



# Universidad de Granada

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON EL SÍNDROME DE  
WISKOTT-ALDRICH Y RECONSTITUCIÓN FUNCIONAL CON INHIBIDORES DE LA  
CALPAÍNA Y EL PROTEASOMA

TESIS DOCTORAL

GUADALUPE ZALDÍVAR LELO DE LARREA

Granada, Julio 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea  
D.L.: GR. 3060-2009  
ISBN: 978-84-692-5071-6



**IGNACIO J. MOLINA PINEDA DE LAS INFANTAS**, Profesor Titular de Inmunología  
de la Universidad de Granada

**CERTIFICA:** Que la Tesis Doctoral titulada **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CON EL SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH Y RECONSTITUCIÓN FUNCIONAL CON INHIBIDORES DE LA CALPAÍNA Y EL PROTEASOMA** ha sido realizada bajo su dirección por **GUADALUPE ZALDÍVAR LELO DE LARREA** en el programa de doctorado “Inmunología Molecular y Celular” y reúne las condiciones necesarias para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente.

Granada, 9 de Julio 2009

## **INTRODUCCIÓN**

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) son un grupo de enfermedades genéticamente heterogéneas que afectan distintos componentes del sistema inmune innato y adquirido, incluyendo el desarrollo y función de las proteínas del complemento, fagocitos, células dendríticas, células natural killer y linfocitos T y B. Se han descrito más de 120 defectos en genes (1), dando más de 150 fenotipos de enfermedades. Las alteraciones más severas ocasionan ausencia de la función o una función alterada de los linfocitos T (y algunas veces de los linfocitos B y células natural killer), lo cual es conocido colectivamente como “inmunodeficiencia combinada severa” (SCID). Las fallas del sistema inmune innato pueden observarse en la infancia temprana, pero la profilaxis ha logrado que muchos de estos pacientes sobrevivan hasta la vida adulta temprana.

Debido a que las pruebas genéticas actualmente están disponibles, más pacientes son diagnosticados con PID. Es importante tratar de identificar el defecto genético de fondo, debido a que su identificación puede ayudar a establecer el pronóstico y a saber qué tratamiento se puede ofrecer. Además de la identificación, los registros de datos de grandes cohortes de pacientes dan una información más precisa del desarrollo de una enfermedad dada en los pacientes. En este sentido, las principales sociedades especializadas han dedicado recientemente un gran esfuerzo en el desarrollo de estos registros que ayuden no sólo a valorar la incidencia de las distintas enfermedades, sino también a entender con más precisión las diversas presentaciones clínicas de las mismas y la evolución de los pacientes (2-4)

Las IDPs son un reto tanto para los científicos como para los clínicos, debido a que representan modelos naturales de inmunopatología, los cuales sólo pueden estudiarse efectivamente en modelos animales, y pueden manifestarse con un amplio rango de síntomas

clínicos, incluyendo susceptibilidad a las infecciones, alergia, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, linfoproliferación y cáncer. En la última década, avances en la investigación de las IDPs han dado una luz insospechada sobre los mecanismos de desarrollo y función del sistema inmune. Los defectos genéticos que causan IDPs pueden afectar la expresión y función de proteínas que están involucradas en un amplio rango de procesos biológicos, tales como el desarrollo inmune, las funciones de las células efectoras, la cascada de señalización y el mantenimiento de la homeostasis inmune (5).

Desde el primer trasplante de células troncales hematopoyéticas (HSCT) en 1968 (6), el trasplante se expandió para el tratamiento de varias IDPs. El HSCT es aún con frecuencia visto como un procedimiento riesgoso, con una significativa morbilidad y mortalidad, históricamente en el contexto de la presentación de malignidades hematológicas, por lo que ha sido utilizado como un tratamiento de último recurso. Cuando hay tratamientos profilácticos disponibles, el HSCT no es recomendado de manera rutinaria. Actualmente también se está estudiando la terapia génica, la cual podría representar una opción terapéutica para pacientes que carecen de un donador de médula ósea adecuado (7).

Esto ha despertado la inquietud de ensayar tratamientos alternativos en las IDPs que pudieran solventar el problema de fondo y mejorar la sintomatología y con esto la calidad de vida.

## **2. Síndrome de Wiskott-Aldrich. Características clínicas.**

El Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X caracterizado por eczema, trombocitopenia, infecciones recurrentes, inmunodeficiencia, así como una gran tendencia a los linfomas y a las enfermedades autoinmunes. En 1937, el Dr. Alfred Wiskott describió el caso de tres hermanos con

trombocitopenia, diarrea sanguinolenta, eczema y otitis recurrentes (8). Los tres murieron a temprana edad, debido a hemorragia intestinal y sepsis. Wiskott comentó que el origen de la diátesis hemorrágica, era debido a una disfunción en las plaquetas. La observación de que los tres hermanos estaban afectados, mientras las hermanas no mostraban ninguna sintomatología, llevó a Wiskott a la conclusión de que se trataba de una “trombopatía hereditaria”. Diecisiete años después, los doctores Aldrich, Steinberg y Campbell encontraron al estudiar seis generaciones de una familia de ascendencia holandesa, que 16 varones de un total de 40 miembros de la familia habían muerto de esta enfermedad, mientras que ninguna mujer se había visto clínicamente afectada (9). Estos hallazgos demostraron que este síndrome tenía bases genéticas, heredándose como rasgo ligado al cromosoma X. El WAS es ocasionado por la mutación del gen *WAS* que codifica por la proteína WASP (10), y que se encuentra en el brazo corto del cromosoma X. Hoy sabemos, gracias al estudio molecular de los supervivientes y descendientes de la familia a la que pertenecían los tres pacientes originalmente descritos por Alfred Wiskott en 1937, que estos pacientes tenían una delección de dos nucleótidos (A y C) en las posiciones 73 y 74 (11) del gen *WAS*.

El Síndrome de Wiskott-Aldrich es una enfermedad rara, ya que su incidencia oscila según los estudios desde 10 afectados por millón de nacidos vivos (12, 13) hasta 4 por millón de recién nacidos vivos varones (14). Afecta a individuos de todas las razas, con fenotipos clínicos variables relacionados con el tipo de mutación en el gen *WAS*. Las mutaciones que ocurren en el gen *WAS* pueden provocar la ausencia de la proteína o la existencia de niveles reducidos de la misma (15). En un escaso número de pacientes, además de encontrar niveles reducidos de WASP, la proteína está truncada y se considera que no es funcional (16). Las mutaciones que provocan la pérdida total de la expresión de WASP se correlacionan con un fenotipo más severo de la enfermedad, mientras que las mutaciones que ocasionan que haya niveles reducidos de la proteína coincide con los casos clínicos leves o menos graves de

WAS (17-19), estableciendo una correlación genotipo-fenotipo. Las mutaciones del gen WASP provocan al menos tres distintos fenotipos:

(1) *El síndrome de Wiskott-Aldrich clásico*, que presenta la triada clásica de microtrombocitopenia, infecciones recurrentes y eczema (el fenotipo más severo de WAS, el cual con frecuencia se complica con enfermedades autoinmunes y cáncer). Las características de este síndrome serán discutidas con más detalle a continuación. La severidad clínica de los pacientes está relacionada con el tipo de mutación y los niveles de expresión de la proteína (15, 16) habiéndose propuesto una gradación del 1 al 5 en la severidad de los cuadros clínicos (16).

(2) *La trombocitopenia ligada al cromosoma X, o XLT*, que representa una variante moderada de la enfermedad (20, 21), a pesar de que clásicamente se consideraban entidades patológicas diferentes. La XLT es una enfermedad más benigna que el WAS clásico, caracterizada por microtrombocitopenia congénita, hematomas, a veces asociados con eczema transitorio. La prevalencia de la XLT es igual a la de WAS (13). La enfermedad es usualmente leve o moderada, presentando durante la infancia hematomas, púrpura o hemorragia prolongada después de la cirugía o trauma. Parece haber una tendencia para que los síntomas mejoren al llegar a la adolescencia, aunque el número de plaquetas permanece bajo. Algunos de estos pacientes, sin embargo, tienen características clínicas que recuerda a WAS con eosinofilia, aumento de los niveles de IgA, eczema, glomerulonefritis e infecciones, pero tienen un curso más leve y un resultado más favorable. La presencia de infecciones y la severidad del eczema son significativamente menores que en el caso de WAS. El diagnóstico de estos pacientes es a veces difícil, ya que a menudo se confunde con una trombocitopenia idiopática (22), por lo que si estos pacientes llegan a ser esplenectomizados serán altamente susceptibles de presentar sepsis posterior (23).



(3) *La neutropenia congénita ligada al cromosoma X*, que no comparte ninguno de los hallazgos clínicos característicos de WAS/XLT (24, 25) y que es el resultado de la mutación en residuos de tirosina con actividad reguladora dentro de la propia proteína. Estos pacientes presentan mielodisplasia de los tres linajes, una severa y persistente neutropenia y alteraciones en la forma de los megacariocitos con plaquetas de tamaño grande. Otros pacientes presentan detención en la maduración de los progenitores hematopoyéticos (24). Estas mutaciones, que dan lugar a una permanente activación de WASP, causan alteraciones en los procesos de mitosis y citocinesis (26).

La triada clásica de WAS (trombocitopenia, eczema e inmunodeficiencia) no incluía la autoinmunidad, que se encontraba enmascarada por la rápida evolución de los pacientes y que sólo se volvió aparente al mejorar la esperanza de vida de los mismos como consecuencia de la mejora de los tratamientos. Por las mismas razones, no se describieron originalmente la tendencia a presentar linfomas o leucemias (27). Históricamente, antes del advenimiento de los antibióticos, los pacientes con WAS vivían en promedio hasta los 8 meses de edad e invariablemente morían a causa de una infección. La disponibilidad y el uso de drogas efectivas antibacterianas condujeron a una mejoría de la supervivencia a una media de edad de 5 años, pero al mismo tiempo, reveló a la diátesis hemorrágica de estos pacientes como una fuente severa de morbilidad y como segunda causa más común de muerte. El advenimiento del trasplante de médula ósea y la esplenectomía electiva han llevado más recientemente al incremento substancial de la esperanza de vida de estos pacientes, ya que una considerable porción de ellos sobrevive más de 20 años (14).

Las manifestaciones clínicas sugerentes de WAS-XLT están con frecuencia presentes al nacimiento y consisten en petequias, hematomas y diarrea hemorrágica. Las plaquetas son típicamente de tamaño pequeño (28). La hemorragia excesiva después de la circuncisión es un signo diagnóstico temprano. El eczema es una manifestación frecuente de WAS durante la

infancia. El hallazgo diagnóstico más consistente tanto en WAS como en XLT es la microtrombocitopenia. Las infecciones recurrentes incluyendo las otitis medias con secreción mucopurulenta, las neumonías frecuentemente causadas por bacterias y a veces por *Pneumocystis carinii*, son hallazgos frecuentes durante los primeros seis meses de vida. También pueden presentarse meningitis y sepsis. Las infecciones virales severas incluyen infecciones recurrentes de herpes virus simple, observada en el 12% de los pacientes con WAS; la varicela con complicaciones sistémicas frecuentemente requieren tratamiento con aciclovir. Además de todos estos problemas, estos pacientes son anormalmente propensos a presentar linfomas u otros cánceres en la adolescencia y en la juventud. Es más, se ha invocado con rotundidad que en el caso de WAS la predisposición al cáncer es debido a una alteración en los controvertidos mecanismos de la inmunovigilancia (29).

Los pacientes con WAS presentan una alta prevalencia de enfermedades autoinmunes. En el estudio retrospectivo realizado por Dupuis-Girod y cols. en 2003 (30), más del 70% de los pacientes con WAS (40/55 evaluados) tuvieron uno o más episodios autoinmunes, incluyendo citopenias autoinmunes, artritis, vasculitis, enfermedad intestinal inflamatoria o enfermedad renal. Las manifestaciones autoinmunes en WAS se presentan típicamente en la vida temprana y la mayoría no responde al tratamiento médico. Es más, los pacientes con enfermedad autoinmune tienen un pronóstico clínico pobre. Incluso los pacientes con XLT cuyas mutaciones permiten la expresión de bajos niveles de WASP intacta, o de una proteína parcialmente funcional, pueden sufrir de secuelas autoinmunes que incluso llegan a poner en peligro su vida (17, 18). Recientemente se ha descrito que las alteraciones autoinmunes están relacionadas con alteraciones en las células T reguladoras (Tregs), para las que la expresión de WASP es esencial para asegurar el correcto desarrollo, actividad y homeostasis de este compartimento celular (18, 31, 32). No obstante, datos recientes sugieren que, además de las alteraciones en las células T reguladoras, las células B

de los pacientes con WAS son intrínsecamente autoinmunes. En efecto, tanto los pacientes como los ratones deficientes en WAS tienen un uso excesivamente sesgado hacia la utilización de las cadenas lambda, lo cual ha sido claramente asociado en modelos murinos con el desarrollo de autoinmunidad (D. Rawlings, comunicación personal). En apoyo a esta idea, se ha descrito que WASP es esencial para el mantenimiento de la homeostasis de las células B, tanto a nivel periférico como en la homeostasis de la zona marginal (33, 34).

Las anomalías inmunológicas características de los pacientes con WAS, involucran a las funciones de las células T y B e incluyen quimiotaxis defectuosa de los monocitos, así como morfología anormal de las células dendríticas estimuladas (35). Los linfocitos de estos pacientes exhiben profundas anomalías en la superficie celular, caracterizadas por una disminución en el número y tamaño de las microvellosidades que pueden observarse al microscopio electrónico de barrido (36-38). La mayoría de los infantes tienen un número normal de linfocitos circulantes pero con frecuencia desarrollan linfopenia hacia los 6 a 8 años de edad, posiblemente debido al incremento de apoptosis (13, 39, 40). Los pacientes con WAS a menudo tienen niveles elevados de IgE e IgA, normales de IgG y disminuidos de IgM, aunque presentan característicamente una incapacidad para producir anticuerpos frente a antígenos polisacáridos, como los contenidos en la vacuna del *H. influenzae* tipo B (41, 42). Además de ello, las células T tienen un característico defecto en las respuestas mediadas por CD3, tanto en lo que se refiere a proliferación y producción de IL-2 (43) como en la reordenación del citoesqueleto y polimerización de actina (37).

### **3. El gen WAS**

#### **Mapeo Cromosómico e Identificación**

En 1994 Derry, Ochs y Francke identificaron en el cromosoma X el gen cuya mutación es responsable de WAS, denominándose *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*

(WASP) (10), aunque posteriormente el comité de nomenclatura lo ha definido como gen WAS. El gen WAS está localizado en el brazo corto del cromosoma X en la posición Xp11.22-Xp11.23 (44), consta de 12 exones y 1806 pares de bases y codifica para una proteína citoplásmica rica en prolina, de 502 aminoácidos, con un peso molecular de 53 kDa (10). Es interesante mencionar el hecho de que las mujeres heterocigotas que portan una mutación en el gen WAS en uno de sus cromosomas X, sólo el cromosoma X salvaje es activo, el cromosoma que porta la mutación es invariablemente inactivado de manera no aleatoria (45), excepto en los raros casos donde se altera la expresión del cromosoma X no mutado, presentándose la enfermedad en mujeres (46-48).

### **Estructura y función de WASP.**

WASP es el primer miembro de la familia de proteínas involucradas en la señalización del citoesqueleto que incluye a N-WASP y Scar/WAVE (49). La homóloga más cercana a WASP es N-WASP, la cual juega un papel crítico en la asociación de las señales celulares que activan Cdc42 con la actina del citoesqueleto. WASP y N-WASP son muy similares estructural y funcionalmente, pero WASP se expresa exclusivamente en células hematopoyéticas (10, 50) mientras N-WASP es expresada de manera ubicua (51).

Los reordenamientos en el citoesqueleto de actina tienen un papel esencial en la forma de la célula, en respuesta a señales extracelulares. La remodelación de actina provee marcos estructurales para la reorganización espacial de las señales efectoras requeridas para transmitir señales estimuladoras, para seleccionar los sitios intracelulares y permitir a las células cambiar rápidamente de polaridad, forma y motilidad en respuesta a la estimulación (52). El montaje de los filamentos de actina genera la fuerza mecánica que conduce la endocitosis, el tráfico vesicular y muchos otros procesos celulares fundamentales ahora reconocidos como facetas integrales de la transducción de las señales intracelulares. En años

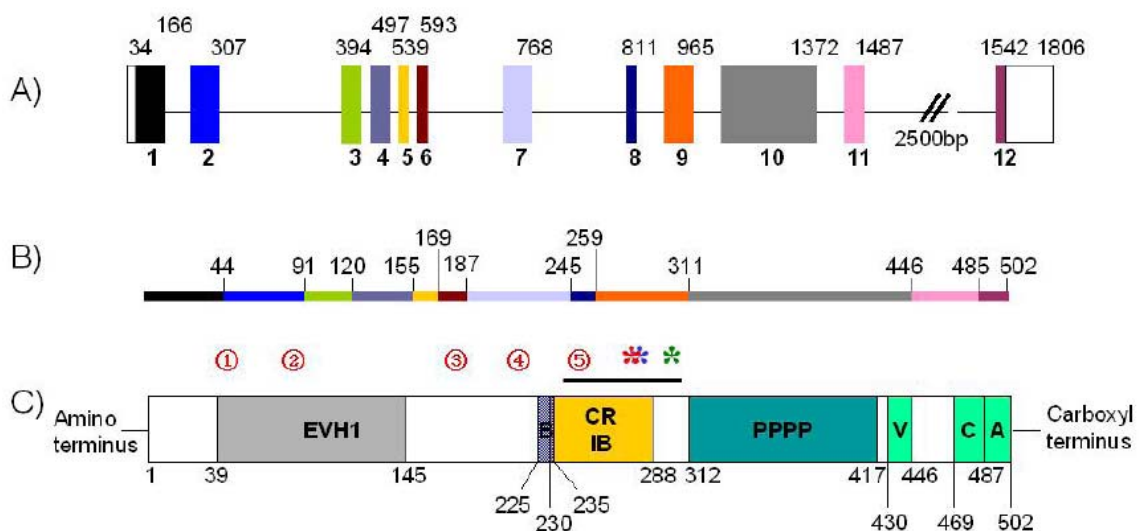
recientes, la importancia de la remodelación de actina en las vías de señalización de la célula T ha sido resaltado debido al descubrimiento de la sinapsis inmune y los extensos rearrreglos de la superficie de la célula T y moleculares intracelulares desencadenados por el entrecruzamiento del receptor de antígeno de la célula T (TCR) (53). Sin embargo, mientras la reorganización del citoesqueleto de actina es requerido para la activación de la célula T, los mecanismos específicos por los cuales el citoesqueleto de la célula T responde a señales extracelulares han empezado no hace mucho a emerger. Un descubrimiento crítico sobre esto, ha sido el descubrimiento de WASP como un regulador en la polimerización de actina en las células hematopoyéticas (37).

WASP se expresa exclusivamente en el citosol de las células hematopoyéticas (50), y es directamente responsable de regular la dinámica de la actina del citoesqueleto durante una gran diversidad de actividades celulares, por lo tanto interviene en la locomoción celular y en la formación de la sinapsis inmune entre el linfocito T y las células presentadoras de antígeno. La mayoría de las mutaciones en el gen WAS provoca pérdida de la función de la proteína y provoca varios rasgos clínicos, lo cual depende de la severidad o localización del defecto molecular, y quizá secundariamente a factores genéticos secundarios y ambientales (17, 23, 54-56).

WASP, al igual que su homóloga N-WAS, contiene varios dominios proteicos que regulan su actividad y su localización subcelular. Esto le confiere a WASP mediar la polimerización de actina en respuesta a una variedad de señales en el tiempo justo y en el lugar apropiado. Muchas investigaciones en la regulación de WASP/N-WASP han revelado similitudes entre las dos proteínas. WASP/N-WASP y sus proteínas relacionadas WAVE (*WASP family verprolin homologous protein*, también llamada Scar) están caracterizadas por un dominio carboxiterminal tripartito VCA (homología verprolina, central, acídico) que es capaz de activar el complejo de la proteína relacionada con actina 2/3 (Arp 2/3) y de ahí

iniciar la formación de nuevos filamentos de actina (53, 54).

La proteína WASP tiene una porción amino terminal con un dominio con homología Ena/VASP (Ena, *vasodilatador-stimulated phosphoprotein* u homología VASP) o dominio EVH1 o WH1 (con homología WASP) que tiene cerca de 100 aminoácidos; una región altamente básica (BR) conteniendo 5 residuos de lisina seguido inmediatamente por un dominio de unión Cdc42/Rac GTPasa (GBD) también denominado GBD/CRIB (de las siglas en inglés *Cdc42 Rac-interacting binding*); un dominio rico en prolina conteniendo varias regiones consenso con homología Src3 (SH3); un dominio carboxiterminal con homología verprolina que se une a la G-actina (VH), otro dominio con homología cofilina (CH) y un extremo ácido, el segmento A (VCA) (52-54).



