



Universidad de Granada

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III
e Inmunología**

Programa de Doctorado en Biomedicina

***CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CELULAR DE UNA COHORTE DE
PACIENTES CON ATAXIA-TELANGIECTASIA***

**Memoria presentada por Ana Karina Vega Bogado para
optar al título de Doctor por la Universidad de Granada**

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ana Karina Vega Bogado
D.L.: GR 425-2014
ISBN: 978-84-9028-789-7



Universidad de Granada



Como Director de la Tesis y hasta donde mi conocimiento alcanza el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo mi dirección y se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones. Así mismo, el trabajo reúne todos los requisitos de contenido, teóricos y metodológicos para ser admitido a trámite, a su lectura y defensa pública, con el fin de obtener el referido Título de Doctor, y por lo tanto AUTORIZO la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero.

Granada, a 20 junio de de 2013

Fdo.: IGNACIO J. MOLINA PINEDA DE LAS INFANTAS

SR. COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

1. TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido

1.	TABLA DE CONTENIDO	I
2.	RESUMEN.....	1
3.	INTRODUCCIÓN	5
1.	ATAXIA TELANGIECTASIA.	7
1.1.	<i>Diagnóstico de A-T</i>	9
1.2.	<i>Tratamiento de las manifestaciones clínicas de A-T</i>	9
2.	IDENTIFICACIÓN DEL GEN Y LA PROTEÍNA DE ATM.	10
3.	ACTIVACIÓN DE ATM Y DAÑO AL ADN.	14
1.2.	<i>Cascada de fosforilación de proteínas implicadas en la reparación del daño al ADN</i>	15
4.	ATM Y CICLO CELULAR.....	17
5.	EL DAÑO AL ADN Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO. PAPEL DE ATM.	21
5.1	<i>Especies reactivas de Oxígeno (ROS)</i>	21
5.2	<i>Mecanismos defensivos contra la acción de ROS.</i>	21
6.	ATM Y TELÓMEROS.	23
	<i>Telómeros y A-T</i>	24
7.	ATM Y SU RELACIÓN EN EL DESARROLLO DEL LINFOCITO.	25
8.	LA INMUNODEFICIENCIAS EN PACIENTES CON A-T.....	27
9.	CÁNCER Y ATAXIA-TELANGIECTASIA.	31
9.1	<i>Heterocigotas de ATM y riesgo de cáncer.</i>	32
9.2	<i>Mutaciones. Correlación entre genotipo y fenotipo</i>	33
9.3	<i>Polimorfismos en ATM.</i>	36
10.	RELACIÓN DEL ESTUDIO DE HAPLOTIPO Y ETNIA	37
11.	TERAPIAS POTENCIALES DE A-T.....	39
11.1	<i>Estudio para el tratamiento del cáncer en niños con Ataxia-Telangiectasia (Treatment of Cancer in Children With Ataxia-telangiectasia)</i>	39
11.2	<i>Terapias dirigidas a las mutaciones.</i>	39
11.3	<i>Terapia génica y A-T</i>	41
4.	OBJETIVOS	43
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	46
1.	OBTENCIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA.	48

2.	LÍNEAS CELULARES DE INDIVIDUOS NORMALES Y PACIENTES A-T, MEDIOS DE CULTIVOS, REACTIVOS.	48
3.	SEPARACIÓN DE CÉLULAS VÍRGENES Y MEMORIAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS EN CONTROLES SANOS Y PACIENTES A-T.	49
	3.1 Separación	49
	3.2 Pureza de la fracción negativa:.....	50
	3.3 Estimulación:.....	50
	3.4 Determinación de citoquinas intracelulares:	50
	3.5 Determinación de citoquinas en sobrenadante.	51
4.	FENOTIPO DE LAS CÉLULAS ALOESTIMULADAS.....	52
5.	ESTIMULACIÓN DE LÍNEAS ALOESPECÍFICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE ACTIVACIÓN.....	52
6.	DETERMINACIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS ALOESTIMULADAS DE PACIENTES Y CONTROLES INDUCIDA TRAS IRRADIACIÓN GAMMA.....	53
7.	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT A PARTIR DE EXTRACTOS NUCLEARES DE PACIENTES Y DE INDIVIDUOS SANOS.	54
8.	CUANTIFICACIÓN DEL ARN MENSAJERO MEDIANTE PCR CUANTITATIVA.....	56
9.	ENSAYO DE CLONOGENICIDAD INDUCIDA POR RADIACIÓN.	58
10.	SECUENCIACIÓN DEL GEN DE ATM DE PACIENTES A-T MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA.	59
6.	RESULTADOS	63
1.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UNA COHORTE DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO PARA ATAXIA- TELANGIECTASIA.....	65
	(i) Detección de la presencia de ARN mensajero:	67
	(ii) Análisis de la expresión de la proteína ATM y de su actividad quinasa.	68
	(iii) Análisis molecular del gen ATM en la cohorte de pacientes.....	74
2.	GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LÍNEAS T ALOESPECÍFICAS PROCEDENTES DE PACIENTES CON A-T.	87
	2.1 Fenotipo de las líneas T aloespecíficas.	87
	Expresión de marcadores de activación CD69 y CD40-L.	89
	Análisis del ciclo celular de las líneas T aloespecíficas de pacientes con A-T tras radiación.....	91
3.	ESTUDIO FUNCIONAL DE CÉLULAS VÍRGENES Y MEMORIA DE PACIENTES A-T Y CONTROLES SANOS.....	98
	Determinación de citoquinas intracelulares.	98
	Determinación de la producción de citoquinas en el sobrenadante de células estimuladas.....	104
7.	DISCUSIÓN	109

Tabla de contenido

8. CONCLUSIONES.....	117
9. BIBLIOGRAFÍA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

2. Resumen

La Ataxia telangiectasia (A-T) es un desorden raro autosómico recesivo, con un complejo fenotipo que afecta a los sistemas nervioso, inmunológico y reproductivo. Está caracterizado por una ataxia cerebelar progresiva, que se inicia entre los 1 y 4 años de edad; apraxia oculomotora; neurodegeneración; radiosensibilidad; telangiectasia de la conjuntiva; inmunodeficiencia con infecciones frecuentes; defectos en los controles del ciclo celular; e inestabilidad genómica y predisposición al cáncer, especialmente linfoma y leucemia. La prevalencia de la enfermedad varía dependiendo de la consanguinidad que pueda existir en cada país. En España no existe hasta el momento ninguna estimación objetiva sobre la incidencia o prevalencia de la enfermedad en el conjunto del país, y tampoco se ha abordado el estudio de las características moleculares y las mutaciones prevalentes en España.

En este trabajo nos hemos propuesto realizar la caracterización molecular de una amplia cohorte de pacientes españoles, analizando además la expresión y actividad funcional de la proteína deficiente. Además, hemos abordado el estudio de los defectos presentes en células T de pacientes con A-T, generando para ello un panel de líneas celulares primarias aloespecíficas, y hemos examinado la actividad funcional de sus células vírgenes y memoria.

3. Introducción

1. Ataxia Telangiectasia.

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) asociadas a defectos en la reparación de daño al ADN suelen estar relacionadas a manifestaciones clínicas como radiosensibilidad, defectos en el desarrollo y predisposición al cáncer. Un número creciente de defectos genéticos en la reparación de daño al ADN han sido identificados con IDPs, una de los cuales es la Ataxia telangiectasia (Slatter and Gennery, 2010).

La Ataxia telangiectasia (A-T) es un desorden raro autosómico recesivo, con un complejo fenotipo que incluye a los sistemas nervioso, inmunológico y reproductivo. Está caracterizado por: ataxia cerebelar progresiva, que se inicia entre los 1 y 4 años de edad; apraxia oculomotora; neurodegeneración; radiosensibilidad; telangiectasia de la conjuntiva; inmunodeficiencia con infecciones frecuentes; defectos en los controles del ciclo celular; inestabilidad genómica y predisposición al cáncer, especialmente linfoma y leucemia (Boder, 1985).

Fue descrita por primera vez por Syllaba y Henner, y 30 años después, fue establecido como enfermedad por Boder y Sedgwick (Boder and Sedgwick, 1958). Durante la siguiente década numerosos grupos describieron la respuesta adversa a la radioterapia, así como la hipersensibilidad de las células en cultivo de A-T a los rayos X y a los rayos gamma (Boder, 1985; Lavin, 2008; Watters et al., 1999).

La ataxia se manifiesta cuando el niño empieza a caminar y es progresiva afectando las extremidades, el habla se vuelve disártrica en aumento, los movimientos involuntarios son evidentes y el niño queda inmovilizado al terminar la primera década de vida (Boder, 1985; Lavin and Shiloh, 1997; Lee et al., 2013).

La escritura está afectada entre los siete y ocho años, todos los adolescentes con A-T clásica necesitan ayuda para comer, vestirse, lavarse e ir al baño. A pesar de ser inteligentes, suelen presentar dificultades en el aprendizaje, lo que no ha impedido que muchos individuos norteamericanos y británicos hayan terminado el colegio y la universidad (Gatti, 1993).

En la degeneración cerebelar cortical están implicadas las células de Purkinje y células granulares, pero las células de la corteza cerebelosa permanecen intactas (Boder, 1985).

La telangiectasia es otra manifestación clínica de la enfermedad y es debido a la dilatación de los vasos oculares, aunque no está confinado sólo a esta área sino también puede aparecer en el área facial y orejas, su inicio es tardío con respecto a la ataxia y suele observarse entre los dos y ocho años de edad (Lavin and Shiloh, 1997).

Además de las manifestaciones neurológicas y los signos oculomotores, la A-T se caracteriza por un número de características clínicas que son variables en apariencia, pero pueden ayudar en el diagnóstico y son: crecimiento retardado, hipogonadismo, displasia tímica (Boder, 1985), así como niveles elevados de α -Fetoproteína (AFP) y antígeno carcino embrionario (CEA) en suero (Kozlov et al., 2006; Mirzoeva and Petrini, 2003).

La prevalencia de la enfermedad varía dependiendo de la consanguinidad que pueda existir en cada país, siendo en los Estados Unidos y el Reino Unido 1:40.000-1:100.000 (Swift, 1985) (<http://ghr.nlm.nih.gov/condition/ataxia-telangiectasia>). En España no existe hasta el momento ninguna estimación objetiva sobre la incidencia o prevalencia de la enfermedad en el conjunto del país.

1.1. Diagnóstico de A-T

El diagnóstico clínico de A-T es relativamente fácil, una vez que se han desarrollado las características de la enfermedad como la neurodegeneración y la telangiectasia ocular, el diagnóstico se puede confirmar con el hallazgo de niveles elevados de α -Feto Proteína. El diagnóstico puede ser complicado en niños pequeños cuando hay ausencia de ataxia progresiva, en una minoría de niños que nunca desarrollan telangiectasia o en aquellos con fenotipo atípico o moderado (Lavin et al., 2007).

Una prueba de laboratorio confirmatoria de la enfermedad es la detección de la proteína de ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) por inmunoblot, siendo la prueba muy sensible y específica. La proteína de ATM está ausente en el 90% de los pacientes con A-T, en algunos (10%) pueden presentarse trazas, y sólo el 1% tienen cantidades normales de proteína pero suelen carecer de actividad quinasa. La actividad quinasa de ATM constituye una prueba importante para evaluar la función la proteína e identificar casos raros de A-T que presentan cantidades normales de la proteína de ATM (Gatti, 1993).

Existen otros ensayos que pueden ayudar al diagnóstico en ausencia de la identificación de la mutación del gen. El ensayo de radiosensibilidad o clonogenicidad (*Colony Survival Assay*. CSA) es un ensayo en el cual se determina la supervivencia a lo largo del tiempo de las células después de haber sido irradiadas con dosis bajas, generalmente 1Gy. Sin embargo, existen pacientes que pueden dar resultados de radiosensibilidad intermedia e incluso normal (Becker-Catania et al., 2000; Sun et al., 2002).

1.2 Tratamiento de las manifestaciones clínicas de A-T

La A-T es primariamente un síndrome de ataxia cerebelar progresiva y no existe ninguna estrategia curativa para esta enfermedad. De todas las características la neurodegeneración cerebelar progresiva es la más debilitante, y debido a ella el niño se encuentra al final de la primera década confinado en una silla de ruedas y posee poco control de la cabeza y torso (Boder, 1985).

Los síntomas neurológicos asociados a A-T pueden mejorar de forma modesta, así la disfunción de los ganglios basales pueden responder a derivados de L-DOPA, agonistas de dopamina, y ocasionalmente a anticolinérgicos. La pérdida de equilibrio puede responder a amantadina, fluoxetina o buspirona que también pueden mejorar el habla y la coordinación. Los temblores son controlados con gabapentina, clonazepan o propranolol y se ha visto que el uso de betametasona pero no metilprednisolona disminuyen los síntomas neurológicos (Broccoletti et al., 2008; Broccoletti et al., 2011; Buoni et al., 2006).

La inmunodeficiencia en A-T puede estar acompañada de hipogamablobulinemia con deficiencia de anticuerpos que puede ser tratada con reposición de inmunoglobulinas vía intravenosa (Nowak-Wegrzyn et al., 2004), mientras que las infecciones sinopulmonares usualmente responden bien a los antibióticos (Lavin et al., 2007).

2. Identificación del gen y la proteína de ATM.

Gatti et al. localizaron el gen defectuoso de A-T en el cromosoma 11q22-23 utilizando el método de ligamiento genético en 31 familias (Gatti et al., 1988), este

hallazgo fue el precursor de numerosos trabajos que intentaron identificar el gen mutado. Debido a la aparente heterogeneidad de A-T y a la falta de marcadores genéticos de la región del cromosoma 11, la identificación fue inicialmente lenta, pero gracias al clonaje exhaustivo y al mapeo físico fueron estrechando la región del gen o genes de A-T a menos de 500 kilobases (kb). Varios genes candidatos fueron identificados y uno de ellos, *ATM*, fue encontrado mutado en todos los grupos complementarios por el grupo de Yosef Shiloh (Savitsky et al., 1995).

El gen de *ATM* ocupa 160kb del ADN genómico, codifica un transcrito de 13kb de 66 exónes (Uziel et al., 1996), siendo el producto del gen la proteína de ATM (3056aa) de 315-kDa que migra en SDS-PAGE a 370kDa (Gatti et al., 1988).

La ATM es una proteína predominantemente nuclear, además existen evidencias de formas citoplasmáticas que son asociadas a los peroxisomas y endosomas (Watters et al., 1999). La proteína ATM es una serin-treonin quinasa perteneciente a una familia de proteínas PI3-kinasa (familia PIKK). Todas las proteínas de dicha familia están relacionadas en la señalización seguida al estrés celular, e incluye a ATR (ATM y Rad3 related protein kinase), DNAPKcs, mTOR (blanco de la rapamicina en mamíferos), y hSMG1. Estos miembros tienen en común una estructura que incluye la N-terminal (repeticiones HEAT), dominio FAT, un dominio proteín quinasa, y un dominio carbono terminal C-FAT (Derheimer and Kastan, 2010). (figura1)

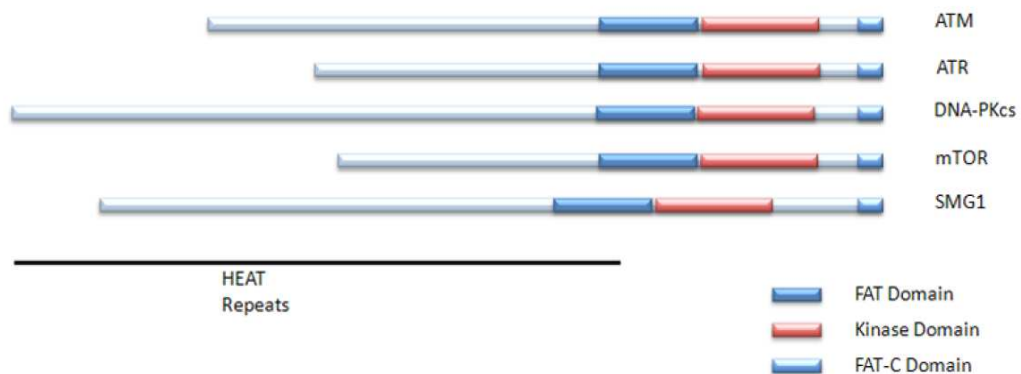


Figura 1. Miembros de la Familia PI3KK. Los miembros de la familia PIKK tienen un dominio C-terminal quinasa flanqueado por el dominio FAT y el dominio C-terminal FAT-C. El dominio N-terminal está compuesto por repeticiones HEAT. (Tomado de (Derheimer and Kastan, 2010))

La señal que activa a la proteína de ATM y DNA-PKcs es la doble rotura de la cadena de ADN (DSB *double strand break*), mientras que ATR responde a la rotura de cadena simple (ssDNA *single strand DNA*). Estas tres quinasas son reclutadas al lugar de daño al ADN, donde se promueve la activación quinasa (Lovejoy and Cortez, 2009).

Otro rasgo común de los miembros de la familia PIKK es la asociación con proteínas o complejos de proteínas, éstas facilitan la activación y función de las mismas. ATM se asocia con el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) como parte del proceso de activación. Existen enfermedades que han sido descritas y que comparten síntomas clínicos y características celulares con A-T. Estas enfermedades son debidas a mutaciones en dos miembros del complejo MRN, e incluyen al Síndrome de rotura Nijmegen (NBS1 *Nijmegen breakage syndrome*) (Varon et al., 1998) y los síndromes ATLD (*A-T like disorders*) con mutaciones en MRE11 (Stewart et al., 1999). Tabla I

Tabla I. Resumen comparativo de las características de los principales síndromes de inestabilidad cromosómica.

Características de ataxia-telangiectasia			
Característica	Ataxia-telangiectasia	ATLD	Síndrome de rotura Niimegen
Proteína defectuosa	ATM	MRE11	NBS1
Aparición de los síntomas	Infancia	Infancia	Infancia
Progresión	Rápida	Lenta	Rápida
Defecto neurológico	Atrofia cerebelar	Atrofia cerebelar	Micro encefalia
Apraxia Oculomotora	+	+	-
Inmunodeficiencia	+	-	+
Telangiectasia	+	-	-
Alfa feto Proteína	Elevado	Normal	Normal
Defecto de crecimiento	-	-	+
Radiosensibilidad	++	+	+
Defectos en el ciclo celular	+	+	+
Defectos en la reparación del ADN	+	?	+
Inestabilidad cromosómica	+	+	+
Predisposición al cáncer	+	-	+

3. Activación de ATM y daño al ADN.

La proteína de ATM se encuentra en dímeros inactivos en células intactas, pero cuando existe daño al ADN o tratamientos con agentes que alteran la estructura de la cromatina, ATM sufre una autofosforilación intermolecular en la serina 1981 (S1981), resultando en una disociación del dímero en monómeros activos (Bakkenist and Kastan, 2003).

Además de la autofosforilación en la S1981, se han descrito otras modificaciones incluyendo fosforilaciones adicionales (Ser367, Ser1893) necesarias para la completa activación de ATM y las vías de señalización correspondiente (Kozlov et al., 2011). La histona acetil transferasa TIP60 está señalada como la encargada de acetilar a ATM en la Lisina 3016 (Lys3016), en paralelo a la autofosforilación en la S1981. Esta modificación fue descrita como importante en la activación de ATM (Sun et al., 2005).

El daño por rotura de doble cadena del ADN (DSB) es potencialmente letal para las células, y estos daños deben ser rápidamente reconocidos y reparados para evitar daños genéticos. Para ello existen mecanismos celulares capaces de reconocer y señalar la presencia de DSB a las proteínas de los puntos de control del ciclo celular. Ante la señal de la presencia de DSB, las proteínas de los puntos de control del ciclo celular pueden retrasar el paso de las células a través del ciclo y facilitar de ese modo la reparación del ADN (Zhou and Elledge, 2000).

Una vez producido el daño al ADN, ATM es rápidamente reclutada a los lugares donde hay DSB, sufriendo autofosforilación y separación en monómeros (Kozlov et al., 2006). Al igual que ATM, el complejo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) es rápidamente reclutado a los lugares de DSB (Figura 2).

MRN es una compleja maquinaria, crítica en los procesos biológicos, detectan y reparan el DSB debida a exposición a radiación ionizante, agentes genotóxicos,

derivadas del metabolismo celular durante la replicación, meiosis y recombinación V(D)J), y no requiere de ATM para su localización (Williams et al., 2010).

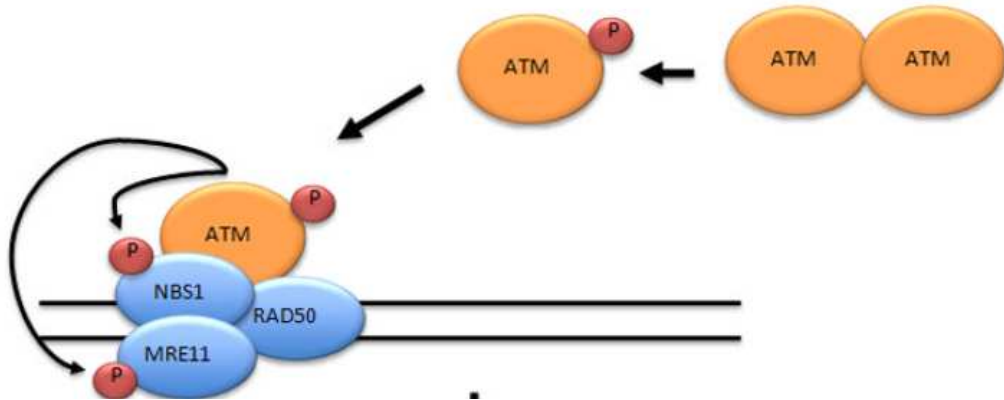


Figura 2. Reclutamiento de proteínas ante el daño al ADN (I). MRN es el sensor primario ante rotura de la doble cadena de ADN (DSB). ATM es rápidamente reclutado y sufre autofosforilación y separación en monómeros, para luego ser MRN sustrato de ATM. (Tomado de (Derheimer and Kastan, 2010))

1.2. Cascada de fosforilación de proteínas implicadas en la reparación del daño al ADN.

La activación de ATM conlleva a la rápida fosforilación de una multitud de proteínas que están implicadas no sólo en la reparación del ADN sino también en otros procesos. Una de estas proteínas es NBS1, cuando ocurre el DSB es rápidamente reclutada al lugar del daño donde permanece adherida a través de su C-terminal a la porción N-terminal de MRE11. En respuesta a la radiación NBS1 sufre fosforilaciones dependientes de ATM en dos sitios (Ser278 y Ser343) (Gatei et al., 2000; Lukas et al., 2004; Wu et al., 2000).

Otra proteína que participa en este proceso es SMC1, que ha sido identificada como un efector río abajo del punto de control de la fase S controlado por ATM/NBS1, la fosforilación de SMC1 depende de la fosforilación de NBS1 (Yazdi et al., 2002).

Inmediatamente después de ser reclutada ATM a la cromatina seguida del daño al ADN, ésta contribuye a la fosforilación de la histona H2AX en la Ser139 (conocida como γ H2AX) (Burma et al., 2001). La fosforilación de H2AX seguida de la radiación es mediada redundantemente por miembros de la familia PIKK (ATM y DNA-PK) (Wang et al., 2005), y la producción de la forma fosforilada es la señal para la consiguiente acumulación de proteínas de daño al ADN (Bassing et al., 2003; Celeste et al., 2003). Una de estas proteínas es MDC1, que se pega a γ H2AX, teniendo así un papel clave como regulador del reconocimiento y reparación de DSB (Stucki and Jackson, 2004).

La ubiquitin ligasa RNF8 también se reúne en el lugar de DSB a través de su dominio FHA junto con la proteína fosforilada MDC1, y ubiquitina a H2AX facilitando la acumulación de 53BP1 (p53 binding protein-1) y BRCA1 en el lugar del daño, siendo ambas proteínas sustratos de ATM en respuesta a DSB del ADN (Hamer et al., 2004). (Figura 3)

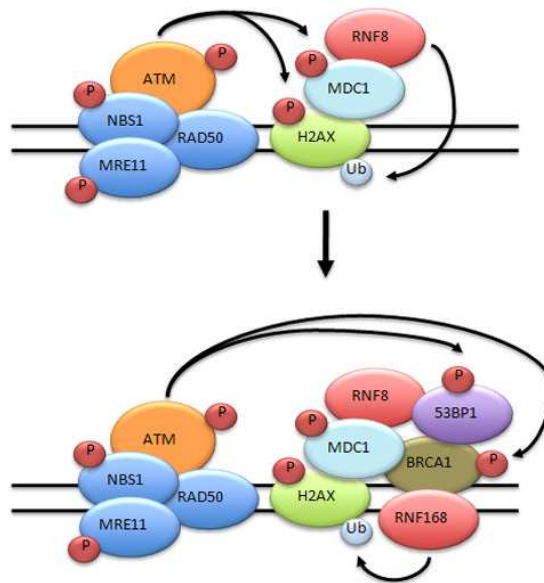


Figura 3. Reclutamiento de proteínas ante el daño al ADN (II). ATM en su forma monomérica es la clave en la fosforilación de otras proteínas que constituyen los principales componentes de la maquinaria del reconocimiento del daño al ADN y son responsables de la amplificación de la señal. ATM fosforila a MRE11, NBS1, y H2AX. La fosforilación de H2AX conlleva al reclutamiento de MDC1. MDC1 es fosforilado por ATM y sirve como lugar de acoplamiento para RNF8. RNF8 mono ubiquitina a γ H2AX resultando en el reclutamiento de 53BP1, BRCA1 y RNF168. (Tomado de (Derheimer and Kastan, 2010))

4. ATM y ciclo celular

La integridad del genoma es una consecuencia de la correcta transmisión de la información genética cuando una célula se divide. Debido a que las células se encuentran bajo constantes ataques por agentes que dañan el ADN, es esencial que la progresión del ciclo celular sea temporalmente detenido para reparar estos posibles daños (Langerak and Russell, 2011).

Existen mecanismos para retrasar el progreso del ciclo celular ante la presencia del daño de ADN, estos mecanismos son conocidos como puntos de control. En las células de mamífero existen tres puntos importantes de reparación del ADN que son: G1/S, intra-S y G2/M (Sancar et al., 2004).

En los puntos de control existen una serie de proteínas implicadas en estos procesos y pueden actuar como: sensores del daño, mediadores de la señal, transductores de la señal y efectores. En el caso de DSBs, MRN actúa como sensor que reconoce y se localiza en el lugar del daño durante todos los estadios del ciclo celular (Lisby et al., 2004). MRN posteriormente recluta a ATM y otros dos miembros quinasas de la familia de PIKK, ATR y DNA-PKs, que son también reclutados por ATRIP y Ku80 respectivamente (Falck et al., 2005). Las quinasas PIKK sirven en este proceso como transductores de la señal del daño fosforilando y activando quinasas efectoras como CHK1 y CHK2, el relevo de la señal entre estas proteínas es facilitada y realizada por proteínas mediadoras (Li and Zou, 2005).

La primera línea de defensa que previene la replicación del ADN dañado es el punto de control G1. Este punto de control provee el tiempo necesario para reparar el daño ocurrido en el ADN, así, seguida de la radiación, ATM ejecuta la parada en G1 fosforilando a p53 en la Ser15. Aunque esto no estabiliza a p53, ATM participa en su estabilización fosforilando a CHK2, HDM2 (*human doble minute-2*) y MDMX (Kastan and Lim, 2000). La fosforilación de HDM2 hace que decrezca su afinidad hacia p53, previniendo así su ubiquitinación y por lo tanto su degradación proteasómica, contribuyendo así a su estabilización. Esto conlleva a una serie de activaciones de genes que son diana de p53, entre ellos p21, inhibiendo así el progreso de G1 a la fase S. p21, junto con p27 y p57, forman una familia que comparten la capacidad de inhibir una amplia gama de ciclinas dependientes de quinasas CDKs (*cyklin-dependent kinases*) (Schwartz, 2002). (Figura 4)

Durante la fase S, las células que tienen DSBs cuentan con las rutas dependientes de ATM para bloquear la replicación del ADN dañado. En este punto, CHK2 (activado por ATM) media la degradación de la fosfatasa CDC25A manteniendo inhibida de este modo a CDK2, que es requerida para la síntesis de ADN. Las

células que tienen mutaciones en esta ruta (ATM/CHK2/CDC25A/CDK2) están incapacitadas para inhibir la síntesis de ADN (Falck et al., 2005). (Figura 4)

En forma paralela a la ruta antes citada, existe otro mecanismo en el cual ATM participa en el punto de control de la fase S y requiere el complejo MRN. En respuesta a la radiación ionizante ATM fosforila a NBS1 en la Ser343 y SMC1 (Gatei et al., 2000; Kitagawa et al., 2004; Wu et al., 2000; Yazdi et al., 2002). La fosforilación de NBS1 es necesaria para fosforilar la proteína FANCD2 (*Fanconi anaemia complementation group D2*) en la Ser222 (Taniguchi et al., 2002) Fig4. En las células A-T, la pérdida del punto de control de la fase S es manifestado en la incapacidad para inhibir la replicación del ADN y su elongación (Painter and Young, 1980).

El punto de control G2/M es el último centinela del ciclo celular, previene que las células que contienen daños en el ADN continúen con la mitosis, y también es necesario para la detención de las células que fueron irradiadas en la fase G2. Existen diversos mecanismos paralelos dependientes de ATM que aseguran la detención de las células en G2. Así, moléculas como CDC25, Rad17 o BRCA1 están involucradas en la inducción del punto de control de G2/M seguida de la radiación ionizante (Lavin, 2008). (Figura 4)

De todo lo antes señalado, se evidencia la importancia de la señalización de ATM en todas las fases del ciclo celular, coordinando una respuesta celular optima al daño de ADN (Derheimer and Kastan, 2010).

