariamente nos períodos de tempo indicados. Dados representativos de 3 experimentos independentes. A média das triplicatas $\pm$ SD é mostrada. * $p < 0.05$.

Figura 10. Silenciamento de NRAS é inócuo em células T normais. Três dias antes da retirada de IL-2, linfócitos ativados de um controle normal (NL) foram transfectados com oligonucleotídeos não-silenciadores (ns RNAi) ou três oligos dirigidos para NRAS, e a morte celular foi mensurada diariamente após a retirada de citocina. O *inset* de western blotting mostra a quantificação de BIM e NRAS nestes amostras.

2.3 Discussão

NRAS foi identificado como um fator oncogênico em neuroblastomas e outros tumores malignos, mas seu papel fisiológico em humanos é incerto (61). Nosso trabalho sugere que mutações germinativas em NRAS causam supressão de BIM e um defeito na apoptose intrínseca mitocondrial em linfócitos, levando à manifestações clínicas típicas de ALPS e a neoplasias hematológicas.

O fenótipo humano aqui descrito, associado com uma mutação ativadora de *NRAS*, contrasta com as outras desordens genéticas causadas por alterações em membros da família RAS e proteínas associadas. As síndromes de Costello (*HRAS*), Noonan (*PTPN11*, *KRAS*, *SOS1*) e cárdio-facial-cutânea (*MEK1*, *MEK2*, *B-RAF* e *KRAS*) cursam com anomalias de desenvolvimento e transformações neoplásicas em vários tecidos de origem mesodérmica e ectodérmica (69). Nenhuma destas anomalias está presente no P58. Uma explicação plausível para esta diferença é que estas diferentes isoformas de RAS possuem uma heterogeneidade funcional que parece estar associada às suas regiões C-terminais, que podem influenciar sua localização intracelular e interação com parceiros moleculares (82). Em camundongos, a ablação genética de *NRAS* resulta apenas em defeitos imunológicos sutis, sem alterações desenvolvimentais importantes (83). Em contraste, a deficiência de *KRAS* causa mortalidade intra-uterina, ao passo que camundongos deficientes em *HRAS* são completamente normais (84,85). Camundongos transgênicos expressando NRAS hiperativo desenvolvem múltiplos tumores hematológicos, tais como leucemia, linfoma, mastocitose e, raramente,

carcinomas mamários (86,87). Assim, esses dados da literatura e os nossos achados indicam que *NRAS* tem um papel regulador imunológico, e sua ausência ou ganho-de-função afeta primariamente células hematopoiéticas.

Nossos achados revelam o papel vital da apoptose intrínseca mitocondrial na manutenção da homeostase dos linfócitos periféricos e da tolerância em humanos. Embora as manipulações genéticas em roedores já destacavam a importância da via para manutenção da homeostase do sistema imune, nossos dados em células humanas validam esses achados, com algumas surpresas. A mutação em *NRAS* causou um fenótipo clínico que, em diversos aspectos importantes, assemelha-se a ALPS, com elevação de células DNTs, acúmulo crônico de linfócitos e uma tendência clara ao desenvolvimento de tumores hematológicos. Contudo, outros achados imunofenotípicos e histopatológicos vistos em ALPS clássico não foram observados no paciente, como elevação dos linfócitos T HLA-DR⁺ ou CD57⁺ no sangue periférico ou uma importante infiltração de DNTs nos linfonodos.

O defeito apoptótico linfocitário visto neste paciente também é claramente diferente de todos os casos prévios de ALPS, e chama atenção para um ponto de confusão na literatura especializada (12). Originalmente, o fenótipo de ALPS foi associado a um defeito na apoptose induzida por estimulação do TCR, sugerindo deficiência em um mecanismo regulatório propriocida. Com a descoberta subsequente de que a maioria dos casos de ALPS é causada por mutações em FAS, assumiu-se que ALPS poderia ser definido como uma doença causada por defeito na apoptose induzida por FAS. Se adotarmos uma visão mais abrangente, incluindo no conceito de ALPS outros potenciais distúrbios de morte celular que afetem a homeostase do sistema imune

periférico, P58 será facilmente classificado como uma nova variante da doença. Desta forma, é razoável considerar que P58 possui um defeito na apoptose linfocitária que se encaixa na definição de ALPS, e também exhibe elevação de DNTs e expansão dos tecidos linfóides secundários, preenchendo os critérios diagnósticos sugeridos pelo NIH. Como o seu fenótipo clínico e celular é distinto, este último claramente diferente dos casos de ALPS tipo I e II, nós classificamos provisoriamente esta condição como **ALPS, tipo IV** (tipo III abarca casos sem etiologia molecular definida).