**Figura 1. Organización genómica de WASP y estructura de la proteína.** A) Diagrama esquemático de la estructura genómica de WASP. Los 12 exones están coloreados y numerados. Los espacios vacíos representan las regiones no codificadas. Los números de arriba indican los pares de bases. B) El diagrama lineal representa la proteína WASP. Las regiones coloreadas corresponden a los exones codificantes y los números indican los aminoácidos. C) El diagrama representa la proteína WASP. Los dominios EVH1, Básico (B) y VCA son mostrados. Los aminoácidos están numerados bajo la proteína. Una línea negra sobre el dominio CRIB indica la región de unión a VCA (aminoácidos 242-310). Los círculos rojos denotan los hotspots mutacionales como sigue: 1 = T45M, 2 = R86S/G/C/H/L, 3 = IVS6 (+5g>a), 4 = R211X, 5 = IVS8 (+1g>a/c/t). Las mutaciones que provocan una activación constitutiva están indicadas por asteriscos: rojo = L270P, azul = L272P de = I294T (24, 54).

## **Interacciones de WASP.**

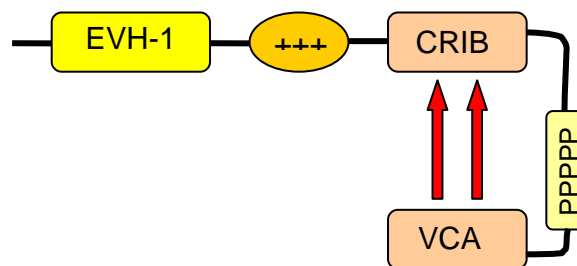
### *Proteínas que se unen a Poli-prolina.*

WASP tiene una región rica en prolina, necesaria para la óptima actividad de WASP en la polimerización de actina y para el reclutamiento efectivo de la sinapsis inmune (IS) formada entre las células T y las células presentadoras de antígeno (APCs) (52, 57). La secuencia rica en prolinas provee sitios de unión para VASP, que se sabe promueve la formación de estructuras de actina, los filopodios protrusivos que se cree son importantes para la quimiotaxis, y también para dominios con homología SH3, tales como la proteína adaptador Nck (54, 58). En esta región interactúan los dominios SH3 de muchas tirosin quinasas y adaptadores. Estos efectores adaptadores incluyen el Nck, PSTPIP1 (*Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1*), Grb 2, CIP4, CrkL y la intersectina 2, así como Fyn y Btk como tirosina quinasas, cuya unión de su dominio SH3 a la región rica en prolina de WASP interviene en acoplar la estimulación celular al reposicionar a WASP dentro de la célula. En las células T, el TCR desencadena la interacción de la región rica en prolina de WASP con los dominios SH3 de la intersectina 3 o de PSTPIP1 lo cual induce la translocación del WASP citosólico a las vesículas endocíticas o a la sinapsis inmunológica, respectivamente (52, 59).

### *Cdc42.*

El papel de WASP en la regulación del citoesqueleto es sugerido por la presencia del dominio CRIB que específicamente media la unión de la guanosina trifosfato activa (GTP) al Cdc42. Cdc42 es una GTPasa que regula la formación de filopodios, la adhesión de la célula a substratos y controla la polaridad celular/quimiotaxis. En ausencia de Cdc42, el dominio

CRIB mantiene una conformación autoinhibida de WASP al estar unido al dominio VCA (60) (Ver figura 2). En la resultante estructura cerrada, se previene que el dominio VCA active al complejo Arp2/3 (61, 62). El Cdc42 activo estimula a WASP al unirse a su dominio CRIB con alta afinidad, desplazando al dominio VCA y facilitando la interacción productiva con el complejo Arp2/3. La capacidad de algunos dominios SH3 para activar a WASP en lugar del Cdc42 puede reflejar los mecanismos alternativos para desestabilizar la conformación autoinhibida(54, 63)



**Figura 2. Representación esquemática de la autoinhibición de WASP.** El dominio VCA se une a una región de los residuos de aminoácidos 242 a 310, lo cual incluye la parte carboxiterminal del dominio CRIB. El sitio de unión de alta afinidad del Cdc42 en WASP va del residuo 230 al 288 (54, 60)

#### *Fosfoinositoles.*

WASP contiene una región altamente básica en la región aminoterminal del dominio CRIB, que en el caso de N-WASP se une al fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>). Permanece poco claro si éste es el sitio de unión al PIP<sub>2</sub> en WASP. Sin embargo, PIP<sub>2</sub> se sinergiza con Cdc42 para activar a WASP *in vitro*, proveyendo una ruta a través de la cual WASP puede responder a la composición local de la membrana (54).

#### *Tirosina quinasas.*

La fosforilación de tirosina es un mecanismo regulador importante para la actividad de WASP. WASP es tirosin-fosforilado después del entrecruzamiento del TCR. Se ha



caracterizado un sitio único de fosforilación de tirosina –WASP Y291, el cual es blanco para la familia de las quinasas Scr, Btk, Fyn, lck, Itk y la proteína-tirosin-fosfatasa (PTP)-PEST. La fosforilación de este sitio rompe la conformación autoinhibida de WASP y se activa. La fosforilación Y291 es crítica para las múltiples funciones efectoras de WASP incluyendo la polimerización de actina y la formación de la IS (53, 59, 64)

#### *WIP (WASP interacting protein)*

Una de las interacciones críticas de WASP es con WIP, una proteína ampliamente expresada que regula la polimerización y la estabilidad de la F-actina y que se une al dominio WH1 de WASP sobre la región C-terminal (65, 66). Tanto WASP como WIP pertenecen a una familia de proteínas conservadas durante la evolución que regulan el pool de los monómeros de actina citoplásmicos uniéndose a la G-actina a través de sus dominios WH2 y activando el complejo nucleador de filamentos de actina Arp2/3 (67). Las mutaciones en WASP en el sitio donde alterna su interacción con WIP ha sido observado en muchos pacientes WAS (66, 68), y una gran proporción de mutaciones conocidas como causantes de WAS incluyen varios puntos calientes, involucrando el dominio EVH1 donde WIP se une a WASP (13), sugiriendo así un papel clave para tales dominios.

WIP es una proteína rica en prolina de 503 aminoácidos (aa). Se expresa en linfocitos en niveles más altos que WASP, y en estudios de co-precipitación se ha demostrado que en las células cerca del 80% de WIP y WASP existen como un complejo mutuo (69, 70). La región de unión WASP/WIP ha sido mapeada por Antón y cols. en 1998 (71) y ocurre en el dominio EVH1 de WASP de los aa 26-147, en forma tal que WIP hace contacto en dos áreas.

WIP es requerido para la expresión de WASP en células humanas y sugiere que la preservación de la expresión de niveles adecuados de WASP puede ser una contribución fundamental de WIP a la función WASP (72). La dependencia de la expresión de WASP en

WIP es también consistente con los hallazgos de que todas las anomalías de las células T observadas en los ratones WASP-knockout, también fueron observados en los ratones deficientes en WIP, pero no viceversa (73). Aunque WIP es necesaria para la función de WASP/N-WASP, WIP también inhibe la actividad de WASP/N-WASP presumiblemente estabilizando su conformación autoinhibida (74, 75). Estas evidencias aparentemente contradictorias sugieren que la estabilización de WAS por la unión a WIP puede ser el mecanismo por el cual WIP permite la expresión de WASP y de ahí su función (72).

Después del entrecruzamiento del TCR, WASP es reclutado a la sinapsis inmune y liberada de la inhibición de WIP, lo cual conduce a la activación de Arp2/3 y a la polimerización local de actina (75). La señal puede ser terminada por la degradación de WASP libre o por su reasociación a WIP y el consecuente retorno al estado inactivo. De ahí, que la inestabilidad de WASP libre pueda ser un mecanismo contributivo a la homeostasis de la polimerización de actina, ya que WASP libre es degradada por la calpaína o ubiquitinizada al proteasoma (70).

La mayoría de los pacientes WAS con un fenotipo leve o moderado (XLT) tienen mutaciones missense que frecuentemente involucran la región de unión de WIP a WASP y presentan una expresión reducida de WASP (13, 17, 65, 68, 76). La asociación entre fenotipo leve o moderado de WAS y las mutaciones que afectan la interacción WASP-WIP puede ser explicado por el hecho que tales mutaciones causan principalmente una reducción en la expresión de WASP y tienen un efecto menor sobre su función biológica (72). Las mutaciones de WIP deben ser consideradas como una causa de fenotipo WAS en pacientes con expresión reducida de WASP con la presencia de una secuencia normal del gen WASP y expresión de mRNA. Además los pacientes con presentación clínica de WAS en ausencia de mutaciones de WASP han sido reportados (77). Por otro lado, ya que sólo la región de unión de WIP a WASP es requerida para la expresión de WASP, las mutaciones de WIP que no

afectan esta región podrían mantener la expresión de los niveles de WASP, pero podría causar alteración de la función de los linfocitos T debido a una disminución de la producción de IL-2 mediada por el TCR (72).

Datos recientes indican que WIP también se asocia con Syk e inhibe su degradación por la calpaína y el proteasoma en mastocitos derivados de médula ósea murina (78). Esto abre la posibilidad de que WIP podría de la misma manera proteger a WASP de la degradación por proteasas al actuar como chaperona (70, 72).

Sorprendentemente, dado su alto grado de homología secuencial y estructural y a que comparten sus funciones *in vitro*, la sensibilidad a la degradación por calpaína que tiene WASP es mucho mayor que la de su homólogo N-WASP (79), lo cual podría explicar la carencia de los efectos en los ratones WIP-knockout en la expresión de N-WASP. Asimismo, WIP evita la ubiquitinización de WASP al proteasoma (70). Las calpaínas son cisteína proteasas dependientes de calcio, no lisosomales, que selectivamente escinden proteínas en respuesta a señales de calcio (80), y de ahí controlan las funciones celulares tales como la reordenación del citoesqueleto, la progresión del ciclo celular, la expresión génica y la muerte celular por apoptosis (81, 82). En mamíferos, los dos miembros mejor caracterizados de la familia de las calpaínas son la calpaína 1 y la calpaína 2 ( $\mu$ -calpaína y m-calpaína respectivamente), que son expresadas de manera ubicua (83). La actividad de las calpaínas está fuertemente controlada por su inhibidor endógeno la calpastatina, la cual es una proteína intrínsecamente no estructurada capaz de unirse reversiblemente e inhibir cuatro moléculas de calpaína, pero sólo en la presencia de calcio (84). Los mecanismos de inhibición por la calpastatina y la base de su especificidad absoluta todavía permanecen no resueltos (83). Por otro lado, después del entrecruzamiento del TCR, se disuelve el complejo WIP/WASP ya que WIP es fosforilado (75), quedando WASP libre y en este momento se vuelve susceptible de ser ubiquitinizado al proteasoma (70).

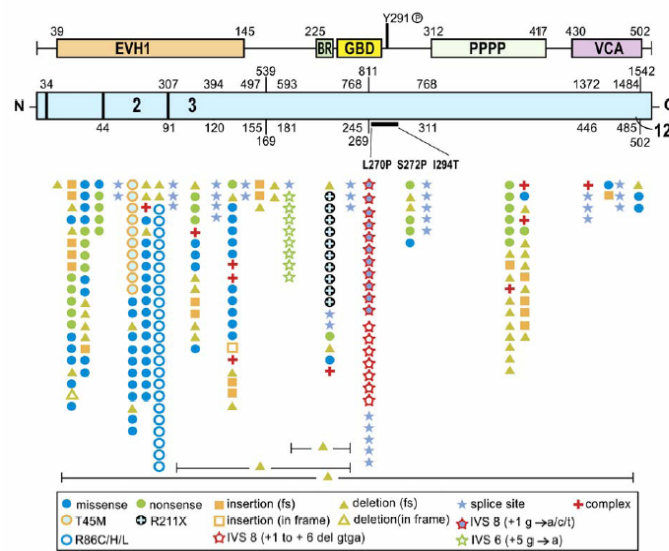
Las funciones de WASP y WIP como complejo multiproteico apenas han comenzado a comprenderse. Debido a que la familia de proteínas WIP participan en una variedad de funciones celulares, incluyendo la señalización celular, endocitosis y en la reorganización de la actina del citoesqueleto, es posible que estos complejos sean módulos que se asocian con diferentes señalosomas para integrar varias señales celulares conducentes a la activación de Arp2/3. Alternativamente, la asociación con múltiples proteínas, es crucial para la localización espacial y temporal de los complejos WASP/WIP en áreas con remodelación de actina activa y formación de estructuras específicas. Ya que los defectos observados en la activación de la célula T, quimiotaxis y homing in vivo en ratones doble knockout WASP/WIP son más severos que en los ratones knockout sólo para WASP (85), esto sugiere que WIP tiene un papel importante en la activación de la célula T independientemente de WASP (69, 86).

### **Mutaciones del gen WAS.**

Aproximadamente 300 mutaciones únicas han sido reportadas en el gen WAS, en 441 casos reportados distribuidas a lo largo de los 12 exones, pero aglomeradas en los primeros 4 (ver figura 3). Estas mutaciones están recogidas en las base de datos WASPbase: <http://homepage.mac.com/kohsukeimai/WASP/WASPbase.html> (13, 17).

En general, las mutaciones missense en los primeros tres exones usualmente están asociados con XTL o WAS atenuado, mientras las mutaciones missense en cualquier otra parte y otros tipo de mutaciones (encontrados predominantemente en los exones 6-11) están asociados con variables fenotipos, indicando que el análisis de la mutación exclusivamente es insuficiente como herramienta pronóstica, de ahí que otro punto en cuestión es la expresión de WASP. Las mutaciones que provocan ausencia de proteína provocan una enfermedad clínica severa (87) y a nivel molecular, total abolición de la polimerización de actina mediada

por WASP-Arp2/3. Como no toda la polimerización de actina es dependiente de WASP, la producción celular total de F-actina puede ser normal, pero la respuesta del citoesqueleto ante los estímulos externos está comprometida. La expresión de proteína truncada similarmente se correlaciona con un fenotipo clínico severo, pero en contraste, proteína normal residual es predictiva de una enfermedad moderada. Sin embargo, la correlación expresión de proteína-fenotipo no es absoluta y pacientes con proteína normal residual pueden desarrollar manifestaciones severas de la enfermedad (16, 54, 88). Sin embargo, no sólo las mutaciones que alteran la estructura de WASP disminuyen sus niveles de expresión, sino también aquellas mutaciones missense que alteran los residuos de aminoácidos que intervienen en la unión de WASP con WIP (19).



**Figura 3.- Representación esquemática de las mutaciones en gen WAS.** Las mutaciones identificadas en 270 familias de pacientes de WAS no relacionadas entre sí se visualiza de acuerdo a su localización en los exones y en las uniones del exón-intrón. Cada símbolo representa una familia única con mutación en WAS. Las mutaciones missense se localizan casi todas en los exones 1 a 4. Deleciones, inserciones y mutaciones sin sentido están distribuidos a lo largo del gen WAS. Las mutaciones splice-site se encuentran predominantemente en los intrones 6,8,9 y 10. Los símbolos para las mutaciones específicas de WASP mostradas en la caja, representan los 6 hotspots. EVH1, dominio 1 con homología Ena/VASP; BR, región básica; GBD, dominio de unión GTPasa; PPPP, región rica en prolina; VCA, dominio con homología verprolina cofilina/región ácida (54).

### Mutaciones en el dominio EVH1 interrumpen la interacción con WIP

Una proporción significativa de las alteraciones del gen *WAS* ocasionan la expresión de una proteína con sustituciones de aminoácidos en el dominio EVH1. Esta región media la interacción con WIP, lo cual regula varios efectos importantes sobre la polimerización de actina mediada por WASP, en particular actividad de localización espacial. Como todo el dominio EVH1 es requerido para la unión con WIP, se cree que las mutaciones que afectan este dominio alteran esta interacción (19, 66). Sin embargo, las mutaciones clínicamente relevantes que interrumpen la unión WIP/WASP han demostrado que abolen la localización y subsecuentemente la polimerización de actina dando un mecanismo que podría explicar muchos de los defectos celulares. Lo que no se explica es cómo mutaciones que parecen tener efectos bioquímicos similares provocan tanta variabilidad en la severidad clínica, aunque podría especularse con que algunas mutaciones afectarían de manera variable la capacidad de WASP para interactuar con WIP.

#### **4. Trastornos funcionales de los linfocitos WAS**

Las consecuencias biológicas de los defectos en la citoarquitectura en pacientes de WAS comenzaron a ser evidentes al descubrirse los defectos en la polimerización de actina y proliferación de linfocitos T de pacientes de WAS al ser estimulados por anticuerpos agonistas del complejo molecular TCR/CD3 (37, 43, 89). Esto permitió sugerir que la disfunción de otros procesos celulares están directamente relacionados con la reorganización de la arquitectura del citoesqueleto, tales como la motilidad celular y la fagocitosis, lo cual contribuiría significativamente a la inmunopatología de WAS (22).

La generación de la respuesta inmune es dependiente, entre otras cosas, de la capacidad de las células para migrar en respuesta a las quimiocinas. Los mecanismos biológicos celulares que permiten que este proceso ocurra están íntimamente relacionados con la regulación de la arquitectura del citoesqueleto, y la respuesta de éste a estímulos

externos es de importancia fundamental para la homeostasis de las células inmunes y para el inicio del proceso inflamatorio. Zicha y cols (90) estudiaron la respuesta de los macrófagos y neutrófilos WAS a factores conocidos como quimioatrayentes de estas células. En el caso de los neutrófilos de pacientes con WAS se observó una velocidad de migración y quimiotaxis direccional normal hacia péptidos formil; sin embargo al exponer a los macrófagos WAS al factor estimulante de las colonias 1 (CSF-1), potente quimioatrayente de estas células, observaron que no ocurría la quimiotaxis, pero sí en los controles normales, concluyendo estos autores que la quimiotaxis en macrófagos WAS está abolida.

Badolato y cols. (91) encontraron que los defectos reportados en la respuesta quimiotáctica de las células mononucleares de pacientes con WAS no era por falta de la unión a las quimiocinas MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) y MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* ), sino por un defecto selectivo en la motilidad celular, mediado potencialmente por la interrupción de la formación de podosomas. Correlacionado con la carencia de podosomas, las células dendríticas (DCs) WAS, son incapaces de formar podosomas asociado a la carencia de reclutamiento de sus integrinas  $\beta$ 2 en la ausencia de WASP, provocando la adhesión reducida a la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) (92).

Concluyendo, estos datos sugieren que los macrófagos y las DCs deficientes en WAS están alteradas en dos niveles. Primero, las células son incapaces de responder a estímulos en una manera direccional, aún cuando parecen activarse normalmente, y esto se piensa sea secundario a la incapacidad de formar filopodios mediados por WASP-Cdc42. Segundo, los macrófagos y DCs de pacientes con WAS polarizan de manera aberrante y no son móviles cuando la adherencia requiere de la unión a las integrinas de su superficie celular. Estos hallazgos indican que WASP juega un papel en proveer la plataforma requerida para la organización de integrinas en la membrana celular que parece ser un prerrequisito para la

activación posterior de tales integrinas en respuesta a su sustrato o a la señalización intracelular (93).

Además de los defectos de migración, la fagocitosis se encuentra alterada en las células de los pacientes con WAS. La fosforilación de WASP y la formación del complejo WASP/WIP son pasos moleculares esenciales para la formación de las copas para la fagocitosis. La ausencia de WASP altera estos pasos moleculares, provocando formación defectuosa de las copas fagocíticas. Esta alteración de la fagocitosis, contribuye a las infecciones recurrentes en los pacientes con WAS (94), alterando también la eficiencia óptima de la fagocitosis mediada por IgG. Pero además, WASP juega un papel muy relevante en la eliminación por los fagocitos de los cuerpos apoptóticos de aquellas células que han iniciado el proceso de muerte celular programada (95).

## **5. Tratamiento para WAS/XLT**

### ***(1) Trasplante de células troncales hematopoyéticas.***

En la actualidad, el tratamiento de elección para WAS es el trasplante de progenitores hematopoyéticos, bien procedentes de médula ósea o de cordón umbilical. Como ya hemos comentado anteriormente, los primeros trasplantes de células hematopoyéticas en humanos con éxito durable fueron reportados en 1968 en tres pacientes con IDPs (6) (dos con Inmunodeficiencia Combinada Severa y otro con Síndrome de Wiskott-Aldrich), quienes recibieron trasplantes de donadores hermanos con HLA compatibles. Desde entonces, y a pesar de la elevada morbi-mortalidad inicial, se han logrado progresos significativos para corregir las inmunodeficiencias primarias mediante trasplante de progenitores hematopoyéticos debido a varios factores, entre ellos:

- Una mejor capacidad para fenotipar y cuantificar las células troncales hematopoyéticas (CD34<sup>+</sup>).



- El advenimiento del tipaje HLA de alta resolución, lo que ha mejorado la selección de donantes.

- La mayor disponibilidad de donantes de médula ósea y de cordón umbilical gracias a la organización de redes de donantes adecuadamente coordinadas y la creación de bancos de células de cordón umbilical.

- La mejora en la aplicación de regímenes pretrasplante de intensidad reducida.

- La identificación de las bases moleculares de estas enfermedades, permitiendo estudios más exactos de la historia natural de las mismas, lo cual ha permitido valorar objetivamente los riesgos/beneficios del trasplante temprano en enfermedades con una media de supervivencia de 15 a 20 años. Así, el éxito de la transferencia de progenitores medulares está influenciado por la edad a la que se efectúa el trasplante y la salud general del paciente. A temprana edad se presenta menor comorbilidad y hay menor frecuencia pre-trasplante de la exposición a la familia de los herpes virus y de los virus entéricos, bajando así los riesgos de complicaciones relacionadas en el post-trasplante (96).