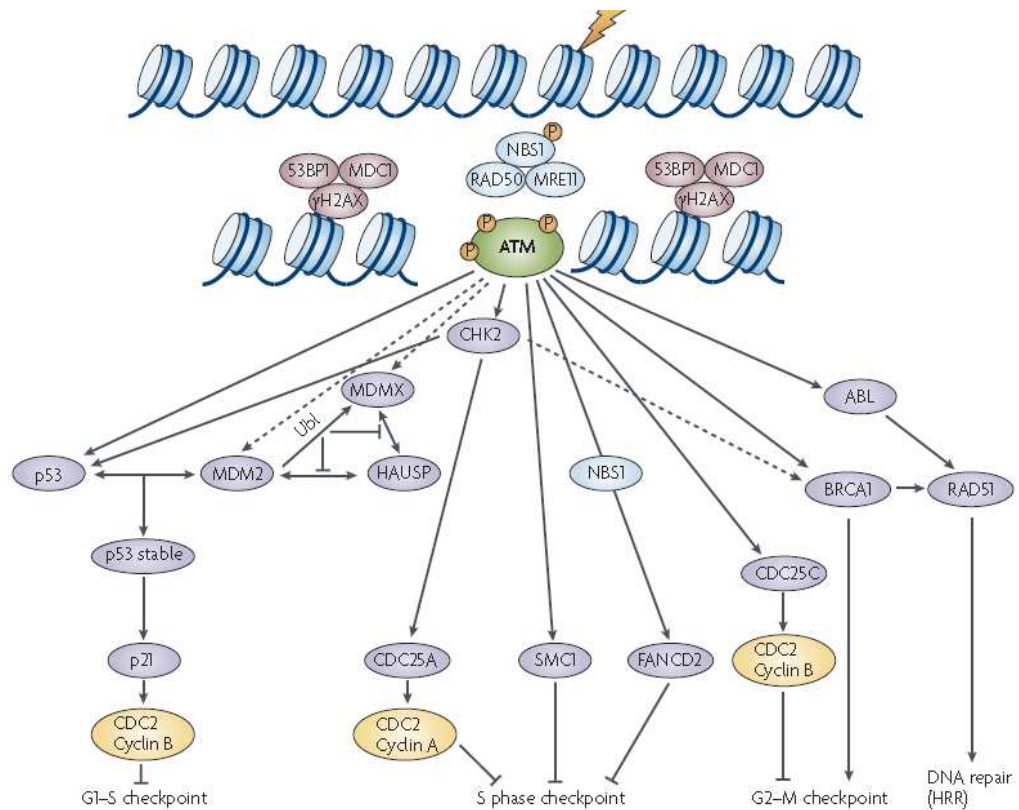


Figura 4. ATM y control del ciclo celular. ATM fosforila o media la fosforilación de diversas proteínas implicadas en el control del ciclo celular. Una vez que ocurre el daño al ADN, ATM se activa por una serie de eventos, ésta activación se completa cuando interactúa con el sensor del DSB al ADN el complejo MRN. La proteína p53 es clave en el punto de control de la fase G1-S y es un sustrato directo de ATM. (izq). NBS1 es fosforilado y actúa como adaptador en la fosforilación de otros sustratos ATM-dependientes como FANCD2 (Fanconi Anaemia) que controla el proceso específico del punto de control de la fase S junto con SMC1. (centro). Lo mismo se aplica en el punto de control G2-M, una serie de eventos que pueden ser vía p53 dependiente o independiente, en la vía independiente de p53, Chk1/Chk2 fosforilan inhibiendo a las proteínas (CDC)25A, CDC25B y CDC25C (Cell Division Cycle) (der). (Tomado de (Lavin, 2008)

5. El daño al ADN y Especies reactivas de oxígeno. Papel de ATM.

5.1 Especies reactivas de Oxígeno (ROS)

Agentes metilantes como drogas anti cancerígenas , radiaciones ionizantes y todo lo que pueda modificar el ADN, disparan una cascada de eventos que pueden llevar a la apoptosis. Se estima que cada día ocurren 2×10^4 eventos que dañan el ADN, y una porción significativa de este daño es causada por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Barzilai et al., 2002).

El Estrés Oxidativo es definido como un desequilibrio entre los oxidantes celulares y los agentes antioxidantes en el cual la producción de ROS excede a la capacidad antioxidante (Chen et al., 2012). Las ROS son constantemente producidas en las células vivas. La mayor fuente endógena son los procesos metabólicos, primeramente el metabolismo oxidativo de la mitocondria y procesos patológicos como la inflamación (Kehrer, 1993; Williams and Jeffrey, 2000). Las ROS en niveles fisiológicos normales juegan un papel regulando vías de señalización y expresión génica, y por lo tanto su producción es de vital importancia. La fuente de ROS exógena incluye exposición a radiaciones ionizantes, fármacos radiomiméticos y la producción de ROS por células vecinas (Barzilai et al., 2002).

5.2 Mecanismos defensivos contra la acción de ROS.

Los daños debidos a las ROS en las macromoléculas celulares llevan a la célula a reparar el daño mientras el ciclo celular es detenido o sufrir inducción de apoptosis, pero si el daño es extenso puede llevar a la muerte por necrosis de la célula (Offord et al., 2000; Williams and Jeffrey, 2000).

Dadas las consecuencias que puede llegar a tener en las células un exceso de ROS, éstas han sido dotadas de mecanismos defensivos contra el daño oxidativo. (Barzilai et al., 2002). Además, se ha visto que en ausencia de ATM las células

presentan un incremento de ROS, así, ratones deficientes en ATM presentan niveles elevados de ROS y signos de estrés oxidativo en el sistema nervioso central, particularmente en el cerebelo (primer lugar de degeneración en A-T) (Kamsler et al., 2001).

El hecho de que las células deficientes en ATM acumulen ROS y que sean sensibles al daño oxidativo, sugiere que ATM es crucial en el programa de defensa en el estrés oxidativo. Recientemente se ha identificado una función citoplasmática de ATM, esta función está relacionada con la respuesta al daño celular producida por ROS (Alexander et al., 2010).

Guo et al demostraron que la oxidación directa de ATM induce su activación en ausencia de DSB y del complejo MRN. La forma oxidada de ATM es un dímero activo en el cual ambos monómeros están covalentemente unidos por uniones intermoleculares bisulfuros (Figura 5). La mutación del residuo Cys2991L localizado en el dominio C-Terminal FATC está implicado en la unión disulfuro y la activación por oxidación de ATM (Guo et al., 2010) . Cuando la variante C2991L está presente en linfocitos de pacientes, no se produce apoptosis en respuesta al tratamiento con H₂O₂ (Ray et al., 2012).

Una forma de ATM con la región C-terminal truncada (R3047X) identificado en algunos pacientes A-T, puede ser activada por el ADN y MRN, pero no por oxidación (Guo et al., 2010). Los pacientes que tienen la variante R3047X desarrollan ataxia y sus células exhiben menor sensibilidad a la radiación comparados con el fenotipo clásico de A-T (Gilad et al., 1998).

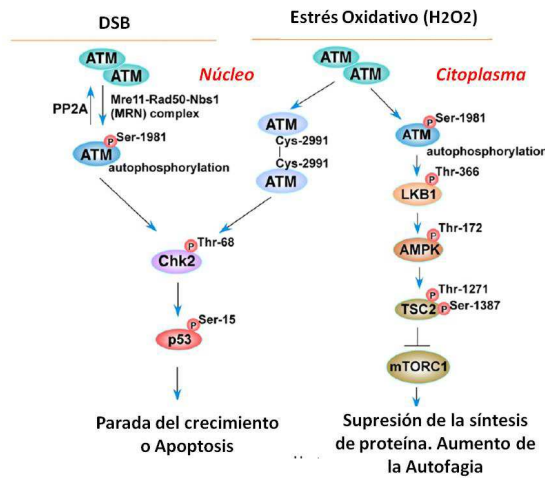


Figura 5. Activación esquemática de ATM por DSB y ROS. DSB media la activación vía ATM-Chk2, mientras que por estrés oxidativo provoca las vías de fosforilación: ATM-LKB1 y la vía ATM Homodímero.

6. ATM y Telómeros.

Los telómeros son estructuras complejas que comprenden ADN, ARN y proteínas designadas a proteger los extremos libres de los cromosomas con el fin de evitar ser reconocidos por las células como extremos libres de DSB. El complejo de protección telomérica, conocido como "*Shelterin*", está compuesto por múltiples proteínas: TIN2, TRF1, TRF2, TPP1, POT1 y RAP1, las cuales se unen a la secuencia telomérica y forman una estructura de bucle-t (t-loop) que es esencial en la protección del telómero y en su capacidad de eludir la maquinaria de reparación de ADN (Longhese, 2008). (Figura 6)

Si los telómeros no se encuentran protegidos se generan los TIFs (*telomere dysfunction induced foci*), debido a un reclutamiento de las proteínas que responden al daño de ADN. La proteína TRF2 puede unirse a ATM, y la sobreexpresión de la misma puede inhibir la respuesta al daño de ADN ATM dependiente en el caso por ejemplo de una agresión como la radiación ionizante (Karlseder et al., 2004). La interacción entre TRF2 y ATM podría ser esencial

previniendo el reconocimiento de los telómeros como daño al ADN, también ha sido demostrado que TRF2 interacciona con el complejo MRN (Zhu et al., 2000).

La activación de ATM también tiene lugar como respuesta al daño al telómero. Cuando el telómero se encuentra no encubierto debido a la inhibición de TRF2, ATM fosforilado en la Ser1981 se asocia a los telómeros, y las proteínas diana de ATM son fosforiladas en células envejecidas y los telómeros acortados (Takai et al., 2003).

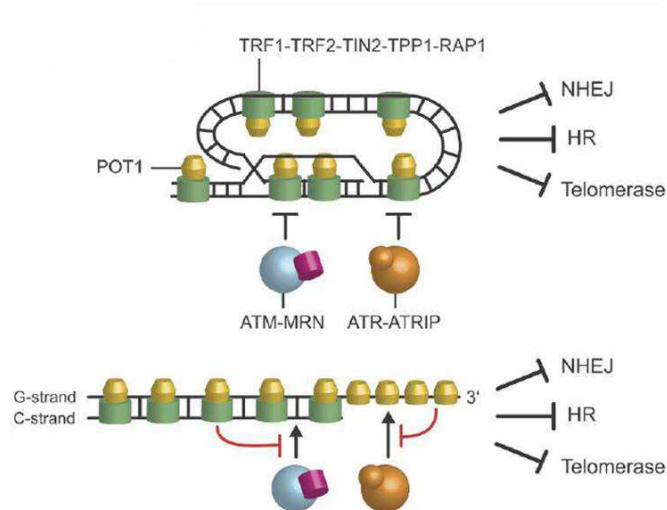


Figura 6. Como se logra la protección de los extremos libres del cromosoma. (Arriba) Los telómeros se pliegan en bucles o t-loop, esto protege los extremos de NHEJ (Recombinación no homóloga) y HR (Recombinación homóloga), además las estructuras t-loop también inhiben el reclutamiento de telomerasas y proteínas de control (entre ellas ATM). **(Abajo)** Si el telómero no ha adoptado la conformación t-loop, la proteína de unión a simple cadena de ADN (proteína de unión a ssDNA POT1) inhibe tanto la activación de ATR y la acción de la telomerasa. La proteína de unión a doble cadena de ADN (dsDNA) TRF2 previene la activación de ATM. (Tomado de (Longhese, 2008))

Telómeros y A-T

El papel de ATM en el mantenimiento del telómero ha sido extensamente estudiado y existen resultados directos e indirectos que la implican, entre ellos: (i) las células derivadas de pacientes A-T presentan una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas (Pandita et al., 1995), (ii) los fibroblastos primarios humanos de pacientes y ratones $Atm^{-/-}$ sufren envejecimiento prematuro en cultivo (Barlow et al., 1996; Hande et al., 2001), (iii) las células A-T tienen una respuesta anómala a los agentes que inducen especies reactivas de oxígeno (ROS), un fenómeno que está unido al acortamiento del telómero (Tchirkov and Lansdorp, 2003). Otros hallazgos llamativos acerca de los telómeros y células A-T, es la presencia de ADN telomérico extracromosómico en fibroblastos de pacientes, que pueden representar a fragmentos de telómeros o sus productos de replicación defectuosa del ADN telomérico (Hande et al., 2001). A pesar de todos estos datos, no está totalmente claro por qué existe una disfunción en los telómeros en ausencia de proteína funcional de ATM.

7. ATM y su relación en el desarrollo del linfocito.

Los linfocitos B y T constituyen los componentes principales del sistema inmunológico adaptativo, caracterizado por la especificidad y la memoria inmunológica. Los linfocitos son capaces de reconocer una multitud de antígenos debido a la recombinación somática de sus receptores de unión a antígenos. Los locus de los receptores B y T (BCR y TCR respectivamente) son modificados por reordenamientos genéticos, realizados por complejos proteicos de reparación y respuesta al daño (Revy et al., 2005). Los defectos en proteínas encargadas de reparar el daño al ADN afectan enormemente al desarrollo de los linfocitos debido al papel importante en la generación de los receptores BCR y TCR (de Miranda et al., 2011).

Para que los linfocitos B y T expresen una gran variedad de receptores (BCR y TCR), los genes sufren un número de reordenamientos genéticos específicos llamados recombinación V(D)J (Wyman and Kanaar, 2006). El locus de la inmunoglobulina (Ig) es posteriormente modificado por la recombinación del cambio de clase (CSR *class switch recombination*), que reemplaza la cadena pesada (CH) constante de C μ a C γ , C α o C ϵ , resultando en la producción de anticuerpos IgG, IgA o IgE respectivamente (Stavnezer et al., 2008). Finalmente la afinidad entre anticuerpos y antígenos es puesta a punto por la introducción de mutaciones puntuales en la región variable (V) de las Igs por el proceso llamado hipermutación somática (HMS) (Peled et al., 2008).

El papel de la reparación del ADN es crucial durante el desarrollo de los linfocitos, lo que explica el fenotipo de IDP en pacientes con defectos en los genes de la reparación del ADN. Los procesos de recombinación V(D)J, CSR e HMS comparten proteínas en los mecanismos de reparación de ADN. De este modo, deficiencias en ATM, DNA ligasa 4, Cernunnos, DNA-PKcs o en Artemis afectan a la recombinación V(D)J y CSR, y aquellos pacientes que tienen falta de las proteínas MRN o NBS1 presentan una disminución en los procesos de CSR e HMS (de Miranda et al., 2011). (Figura 7)

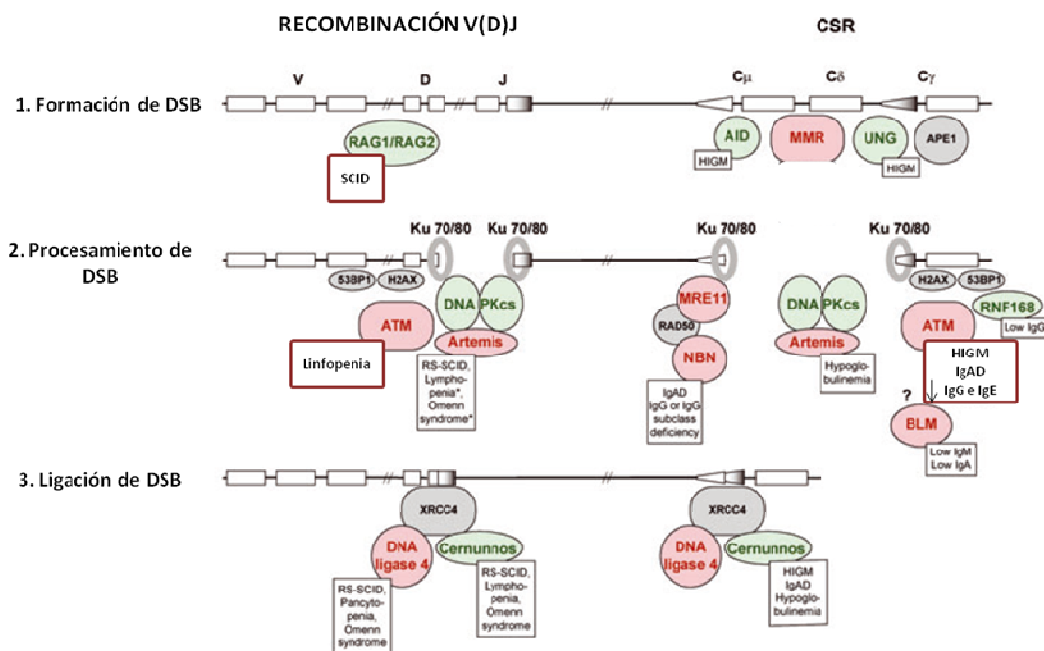


Figura 7. Asociación entre las proteínas responsables en el proceso de reparación del ADN en la recombinación V(D)J y en el cambio de clase (CSR). Dependiendo del papel en la recombinación V(D)J o en el cambio de clase (CSR), la deficiencia de cualquiera de las proteínas implicadas conducen a un fenotipo de IDP. (Tomado de (de Miranda et al., 2011)

8. La inmunodeficiencias en pacientes con A-T.

La inmunodeficiencia está presente entre el 60%-80% de los individuos con A-T. Las manifestaciones son variables y no se correlacionan ni con la frecuencia ni con la severidad de las infecciones, además, la inmunodeficiencia no es progresiva y afecta tanto a la inmunidad humoral como a la celular (Boder, 1985; Staples et al., 2008; Woods et al., 1990). Los pacientes A-T son susceptibles a bacterias patógenas comunes y virus, algunos pacientes tienen historia de infecciones sinopulmonares crónicas, otros pacientes infecciones recurrentes, pero es muy raro que sufran infecciones oportunistas por hongos o protozoarios (Lavin et al., 2007; Nowak-Wegrzyn et al., 2004).

La inmunodeficiencia en A-T tiene correlación con la presencia de mutaciones nulas. Aquellos pacientes con mutaciones que permiten la expresión de proteína residual funcional presentan una inmunodeficiencia mucho menos severa (Staples et al., 2008). Sin embargo en el estudio realizado por Verhagen et al. demostraron que la sola presencia de proteína, aunque no fuera funcional, mejoraba el estado inmunológico de los pacientes y presentaban niveles normales de inmunoglobulinas IgG, observando también que estos pacientes fueron tratados menos veces con inmunoglobulinas sustitutivas comparados con aquellos que no tenían proteína (Verhagen et al., 2012).

La deficiencia en la inmunidad humoral se caracteriza por tener una respuesta de anticuerpos pobre a la vacuna polisacárida neumocócica (Becker-Catania and Gatti, 2001) y están reducidas las concentraciones de inmunoglobulinas IgA, IgE e IgG2 (Becker-Catania and Gatti, 2001; Boutin et al., 1987; Exley et al., 2011; Garcia-Perez et al., 2001; Pashankar et al., 2006). Algunos pacientes pueden presentar síndrome de Hiper IgM (HIGM) (Noordzij et al., 2009), este síndrome es observado en quienes carecen AID, y también en aquellos que han perdido otras proteínas que participan de CSR como UNG, ATM y NBS1. El síndrome de HIGM está caracterizado por niveles normales o elevados de IgM, y niveles bajos o ausencia del resto de clases de Igs, indicando la incapacidad de las células IgM positivas para realizar el CSR a otros isotipos (de Miranda et al., 2011).

La inmunodeficiencia que afecta la inmunidad celular presenta características muy diversas. Los pacientes con A-T tienen linfopenia moderada, numerosos estudios han encontrado una disminución en los linfocitos del tipo CD4+/CD45RA+, los linfocitos CD8+ pueden encontrarse en niveles normales o disminuidos, aunque están afectados los linfocitos CD8+/CD45RA+, los linfocitos B suelen encontrarse normales mientras que las células NK están francamente aumentadas (Carney et al., 2012; Exley et al., 2011; Garcia-Perez et al., 2001; Giovannetti et al., 2012;

Giovannetti et al., 2002; Paganelli et al., 1992; Pashankar et al., 2006; Reichenbach et al., 2006; Schubert et al., 2002).

Existen numerosos estudios que han intentado evaluar la inmunidad celular de los pacientes A-T estudiada mediante proliferación celular ante diversos estímulos como PHA, anticuerpos monoclonales anti CD3 o PMA/Ionomicina. Como se puede observar en la Tabla II, hay una heterogeneidad en los resultados hallados en dichos ensayos funcionales. En general, parece haber una disminución en la proliferación cuando fueron utilizadas las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

Tabla II. Evaluación de la proliferación celular en células de pacientes A-T.

Referencia	Cohorte (n=)	Tipo Celular	Proliferación			
			PHA	anti CD3	PMA/IO	Ag soluble
B. Boutin 1987	5	PBMC	↓	↓	ND	ND
R. Paganelli.1992	13	PBMC	↓	ND	ND	Normal
Kondo N.1993	2	PBMC	↓	ND	ND	ND
Rivero, Regueiro 2000	15	Cél. T inmortalizadas c/HVS.	ND	NS	ND	NS C/IL2
García Pérez MA 2001	3	PBMC	NS	NS	↓	NS
Schubert., R.2002	19	PBMC	↓	↓	↓	ND
		CD45RO+	NS	↓	NS	ND

PBMC: células mononucleares de sangre periférica, ND: no determinado, NS: no significativo

Además de la proliferación celular se han medido producción de citoquinas, entre ellas IL2 e IFN γ . Igual que en el caso de la proliferación, los resultados encontrados son muy variados como se puede observar en la Tabla III. Esto podría deberse al tipo celular utilizado y a las características de la cohorte. Llama la

atención que al utilizar líneas de células T inmortalizadas con Herpesvirus Saimiri (HVS) no se encontraron diferencias en la producción de IL2 e INF γ comparándolas con los controles sanos (Rivero-Carmena et al., 2000).

Shubert et al. encontraron una disminución en la producción de IL2 e INF γ cuando utilizaron PBMCs, sin embargo, cuando aislaron los linfocitos CD45/RO no hallaron diferencias significativas excepto cuando se utilizó anti-CD3 como estímulo, donde observaron una disminución de IL2 e INF γ (Schubert et al., 2002).

Tabla III. Producción de citoquinas por células de pacientes A-T.

Referencia.	Cohorte (n=)	Tipo Celular	Producción de IL-2			Producción de INF γ		
			PHA	anti CD3	PMA/IO	PHA	anti CD3	PMA/IO
B. Boutin 1987	5	PBMC	Heterogeneo	Normal	ND	ND	ND	ND
Kondo N.1993	2	PBMC	↓	ND	ND	ND	ND	ND
Rivero, Regueiro 2000	15	Cél T immort e/HVS. May. CD8+	ND	NS	NS	ND	NS	NS
Giovannetti, A.2002	9	PBMC	ND	ND	N	ND	ND	↑ e IL4
Schubert., R.2002	19	PBMC	↓	↓	↓	↓	↓	↓
		CD45RO+	NS	↓	NS	NS	↓	NS
		CD4+						↑
		CD8+	ND	ND	ND	ND	ND	NS
Reichenbach, J 2006	10	ST/PBMC	ND	ND	ND	↓	ND	ND
Pashankar, F 2006	4	PBL	ND	ND	↑	ND	ND	↑

PBMC: células mononucleares de sangre periférica, PBL: linfocitos de sangre periférica, ST: sangre total, ND: no determinado, NS: no significativo, N: normal.

9. Cáncer y Ataxia-telangiectasia.

La pérdida del control de la estabilidad genómica es uno de los pasos necesarios en la carcinogénesis, y permite la acumulación necesaria de mutaciones en poblaciones clonales para adquirir un fenotipo maligno. Como ya habíamos visto, ATM es clave en el mantenimiento de la integridad genómica monitorizando y/o reparando los daños al ADN (DSB) que ocurren tanto de forma fisiológica (recombinación V(D)J, CSR etc.) o de forma accidental (mutaciones y errores en la replicación). En células $ATM^{-/-}$ o $ATM^{+/-}$ la pérdida funcional de la proteína de ATM lleva a una relajación en la vigilancia de las lesiones en el ADN, y estas células son susceptibles ante el daño no reparado, de acumular mutaciones que en última instancia conducen al cáncer (Khanna, 2000). (Figura 8)

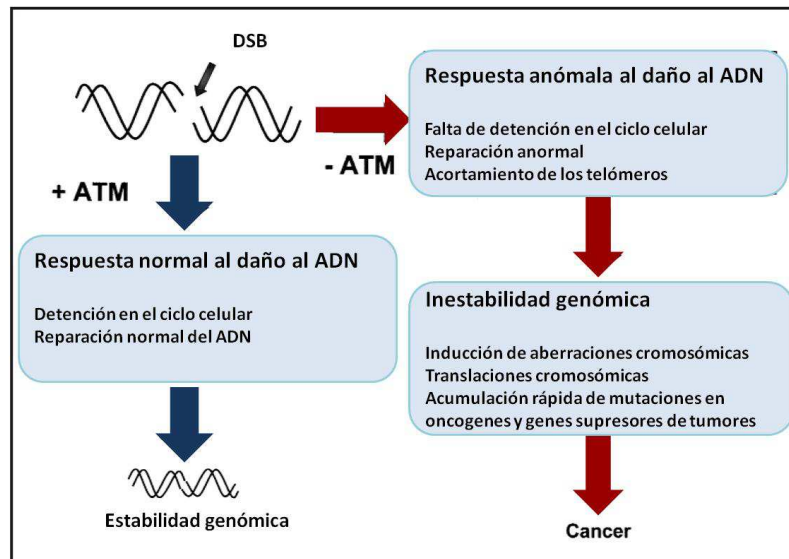


Figura 8. Modelo que explica cómo la pérdida de la función de la proteína de ATM podría promover la carcinogénesis. ATM mantiene la integridad genómica activando funciones celulares monitorizando y/o reparando los daños al ADN (DSB). Un defecto en ATM conduce a una falta de activación de las vías de reparación del daño resultando en susceptibilidad al cáncer.

Además de la inmunodeficiencia y la radiosensibilidad la Ataxia-Telangiectasia tiene como características la aparición de tumores. Así, aproximadamente un tercio de los pacientes con A-T desarrollan enfermedades malignas como linfomas y leucemias, siendo las de origen T las predominantes. Las neoplasias de origen B son menos comunes y tienen una proporción 1:5 con relación a los cánceres de origen T, ocurriendo en su mayoría en niños (Taylor et al., 1996). Además, los pacientes con A-T pueden desarrollar carcinomas como cáncer de mamas y cáncer de tiroides entre otros (Micol et al., 2011). De estos cánceres el 40% son linfomas no Hodgkin, 25% son leucemias, 25% tumores sólidos y 10% son linfomas Hodgkin (Gatti R, 1999).

Se ha asociado la morbilidad y la mortalidad relacionada con cáncer con el tipo de mutación. Así, en los pacientes cuyas mutaciones eran nulas el cáncer fue el factor principal asociado a la muerte (principalmente linfomas y a edad más temprana), mientras que en aquellos otros que poseían mutaciones hipomórficas las causas de muerte fueron mayoritariamente otras (Micol et al., 2011). Reiman et al. observaron que los pacientes cuya ATM carecía de actividad quinasa desarrollaban tumores en la niñez, sin embargo, aquellos otros en los que se detectó una actividad quinasa residual el efecto protector contra el desarrollo de tumores fue notable (Reiman et al., 2011).

9.1 Heterocigotas de ATM y riesgo de cáncer.

Las mujeres portadoras de mutaciones en *ATM* parecen tener un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. Existen varios estudios en los que se ha querido establecer el riesgo relativo de padecer cáncer en los familiares de los pacientes con A-T (Gatti et al., 1999; Thompson et al., 2005). Swift et al. ya sugirieron que familiares femeninos de pacientes con A-T tenían un elevado riesgo de padecer

cáncer, en particular cáncer de mama (Swift et al., 1987). En un estudio más reciente de 132 familias (1160 familiares) se encontraron evidencias de un mayor riesgo de padecer cáncer de mama en portadoras de mutaciones en *ATM* principalmente en edades tempranas, siendo el riesgo relativo de 2.23 en portadoras menores de 50 años. En ese mismo estudio observaron un exceso de riesgo de padecer cáncer colorectal y de estómago (Thompson et al., 2005). Además se ha publicado que mujeres que portan la variante patogénica de *ATM* c.7271T>G, o aquellas que poseen mutaciones que dan lugar a proteínas truncadas, tienen un significativo incremento en el riesgo de cáncer de mama con una penetrancia similar a la conferida por mutaciones en *BRCA2*. Estos estudios son importantes para poder aconsejar a las mujeres que posean estas variantes patogénicas, de modo semejante a la que se hace con las portadoras de mutaciones en *BRCA2* (Goldgar et al., 2011).

Se ha estimado que hasta el 8% de todos los casos de cáncer de mama son portadores de A-T en los Estados Unidos (Swift et al., 1987). Esto supone un dilema, dado que no existe un protocolo adecuado y/o establecido para dichas pacientes, si se debe tener en cuenta que también son sensibles a radiaciones ionizantes y a fármacos radiomiméticos, por lo que pueden no tolerar ciertos medicamentos antineoplásicos. La identificación de dichas pacientes heterocigotas con cáncer, previamente al tratamiento, puede favorecer el uso de regímenes terapéuticos más apropiados.

9.2 Mutaciones. Correlación entre genotipo y fenotipo

La heterogeneidad en A-T ha sido descrita tanto en el laboratorio como en lo que se refiere a los aspectos clínicos. Se presentan de modo variable la susceptibilidad a infecciones pulmonares, presencia y grados de retardo mental y predisposición a leucemia. Aún entre los pacientes con A-T clásica existe variabilidad en el grado de progresión de los síntomas clínicos (Lavin et al., 2007).

Esta heterogeneidad está muy relacionada con las mutaciones en *ATM*. Las mutaciones ocurren a lo largo del gen y cerca del 90% de los pacientes A-T son heterocigotas, portadores de diferentes mutaciones en los alelos de *ATM* (McConville et al., 1996).

De entre las mutaciones publicadas, el 80% predicen la producción de proteína truncada aunque estas son usualmente inestables (Lavin et al., 2004). En general las mutaciones nulas están asociadas a una rápida progresión en los síntomas neurológicos y tienen un fenotipo severo, pero en cambio, fenotipos más suaves han sido observados en pacientes que poseen mutaciones con sentido erróneo con cantidades detectables de proteína de ATM (Becker-Catania et al., 2000; Gilad et al., 1998; Mitui et al., 2009).

De las mutaciones que han sido descritas mencionaremos sólo algunas:

-McConville et al. identificaron la mutación comúnmente referida como 5762ins137 en 14 familias con A-T, la cual está asociada con un fenotipo celular y clínico menos severo. Esta forma de A-T constituye entre el 10 y el 15% de las familias con A-T en el Reino Unido y está caracterizada por inicio tardío de los síntomas y deterioro neurológico lento (McConville et al., 1996).