O fenótipo humano de NRAS ativo com supressão de BIM difere em alguns aspectos do observado em camundongos deficientes em BIM ($BIM^{-/-}$), visto que este último não apresenta acúmulo de células DNTs, e apresenta expansão de outros tipos celulares, como granulócitos (71). Ambos os modelos apresentam expansão de tecidos linfóides e autoimunidade. Essas diferenças podem refletir a expressão residual de BIM nas células do P58, ou os efeitos estimulatórios de NRAS em outras vias efetoras além de ERK, independentes de BIM. Além disso, há diversos níveis regulatórios situados entre NRAS e BIM na cascata de sinalização, e outros fatores não analisados no presente estudo poderiam explicar as diferenças entre o camundongo $BIM^{-/-}$ e P58.

O mecanismo pelo qual NRAS hiperativo suprime a expressão de BIM não é totalmente compreendido. Em outros modelos celulares estudando hiperatividade de KRAS, BIM é controlado pós-traducionalmente, sendo fosforilado, ubiquitinado e degradado pela maquinaria proteasomal (77). Aqui, nós mostramos que os níveis da proteína BIM no P58 estão fortemente reduzidos em linfócitos T ativados ou naive, mas não há diferença nos níveis de BIM mRNA quando comparados a controles normais, sugerindo um mecanismo pós-traducional de supressão. Após o bloqueio de MEK/ERK,

a expressão da proteína BIM no P58 foi praticamente normalizada, sem mudanças nos níveis de mRNA, confirmando a suspeita. Contudo, apesar dos níveis basais de BIM mRNA estarem normais, o aumento na sua expressão, que normalmente ocorre 18 a 24 h após a retirada de IL-2 do meio de cultura, está embotado em P58, sugerindo uma supressão também a nível transcricional. Além disso, dados preliminares (não mostrados) demonstram a ausência de efeito na expressão de BIM em linfócitos do P58 tratados com inibidores do proteasoma. Analisados em conjunto, esses dados sugerem um duplo mecanismo de supressão de BIM por hiperativação de NRAS: inibição do aumento da expressão do mRNA após retirada de IL-2 e inibição da tradução, mas essas hipóteses ainda carecem de prova formal. Nossos achados sugerem que antagonistas de RAS, como os inibidores de farnesiltransferases, podem ser úteis no tratamento de outras desordens de homeostase do sistema imune e autoimunidade, além de câncer.

2.4 Métodos

Este projeto de pesquisa foi realizado com a aprovação do comitê de ética dos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA (NIH), e as amostras colhidas após assinatura de um termo de consentimento informado. Este trabalho também foi aprovado pela CaPPesq. As amostras de controles normais são provenientes de *buffy coats* de doadores anônimos do banco de sangue do *Clinical Center* dos NIH.

A significância estatística das diferenças entre os grupos foi determinada pelo teste *t* de student. Um $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.4.1 Protocolos de cultura e tratamentos celulares

Neste projeto foi utilizado um modelo bem estabelecido para o estudo da morte celular induzida pela retirada de citocinas. Células mononucleares do sangue periférico foram separadas por centrifugação em gradiente Ficoll e cultivadas em meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de tampão HEPES) contendo 1 µg/mL de OKT3 solúvel (OKT3; Ortho Biotech, Bridgewater, NJ) mais 25 U/mL de IL-2 (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) por 3 dias. No terceiro dia, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salina (PBS) e cultivadas em meio completo contendo 25 U/mL de IL-2 por mais três dias. Entre o 6º e 15º dias as células foram usadas para experimentos de retirada da citocina. Vinte e quatro horas antes dos

experimentos o meio de cultura contendo IL-2 foi trocado. Para a indução de morte celular, as células foram lavadas três vezes com PBS e cultivadas em triplicata em meio completo sem IL-2 por períodos de tempo variados, na concentração de 1×10^6 /mL, no volume de 200 μ L, em placas de 96 poços com fundo em U.

Para os outros ensaios de apoptose, as células foram ativadas e cicladas em IL-2 como descrito acima e tratadas com estaurosporina (Calbiochem, EMD Biosciences, San Diego, CA), um anticorpo agonista anti-FAS (Apo1.3, Alexis, San Diego, CA), ou irradiadas com radiação gama. Os inibidores químicos PD98059, U0126, LY294002 e FTI-277 foram da Calbiochem.