Debido a que la corrección de todos los aspectos alterados en el WAS requiere el éxito de la reconstitución de las estirpes mieloide y linfoide, la mayoría de pacientes en los que se ha llevado a cabo un HSCT para WAS han sido preparados con protocolos mieloablativos, consistentes en busulfán, ciclofosfamida y globulina antitimocito (97). A pesar de esto, una pequeña fracción (~10%) de pacientes rechazan su primer trasplante (aunque el restrasplante tiene éxito en la mayoría) y una proporción substancial (un estimado del 30%) presentan una mezcla de quimeras a largo plazo (97).

En el año 2001 se publicaron los datos recogidos por el Centro Internacional de Investigación de Trasplante de Sangre y Médula (CIBMTR) en relación con la supervivencia de los trasplantes de médula ósea en función, entre otras variables, de los diferentes protocolos mieloablativos para pacientes con WAS (98). El análisis revisó el resultado de 170

trasplantes de médula alogénicos realizados en el mundo entre 1980 y 1996, con un énfasis en el análisis del impacto del tipo de donante (compatibles emparentados en comparación con los no emparentados) sobre la supervivencia. El promedio de supervivencia a 5 años post-trasplante fue del 87% en receptores de trasplantes recibidos de hermanos que eran compatibles y un 71% en receptores de trasplantes de donadores compatibles no emparentados, en pacientes de una edad inferior a los 5 años. Un resultado más pobre fue reportado para los pacientes mayores de 5 años que recibieron el trasplante procedente de donantes compatibles no emparentados. En este caso, el promedio de supervivencia fue de sólo del 52%. Es de notar que, en pacientes menores de 5 años, el tipo de donante no influye en la supervivencia pero sí en la morbilidad, con complicaciones más frecuentes y severas (especialmente en el caso de la enfermedad del injerto contra el huésped), en el caso de donantes no relacionados (56% contra 16%). Sin embargo, la mayoría de estos pacientes después del trasplante estaban “curados” o al menos habían mejorado substancialmente su calidad de vida. (98)

En un estudio más reciente se ha examinado la evolución de la supervivencia de 96 pacientes con WAS tratados mediante trasplante de médula en diversos centros europeos en el período 1979-2001 (99). El estudio seleccionaba a pacientes sometidos a mieloablación y con una supervivencia post-trasplante de, al menos, 2 años, ya que en estos centros se llevaron a cabo otros 49 trasplantes que terminaron en muertes prematuras. La media de seguimiento fue de 7 años, y en ese momento aún vivían 93 de los 96 pacientes que sobrevivieron los 2 años posteriores al trasplante (supervivencia total del 64%). La supervivencia estaba claramente relacionada con el tipo de donante: 88% en trasplantes compatibles emparentados; 71% en donantes compatibles no emparentados; y 55% en el caso de donantes no compatibles pero emparentados. Las complicaciones más frecuentes durante este tiempo abarcaban a la enfermedad crónica de injerto contra huésped (cGVHD),

infecciones y autoinmunidad, que se encontraba asociada al estado de quimerismo (células T del donador, células mieloides y B del receptor), sugiriendo que las células residuales del receptor pueden inducir enfermedad autoinmune a pesar de la coexistencia de las células donadoras. El grado de quimerismo también se asociaba a procedimientos mieloablativos suaves. Las infecciones relacionadas con la esplenectomía fueron también un hallazgo significativo en este estudio, sugiriendo que la esplenectomía debe de evitarse en pacientes con WAS que sean candidatos a trasplante o que ya lo hayan recibido.

En conclusión, los datos apoyan que el trasplante de progenitores medulares está claramente indicado en todos los pacientes con WAS clásico y en aquéllos con XLT que tengan un donador hermano. Por el contrario, deben valorarse con suma precaución los potenciales riesgos en el caso de no disponer de donantes compatibles emparentados, de manera muy especial en aquellos pacientes con XLT o con formas moderadas de presentación.

Es necesario, por tanto, desarrollar nuevas alternativas de tratamiento para aquellos pacientes en los que el trasplante de médula represente un riesgo excesivo o no se encuentre disponible, como es el caso de la terapia génica (97).

## ***(2) Terapia génica***

La terapia génica ha emergido como un tratamiento alternativo para las IDPs, basado en la transferencia *ex vivo* a las células troncales hematopoyéticas de una copia correcta del gen cuya mutación es responsable de la enfermedad. El transgén debe integrarse en el genoma de estas células progenitoras, de manera que la corrección funcional conseguida por aquél pueda transmitirse no sólo a las células transducidas sino a toda su progenie (100, 101).

Recientemente, la terapia génica para IDPs ha tenido éxito en 28 de 31 pacientes tratados en tres ensayos clínicos de la inmunodeficiencia combinada severa (SCID),

mostrando el potencial de la terapia génica para el tratamiento de esta condición. Sin embargo, cinco niños que estaban en el grupo SCID-X1 del ensayo clínico, desarrollaron una enfermedad semejante a la leucemia producida por la expresión aberrante de oncogenes como resultado de la integración del vector. Este fenómeno provocó el retraso en el avance de la terapia génica.(102-104).

Varios grupos han demostrado que la transferencia de genes vía vectores gammaretrovirales derivados del virus Molony (retrovirus de la leucemia murina-MLV-RV) o vía por vectores derivados de lentivirus HIV-1 (HIV-LV), efectivamente restaura la expresión de la proteína y corrige los defectos en la organización del citoesqueleto, la activación celular y la inflamación en varios modelos *in vitro* o *in vivo* de WAS (105, 106) . Estos estudios proveen un soporte racional para el desarrollo de protocolos clínicos de terapia génica para esta enfermedad. La transferencia de genes por transducción retroviral, corrige el defecto inmunológico en ratones knockout WASP y en líneas celulares humanas, con aumento en la polimerización de actina, corrección funcional de las células T incluyendo la respuesta a la influenza así como disminución de la colitis autoinmune en ratones deficientes en WASP (107-110).

Los vectores de la transferencia de genes, por tanto deben vencer dos obstáculos significativos: eficiencia pobre, ya que las HSCs son muy restrictivas para la transducción; y genotoxicidad alta, ya que la integración del vector implica modificaciones en los cromosomas de las HSCs. Es por ello que en la actualidad se está trabajando activamente en el desarrollo de nuevas herramientas que mejoren la eficiencia y la seguridad del procedimiento, lo que implica la sustitución de los vectores retrovirales derivados del gammaretrovirus, que han sido los vectores más ampliamente usados para el estudio de la terapia génica en IDPs, y los únicos utilizados en ensayos clínicos. Éstos son altamente eficientes, integrativos, fácil de manipular, poco inmunogénicos y son derivados de un virus

que no es patógeno para los humanos (111, 112). Estas propiedades han hecho que los vectores basados en MLV hayan sido la única alternativa para la terapia génica en las IDPs. Sin embargo, como las HSCs se dividen muy lentamente y los vectores basados en MLV requieren activa división celular para la transducción, es obligado utilizar citocinas para estimular a las HSCs e inducir su proliferación, un proceso que puede modificar las características intrínsecas de los precursores hematopoyéticos, ya que al activarse los genes involucrados en la proliferación, provocará que sus áreas cromosómicas sean más susceptibles a la integración del vector (113). Otro inconveniente de los vectores basados en MLV es el alto nivel de silenciar el transgén por medio de la remodelación de cromatina y/o metilación.

Es por ello que nuevos vectores están apareciendo como una sólida alternativa a los vectores oncorretrovirales, y entre todos ellos, destacan los vectores lentivirales transcripcionalmente dirigidos, que han obtenido resultados extraordinariamente prometedores en el caso de WAS (114-122). Estos vectores han conseguido reconstituir células deficientes, tanto de pacientes como de animales deficientes, restringiendo su expresión a células del tejido hematopoyético, lo que implica una sustancial mejora en la bioseguridad potencial de esta aproximación terapéutica, al reducir los posibles efectos de genotoxicidad, silenciamiento y expresión ectópica.

### ***(3) Tratamiento paliativo para los pacientes WAS/XLT***

Como ya se ha señalado anteriormente, la mejora en el manejo de los pacientes con WAS ha permitido mejorar sustancialmente su vida media, que en estos momentos supera los 20 años. La muerte se debe a complicaciones por infecciones, hemorragias, debido a la presencia de enfermedades autoinmunes o malignas, como leucemia o linfoma. El

tratamiento paliativo de soporte es el uso profiláctico de antimicrobianos y de inmunoglobulinas intravenosas, además de valorar en su caso la esplenectomía (siempre previa inmunización con polisacáridos conjugados HiB y neumococos). En este caso la profilaxis antibiótica es imperativa debido al riesgo de sepsis (97).

#### ***(4) Tratamientos emergentes***

El conocimiento de las mutaciones responsables de la enfermedad en cada uno de los pacientes comienza a sentar las bases para el desarrollo de tratamientos individuales que tengan como diana cada una de las mutaciones. En este sentido, se están comenzando a desarrollar drogas que sobrepasen los defectos moleculares presentes en estos pacientes, o bien que se encuentren dirigidos a proteger las proteínas responsables de una degradación acelerada.

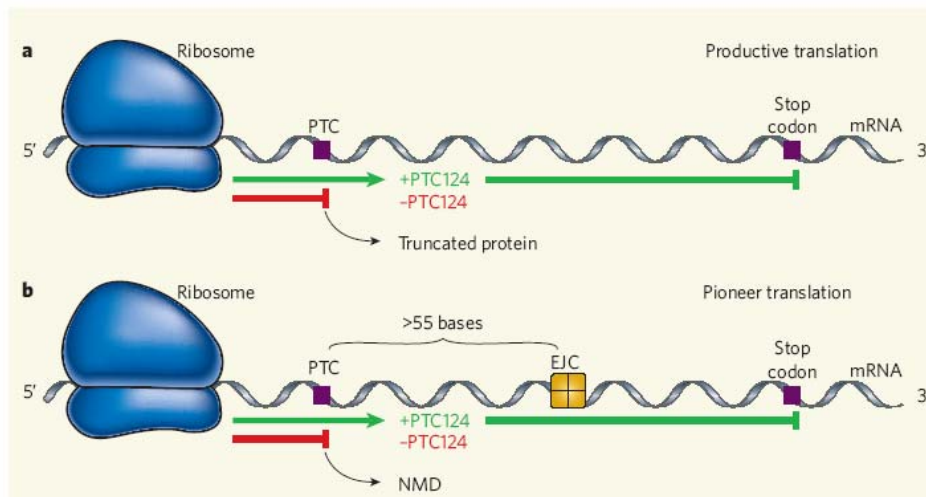
#### ***PTC 124***

Se estima que, en promedio, del 5-15% de los pacientes con cualquiera de al menos 1,800 enfermedades genéticas diferentes, tienen mutaciones sin sentido como la causa básica de la enfermedad, incluyendo, entre otras, la fibrosis quística, la distrofia muscular de Duchenne, la atrofia espinal muscular, la hemofilia, alteraciones del almacenamiento lisosomal, retinitis pigmentosa, hipercolesterolemia familiar, neurofibromatosis y algunas formas de cáncer (123).

Las mutaciones sin sentido son alteraciones puntuales únicas en el DNA que al ser transcrito, provoca la presencia inapropiada de codones de stop UAA, UAG, o UGA en la región codificante de la proteína del mRNA (RNA mensajero), lo cual conduce a la cesación prematura de la traducción, con la consecuente producción de una proteína truncada y la aparición de enfermedad, debido a la pérdida de la función crítica de dicha proteína. Ya que las mutaciones sin sentido son la base de la mayoría de las enfermedades hereditarias

monogénicas, estudios en fibrosis quística mediada por este tipo de mutaciones, han indicado que aumentando la síntesis de proteína de <1% a tan sólo 5% de los niveles normales, se puede reducir la severidad o incluso eliminar las principales manifestaciones de la enfermedad. (124).

Los antibióticos aminoglucósidos fueron de las primeras drogas descubiertas como producto natural de la actividad antibacteriana. Esta capacidad antimicrobiana resulta de su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas bacterianas a altas dosis (125). El laboratorio de Waksman reportó el descubrimiento y aislamiento del aminoglucósido estreptomina obtenido a partir de una bacteria de la tierra en 1944 (126). La estreptomina fue el primer antibiótico efectivo contra el *Mycobacterium tuberculosis*. Mientras el mecanismo de acción de la mayoría de los aminoglucósidos ha sido elucidado en los pasados 50 años, no fue sino hasta los últimos años 1980s que se descubrió el blanco molecular, un RNA ribosomal 16S componente del ribosoma bacteriano. El conocimiento del mecanismo de acción y el blanco molecular de los aminoglucósidos, llevó a mediados de los 1990s a experimentar un tratamiento para enfermedades genéticas cuya causa patogénica eran las mutaciones sin sentido, incluyendo la distrofia muscular de Duchenne y la fibrosis quística (126).



**Figura 4. Posibles mecanismos de acción del PTC124.** **a**, El PTC124 puede directamente suprimir la traducción “productiva” de una proteína con un codon prematuro de terminación (PTC), conduciendo a incrementar los niveles de las proteínas de tamaño normal funcionales. **b**, Alternativamente, el PTC124 puede suprimir la identificación de los PTCs en la traducción “pionera”, de ahí previniendo la destrucción mediada por el mecanismo nonsense del RNAm (NMD), el cual es inducido si el ribosoma toca un codon de stop a más de 55 bases upstream de un complejo de unión de exón (EJC). Esto conduciría a la estabilización del PTC-contenido en el RNAm, permitiendo su traducción, presumiblemente a través del mecanismo mostrado en **a**. Algunas evidencias experimentales apoyan el primer mecanismo (127).



## **OBJETIVOS**

El Síndrome de Wiskott-Aldrich es una compleja enfermedad en la que las mutaciones en el gen *WAS* dan lugar a presentaciones clínicas diferentes. La imposibilidad para ofrecer en muchos casos tratamientos efectivos a estos pacientes hace que sea imperativo profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de esta enfermedad al objeto de poder encontrar nuevas dianas terapéuticas, que podrían encontrarse tanto a nivel de modificación de los procesos de regulación génica o bien en lo que se refiere a la protección intracitoplasmática de la proteína WASP que puede encontrarse en algunos tipos de mutaciones.

Por tanto, la presente tesis aborda los siguientes objetivos:

- 1.- Reclutamiento de una cohorte de pacientes con cuadros clínicos compatibles con WAS, determinando las mutaciones presentes en cada uno de ellos con el objeto de establecer las posibles correlaciones entre genotipo, proteotipo y severidad de la presentación.
- 2.- Determinar si las células de pacientes que presenten mutaciones en las zonas de interacción WASP/WIP son susceptibles de modificación en los niveles de expresión de WASP mediante el tratamiento con inhibidores de la degradación enzimática de WASP o de la actividad del proteasoma.
- 3.- Determinar el impacto que el tratamiento con inhibidores de la degradación de WASP tiene en la reconstitución de dos defectos funcionales típicos de las células T de pacientes con WAS en respuesta a estimulación mediada por CD3: alteraciones en la producción de IL-2 y polimerización de actina.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***Líneas celulares, medios de cultivo y generación de líneas aloespecíficas de pacientes con WAS.***

Al objeto de generar líneas primarias aloespecíficas procedentes de individuos normales y pacientes con WAS según el método previamente descrito (38), las células mononucleares procedentes de sangre periférica se obtuvieron mediante centrifugación en gradiente de densidad. Las células así obtenidas fueron cocultivadas en una proporción 1:1 con células Raji (células B linfoblastoides con MHC-II) previamente inactivadas con mitomicina C. Las líneas de células T aloespecíficas se cultivaron a concentración óptima en medio Panserin (PAN Biotech. Aidenbach, Germany) suplementado con un 5% de suero humano fresco (Centro Regional de Transfusión Sanguínea, Granada), Glutamax (BioWhittaker) al 1%, Penicilina/ Estreptomicina (BioWhittaker) al 1%, y 50 UI/ml de rIL-2 (Hoffman-La Roche, Nutley, NJ) y reestimuladas en períodos semanales. La línea celular Raji se cultivó en RMPI 1640 (BioWhittaker, Verviers, Belgium) suplementado con un 10% de FBS descomplementado (GIBCO, Invitrogen, Auckland, New Zealand), Glutamax al 1% y Penicilina/ Estreptomicina al 1%. Las células fueron mantenidas en un incubador a 37° C de temperatura en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Las células utilizadas en todos los experimentos fueron células en reposo, es decir, entre 8-10 días después de la estimulación.

### ***Extracción de DNA genómico***

La extracción de ADN genómico de las células de los pacientes se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del kit de extracción de ADN genómico utilizado (Promega, Madison, WI, USA) partiendo de  $2 \times 10^6$  células en reposo previamente lavadas en PBS. El DNA obtenido fue analizado en un gel de agarosa para comprobar su integridad y determinada su concentración mediante espectofotometría ultravioleta con lecturas a 260 nm y 280 nm (Nanodrop 2000, Termo Scientific). Las muestras fueron

secuenciadas mediante electroforesis capilar en el servicio de secuenciación del Hospital Universitario “Son Dureta” de Palma de Mallorca, utilizando para las reacciones de amplificación de cada uno de los exones los juegos de cebadores previamente descritos para el análisis genómico de WAS (128).

### ***Western blot cuantitativo y semicuantitativo***

Las muestras celulares fueron lisadas con tampón de lisis NP40 al 1%, en el que estaba diluido 1:10 una solución que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma, St. Louis, MO, USA). Las proteínas se separaron mediante un gel SDS-PAGE (al 7.5% en condiciones reductoras) y electro-transferidas a membranas PVDF *Hybond-P* (Amersham, Buckinghamshire, UK). Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora con una solución de PBS/Tween20 al 0.1% y 5% de leche desnatada en polvo a temperatura ambiente. Fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-WASP D1 [200 µg/ml] (Santa Cruz Biotech.), preparado 1/100 en la solución de bloqueo diluida 1/10 con PBS-Tween, durante 1 h a temperatura ambiente. Donde se indica, las membranas fueron hibridadas en las mismas condiciones a las anteriormente descritas con el anticuerpo monoclonal anti-WIP 3D10 (129), una generosa donación del Dr. Raif S. Geha (Children’s Hospital, Boston). Como controles de carga se usaron los anticuerpos monoclonales anti-actina o anti-Erk. Tras ello fueron incubadas con un anticuerpo *goat anti-mouse* conjugado con HRP (dilución 1:5000) (Caltag, Burlingame, CA, USA). Las membranas fueron reveladas por quimio-luminiscencia (ECL, Amersham) y expuestas a autorradiografías (Amersham). Para revelar los controles de carga, las membranas fueron rehibridadas con un anticuerpo policlonal anti-Erk (anti-MAP quinasa 1/2 Upstate Biotechnololgy, UK). El análisis semi-cuantitativo fue llevado a cabo por densitometría tras digitalizar las bandas utilizando el programa *Quantity One* versión 4.5.0 (Bio-Rad). El análisis cuantitativo fue realizado utilizando para revelar ECL Advance

Western Blotting Detection Kit (Amershan, Bioscience, UK). Las membranas fueron hibridadas como se ha indicado anteriormente y fueron reveladas por incubación de 1-5 minutos con una mezcla 1:1 de los reactivos suministrados en el kit. La cuantificación de la emisión de luz fue detectada con una longitud de onda de 440 nm utilizando el instrumento *QuemIDoc XRS* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y analizadas con el programa *Quantity One*. La aportación de cada banda fue grabada y expresada como intensidad relativa por mm<sup>2</sup>.

### ***Inmunotinción y citometría de flujo***

El análisis funcional de las células T aloespecíficas de polimerización de actina en respuesta a la activación celular mediada por CD3 se realizó de acuerdo al método previamente descrito (37), utilizando como sonda Phalloidina marcada con Rodamina. La Phalloidina es la toxina de la *Amanita phalloides*, que se une de manera específica a los extremos filamentosos de la actina, por lo que cuando se usa en condiciones saturantes marcada con un fluorocromo, la intensidad de fluorescencia es un indicador fiel de la cantidad total de F-actina presente en la célula (130). Brevemente, alícuotas de  $5 \times 10^5$  células por cada punto a analizar fueron lavadas con PBS frío dos veces, resuspendidas y puestas a 4° C durante 30 minutos con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 OKT3. Tras un lavado en frío, se incubaron a 37° C y en presencia del anticuerpo entrecruzador anti-IgG (crosslinker) en una concentración 4 veces superior a la de OKT3 durante 5 ó 15 minutos, según el caso. Posteriormente, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 100 µl de cytofix/cytoperm (Pharmigen, San Diego, CA), dejándolas en incubación durante 20 minutos a 4° C y en agitación. Todo el proceso en adelante se realizó a 4° C. Tras la incubación, se lavaron las células dos veces con una solución de PBS/saponina 0.05%, añadiendo a continuación 100µl de una solución 1/50 (preparada en PBS/saponina 0.05%) de Phalloidina marcada con

Rodamina (Molecular Probes), incubándose durante 40 minutos a 4° C y en agitación. Tras los lavados finales, la fluorescencia emitida fue analizada por citometría de flujo en un citómetro FACScan (Becton Dickinson).