-La mutación c.7271T>G fue descrita en dos familias cuyos miembros afectados poseían un fenotipo de A-T tanto clínico como celular moderado. En una de las familias se encontraba el paciente con más edad en las Islas Británicas (70 años), posiblemente el paciente con A-T de mayor edad que se ha descrito. Los individuos afectados tenían mínima telangiectasia y sin predisposición a infecciones (Stankovic et al., 1998b).

-La mutación 7636del19 lleva a una delección de 9 nucleótidos (codones 2546-2548), esta pequeña delección desestabiliza a la proteína de ATM y suprime totalmente su actividad quinasa, presumiblemente por interferir en la conformación

de la proteína y/o su capacidad de unirse a otras proteínas. La presencia de esta mutación en uno de los alelos de los pacientes A-T han sido asociadas con una menor supervivencia (Li and Swift, 2000).

-Toyoshima et al. describieron el caso de un japonés, varón de 24 años con AT sin inmunodeficiencia. Había desarrollado ataxia a los 6 años y telangiectasia a los 9, sin embargo no tenía susceptibilidad a infecciones. El análisis demostró la presencia de una mutación con cambio de sentido con la sustitución del amino ácido LEU2656PRO, y además la presencia de una mutación sin sentido con el truncamiento del codón 3047 (Toyoshima et al., 1998).

-Dork et al. describieron a un paciente con una forma atenuada de A-T, que presentaba una doble mutación sin sentido (ASP2625GLU y ALA2626PRO) y una mutación en el corte y empalme (496+5G-A) en el gen de *ATM*. Presentaba trazas de proteína de ATM cuya actividad quinasa residual pudo demostrarse a través de p53. Este resultado confirmó la variabilidad clínica de A-T que parcialmente está determinada por el tipo de mutación e indica que A-T puede presentarse como una enfermedad tardía en la adultez (Dork et al., 2004).

-Se ha descrito una variante de A-T en dos hermanas cuyo inicio de la ataxia se produjo a los 27 años, y que presentaban además polineuropatía, coreoatetosis, y ausencia de telangiectasia, inmunodeficiencia y cáncer. Saviozzi et al. identificaron las mutaciones en el gen de ATM: un cambio 8030 A-G en el exón 57, resultando en una sustitución de TYR2677CYS, y una inserción de 1-pb en el nucleótido 7481 en el exón 52. El análisis por Western Blot mostró bajos niveles de la proteína de ATM con actividad quinasa residual, los autores atribuyen a la presencia de actividad quinasa de la proteína a este tipo de fenotipo intermedio de A-T (Saviozzi et al., 2002).

-La mutación c.3576G>A fue descrita en tres pacientes con A-T sin ninguna relación, un italiano, un turco y uno proveniente de Georgia. Esta mutación causa un splicing aberrante resultando en la omisión del exón 26 (24 del genoma 19). Sandoval et al. supusieron que esta mutación es mas común en Europa del Este que en Alemania (Sandoval et al., 1999).

9.3 Polimorfismos en ATM.

Los polimorfismos o "variantes naturales" en el gen de *ATM* causan: defectos en la activación en los puntos de control del ciclo celular, capacidad reducida para reparar los DSB del ADN y apoptosis anormal. Estos polimorfismos contribuyen a las características propias de A-T que incluyen inestabilidad genómica, aumento en el riesgo de cáncer y neurodegeneración. Existen muchos estudios que tratan de establecer relación entre polimorfismos y susceptibilidad al cáncer, aunque con resultados controvertidos. Así se incluyeron cáncer de mama (Fletcher et al., 2010), cáncer colorectal y cáncer de células pulmonares no microcíticas (Yang et al., 2007).

10. Relación del estudio de haplotipo y etnia

En grupos étnicos específicos bien estudiados el análisis de STR (Short tandem repeats) de 11q23.1 puede ser utilizado para identificar rápidamente haplotipos fundadores. Tabla IV

Tabla IV. Mutaciones patológicas de ATM frecuentes en poblaciones étnicas.

Etnia	ADN. Cambio de Nucleótido	Proteína. Cambio de amino ácido	Frecuencia alélica (%)
	(Alias ¹)		
Afro americanos	c.2851-10T>G	--	-
	(IVS16-10T>G)		
	c.2810_2811insCTAG	p.Glu937AspfsX2	-
	c.7327C>T	p.Arg2443X	-
	c.7926A>C	p.Arg2642Ser	-
Amish	c.1563_1564delAG	p.Glu522IlefsX43	>99
Costarricenses	c.5908C>T	p.Gln1970X	56
	(IVS63del17kb)	--	7
	c.7449G>A	p.Trp2483*	12
	c.4507C>T	p.Gln1503X	12
	c.8264_8268del5)	p.Tyr2755Cysfs*12	4
	(8264del5)		
	c.1120C>T	p.Gln374X	2
Iraníes	c.4852C>T	p.Arg1618X	<5%
	c.8201_8212del11ins6	--	
	(8201del11ins6)		

(Gatti R, 1999)

Tabla IV (cont.) Mutaciones patológicas de ATM frecuentes en poblaciones

étnicas.

Etnia	ADN. Cambio de Nucleótido (Alias ¹)	Proteína. Cambio de amino ácido	Frecuencia alélica (%)
Italianos	c.7517del4	p.Cys252AsnfsX2	16
	c.3576G>A	(Delección del exon 26)	12
	c.391dupT (3894insT)	p.Ser131PhefsX3	Cerdeña (>95%)
Japoneses	c.7883_7887del (7883del5)	p.Ile2629SerfsX25	-
	c.5390+2T>C (IVS33+2T>C)	--	-
Judíos del norte de África	c.103C>T	p.Arg35X	>99
Noruegos	c.3245_3247delATC insTGAT (3245ATC>TGAT)	p.His1082LeufsX14	55
Polacos	c.8313-2A>C (IVS53-2A>C(del159nt))	--	15
	c.6095G>A	(delección del exon 43)	8
	c.7010_7011del (7010delGT)	p.Cys2337SerfsX35	6
	c.5932G>T (5932G>T(del88))	p.Glu1978X	10
	c.1563_1564delAG	p.Glu522IlefsX43	6
Turcos	c.3576G>A		39
	c.5762G>A (5762ins137)		18
	c.7637_7645del (7637del9)	p.Arg2547_Ser2549del	15
Mormones de Utah	c.5395-12A>G (IVS32-12A>G)	--	-
	8494C>T	p.Arg2832Cys	-
	c.9372+1G>A (IVS62+1G>A)	--	-

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26468/>)

11. Terapias potenciales de A-T

Actualmente no hay terapia disponible que pueda curar el progreso de A-T. Como se ha mencionado, es posible aliviar algunos de los síntomas asociados a la inmunodeficiencia y otros, pero no puede prevenirse la neurodegeneración. Actualmente se están llevando a cabo diversos estudios que intentan mejorar o revertir los síntomas de A-T, mencionaremos algunos de los que se encuentran en estado activo (www.clinicaltrials.gov):

11.1 Estudio para el tratamiento del cáncer en niños con Ataxia-Telangiectasia (Treatment of Cancer in Children With Ataxia-telangiectasia).

Este estudio está diseñado para investigar la viabilidad de tratar a niños con diagnóstico de A-T y cáncer, con regímenes casi tan intensos como lo recibirían los pacientes no A-T. La intervención se dará con los siguientes fármacos:

- Vinblastina, vincristina, prednisona, daunorubicina,
- doxorubicina, metotrexate, cyclophosphamida, L-asparaginasa
- Etoposido, cytarabina, mercaptopurina
- Dexametasona, procarbazona.

Procedimiento: quimioterapia, quimioterapia intratecal, terapia esteroide.

(<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00187057>)

11.2 Terapias dirigidas a las mutaciones.

La mayoría de los pacientes A-T heredan dos mutaciones distintas, una por cada alelo. Cualquier esfuerzo por corregir el gen mutado debe ser casi hecho a medida para la mutación individual, no siendo necesario la restauración total de niveles normales de proteína porque aún niveles bajos (~5-10%) en algunos pacientes resulta en fenotipos leves (Taylor and Byrd, 2005).

Se ha empleado aminoglucósidos para la corrección de la función del gen de *ATM* por lectura del codón de terminación prematuro, y para conseguir la expresión funcional de proteína de ATM. A pesar de los logros obtenidos, el uso de aminoglucósidos en concentraciones efectivas es tóxico tanto para las células como para el ser humano (Lavin et al., 2007).

Recientemente Lee et al. han publicado los resultados obtenidos de la diferenciación de las células madre pluripotentes inducidas de paciente A-T a células de Purkinje, y su posterior tratamiento con pequeñas moléculas capaces de saltarse un codón de parada prematuro (*SMRT small molecule read trough*). El resultado ha sido la restauración de la actividad de ATM y la mejora en la respuesta al daño de ADN. Estos datos sugieren que la reprogramación de células de pacientes A-T al estado pluripotencial, permite a un nuevo paradigma para la identificación y caracterización de compuestos SMRT que puedan probarse clínicamente para restaurar la actividad de ATM y mejorar la capacidad de reparar el ADN (Lee et al., 2013).

Otra estrategia es la utilización de oligonucleótidos antisentido morfolino (AMOs) para la corrección del corte y empalme en las mutaciones de ATM. Se ha probado para redireccionar y restaurar el corte y empalme normal en el gen de *ATM* ocultando los sitios aberrantes de los mismos, y permitiendo la expresión normal del ARNm. La eficiencia de traslación de éste ARNm a proteína fue del 30% después de haber sido expuestas las células por 3.5 días con los AMOs, y se demostró que la proteína tenía actividad quinasa, todavía falta por resolver preguntas antes de que pueda ser utilizado en terapéutica humana (Du et al., 2007).

11.3 Terapia génica y A-T

La terapia génica ha conseguido resultados en pacientes afectados con inmunodeficiencias, estos resultados se han logrado mediante transducción de las células progenitoras hematopoyéticas con vectores oncoretrovirales, estos vectores contenían un gen sano capaz de sustituir al mutado. Desde el primer resultado positivo de terapia génica al restaurarse el sistema inmunológico de tres niños con inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X (SCID-X1) (Cavazzana-Calvo and Hacein-Bey-Abina, 2001), se han probado en muchas otras patologías (Aiuti et al., 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2002; Ott et al., 2006).

El hecho de que A-T sea una enfermedad monogénica, y que la terapia génica con modelos animales se esté aplicando en otras enfermedades como la hemofilia (Waddington et al., 2004), talasemia (Imren et al., 2002), anemia de Fanconi (Yamada et al., 2003) y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Singer et al., 2005) o Parkinson, hace plantear a la terapia génica como alternativa terapéutica para la Ataxia-Telangiectasia.

Estudios previos han demostrado que la introducción de un cADN normal de *ATM* en células deficientes, resultaron en la reconstitución funcional de las células de pacientes (Cortes et al., 2003; Qi et al., 2004). El significado biológico de estos estudios *in vitro* donde se demostró la reconstitución funcional de las células fue confirmada *in vivo* en modelos animales (Cortes et al., 2006).

La longitud considerable del cADN de *ATM* (9.1kb), hizo que en los estudios mencionados se haya utilizado el vector amplicón HSV-1 o el vector amplicón híbrido HSV/AAV, los cuales son capaces de portar transgenes extensos, pero la naturaleza de estos vectores hace incompatible la aplicación clínica humana debido a que son muy patogénicos e inmunogénicos (Epstein, 2005).

Una alternativa en el intento de terapia génica en pacientes A-T es la utilización de vectores lentivirales, en este campo nuestro grupo tiene una extensa experiencia, y ha sido capaz de desarrollar nuevos vectores con las siguientes características: bioseguridad mejorada, tejido específico y expresión fisiológica del transgen (Martin et al., 2005; Romero et al., 2011; Toscano et al., 2008).

El beneficio clínico del paciente sería significativo si se pudiera dar la expresión del transgen terapéutico aún en pequeñas cantidades, dado que es un hecho que el mantenimiento de cantidades residuales de proteína funcional de ATM en los pacientes, redundaría en mejora de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, como se evidencia en una menor tasa de tumores en la infancia y de infecciones (Reiman et al., 2011).

Objetivos

4. Objetivos

La Ataxia Telangiectasia es una enfermedad genética autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen *ATM*. A pesar de que se han identificado un gran número de mutaciones que afectan a toda la extensión de este gen, no existe ningún estudio que haya analizado el mapa de mutaciones en pacientes españoles. Esta circunstancia se complica aún más por el hecho de que el diagnóstico de A-T en España se ha realizado mayoritariamente atendiendo a la presentación clínica de la enfermedad, no conociendo por tanto la mutación causante de la misma ni sus consecuencias sobre la actividad funcional de la proteína deficiente.

De la misma manera, hay muy pocos estudios hasta la fecha que hayan analizado las alteraciones causadas en células T primarias de los pacientes con A-T, debido sobre todo a la dificultad de obtención de estas células. Igualmente, no se han realizado estudios dirigidos a la caracterización pormenorizada de defectos presentes en células vírgenes y memoria.

En razón a lo anterior, nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- 1.- Caracterización molecular y expresión funcional de ATM en una cohorte de pacientes españoles con diagnóstico clínico de Ataxia-Telangiectasia, para conocer la mutación causante, así como la expresión de la proteína ATM y su actividad funcional.
- 2.-. Caracterización de defectos celulares presentes en un panel de líneas T aloespecíficas derivadas de linfocitos periféricos de pacientes con diagnóstico clínico de A-T, así como en células T vírgenes y memoria obtenidas de sangre periférica de estos pacientes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de sangre periférica.

La sangre periférica fue obtenida mediante veno-punción (previo consentimiento informado) en tubos con heparina sódica, de la cual una parte fue reservada para la obtención de DNA genómico, otra para la obtención de líneas aloespecíficas, obtención de células CD4 vírgenes y memorias , y una pequeña parte para la determinación de las poblaciones linfocitarias.

2. Líneas celulares de individuos normales y pacientes A-T, medios de cultivos, reactivos.

La obtención de líneas primarias aloespecíficas se realizó por el método previamente descrito (Molina et al., 1992). Las células mononucleares de sangre periférica fueron obtenidas por separación en gradiente de densidad por centrifugación (2200rpm 20 minutos a 20°C), y cocultivadas en proporción 1:1 con células Raji (células B linfoblastoides con MHC-II) previamente inactivadas con Mitomicina C 1mg/mL (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) a 37°C en baño durante una hora.

Las líneas de células T aloespecíficas se cultivaron a concentración óptima en medio Panserin (PAN Biotech. Aidenbach, Germany) suplementado con 10% de suero bovino fetal (GIBCO, Invitrogen, Auckland, New Zealand), Glutamax (BioWhittaker) al 1%, Penicilina/ Estreptomicina (BioWhittaker) al 1% y 50 UI/ml de rIL-2 (Hoffman-La Roche, Nutley, NJ), obtenida a través del AIDS Reagents Reference Program. Se realizaron re-estimulaciones cada 7 días.

La línea celular Raji (linfocitos B de linfoma humano) se cultivó en RPMI 1640 (BioWhittaker, Verviers, Belgium) suplementado con 10% de suero bovino fetal descomplementado (GIBCO), Glutamax al 1% y Penicilina/ Estreptomicina al 1%

(Sigma-Aldrich). Las células fueron mantenidas a 37° C de temperatura en atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

3. Separación de células vírgenes y memorias para la determinación de citoquinas en controles sanos y pacientes A-T.

3.1 Separación: La sangre fue diluida con PBS y la obtención de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron obtenidas por separación en gradiente de densidad de Ficoll Histopaque (Sigma Aldrich), como se indicó anteriormente. Obtenidas las células mononucleares se dividió en partes iguales para la separación de células vírgenes y células memoria. En ambos casos se utilizaron kits de separación: *Naive CD4+ T Cells Isolation Kit* y *Memory CD4+ T Cells Isolation kit de MACS* (Miltenyi Biotec, California, USA).

La suspensión celular se centrifugó a 300g durante 10 minutos, tras los cuales se aspiró el sobrenadante y se resuspendió en 40ul de tampón PBS (pH:7.2, conteniendo 0.5% de BSA (Sigma Aldrich) y 2mM de EDTA) por cada 10×10^6 células. A ésta dilución se agregó 10ul de Naive CD4+ T cell biotin antibody y 10µL de Memory CD4+ T cell biotin antibody incubándose durante 10 minutos en el frigorífico (2-8°C), pasado el tiempo se agregó 30 µL de tampón frío y 20 µL de anti biotin MicroBeads incubándose otros 15 minutos de 2-8°C. Por último se realizó un lavado con 2mL de tampón frío centrifugándose a 300g durante 10 minutos.

Para realizar la separación magnética se resuspendió el pellet celular en 500µL de tampón y se utilizó columnas de separación MS de MACS (Miltenyi Biotec). Las columnas fueron preparadas lavándolas con 500µL de tampón sin formar burbujas, se dispensó la suspensión celular y se hicieron tres lavados con el tampón frío. La

fracción negativa correspondían a las células de interés, una pequeña parte se utilizó para determinar la pureza mediante citometría de flujo y el resto para posterior estimulación celular.

3.2 Pureza de la fracción negativa: se dispensó 50 μ L de la suspensión celular obtenida de la separación magnética en tubos de citometría. Un tubo para los controles de isotipo: FITC IgG1 de ratón (Biolegend, San Diego, USA), PE IgG1 de ratón (eBiosciencie, San Diego, USA) y otro tubo para determinar CD4-FITC (clon RPA-T4, Biolegend) y CD45RO-PE (clon UCHL1, eBiosciencie) en la fracción negativa de las células memorias y CD4-FITC (clon RPA-T4, Biolegend) y CD45RA-PE (clon HI100, eBiosciencie) en la fracción negativa de las células vírgenes.

La incubación se realizó durante media hora en frío, se lavaron con PBS durante 5 minutos a 1500rpm y se resuspendió en 200 μ L de PBS realizándose la lectura en el citómetro de flujo FacsCalibur (BD).

3.3 Estimulación: Una vez corroborado la pureza se procedió a la separación en placa de 48 pocillos a una concentración 10^6 /mL: un pocillo fue utilizado para las células no estimuladas (control) y otro para las células estimuladas con PMA a 10ng/mL (Sigma Aldrich) más Ionomicina 5 μ g/mL (Sigma Aldrich).

La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 24hs, en las seis últimas horas se incubó con el inhibidor de transporte de proteína GolgiPl μ g (BD) que contiene Brefeldina A.

3.4 Determinación de citoquinas intracelulares: Una vez transcurrido el tiempo se recogieron las células y se congelaron los sobrenadantes a -20°C para la determinación posterior de citoquinas. Las células fueron fijadas y permeabilizadas con Cytofix/Cytoperm (BD) durante 20 minutos en frío y en movimiento, tras los cuales se lavaron con 2mL de tampón PermWash (BD) a 800g durante 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se procedió a la incubación

de las células con los siguientes anticuerpos: control de Isotipo: PE IgG1 y APC IgG1 ambos de ratón (eBiosciencie); IL2/PE (BD); IL17-A/PE (clon eBio64CAP17) (eBiosciencie) y anti INF- γ /APC (clon 4S.B3) (eBiosciencie). Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C tras los cuales se realizó un lavado con 2mL de Perm/Wash y un último lavado con PBS a 800g durante 5 minutos, se decantó y se resuspendió en 200mL de PBS para su posterior análisis en el citómetro de flujo (FacsCalibur. BD). El análisis se realizó con el programa Cell Quest (BD Biosciencias) y el análisis bioestadístico con el programa GraphPad Prism 6. El valor de " p " está basado en la prueba de Two-Way ANOVA. $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (**), $p < 0.001$ (***) , $p < 0.0001$ (****).

3.5 Determinación de citoquinas en sobrenadante.

Para la determinación de citoquinas en el sobrenadante de las células estimuladas vírgenes y memoria se utilizó el *Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex RTU FlowCytomix Kit* (eBiosciencie Viena-Austria), cuyas perlas fluorescentes llevan unidos los anticuerpos monoclonales de las citoquinas a determinar.

Una vez que las perlas fluorescentes están en contacto con la muestra, hay unión antígeno anticuerpo y un segundo anticuerpo conjugado con biotina se une a los analitos capturados por el primer anticuerpo. A continuación se añade Estreptavidina-PE que se une a la biotina conjugada y emite señales fluorescentes. La cantidad de citoquinas presentes en el sobrenadante es por tanto proporcional a la fluorescencia emitida por las perlas conjugas, con las que se realiza una curva patrón. Una vez acabado el procedimiento se procedió a la lectura en el citómetro de flujo FacsCanto. El análisis se realizó con el programa FlowCytomix Pro Software (eBiosciencie), y el posterior análisis bioestadístico mediante el programa GraphPad6 Prism. El valor de " p " está basado en la prueba de Two-Way ANOVA. $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (**), $p < 0.001$ (***) , $p < 0.0001$ (****).

Las citoquinas determinadas fueron: Grupo Th1: INF- γ , IL-2, IL1- β , IL12-p70; grupo Th2: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13; grupo Th9: IL-9; grupo Th2: IL-22, TNF- α ; grupo Th17: IL-17A.

4. Fenotipo de las células aloestimuladas.

Las líneas celulares aloespecíficas de pacientes con A-T y derivadas de individuos sanos fueron lavadas con PBS y dispensadas en tubos de citometría a una concentración de 5×10^5 células/tubo. Las células fueron marcadas con los siguientes anticuerpos: controles de isotipo IgG1 FITC (Biolegend), IgG1 PE (eBiosciencie), IgG1 PE CY5.5 (BD); CD4 FITC (Biolegend); CD45RO/PE y CD45RA/PE (eBiosciencie); CD56/PE y CD19/FITC (BD); CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PECY5.5 (BD). Las células fueron incubadas durante 30 minutos en hielo, se realizó un lavado con PBS y se resuspendieron en 200ul de PBS para su posterior lectura en el citómetro de flujo FacsCalibur (BD).

5. Estimulación de líneas aloespecíficas para la determinación de marcadores de activación.

Las líneas celulares aloespecíficas de pacientes con A-T y de individuos sanos se encontraban en reposo entre el 8-15 día post estimulación aloespecífica. Las células fueron además privadas de IL2 durante 24hs antes del experimento y fueron recolectadas del cultivo, se realizó un lavado con PBS y se resuspendieron para su posterior conteo con la cámara de Neubauer.

Las células se dispusieron a 10^6 /mL en placa de 24 pocillos, un pocillo con las células no estimuladas (control), otro con PMA 10ng/ml más Ionomicina 0.5 μ g/mL, y un último pocillo con partículas estimuladoras CD3/CD28 Dynabeads (Dyna) en proporción 1:1. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 24hs.

Tras 24hs de incubación las células fueron recolectadas y lavadas con PBS, se centrifugaron 5 minutos a 1500rpm y se distribuyeron en tubos para la incubación con los siguientes anticuerpos: controles de isotipo PE IgG1 de ratón (Caltag), APC IgG1 anti ratón (BD); anticuerpo primario ratón anti humano CD40L (AbCamb); anti ratón en APC (BD), y anti humano CD69/PE (Caltag). Tras media hora de incubación del anticuerpo primario y posterior lavado con PBS durante 5 minutos a 1500rpm, se realizó la incubación con el secundario y el anticuerpo directo, después de un último lavado con PBS se resuspendió en 200 μ L de PBS para su lectura en el citómetro FacsCalibur (BD).

6. Determinación del ciclo celular en células aloestimuladas de pacientes y controles inducida tras irradiación gamma.

Para la determinación del ciclo celular las células fueron aloestimuladas y puestas en placas de 6 pocillos a la concentración de 10^6 /mL en medio completo y suplementado con IL2. Las placas utilizadas fueron cuatro: una correspondiente a las células no irradiadas y tres a las irradiadas con 1, 2 y 5 Gy respectivamente. Se irradiaron en el servicio de la Unidad de Radiología Experimental del Centro e Instituto CIC de la Universidad de Granada, utilizando el irradiador gamma J.L. Shepherd modelo MARK 1-30, con 1,000 Ci de actividad de Cs-137. Una vez irradiadas, se mantuvieron en cultivo y se tomaron parte de las células en días sucesivos a las 24, 48, 72 y 96 horas post irradiación.

El análisis del ciclo celular fue realizado recolectando las células y dispensándolas en tubos de citometría, lavadas con 2ml de PBS, se decantaron los tubos y para la fijación se agregó a cada uno 100 μ L de PBS y 900 μ L de etanol al 70%, después de 5 minutos se procedió a un lavado con PBS a 3500rpm durante 3 minutos tras los cuales se retiró el sobrenadante. Para la extracción de ADN se agregó 250 μ L de PBS y 250 μ L de tampón de extracción de ADN (0.2M de NaHPO_4 , 0.1M de

ácido cítrico pH: 7.8) precalentado en baño a 37°C, se incubó a 37°C durante 10 minutos y se realizó una última centrifugación a 3500rpm durante 3 minutos. Para la tinción del ADN se agregaron 200 µL de la solución de Ioduro de Propidio y RNAsa (40µg/mL y 100ng/ml respectivamente), los tubos fueron incubados a 37° durante 30 minutos en oscuridad tras los cuales se procedió a la lectura en el citómetro FacsCalibur (BD). El análisis del pico sub-G1 del ciclo celular se realizó midiendo la fluorescencia del ADN con los detectores FL2/FL3.

Para el análisis de la parada en G2 se utilizó una plantilla en la cual se eliminaron los dupletes y tripletes, y el análisis en ambos casos se realizó con el programa Cell Quest (BD Biosciencias).

7. Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot a partir de extractos nucleares de pacientes y de individuos sanos.

Las muestras celulares para la determinación de la proteína de ATM fueron recogidas a partir del 7º día post estimulación para evitar posible contaminación de células Raji. Las células fueron recolectadas y lavadas con PBS para posteriormente ser trasvasadas a tubos de 1.5 mL, estos tubos se centrifugaron a 3500rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 400 µL del tampón A frío (10mM Hepes pH:7.6, 10mM KCL, 0.1 mM EDTA, 0.1mM EGTA). Antes del uso del tampón A se añadieron los siguientes reactivos: 5 µL DTT 1M, 25 µL de PMSF 100Mm, 50 µL de Molibdato, 10 µL del coctel de inhibidor de las proteasas (solución 1:10) (Sigma Aldrich) y 10 µL de inhibidor de las fosfatasas (solución 1:10) (Roche, Indianapolis, IN, USA).

Una vez añadido el tampón A se mantuvieron en hielo durante 15 minutos, tras los cuales se añadieron 12.5 µL de NP40 al 20% y se mezclaron en un Vórtex durante 10 segundos. Los tubos se centrifugaron a 13000rpm durante 30 segundos tras los cuales se descartó el sobrenadante, se lavaron posteriormente dos veces con

300 μ L del tampón A aspirando lentamente y evitando levantar el pellet. Finalmente se agregaron 50 μ L de tampón C (20mM Hepes pH:7.6, 400mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA). Antes del uso del tampón C se agregaron los siguientes reactivos: 1 μ L de DTT 1M, 5 μ L de PMSF, 10 μ L de Molibdato, 2 μ L de un coctel de inhibidor de las proteasas (Sigma Aldrich) y 2 μ L de inhibidor de las fosfatasa (Roche). Los tubos se incubaron durante 15-30 minutos en agitación a 4°C, pasado el tiempo se centrifugaron durante 5 minutos a 3500rpm y se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos. Los extractos se guardaron a -20°C hasta su análisis.

Detección de ATM fosforilada y sustratos directos de ATM: la proteína de ATM normalmente se encuentra formando dímeros en estado inactivo, pero ante el daño a la doble hebra de ADN (por ejemplo por radiación ionizante como la radiación gamma), la proteína se autofosforila desencadenando una serie de fosforilaciones.

Para detectar la proteína de ATM en su forma fosforilada, los sustratos directos de ATM como NBS1 y p53, y la forma fosforilada de H2AX (γ H2AX), las células tanto de paciente como de individuo sano fueron separadas en placas de seis pocillos, guardándose una para control, y otras dos fueron sometidas a la irradiación con dosis de 1 y 5 Gy. Una vez irradiadas las células se esperó una hora antes de empezar el protocolo de extracción de proteínas nucleares.

Para la detección de proteínas de elevado peso molecular como ATM, NBS1 (y sus formas fosforiladas) y PARP, fueron utilizados 35 μ g de extracto nucleares que se separaron mediante gel SDS-PAGE (al 5% en condiciones reductoras). Las proteínas de bajo peso molecular como p53, fosfo p53 y γ H2AX fueron separadas en gel SDS-PAGE al 12%. Tras la separación, las muestras fueron electrotransferidas 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 10% de leche desnatada en polvo a temperatura ambiente. Una vez terminado el bloqueo, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal correspondiente: anti-Atm(1A1) de ratón (clon:sc-73615, Santa Cruz Biotech.); anti ATM pS1981 de ratón (clon: 10H11E12, Rockland); NBS1 p95 S343 de conejo (Cell Signalling, Darmstadt, Germany); anti NBS1 de ratón (clon 34/NBS1, BD); γ H2AX de conejo (clon sc-101696, Santa Cruz Biotech.); anti PARP de ratón (Santa Cruz Biotech.); anti P53 y anti pP53 S15 (Santa Cruz Biotech.).

Los anticuerpos fueron preparados a las concentraciones recomendadas en la solución de bloqueo diluida 1/10 con PBS-Tween, e incubadas durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, tras tres lavados de 5 minutos con PBS Tween, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente anti Igs de ratón o anti Igs de conejo, ambos de cabra conjugado con HRP (dilución 1:5000) (Caltag, Burlingame, CA, USA). La incubación se llevó a cabo durante una hora a temperatura ambiente, tras los cuales se realizaron tres lavados con PBS-Tween, las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (ECL Advance Western Blotting Detection Kit, Amersham, GE Healthcare UK) en el FUJI Film LAS-4000 y analizadas con el programa Multi Gauge.

8. Cuantificación del ARN mensajero mediante PCR cuantitativa.

La extracción de ARN total de los linfocitos T aloestimulados se realizó mediante desnaturalización con Trizol (Invitrogen), a partir del 7º día post estimulación con el fin de evitar posibles contaminaciones de células Raji.

Las células fueron recogidas, lavadas con PBS y resuspendidas en 1mL de Trizol (Invitrogen), e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después se realizó una extracción orgánica con cloroformo y tras

centrifugación a 13000rpm se recogió la fase acuosa para la precipitación del ARN con Isopropanol. Una vez precipitado el ARN, se procedió al lavado con etanol al 75% preparado con agua DEPC (dietil pirocarbonato, Sigma-Aldrich), se hidrató durante 10 minutos a 55°C con 20 µL de H₂O-DEPC.