As células T em repouso foram purificadas por seleção negativa em coluna magnética utilizando-se o *CD4 Separation Kit II* (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Os monócitos e linfócitos B foram isolados por seleção positiva utilizando-se anticorpos anti-CD19-PE e anti-CD14-PE 9BD Biosciences, San Jose, CA), seguidos de contas magnéticas anti-PE (Miltenyi Biotec). A pureza das populações purificadas foi avaliada por citometria de fluxo, e variava de 90 a 95% para linfócitos T e de 75 a 85% para linfócitos B e monócitos.

2.4.2 Quantificação da morte celular

Para medir a apoptose, as amostras de células foram simultaneamente coradas com 50 ng/mL de iodeto de propídio (PI) e 40 nM de 3, 3'-Dihexyloxacarbo-cyanine (DiOC6(3)) por 15 min a 37°C. Utilizando citometria de fluxo, cada amostra foi

adquirida por 30 seg (tempo fixo) e as células vivas (gate PI negativo e DiOC6 positivo) foram contadas no tempo 0h e após o período desejado. Com esses dados foi calculado o “porcentual de perda celular”, que é a razão entre o número de células vivas no estado basal e após o tratamento, de acordo com a fórmula: $(\text{número de células vivas não tratadas} - \text{número de células vivas após o tratamento} / \text{número de células vivas não-tratadas}) \times 100$. A “viabilidade celular” representada nos gráficos foi calculada como: $100 - \text{“porcentual de perda celular”}$.

Esse método mede a morte celular muito precisamente. O autor acredita que o método usual, que calcula o porcentual de células mortas em determinado ponto de tempo, pode ser enganoso em experimentos prolongados, onde a morte celular ocorre durante dias, tal como na retirada de citocina. As células mortas se desintegram e desaparecem da cultura, levando a uma subestimação da perda celular total.

2.4.3 Western blottings

O estímulo nas células foi finalizado pela adição de PBS gelado e o pellet de células lisado imediatamente com tampão RIPA (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 0,1% NP40, 0,1% sulfato duodecil sódio (SDS), 1% deoxicolato sódio) contendo um cocktail completo de inibidor de proteases (Complete Mini, Roche) e nuclease (Benzonase, Novagen), para diminuir a viscosidade da amostra. As amostras foram incubadas em gelo por 30 min e centrifugadas a 12000 x g por 5 min a 4°C. O lisado protéico foi utilizado imediatamente ou congelado a -80°C para uso posterior.

O conteúdo protéico dos lisados foi medido pelo método do ácido bicinchonínico (Micro BCA; Pierce, Rockford, IL) e 20µg de proteína foram separados em gel de poliacrilamida (Nupage Bis-Tris, Invitrogen), usando o tampão de corrida MES para proteínas pequenas e MOPS para proteínas maiores. Em seguida, as proteínas foram transferidas sobre uma membrana de nitrocelulose e incubadas com tampão de bloqueio (PBS, 0,1%, Tween e 5% de leite em pó desnatado) por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas durante a noite com o anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio, sob agitação constante a 4°C. No final desse período as membranas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS, 0,1% Tween 20) e incubadas com anticorpo secundário conjugado a HRP à temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram lavadas novamente (3 x 5min), incubadas reagentes quimioluminescentes e expostas para autoradiografia. A análise densiométrica foi realizada usando um software de imagem.

Os seguintes anticorpos foram usados: anti-BIM, anti-BAK (Stressgen, Ann Arbor, MI); anti-BCL-2, anti-p27^{kip1}, anti-MCL-1, anti-β-actina, anti-BAX, anti-citocromo c (clone 7H8.2C12), anti-citocromo c oxidase IV subunit II (CoxIV), anti-BCL-X_L (BD Biosciences, San Jose, CA); anti-PUMA (Axxora, San Diego, CA); anti-AIF, anti-N-RAS (Clone F155) (Santa Cruz, Santa Cruz, CA).

2.4.4 Interferência de RNA e transfecção de plasmídeos

O silenciamento da expressão gênica em linfócitos T primários foi obtido pela

técnica de interferência no RNA (siRNA). As células mononucleares do sangue periférico foram separadas e ativadas como descrito acima. No 6º dia de cultivo, as células foram transfectadas com oligonucleotídeos silenciadores (siRNA) ou com controles não-silenciadores (nsRNA). Os oligos silenciadores, duplexes de 21 nucleotídeos, foram projetados online usando o software BLOCK-iT™ RNAi da Invitrogen

(<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=stealth>) e sintetizados pela mesma companhia. As seqüências dos oligonucleotídeos usados no silenciamento de BIM foram: #1 GGAUCGCCCAAGAGUUGCGGCGUAU and #2 GGCCUAUUCUCAGAGGAUUAUGUAA. Para o silenciamento de NRAS foram usados:

#1	GCGCACUGACAAUCCAGCUAAUCCA;	#2
	CCAGCUAAUCCAGAACCACUUUGUA;	#3
	GGACAUACUGGAUACAGCUGGACAA.	