Para la inmunotinción de IL-2 intracitoplasmática, las células T aloespecíficas de los pacientes indicados y las procedentes de individuos normales fueron pretratadas con los agentes que se indican durante 6 horas en medio privado de IL-2. Tras su lavado en PBS frío, las células fueron incubadas con 2.5 µg/ml del anticuerpo monoclonal OKT-3 durante 30 m en frío, y tras lavados las células fueron finalmente incubadas durante 6 h a 37° C con el anticuerpo entrecruzados anti-IgG (crosslinker) a 10 µg/mL y 0,5 µl de Brefeldina 1M (Golgi Plug™, BD). Como control positivo de activación se utilizaron células incubadas con 25 ng/µL de PMA (Sigma, St. Louis, MO, USA) más 0.5 µg/µL de Ionomicina (Sigma, St. Louis, MO, USA). Tras finalizar el período de incubación, las células se lavaron con PBS y permeabilizaron con 100 µl de cytofix/cytoperm (Pharmigen, San Diego, CA), dejándolas en incubación durante 20 minutos a 4° C y en agitación y lavadas en PBS/saponina 0.05%. Las células fueron finalmente incubadas con 1,65 µg/mL del anticuerpo anti-human IL-2 (Caltag Laboratories, CA, USA) durante 30 minutos a 4° C y en agitación. Tras los lavados finales en PBS/saponina 0.02%, las células fueron analizadas por citometría de flujo (FACScan).

### ***Calpeptina, MG132 y Velcade.***

Para determinar el efecto de la exposición de las células a los inhibidores del proteasoma y de la calpaína,  $1 \times 10^6$  de cada una de las células indicadas se pretrataton durante 6 horas a 37°C en placas de 12 pocillos con las siguientes combinaciones: Calpeptina (inhibidor de la calpaína; Calbiochem) 10 µM; MG132 (inhibidor del proteasoma; Calbiochem) 100 mM; Velcade (Bortezomib) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 100 µM; o una combinación de Calpeptina y MG132 a las dosis indicadas. Al finalizar la incubación, las

células fueron lisadas para análisis de la expresión de WASP por Western Blot o bien destinadas a los análisis funcionales de polimerización de actina y citoquinas intracelulares según se indica en los apartados correspondientes.

### ***RT-PCR.***

El ARN total procedente de las células T aloestimuladas, objeto de estudio, fue extraído mediante el reactivo Trizol (Invitrogen). Tras un lavado con PBS frío, las células fueron resuspendidas en 1 mL de Trizol e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después se realizó una extracción orgánica con cloroformo 5:1. Tras recoger la fase acuosa se procedió a la precipitación del ARN con Isopropanol. Una vez precipitado y lavado con Etanol 75% preparado con agua DEPC (dietil pirocarbonato, Sigma, St. Louis, USA), se hidrató durante 10 minutos a 55° C con 20 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC. La medida de la concentración se llevó a cabo a 280 nm en NanoDrop Thermo Fischer Scientific Inc. El ADN complementario (ADNc) usado como molde para la realización de la PCR, se obtuvo por la realización de la transcripción en reverso (Reverse Transcription system, Promega) de 1 µg ARN total extraído de las células T aloestimuladas, usando como cebador oligo dT. El proceso de retrotranscripción se realizó en 3 ciclos: 1X (42°, 60'), 1X (95°, 5'), 1X (4°, 5'). Las reacciones de PCR se realizaron sobre 1 µL ADNc usando la enzima Pfu polimerasa (Promega) y los siguientes oligonucleótidos-cebadores:

S-WASP (5' AGGGCAGAAAGCACCATGAG 3')

A-WASP (5' GCGGCGGAAGTGGCTCCTGG 3')

S-ACTINA (5' TGACGGGGTCAACCACACTGTGCCCATCTA 3')

A-ACTINA (5' CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG 3')

Las condiciones de la PCR fueron 1X (94° C, 2'); 35X(94° C, 30''/ 58° C, 30''/ 72° C, 2');



1X(72° C, 10'). Los productos de amplificación de la PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando el marcador de peso molecular 0.07-12.2 DNA molecular weight X (Roche) y visualizados con bromuro de etidio incorporado al gel, siendo el producto de amplificación de los cebadores S-WASP/A-WASP de 961 pb, F-WASP/A-WASP de 502 pb y de S-ACTINA/A-ACTINA de 660 pb. Las reacciones de PCR se realizaron en 2720 Thermo Cycler (Applied Biosystems). La Tm de los oligonucleótidos usados fue establecida en ensayos previos.

### ***Real Time-PCR.***

Las reacciones de PCR a tiempo real se realizaron en un termociclador 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems) usando FastStart SYBR green master (Roche) que contiene todos los componentes necesarios para realizar una PCR a tiempo Real excepto los primers y el molde. Este kit contiene el agente intercalante SYBR Green específico de ADN de doble cadena, de tal forma que, conforme se va sintetizando ADN, se va uniendo a él y emite fluorescencia (absorción a 497 nm y emisión a 520 nm) que es recogida por el sistema detector en cada uno de los ciclos de la PCR. Mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. El ciclo de la PCR en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (Ct, de threshold cycle) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN presente en la muestra. El estudio comparativo de las diferentes muestras se hace comparando los Ct respecto a una muestra control. Los resultados de las Ct de diferentes muestras con respecto al gen WAS fueron normalizadas con respecto al gen constitutivo 18S. Los cebadores utilizados para la amplificación fueron:

F-wex1 (5' CCAGCGACTCTTTGAGATGCT 3')

R-wex2 (5' CGCCAGGTACAGCTGAACAA 3')

R-18S (5' AATCTTCTTCAGTCGCTCCA 3')

F-18S (5' GATATGCTCATGTGGTGTG 3')

Las condiciones de la PCR fueron de 1X(50° C, 2'); 1X(95° C, 10'); 40X(95° C 15''/ 60° C 1'). La curva estándar se realizó usando 2, 1 y 0,5 ng de ADNc paciente sano.

### ***Microscopía electrónica de barrido.***

El análisis de la superficie de las células T aloespecíficas de pacientes y normales, según se indica, mediante microscopía electrónica de barrido fue realizado según el método previamente descrito (37, 117). Brevemente, las células en crecimiento exponencial fueron recogidas y lavadas con PBS libre de Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> permitiéndoseles la adherencia a láminas recubiertas de poli-L-lisina. Simultáneamente, se consiguió la fijación de las mismas mediante la incubación a 4° C y durante toda la noche en una atmósfera saturada de vapores de glutaraldehído. Las células fueron postfijadas en tetróxido de osmio al 1% durante 1 h, deshidratadas en etanoles de diferentes porcentajes, secadas con dióxido de carbono y finalmente recubiertas con carbono. Las células fueron examinadas en un microscopio de alta resolución LEO 1530 Gemini (LEO Electron Microscopy/Nano Technology Systems Division of Carl Zeiss NTS, Oberkochen, Germany) en el Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

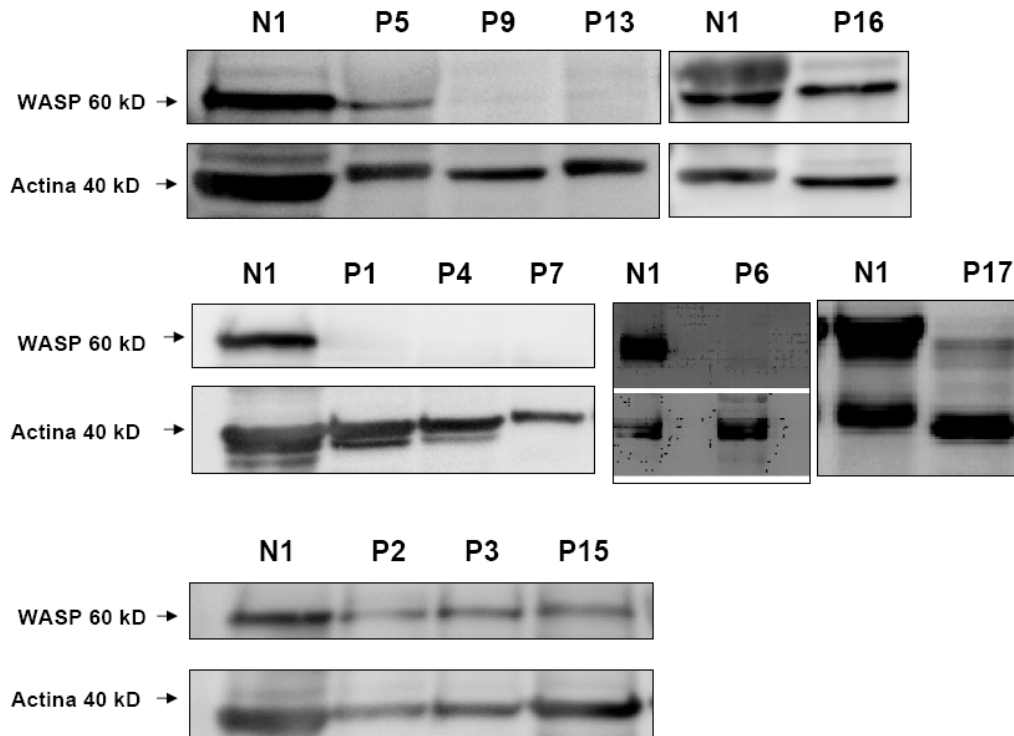
## **RESULTADOS**

### ***Reclutamiento y caracterización molecular de una cohorte de pacientes con WAS***

Como primer objetivo de nuestro trabajo nos propusimos reclutar una cohorte de pacientes con sintomatología compatible con el Síndrome de Wiskott-Aldrich, con el objeto de caracterizar sus características de expresión de WASP y de identificación de posibles mutaciones en su genoma. A tal efecto, realizamos el estudio de expresión de WASP mediante Western Blot cuantitativo, acompañado en su caso por el correspondiente análisis del gen *WAS* a nivel del DNA genómico.

Los pacientes nos fueron remitidos para estudio desde los centros indicados. Las células periféricas fueron obtenidas mediante aislamiento en gradiente de densidad, procediendo a la generación de líneas T aloespecíficas de acuerdo al protocolo indicado en Materiales y Métodos. Se procedió a la extracción de lisados citoplasmáticos de estas células, comparando la expresión de WASP en las líneas de pacientes con la obtenida en líneas controles derivadas de individuos sanos.

La figura 5 muestra los perfiles de expresión de los pacientes analizados. En el panel superior y central se recogen los casos confirmados de WAS, mientras en el inferior se indican los que no pudo encontrarse una mutación en el DNA genómico en *WAS*. Todos los pacientes, con excepción de P16, presentaron alteraciones en la expresión de WASP, obteniendo niveles de la proteína ausentes o muy disminuidos. Los resultados fueron referidos a los obtenidos con los correspondientes niveles de los controles de carga tras rehibridación de las membranas con anticuerpos específicos.



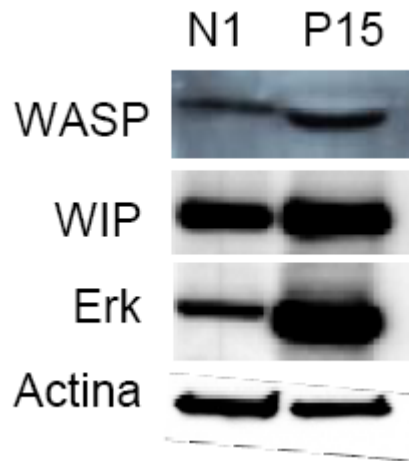
**Figura 5.- Análisis por Western Blot de la expresión de WASP en células T aloespecíficas de pacientes con sospecha clínica de WAS.-** La expresión de WASP fue analizada por Western Blot en lisados citoplasmáticos de igual número células en reposo e hibridados con el anticuerpo monoclonal anti-WASP y revelado por quimioluminiscencia según se describe en Materiales y Métodos. Las membranas fueron rehibridadas para confirmar los niveles de carga utilizando el anticuerpo monoclonal anti-actina.

Tras el análisis de la proteína por Western Blot, se procedió al análisis molecular de aquellos casos en los que se observaron alteraciones en los niveles de expresión de WASP. Obtuvimos DNA genómico de las células de estos pacientes y se realizó la secuenciación de los fragmentos genómicos correspondientes al gen WAS mediante electroforesis capilar. La tabla I recoge los resultados obtenidos, en los que puede comprobarse la heterogeneidad en las mutaciones presentadas por este grupo de pacientes. El análisis de los resultados moleculares y de expresión de la proteína WASP con el fenotipo clínico de nuestro grupo de pacientes, clasificado de acuerdo a los criterios establecidos de severidad 1-5(16), estaba en concordancia con los resultados previamente descritos (15, 128). No obstante, cabe destacar cuatro casos peculiares:

- **P2 y P3.** Se trata de dos hermanos con un síndrome clínico claramente compatible con WAS. Existen hermanas en la familia libres de enfermedad, aunque no existía historia familiar previa. No obstante la similitud en la presentación clínica y la fuerte sospecha de una patología ligada al cromosoma X, tanto los niveles de expresión de la proteína como la secuencia génica son absolutamente normales.

- **P14.** Es un paciente con una mutación que corresponde a un punto caliente de XLT. No obstante, los niveles de proteína se encontraban muy disminuidos y el paciente siguió un curso clínico inesperadamente agresivo, teniendo en cuenta lo que sería esperable en una mutación de este tipo.

- **P15.** Es un paciente con un cuadro clínico compatible con WAS. Sin embargo, tanto los niveles de la expresión de la proteína como el análisis molecular del gen eran completamente normales. Se procedió al análisis de la expresión de WIP con un anticuerpo policlonal, que reveló una expresión disminuida con respecto al control. Por ello, el paciente fue secuenciado para WIP, no encontrando mutaciones en su secuencia. La expresión de esta proteína fue re-examinada con dos anticuerpos monoclonales (3D10 y D12C5) (129) amablemente cedidos por el Dr. Raif Geha (Boston), que revelaron una expresión de WIP totalmente normal. No obstante, este paciente, que siguió un curso clínico agresivo, presenta consistentemente una muy elevada expresión de Erk. Estos datos se muestran en la Figura 6.



**Figura 6.- Análisis por Western Blot de las células T aloespecíficas de P15.** Los lisados celulares pertenecientes a este paciente fueron examinados por Western Blot en membranas sometidas a hibridación con anticuerpos monoclonales anti-WASP. Anti-WIP, anti-Erk y anti-actina, y posteriormente reveladas por quimioluminiscencia.

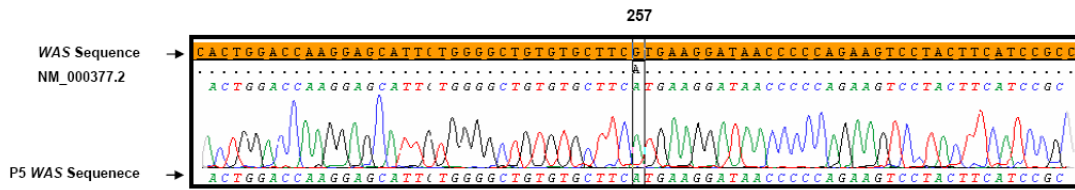
- **P16.** Se trata de una niña, único caso en nuestra cohorte, que presenta una mutación asociada a XLT y que presentaba una expresión de WASP normal, igualmente el único caso de estas características. La evolución de esta paciente es benigna.

En la figura 7 se muestran dos cromatogramas representativos de los análisis de los fragmentos del gen WAS en los que se pudo confirmar una mutación, en este caso en los pacientes P5 y P13.

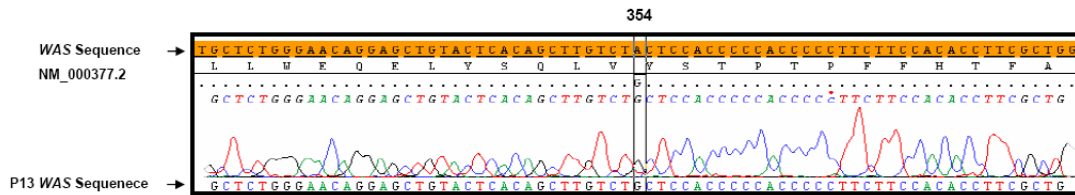
TABLA I CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES ANALIZADOS Y MUTACIONES CONFIRMADAS EN EL GEN WAS			
	FENOTIPO	MUTACIÓN	PROCEDENCIA
P1	4. WAS	del A 266-267	H.U. Son Dureta. Palma de Mallorca.
P2	WAS?	Secuencia Normal	Aghia Sophia" Children's Hospital. Atenas
P3	WAS?	Secuencia Normal	Aghia Sophia" Children's Hospital. Atenas
P4	4. WAS	del G 823-824 → codón stop prematuro G275 fs X 307	Aghia Sophia" Children's Hospital. Atenas
P5	3	G>A 257 → mutación Val 75 Met	Aghia Sophia" Children's Hospital. Atenas
P6	4. WAS	IVS 8 – 2 G>A	"P. and Aglaia Kyriakou" Children's Hospital. Atenas
P7	4. WAS	C>T 37 → codón stop prematuro TGA	H.U. del Niño Jesús. Madrid
P9	3. XLT	T>C 336 Leu 101 Pro	H.U. Virgen del Rocío. Sevilla
P13	3. WAS	A>G 354 → mutación Tyr 107 Cys	Aghia Sophia" Children's Hospital. Atenas
P14	5* XLT/WAS	IVS 6 + 5 G>A	H.U. Vall d'Hebron. Barcelona
P15	WAS?	Secuencia WAS Normal. Secuencia de <i>WIP</i> normal.	H.U. Cruces. Baracaldo
P16* Niña	2. XLT	T>C 995 → Val 107 Ala	H.U. Virgen de la Arrixaca. Murcia
P17	4. WAS	Pendiente de finalización. Amplificación del exón 10 negativa. Resto normal.	H.U. Son Dureta. Palma de Mallorca



### P5



### P13

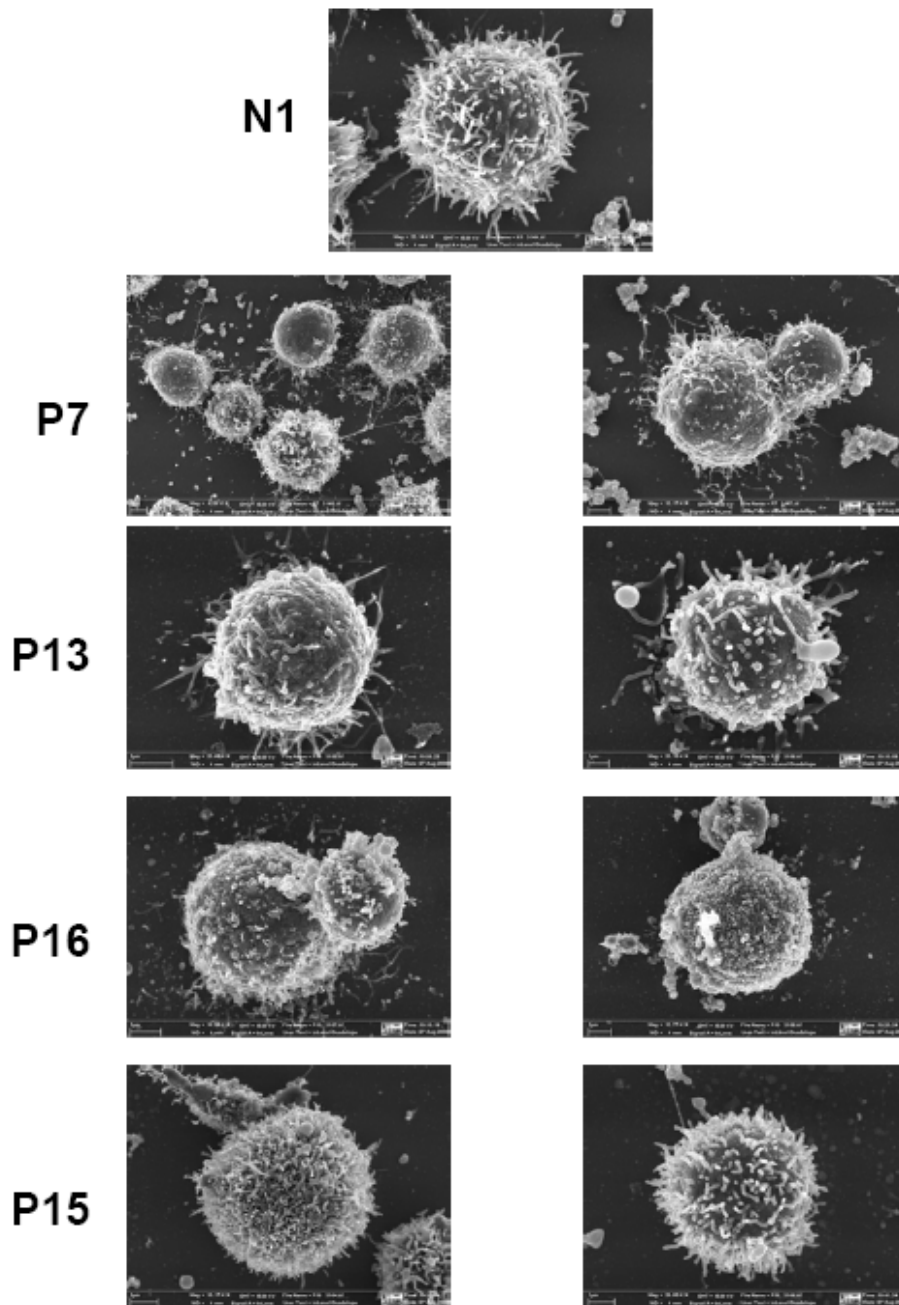


```
EMBOSS_001      58 atgagtgggggccaatgggaggaaggccccgggggcgaggagcaccagc      107
EMBOSS_001      95 ATGAGTGGGGGCCAATGGGAGGAAGGCCCGGGGCGGAGGAGCACCAGC      143
EMBOSS_001     108 ggttcagcagaacataccctccaccctcctccaggaccacgagaaccagc      157
EMBOSS_001     144 GGTTTCAGCAGAACATACCCTCCACCCTCCTCCAGGACCACGAGAACCAGC      193
```

**Figura 7.- Cromatograma correspondiente a los análisis genómicos de WAS de los pacientes P5, P13 y P7.-** La figura muestra resaltado en un rectángulo las mutaciones detectadas en los pacientes mencionados, con indicación del nucleótido esperado y el detectado en el análisis. El alineamiento corresponde a las secuencias de la región de interés obtenida en P7 alineada sobre la secuencia normal.