La medida de la concentración del ARN se llevó a cabo a 280 nm en NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.). El ADN complementario (ADNc) usado como molde para la realización de la PCR cuantitativa (Q-PCR) se obtuvo por la realización de la transcripción en reverso (Reverse Transcription system Promega) de 1µg de ARN total extraído de las células T aloestimuladas, usando como cebador oligo dT. El proceso de retro transcripción se realizó en 3 ciclos: 1X (70°, 10'); 1X (42°, 60'); 1X (95°, 5' / 4°, 5'). La Q-PCR fue realizada en 7500 RT PCR System Applied Biosystem (Paisley, UK), la amplificación de la reacción se realizó en un volumen final de 25ul con 1ul de ADNc con FastStart SYBR green master (Roche) en el que contiene SYBR Green específico de ADN de doble cadena. Los resultados de las Ct de diferentes muestras con respecto al gen de ATM fueron normalizadas con respecto al gen constitutivo de β-actina.

Antes de realizar el experimento se realizó una curva estándar con los cebadores tanto del gen de ATM como para los de β-actina, utilizando diferentes volúmenes de ADNc de un individuo sano siendo 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 µL. El amplicón obtenido fue de unas 200pb.

Los cebadores utilizados para ATM en la amplificación cubrían los exónes 23 y 24 y flanqueaban el intrón 23:

Forward: 5' TGTTCAGGACACGAAGGGAGA 3'

Reverse: 5' CAGGGTTCTCAGCACTATGGGA 3'

Para la β -actina

Forward: 5' AGCCTCGCCTTTGCCGATCC 3'

Reverse: 5' ACATGCCGGAGCCGTTGTGCG3'

Las condiciones de la Q-PCR fueron 1X(50°C, 2'); 1X(95°C, 10'); 40X(95°C,15' /60°C,1').

9. Ensayo de clonogenicidad inducida por radiación.

El ensayo de clonogenicidad o CSA (Colony Survival Assay) es un método modificado del descrito por Yong K. Huo (Huo et al., 1994), cuya principal diferencia es la utilización de linfocitos T aloestimulados y no líneas de linfocitos B inmortalizadas con el virus de Epstein Barr.

Primeramente se determinó la tasa de crecimiento de las líneas celulares, para lo que se utilizaron células en el segundo día posterior a la aloestimulación (éstas células se encontraban en plena proliferación celular, así, la parada de crecimiento sólo se daría por la radiación y no por el estado de reposo). El experimento se realizó en placa de 96 pocillos con diluciones de 100-2000 células por mililitro de cultivo, siendo la concentración elegida fue aquella en la cual las colonias formadas pudieron ser observadas sin dificultad, y que resultó ser de 750 células/mL.

El experimento se realizó con 100ul a la concentración de 750 células/mL en placa de 96 pocillos, por cada línea se utilizaron dos placas, una como control y otra irradiada a la dosis de 1Gy. Una vez irradiadas las placas fueron mantenidas en cultivo entre 9-12 días, el día de la lectura se añadió 100ul de MTT (Sigma Aldrich) a la concentración de 1mg/mL y se incubó al menos una hora para facilitar la observación de las colonias. Los pocillos que fueron considerados como positivos fueron aquellos cuyas colonias estaban constituidas como mínimo por 32 células y

tuvieran un color violáceo, señal de la viabilidad celular. Fueron observados 48 pocillos por línea.

Para calcular la fracción superviviente (SF, survival fraction), se utilizó la siguiente fórmula:

$$SF = [CFE_i / CFE_c] \times 100$$

$$CFE = -I_n F / W$$

CFE: es la eficiencia de formación de colonias (Colony forming efficiency **CFE_i** irradiadas, **CFE_c** control), **F** es el número de pocillos negativos y **W** es el número de células sembradas.

Se utilizó la siguiente escala de radiosensibilidad (Sun et al., 2002).

Normales: >36% de SF

Intermedios: entre 36-21%

Radiosensibles: <21% de SF

10. Secuenciación del gen de ATM de pacientes A-T mediante secuenciación masiva.

Un volumen de 2.5 ml de sangre total obtenida de los pacientes con A-T fue preservada a -80°C en tubos de 15mL hasta su procesamiento en el "Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica. Genyo" (Granada). La obtención de ADN genómico se realizó por los siguientes métodos: QIAamp DNA Mini and Blood Mini (QIAGEN/QIACUBE) y QIAamp Blood and Tissue Kit (QIAGEN) (Hilden-Germany).

La secuenciación masiva se realizó con el instrumento SOLiD (Applied Biosystems) y su fundamento es el siguiente:

El ADN genómico completo se fragmentó y mediante ligación se le añadieron secuencias adaptadoras a los extremos, del cual se seleccionaron los fragmentos que codifican nuestra zona de interés (lo que se conoce como *Targeted Resequencing*). Los fragmentos de ADN seleccionados se amplificaron mediante una PCR en emulsión, cada una de las micelas formadas en la emulsión fue utilizada como una entidad a secuenciar.

Tras liberar los productos de la PCR de la emulsión se realizó la secuenciación. Durante ciclos sucesivos se fueron marcando los fragmentos con fluorocromos, alternando ciclos de terminación reversible cíclica CRT (*cyclic reversible termination*). La reacción CRT utiliza terminadores reversibles para incorporar nucleótidos marcados fluorescentemente, que a continuación son «fotografiados» en la toma de imágenes y posteriormente son procesados. En cada uno de los ciclos, tras haber marcado las bases, se realizó la toma de imágenes (*imaging*).

Las secuencias cortas producidas por el instrumento a partir de los extremos del ADN con los adaptadores se denominan lecturas o *reads*. Se generan lecturas a partir de cada uno de los extremos de un fragmento de ADN (el inserto), dando lugar a lecturas apareadas.

La genoteca o librería generada en este caso recibe el nombre de *paired end* y que en nuestro caso las lecturas apareadas fueron de 75pb en dirección directa (forward) y 25pb en sentido inverso (reverse). Estas genotecas se crearon a partir de fragmentos de ADN que oscilaban entre 250pb y 275pb, estas genotecas llevan integradas en su zona terminal un adaptador de secuencia conocida, característico de cada una de las muestras, denominada código de barras que sirve tras su secuenciación, para diferenciar qué muestra es cada una de entre las lecturas

realizadas. Por tanto, finalmente de cada fragmento obtuvimos la lectura de 105pb (75/25/5).

Para realizar la genoteca los fragmentos de ADN se obtuvieron mediante sonicación, que al ser sometidos a una frecuencia de ultrasonidos dirigida produjo fragmentación al azar. Posteriormente a la sonicación, fueron purificados y seleccionados los fragmentos que se encontraban en el rango de estudio (250-275pb).

Previo a la secuenciación se realizó lo que se denomina secuenciación dirigida (*o Targeted Resequencing*), que es una selección de la zona a secuenciar, en nuestro caso nuestra zona de interés es el gen *ATM*. Mediante esta técnica sólo un gen o subconjunto de genes o regiones definidas en un genoma se secuenciará, permitiendo y facilitando el análisis de los datos. También permite obtener una cobertura de secuencia más alta durante una sola ejecución. Para realizar este proceso se procedió a un enriquecimiento de la zona gracias a una técnica denominada enriquecimiento con un objetivo seleccionado (*sure select target enrichment*). Gracias a esta técnica conseguimos que la gran mayoría de las lecturas obtenidas mapeen con nuestro gen estudiado.

6. Resultados

1. Caracterización molecular de una cohorte de pacientes con diagnóstico clínico para Ataxia-Telangiectasia.

Para lograr el primer objetivo, nos propusimos reclutar a una cohorte de pacientes con diagnóstico clínico compatible con Ataxia-Telangiectasia, con el objeto de: (i) analizar la presencia de ARN mensajero, (ii) detectar la expresión de proteína y actividad quinasa de la proteína de ATM y (iii) determinar las mutaciones en el gen de ATM de cada paciente.

Los pacientes nos fueron remitidos para el estudio desde los distintos puntos de la geografía española gracias a la colaboración con la AEFAT (Asociación Española Familia Ataxia Telangiectasia) y con el apoyo de los distintos centros que se indican en la Tabla V.

Una vez llegada la sangre del paciente al laboratorio, se procedió a la obtención de las células mononucleares por gradiente de densidad para la generación de líneas T aloespecíficas como hemos indicado en los Materiales y Métodos. En la Figura 8 se observa el número de PBMC's (10^6 /mL de sangre) de los pacientes y de controles sanos. La diferencia entre ambos grupos ha sido significativa ($p < 0.01$. Prueba T).

Tabla V. Pacientes reclutados para el estudio de A-T.

	Procedencia
ATMp1	Hospital Virgen de las Nieves. Granada
ATMp3	Hospital Virgen de las Nieves. Granada
ATMp4	Hospital Virgen de las Nieves. Granada
ATMp5	Hospital Virgen de las Nieves. Granada
ATMp6	Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba
ATMp7	Hospital Virgen de las Nieves. Granada
ATMp8	Hospital Virgen de las Nieves. Granada
ATMp9	Pontevedra
ATMp10	Málaga
ATMp11	Feirrol. La Coruña
ATMp12	Burgos
ATMp13	Burgos
ATMp14	Alicante
ATMp15	Oliva. Valencia
ATMp16	Lalín. Pontevedra
ATMp17	Hospital Sant Joan de Déu. Barcelona
ATMp18	Hospital Sant Joan de Déu. Barcelona
ATMp19	Hospital Sant Joan de Déu. Barcelona
ATMp20	Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia
ATMp21	Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia
ATMp22	Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia
ATMp23	Hospital Principe de Asturias. Alcalá de Henares. Madrid
ATMp24	Vitoria
ATMp25	Madrid
ATMp26	Hospital Virgen de las Nieves. Granada
ATMp27	Hospital Sant Joan de Déu. Barcelona
ATMp28	Segovia

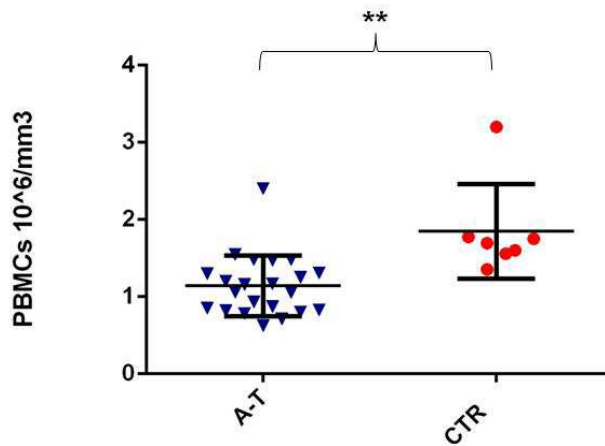


Figura 8. Recuento total de células cononucleares de sangre periférica (PBMC's) de controles sanos y pacientes A-T. Las PBMC's se obtuvieron por gradiente de densidad y se procedió al conteo en cámara de Neubauer, se expresan los valores en 10⁶/mL de sangre total ($p < 0.01$ Prueba T).

(i) Detección de la presencia de ARN mensajero:

Para la detección y cuantificación de mRNA se procedió a su extracción mediante Trizol, tanto de las líneas de los pacientes como las de un control sano (N1). La Figura 9 muestra los niveles de expresión de mRNA detectada mediante PCR cuantitativa (Q-PCR) de los pacientes ATMp1 al ATMp28.

Con la utilización de los cebadores descritos en Materiales y Métodos podemos observar que la expresión de mRNA está muy disminuida en los pacientes comparándolos con el control sano N1. Sólo se observa una expresión residual en los pacientes ATMp3, ATMp4, ATMp5 y ATMp13. Los niveles observados en el paciente ATMp1 representan alrededor del 25% de los niveles normales (Figura 9).

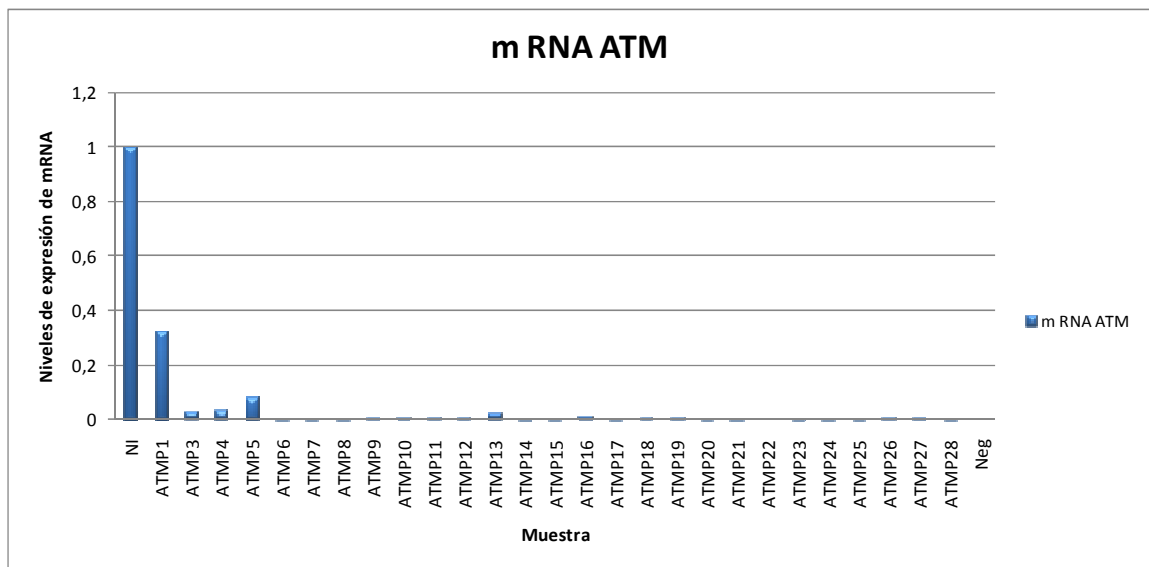


Figura 9. Expresión de mRNA de ATM mediante Q-PCR en líneas de pacientes y de control sano (N1). Los valores obtenidos para las líneas de pacientes están calculados con respecto al control. El incremento está en relación a N1.

(ii) **Análisis de la expresión de la proteína ATM y de su actividad quinasa.**

Como habíamos mencionado en la Introducción, una prueba de laboratorio confirmatoria de la enfermedad es la detección de la proteína ATM por Western Blot. La proteína ATM puede encontrarse ausente en el 90% de los pacientes con A-T, mientras en algunos (10%) pueden presentarse trazas y sólo el 1% tienen cantidades normales de proteína pero que carecen de la actividad quinasa. La actividad quinasa de ATM constituye una prueba importante para evaluar la función la proteína e identificar casos raros de A-T que presentan cantidades normales de la proteína de ATM (Gatti, 1993). Para lograr una correcta detección de ATM hemos obtenido extractos nucleares de las líneas T aloespedíficas, tanto de los pacientes como del control sano (N1). La Figura 10 muestra los resultados de expresión de la proteína de ATM de todos los pacientes A-T y del control sano (N1) tras análisis por Western Blot según se detalla en Materiales y Métodos.

Del análisis por Western Blot pudimos obtener tres patrones de expresión de la proteína de ATM en los pacientes A-T (Figura 10). Los pacientes ATMp1, ATMp4, ATMp6, ATMp8, ATMp9, ATMp11, ATMp12, ATMp15, ATMp16, ATMp17, ATMp18, ATMp19, ATMp21, ATMp22, ATMp23, ATMp24, ATMp25, ATMp26 y ATMp27 no expresan proteína ATM. Presentan trazas los pacientes ATMp3, ATMp7, ATMp10, ATMp13, ATMp14 y ATMp20, mientras que en los pacientes ATMp5 y ATMp28 los niveles de ATM detectada en lisados nucleares es significativa (Tabla VI).

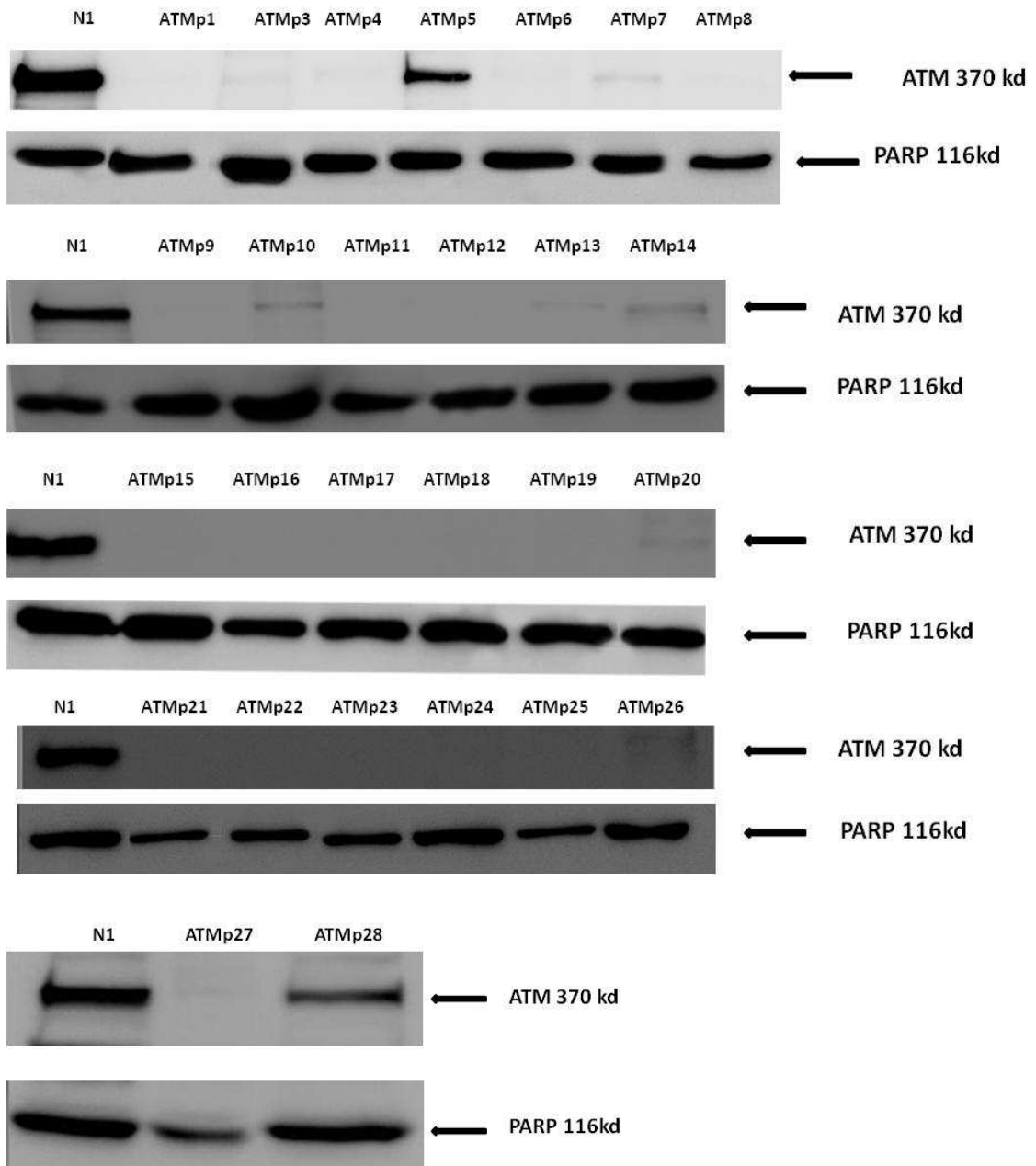


Figura 10. Análisis por Western Blot de la expresión de la proteína de ATM en células T aloespecíficas de pacientes A-T. La expresión de ATM fue analizada por Western Blot en extractos nucleares de proteínas (35 μ g) transferidos a membranas que fueron hibridadas con el anticuerpo monoclonal anti-ATM y anti-PARP como control de carga.

Para determinar la actividad quinasa de la proteína de ATM en aquellas líneas que presentaban, al menos trazas de la misma, se procedió a la irradiación de las células T aloespecíficas de los pacientes y control sano con las dosis de 1 y 5 Gy. Una hora después de la irradiación (tiempo óptimo de fosforilación de las proteínas), se procedió a la extracción de las proteínas nucleares.

Como se puede observar en las figuras 11 y 12, hay una clara fosforilación de la proteína de ATM (ATMpS1981) en el control N1 posterior a la irradiación, sin embargo no ocurre así en ninguna de las líneas de los pacientes. Como consecuencia de la activación de ATM por irradiación se asocian además la fosforilación de sus sustratos (NBS1, p53 y H2AX) en la línea N1. La fosforilación de NBS1 (NBS1pS343) se presenta en la Figura 10, y la fosforilación de p53 y su acumulación en las figuras 11 y 12.

La fosforilación de H2AX seguida de la radiación es mediada redundantemente por miembros de la familia PIKK (ATM y DNA-PK) (Wang et al., 2005), en las figuras 11 y 12 podemos observar los efectos de la radiación en las distintas líneas celulares, sólo en la línea ATMp14 (Figura 11) se aprecia un defecto en la detección de la forma fosforilada de H2AX.

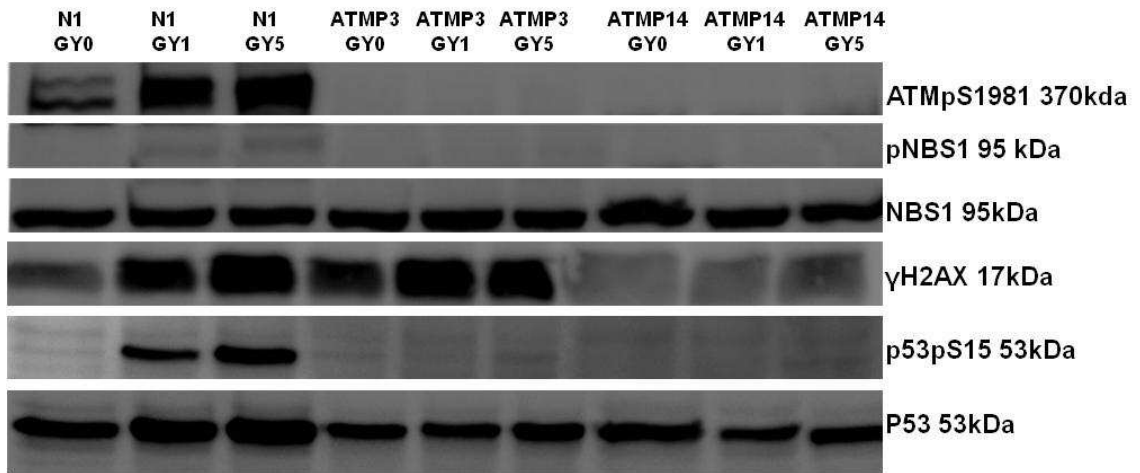


Figura 11. Actividad quinasa de ATM posterior a la irradiación celular. Las líneas T aloespecíficas de los pacientes ATMp3 y ATMp14 y del control sano N1 fueron irradiadas con dosis de 1 y 5 Gy. Se observa fosforilación en la proteína de ATM (ATMp1981) y de sus sustratos directos NBS1pS343 y p53pS15 en el control sano, no así en las líneas de los pacientes ATMp3 y ATMp14.

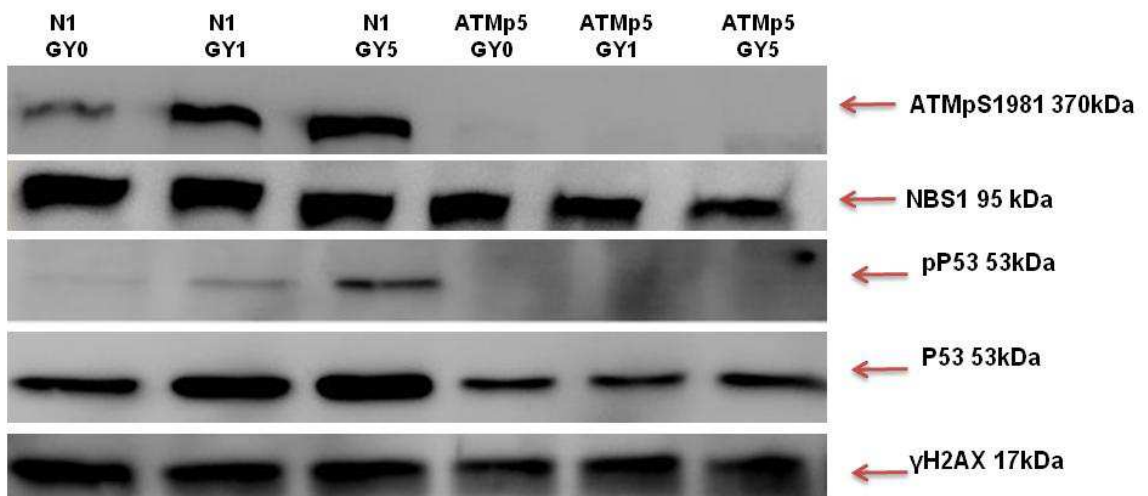


Figura 12. Actividad quinasa posterior a la irradiación de las líneas ATMp5 y N1. Las líneas T aloespecíficas del paciente ATMp5 y del control sano N1 fueron irradiadas con dosis de 1 y 5 Gy. Se observa fosforilación en la proteína de ATM (ATMp1981) y de su sustrato p53pS15 en el control sano, no así en el paciente.

Tabla VI. Resumen de la presencia de proteína de ATM en los pacientes A-T y actividad quinasa.

Presencia de la proteína de ATM y actividad quinasa.		
Línea aloespecífica	Proporción ATM/PARP (densitometría)	Actividad quinasa (ATMpS1981)
control N1	1,120	Positivo
ATMP1	0,027	ND
ATMP3	0,040	Negativo
ATMP4	0,090	ND
ATMP5	0,700	Negativo
ATMP6	0,015	ND
ATMP7	0,040	Negativo
ATMP8	0,010	ND
ATMP9	0,060	ND
ATMP10	0,200	Negativo
ATMP11	0,040	ND
ATMP12	0,002	ND
ATMP13	0,090	Negativo
ATMP14	0,460	Negativo
ATMP15	0,017	ND
ATMP16	0,000	ND
ATMP17	0,000	ND
ATMP18	0,000	ND
ATMP19	0,000	ND
ATMP20	0,016	Negativo
ATMP21	0,004	ND
ATMP22	0,006	ND
ATMP23	0,008	ND
ATMP24	0,010	ND
ATMP25	0,030	ND
ATMP26	0,008	ND
ATMP27	0,007	ND
ATMP28	0,400	Negativo

ND: No Determinado

(iii) Análisis molecular del gen ATM en la cohorte de pacientes.

Con el objeto de determinar las mutaciones en el gen *ATM* en la cohorte de pacientes, nos propusimos realizar mediante secuenciación masiva con la tecnología SOLiD (Applied Biosystems) el análisis del gen *ATM*. Para ello se preservó la sangre total (2.5-3mL) de los pacientes a -80°C hasta su procesamiento en el "Centro Pfizer-Universidad de Granada-Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica" (GENYO).

El mapeo se ha realizado sobre el genoma 19, y la predicción de los efectos de las variantes encontradas se realizó con las herramientas de Ensembl (<http://www.ensembl.org>) y SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/index.html>). Para saber si la variante encontrada era conocida o estaba aún sin describir, hemos buscado su número de identificación "rs" (dbSNP Short Genetic Variation) y/o un número de identificación HGMD (The Human Gene Mutation Database (HGMD®) representa una tentativa de cotejar las mutaciones genéticas responsables de las enfermedades humanas hereditarias que son conocidas y publicadas). También hemos consultado las siguientes base de datos: MUTADATABASE y LOVD ([Leiden Open Variation Database](http://www.lovd.nl)).

Para conocer la zona de la proteína afectada y si la variante encontrada estaba dentro de las "variantes naturales" hemos consultado la página de UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q13315>).

Las mutaciones en el gen de *ATM* encontradas, tanto las nuevas como las desconocidas, se encuentran en la Tabla VIII. De las 27 mutaciones que hemos identificado sólo una fue debida a mutación en un intrón (intrón 63) y la mayoría han sido a causa de deleciones (37%; 10/27), seguidas de mutaciones sin sentido (26%; 7/27) y mutaciones con cambio de sentido (22%; 6/27). Las menos comunes fueron las mutaciones que afectan a la zona donación-aceptación intrón-exón (7.5%; 2/27) así como las mutaciones sinónimas (7.5%; 2/27). De las estas

27 mutaciones, hemos identificado 11 nuevas que no se encuentran en las bases de datos antes citadas (Tabla XI)

Además de las mutaciones que causan daño en la proteína de ATM, hemos encontrado 8 "variantes naturales" descritas en la página de UniProt (Tabla IX), de las cuales sólo dos se encontraban en intrones.

El paciente ATMp1 (Granada) presenta una delección patogénica de un nucleótido(G/-) en heterocigosis en el exón 26 (c.3801delG). Esta variante puede ocasionar una proteína truncada, y el daño se presentaría en la proteína en la posición 1267. Presenta además una delección patogénica de dos nucleótidos (TG/-) en heterocigosis en el exón 62, la cual podría también generar una proteína truncada, el daño en la proteína se presentaría en la posición 2978-2979.

El paciente ATMp3 (Granada) presenta la misma delección patogénica que ATMp1 en el exón 26 en heterocigosis. Presenta en el otro alelo una delección patogénica de cinco nucleótidos (ATAAG/-) en el exón 56, que predice una proteína truncada. El daño ocurriría en la posición 2755-2756 de la proteína y esta mutación ha sido descrita como haplotipos fundadores en los costarricenses, (Stankovic et al., 1998a). También presenta un polimorfismo en el intrón 54 (c.8010+186C>T) y otro en el 61 (c.8851-973A>C), ambos en heterocigosis y están descritos como asociado al cáncer de pulmón de células no microcíticas (Yang et al., 2007).

El paciente ATMp4 (Granada) presenta una delección patogénica en homocigosis de 28 nucleótidos (c.9007_9034delAACAAGTAGCTGAACGTGTCTTAATGA) en el exón 63. Esta mutación predice una proteína truncada por cambio en el marco de lectura. El daño en la proteína afecta la posición 3003-3012 (entre la región PI3Kc y FATC). Esta mutación ha sido descrita antes en un paciente español por García Pérez et al (Garcia-Perez et al., 2001).