A transfecção das células T ativadas foi realizada por eletroporação usando o sistema Nucleofection® (Amata), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 4×10^6 linfócitos foram ressuspensos em 100 µl de solução nucleofectora de células T (kit nucleofector de células T humanas, Amata) contendo 200 pmol de oligos siRNA ou nsRNA e eletroporados usando o programa T23 do aparelho Amata. Após a eletroporação, 500 µl de meio de cultura pré-aquecido foram adicionados à cubeta e as células foram transferidas para placas de cultura de tecido de 12 poços, contendo 1.5 mL de meio completo pré-aquecido. Quatro horas após a transfecção o meio de cultura foi suplementado com 25 U/mL de IL-2. Três dias após a

transfecção, uma alíquota de células foi lisada e a eficiência da inibição avaliada por western blotting. Amostras com mais de 50% de inibição da proteína foram usadas para experimentos funcionais.

Nos experimentos de sobre-expressão de NRAS, plasmídeos expressando NRAS selvagem (cedido por Silvio Gutkind, NIDCR) e mutante G13D foram tranfectados por eletroporação em linfócitos humanos e Jurkat A3 usando tecnologia Amaxa (kits T e V, respectivamente), e em H-9 usando o eletroporador BTX (BioRad).

2.5.5 Imunofluorescência

As células foram fixadas em PBS contendo 4% paraformaldeído em PBS por 20 min a 4°C, centrifugadas sobre lâminas e lavadas com PBS. A permeabilização foi feita com 0.05% Triton X-100 (ou 0.001% CHAPS, para a marcação de BAX ativado) por 5 min à temperatura ambiente. Após a permeabilização as células foram lavadas com PBS e bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS contendo 10% de soro fetal bovino) por 30 min. As amostras foram então incubadas com o anticorpo primário diluído em 0.5% BSA por 45 min à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo diluído em 0.5% BSA por 45 min à temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagem os núcleos foram corados com 40 ng/mL de Hoechst 33342 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR). As lâminas foram então lavadas em PBS e montadas com coverslip usando Fluoromount-G (Southern Biotechnology, Birmingham, AL). As imagens foram obtidas

no microscópio confocal Leica TCS-NT/SP usando a objetiva de imersão em óleo de 63x. Para quantificação, um observador cego (mas com boa visão) contou pelo menos 200 células por amostra em um microscópio de fluorescência convencional. Anticorpos usados: anti-citocromo c (6H2.B4, BD Pharmingen), anti-HSP60 (E-1, Santa Cruz), and anti-BAX (NT, Upstate, Charlottesville, VA).

2.5.6 PCR quantitativo em Tempo-Real (qPCR)

O RNA total foi extraído usando método baseado em coluna de sílica (RNeasy, Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Para minimizar a contaminação com DNA genômico, as colunas contendo o RNA foram tratadas com 27.3 unidades Kunitz de DNase I (Qiagen) por 15 min, à temperatura ambiente. Após a extração do RNA, o rendimento e pureza foram avaliados por espectrofotometria e a razão $A_{260}/A_{280} > 1.8$ foi considerada aceitável, e o material usando imediatamente ou congelado a -80°C . A síntese da primeira cadeia de DNA complementar (cDNA) foi efetuada por transcriptase reversa PCR (RT-PCR). Resumidamente, $1\mu\text{g}$ de RNA total foi misturado a $2.5\mu\text{M}$ de oligo $(\text{dT})_{20}$ primers e 0.5 mM da mistura dNTP e incubado a 65°C por 5 min. O cocktail de tampão RT, contendo 5 mM de MgCl_2 , 10 mM de DTT, 40 unidades de RNaseOUT[®] (Invitrogen) e 200 U de transcriptase reversa (SuperScript III, Invitrogen) foi adicionado e a mistura incubada a 50°C por 50 min. A reação foi finalizada por incubação a 85°C por 5 min, seguido por um tratamento com RNase H por 20 min a 37°C . O cDNA

A plataforma 7300 ABI PRISM (Applied Biosystem) foi utilizada para o qPCR. Os primers e sondas TaqMan[®] (Applied Biosystem) foram usados para a análise da expressão dos genes de interesse. Resumidamente, 1/20 (1µL) da reação de cDNA foi aliquoteado em triplicata em placa ótica de 96 poços, e a mistura contendo os primers específicos (para uma concentração final de 0.9 µM), sonda fluorescente (para uma concentração final de 0.25µM) e a mistura mestre de PCR universal TaqMan[®] foi adicionada para a reação final. As condições dos ciclos térmicos foram: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C e 40 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C. A expressão relativa do gene por qPCR foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, após normalização usando um gene *housekeeping* (18srRNA ou GADPH), como descrito (88). Os controles para a contaminação exógena (não adição de cDNA) e contaminação do DNA genômico (reações onde RT não foi adicionada) foram incluídos em todas as reações qPCR.