Las alteraciones en la superficie celular de los linfocitos con WAS constituyen una de las alteraciones más características del Síndrome (36-38), en la que las típicas microvellosidades presentes en la membrana celular siguiendo una distribución homogénea se encuentran profundamente alteradas o ausentes. No obstante, no ha sido abordado hasta el momento el estudio de las anomalías en las microvellosidades en pacientes con distinto fenotipo clínico, al objeto de comprobar si existe alguna correlación entre ambas variables.

Por tanto, las células procedentes de líneas aloespecíficas de un individuo normal y de los pacientes P7 (fenotipo WAS, severo); P13 (fenotipo WAS moderado); P16 (fenotipo XLT) y P15 (presentación clínica de WAS, sin alteraciones en la expresión ni mutaciones en el gen) fueron examinadas en el Microscopio Electrónico de Barrido. Las células representadas en la Figura 8 muestran una asociación entre las alteraciones de la superficie celular y el grado de severidad clínica, con profundas anormalidades en P7 y una superficie más conservada en P13 y P16. Es interesante señalar que P15, paciente con un cuadro compatible con WAS pero sin mutaciones demostradas, no pueden detectarse alteraciones llamativas en la superficie celular.

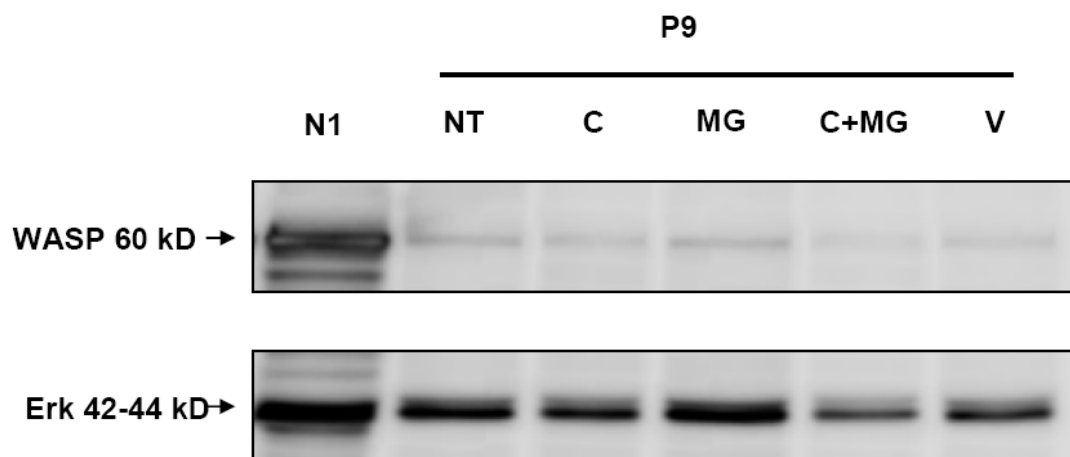


**Figura 8.- Examen por Microscopía Electrónica de Barrido de células T aloespecíficas normales y de pacientes con WAS.-** Microfotografías correspondientes a las células T de los pacientes indicados.

***Análisis de la expresión de WASP en líneas de pacientes con mutaciones que afectan a la zona de interacción WASP-WIP.***

Como se ha señalado en la introducción, las mutaciones que ocasionan un cambio de aminoácido en la zona de unión WASP-WIP provocan una disrupción en el acoplamiento de ambas proteínas (66), evitando la formación de este complejo. El resultado de ello es que el WASP libre no estaría protegido por la acción chaperona de WIP(70), por lo que en estas condiciones sería rápidamente degradado en el citoplasma celular por, entre otros efectores, la acción proteasa de la calpaína(79) y por una degradación acelerada en el proteasoma. En estas condiciones, nos propusimos evaluar si un inhibidor específico de la calpaína (Calpeptina) y dos del proteasoma (MG132 y Velcade) podrían restaurar los niveles de WASP.

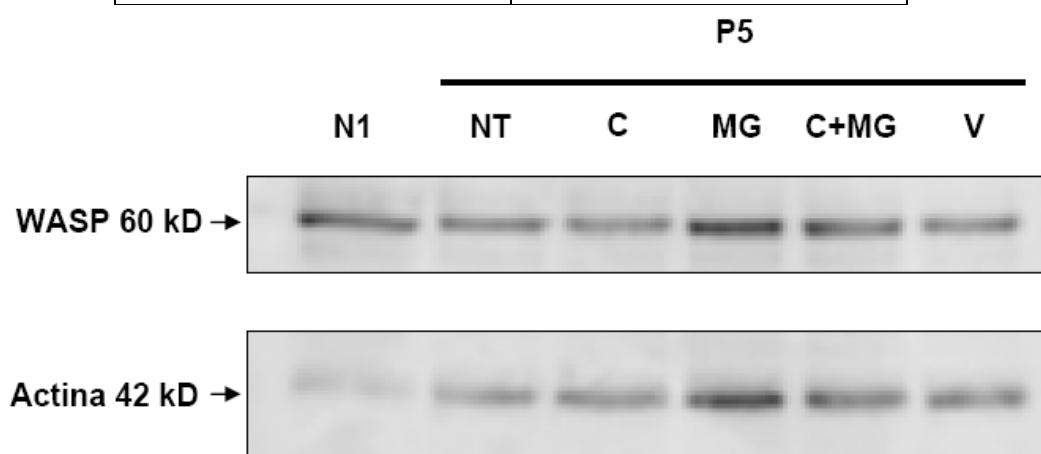
Para ello, identificamos en primer lugar en los pacientes de nuestra cohorte aquellos que cumplieran con los requisitos mencionados. Los pacientes P5, P9 y P13 tienen mutaciones que ocasionan la sustitución de un aminoácido en la zona de unión WASP-WIP, esto es, en la región EVH1. Por ello, las líneas celulares correspondientes fueron pretratadas durante 6 horas con los inhibidores mencionados y examinada la expresión de WASP mediante Western Blot cuantitativo y posterior densitometría al objeto de cuantificar la contribución de cada banda y las proporciones entre la expresión de WASP y su control de carga. Los resultados obtenidos se reflejan en las Figuras 9, 10 y 11 y las Tablas II, III y IV.



**Figura 9.- Western Blot cuantitativo de las células N1 (normales) y P9 tras el tratamiento con diferentes inhibidores.-** Las células P9 fueron pretratadas con Calpeptina; MG132; Calpeptina+MG132 o Velcade durante 6 horas y examinadas por Western Blot. La expresión de Erk fue usada como control de carga.

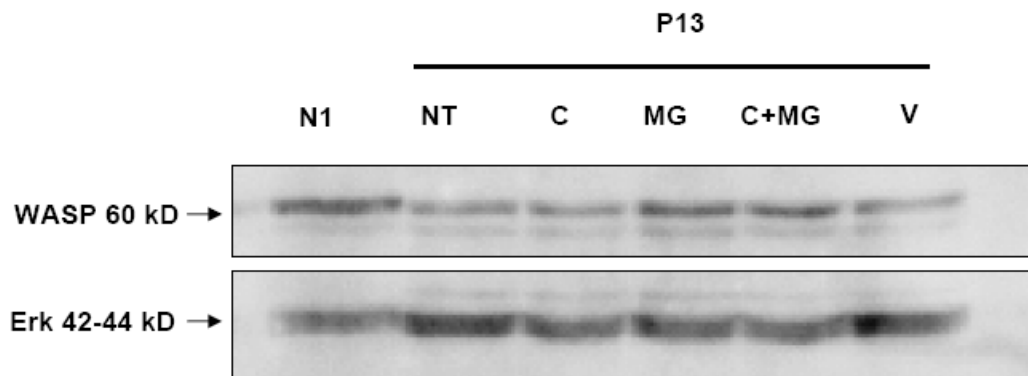
TABLA II  
Análisis densitométrico de los resultados obtenido en la  
Figura 9

Muestra	Proporción WASP/Erk
N1	0.76
P9	0.15
P9+Calpeptina	0.08
P9+MG132	0.07
P9+Calpeptina+MG132	0.07
P9+Velcade	0.07



**Figura 10.- Western Blot cuantitativo de las células N1 (normales) y P5 tras el tratamiento con diferentes inhibidores.-** Las células P9 fueron pretratadas con Calpeptina; MG132; Calpeptina+MG132 o Velcade durante 6 horas y examinadas por Western Blot. La expresión de actina fue usada como control de carga.

TABLA III	
Análisis densitométrico de los resultados obtenido en la Figura 9	
Muestra	Proporción WASP/Erk
N1	2.8
P5	0.71
P5+Calpeptina	0.66
P5+MG132	0.8
P5+Calpeptina+MG132	1.04
P5+Velcade	0.65



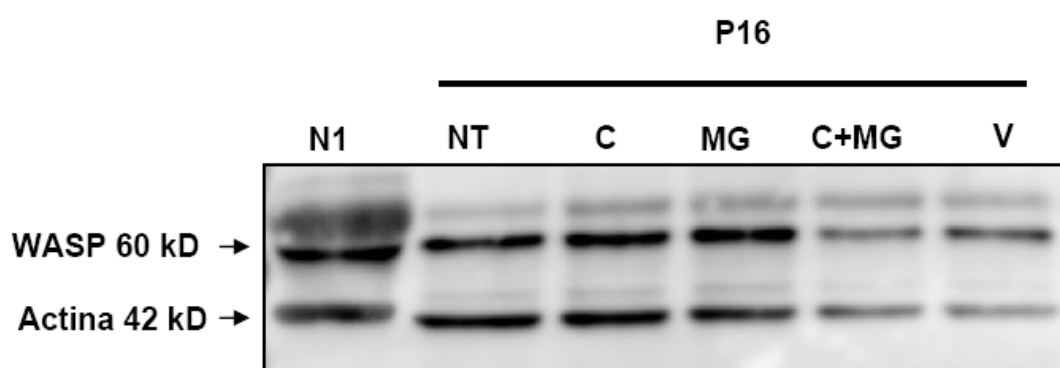
**Figura 11.- Western Blot cuantitativo de las células N1 (normales) y P13 tras el tratamiento con diferentes inhibidores.-** Las células P9 fueron pretratadas con Calpeptina; MG132; Calpeptina+MG132 o Velcade durante 6 horas y examinadas por Western Blot. La expresión de Erk fue usada como control de carga.

TABLA IV	
Análisis densitométrico de los resultados obtenido en la Figura 10	
Muestra	Proporción WASP/Erk
N1	0.84
P13	0.25
P13+Calpeptina	0.26
P13+MG132	0.79
P13+Calpeptina+MG132	0.65
P13+Velcade	0.30

Por tanto, puede comprobarse que el tratamiento con los inhibidores de la calpaína y el proteasoma no tiene efecto alguno sobre la expresión de WASP en P9, mientras que puede

observarse una acumulación de WASP intracitoplasmático en las células tratadas con MG132 (sólo o en combinación con Calpeptina) en los casos de P5 y P13.

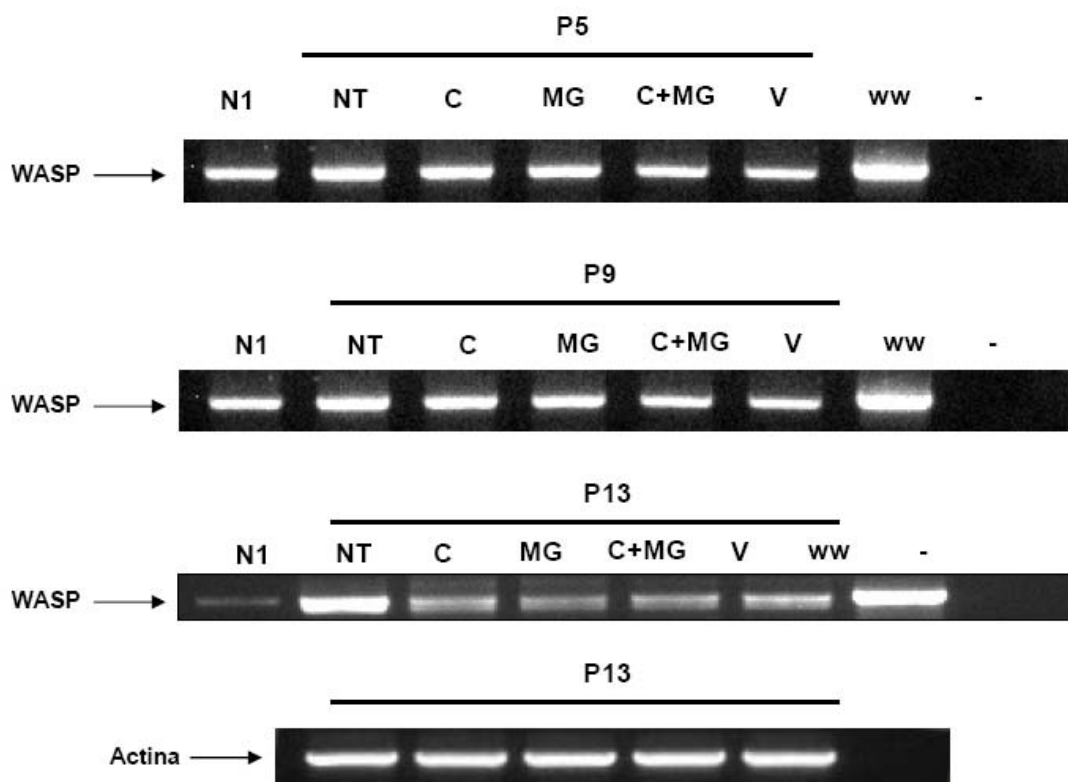
Al objeto de comprobar si el efecto observado en estas líneas de pacientes está ligado de manera específica a las mutaciones en la región EVH1 (zona de unión WASP/WIP), realizamos un análisis similar con células de P16, que portan una mutación fuera de la zona mencionada (XLT). En la Figura 11 y Tabla V puede comprobarse que el tratamiento con los agentes mencionados no afecta a la expresión de WASP en ninguna de las combinaciones empleadas.



**Figura 12.- Western Blot cuantitativo de las células N1 (normales) y P16 tras el tratamiento con diferentes inhibidores.-** Las células P9 fueron pretratadas con Calpeptina; MG132; Calpeptina+MG132 o Velcade durante 6 horas y examinadas por Western Blot. La expresión de Actina fue usada como control de carga.

TABLA V	
Análisis densitométrico de los resultados obtenidos en la Figura 11	
Muestra	Proporción WASP/Erk
N1	0.84
P16	0.70
P16+Calpeptina	0.68
P16+MG132	0.76
P16+Calpeptina+MG132	0.67
P16+Velcade	0.78

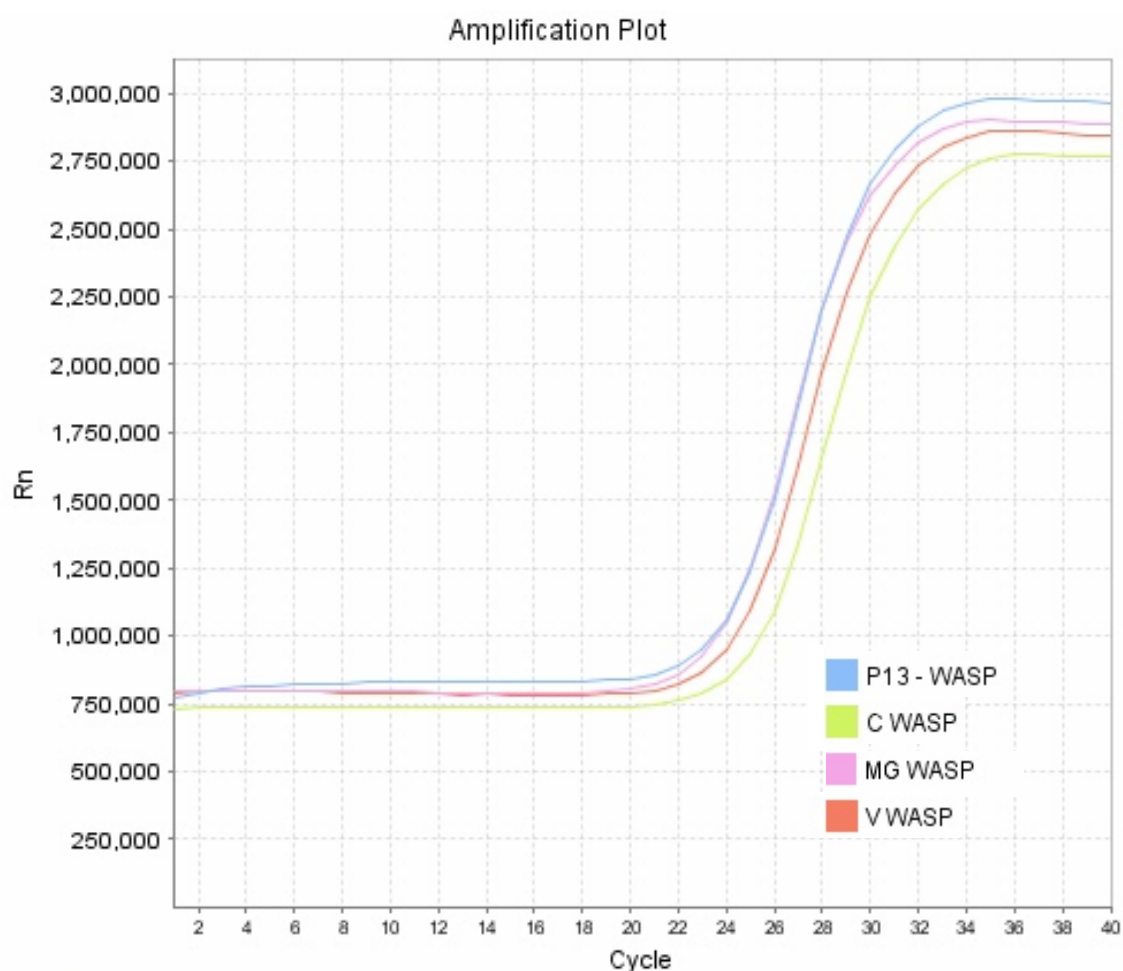
En este punto era importante determinar si este aumento en la expresión de WASP era consecuencia de una modificación en los patrones de transcripción, o si por el contrario, respondía exclusivamente a mecanismos de protección que prevenían su degradación intracitoplasmática. Para ello, obtuvimos ARN total de manera simultánea a las extracciones de lisados citoplasmáticos correspondientes a las células analizadas por Western Blot en las Figuras 8, 9 y 10, al objeto de estudiar en paralelo las modificaciones en la expresión de WASP y su transcripción. La retrotranscripción de este ARN y su posterior amplificación reveló que todos los pacientes tenían ARN de WASP en las células sin tratamiento, y que su nivel de transcripción se mantenía de manera constante en todos los tratamientos utilizados (Figura 11)



**Figura 13.- Amplificación por PCR de cantidades equivalentes de ARN retrotranscrito realizado en paralelo al análisis de la cuantificación de WASP por Western Blot.** Se realizaron PCRs de las células N1 y de los pacientes indicados en ausencia de tratamiento (NT) o tras la exposición a Calpeptina, MG132, Calpeptina+MG132 o Velcade. El control positivo WW corresponde a la amplificación de un plásmido conteniendo el cDNA de WAS.



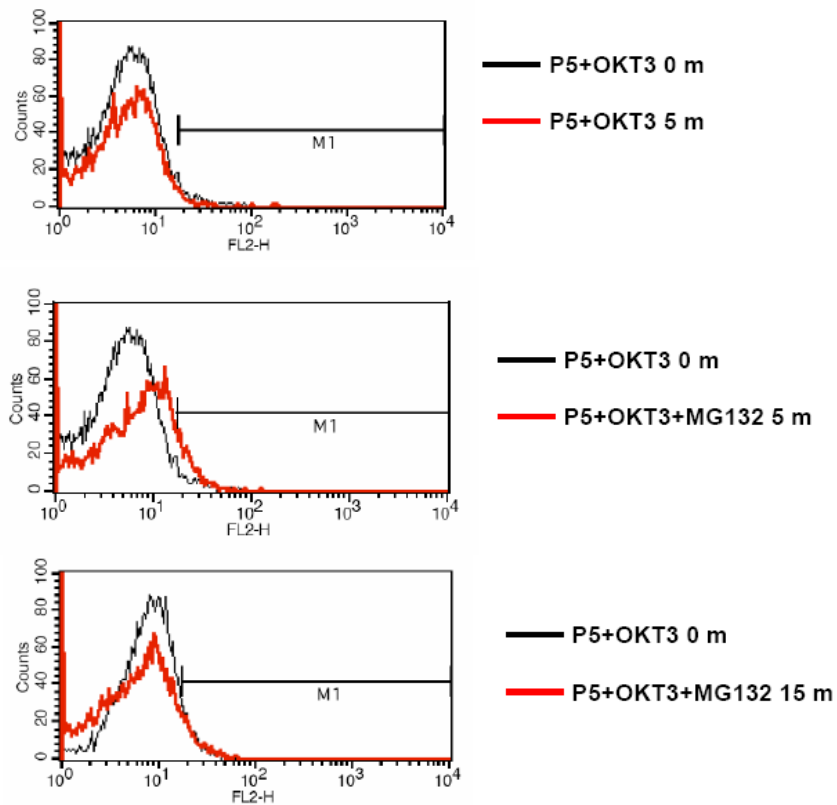
Al objeto de confirmar los datos obtenidos por PCR en los que se sugiere que la transcripción de WAS no es modificada por los tratamientos mencionados, realizamos una amplificación por PCR a tiempo real de las muestras indicadas en la figura anterior correspondientes a P13. La Figura 12 muestra estos resultados, en los que puede observarse que las pendientes de amplificación de las células sometidas a los distintos tratamientos son equivalentes, y que prácticamente no se observan desplazamientos significativos en los ciclos en los que se obtiene una amplificación similar.