El paciente ATMp5 (Granada) presenta una delección patogénica en heterocigosis de dos nucleótidos (c.8278_8279delCT) en el exón 57. Esta mutación predice una proteína truncada por cambio en el marco de lectura, afectando el residuo en la posición 2760. Presenta además en el otro alelo una mutación sin sentido en heterocigosis en el exón 7 (c.802C>T) en la cual se introduce un codón de parada. Esta mutación afecta al amino ácido en la posición 268 y ha sido descrita por S. Teraoka (Teraoka et al., 1999). También presenta un polimorfismo en el intrón 54 (c.8010+186C>T) y otro en el 61 (c.8851-973A>C), ambos en homocigosis y están descritos como asociado al cáncer de pulmón de células no microcíticas (Yang et al., 2007).

El paciente ATMp6 (Málaga), presenta una mutación sin sentido en el exón 14 en heterocigosis que introduce un codón de parada en la posición 747 (en lugar de una Glutamina). En el otro alelo presenta una mutación con cambio de sentido en heterocigosis en el exón 58 (c.8500T>C), que introduce en la proteína una Leucina en vez de una Fenilalanina en la posición 2834, que afecta por tanto el dominio catalítico PI3Kc (Fosfo inositol 3kinasa). Este paciente, además, presenta un polimorfismo en el exón 9 (c.1229T>C) donde se sustituye una Valina por una Alanina en la posición 410 asociado a telangiectasia ocular (Greenman et al., 2007).

Los pacientes ATMp7 (Granada) y ATMp8 (Granada) al igual que el paciente ATMp4, presentan una delección patogénica en el exón 63 en homocigosis (c.9007_9034delAACAAAGTAGCTGAACGTGTCTTAATGA). Esta mutación causaría daño a la proteína en la posición 3003-3012 (entre la región PI3Kc y FATC) y produciría una proteína truncada. El paciente ATMp7 presenta además un polimorfismo o variante natural en homocigosis en el exón 37 (c.5557G>A), que introduce una Asparagina en vez de un ácido Aspártico (p.Asp1853Asn) y que se encuentra asociada con el cáncer de mama bilateral (Heikkinen et al., 2005).

El paciente ATMp9 (Pontevedra) presenta una delección de cuatro nucleótidos (c.8874_8877delTGAC) en homocigosis en el exón 62. Esta mutación desplaza el marco de lectura y produciría una proteína truncada cercana a la posición 2958-2959. También presenta un polimorfismo en el intrón 54 (c.8010+186C>T) y otro en el 61 (c.8851-973A>C), ambos en heterocigosis, y que han sido descritos como asociados al cáncer de pulmón de células no microcíticas (Yang et al., 2007).

El paciente ATMp10 (Málaga) presenta una delección patogénica de un nucleótido en el exón 6 (c.634delT) en heterocigosis. Esta mutación cambia el marco de lectura y produciría una proteína truncada afectando a la posición 212 de la proteína. También presenta una mutación sin sentido en heterocigosis en el exón 7 cambiando una Glutamina por un codón de parada, lo cual ocasionaría la producción de una proteína truncada (Buzin et al., 2003; Teraoka et al., 1999). Además, este paciente presenta un polimorfismo en el intrón 54 (c.8010+186C>T) y otro en el 61 (c.8851-973A>C), ambos en heterocigosis, y que están descritos como asociados al cáncer de pulmón de células no microcíticas (Yang et al., 2007).

El paciente 11 (Feirrol. Pontevedra) presenta una mutación sin sentido en homocigosis en el exón 19 (c.2908G>T), esto produce un codón de parada (p.Glu968X). Esta mutación aún no ha sido descrita.

Los pacientes ATMp12 y ATMp13 (Burgos) son hermanos y presentan una delección en heterocigosis de dos nucleótidos (c.1211_1212delAG). Esta mutación produce una variante en el marco de lectura y la producción de una proteína truncada. No hemos podido detectar la segunda mutación patogénica en el alelo 2. Presentan además cuatro polimorfismos: dos en exones y dos en intrones. Los polimorfismos en exones están ambos en heterocigosis tanto en el exón 17 (c.2572T>C) como en el exón 22 (c.3161C>G) y están asociados al cáncer de mamas (Buzin et al., 2003). Los dos polimorfismos en intrones son los antes descritos (intrones 54 y 61), se encuentran también en heterocigosis (Yang et al., 2007) .

El paciente ATMp14 (Alicante, Valencia) presenta una mutación sin sentido en un alelo y otra con cambio de sentido en el segundo. La primera mutación se encuentra en el exón 7 (heterocigosis) y es la antes descrita en el paciente ATMp5 y ATMp10 (c.802C>T) (Buzin et al., 2003). La segunda mutación está en heterocigosis y se encuentra en el exón 43 (c.6203T>C), esta mutación cambia una Leucina por una Serina correspondiente al dominio FAT de la proteína (Anheim et al., 2010). Presenta además dos polimorfismos en intrones, ambos en homocigosis (intrones 54 y61) (Yang et al., 2007).

El paciente ATMp15 (Oliva, Valencia) presenta una mutación con cambio de sentido en heterocigosis en el exón 53 (c.7879T>C). Esta mutación introduce una Histidina en vez de una Tirosina siendo dañina para la proteína (Jacquemin et al., 2012). Presenta en el otro alelo una delección de cinco nucleótidos (c.8264_8268delATAAG) en heterocigosis, que es la misma encontrada en el paciente ATMp3. Presenta además dos polimorfismos en intrones, ambos en heterocigosis (intrones 54 y61) (Yang et al., 2007).

En el paciente ATMp16 (Lalín, Pontevedra) hemos encontrado una mutación en la región de aceptación y empalme (intrón 63) (c.8988-1G>C) en heterocigosis. Esta mutación ocasiona una variante en el marco de lectura y origina una proteína truncada (Teraoka et al., 1999). No hemos podido conocer la segunda mutación patogénica. Presenta además dos polimorfismos en intrones, ambos en homocigosis (intrones 54 y61) (Yang et al., 2007).

Los pacientes ATMp17, ATMp18 y ATMp19 (Terrasa, Barcelona) son hermanos, presentan una delección en heterocigosis de cinco nucleótidos (c.3705_3709delTTTTA) en el exón 25. Esta mutación ocasiona un cambio en el marco de lectura y origina una proteína truncada, el daño en la proteína ocurriría en la posición 1235-1237, esta mutación aún no ha sido descrita. No hemos podido conocer la segunda mutación patogénica.

El paciente ATMp20 (Murcia) presenta dos mutaciones sin sentido, ambas en heterocigosis. La primera mutación se encuentra en el exón 35 (c.5188C>T) y se reemplaza una Arginina por un codón de parada (p.Arg1730X) (Castellvi-Bel et al., 1999). La segunda mutación se encuentra en exón 37, en esta mutación se reemplaza otra Arginina por un codón de parada (p.Arg1882X) (Buzin et al., 2003). Presenta además dos polimorfismos en intrones, ambos en heterocigosis (intrones 54 y61) (Yang et al., 2007).

El paciente ATMp21(Murcia) presenta en el primer alelo una mutación sin sentido en heterocigosis en el exón 35, que es igual a la que porta el paciente ATMp20. No hemos podido identificar la segunda mutación patogénica. Presenta además un polimorfismo en el exón 8 (c.967A>G), en donde se reemplaza una Isoleucina por una Valina (p.Ile323Val) (Li and Swift, 2000), y dos polimorfismos más en intrones, ambos en homocigosis (intrones 54 y61) (Yang et al., 2007).

El paciente ATMp22 presenta una mutación en la región donación-aceptación, ésta se encuentra en homocigosis en el exón 24 (c.3576G>A) y resulta en la producción de un transcrito sin el exón 24, no altera el marco de lectura para la proteína, pero si resultaría en una proteína mas corta (Gilad et al., 1996; Teraoka et al., 1999). También presenta un polimorfismo en homocigosis en el exón 22 (c.3161C>G) (Vorechovsky et al., 1996).

El paciente ATMP23 (Alcalá de Henares, Madrid) presenta una delección en heterocigosis en el exón 6 (c.634delT) igual a la descrita en el paciente ATMP10. En el otro alelo presenta una mutación que aún no ha sido descrita con cambio de sentido en el exón 21 (c.3137T>C).

El paciente ATMp24, aunque proviene de Vitoria (PV) su padres son originarios de Jaén, presenta una delección patogénica en el exón 34 en heterocigosis (c.5020delT) que produce un cambio en el marco de lectura y como producto una proteína truncada. En el segundo alelo presenta una mutación sin sentido en el

exón 62 en heterocigosis (c.8977C>T) que introduce un codón de parada en vez de una Arginina (p.Arg2993X). Esta modificación ocurre entre la región PI3Kc y la región FATC (Vorechovsky et al., 1996). Presenta además un polimorfismo en heterocigosis en el exón 37 (c.5557G>A) (Heikkinen et al., 2005) y dos polimorfismos en intrones, ambos en heterocigosis (intrones 54 y61) (Yang et al., 2007).

El paciente ATMp25 (Madrid) presenta una mutación en heterocigosis con cambio de sentido en el exón 41 (c.6067G>A. Este cambio introduce una Arginina en vez de una Glicina (p.Gly2023Arg) (Paglia et al., 2010) en la región FAT. En el otro alelo presenta una delección patogénica en el exón 57 (c.8278_8279delCT) que produce un cambio en el marco de lectura y como producto una proteína truncada. Esta mutación aún no ha sido descrita. Presenta además dos polimorfismos en intrones, ambos en heterocigosis (intrones 54 y61) (Yang et al., 2007).

El paciente ATMp26 presenta en ambos alelos mutaciones en el exón 63, en el primer alelo se encuentra una delección en heterocigosis, ésta ha sido descrita en los pacientes ATMp4, ATMp7 y ATMp8 (c.9007_9034delAACAAGTAGCTGAACGTGTCTTAATGA). La otra mutación se encuentra en el exón 63 y es una con cambio de sentido (c.9007A>G) e introduce un Ácido Aspártico en vez de una Arginina (p.Asn3003Asp) entre la región PI3Kc y FATC. Presenta además el polimorfismo c.5557G>A en homocigosis (Heikkinen et al., 2005).

El paciente ATMp27 aunque proviene de Barcelona, es de origen andaluz de raza gitana, presenta una delección en homocigosis descrita en los pacientes ATMp4, ATMp7, ATMp8 y ATMp26 (c.9007_9034delAACAAGTAGCTGAACGTGTCTTAATGA) (Garcia-Perez et al., 2001). Presenta además el polimorfismo c.5557G>A en homocigosis (Heikkinen et al., 2005).

El paciente ATMp28 presenta una mutación en homocigosis en el exón 45 c.6238T>G, lo que produciría un cambio de amino ácido en el dominio FAT, donde se introduce un ácido Aspartico en vez de una Tyrosina (p.Tyr2079Asp) (el estudio molecular de este paciente se realizó en el laboratorio de Inmunología del Hospital Universitario La Paz).

Todos los pacientes de la cohorte, es decir, del ATMp1 al ATMp27 presentan el polimorfismo en el exón 40 c.5948A>G. Esta mutación introduce una Serina en vez de una Asparagina (p.Asn1983Ser). Este polimorfismo tiene la predicción de ser "tolerable" y "benigno" según los predictores de efectos en la proteína SIFT y PolyPhen respectivamente.

Tabla VII. Apellidos codificados de los pacientes con A-T seguidos en el Hospital Universitario "Virgen de las Nieves" y sus progenitores.

Código	Apellidos Pacientes	Progenitor 1	Progenitor 2
ATMp1	1.2	1.3	2.4
ATMp3	5.6	5.7	6.8
ATMp4	3.9	3.3	9.3
ATMp5	10.7	10.4	7.3
ATMp7	12.13	12.12	13.5
ATMp8	12.14	12.15	14.12
ATMp26	16.9	16.16	9.17

Tabla VIII. Mutaciones en el gen de *ATM* identificadas en los pacientes con A-T

Localización	Tipo de Mutación	Mutación	rs ID (dbSNP Short Genetic Variation)	HGMD ID (The human Gene Mutation Database)	Consecuencia	Consecuencia en la proteína/IUPAC	Zona de Prot. Afectada	Pacientes/ Estado (He/Ho)* / Origen	Referencia
Exón 6	Delección	c.634delT	-	-	Variante marco de lectura/Prot. Truncada.	-		ATMp10(He)(Ma) ATMp23(He)(M)	-
Exón 6	Variante sinónimo	c.609C>T	rs144709948	-		p.Asp203=/ p.D203=		ATMp17 (He) (B) ATMp18 (He) (B) ATMp19 (He)(B)	
Exón 7	Sin sentido	c.802C>T	-	CM30189	Codón de parada/Prot.Truncada	p.Gln268X/Q268X		ATMp5(He)(GR) ATMp10(He)(Ma) ATMp14(He)(V)	Teraoka, Sh (1999), Buzin (2003)
Exón 9	Delección	c.1211_1212delAG	-	-	Variante marco de lectura/Prot. Truncada.	Variación en la proteína desde posición 404		ATMp12(He)(Bu) ATMp13(He)(Bu)	-
Exón 10	Variante sinónimo	c.1254A>G	rs4987943	-		p.Gln418=/p.Q148=		ATMp6(He)(Ma)	
Exón 14	Sin sentido	c.2239C>T	-	-	Daño debido a codón de parada.	p.Gln747X/Q747X		ATMp6(He)(Ma)	
Exón 19	Sin sentido	c.2908G>T	-	-	Daño debido a codón de parada.	p.Glu968X/E968X		ATMp11(Ho)(Ga)	
Exón 21	Cambio de sentido	c.3137T>C	-	-	Variante marco de lectura	p.Leu1046Pro/ L1046P		ATMp23(He)(M)	-
Exón 24	Variante en la zona Aceptación-donación	c.3576G>A	-	CS961477	Exón 24 omitido/Prot. Truncada.	p.Ser1135_Lys1192del58		ATMp22(Ho)(Mu)	Gilad (1996)
Exón 25	Delección	c.3705_3709delTTTTA	-	-	Variante marco de lectura/Prot. Truncada.	Variación en la proteína desde posición 1235		ATMp17(He) (B) ATMp18(He)(B) ATMp19(He)(B)	-
Exón 26	Delección	c.3801delG	-	-	Daño debido a cambio en el marco de lectura.	Variación en la proteína desde posición 1267		ATMp1(He)(Gr) ATMp3 (He)(Gr)	
Exón 34	Delección	c.5020delT	-	-	Variante marco de lectura/Prot. Truncada.	Variación en la proteína desde posición 1674		ATMp24(He)(V).	-
Exón 35	Sin sentido	c.5188C>T	-	CM990211	Daño debido a codón de parada.	p.Arg1730X/R1730X		ATMp21(He)(Mu) ATMp20(He)(Mu)	Castellví-Bel, S (1999)
Exón 37	Sin sentido	c.5644C>T	-	CM030193	Daño debido a codón de parada.	p.Arg1882X/R1882X		ATMp20(He)(Mu).	Buzin CH (2003)

*He: Heterocigota, Ho: Homocigota

Tabla VIII (cont). Mutaciones en el gen de *ATM* identificadas en los pacientes con A-T

Localización	Tipo de Mutación	Mutación	rs ID (dbSNP Short Genetic Variation)	HGMD ID (The human Gene Mutation Database)	Consecuencia	Variación en la proteína/IUPAC	Zona de Prot. Afectada	Pacientes/ Estado (He/Ho)* / Origen	Referencia
Exón 41	Cambio de sentido	c.6067G>A	rs11212587	CM092585		p.Gly2023Arg/G2023R	FAT	ATMp25(He)(M)	Paglia L (2009)
Exón 43	Cambio de sentido	c.6203T>C	-	CM102245	Dañina	p.Leu2068Ser/L2068S	FAT	ATMp14(He)(V)	Anheim M (2003)
Exón 45	Cambio de sentido	c.6238T>G	?	-	Dañina	p.Tyr2079Asp/ Y2079D	FAT	ATMp28(Ho) (Se)	?
Exón 53	Cambio de sentido	c.7879T>C	-	CM121259	Dañina	p.Tyr2627His/Y2627H		ATMp15(He)(V)	Jacquemin, V (2012)
Exón 56	Delección	c.8264_8268del ATAAG	-	-	Daño debido a cambio en el marco de lectura.	Variación en la proteína desde posición 2755		ATMp3(He)(Gr) ATMp15 (He)(V)	Stankovic (1998)
Exón 57	Delección	c.8278_8279del CT	-	-	Variante marco de lectura/Prot. Truncada.	Variación en la proteína desde posición 2759		ATMp5 (He) (Gr) ATMp25 (He) (M)	
Exón 58	Cambio de sentido	c.8500T>C	-	-	Dañina	p.Phe2834Leu/F2834L	PI3Kc:Fosfoinositol 3kinasa, dominio catalítico	ATMp6(He)(Ma)	-
Exón 62	Delección	c.8934_8935del TG	-	-	Daño debido a cambio en el marco de lectura.	Variación en la proteína desde posición 2978		ATMp1(He)(Gr)	
Exón 62	Delección	c.8874_8877del TGAC	-	-	Variante marco de lectura/Prot. Truncada.	p.Asp2959GlyfsSTOP3		ATMp9(He)(Ga)	MUTA DATABASE
Exón 62	Sin sentido	c.8977C>T	-	CM960113	Pérdida del codón de parada	p.Arg2993X/R2993X	Entre la región PI3Kc y FATC.	ATMp24(He)(V)	Vorechovský I (1996)
Exón 63	Delección	c.9007_9034del AACAAAGTAGC TGAACGTGTCT TAATGA	-	-	Dañina	p.3003_3012del9	Entre la región PI3Kc y FATC.	ATMp4 (Ho)(Gr) ATMp7(Ho)(Gr) ATMp8 (Ho)(Gr) ATMp26(He)(Gr) ATMp27 (Ho)(B)	García Pérez, MA (2001)
Exón 63	Cambio de sentido	c.9007A>G	rs1137889	-		p.Asn3003Asp/N3003D	Entre la región PI3Kc y FATC.	ATMp26(He)(Gr)	
Intrón 63	Variante aceptor de empalme	c.8988-1G>C	-	CS991314	Variante marco de lectura/Prot. Truncada.			ATMp16 (He)(Ga)	Teraoka, Sh (1999).

*He: Heterocigota, Ho: Homocigota

Tabla IX. Variantes naturales del Gen *ATM* identificadas en la cohorte de pacientes con A-T.

Variantes Naturales. Gen de ATM								
Localización	Tipo de Mutación	Mutación	rs ID.	HGMD ID.	Fenotipo (HGMD)	Predicción de efecto en la proteína/IUPAC	Pacientes/Estado (He/Ho)*	Referencia
Exón 8	Cambio de sentido	c.967A>G	-	CM000651	Ataxia-Telangiectasia	p.Ile323Val/I323V	ATMp21 (He)	Li, A (2000).
Exón 9	Cambio de sentido	c.1229T>C	rs56128736	CM035782	Telangiectasia ocular	p.Val410Ala/V410A	ATMp6 (He)	Greenman, Ch (2007)
Exón 17	Cambio de sentido	c.2572T>C	rs1800056	CM061641	Asociado a cáncer de mama	p.Phe858Leu/F858L	ATMp12 (He) ATMp13(He)	Vorechovsky, I (1996)
Exón 22	Cambio de sentido	c.3161C>G	rs1800057	CM973365	Asociado a cáncer de mama.	p.Pro1054Arg/P1054R	ATMp12(He) ATMp13(He) ATMp22(Ho)	Vorechovsky, I (1996)
Exón 37	Cambio de sentido	c.5557G>A	rs1801516	CM077896	Asociado a cáncer de mama.	p.Asp1853Asn/ D1853N	ATMp7(Ho) ATMp24(He) ATMP26(Ho) ATMP27(Ho)	Heikkinen, K (2005)
Exón 40	Cambio de sentido	c.5948A>G	rs659243	-	-	p.Asn1983Ser/p.N1983S	ATMp1 al ATMp27	-
Intrón 54	Variante del intrón.	c.8010+186C>T	rs227060	CS077841	Asociado al cáncer de pulmón de células no microcíticas	-	ATMp3(He) ATMp5(Ho) ATMp9(He) ATMp10(He) ATMp12(He) ATMp13(He) ATMp14(Ho) ATMp15(He) ATMp16(Ho) ATMp20(He) ATMp21(Ho) ATMp24(He) ATMp25(He)	Yang (2007)
Intrón 61	Variante del intrón.	c.8851-973A>C	rs170548	CS077842	Asociado al cáncer de pulmón de células no microcíticas	-	ATMp3(He) ATMp5(Ho) ATMp9(He) ATMp10(He) ATMp12(He) ATMp13(He) ATMp14(Ho) ATMp15(He) ATMp16(Ho) ATMp20(He) ATMp21(Ho) ATMp24(He) ATMp25(Ho)	Yang (2007)

*He: Heterocigota, Ho: Homocigota

Tabla X. Mutaciones, procedencia, expresión de proteína y radiosensibilidad de los pacientes con A-T

Paciente	Procedencia	Alelo 1		Alelo 2		Expresión de Proteína	Radiosensibilidad
		Exón	Mutación	Exón	Mutación		
ATMp1	Granada	26	c.3801delG	62	c.8934_8935delTG	Ausente	Intermedio
ATMp3	Granada	26	c.3801delG	56	c.8264_8268delATAAG	Trazas	Radiosensible
ATMp4	Granada	63	c.9007_9034delAACAAA GTAGCTGA ACGTGTCTT AATGA	63	c.9007_9034delAACAAA GTAGCTGA ACGTGTCTT AATGA	Ausente	Radiosensible
ATMp5	Granada	7	c.802C>T	57	c.8278_8279delCT	Presencia	Radiosensible
ATMp7	Granada	63	c.9007_9034delAACAAA GTAGCTGA ACGTGTCTT AATGA	63	c.9007_9034delAACAAA GTAGCTGA ACGTGTCTT AATGA	Trazas	Intermedio
ATMp8	Granada	63	c.9007_9034delAACAAA GTAGCTGA ACGTGTCTT AATGA	63	c.9007_9034delAACAAA GTAGCTGA ACGTGTCTT AATGA	Ausente	Radiosensible
ATMp26	Granada	63	c.9007A>G	63	c.9007_9034delAACAAA GTAGCTGA ACGTGTCTT AATGA	Ausente	Intermedio
ATMp24	Jaén	34	c.5020delT	62	c.8977C>T	Ausente	ND
ATMp6	Málaga	14	c.2239C>T	58	c.8500T>C	Ausente	Intermedio
ATMp10	Málaga	6	c.634delT	7	c.802C>T	Trazas	Radiosensible
ATMp20	Murcia	35	c.5188C>T	37	c.5644C>T	Trazas	Radiosensible
ATMp21	Murcia	35	c.5188C>T	Desconocido		Ausente	ND
ATMp22	Murcia	24	c.3576G>A	24	c.3576G>A	Ausente	Radiosensible
ATMp23	Madrid	6	c.634delT	21	c.3137T>C	Ausente	Intermedio
ATMp25	Madrid	41	c.6067G>A	57	c.8278_8279delCT	Ausente	ND
ATMp28	Segovia	45	c.6238T>G	45	c.6238T>G	Presencia	ND
ATMp17	Barcelona	25	c.3705_3709delTTTTA	Desconocido		Ausente	Intermedio
ATMp18	Barcelona	25	c.3705_3709delTTTTA	Desconocido		Ausente	Radiosensible
ATMp19	Barcelona	25	c.3705_3709delTTTTA	Desconocido		Ausente	Radiosensible
ATMp27	Barcelona	63	c.9007_9034delAACAAA GTAGCTGA ACGTGTCTT AATGA	63	c.9007_9034delAACAAA GTAGCTGA ACGTGTCTT AATGA	Ausente	ND
ATMp14	Valencia	7	c.802C>T	63	c.6203T>C	Trazas	Intermedio
ATMp15	Valencia	53	c.7879T>C	56	c.8264_8268delATAAG	Ausente	Intermedio
ATMp12	Burgos	9	c.1211_1212delAG	Desconocido		Ausente	Radiosensible
ATMp13	Burgos	9	c.1211_1212delAG	Desconocido		Trazas	Normal
ATMp11	Galicia	19	c.2908G>T	19	c.2908G>T	Ausente	Intermedio
ATMp9	Galicia	62	c.8874_8877delTGAC	62	c.8874_8877delTGAC	Ausente	Intermedio
ATMp16	Galicia	intrón 63	c.8988-1G>C	Desconocido		Ausente	Intermedio

ND: No Determinado

Tabla XI. Nuevas mutaciones identificadas en la cohorte de pacientes con A-T.

Localización	Tipo de Mutación	Mutación	Consecuencia	Consecuencia en la proteína/IUPAC	Pacientes/ Estado (He/Ho)* / Origen
Exón 6	Delección	c.634delT	Variante marco de lectura/Prot. Truncada.	-	ATMp10(He)(Ma) ATMp23(He)(M)
Exón 9	Delección	c.1211_1212delAG	Variante marco de lectura/Prot. Truncada.	Variación en la proteína desde posición 404	ATMp12(He)(Bu) ATMp13(He)(Bu)
Exón 14	Sin sentido	c.2239C>T	Daño debido a codón de parada.	p.Gln747X/ Q747X	ATMp6(He)(Ma)
Exón 19	Sin sentido	c.2908G>T	Daño debido a codón de parada.	p.Glu968X/ E968X	ATMp11(Ho)(Ga)
Exón 21	Cambio de sentido	c.3137T>C	Variante marco de lectura	p.Leu1046Pro/ L1046P	ATMp23(He)(M)
Exón 25	Delección	c.3705_3709delTTTTA	Variante marco de lectura/Prot. Truncada.	Variación en la proteína desde posición 1235	ATMp17(He) (B) ATMp18(He)(B) ATMp19(He)(B)
Exón 26	Delección	c.3801delG	Daño debido a cambio en el marco de lectura.	Variación en la proteína desde posición 1267	ATMp1(He)(Gr) ATMp3 (He)(Gr)
Exón 34	Delección	c.5020delT	Variante marco de lectura/Prot. Truncada.	Variación en la proteína desde posición 1674	ATMp24(He)(V).
Exón 57	Delección	c.8278_8279delCT	Variante marco de lectura/Prot. Truncada.	Variación en la proteína desde posición 2759	ATMp5 (He) (Gr) ATMp25 (He) (M)
Exón 58	Cambio de sentido	c.8500T>C	Dañina	p.Phe2834Leu/F2834L	ATMp6(He)(Ma)
Exón 62	Delección	c.8934_8935delTG	Daño debido a cambio en el marco de lectura.	Variación en la proteína desde posición 2978	ATMp1(He)(Gr)

*He: Heterocigota, Ho: Homocigota

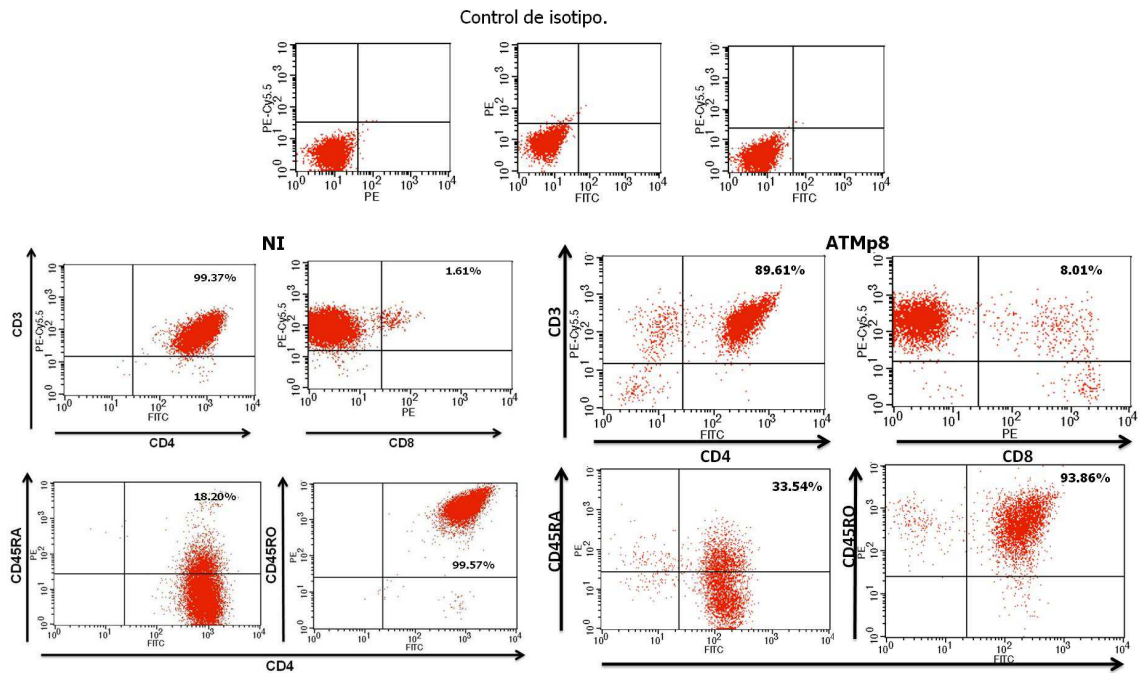
2. Generación y caracterización funcional de líneas T aloespecíficas procedentes de pacientes con A-T.

Existen numerosos estudios que han intentado evaluar la funcionalidad de las células de los pacientes con A-T. Para ello se han empleado diferentes tipos celulares, entre ellos linfocitos inmortalizados con Herpesvirus Saimiri (HVS) (Rivero-Carmena et al., 2000) o células mononucleares periféricas (Giovannetti et al., 2002). Por tanto nos propusimos generar líneas T aloespecíficas de linfocitos primarios de los pacientes con A-T.

2.1 Fenotipo de las líneas T aloespecíficas.

Con el objeto de establecer el fenotipo de las líneas T aloespecíficas derivadas de sangre periférica tanto de pacientes con A-T como de sujetos controles, utilizamos los siguientes marcadores de superficie: CD3, CD4, CD8, CD45RO y CD45RA que fueron estudiados mediante citometría de flujo. En la Figura 13 (a) se observa, a modo ilustrativo, el dot plot de la línea T aloespecífica del control sano N1 que presenta un gran porcentaje de expresión de CD3/CD4 (99.37%) y CD4/CD45RO (99.57%), al igual que ocurre con el paciente ATMp8 que presenta el siguiente perfil: CD3/CD4 (89.61%) y CD4/CD45RO (93.86%). En la Figura 13 (b) se observa la casi uniformidad en la expresión de los marcadores en las líneas de pacientes y control N1. La población cultivada, pues, se redirige hacia células predominantemente CD3/CD4 y del tipo CD4/CD45RO.

a.)



b.)