2.5.7 Imunoprecipitação de NRAS ativo

A forma ativa de NRAS, ligada a GTP, foi imunoprecipitada com o *EZ detection Ras activation kit* (Pierce), de acordo com o protocolo da companhia. As proteínas imunoprecipitadas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de celulose e as membranas incubadas com anticorpo anti-NRAS (F-155; Santa Cruz).

2.5.8 Sequenciamento de DNA

As amostras de DNA do paciente P58 e controles normais foram extraídas utilizando-se o kit DNAeasy (Qiagen). As regiões exônicas dos seguintes genes foram amplificadas com *puRe Taq Ready-To-Go PCR beads* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ): *BCL2L1* (*BIM*), *MAPK3* (*ERK1*), *MAPK1* (*ERK2*), *MAPK14* (p38a), *MAPK11* (p38b), *MAPK8* (*JNK1*), *MAPK9* (*JNK2*), *MAP2K3* (*MKK3*), *MAP2K6* (*MKK6*), *MAP2K4* (*MKK4*), *MAP2K7* (*MKK7*), *DUSP1* (*CL100/MKP1*), *DUSP2* (*PAC1*), *DUSP4* (*hVH2/MKP2*), *DUSP5* (*B23/hVH3*), *DUSP6* (*MKP3*), *DUSP7* (*PYST2/MKPX*), *DUSP9* (*MKP4*), *FOXO3A*, *FOXO1A*, *FOXO4*, *SOS1* e *NRAS*. Os produtos de PCR foram seqüenciados diretamente usando-se *ABI Prism BigDye* (v 1.1) *terminators* e analisados em um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2.5.9 Análise por Microarranjo

A expressão de mRNA em linfócitos ativados do P58 e dois controles normais (NL 1 e NL2) foi medida a 0 e 24 horas após a retirada de IL-2 do meio de cultura. O RNA total foi extraído, reversamente transcrito, marcado com biotina, fragmentado e hibridizado aos chips U133Plus2.0 microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Após marcação com um conjugado de streptavidina com ficoeritrina (SA-PE, Molecular Probes) e anticorpo-anti-streptavidina biotilado (Vector Laboratories), os chips foram lidos no setor de Proteômica e Genômica Funcional do Departamento de Medicina Intensiva do *Clinical Center*, NIH,

utilizando-se o *Affymetrix GeneChip Scanner*. A intensidade dos sinais das sondas foi computada pela análise das imagens pelo software GCOS versão 1.2. Os resultados foram depositados no bando de dados do NIHLIM, resgatadas e analisadas com o software *MSCL Analyst's Toolbox* (<http://affylims.cit.nih.gov>) e o pacote de análises estatísticas JMP (SAS, Inc., Cary, NC).

2.5.10 Fracionamento Subcelular

Os extratos citosólicos foram preparados através de uma técnica de permeabilização celular por digitonina. Alíquotas de 5×10^6 de células foram lavadas duas vezes em PBS e incubadas no gelo com tampão de extração (20 µg/ml digitonina, 250 mM sacarose, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7.5, 1 x coquetel inibidor de protease) por 5 min. A taxa de permeabilização foi monitorizada por visualização direta em microscópio ótico após adição de azul de Tripan, e maiores quantidade de digitonina adicionadas até 80% das células estarem permeáveis. As células foram então centrifugadas a 300 x g por 10 min a 4°C, e os sobrenadantes coletados (fração citosólica). O pellet (fração membranosa) foi lisado com 3% SDS em tampão RIPA à temperatura ambiente por 30 min. A pureza da fração citosólica foi avaliada por imunoblotting dirigido aos componentes mitocondriais citocromo oxidase IV ou Oxp4.

3. CONCLUSÕES

- 3.1 A síndrome autoimune linfoproliferativa pode ser causada por defeitos na via intrínseca de apoptose linfocitária;
- 3.2 Mutações tipo ganho-de-função em NRAS causam supressão de BIM por hiperestimulação da via ERK das MAP cinases;.
- 3.3 Bloqueio de ERK, inibição das farnesiltransferases ou silenciamento de NRAS mRNA reverterem a supressão de BIM em células expressando NRAS hiperativo.