**Figura 14.- Curvas de pendiente de la PCR a tiempo real de células de P13 sometidas a distintos tratamientos.-** Los ARN retrotranscritos de las células de P13 fueron amplificados mediante PCR a tiempo real con cebadores específicos. Línea azul: Células No Tratadas; Verde: Calpeptina; Violeta: MG132; Naranja: Velcade.

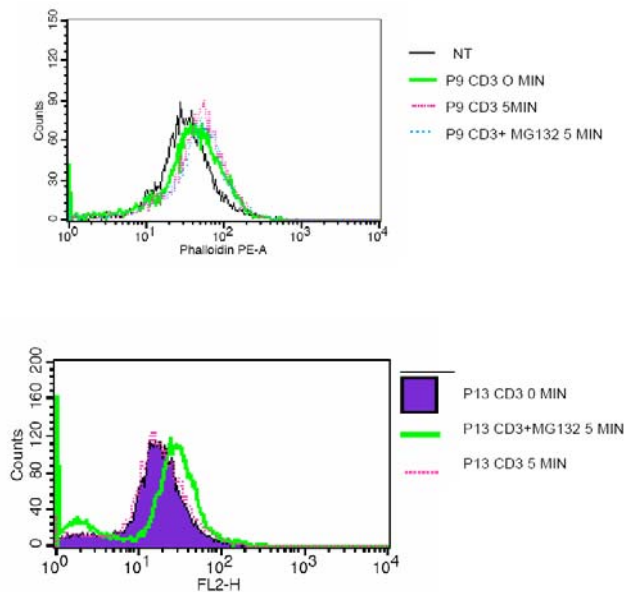
***Análisis funcional de las células de pacientes de WAS con mutaciones en el dominio EVH1 tras el tratamiento con inhibidores de la calpaína y el proteasoma.-*** Las células T de los pacientes con WAS presentan, entre otros, dos defectos típicos asociados a los mecanismos de respuesta tras la ocupación del complejo molecular TCR/CD3, y que afectan a la producción de IL-2 (43) y a la polimerización de actina (37). Por ello, nos propusimos analizar si el pre-tratamiento con inhibidores del proteasoma de las células de pacientes con mutaciones que dan lugar a un cambio de aminoácido en la región EVH1 (P5, P9 y P13) restauran, al menos parcialmente, los defectos observados en WAS. La elección de este agente se realizó en función de los datos obtenidos en los experimentos detallados en las Figuras 9-12 y sus correspondientes tablas, en las que se aprecia que la mayor capacidad para evitar la degradación intracitoplasmática de WASP corresponde a los inhibidores del proteasoma.

Para ello, analizamos en primer lugar la polimerización de actina en respuesta a estimulación mediada por CD3 mediante tinción celular con Phalloidina marcada con Rodamina, cuya intensidad de fluorescencia representa un índice fiel de la cantidad de F-actina presente en la célula (130). La Figura 15 muestra cómo las células T aloespecíficas procedentes del paciente P5 no polimerizan actina tras 5 minutos de estimulación por el anticuerpo OKT3. Sin embargo, estas células pretratadas con MG132 son capaces de inducir significativamente el paso de g-actina a f-actina en niveles comparables a los de las células normales. Esta polimerización es rápidamente reversible, siguiendo el comportamiento de las células de individuos normales, puesto que a los 15 m tras la estimulación los niveles de F-actina retornan a los niveles de las células en reposo.



**Figura 15.- Las células T aloespecíficas del paciente P5 pretradas con MG132 son capaces de polimerizar actina en respuesta a estimulación mediada por CD3.** Los histogramas del panel superior representan las células sin tratamiento a tiempos 0 y 5 minutos, el central las células tratadas a tiempos 0 y 5 minutos y el inferior a los 15 minutos.

Un análisis similar fue realizado en los otros dos pacientes que presentaban mutaciones en el dominio EVH1 que causaban un cambio de aminoácido (P9 y P13). La Figura 15 muestra que el tratamiento de las células T aloespecíficas de P9 con MG132 no restaura su capacidad para polimerizar actina (al igual que tampoco inducía su acumulación en el citoplasma) mientras que P13 sí que adquiere una significativa capacidad de polimerizar actina a los 5 minutos tras ocupación del complejo molecular TCR/CD3.



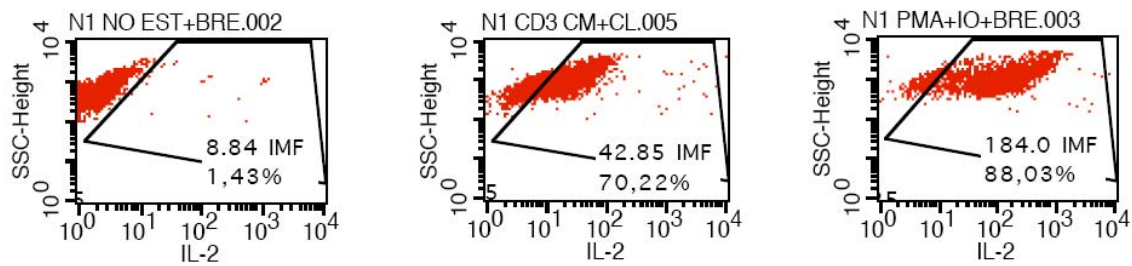
**Figura 16.- El tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132 restaura la capacidad de polimerizar actina de las células T de P13 pero no de P9.-** Las células T aloespecíficas de P13 pretratadas con MG132 adquieren la capacidad de polimerizar actina a los 5 minutos tras estimulación con OKT3, mientras que este agente no modifica la capacidad de polimerización de actina de las células de P9.

Con el objeto de confirmar los resultados funcionales observados anteriormente, analizamos la producción de IL-2 en respuesta a estimulación mediada por CD3, mediante tinción intracitoplasmática y posterior evaluación por citometría de flujo. Las células fueron estimuladas con PMA+Ionomicina al objeto de confirmar su capacidad de producción de IL-2 en condiciones de óptima estimulación.

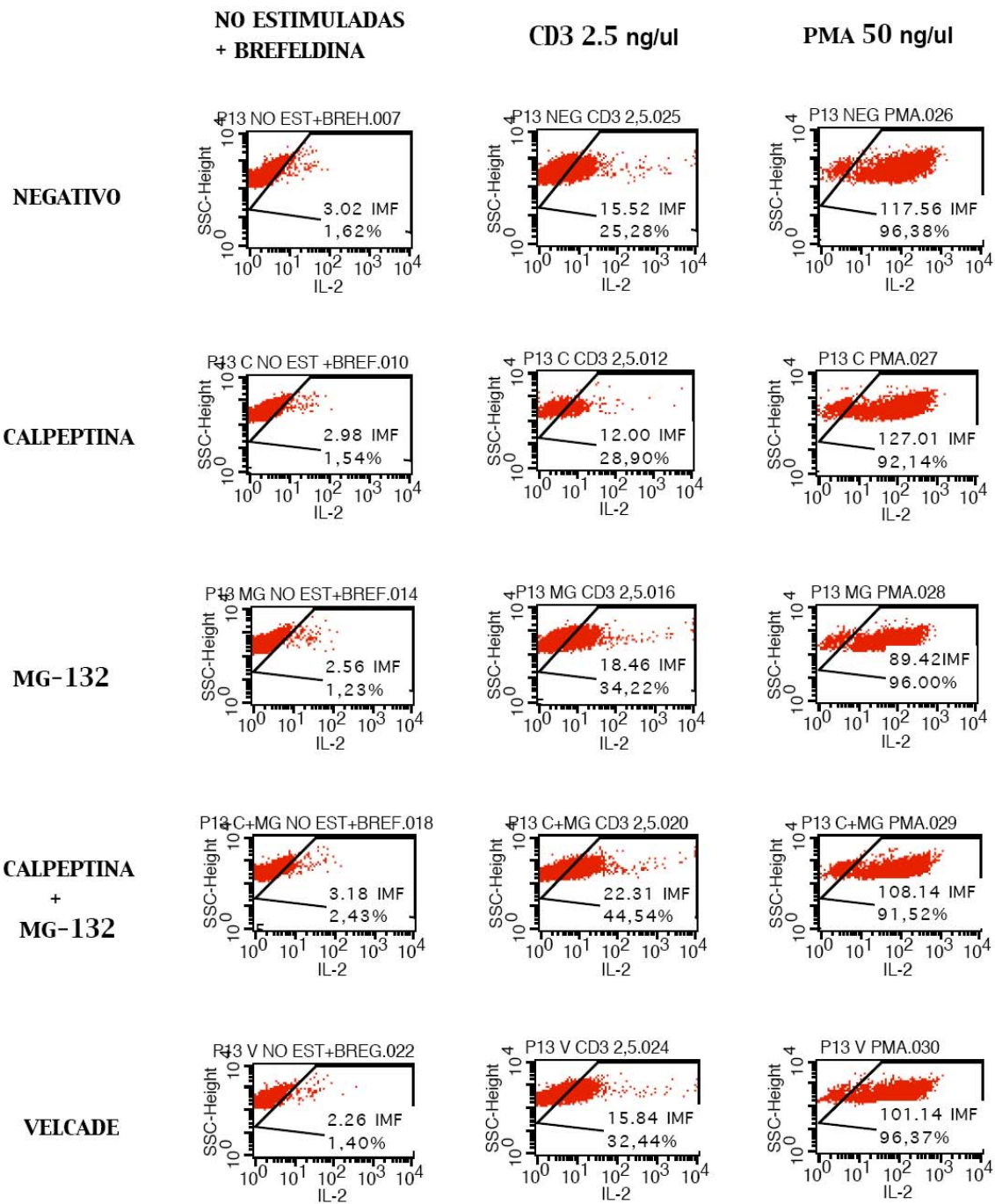
En la Figura 17 puede comprobarse cómo las células de N1 presentan una vigorosa respuesta de producción de IL-2 tras estimulación mediada por el anticuerpo OKT3. Esta producción, sin embargo, se encuentra disminuida en las células de P13 y P9, consistente con el defecto previamente descrito en las células de estos pacientes (43). No obstante, la alta dosis de anticuerpo necesaria en este sistema experimental tiende a enmascarar el defecto en la producción de IL-2, que resulta más evidente a dosis 10 veces menores y que tiende a equipararse a dosis similares a las utilizadas (2.5 µg/ml) (43, 122). No obstante, el pretratamiento de las células de P13 con el inhibidor del proteasoma MG132 induce no sólo

un aumento del porcentaje de células productoras de IL-2, sino que además se produce un aumento sustancial en la intensidad media de fluorescencia, indicativo de que no solamente una mayor proporción de células adquieren la capacidad de responder a CD3, sino que además producen una mayor cantidad de IL-2 por célula.

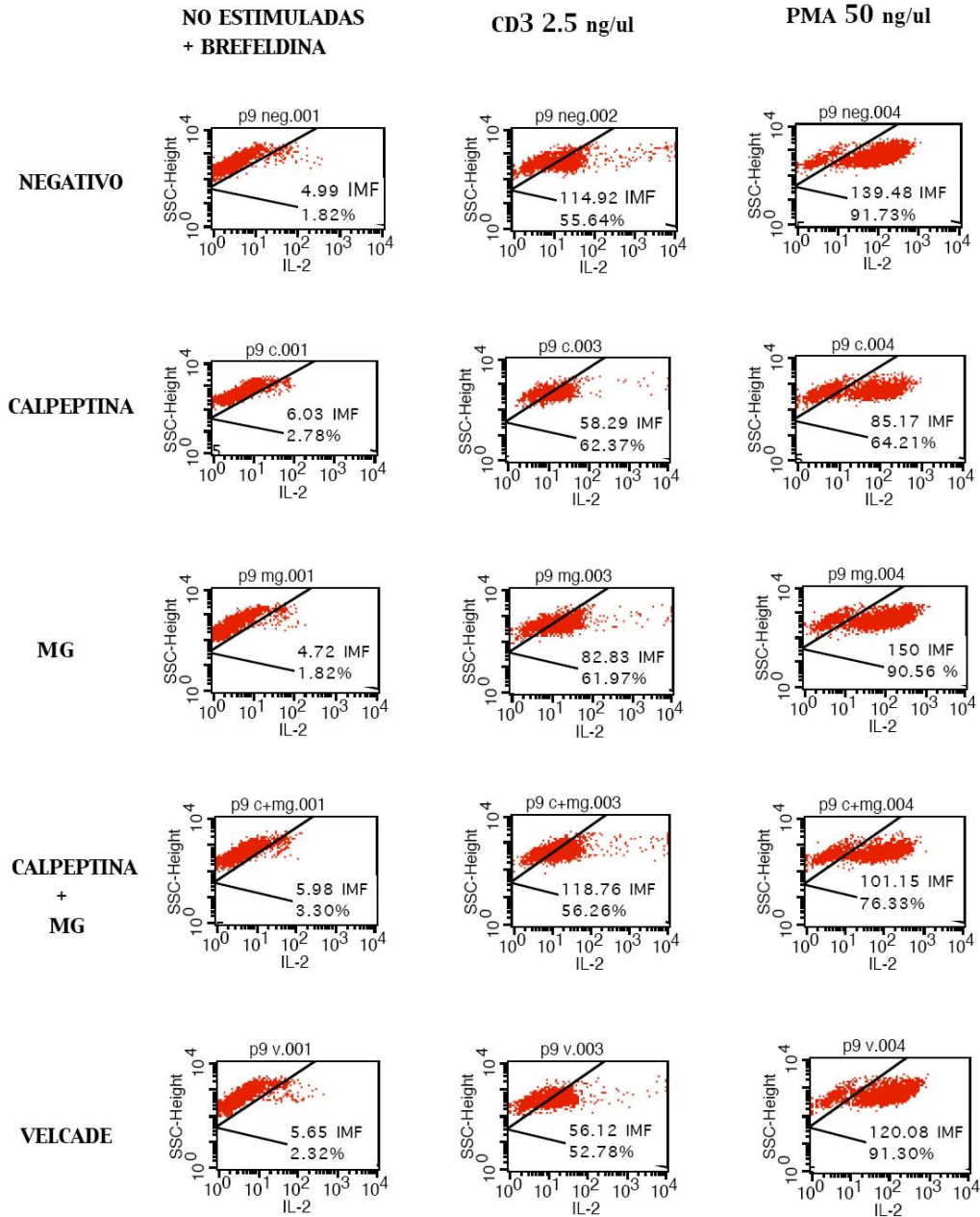
Esto no ocurre, sin embargo, en el caso de P9. La producción de IL-2 no se modifica tras el tratamiento con MG132, en consistencia con los resultados obtenidos en el análisis de la cantidad total de proteína intracitoplasmática o la capacidad de polimerización de actina a estimulación mediada por CD3.



**Figura 17.- Producción de IL-2 por células las células T aloespecíficas N1 derivadas de un individuo normal tras estimulación con OKT3.-** Las células N1 fueron estimuladas durante 6 h con el anticuerpo monoclonal OKT3 a una concentración de 2.5 µg/ml en presencia de brefeldina (panel central) o con PMA+Ionomycina (panel derecho). Las células fueron teñidas con un anticuerpo anti-IL-2 y analizadas por citometría de flujo. Se representan los valores de Intensidad Media de Fluorescencia de la población completa y los porcentajes comprendidos en la región indicada.



**Figura 18.- Producción de IL-2 por células las células T aloespecíficas P13 derivadas de un paciente con WAS tras estimulación con OKT3.-** Las células P13 fueron estimuladas durante 6 h con el anticuerpo monoclonal OKT3 a una concentración de 2.5 µg/ml en presencia de brefeldina (panel central) o con PMA+Ionomycina (panel derecho), pretratadas con los agentes indicados durante 6 h. Las células fueron teñidas con un anticuerpo anti-IL-2 y analizadas por citometría de flujo. Se representan los valores de Intensidad Media de Fluorescencia de la población completa y los porcentajes comprendidos en la región indicada.



**Figura 19.- Producción de IL-2 por células las células T aloespecíficas P9 derivadas de un paciente con WAS tras estimulación con OKT3.-** Las células P9 fueron estimuladas durante 6 h con el anticuerpo monoclonal OKT3 a una concentración de 2.5  $\mu$ g/ml en presencia de brefeldina (panel central) o con PMA+Ionomycina (panel derecho), pretratadas con los agentes indicados durante 6 h. Las células fueron teñidas con un anticuerpo anti-IL-2 y analizadas por citometría de flujo. Se representan los valores de Intensidad Media de Fluorescencia de la población completa y los porcentajes comprendidos en la región indicada.

## **DISCUSIÓN**



El síndrome de Wiskott-Aldrich es una inmunodeficiencia que puede presentar distintos fenotipos y grados de severidad debido a la diversidad de mutaciones que pueden ocurrir a lo largo del gen WAS. La determinación de la mutación que está causando la enfermedad constituye la base del consejo genético, el diagnóstico prenatal y en algunos casos, la predicción de la severidad de la enfermedad (13, 131). Sin embargo, los intentos para correlacionar fenotipos con genotipos específicos han provocado interpretaciones controvertidas, probablemente porque deben considerarse otras variantes. Así, mientras que la correlación con el genotipo es difícil de establecer, no lo es tanto con el proteotipo, puesto que aquellos pacientes que expresan una cantidad reducida de WASP sufren una enfermedad mucho menos severa que aquellos otros en los que WASP está completamente ausente (19). Esta situación hace que deba considerarse con cautela la indicación terapéutica del trasplante de médula ósea, puesto que las estrictas condiciones requeridas para su realización con éxito en esta enfermedad, así como sus complicaciones, hace que no sea posible su abordaje en un número importante de pacientes (96-98, 132). Esto hace que sea prioritaria la búsqueda de terapias paliativas con aplicación directa al mayor número de pacientes posible, teniendo en cuenta los condicionantes presentados de manera individual por las mutaciones responsables de la enfermedad en cada paciente.

Al inicio de nuestro trabajo, clasificamos a los pacientes basados en sus características clínicas, lo que nos permitió diferenciar a los pacientes con XLT de aquéllos que presentaban un fenotipo WAS clásico. Para definir en mayor detalle la naturaleza de cada mutación, no sólo mandamos a secuenciar el DNA genómico, sino que además examinamos el efecto de la mutación sobre la transcripción del RNA y los niveles de proteína WASP en los linfocitos de los pacientes. Asimismo, analizamos la morfología de las células T de los diferentes

pacientes WAS por microscopía electrónica de barrido (SEM), para comparar las microvellosidades de la superficie celular con las de las células T de individuos normales.

Los análisis por Western Blot son los más adecuados para determinar el efecto final de la mutación, porque nos da los niveles de proteína en las células de los pacientes independientemente de que la mutación afecte a la actividad del promotor, al procesamiento del ARN, o a la estabilidad de la proteína. Por ello, los primeros trabajos se centraron en determinar por Western Blot los niveles de proteína WASP en los 17 pacientes con síntomas clínicos de WAS y XLT con la idea de asociarlos al cuadro clínico que presentaban. En general observamos una correlación bastante buena entre los niveles de WASP y el cuadro clínico: Así, los pacientes P1, P4 y P7 donde no se detectó expresión de WASP, eran pacientes con WAS severo, mientras que los pacientes P5, P9, P13, P14 y P16 donde detectamos niveles de WASP disminuidos, eran pacientes con un cuadro de WAS moderado o XLT. Sin embargo, no en todos los casos pudimos observar esa correlación, ya que en P14, que a pesar de tener expresión disminuida de WASP presenta un cuadro clínico severo. De igual forma detectamos otros tres pacientes (P2, P3 y P15) con el cuadro clínico que se asemeja a WAS, pero donde los niveles de WASP eran normales (posteriormente demostramos por secuenciación que no había mutaciones en los exones del gen WAS). Por tanto, con estos resultados podemos concluir, que la severidad del cuadro clínico, está en relación con la expresión de la proteína, ya que cuando no se expresa el cuadro clínico es grave. Asimismo, la expresión de proteína truncada similarmente se correlaciona con un fenotipo clínico severo, pero en contraste, proteína normal residual es predictiva de una enfermedad moderada. Sin embargo, la correlación expresión de proteína-fenotipo no es absoluta y pacientes con proteína normal residual pueden desarrollar manifestaciones severas de la enfermedad, como en el caso de P14.