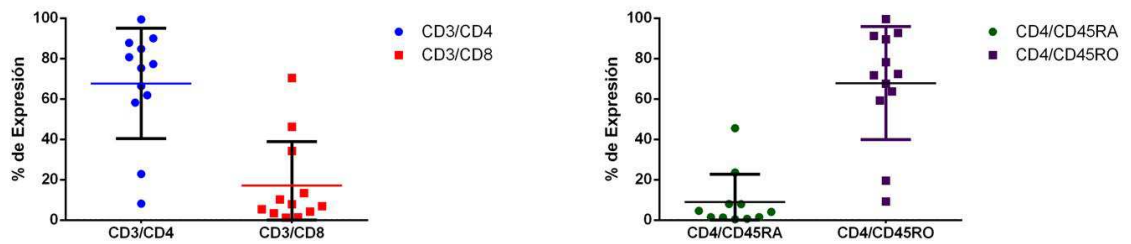
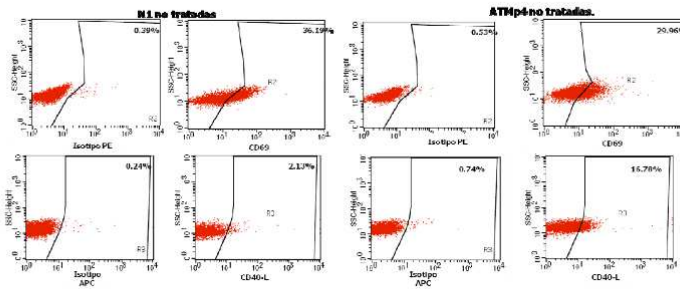


Figura 13. Fenotipo de las líneas celulares T aloespecíficas. Las líneas celulares T aloespecíficas de los pacientes y del control sano N1 expresan casi exclusivamente CD3/CD4 y CD4/CD45RO. a.) Dot plot de la línea T aloespecífica del control sano N1 (izq) y del paciente ATMp8 (der). b.) Figura que representa el fenotipo de las líneas T aloespecíficas de los pacientes A-T y control N1. Derecha, CD3/CD4, y CD3/CD8. Izquierda: CD4/CD45RA y CD4/CD45RO.

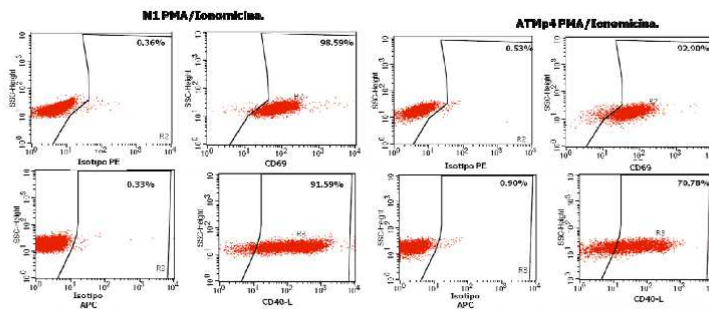
Expresión de marcadores de activación CD69 y CD40-L.

Con el fin de evaluar la capacidad de respuesta de las líneas T aloespecíficas con A-T, evaluamos la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD40-L de las líneas T aloestimuladas de pacientes y de los controles N1 y N12. Para ello, se realizó la estimulación con PMA 10ng/mL más Ionomicina 0.5µg/mL (Sigma Aldrich) y con perlas estimuladoras CD3/CD28 (Dynabeads) en proporción 1:1. Luego de 24 hs se procedió a la tinción de los marcadores de superficie celular CD69 y CD40-L. A modo ilustrativo en la Figura 14 (a, b, c) se muestran los dot plots de los linfocitos de las líneas tanto del control sano (N1) como del paciente ATMp4. En el panel superior (a), se observan las células no tratadas con sus correspondientes isotipos, en el panel b se pueden observar las células tratadas con PMA/Ionomicina, y en el panel inferior (c), las células tratadas con las perlas estimuladoras (CD3/CD28). Las células no tratadas (a) presentan expresión basal de CD69 y CD40-L, y tanto el control (N1) como la línea de paciente muestran una vigorosa respuesta ante la estimulación con PMA/Ionomicina. Sin embargo la respuesta a CD3/CD28 (c) es mucho más modesta en ambas líneas. En la Figura 15 podemos observar que si bien la respuesta de los controles N1 y N12 han sido un poco mayor a las de los pacientes, estos datos no son significativos ($p > 0.05$).

A-)



B-)



C-)

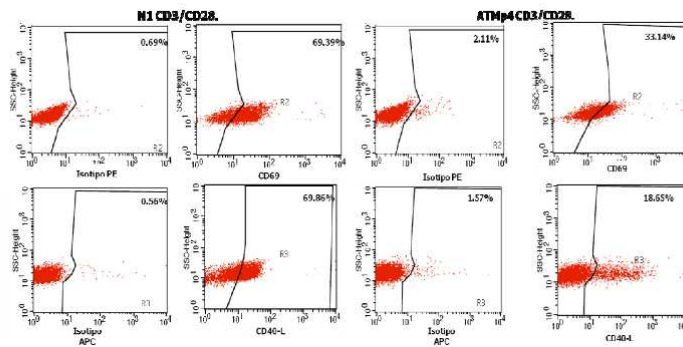


Figura 14: Expresión de los marcadores de estimulación CD69 y CD40-L en líneas T aloespecíficas de sujetos controles y pacientes con A-T. Las líneas T aloespecíficas fueron tratadas con PMA/Ionomicina (10ng/mL, 0.5µg/mL) y con perlas estimuladoras CD3/CD28 (1:1) durante 24hs y teñidas para los marcadores CD69 y CD40-L. A. Expresión basal de CD69 y CD40-L en células no tratadas (N1 y ATMp4). B. Líneas N1 y ATMp4 tratadas con PMA/Ionomicina durante 24hs. C. Líneas tratadas con perlas estimuladoras CD3/CD28 en proporción 1:1 durante 24 hs.

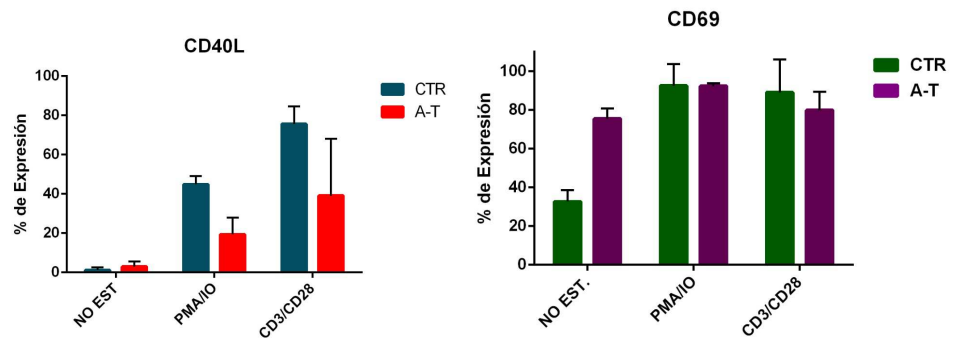


Figura15 Análisis de la expresión de los marcadores de estimulación de los controles y de los pacientes. Izq. Expresión de CD69. Der. Expresión de CD40-L. Se puede observar un aumento en las células tratadas con PMA/IO y CD3/CD28 de los controles con respecto a los pacientes aunque no han sido significativas ($p>0.05$).

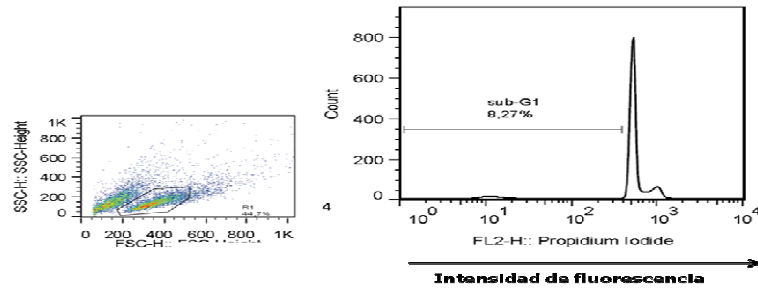
Análisis del ciclo celular de las líneas T aloespecíficas de pacientes con A-T tras radiación.

Los puntos de control del ciclo celular son indispensables para la correcta transmisión de la información genética cuando una célula se divide. Si el ADN sufre daño es indispensable que el ciclo celular sea temporalmente detenido para reparar el daño, y si el daño no es reparado sobreviene entonces la apoptosis. Para evaluar los efectos de la irradiación en las líneas celulares de los pacientes con A-T, se expusieron las líneas celulares de pacientes con A-T y controles (N1, N11 y N12) a dosis de 1, 2 y 5 Gy, y se analizó el ciclo celular mediante tinción con Ioduro de Propidio a las 24, 48, 72 y 96 hs posteriores a la irradiación. En la Figura 16 (A) se muestra la región sub-G1 tomada para el análisis de células apoptóticas (%). En B se observa la respuesta de las líneas aloespecíficas tanto de pacientes A-T como de los controles a la irradiación. Si bien a lo largo del tiempo ha habido diferencias entre los pacientes y los controles, sólo a las 72hs a la dosis de 5Gy el porcentaje de apoptosis fue significativo ($p<0.001$).

Continuando con el análisis de los efectos de la radiación en las líneas celulares, hemos medido el pico G2 en las células teñidas con Ioduro de Propidio, para lo cual se definió una región en la que se eliminaron los dupletes y tripletes con el fin

de evitar falsos aumentos en esta región. En la Figura 17 observamos la región de linfocitos (izq) y la región G2 (der) consideradas para el análisis. Se puede observar los efectos de la radiación en pacientes A-T y controles (B), a partir de las 48hs se observan diferencias significativas (Prueba T $p < 0.001$) y los valores de %G2 son máximos alcanzando casi un 20%, a partir de las 72hs estos valores empiezan a disminuir observándose algunas diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0.05$).

A-)



B-)

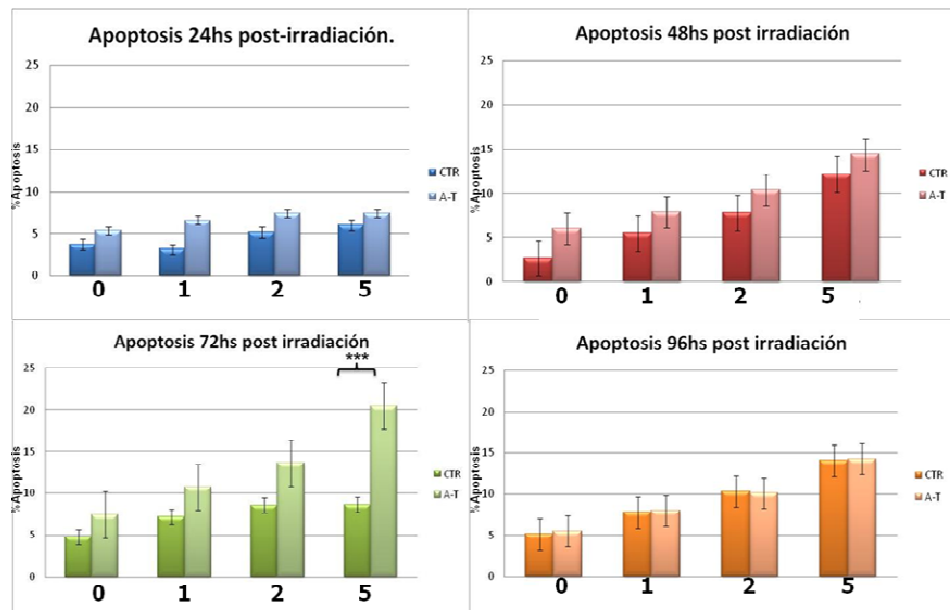


Figura 16. Análisis del ciclo celular en líneas celulares de controles y pacientes A-T. Las células T aloespecíficas fueron irradiadas a dosis de 1, 2 y 5 Gy, y fueron teñidas con Ioduro de Propidio a las 24, 48, 72 hs posteriores a la irradiación. A. Región de linfocitos (izq) y sub-G1 (der) considerados para el análisis. B. Los resultados de apoptosis de controles (CTR) y pacientes (A-T) son expresados en porcentaje. (el valor de p está basado en la prueba t $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****)).

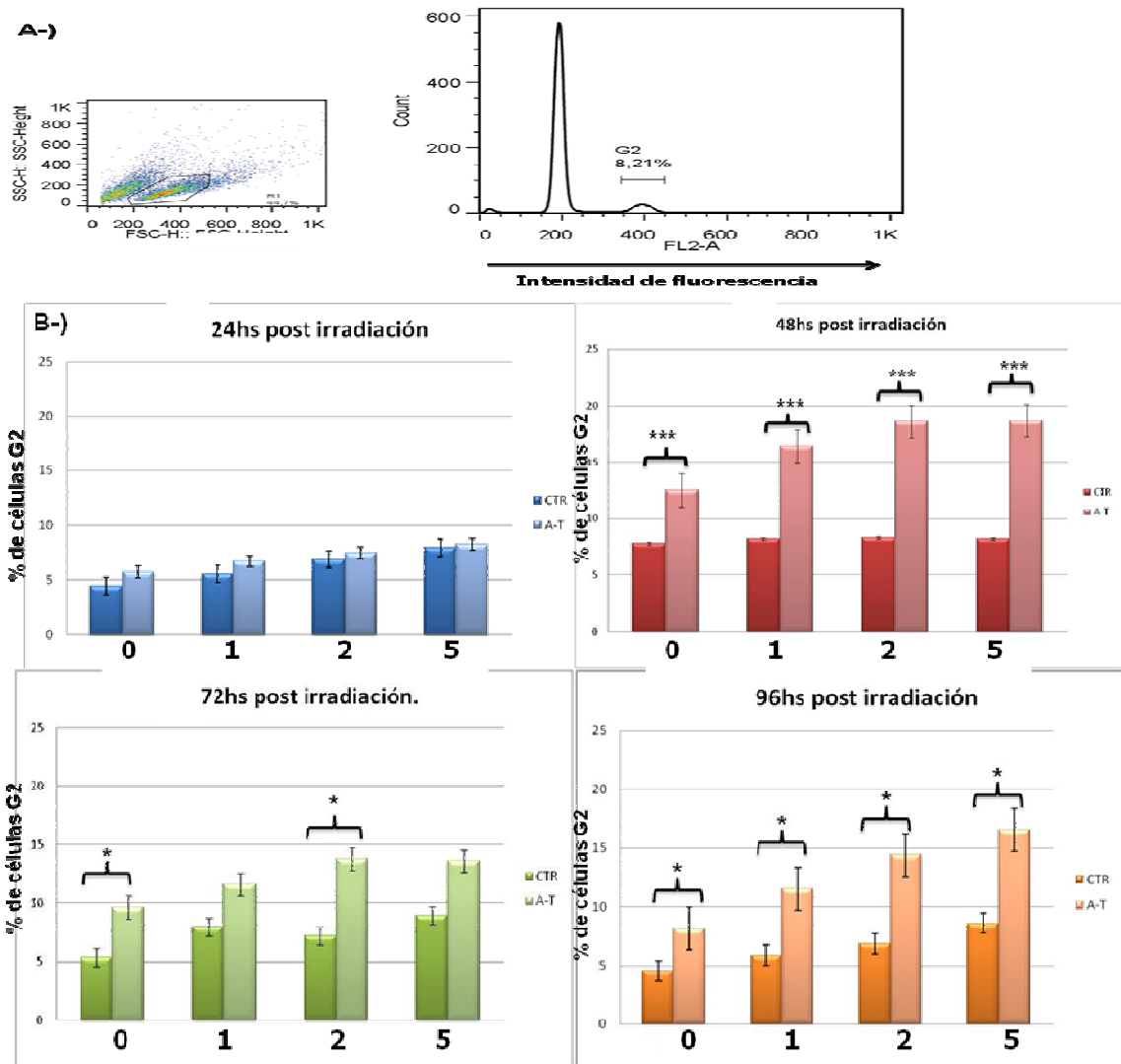


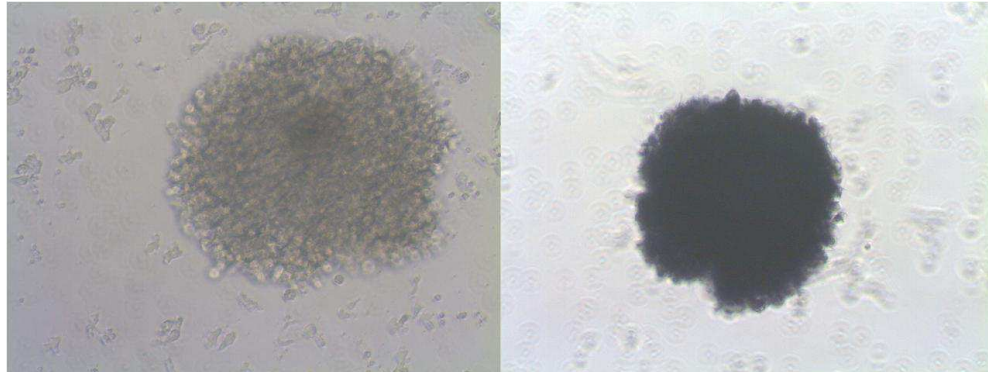
Figura 17. Análisis del porcentaje de células T aloespecíficas en fase G2 del ciclo celular de sujetos controles y pacientes con A-T. Las células T aloespecíficas fueron irradiadas a dosis de 1, 2 y 5 Gy, y fueron teñidas con Ioduro de Propidio a las 24, 48, 72 hs posteriores a la irradiación. A. Región de linfocitos (izq) y pico G2 (der) considerados para el análisis. B. Los resultados de G2 de controles (CTR) y pacientes (A-T) son expresados en porcentaje. (el valor de "p" está basado en la prueba t).

Con el objeto de comprobar los efectos de la radiación a largo plazo en las líneas celulares de pacientes, hemos utilizado el ensayo de clonogenicidad o CSA (Colony survival Assay) (Huo et al., 1994). En dicho ensayo se utilizaron líneas de linfocitos inmortalizadas con el virus de Epstein Barr, sin embargo, nosotros hemos utilizado

las líneas T aloespecíficas. Una vez sembradas las células en placa de 96 pocillos (750 células/mL) fueron irradiadas a la dosis de 1Gy, pasados 9-12 días se procedió a la observación bajo microscopio. Las colonias viables se presentaban refringentes a la luz y con MTT (1mL/mL) tenían un color violáceo como se puede observar en la Figura 17 A (izq y der). Una vez obtenido el número de colonias se calculó la Eficiencia de formación de colonias (CFE) tanto de las células no irradiadas como de las irradiadas, para luego calcular la fracción de supervivencia SF (Survival fraction) y enmarcarlas en la escala de radiosensibilidad (Sun et al., 2002) como hemos descrito en materiales y métodos. Como controles hemos utilizado las líneas N1 y N12.

En la Tabla XI y en la Figura 18 B, podemos observar los resultados obtenidos tanto de los controles como de los pacientes. La mayoría de las líneas A-T se presentaron como radiosensibles e intermedios (44 y 52% de SF respectivamente), mientras que sólo una presentó valores dentro del rango de la normalidad (ATMp13) pero sin llegar a igualar los porcentajes obtenidos por los controles (N1 y N12).

A-)



B-)

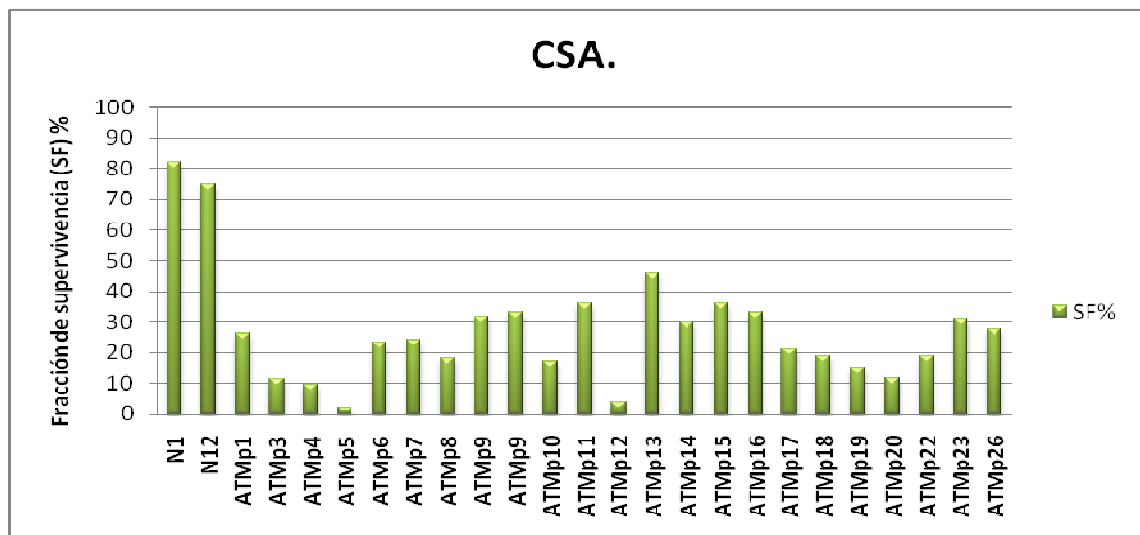


Figura 18. Ensayo de clonogenicidad en líneas T aloespecíficas de controles (N1 y N12) y pacientes A-T. Las líneas celulares fueron cultivadas a una concentración de 750 células/mL e irradiadas a 1Gy mientras que sus controles no fueron irradiadas. Tras 9-12 días se agregó MTT 1mg/mL y se procedió a la observación bajo microscopio. A. Aspecto de las colonias formadas en dicho periodo, se observan células refringentes (izq) y al estar en contacto con el MTT se observan de color violáceo indicando viabilidad (der). B. Porcentaje de SF (Fracción de Supervivencia) de las líneas T aloespecíficas analizadas tanto de controles (N1 y N12) como de pacientes A-T.

Tabla XI. Radiosensibilidad de las líneas T aloespecíficas de pacientes con A-T analizadas mediante un ensayo de clonogenicidad (CSA).

Línea	Fracción de Supervivencia (%)	Radiosensibilidad
N1	82,12	Normal
N12	74,8	Normal
ATMp1	26,4	Intermedia
ATMp3	11,5	Radiosensible
ATMp4	9,7	Radiosensible
ATMp5	2	Radiosensible
ATMp6	23,4	Intermedia
ATMp7	24,1	Intermedia
ATMp8	18,09	Radiosensible
ATMp9	31,8	Intermedia
ATMp9	33	Intermedia
ATMp10	17,3	Radiosensible
ATMp11	36	Intermedia
ATMp12	3,9	Radiosensible
ATMp13	45,65	Normal
ATMp14	29,9	Intermedia
ATMp15	36	Intermedia
ATMp16	33	Intermedia
ATMp17	21	Intermedia
ATMp18	19	Radiosensible
ATMp19	14,9	Radiosensible
ATMp20	11,6	Radiosensible
ATMp22	19	Radiosensible
ATMp23	30,9	Intermedia
ATMp26	27,6	Intermedia

3. Estudio funcional de células vírgenes y memoria de pacientes A-T y controles sanos.

Determinación de citoquinas intracelulares.

Como hemos visto en la introducción, existen numerosos estudios que han evaluado la inmunidad celular de los pacientes A-T, especialmente la producción de citoquinas tras diversos estímulos. Sin embargo los resultados han sido muy variados y realizados con diferentes tipos celulares desde células periféricas mononucleares (Reichenbach et al., 2006), linfocitos sanguíneos periféricos (Pashankar et al., 2006) o células T inmortalizadas con Herpes Virus Saimiri (HVS) (Rivero-Carmena et al., 2000).

Con el objeto de evaluar la producción de citoquinas en linfocitos de sangre periférica de pacientes con A-T y de controles sanos, nos propusimos separar los linfocitos T CD4 vírgenes de los linfocitos T CD4 memoria, para lo cual separamos las células mononucleares mediante gradiente de densidad y utilizamos los equipos comerciales "*Naive CD4+ T Cells Isolation Kit*" y "*Memory CD4+ T Cells Isolation kit*" de MACS (Miltenyi Biotec, California, USA). Para este experimento se utilizó sangre de los pacientes ATMp1, ATMp3, ATMp4, ATMp7, ATMp8, ATMp10 y ATMp26 y con ellos los controles C1 al C6.

Una vez realizada la separación comprobamos la pureza de la fracción negativa (que contenía la población de interés), para lo cual se dispuso en tubos de citometría 50µL de dicha fracción y realizamos la tinción con FITC IgG1 de ratón (Biolegend, San Diego, USA), PE IgG1 de ratón (eBiosciencie, San Diego, USA) para los controles de Isotipo, así como CD4-FITC (clon RPA-T4, Biolegend) y CD45RO-PE (clon UCHL1, eBiosciencie) en la fracción negativa de las células memorias y CD4-FITC (clon RPA-T4, Biolegend) y CD45RA-PE (clon HI100, eBiosciencie) en la fracción negativa de las células vírgenes (Figura 17). La pureza obtenida en todos los casos ha superado el 90%. en la Figura 19 se

representa una de las muestras y se obtuvieron 92.7% y 97.45% de pureza en la fracción de células memoria y vírgenes respectivamente.

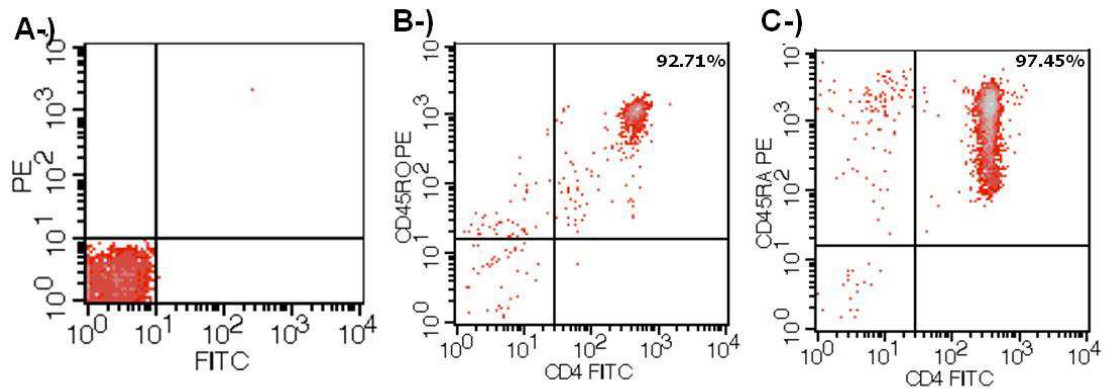


Figura19. Pureza de la poblaciones celulares obtenidas por inmuno selección magnética negativa. Las células mononucleares periféricas fueron separadas por gradiente de densidad y luego por separación magnética negativa fueron aislados los linfocitos CD4 vírgenes de los linfocitos CD4 memoria, A. Control de isotipo FITC IgG1 de ratón (Biolegend, San Diego, USA), PE IgG1 de ratón (eBiosciencie, San Diego, USA) B. Fracción negativa de la separación de células CD4 Memoria. La tinción se realizó con CD4-FITC (Biolegend) y CD45RO-PE (eBiosciencie) C. Fracción negativa tras la separación de los linfocitos CD4 vírgenes. La tinción se realizó con CD4-FITC (Biolegend) y CD45RA-PE (eBiosciencie).

Una vez confirmada la pureza de la población, procedimos a la estimulación de las células CD4/CD45RO y CD4/CD45RA con PMA/Ionomicina (10ng/mL y 5µg/mL respectivamente) durante 24hs, (añadiendo en las 6 últimas horas de incubación el inhibidor de transporte de proteína GolgiPlµg BD). Pasadas las 24hs se recogieron las células, se congelaron los sobrenadantes (-20°C) y se lavaron con PBS para la realización de la tinción intracitoplasmática. Previamente a la tinción se fijaron y permeabilizaron con Cytofix/Cytoperm (BD) (20 min) y se lavaron con PermWash (BD). La tinción se realizó con PE IgG1 y APC IgG1 ambos de ratón (eBiosciencie) como controles de isotipo, IL2/PE (BD), IL17-A/PE (eBiosciencie) y anti IFN-γ/APC (eBiosciencie), las muestras fueron analizadas por citometría de flujo.

En la Figura 20 se puede observar la producción de citoquinas de los linfocitos T CD4 memoria (CD4/CD45RO), en la Figura se muestra a las células del Control 6 (CTR 6) en representación de los controles.

En la Figura 20 se muestra la producción de citoquinas de los linfocitos T CD4 memoria (CD4/CD45RO) del paciente ATMp7, elegido como representativo de los resultados obtenidos en los pacientes con A-T. En ambos casos (CTR6 y ATMp7) se representan los porcentajes de células productoras de citoquinas intracelulares. En el ejemplo vemos cómo la producción tanto de IL-2, IL-17A e IFN- γ (46.6%, 17.6%, 45.6% respectivamente) es mayor en el control (CTR6) con respecto a la producción de las mismas citoquinas producidas por las células del paciente ATMp7 (28.8%, 7.7%, 32.28% respectivamente).

En las figura 21 estan representados la producción de citoquinas de linfocitos T CD4/CD45RA tanto en el CTR6 como en el paciente ATMp7 respectivamente. Se puede observar que existe una buena respuesta a la estimulación con PMA/IO. Los valores de IL-2, IL-17A e IFN- γ de CTR6 (50.1%, 7.71,% y 20.1% respectivamente) fueron un poco mayores que los expresados por el paciente ATMp7 (34.41%, 4.68% y 15.17% respectivamente).