4. REFERÊNCIAS

1. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 1996;272:54-60.
2. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988;334:395-402.
3. Strasser A, Pellegrini M. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol.* 2004;25:610-615.
4. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972;26:239-257.
5. Formigli L, Conti A, Lippi D. "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva Med.* 2004;95:159-164.
6. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004;16:663-669.
7. Savill J, Gregory C, Haslett C. Cell biology. Eat me or die. *Science* 2003;302:1516-1517.
8. Depraetere V. "Eat me" signals of apoptotic bodies. *Nat. Cell Biol.* 2000;2:E104-

9. Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17:221-253.
10. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 2004;304:1500-1502.
11. Yu L, Lenardo MJ, Baehrecke EH. Autophagy and caspases: a new cell death program. *Cell Cycle* 2004;3:1124-1126.
12. Bidere N, Su HC, Lenardo MJ. Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 2006;24:321-352.
13. Oliveira JB, Fleisher T. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2004;4:497-503.
14. Horvitz HR. Nobel lecture. Worms, life and death. *Biosci. Rep.* 2003;23:239-303.
15. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-219.
16. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
17. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 1997;22:299-306.

18. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.
19. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002;296:1635-1636.
20. Marsden VS, Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:71-105.
21. Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 2000;103:839-842.
22. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 2007;315:856-859.
23. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol. Today* 1995;16:39-43.
24. 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. *J. Clin. Invest* 1992;90:334-341.
25. Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J. Pediatr.* 1967;70:891-899.

26. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994;76:969-976.
27. 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;81:935-946.
28. Rieux-Laucat F, le DF, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995;268:1347-1349.
29. Bi LL, Pan G, Atkinson TP, Zheng L, Dale JK, Makris C, Reddy V, McDonald JM, Siegel RM, Puck JM, Lenardo MJ, Straus SE. Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib. *BMC. Med. Genet.* 2007;8:41-
30. Oliveira JB, Bidere N, Niemela JE, Zheng L, Sakai K, Nix CP, Danner RL, Barb J, Munson PJ, Puck JM, Dale J, Straus SE, Fleisher TA, Lenardo MJ. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2007;104:8953-8958.

31. Kwon SW, Procter J, Dale JK, Straus SE, Stroncek DF. Neutrophil and platelet antibodies in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Vox Sang.* 2003;85:307-312.
32. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rosen-Wolff A, Peters AM, Sneller MC, Hallahan CW, Wang J, Fischer RE, Jackson CM, Lin AY, Baumler C, Siegert E, Marx A, Vaishnaw AK, Grodzicky T, Fleisher TA, Lenardo MJ. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 2001;98:194-200.
33. 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;98:2466-2473.
34. Maldonado MA, Eisenberg RA, Roper E, Cohen PL, Kotzin BL. Greatly reduced lymphoproliferation in lpr mice lacking major histocompatibility complex class I. *J. Exp. Med.* 1995;181:641-648.
35. Lopatin U, Yao X, Williams RK, Bleesing JJ, Dale JK, Wong D, Teruya-Feldstein J, Fritz S, Morrow MR, Fuss I, Sneller MC, Raffeld M, Fleisher TA, Puck JM, Strober W, Jaffe ES, Straus SE. Increases in circulating and lymphoid tissue interleukin-10 in autoimmune lymphoproliferative syndrome are associated with disease expression. *Blood* 2001;97:3161-3170.

36. 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. *J. Immunol.* 1997;158:1912-1918.
37. Kim YJ, Dale JK, Noel P, Brown MR, Nutman TB, Straus SE, Klion AD. Eosinophilia is associated with a higher mortality rate among patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am. J. Hematol.* 2007;82:615-624.
38. Sneller MC, Wang J, Dale JK, Strober W, Middleton LA, Choi Y, Fleisher TA, Lim MS, Jaffe ES, Puck JM, Lenardo MJ, Straus SE. Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood* 1997;89:1341-1348.
39. Lim MS, Straus SE, Dale JK, Fleisher TA, Stetler-Stevenson M, Strober W, Sneller MC, Puck JM, Lenardo MJ, Elenitoba-Johnson KS, Lin AY, Raffeld M, Jaffe ES. Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am. J. Pathol.* 1998;153:1541-1550.
40. 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. *J. Clin. Invest* 1996;98:1107-1113.
41. 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;98:47-58.

42. Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG, Skoda-Smith S, Atkinson TP, Straus SE, Lenardo MJ.
Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 2002;419:395-399.
43. Holzelova E, Vonarbourg C, Stolzenberg MC, Arkwright PD, Selz F, Prieur AM, Blanche S, Bartunkova J, Vilmer E, Fischer A, le DF, Rieux-Laucat F.
Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N. Engl. J. Med.* 2004;351:1409-1418.
44. le DF, Emile JF, Rieux-Laucat F, Benkerrou M, Roberts I, Brousse N, Fischer A.
Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet* 1996;348:719-723.
45. Del-Rey M, Ruiz-Contreras J, Bosque A, Calleja S, Gomez-Rial J, Roldan E, Morales P, Serrano A, Anel A, Paz-Artal E, Allende LM. A homozygous Fas ligand gene mutation in a patient causes a new type of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood* 2006;108:1306-1312.
46. Chen M, Wang YH, Wang Y, Huang L, Sandoval H, Liu YJ, Wang J. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science* 2006;311:1160-1164.

47. Jackson CE, Fischer RE, Hsu AP, Anderson SM, Choi Y, Wang J, Dale JK, Fleisher TA, Middleton LA, Sneller MC, Lenardo MJ, Straus SE, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am. J. Hum. Genet.* 1999;64:1002-1014.
48. Campagnoli MF, Garbarini L, Quarello P, Garelli E, Carando A, Baravalle V, Doria A, Biava A, Chiocchetti A, Rosolen A, Dufour C, Dianzani U, Ramenghi U. The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica* 2006;91:538-541.
49. Bidere N, Snow AL, Sakai K, Zheng L, Lenardo MJ. Caspase-8 regulation by direct interaction with TRAF6 in T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *Curr. Biol.* 2006;16:1666-1671.
50. Su H, Bidere N, Zheng L, Cubre A, Sakai K, Dale J, Salmena L, Hakem R, Straus S, Lenardo M. Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* 2005;307:1465-1468.
51. Kossiva L, Theodoridou M, Mostrou G, Vrachnou E, le DF, Rieux-Laucat F, Kanariou MG. Mycophenolate mofetil as an alternate immunosuppressor for autoimmune lymphoproliferative syndrome. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2006;28:824-826.

52. Rao VK, Dugan F, Dale JK, Davis J, Tretler J, Hurley JK, Fleisher T, Puck J, Straus SE. Use of mycophenolate mofetil for chronic, refractory immune cytopenias in children with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br. J. Haematol.* 2005;129:534-538.
53. Heelan BT, Tormey V, Amlot P, Payne E, Mehta A, Webster AD. Effect of anti-CD20 (rituximab) on resistant thrombocytopenia in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br. J. Haematol.* 2002;118:1078-1081.
54. Wei A, Cowie T. Rituximab responsive immune thrombocytopenic purpura in an adult with underlying autoimmune lymphoproliferative syndrome due to a splice-site mutation (IVS7+2 T>C) affecting the Fas gene. *Eur. J. Haematol.* 2007;79:363-366.
55. 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 Transplant.* 1998;22:375-380.
56. Kahwash S, Fung B, Savelli S, Bleesing J, Qualman S. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS): A Case with Congenital Onset. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2007;1-
57. van der Werff Ten Bosch, Schotte P, Ferster A, Azzi N, Boehler T, Laurey G, Arola M, Demanet C, Beyaert R, Thielemans K, Otten J. Reversion of autoimmune lymphoproliferative syndrome with an antimalarial drug: preliminary

- results of a clinical cohort study and molecular observations. *Br. J. Haematol.* 2002;117:176-188.
58. van der Werff ten Bosch JE, Demanet C, Balduck N, Bakkus MH, De RH, Desprechins B, Otten J, Thielemans K. The use of the anti-malaria drug Fansidar (pyrimethamine and sulphadoxine) in the treatment of a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and Fas deficiency. *Br. J. Haematol.* 1998;102:578-581.
 59. Rao VK, Dowdell KC, Dale JK, Dugan F, Pesnicak L, Bi LL, Hoffmann V, Penzak S, Avila NA, Fleisher TA, Puck JM, Straus SE. Pyrimethamine treatment does not ameliorate lymphoproliferation or autoimmune disease in MRL/lpr-/- mice or in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am. J. Hematol.* 2007;82:1049-1055.
 60. Rao VK, Carrasquillo JA, Dale JK, Bacharach SL, Whatley M, Dugan F, Tretler J, Fleisher T, Puck JM, Wilson W, Jaffe ES, Avila N, Chen CC, Straus SE. Fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) for monitoring lymphadenopathy in the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Am. J. Hematol.* 2006;81:81-85.
 61. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* 2003;3:459-465.
 62. Barbacid M. ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* 1987;56:779-827.

63. Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y, Filocamo M, Kato K, Suzuki Y, Kure S, Matsubara Y. Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat. Genet.* 2005;37:1038-1040.
64. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RC, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat. Genet.* 2006;38:294-296.
65. Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS, McCormick F, Rauen KA. Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* 2006;311:1287-1290.
66. Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, Bollag G, van dB, I, Musante L, Kalscheuer V, Wehner LE, Nguyen H, West B, Zhang KY, Sistermans E, Rauch A, Niemeyer CM, Shannon K, Kratz CP. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 2006;38:331-336.
67. Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, Pandit B, Oishi K, Martinelli S, Schackwitz W, Ustaszewska A, Martin J, Bristow J, Carta C, Lepri F, Neri C, Vasta I, Gibson K, Curry CJ, Siguero JP, Digilio MC, Zampino G, Dallapiccola B, Bar-Sagi D, Gelb BD. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 2007;39:75-79.

68. Gelb BD, Tartaglia M. Noonan syndrome and related disorders: dysregulated RAS-mitogen activated protein kinase signal transduction. *Hum. Mol. Genet.* 2006;15: 220-226.
69. Aoki Y, Niihori T, Narumi Y, Kure S, Matsubara Y. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders. *Hum. Mutat.* 2008 (e-publication)
70. Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:189-200.
71. Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, Adams JM, Strasser A. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 1999;286:1735-1738.
72. Bloethner S, Chen B, Hemminki K, Muller-Berghaus J, Ugurel S, Schadendorf D, Kumar R. Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines. *Carcinogenesis* 2005;26:1224-1232.
73. Bos JL, Toksoz D, Marshall CJ, Verlaan-de VM, Veeneman GH, van der Eb AJ, van Boom JH, Janssen JW, Steenvoorden AC. Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukaemia. *Nature* 1985;315:726-730.

74. Lubbert M, Mirro J, Jr., Miller CW, Kahan J, Isaac G, Kitchingman G, Mertelsmann R, Herrmann F, McCormick F, Koeffler HP. N-ras gene point mutations in childhood acute lymphocytic leukemia correlate with a poor prognosis. *Blood* 1990;75:1163-1169.
75. Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Oda K, Okada J, Rauen K, McCormick F. Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2005;70:461-467.
76. Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 2001;294:1299-1304.
77. Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death. Differ.* 2005;12:1008-1014.
78. Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Howes E, Balmano K, Cook SJ. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 are serum-stimulated "Bim(EL) kinases" that bind to the BH3-only protein Bim(EL) causing its phosphorylation and turnover. *J. Biol. Chem.* 2004;279:8837-8847.
79. Ley R, Balmano K, Hadfield K, Weston C, Cook SJ. Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J. Biol. Chem.* 2003;278:18811-18816.

80. Tan TT, Degenhardt K, Nelson DA, Beaudoin B, Nieves-Neira W, Bouillet P, Villunger A, Adams JM, White E. Key roles of BIM-driven apoptosis in epithelial tumors and rational chemotherapy. *Cancer Cell* 2005;7:227-238.
81. Karp JE, Lancet JE. Targeting the process of farynesylation for therapy of hematologic malignancies. *Curr. Mol. Med.* 2005;5:643-652.
82. Mor A, Philips MR. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 2006;24:771-800.
83. de C, I, Diaz R, Malumbres M, Hernandez MI, Jagirdar J, Jimenez M, Ahn D, Pellicer A. Mice deficient for N-ras: impaired antiviral immune response and T-cell function. *Cancer Res.* 2003;63:1615-1622.
84. Johnson L, Greenbaum D, Cichowski K, Mercer K, Murphy E, Schmitt E, Bronson RT, Umanoff H, Edelmann W, Kucherlapati R, Jacks T. K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev.* 1997;11:2468-2481.
85. Esteban LM, Vicario-Abejon C, Fernandez-Salguero P, Fernandez-Medarde A, Swaminathan N, Yienger K, Lopez E, Malumbres M, McKay R, Ward JM, Pellicer A, Santos E. Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol. Cell Biol.* 2001;21:1444-1452.

86. Parikh C, Subrahmanyam R, Ren R. Oncogenic NRAS rapidly and efficiently induces. *Blood* 2006;108:2349-2357.
87. Wiesner SM, Jones JM, Hasz DE, Largaespada DA. Repressible transgenic model of NRAS oncogene-driven mast cell disease in the mouse. *Blood* 2005;106:1054-1062.
88. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method. *Methods* 2001;25:402-408.