En los pacientes P2 y P3, hubo una expresión normal de WASP, son hermanos y ambos presentan un cuadro compatible de WAS. Sin embargo, la secuenciación del gen *WAS* salió sin alteración. Es interesante mencionar el hecho de que en su familia no hay antecedentes familiares de WAS, y en ellos se estableció que presentan una inmunodeficiencia primaria ligada al X, ya que tienen una hermana sana. Estos pacientes siguen en estudio.

El paciente P15 es un caso interesante ya que, se observó de manera consistente, una expresión aumentada de Erk, situación que nos hizo pensar, que quizá la alteración estaría en *WIP*. Sin embargo, al igual que en el caso de WASP, la expresión de *WIP* y la secuenciación del gen *WIP* estaban normales. Actualmente, estamos estudiando la posibilidad de que la alteración se encuentre en el gen *N-WASP*. Por tanto, tenemos tres casos de pacientes que presentan un cuadro clínico compatible con WAS y no lo son. P4 es un paciente con un síndrome de WAS clásico, no expresa WASP debido a una delección que provoca un codón de stop prematuro. P5 es un paciente con una mutación missense en el dominio EVH1. Mostró una expresión disminuida de WASP y clínicamente presenta XLT, lo cual corresponde al tipo de mutación. P7 tiene un cuadro clínico severo de WAS, compatible con la ausencia de expresión de WASP. Este paciente tiene un codón de stop prematuro que provoca una proteína truncada. P9 es un paciente que tiene una expresión disminuida de WASP, presenta una mutación missense en el dominio EVH1 y un fenotipo XLT moderado. P13 es un paciente que tiene una mutación missense en el dominio EVH1, tiene una expresión residual de WASP, y presenta un cuadro clínico de XLT.

P14 es un paciente que presenta un cuadro clínico muy agresivo de WAS, a pesar de presentar expresión baja de WASP. La mutación de este paciente se encuentra en un punto caliente que provoca XLT. Esto puede explicar el curso severo de la enfermedad. En este caso particular, observamos que también el tipo de mutación es importante en el fenotipo de WAS. En cuanto a P16 se trata de una niña, la cual presenta una mutación missense, y clínicamente presenta un cuadro clínico XLT benigno. Este es uno de los casos donde se presenta esta enfermedad en mujeres, debido a una inhibición del cromosoma X sano.

Lo que no se explica es cómo mutaciones que parecen tener efectos bioquímicos similares provocan tanta variabilidad en la severidad clínica. Lo que hasta ahora podemos argumentar es que podría deberse a que algunas mutaciones afectarían de manera variable la capacidad de WASP para interactuar con WIP. Sabemos que las mutaciones que afectan la interacción WASP/WIP provocan que WASP sea degradado por la calpaína y el proteasoma(70).

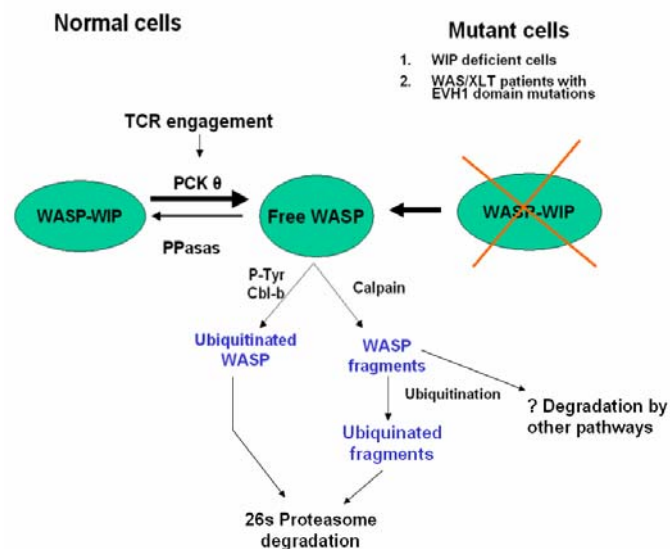
Una vez conocida la expresión de WASP y el tipo de mutación, el paso siguiente fue la SEM. La decisión de observar a las células T de individuos normales y células T WAS por SEM, fue debido a que se ha demostrado que el mecanismo patofisiológico responsable de WAS está relacionado con la polimerización de actina en las células hematopoyéticas. Una variedad de proyecciones sobre la superficie celular están basadas en la dinámica de la actina, éstas incluyen microvellosidades, lamelipodios, microespigas y filopodios (133). El hecho de que podamos asociar alteraciones en la superficie de los linfocitos T con la severidad del cuadro clínico podría ser relevante desde el punto de vista del pronóstico de la enfermedad, sea ésta WAS o alguna otra modalidad de IDP. Los análisis por SEM podrían dar información acerca de la robustez del citoesqueleto de las células de los pacientes. Así

cualquier defecto que afecte de alguna manera significativa a la rigidez y/o número de microvellosidades podría ser indicativo de defectos en la función de las células T.

Los hallazgos encontrados en la SEM, fueron interesantes. En el caso de P7 sus células T están prácticamente calvas, carecen de las microvellosidades que se observan en las células normales. Esto se correlaciona con la ausencia de expresión de WASP en sus células y el cuadro clínico tan grave (ver figura 8).

En cuanto a las células de P13, no se observaron diferencias en las microvellosidades con respecto a las células normales, y clínicamente presenta una XLT con expresión disminuida de WASP. Esto puede ser debido a que la mutación que presenta no altera la estabilidad de la proteína residual expresada, por lo cual puede, hasta cierto punto, cumplir con las funciones normales. En P15, a pesar de ser un paciente donde no se estableció el diagnóstico de WAS, las microvellosidades de sus células están alteradas, lo cual se correlaciona con la gravedad del cuadro clínico que presenta. Podemos concluir que la IDP que sufre y que hasta ahora ignoramos a qué se debe, altera la dinámica de la actina que produce las microvellosidades de la superficie celular. Observando esto y debido a que N-WASP también está involucrada en la formación de filopodios (134), buscaremos si hay alguna alteración en esta proteína. Por otro lado, es llamativo el hecho de que P16 es, de todos los pacientes registrados, el que tiene el cuadro clínico más benigno, y la imagen obtenida de sus linfocitos por SEM muestra que están muy peludos, es decir, la cantidad de proteína que expresa es suficiente para mantener la superficie celular en un estado adecuado. Por lo tanto, podemos concluir, que además del tipo de mutación y de si se expresa o no WASP, la presencia o no de las microvellosidades va a estar directamente relacionado con la severidad del cuadro clínico.

Una vez conocido el tipo de mutación, el paso siguiente fue elegir a aquéllos que presentarían mutaciones missense en el dominio EVH1, sitio de interacción WASP/WIP. De todos los pacientes estudiados (17 en total), sólo tres presentaron este tipo de mutación. Estos fueron P5, P9 y P13. Todos ellos manifestaban clínicamente XLT. Dado que las mutaciones que alteran la unión de WASP con WIP ocasionan que WASP sea degradado por la calpaína y ubiquitinizado al proteosoma, cualquier droga que específicamente bloquee la actividad de esta enzima y del proteosoma podría ser de potencial aplicación en terapia paliativa de WAS. (Ver figura 14). Con esta idea nos propusimos estudiar el efecto de diferentes inhibidores en los niveles de WASP de las células de estos pacientes. Las mutaciones que alteran la unión de WASP con WIP ocasionan que WASP sea degradado por la calpaína y ubiquitinizado al proteosoma, ya que WASP se encuentra libre. (Ver figura 5). Las células de estos pacientes fueron sometidas al tratamiento con los inhibidores de la calpaína, la calpeptina, y con inhibidores del proteosoma, el MG132 y el Velcade.



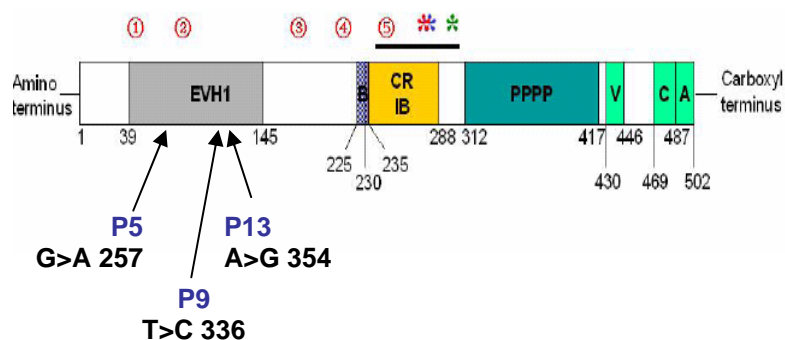
**Figura 20. Representación esquemática de la susceptibilidad de WASP a ser degradado por la calpaína o por el proteosoma al encontrarse libre de WIP.** También se muestra que en las células con mutaciones que alteran la expresión de WIP o la unión de WIP con WASP presentarán altos niveles de WASP libre y por tanto será degradado por la calpaína y el proteosoma. (70).

Cuando se trataron las células del paciente P9, los resultados fueron negativos. Sus linfocitos, presentaban una expresión basal de WASP del 19.7% (0.15) con respecto a la expresión en linfocitos de individuos sanos (0.76). Al ser preincubadas durante 6 horas con la calpeptina, lejos de aumentar la expresión de WASP, ésta disminuyó (0.08), lo mismo ocurrió con el MG132 (0.07), con la preincubación de ambos inhibidores (0.07) y con la preincubación con velcade (0.07). (Ver tabla II)

En el caso del paciente P5, sus linfocitos, presentaban una expresión residual de WASP del 25% (0.71) con respecto a la expresión en linfocitos de individuos sanos (2.8). Al ser preincubadas durante 6 horas con la calpeptina, no se observó un aumento de la expresión de WASP (0.66). Sin embargo, cuando se preincubaron con MG132, hubo un ligero incremento de la expresión al 28% (0.80). Al preincubarse las células con ambos inhibidores (calpeptina y MG132), el aumento fue un poco mayor, del 37% (1.04). Cuando se preincubaron con velcade, no hubo aumento de la expresión de WASP (0.65). (Ver tabla III)

En el caso de P13, sus linfocitos, presentaban una expresión basal de WASP del 29.7% (0.25) con respecto a la expresión en linfocitos de individuos sanos (0.84). Al ser preincubadas durante 6 horas con la calpeptina, no se observó un aumento de la expresión de WASP (0.26). Sin embargo, con la preincubación con MG132, hubo un incremento significativo de la expresión de WASP al 94% (0.79). Al preincubarse las células con ambos inhibidores (calpeptina y MG132), el aumento fue un poco menor, del 77% (0.65). Cuando se preincubaron con Velcade, no hubo aumento de la expresión de WASP (0.3). (Ver tabla IV)

Aquí cabe preguntar por qué las células de unos pacientes sí responden y otras no, ya que los tres presentan mutaciones missense en el dominio EVH1. Esto se debe seguramente a que estas mutaciones se encuentran en sitios diferentes. (Ver figura 6).



**Figura 21.** Representación esquemática de los sitios de mutación de P5, P9 y P13.

Sin embargo, llama la atención el hecho de la disparidad de la respuesta a los inhibidores entre P9 y P13, ya que las mutaciones missense del gen *WAS* se encuentran muy cerca, y P9 no responde al tratamiento. Por lo tanto, a pesar de haberse detectado solamente esta mutación en el dominio EVH1 del gen *WAS* en P9, la ausencia de respuesta al tratamiento podría explicarse bien por la presencia de otras mutaciones fuera de las regiones analizadas (por ejemplo en la región promotora o en la región no traducida en 3' (3'UTR)) o porque esta mutación en concreto altere de forma más significativa la estabilidad de la proteína. Otra explicación posible sería que quizá estas células tienen una sensibilidad aumentada a los inhibidores, ya que después de la incubación con todos los tratamientos, se observó un decremento significativo de la expresión residual de WASP. Sabemos que estos fármacos son citotóxicos.

Otra cuestión, es explicar por qué hay un aumento en la expresión de WASP únicamente al preincubarse las células con el MG132 y no con la calpeptina. Esto podría deberse probablemente a que la mayoría de WASP libre es ubiquitinizado al proteasoma; pero como tampoco responden con el Velcade, la explicación más probable sería que tanto la calpeptina como el Velcade, son excesivamente tóxicos, ya que matan a un gran número de células



durante la incubación.

Ahora bien, para saber si el aumento de esta expresión se debe al procesamiento del ARN, o a la estabilidad de la proteína, realizamos PCR. En todos los casos (P5, P9 y P13), el RNA mensajero se mantuvo estable, por lo tanto no hay cambios en la transcripción ni en la traducción, sino en la estabilidad de la proteína en el citoplasma. No obstante, este sistema de PCR es poco confiable, por lo que procedimos a realizar PCR a tiempo real en P13. Se realizaron en células sin tratar, tratadas con calpeptina, con MG132 y con Velcade. Se observó un aumento de la expresión prácticamente al mismo tiempo en todos los casos, exceptuando por un poco de retraso en el caso de las células tratadas con calpeptina, debido quizá a la citotoxicidad de este agente. Esto confirma el hecho de que el aumento de expresión de WASP se debe a un incremento en la estabilidad de la proteína en el citoplasma. Ya que WASP media la polimerización de actina y la producción de IL-2, lo siguiente fue comprobar si este aumento en la expresión de WASP producía una reconstitución funcional parcial de las células T WAS, a través de la polimerización de actina y de la producción de la IL-2.

En la polimerización de actina, en P13 después de la preincubación con los inhibidores y de la estimulación con el anticuerpo OKT3 durante 5 y 15 minutos, se observó un aumento en la polimerización de actina en las células que habían sido tratadas con el MG132, con respecto a las células no tratadas, más no en las tratadas exclusivamente con calpeptina, pero sí en las tratadas con ambos inhibidores. Esto posiblemente se debe a la toxicidad de la calpeptina ya observada también en los otros experimentos.

Con P5 obtuvimos un resultado similar al de P13, ya que hubo aumento de la polimerización

de actina en las células que fueron tratadas previamente con el MG132 después de la estimulación con OKT3 durante 5 y 15 minutos. Sin embargo, este aumento tampoco se observó en las células tratadas con calpeptina.

En el caso de P9, no obtuvimos ninguna respuesta, lo cual era de esperarse, ya que tampoco hubo un aumento de la expresión de WASP con la preincubación con los inhibidores.

En el caso de la producción de IL-2 no obtuvimos ninguna respuesta en ningún tipo de células con ningún tratamiento. Por lo tanto, podemos concluir con estos resultados, que si bien, con el tratamiento con inhibidores hay un aumento considerable de la expresión de WASP en P5 y P13, y este aumento de expresión provoca un aumento adecuado de la polimerización de actina, no es suficiente para lograr una producción de IL-2, lo cual es indispensable en la función de los linfocitos T, como factor de crecimiento. Por lo tanto concluimos, que si bien, estos tratamientos parecen ser prometedores, todavía falta mucho por hacer, ya que la reconstitución funcional del linfocito T WAS, sólo se logra de manera parcial, lo cual no sería suficiente para restaurar *in vivo* la respuesta inmune mediada por el linfocito T, ya que no se logra la producción necesaria de IL-2. Quizá bajando la toxicidad de estos inhibidores, se podría obtener un resultado más alentador, u obteniendo otro tipo de fármacos que no sean tan tóxicos. También creo que falta mucho por conocer sobre la biología del complejo WASP/WIP, por el hecho de que en situaciones donde hay expresión residual de proteína, se pueden presentar casos severos. Dado las infecciones recurrentes que presentan estos pacientes, las hemorragias, las complicaciones que se pueden presentar con el trasplante de médula ósea, entre otros, creo que vale la pena incursionar en el estudio de tratamientos paliativos, que permitan una mejora de la calidad de vida de estos pacientes.

## **CONCLUSIONES**

- 1.- Hemos caracterizado molecularmente una cohorte de 11 pacientes con el Síndrome de Wiskott-Aldrich, encontrando un amplio rango de mutaciones que dan lugar a distintos grados de la enfermedad. No existe una correlación entre el fenotipo clínico y el genotipo, pero sí con el proteotipo.
- 2.- Hemos registrado tres casos de pacientes con cuadros clínicos compatibles con WAS en los que, sin embargo, no ha sido posible encontrar mutaciones en el gen *WAS* ni alteraciones en el nivel de expresión de su proteína.
- 3.- El inhibidor del proteasoma MG132 produce una acumulación de WASP intracitoplasmático en dos de los tres pacientes con mutaciones que dan lugar a un cambio de aminoácido en el dominio EVH1. La calpeptina, inhibidor de la calpaína, no tiene efecto por sí misma, pero sí coadyuva al del MG132.
- 4.- Ninguno de los agentes estudiados induce modificaciones a nivel de la transcripción del gen *WAS*.
- 5.- El MG132 restaura, en los dos pacientes en los que modula la acumulación intracitoplasmática de WASP, los defectos funcionales a estimulación mediada por CD3: polimerización de actina y producción de IL-2.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, Hammarström L, Shigeaki S, Nonoyama S, Ochs HD, Puck J, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. 2007. The International Union of Immunological Societies (IUIS) Primary Immunodeficiency Diseases (PID) Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol* 120: 776-94
2. Eades-Perner AM, Gathmann B, Knerr V, Guzman D, Veit D, Kindle G, Grimbacher B. 2007. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2004-06. *Clin Exp Immunol* 147: 306-12
3. Guzman D, Veit D, Knerr V, Kindle G, Gathmann B, Eades-Perner AM, Grimbacher B. 2007. The ESID Online Database network. *Bioinformatics* 23: 654-5
4. Knerr V, Grimbacher B. 2007. Primary immunodeficiency registries. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7: 475-80
5. Maródi L, Notarangelo LD. 2007. Immunological and genetic bases of new primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol* 7: 851-61
6. Hu H, Gatti RA. 2008. New approaches to treatment of primary immunodeficiencies: fixing mutations with chemicals. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8: 540-6
7. Gennery AR, Cant AJ. 2008. Advances in hematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency. *Immunol Allergy Clin North Am* 28: 439-56, x-xi
8. Wiskott A. 1937. Familiärer, angeborener Morbus Werlhofii? *Monatsschr Kinderheilkd* 68: 212-6

9. Aldrich RA SA, Campell DC. . 1954. Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. . *Pediatrics* 13: 133-9
10. Derry JM, Ochs HD, Francke U. 1994. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 79: following 922
11. Binder V, Albert MH, Kabus M, Bertone M, Meindl A, Belohradsky BH. 2006. The genotype of the original Wiskott phenotype. *N Engl J Med* 355: 1790-3
12. Ochs HD, Thrasher AJ. 2006. The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 117: 725-38; quiz 39
13. Jin Y, Mazza C, Christie JR, Giliani S, Fiorini M, Mella P, Gandellini F, Stewart DM, Zhu Q, Nelson DL, Notarangelo LD, Ochs HD. 2004. Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood* 104: 4010-9
14. Schurman SH, Candotti F. 2003. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 15: 446-53
15. Shcherbina A, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. 1999. WASP levels in platelets and lymphocytes of wiskott-aldrich syndrome patients correlate with cell dysfunction. *J Immunol* 163: 6314-20
16. Zhu Q, Watanabe C, Liu T, Hollenbaugh D, Blaese RM, Kanner SB, Aruffo A, Ochs HD. 1997. Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia: WASP gene mutations, protein expression, and phenotype. *Blood* 90: 2680-9
17. Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, Yata J, Mizutani S, Ochs HD, Nonoyama S. 2004. Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood* 103: 456-64

18. Humblet-Baron S, Sather B, Anover S, Becker-Herman S, Kasprovicz DJ, Khim S, Nguyen T, Hudkins-Loya K, Alpers CE, Ziegler SF, Ochs H, Torgerson T, Campbell DJ, Rawlings DJ. 2007. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis. *J Clin Invest* 117: 407-18
19. Lutskiy MI, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. 2005. Genotype-phenotype linkage in the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Immunol* 175: 1329-36
20. Zhu Q, Zhang M, Blaese RM, Derry JM, Junker A, Francke U, Chen SH, Ochs HD. 1995. The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood* 86: 3797-804
21. Villa A, Notarangelo L, Macchi P, Mantuano E, Cavagni G, Brugnani D, Strina D, Patrosso MC, Ramenghi U, Sacco MG, et al. 1995. X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in the WASP gene. *Nat Genet* 9: 414-7
22. Thrasher AJ, Kinnon C. 2000. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Exp Immunol* 120: 2-9
23. Ochs HD. 2002. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Isr Med Assoc J* 4: 379-84
24. Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO, Calle Y, Worth A, Kempinski H, Burns S, Jones GE, Sinclair J, Kinnon C, Hann IM, Gale RE, Linch DC, Thrasher AJ. 2006. Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood* 108: 2182-9
25. Notarangelo LD, Miao CH, Ochs HD. 2008. Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol* 15: 30-6
26. Moulding DA, Blundell MP, Spiller DG, White MR, Cory GO, Calle Y, Kempinski H, Sinclair J, Ancliff PJ, Kinnon C, Jones GE, Thrasher AJ. 2007. Unregulated actin