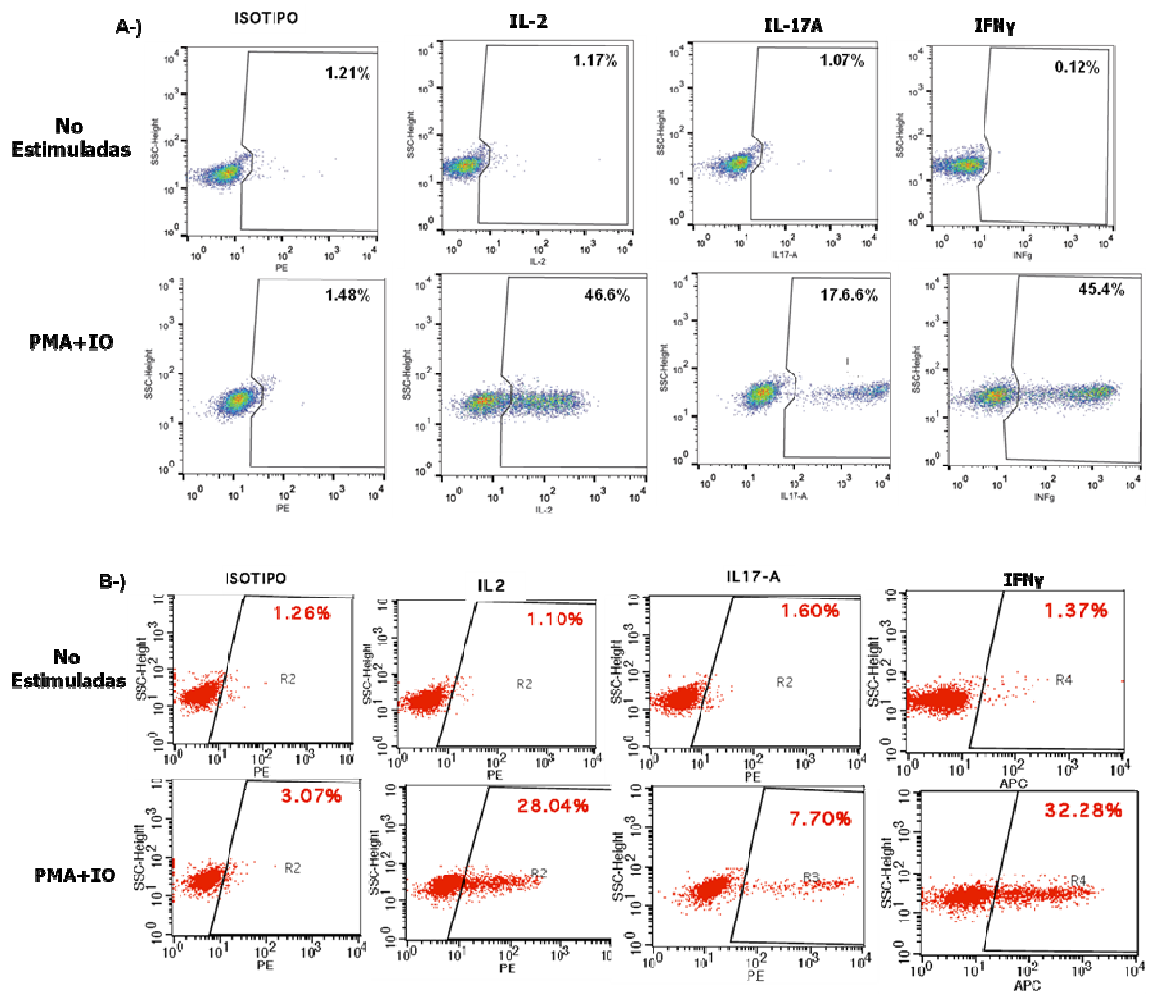


Figura20. Producción de citoquinas intracelulares por células T Memoria (CD4/CD45RO) del control 6 (CTR6) y del paciente (ATMp7). Las células T CD4/CD45RO fueron cultivadas 24hs con PMA/Ionomomicina (10ng/mL. 0.5µg/mL), se agregó GolgiPlµg en las 6 últimas horas, se fijaron y permeabilizaron antes de realizar la tinción con los anticuerpos respectivos. A-) Células del control 6 (CTR6) no estimuladas (panel superior) y células estimuladas con PMA+IO (panel inferior) B-) Células del paciente ATMp7 no estimuladas (panel superior) y células estimuladas con PMA+IO (panel inferior). De izquierda a derecha tenemos el control de Isotipo, IL-2/PE (BD), IL-17A/PE (eBiosciencie) y IFNγ/APC (eBiosciencie).

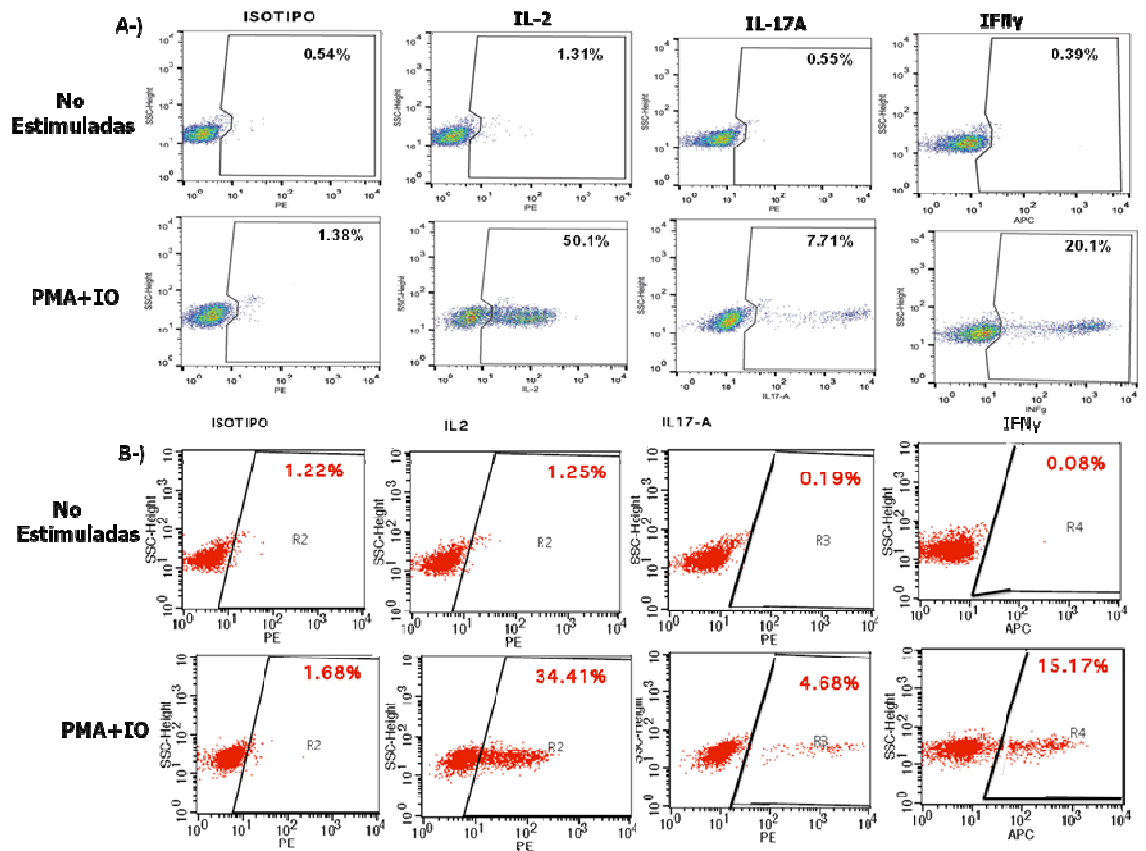


Figura 21. Producción de citoquinas intracelulares por células T Vírgenes (CD4/CD45RA) del control 6 (CTR6) y del paciente (ATMp7). Las células T CD4/CD45RA fueron cultivadas 24hs con PMA/Ionicina (10ng/mL, 0.5µg/mL), se agregó GolgiPlug en las 6 últimas horas, se fijaron y permeabilizaron antes de realizar la tinción con los anticuerpos respectivos. A-) Células del control 6 (CTR6) no estimuladas (panel superior) y células estimuladas con PMA+IO (panel inferior) B-) Células del paciente ATMp7 no estimuladas (panel superior) y células estimuladas con PMA+IO (panel inferior). De izquierda a derecha tenemos el control de Isotipo, IL-2/PE (BD), IL-17A/PE (eBiosciencie) y IFNγ/APC (eBiosciencie).

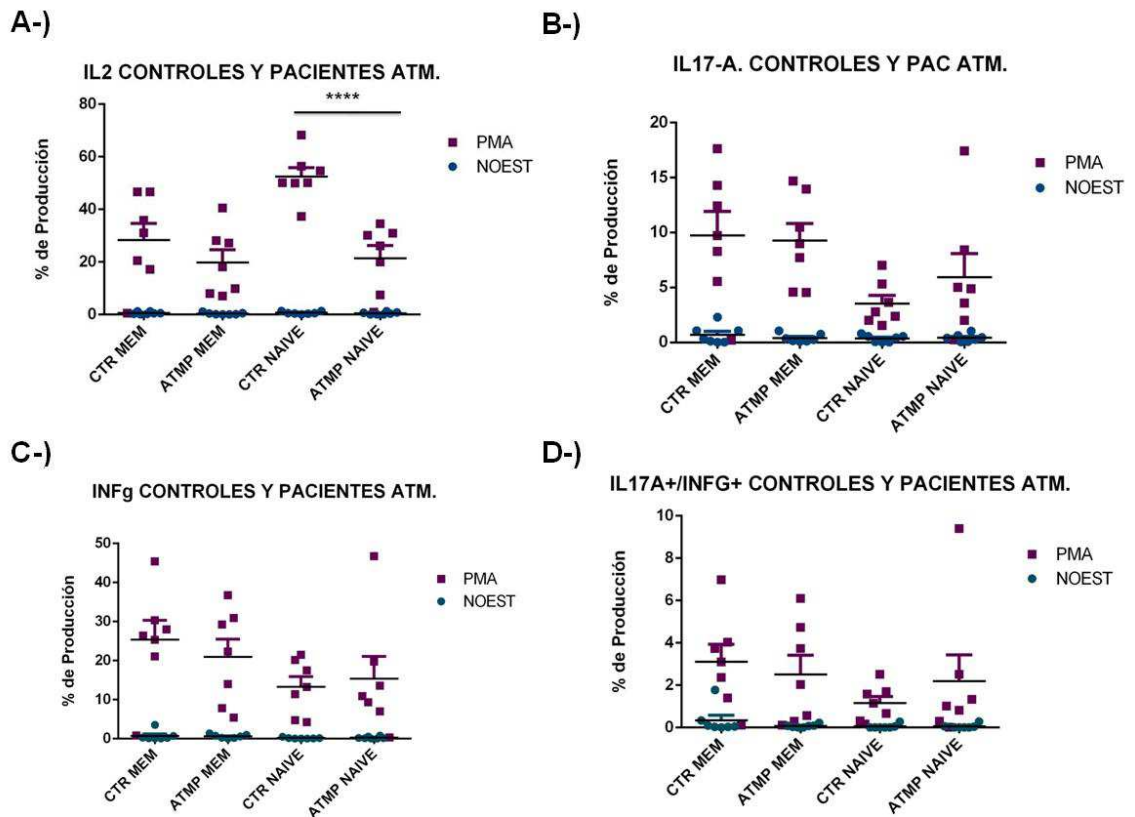


Figura22. Análisis de la producción de citoquinas intracelulares en células T CD4/CD45RA (Naive) y CD4/CD45RO (Memoria) en pacientes A-T (ATMp) y controles (CTR). Las células T CD4/CD45RO y CD4/CD45RA fueron cultivadas 24hs con PMA/Ionomicina (10ng/mL, 0.5 μ g/mL) durante 24hs, se agregó GolgiPlug en las 6 últimas horas, se fijaron y permeabilizaron antes de realizar la tinción con los anticuerpos respectivos, una vez teñidos fueron analizados en el citómetro de flujo. Los valores "p" están basados en la prueba Two-Way ANOVA. A. Producción de IL-2 por controles y pacientes, B. Producción de IL-17A por controles y pacientes. C. Producción de INF γ por controles y pacientes. D. Producción de IL-17A e INF γ por controles y pacientes. Los valores están dado en porcentaje (%) de producción. $p < 0.0001$ (****)

En la Figura 22 se puede ver el análisis de la producción de citoquinas intracelulares de los pacientes A-T (ATMp) y de los controles (CTR). La producción de IL-2 (fig.22 A) fue mayor en las células vírgenes (naive) de los controles con respecto a las células vírgenes de los pacientes ($p < 0.0001$) y también con respecto a las células memoria de los controles ($p < 0.001$). Sin embargo, en la producción de IL-17A (fig.22 B) se puede observar un aumento en la producción por parte de las células memoria controles con respecto a las naive controles ($p < 0.001$), pero no se observan diferencias significativas entre los grupos pacientes (ATMp) y controles (CTR).

Al analizar la producción de IFN γ (fig.22 C) y de las dobles productoras IL-17A/IFN γ (fig.22 D) no hemos encontrado diferencia entre los grupos de pacientes y controles.

Determinación de la producción de citoquinas en el sobrenadante de células estimuladas.

La determinación de la liberación de citoquinas del sobrenadante fue realizada utilizando el "Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex RTU FlowCytomix Kit" (eBiosciencie Viena-Austria), cuyas perlas fluorescentes llevan unidos los anticuerpos monoclonales de las citoquinas a determinar. Como habíamos mencionado en materiales y métodos, el fundamento se basa en que una vez que las perlas fluorescentes están en contacto con la muestra, hay unión antígeno anticuerpo y un segundo anticuerpo conjugado con biotina se une a los analitos capturados por el primer anticuerpo. A continuación, se añade Estreptavidina-PE que se une a la biotina conjugada y emite señales fluorescentes. Una vez acabado el procedimiento se procedió a la lectura en el citómetro de flujo FACS Canto. El análisis se realizó con el programa FlowCytomix Pro Software (eBiosciencie), y el posterior análisis bioestadístico mediante el programa GraphPad6 Prism. El valor

de “ p ” está basado en la prueba de Two-Way ANOVA. $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (**), $p < 0.001$ (***) , $p < 0.0001$ (****).

En la Figura 23 podemos ver la producción de citoquinas en el sobrenadante de las células vírgenes y memoria tanto de las células controles como de los pacientes tras 24 hs de estimulación. En el panel A se observa un ligero aumento de la IL-12p70 de las células memoria de paciente con respecto a las células memorias de individuos normales, aunque tal diferencia no ha sido significativa. En el panel B se observa un aumento de la producción de IL2 de las células memoria y células vírgenes de los controles con respecto a la producción de las células memoria y células vírgenes de los pacientes (sin significancia estadística). Sin embargo en el panel C se observa que la producción de IFN γ es ligeramente mayor en las células memoria de los pacientes con respecto a las memoria de los controles, pero también sin significancia estadística. En la producción de TNF- α no vemos mayores diferencias entre uno y otro grupo.

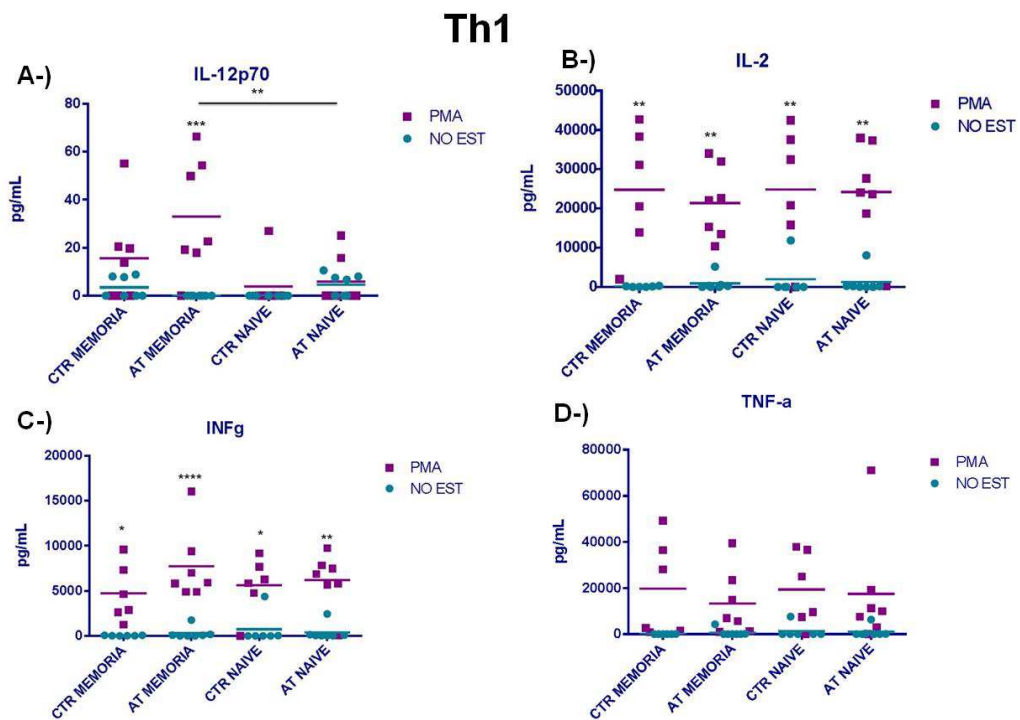


Figura 23. Análisis de la producción de citoquinas en el sobrenadante después de 24hs de estimulación de células T CD4/CD45RA (Naive) y CD4/CD45RO (Memoria) en pacientes A-T (A-T) y sujetos control (CTR). Las células T CD4/CD45RO y CD4/CD45RA fueron cultivadas 24hs con PMA/Ionicina (10ng/mL, 0.5 μ g/mL) durante 24 hs, cumplido el tiempo las células se separaron del sobrenadante y se congelaron hasta su procesamiento. A-) Producción de IL-12p70 (pg/mL), B-) Producción de IL-2 (pg/mL), C-) Producción de IFN- γ (pg/mL), D-) Producción de TNF- α (pg/mL).

En la Figura 24 se observa la producción de citoquinas del tipo Th2 después de 24 hs de estimulación. En los paneles A, B y D se observa que existe una ligera diferencia en la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 de los grupos A-T con respecto a los controles CTR, tanto en las células vírgenes como en las memorias, aunque tal diferencia no es estadísticamente significativas. La IL-10 es la única que se presenta de manera diferente, los grupos CTR (vírgenes y memoria) tienen mayor producción cuando se compara con sus respectivos grupos (vírgenes y memoria respectivamente)

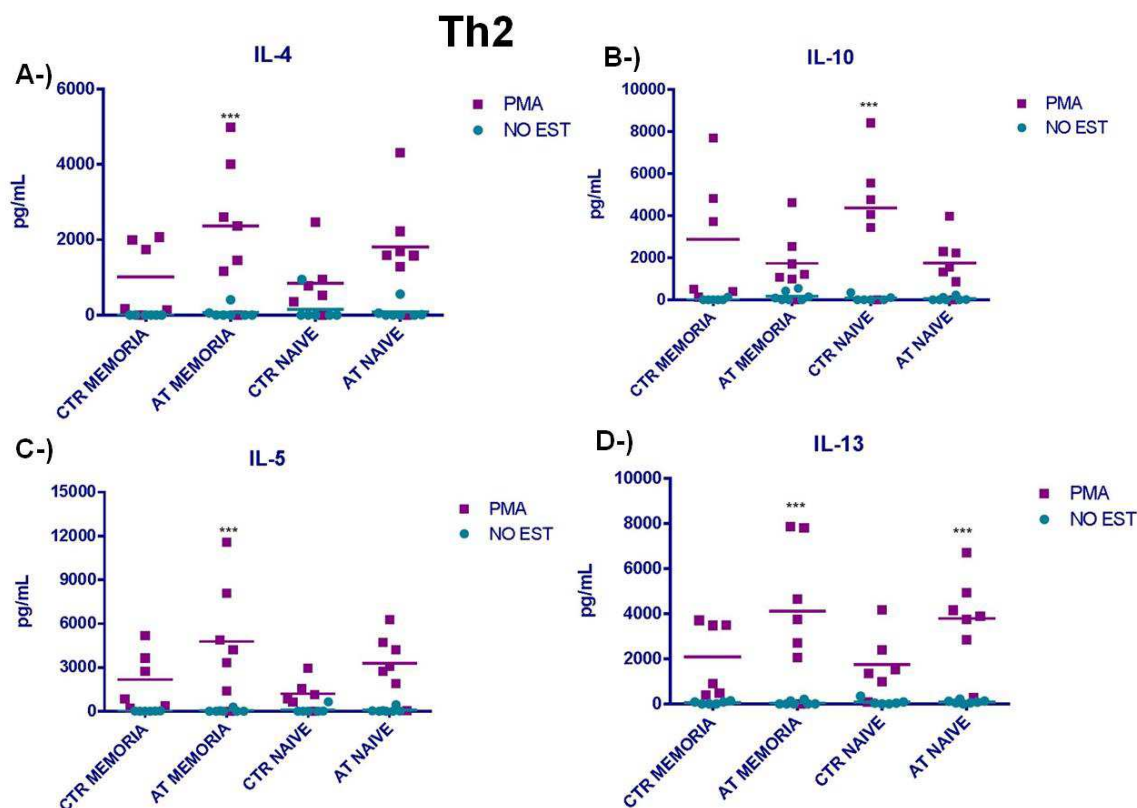


Figura 24. Análisis de la producción de citoquinas en el sobrenadante después de 24hs de estimulación de células T CD4/CD45RA (Vírgenes) y CD4/CD45RO (Memoria) en pacientes A-T (A-T) y controles (CTR). Las células T CD4/CD45RO y CD4/CD45RA fueron cultivadas 24hs en presencia de PMA/Ionomicina (10ng/mL, 0.5µg/mL) durante 24hs, cumplido el tiempo las células se separaron del sobrenadante y se congelaron hasta su procesamiento. A-) Producción de IL-4 (pg/mL), B-) Producción de IL-10 (pg/mL), C-) Producción de IL-5 (pg/mL), D-) Producción de IL-13 (pg/mL).

En la Figura 25 A, vemos la producción de la IL-17A, se observa un aumento (sin significancia estadística) del grupo AT memoria vs CTR memoria. Sin embargo en la producción de la IL-9 el aumento se observa en ambos grupos celulares (vírgenes y memoria) de las células AT.

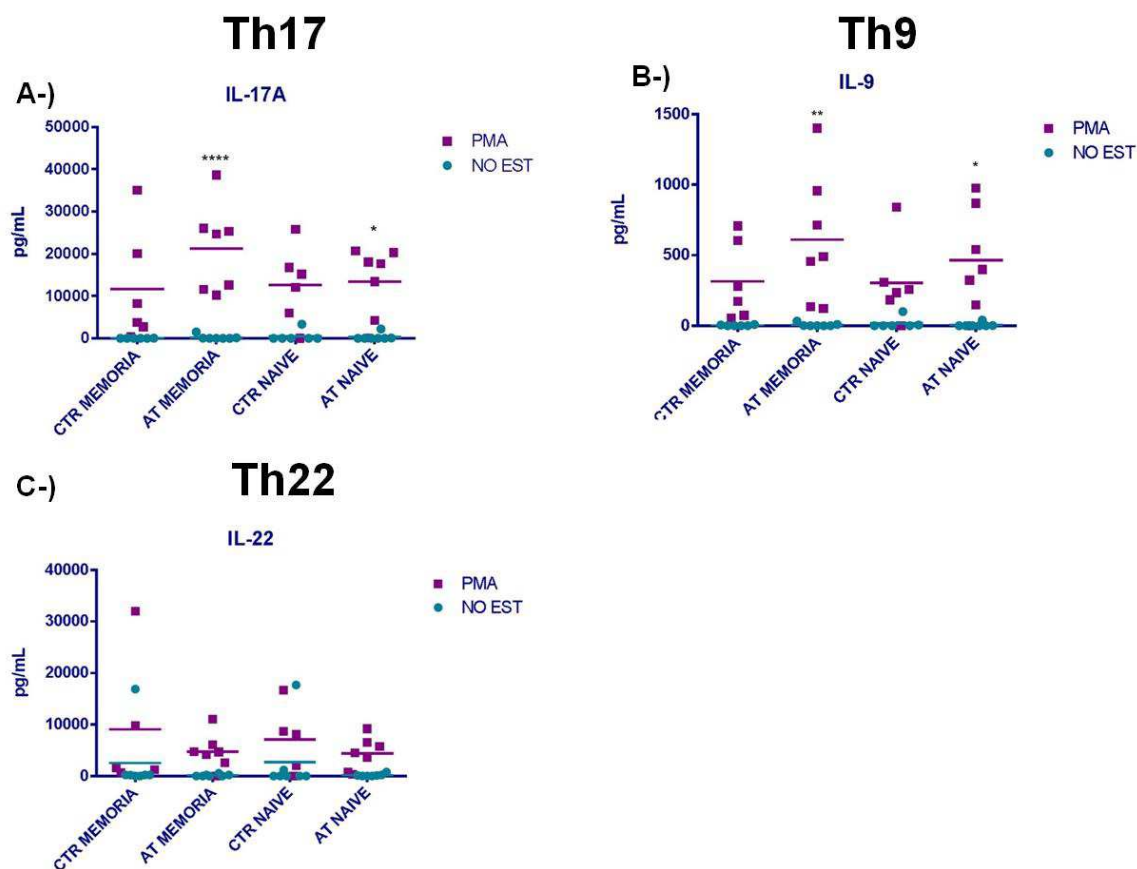


Figura25. Análisis de la producción de citoquinas en el sobrenadante después de 24hs de estimulación de células T CD4/CD45RA (Virgenes) y CD4/CD45RO (Memoria) en pacientes A-T (A-T) y controles (CTR). Las células T CD4/CD45RO y CD4/CD45RA fueron cultivadas 24hs con PMA/Ionomicina (10ng/mL, 0.5µg/mL) durante 24 hs. A-) Producción de IL-17A (pg/mL), B-) Producción de IL-9 (pg/mL), C-) Producción de IL-22 (pg/mL).

7. DISCUSIÓN

La Ataxia Telangiectasia es una enfermedad rara autosómica recesiva caracterizada por una amplia gama de manifestaciones patológicas como: ataxia cerebelar progresiva, sensibilidad a la radiación, aumento en el riesgo al cáncer, inmunodeficiencia, hipogonadismo (Boder, 1985). El gen responsable de A-T, ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), está localizado en el cromosoma 11q22-23 y ocupa 160kb del ADN genómico (Uziel et al., 1996), el transcrito primario de 13 kb (66 exónes) codifica un polipéptido de 3056 aa (370kDa) (Gatti et al., 1988).

La heterogeneidad en A-T se presenta no sólo en la variabilidad en los aspectos clínicos, sino también en el laboratorio, donde según el tipo de mutación que porta el paciente, puede expresar o no la proteína y en cuyo caso de que la exprese aunque sea trazas, puede presentar o no actividad quinasa. Esta heterogeneidad está muy relacionada con las mutaciones en el gen de *ATM*.

Las mutaciones el gen de *ATM* ocurren a lo largo del gen, y cerca del 90% de los pacientes A-T son heterocigotas (portadores de diferentes mutaciones en los alelos de *ATM*). Las mutaciones están constituidas por pequeñas inserciones y deleciones, y cambios en un único nucleótido (McConville et al., 1996).

Los tipos de mutaciones pueden tener diferentes proporciones según los estudios y pueden variar de uno a otro, en el presente estudio hemos encontrado que la mayoría (70%) son heterocigotas y debidas a pequeñas deleciones (37%), en otros estudios se han encontrado un mayor porcentaje (48%) de mutaciones en la zona donación-aceptación (Teraoka et al., 1999), y nosotros hemos encontrado sólo 2 (7.5%). Una de esas mutaciones debidas a la zona donación-aceptación se encuentra en homocigosis en el exón 24 (c.3576G>A) en el paciente ATMp22, y la otra mutación se encuentra en el intrón 63 (ATMp16). En ambos casos se esperaría la presencia de proteína truncada, pero nosotros no la hemos detectado. En este estudio hemos detectado 10 nuevas mutaciones, las cuales no se encuentran en la base de datos de dbSNP de la NCBI ni en la biobase de HGMD,

seis de ellas son deleciones, dos debida a mutaciones sin sentido por lo que se introduce un codón de parada, y dos mutaciones con cambio de sentido.

Una mutación antes descrita en un paciente español (Garcia-Perez et al., 2001), implica una deleción importante de 28 nucleótidos y afecta a la mayoría de los pacientes de Granada (ATMp4, ATMp7, ATMp8 y ATMp26), tres de ellos presentan la mutación en homocigosis incluyendouno proveniente de Barcelona (ATMp27) cuyo origen es andaluz de etnia gitana, cuyos padres y abuelos son consanguíneos. Aunque es difícil establecer el genotipo-fenotipo de estos pacientes dado que sólo tenemos algunos datos generales clínicos, podemos mencionar que dos de ellos (ATM7 y ATMp26) no han tenido infecciones importantes y nunca han sido tratados con inmunoglobulinas intravenosa, mientras que ATMp4 y ATMp8 han dejado de utilizarla. Esta mutación, por tanto, se encuentra muy frecuentemente en los pacientes de etnia gitana, en los que la consanguineidad es relativamente frecuente. Varios de los pacientes del grupo de Granada comparten apellidos, a pesar de que todos ellos niegan ningún tipo de parentesco entre sí. El hecho, no obstante, de que la mutación se encuentre en todos ellos en homocigosis nos hace sospechar de que debió estar ligada a un efecto fundador que se ha mantenido además a lo largo de múltiples generaciones, las suficientes para que los pacientes no consideren familiares a otros individuos que comparten alguno de los apellidos y la mutación.

El estudio de la variación genética, especialmente los polimorfismos de un único nucleótido (SNP), ha sido extensamente utilizado en estudios del genoma para localizar regiones genómicas que son susceptibles a la enfermedad y a la variación fenotípica. Los SNPs pueden alterar la secuencia de amino ácidos, modificando las propiedades de la proteína codificada, algunos SNPs pueden alterar la respuesta celular y de ese modo aumentar la susceptibilidad a enfermedades como el cáncer (Bandelet et al., 2011). Algunos estudios han propuesto un efecto fenotípico para

algunos polimorfismos de ATM. En la cohorte estudiada hemos detectado algunos polimorfismos, uno de ellos es la variación c.5557G>A en el exón 37 que ha sido relacionado con el cáncer de mama, Heikkinen et al. observaron que en presencia de la variación IVS38-8T en cis tenía una significativa asociación con el cáncer de mama bilateral (Heikkinen et al., 2005), aunque estas observaciones han tenido sus discrepancias con otros autores (Langholz et al., 2006). Otras dos variaciones relacionadas con el cáncer de pulmón de células no microcíticas (c.8010+186C>T, c.8851-973A>C) han sido detectado en trece de nuestros pacientes, en el estudio realizado por Yang et al. estas variaciones exhibieron una significativa asociación con el cáncer descrito (Yang et al., 2007).