- polymerization by WASp causes defects of mitosis and cytokinesis in X-linked neutropenia. *J Exp Med* 204: 2213-24
27. Sullivan KE, Mullen CA, Blaese RM, Winkelstein JA. 1994. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr* 125: 876-85
  28. Remold-O'Donnell E, Rosen FS. 1990. Sialophorin (CD43) and the Wiskott-Aldrich syndrome. *Immunodefic Rev* 2: 151-74
  29. Puck JM, Candotti F. 2006. Lessons from the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med* 355: 1759-61
  30. Dupuis-Girod S, Medioni J, Haddad E, Quartier P, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, de Saint Basile G, Delaunay J, Schwarz K, Casanova JL, Blanche S, Fischer A. 2003. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics* 111: e622-7
  31. Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S, Panaroni C, Martino S, Notarangelo LD, Baz Z, Metin A, Cattaneo F, Villa A, Aiuti A, Battaglia M, Roncarolo MG, Dupre L. 2007. WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *J Exp Med* 204: 369-80
  32. Maillard MH, Cotta-de-Almeida V, Takeshima F, Nguyen DD, Michetti P, Nagler C, Bhan AK, Snapper SB. 2007. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 204: 381-91
  33. Meyer-Bahlburg A, Becker-Herman S, Humblet-Baron S, Khim S, Weber M, Bouma G, Thrasher AJ, Batista FD, Rawlings DJ. 2008. Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency in B cells results in impaired peripheral homeostasis. *Blood* 112: 4158-69
  34. Westerberg LS, de la Fuente MA, Wermeling F, Ochs HD, Karlsson MC, Snapper SB, Notarangelo LD. 2008. WASP confers selective advantage for specific

- hematopoietic cell populations and serves a unique role in marginal zone B-cell homeostasis and function. *Blood* 112: 4139-47
35. Binks M, Jones GE, Brickell PM, Kinnon C, Katz DR, Thrasher AJ. 1998. Intrinsic dendritic cell abnormalities in Wiskott-Aldrich syndrome. *Eur J Immunol* 28: 3259-67
  36. Kenney D, Cairns L, Remold-O'Donnell E, Peterson J, Rosen FS, Parkman R. 1986. Morphological abnormalities in the lymphocytes of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 68: 1329-32
  37. Gallego MD, Santamaria M, Pena J, Molina IJ. 1997. Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation. *Blood* 90: 3089-97
  38. Molina IJ, Kenney DM, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. 1992. T Cell Lines Characterize Events in the Pathogenesis of the Wiskott-Aldrich Syndrome. *J Exp Med* 176: 867-74
  39. Ochs HD, Slichter SJ, Harker LA, Von Behrens WE, Clark RA, Wedgwood RJ. 1980. The Wiskott-Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood* 55: 243-52
  40. Rawlings SL, Crooks GM, Bockstoce D, Barsky LW, Parkman R, Weinberg KI. 1999. Spontaneous apoptosis in lymphocytes from patients with Wiskott-Aldrich syndrome: correlation of accelerated cell death and attenuated bcl-2 expression. *Blood* 94: 3872-82
  41. Blaese RM, Strober W, Brown RS, Waldmann TA. 1968. The Wiskott-Aldrich syndrome. A disorder with a possible defect in antigen processing or recognition. *Lancet* 1: 1056-61
  42. Blaese RM, Strober W, Waldmann TA. 1975. Immunodeficiency in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser* 11: 250-4

43. Molina IJ, Sancho J, Terhorst C, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. 1993. T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses. *J Immunol* 151: 4383-90
44. Kwan SP, Lehner T, Hagemann T, Lu B, Blaese M, Ochs H, Wedgwood R, Ott J, Craig IW, Rosen FS. 1991. Localization of the gene for the Wiskott-Aldrich syndrome between two flanking markers, TIMP and DXS255, on Xp11.22-Xp11.3. *Genomics* 10: 29-33
45. Wengler G, Gorlin JB, Williamson JM, Rosen FS, Bing DH. 1995. Nonrandom inactivation of the X chromosome in early lineage hematopoietic cells in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 85: 2471-7
46. Parolini O, Ressmann G, Haas OA, Pawlowsky J, Gadner H, Knapp W, Holter W. 1998. X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. *N Engl J Med* 338: 291-5
47. Lutskiy MI, Sasahara Y, Kenney DM, Rosen FS, Remold-O'Donnell E. 2002. Wiskott-Aldrich syndrome in a female. *Blood* 100: 2763-8
48. Andreu N, Pujol-Moix N, Martinez-Lostao L, Oset M, Muniz-Diaz E, Estivill X, Volpini V, Fillat C. 2003. Wiskott-Aldrich syndrome in a female with skewed X-chromosome inactivation. *Blood Cells Mol Dis* 31: 332-7
49. Ma L, Rohatgi R, Kirschner M. 1998. The Arp2y3 complex mediates actin polymerization induced by the small GTP-binding protein Cdc42. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15362-7
50. Stewart DM, Treiber-Held S, Kurman CC, Facchetti F, Notarangelo LD, Nelson DL. 1996. Studies of the expression of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *J Clin Invest* 97: 2627-34

51. Miki H, Miura k, Takenawa T. 1996. N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO* 15: 5326-35
52. Badour K, Zhang J, Siminovitch KA. 2003. The Wiskott-Aldrich syndrome protein: forging the link between actin and cell activation. *Immunol Rev* 192: 98-112
53. Badour K, Zhang J, Siminovitch KA. 2004. Involvement of the Wiskott-Aldrich syndrome protein and other actin regulatory adaptors in T cell activation. *Semin Immunol* 16: 395-407
54. Burns S, Cory GO, Vainchenker W, Thrasher AJ. 2004. Mechanisms of WASp-mediated hematologic and immunologic disease. *Blood* 104: 3454-62
55. Notarangelo LD, Mori L. 2005. Wiskott-Aldrich syndrome: another piece in the puzzle. *Clin Exp Immunol* 139: 173-5
56. Kolluri R, Toliaas KF, Carpenter CL, Rosen FS, Kirchhausen T. 1996. Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase Cdc42. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5615-8
57. Badour K, McGavin MK, Zhang J, Freeman S, Vieira C, Filipp D, Julius M, Mills GB, Siminovitch K. 2007. Interaction of the Wiskott–Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required for CD28 endocytosis and cosignaling in T cells. *PNAS* 104: 1593-8
58. Quilliam LA, Lambert QT, Mickelson-Young LA, Westwick JK, Sparks AB, Kay BK, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Der CJ. 1996. Isolation of a NCK-associated kinase, PRK2, an SH3-binding protein and potential effector of Rho protein signaling. *J Biol Chem* 271: 28772-6
59. Badour K, Zhang J, Shi F, McGavin MK, Rampersad V, Hardy LA, Field D, Siminovitch KA. 2003. The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of

- CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity* 18: 141-54
60. Kim AS, Kakalis LT, Abdul-Manan N, Liu GA, Rosen MK. 2000. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* 404: 151-8
  61. Millard TH, Sharp SJ, L.L. M. 2004. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp 2/3 complex. *Biochem J* 380: 1-17
  62. Anton IM, Jones GE. 2006. WIP: a multifunctional protein involved in actin cytoskeleton regulation. *Eur J Cell Biol* 85: 295-304
  63. Symons M, Derry JM, Karlak B, Jiang S, Lemahieu V, McCormick F, Francke U, Abo A. 1996. Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84: 723-34
  64. Torres E, Rosen MK. 2003. Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP. *Mol Cell* 11: 1215-27
  65. Ramesh N, Anton IM, Hartwig JH, Geha RS. 1997. WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14671-6
  66. Stewart DM, L. T, Nelson DL. 1999. Mutations That Cause the Wiskott-Aldrich Syndrome Impair the Interaction of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) with WASP Interacting Protein. *J Immunol* 162: 5019-24
  67. Machesky LM, Insall RH. 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 8: 1347-56

68. Luthi JN, Gandhi MJ, Drachman JG. 2003. X-linked thrombocytopenia caused by a mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) gene that disrupts interaction with the WAS protein (WASP)-interacting protein (WIP). *Exp Hematol* 31: 150-8
69. Anton IM, Jones GE, Wandosell F, Geha R, Ramesh N. 2007. WASP-interacting protein (WIP): working in polymerisation and much more. *Trends Cell Biol* 17: 555-62
70. de la Fuente MA, Sasahara Y, Calamito M, Anton IM, Elkhali A, Gallego MD, Suresh K, Siminovitch K, Ochs HD, Anderson KC, Rosen FS, Geha RS, Ramesh N. 2007. WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 926-31
71. Antón IM, Lu W, Mayer BJ, Ramesh N, Geha RS. 1998. The Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP) binds to the adaptor protein Nck. *J Biol Chem* 273: 20992-5
72. Konno A, Kirby M, Anderson SA, Schwartzberg PL, Candotti F. 2007. The expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is dependent on WASP-interacting protein (WIP). *Int Immunol* 19: 185-92
73. Antón IM, De la Fuente MA, Sims TN, Freeman S, Ramesh N, Hartwig JH, Dustin ML, Geha R. 2002. WIP Deficiency Reveals a Differential Role for WIP and the Actin Cytoskeleton in T and B Cell Activation. *Immunity* 16: 193-204
74. Martinez-Quiles N, Rohatgi R, Antón IM, Medina M, Saviile SP, Miki H, Yamaguchi H, Takenawa T, Hartwig JH, Geha RS, Ramesh N. 2001. WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat Cell Biol* 3: 484-91
75. Sasahara Y, Rachid R, Byrne MJ, de la Fuente MA, Abraham RT, Ramesh N, Geha RS. 2002. Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol Cell* 10: 1269-81

76. Trasher AJ. 2002. WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol* 2: 635-46-
77. MacCarthy-Morrogh L, Hubert BG, Yi-chien W, Katz F, Thompson L, Layton M, Jones AM, Kinnon C. 1998. Absence of Expression of the Wiskott–Aldrich Syndrome Protein in Peripheral Blood Cells of Wiskott–Aldrich Syndrome Patients. *Clin Immunol Immunopathol* 88: 22-7
78. Kettner A, Kumar L, Antón IM, De la Fuente M, Pivniouk VI, Falet H, Hartwig JH, Geha R. 2004. WIP Regulates Signaling via the High Affinity Receptor for Immunoglobulin E in Mast Cells. *J Exp Med* 199: 357-68
79. Shcherbina A, Miki H, Kenney DM, Rosen FS, Takenawa T, Remold-O'Donnell E. 2001. WASP and N-WASP in human platelets differ in sensitivity to protease calpain. *Blood* 98: 2988-91
80. Goll DE, Thompson F, Hongqi L, Wei W, Gong J. 2003. The Calpain System. *Physiol Rev* 83: 731-801
81. Glading A, Lauffenburger DA, Wells A. 2002. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol* 12: 46-54
82. Franco SJ, Huttenlocher A. 2005. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci* 118: 3829-38
83. Hanna RA, Campbell RL, Davies PL. 2008. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature* 456: 409-12
84. Wendt A, Thompson VF, Goll DE. 2004. Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biol Chem* 385: 465-72
85. Gallego MD, de la Fuente MA, Anton IM, Snapper S, Fuhlbrigge R, Geha RS. 2006. WIP and WASP play complementary roles in T cell homing and chemotaxis to SDF-1alpha. *Int Immunol* 18: 221-32

86. Le Bras S, Massaad M, Koduru S, Kumar L, Oyoshi MK, Hartwig J, Geha RS. 2009. WIP is critical for T cell responsiveness to IL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7519-24
87. Notarangelo LD, Notarangelo LD, Ochs HD. 2005. WASP and the phenotypic range associated with deficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5: 485-90
88. Lemahieu V, Gastier JM, Francke U. 1999. Novel mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene and their effects on transcriptional, translational, and clinical phenotypes. *Hum Mutat* 14: 54-66
89. Snapper SB, Rosen FS. 1999. The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu Rev Immunol* 17: 905-29
90. Zicha D, Allen WE, Brickell P, Kinnon C, Dunn GA, Jones GE. 1998. Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Br J Haematol* 101: 659-65
91. Badolato R, Sozzani S, Malacarne F, Bresciani S, Fiorini M, Borsatti A, Albertini A, Mantovani A, Ugazio AG, Notarangelo LD. 1998. Monocytes from Wiskott-Aldrich Patients Display Reduced Chemotaxis and Lack of Cell Polarization in Response to Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine1. *J Immunol* 161: 1026-33
92. Burns S, Hardy SJ, Buddle J, Yong KL, Jones GE, Trasher AJ. 2004. Maturation of DC Is Associated With Changes in Motile Characteristics and Adherence. *Cell Motil. Cytoskeleton* 57: 118-32
93. Calle Y, Burns S, Trasher AJ. 2006. The leukocyte podosome. *Eur J Cell Biol* 85: 151-7
94. Tsuboi S, Meerloo J. 2007. Wiskott-Aldrich syndrome protein is a key regulator of the phagocytic cup formation in macrophages. *J Biol Chem* 282: 34194-203



95. Leverrier Y, Lorenzi R, Blundell MP, Brickell P, Kinnon C, Ridley AJ, Thrasher AJ. 2001. Cutting edge: the Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for efficient phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol* 166: 4831-4
96. Filipovich A. 2008. Hematopoietic cell transplantation for correction of primary immunodeficiencies. *Bone Marrow Transplant* 42 Suppl 1: S49-S52
97. Ochs H, Filipovich A, Veys P, Cowan MJ, Kapoor N. 2009. Wiskott-Aldrich Syndrome: Diagnosis, Clinical and Laboratory Manifestations, and Treatment. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 84-90
98. Filipovich A, Stone JV, Tomany SC, Ireland M, Kollman C, Pelz CJ, Casper JT, Cowan MJ, Edwards JR, Fasth A, Gale RP, Junker A, Kamani NR, Loechelt BJ, Pietryga DW, Ringdén O, Vowels M, Hegland J, Williams AV, Klein JP, Sobocinski KA, Rowlings PA, Horowitz MM. 2001. Impact of donor type on outcome of bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the International Bone Marrow Transplant Registry and the National Marrow Donor Program. *Blood* 97: 1598-603
99. Ozsahin H, Cavazzana-Calvo M, Notarangelo LD, Schulz A, Thrasher AJ, Mazzolari E, Slatter MA, Le Deist F, Blanche S, Veys P, Fasth A, Bredius R, Sedlacek P, Wulffraat N, Ortega J, Heilmann C, O'Meara A, Wachowiak J, Kalwak K, Matthes-Martin S, Gungor T, Ikinogullari A, Landais P, Cant AJ, Friedrich W, Fischer A. 2008. Long-term outcome following hematopoietic stem-cell transplantation in Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the European Society for Immunodeficiencies and European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 111: 439-45
100. Mikkola HK, Orkin SH. 2006. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133: 3733-44

101. Chinen J, Puck J. 2004. Successes and risks of gene therapy in primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 113: 595-603
102. Trasher AJ, Gaspar HB, Baum C, Modlich U, Schambach A, Candotti F, Ostu M, Sorrentino B, Scobie L, Cameron E, Blyth K, Neil J, Abina SH, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. 2006. Gene therapy: X-SCID transgene leukaemogenicity. *Nature* 440: 1123
103. Woods NB, Bottero V, Schmidt M, von Kalle C, Verma IM. 2006. X-SCID transgene leukaemogenicity. *Nature* 440: E5-E6
104. Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC. 2003. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Can* 3: 477-88
105. Charrier S, Dupré L, Scaramuzza S, Jeanson-Leh L, Blundell M, Danos O, Cattaneo F, Aiuti A, Eckenberg R, Trasher AJ, Roncarolo MG, Galy A. 2007. Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Ther* 14: 415-28
106. Jones GE, Zicha D, Dunn GA, Blundell M, Trasher AJ. 2002. Restoration of podosomes and chemotaxis in Wiskott–Aldrich syndrome macrophages following induced expression of WASp. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 806-15
107. Chinen J, Puck J. 2004. Perspectives of gene therapy for primary immunodeficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4: 523-7
108. Klein C, Nguyen D, Liu CH, Mizoguchi A, Bhan AK, Miki H, Takenawa T, Rosen FS, Alt FW, Mulligan RC, Snapper S. 2003. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome: rescue of T-cell signaling and amelioration of colitis upon transplantation of retrovirally transduced hematopoietic stem cells in mice. *Blood* 101: 2159-66

109. Strom TS, Turner SJ, Andreansky S, Liu H, Doherty PC, Srivastava DK, Cunningham JM, Nienhuis AW. 2003. Defects in T-cell-mediated immunity to influenza virus in murine Wiskott-Aldrich syndrome are corrected by oncoretroviral vector-mediated gene transfer into repopulating hematopoietic cells. *Blood* 102: 3108-16
110. Strom TS, Gabbard W, Kelly PF, Cunningham JM, Nienhuis AW. 2003. Functional correction of T cells derived from patients with the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) by transduction with an oncoretroviral vector encoding the WAS protein. *Gene Ther* 10: 803-9
111. Baum C, Schambach A, Bohne J, Galla M. 2006. Retrovirus vectors: toward the lentivirus? *Mol Ther* 13: 1050-63
112. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7: 33-40
113. Miller DG, Adam MA, Miller D. 1990. Gene Transfer by Retrovirus Vectors Occurs Only in Cells That Are Actively Replicating at the Time of Infection. *Mol Cell Biol* 10: 4239-42
114. Galy A, Roncarolo MG, Thrasher AJ. 2008. Development of lentiviral gene therapy for Wiskott Aldrich syndrome. *Expert Opin Biol Ther* 8: 181-90
115. Blundell MP, Bouma G, Calle Y, Jones GE, Kinnon C, Thrasher AJ. 2008. Improvement of migratory defects in a murine model of Wiskott-Aldrich syndrome gene therapy. *Mol Ther* 16: 836-44
116. Frecha C, Toscano MG, Costa C, Saez-Lara MJ, Cosset FL, Verhoeyen E, Martin F. 2008. Improved lentiviral vectors for Wiskott-Aldrich syndrome gene therapy mimic endogenous expression profiles throughout haematopoiesis. *Gene Ther* 15: 930-41
117. Toscano MG, Frecha C, Benabdellah K, Cobo M, Blundell M, Thrasher AJ, Garcia-Olivares E, Molina IJ, Martin F. 2008. Hematopoietic-specific lentiviral vectors

- circumvent cellular toxicity due to ectopic expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Hum Gene Ther* 19: 179-97
118. Charrier S, Dupre L, Scaramuzza S, Jeanson-Leh L, Blundell MP, Danos O, Cattaneo F, Aiuti A, Eckenberg R, Thrasher AJ, Roncarolo MG, Galy A. 2007. Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene Ther* 14: 415-28
119. Dupre L, Marangoni F, Scaramuzza S, Trifari S, Hernandez RJ, Aiuti A, Naldini L, Roncarolo MG. 2006. Efficacy of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome using a WAS promoter/cDNA-containing lentiviral vector and nonlethal irradiation. *Hum Gene Ther* 17: 303-13
120. Martin F, Toscano MG, Blundell M, Frecha C, Srivastava GK, Santamaria M, Thrasher AJ, Molina IJ. 2005. Lentiviral vectors transcriptionally targeted to hematopoietic cells by WASP gene proximal promoter sequences. *Gene Ther* 12: 715-23
121. Charrier S, Stockholm D, Seye K, Opolon P, Taveau M, Gross DA, Bucher-Laurent S, Delenda C, Vainchenker W, Danos O, Galy A. 2005. A lentiviral vector encoding the human Wiskott-Aldrich syndrome protein corrects immune and cytoskeletal defects in WASP knockout mice. *Gene Ther* 12: 597-606
122. Dupre L, Trifari S, Follenzi A, Marangoni F, Lain de Lera T, Bernad A, Martino S, Tsuchiya S, Bordignon C, Naldini L, Aiuti A, Roncarolo MG. 2004. Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction. *Mol Ther* 10: 903-15
123. Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, Northcutt VJ, Paushkin S, Hwang S, Leonard EM, Almstead NG, Ju W, Peltz SW, Miller LL. 2007. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of PTC124, a Nonaminoglycoside Nonsense Mutation Suppressor,

- Following Single- and Multiple-Dose Administration to Healthy Male and Female Adult Volunteers. *J Clin Pharmacol* 47: 430-44
124. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugy J, Chen J, Jones S, Ren H, Moon Y-C, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrack P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL. 2007. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447: 87-93
  125. Linde L, Kerem B. 2008. Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet* 24: 552-63
  126. Hermann T. 2007. Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci* 64: 1841-52
  127. Schmitz A, Famulok M. 2007. Ignore the nonsense. *Nature* 447: 42-3
  128. Wengler GS, Notarangelo LD, Berardelli S, Pollonni G, Mella P, Fasth A, Ugazio AG, Parolini O. 1995. High prevalence of nonsense, frame shift, and splice-site mutations in 16 patients with full-blown Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 86: 3648-54
  129. Koduru S, Massaad M, Wilbur C, Kumar L, Geha R, Ramesh N. 2007. A novel anti-WIP monoclonal antibody detects an isoform of WIP that lacks the WASP binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 875-81
  130. Cooper JA. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105: 1473-8
  131. Ochs HD. 2008. Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein affect protein expression and dictate the clinical phenotypes. *Immunol Res*

132. Griffith LM, Cowan MJ, Kohn DB, Notarangelo LD, Puck JM, Schultz KR, Buckley RH, Eapen M, Kamani NR, O'Reilly RJ, Parkman R, Roifman CM, Sullivan KE, Filipovich AH, Fleisher TA, Shearer WT. 2008. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for primary immune deficiency diseases: current status and critical needs. *J Allergy Clin Immunol* 122: 1087-96
133. Andreu N, Aran JM, Fillat C. 2007. Novel membrane cell projection defects in Wiskott-Aldrich syndrome B cells. *Int J Mol Med* 20: 445-50
134. Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T. 1998. Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* 391: 93-6