Aunque la mayor parte de las mutaciones detectadas en el gen de ATM en pacientes con A-T predicen como resultado una proteína truncada, sin embargo, el análisis de las líneas celulares de pacientes con A-T, con anticuerpos directos contra ATM, indican que la mayoría de estas mutaciones están asociadas con la ausencia de proteína detectable de ATM (Teraoka et al., 1999). Esto sugiere que la estabilidad de la proteína de ATM depende de la integridad de su estructura tridimensional, así, las formas mutadas serían blanco del proceso de degradación proteica (Becker-Catania et al., 2000). Atribuimos la ausencia de proteína en la mayoría de los pacientes a la inestabilidad de la proteína truncada. En nuestro estudio, cerca del 80% de los pacientes no presentan proteína detectable, y ninguno de los que la expresan tienen actividad quinasa inducida por radiación. En el estudio realizado por Verhagen et al. la sola presencia de proteína estaría correlacionada con una ligera mejora en la función inmunológica (Verhagen et al., 2012), aunque sólo tenemos los datos clínicos de los pacientes de Granada, podemos mencionar que dos de los que presentan trazas (ATMp3, ATMp7) y uno con mucha presencia de proteína (ATMp5), sólo uno estuvo libre de infecciones importantes (ATMp7). No obstante, y a pesar de la presencia de proteína en

algunos de los pacientes de la cohorte, no hemos detectado actividad quinasa de ATM en ninguno de ellos.

La integridad del genoma y su correcta transmisión de la información genética es custodiada por un sin número de proteínas, una de ellas es la proteína de ATM. Los sustratos y sitios blanco de la quinasa ATM están implicados en los puntos de control del ciclo celular, de este modo, si las células sufren daños en su ADN por agentes como la radiación, mediante los puntos de control, la progresión del ciclo celular sería temporalmente detenido para reparar el daño (Langerak and Russell, 2011). Si la célula no es capaz de reparar el daño iría a la muerte programada o apoptosis. La mutación de ATM hace que la apoptosis se vea afectada después del daño al ADN. Como las células sin ATM carecen del punto de control de la fase S, si se irradian células en esta fase, se puede observar la acumulación de la fase G2/M (Xu et al., 2002). Esta acumulación (en G2), la hemos observado al irradiar líneas celulares de pacientes A-T y controles (Figura 16). En dicho ensayo ha habido diferencias significativas con respecto a los controles incluso a las 96hs del estudio, sin embargo, en la apoptosis medida con Ioduro de Propio (Figura 15), sólo hemos tenido diferencias significativas a las 72hs y con la mayor dosis de radiación (5Gy). A la vista de estos resultados, y con el objeto de observar la supervivencia mas allá de las 96hs, hemos llevado a cabo el ensayo de radiosensibilidad (CSA) a largo plazo (9-12 días).

El ensayo de radiosensibilidad a largo plazo (CSA) se realizó en 22 líneas de los 27 pacientes, un poco menos de la mitad (44%) se mostró radiosensible, y mas de la mitad (52%) con valores intermedios de fracción superviviente (SF), esto podría explicar los resultados obtenidos en el ensayo de apoptosis, las células A-T que fueron capaces de superar el daño debido a la radiación continuaron normalmente su crecimiento.

Otro dato importante que hemos obtenido del ensayo de radiosensibilidad es que no hemos encontrado relación entre la presencia de proteína (trazas/ausencia) y su estado de radiosensibilidad. Un claro ejemplo es el resultado de la línea del paciente ATMp5 (65% de proteína con respecto a la línea N1) cuyas células fueron radiosensibles a la irradiación. El paciente ATMp13 presentaba trazas de proteína (8% de proteína con respecto a la línea N1), y en el ensayo de CSA dio como resultado valores normales para la radiosensibilidad (aunque muy bajo 45.65%).

Otro aspecto importante es que los pacientes con A-T son más susceptibles a infecciones, y esto ha sido atribuido en parte a diversos grados de inmunodeficiencias. ATM juega un papel importante tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa y tiene parte tanto en el desarrollo de linfocitos T como en el desarrollo de linfocitos B. Los pacientes A-T suelen exhibir contajes anormales de linfocitos T y B además de una respuesta deficiente de anticuerpos (Stracker et al., 2013). Numerosos estudios han medido varios parámetros inmunológicos con el fin de perfilar la inmunidad celular de estos pacientes y paradójicamente hay una variedad de resultados (Tabla 2 y 3). En este estudio hemos querido determinar algunos parámetros de la inmunidad celular como los marcadores de activación y producción de citoquinas.

En las líneas T aloespecíficas hemos determinado los marcadores de activación CD69 y CD40-L. La respuesta de las células tanto en la estimulación con PMA/Ionomicina como con anti-CD3/CD28 ha sido normal (si bien un poco disminuida, pero sin significancia estadística). Estos resultados se correlacionan con los encontrados por Pashankar et al (Pashankar et al., 2006).

En el análisis celular nos hemos enfocado en los linfocitos T CD4+. Éstos representan una línea única en el sistema inmunológico adaptativo donde es crucial para lograr una respuesta inmunológica efectiva frente a patógenos, y su propia función es vital en la supervivencia donde un funcionamiento aberrante está

asociado en el desarrollo de múltiples enfermedades autoinmunes y alérgicas (Luckheeram et al., 2012). En el análisis de citoquinas intracelulares hemos observado una disminución en la producción de IL-2 de las células vírgenes de los pacientes con respecto a los controles, sin embargo, en la determinación de citoquinas en el sobrenadante no hemos encontrado dicha diferencia, pudiendo deberse al consumo autócrino por las mismas células. No hemos encontrado relación entre los pacientes que presentan trazas de proteína (ATMp3, ATMp7, ATMp10) y aquellos que no presentan en relación con la producción de citoquinas, esto podría deberse a que la presencia de proteína sin actividad quinasa no sirve para modificar el curso de las vías de fosforilación en las que participa ATM.

El vitíligo es una enfermedad de despigmentación autoinmune mediada por células T, Tembhe et al. han observado recientemente que existe un aumento de las interleuquinas IL-10, IL-13 e IL-17 A en el suero de estos pacientes (Luckheeram et al., 2012; Tembhe et al., 2013). Dos de los pacientes (ATMp1 y ATMp8) incluidos en el estudio presentan esta patología, en ellos hemos observado un ligero aumento de las interleukinas IL-10 e IL-17 A con respecto a los otros pacientes A-T incorporados en el estudio, sin embargo en la producción de IL-13 han presentado valores intermedios. Es interesante recalcar la ausencia de literatura que incluyan la autoinmunidad en sus distintas formas y la A-T, por lo que sería interesante realizar estudios mas profundos en estos pacientes para buscar una posible causa-efecto.

8. CONCLUSIONES

- 1.- Hemos realizado el estudio molecular del gen *ATM* en una cohorte de veintisiete pacientes españoles con Ataxia-Telangiectasia. Hemos identificado, en este grupo, un total de veintisiete mutaciones que se extienden por todo el gen. De entre ellas, once no han sido previamente descritas.
- 2.-Se han identificado, además, ocho variantes naturales no considerados como patogénicas pero asociados al incremento de riesgo para el desarrollo de tumores y otras patologías.
- 3.- El estudio de expresión de la proteína ATM revela cantidades apreciables de la misma en dos pacientes, trazas en otros seis y ausencia total en el resto. No obstante, la expresión residual de ATM detectada no conlleva ninguna actividad quinasa. El patrón de radiosensibilidad no correlaciona con la expresión de ATM.
- 4.- Se ha generado un panel de veintisiete líneas celulares primarias de linfocitos T aloespecíficos, que muestran, tras estimulación, una tendencia a una menor expresión de CD40L con respecto los controles. Este panel, además, revela en respuesta a irradiación un significativo aumento del número de células en fase G2 del ciclo celular con aumento de la apoptosis.
- 5.- La producción de citoquinas por las células T memoria de pacientes con A-T está intacta. Sí se aprecia, en cambio, una producción significativamente menor de IL-2 en células vírgenes.

Bibliografía

1. Aiuti,A., Slavin,S., Aker,M., Ficara,F., Deola,S., Mortellaro,A., Morecki,S., Andolfi,G., Tabucchi,A., Carlucci,F., Marinello,E., Cattaneo,F., Vai,S., Servida,P., Miniero,R., Roncarolo,M.G., and Bordignon,C. (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* *296*, 2410-2413.
2. Alexander,A., Cai,S.L., Kim,J., Nanez,A., Sahin,M., MacLean,K.H., Inoki,K., Guan,K.L., Shen,J., Person,M.D., Kusewitt,D., Mills,G.B., Kastan,M.B., and Walker,C.L. (2010). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *107*, 4153-4158.
3. Anheim,M., Fleury,M., Monga,B., Laugel,V., Chaigne,D., Rodier,G., Ginglinger,E., Boulay,C., Courtois,S., Drouot,N., Fritsch,M., Delaunoy,J.P., Stoppa-Lyonnet,D., Tranchant,C., and Koenig,M. (2010). Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics*. *11*, 1-12.
4. Bakkenist,C.J. and Kastan,M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* *421*, 499-506.
5. Bandele,O.J., Wang,X., Campbell,M.R., Pittman,G.S., and Bell,D.A. (2011). Human single-nucleotide polymorphisms alter p53 sequence-specific binding at gene regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* *39*, 178-189.
6. Barlow,C., Hirotsune,S., Paylor,R., Liyanage,M., Eckhaus,M., Collins,F., Shiloh,Y., Crawley,J.N., Ried,T., Tagle,D., and Wynshaw-Boris,A. (1996). Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* *86*, 159-171.
7. Barzilai,A., Rotman,G., and Shiloh,Y. (2002). ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* *1*, 3-25.
8. Bassing,C.H., Suh,H., Ferguson,D.O., Chua,K.F., Manis,J., Eckersdorff,M., Gleason,M., Bronson,R., Lee,C., and Alt,F.W. (2003). Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* *114*, 359-370.

9. Becker-Catania,S.G., Chen,G., Hwang,M.J., Wang,Z., Sun,X., Sanal,O., Bernatowska-Matuszkiewicz,E., Chessa,L., Lee,E.Y., and Gatti,R.A. (2000). Ataxia-telangiectasia: phenotype/genotype studies of ATM protein expression, mutations, and radiosensitivity. *Mol. Genet. Metab* *70*, 122-133.
10. Becker-Catania,S.G. and Gatti,R.A. (2001). Ataxia-telangiectasia. *Adv. Exp. Med. Biol.* *495*, 191-198.
11. Boder,E. (1985). Ataxia-telangiectasia: an overview. *Kroc. Found. Ser.* *19*, 1-63.
12. Boder,E. and Sedgwick,R.P. (1958). Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* *21*, 526-554.
13. Boutin,B., Wagner,D.K., and Nelson,D.L. (1987). Analysis of CD3 antigen expression in patients with ataxia-telangiectasia. *Clin. Exp. Immunol.* *68*, 320-330.
14. Broccoletti,T., Del,G.E., Amorosi,S., Russo,I., Di,B.M., Imperati,F., Romano,A., and Pignata,C. (2008). Steroid-induced improvement of neurological signs in ataxia-telangiectasia patients. *Eur. J. Neurol.* *15*, 223-228.
15. Broccoletti,T., Del,G.E., Cirillo,E., Vigliano,I., Giardino,G., Ginocchio,V.M., Bruscoli,S., Riccardi,C., and Pignata,C. (2011). Efficacy of very-low-dose betamethasone on neurological symptoms in ataxia-telangiectasia. *Eur. J. Neurol.* *18*, 564-570.
16. Buoni,S., Zannolli,R., Sorrentino,L., and Fois,A. (2006). Betamethasone and improvement of neurological symptoms in ataxia-telangiectasia. *Arch. Neurol.* *63*, 1479-1482.
17. Burma,S., Chen,B.P., Murphy,M., Kurimasa,A., and Chen,D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* *276*, 42462-42467.
18. Buzin,C.H., Gatti,R.A., Nguyen,V.Q., Wen,C.Y., Mitui,M., Sanal,O., Chen,J.S., Nozari,G., Mengos,A., Li,X., Fujimura,F., and Sommer,S.S. (2003). Comprehensive scanning of the ATM gene with DOVAM-S. *Hum. Mutat.* *21*, 123-131.

19. Carney,E.F., Srinivasan,V., Moss,P.A., and Taylor,A.M. (2012). Classical ataxia telangiectasia patients have a congenitally aged immune system with high expression of CD95. *J. Immunol.* *189*, 261-268.
20. Castellvi-Bel,S., Sheikhavandi,S., Telatar,M., Tai,L.Q., Hwang,M., Wang,Z., Yang,Z., Cheng,R., and Gatti,R.A. (1999). New mutations, polymorphisms, and rare variants in the ATM gene detected by a novel SSCP strategy. *Hum. Mutat.* *14*, 156-162.
21. Cavazzana-Calvo,M. and Hacein-Bey-Abina,S. (2001). Correction of genetic blood defects by gene transfer. *Curr. Opin. Hematol.* *8*, 360-367.
22. Celeste,A., Difilippantonio,S., Difilippantonio,M.J., Fernandez-Capetillo,O., Pilch,D.R., Sedelnikova,O.A., Eckhaus,M., Ried,T., Bonner,W.M., and Nussenzweig,A. (2003). H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell* *114*, 371-383.
23. Chen,B.P., Li,M., and Asaithamby,A. (2012). New insights into the roles of ATM and DNA-PKcs in the cellular response to oxidative stress. *Cancer Lett.* *327*, 103-110.
24. Cortes,M.L., Bakkenist,C.J., Di Maria,M.V., Kastan,M.B., and Breakefield,X.O. (2003). HSV-1 amplicon vector-mediated expression of ATM cDNA and correction of the ataxia-telangiectasia cellular phenotype. *Gene Ther.* *10*, 1321-1327.
25. Cortes,M.L., Oehmig,A., Perry,K.F., Sanford,J.D., and Breakefield,X.O. (2006). Expression of human ATM cDNA in *Atm*-deficient mouse brain mediated by HSV-1 amplicon vector. *Neuroscience* *141*, 1247-1256.
26. de Miranda,N.F., Bjorkman,A., and Pan-Hammarstrom,Q. (2011). DNA repair: the link between primary immunodeficiency and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1246*, 50-63.
27. Derheimer,F.A. and Kastan,M.B. (2010). Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. *FEBS Lett.* *584*, 3675-3681.

28. Dork,T., dix-Waltes,R., Wegner,R.D., and Stumm,M. (2004). Slow progression of ataxia-telangiectasia with double missense and in frame splice mutations. *Am. J. Med. Genet. A* *126A*, 272-277.
29. Du,L., Pollard,J.M., and Gatti,R.A. (2007). Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 6007-6012.
30. Epstein,A.L. (2005). Present and future of herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-based amplicon vectors. *Pathol. Biol. (Paris)* *53*, 1-3.
31. Exley,A.R., Buckenham,S., Hodges,E., Hallam,R., Byrd,P., Last,J., Trinder,C., Harris,S., Screatton,N., Williams,A.P., Taylor,A.M., and Shneerson,J.M. (2011). Premature ageing of the immune system underlies immunodeficiency in ataxia telangiectasia. *Clin. Immunol.* *140*, 26-36.
32. Falck,J., Coates,J., and Jackson,S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* *434*, 605-611.
33. Fletcher,O., Johnson,N., Dos,S.S., I, Orr,N., Ashworth,A., Nevanlinna,H., Heikkinen,T., Aittomaki,K., Blomqvist,C., Burwinkel,B., Bartram,C.R., Meindl,A., Schmutzler,R.K., Cox,A., Brock,I., Elliott,G., Reed,M.W., Southey,M.C., Smith,L., Spurdle,A.B., Hopper,J.L., Couch,F.J., Olson,J.E., Wang,X., Fredericksen,Z., Schurmann,P., Waltes,R., Bremer,M., Dork,T., Devilee,P., van Asperen,C.J., Tollenaar,R.A., Seynaeve,C., Hall,P., Czene,K., Humphreys,K., Liu,J., Ahmed,S., Dunning,A.M., Maranian,M., Pharoah,P.D., Chenevix-Trench,G., Beesley,J., Bogdanova,N.V., Antonenkova,N.N., Zalutsky,I.V., nton-Culver,H., Ziogas,A., Brauch,H., Ko,Y.D., Hamann,U., Fasching,P.A., Strick,R., Ekici,A.B., Beckmann,M.W., Giles,G.G., Severi,G., Baglietto,L., English,D.R., Milne,R.L., Benitez,J., Arias,J.I., Pita,G., Nordestgaard,B.G., Bojesen,S.E., Flyger,H., Kang,D., Yoo,K.Y., Noh,D.Y., Mannermaa,A., Kataja,V., Kosma,V.M., Garcia-Closas,M., Chanock,S., Lissowska,J., Brinton,L.A., Chang-Claude,J., Wang-Gohrke,S., Broeks,A., Schmidt,M.K., van Leeuwen,F.E., van't Veer,L.J., Margolin,S., Lindblom,A., Humphreys,M.K., Morrison,J., Platte,R., Easton,D.F., and Peto,J. (2010). Missense variants in ATM in 26,101 breast cancer cases and 29,842 controls. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *19*, 2143-2151.
34. Garcia-Perez,M.A., Allende,L.M., Corell,A., Varela,P., Moreno,A.A., Sotoca,A., Moreno,A., Paz-Artal,E., Barreiro,E., and rnaiz-Villena,A. (2001). Novel mutations and defective protein kinase C activation of T-lymphocytes in ataxia telangiectasia. *Clin. Exp. Immunol.* *123*, 472-480.

35. Gatei, M., Young, D., Cerosaletti, K.M., Sai-Mehta, A., Spring, K., Kozlov, S., Lavin, M.F., Gatti, R.A., Concannon, P., and Khanna, K. (2000). ATM-dependent phosphorylation of Nibrin in response to radiation exposure. *Nat. Genet.* *25*, 115-119.
36. Gatti, R. (1993). Ataxia-Telangiectasia.
37. Gatti, R.A., Berkel, I., Boder, E., Braedt, G., Charmley, P., Concannon, P., Ersoy, F., Foroud, T., Jaspers, N.G., Lange, K., and . (1988). Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* *336*, 577-580.
38. Gatti, R.A., Tward, A., and Concannon, P. (1999). Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol. Genet. Metab* *68*, 419-423.
39. Gilad, S., Chessa, L., Khosravi, R., Russell, P., Galanty, Y., Piane, M., Gatti, R.A., Jorgensen, T.J., Shiloh, Y., and Bar-Shira, A. (1998). Genotype-phenotype relationships in ataxia-telangiectasia and variants. *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 551-561.
40. Gilad, S., Khosravi, R., Shkedy, D., Uziel, T., Ziv, Y., Savitsky, K., Rotman, G., Smith, S., Chessa, L., Jorgensen, T.J., Harnik, R., Frydman, M., Sanal, O., Portnoi, S., Goldwicz, Z., Jaspers, N.G., Gatti, R.A., Lenoir, G., Lavin, M.F., Tatsumi, K., Wegner, R.D., Shiloh, Y., and Bar-Shira, A. (1996). Predominance of null mutations in ataxia-telangiectasia. *Hum. Mol. Genet.* *5*, 433-439.
41. Giovannetti, A., Mazzetta, F., Caprini, E., Aiuti, A., Marziali, M., Pierdominici, M., Cossarizza, A., Chessa, L., Scala, E., Quinti, I., Russo, G., and Fiorilli, M. (2002). Skewed T-cell receptor repertoire, decreased thymic output, and predominance of terminally differentiated T cells in ataxia telangiectasia. *Blood* *100*, 4082-4089.
42. Giovannetti, A., Mazzetta, F., Cavani, A., Pennino, D., Caprini, E., Ortona, E., Donato, G., Rosato, E., Salsano, F., and Pierdominici, M. (2012). Skewed T-cell receptor variable beta repertoire and massive T-cell activation in idiopathic orofacial granulomatosis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* *25*, 503-511.

43. Goldgar,D.E., Healey,S., Dowty,J.G., Da,S.L., Chen,X., Spurdle,A.B., Terry,M.B., Daly,M.J., Buys,S.M., Southey,M.C., Andrulis,I., John,E.M., Khanna,K.K., Hopper,J.L., Oefner,P.J., Lakhani,S., and Chenevix-Trench,G. (2011). Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res.* *13*, R73.
44. Greenman,C., Stephens,P., Smith,R., Dalgliesh,G.L., Hunter,C., Bignell,G., Davies,H., Teague,J., Butler,A., Stevens,C., Edkins,S., O'Meara,S., Vastrik,I., Schmidt,E.E., Avis,T., Barthorpe,S., Bhamra,G., Buck,G., Choudhury,B., Clements,J., Cole,J., Dicks,E., Forbes,S., Gray,K., Halliday,K., Harrison,R., Hills,K., Hinton,J., Jenkinson,A., Jones,D., Menzies,A., Mironenko,T., Perry,J., Raine,K., Richardson,D., Shepherd,R., Small,A., Tofts,C., Varian,J., Webb,T., West,S., Widaa,S., Yates,A., Cahill,D.P., Louis,D.N., Goldstraw,P., Nicholson,A.G., Brasseur,F., Looijenga,L., Weber,B.L., Chiew,Y.E., DeFazio,A., Greaves,M.F., Green,A.R., Campbell,P., Birney,E., Easton,D.F., Chenevix-Trench,G., Tan,M.H., Khoo,S.K., Teh,B.T., Yuen,S.T., Leung,S.Y., Wooster,R., Futreal,P.A., and Stratton,M.R. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* *446*, 153-158.
45. Guo,Z., Deshpande,R., and Paull,T.T. (2010). ATM activation in the presence of oxidative stress. *Cell Cycle* *9*, 4805-4811.
46. Hacein-Bey-Abina,S., le,D.F., Carlier,F., Bouneaud,C., Hue,C., de Villartay,J.P., Thrasher,A.J., Wulffraat,N., Sorensen,R., Dupuis-Girod,S., Fischer,A., Davies,E.G., Kuis,W., Leiva,L., and Cavazzana-Calvo,M. (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N. Engl. J. Med.* *346*, 1185-1193.
47. Hamer,G., Kal,H.B., Westphal,C.H., Ashley,T., and de Rooij,D.G. (2004). Ataxia telangiectasia mutated expression and activation in the testis. *Biol. Reprod.* *70*, 1206-1212.
48. Hande,M.P., Balajee,A.S., Tchirkov,A., Wynshaw-Boris,A., and Lansdorp,P.M. (2001). Extra-chromosomal telomeric DNA in cells from *Atm*(-/-) mice and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 519-528.
49. Heikkinen,K., Rapakko,K., Karppinen,S.M., Erkkö,H., Nieminen,P., and Winqvist,R. (2005). Association of common ATM polymorphism with bilateral breast cancer. *Int. J. Cancer* *116*, 69-72.
50. Huo,Y.K., Wang,Z., Hong,J.H., Chessa,L., McBride,W.H., Perlman,S.L., and Gatti,R.A. (1994). Radiosensitivity of ataxia-telangiectasia, X-linked

agammaglobulinemia, and related syndromes using a modified colony survival assay. *Cancer Res.* *54*, 2544-2547.

51. Imren,S., Payen,E., Westerman,K.A., Pawliuk,R., Fabry,M.E., Eaves,C.J., Cavilla,B., Wadsworth,L.D., Beuzard,Y., Bouhassira,E.E., Russell,R., London,I.M., Nagel,R.L., Leboulch,P., and Humphries,R.K. (2002). Permanent and panerythroid correction of murine beta thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 14380-14385.
52. Jacquemin,V., Rieunier,G., Jacob,S., Bellanger,D., d'Enghien,C.D., Lauge,A., Stoppa-Lyonnet,D., and Stern,M.H. (2012). Underexpression and abnormal localization of ATM products in ataxia telangiectasia patients bearing ATM missense mutations. *Eur. J. Hum. Genet.* *20*, 305-312.
53. Kamsler,A., Daily,D., Hochman,A., Stern,N., Shiloh,Y., Rotman,G., and Barzilai,A. (2001). Increased oxidative stress in ataxia telangiectasia evidenced by alterations in redox state of brains from Atm-deficient mice. *Cancer Res.* *61*, 1849-1854.
54. Karlseder,J., Hoke,K., Mirzoeva,O.K., Bakkenist,C., Kastan,M.B., Petrini,J.H., and de,L.T. (2004). The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS. Biol.* *2*, E240.
55. Kastan,M.B. and Lim,D.S. (2000). The many substrates and functions of ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 179-186.
56. Kehrer,J.P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev. Toxicol.* *23*, 21-48.
57. Khanna,K.K. (2000). Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 795-802.
58. Kitagawa,R., Bakkenist,C.J., McKinnon,P.J., and Kastan,M.B. (2004). Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. *Genes Dev.* *18*, 1423-1438.

59. Kozlov,S.V., Graham,M.E., Jakob,B., Tobias,F., Kijas,A.W., Tanuji,M., Chen,P., Robinson,P.J., Taucher-Scholz,G., Suzuki,K., So,S., Chen,D., and Lavin,M.F. (2011). Autophosphorylation and ATM activation: additional sites add to the complexity. *J. Biol. Chem.* *286*, 9107-9119.
60. Kozlov,S.V., Graham,M.E., Peng,C., Chen,P., Robinson,P.J., and Lavin,M.F. (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J.* *25*, 3504-3514.
61. Langerak,P. and Russell,P. (2011). Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* *366*, 3562-3571.
62. Langholz,B., Bernstein,J.L., Bernstein,L., Olsen,J.H., Borresen-Dale,A.L., Rosenstein,B.S., Gatti,R.A., and Concannon,P. (2006). On the proposed association of the ATM variants 5557G>A and IVS38-8T>C and bilateral breast cancer. *Int. J. Cancer* *119*, 724-725.
63. Lavin,M.F. (2008). Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 759-769.
64. Lavin,M.F., Gueven,N., Bottle,S., and Gatti,R.A. (2007). Current and potential therapeutic strategies for the treatment of ataxia-telangiectasia. *Br. Med. Bull.* *81-82*, 129-147.
65. Lavin,M.F., Scott,S., Gueven,N., Kozlov,S., Peng,C., and Chen,P. (2004). Functional consequences of sequence alterations in the ATM gene. *DNA Repair (Amst)* *3*, 1197-1205.
66. Lavin,M.F. and Shiloh,Y. (1997). The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 177-202.
67. Lee,P., Martin,N.T., Nakamura,K., Azghadi,S., Amiri,M., Ben-David,U., Perlman,S., Gatti,R.A., Hu,H., and Lowry,W.E. (2013). SMRT compounds abrogate cellular phenotypes of ataxia telangiectasia in neural derivatives of patient-specific hiPSCs. *Nat. Commun.* *4*, 1824.
68. Li,A. and Swift,M. (2000). Mutations at the ataxia-telangiectasia locus and clinical phenotypes of A-T patients. *Am. J. Med. Genet.* *92*, 170-177.
69. Li,L. and Zou,L. (2005). Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells. *J. Cell Biochem.* *94*, 298-306.

70. Lisby,M., Barlow,J.H., Burgess,R.C., and Rothstein,R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* *118*, 699-713.
71. Longhese,M.P. (2008). DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. *Genes Dev.* *22*, 125-140.
72. Lovejoy,C.A. and Cortez,D. (2009). Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair (Amst)* *8*, 1004-1008.
73. Luckheeram,R.V., Zhou,R., Verma,A.D., and Xia,B. (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*, 925135.
74. Lukas,C., Melander,F., Stucki,M., Falck,J., Bekker-Jensen,S., Goldberg,M., Lerenthal,Y., Jackson,S.P., Bartek,J., and Lukas,J. (2004). Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J.* *23*, 2674-2683.
75. Martin,F., Toscano,M.G., Blundell,M., Frecha,C., Srivastava,G.K., Santamaria,M., Thrasher,A.J., and Molina,I.J. (2005). Lentiviral vectors transcriptionally targeted to hematopoietic cells by WASP gene proximal promoter sequences. *Gene Ther.* *12*, 715-723.
76. McConville,C.M., Stankovic,T., Byrd,P.J., McGuire,G.M., Yao,Q.Y., Lennox,G.G., and Taylor,M.R. (1996). Mutations associated with variant phenotypes in ataxia-telangiectasia. *Am. J. Hum. Genet.* *59*, 320-330.
77. Micol,R., Ben,S.L., Suarez,F., Le,M.L., Beaute,J., Mahlaoui,N., Dubois,d.C., Lauge,A., Hall,J., Couturier,J., Vallee,L., Delobel,B., Rivier,F., Nguyen,K., Billette,d., V, Stephan,J.L., Bordigoni,P., Bertrand,Y., Aladjidi,N., Pedespan,J.M., Thomas,C., Pellier,I., Koenig,M., Hermine,O., Picard,C., Moshous,D., Neven,B., Lanternier,F., Blanche,S., Tardieu,M., Debre,M., Fischer,A., and Stoppa-Lyonnet,D. (2011). Morbidity and mortality from ataxia-telangiectasia are associated with ATM genotype. *J. Allergy Clin. Immunol.* *128*, 382-389.

78. Mirzoeva,O.K. and Petrini,J.H. (2003). DNA replication-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol. Cancer Res.* *1*, 207-218.
79. Mitui,M., Nahas,S.A., Du,L.T., Yang,Z., Lai,C.H., Nakamura,K., Arroyo,S., Scott,S., Purayidom,A., Concannon,P., Lavin,M., and Gatti,R.A. (2009). Functional and computational assessment of missense variants in the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) gene: mutations with increased cancer risk. *Hum. Mutat.* *30*, 12-21.
80. Molina,I.J., Kenney,D.M., Rosen,F.S., and Remold-O'Donnell,E. (1992). T cell lines characterize events in the pathogenesis of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Exp. Med.* *176*, 867-874.
81. Noordzij,J.G., Wulffraat,N.M., Haraldsson,A., Meyts,I., van't Veer,L.J., Hogervorst,F.B., Warris,A., and Weemaes,C.M. (2009). Ataxia-telangiectasia patients presenting with hyper-IgM syndrome. *Arch. Dis. Child* *94*, 448-449.
82. Nowak-Wegrzyn,A., Crawford,T.O., Winkelstein,J.A., Carson,K.A., and Lederman,H.M. (2004). Immunodeficiency and infections in ataxia-telangiectasia. *J. Pediatr.* *144*, 505-511.
83. Offord,E., van,P.G., and Tyrrell,R. (2000). Markers of oxidative damage and antioxidant protection: current status and relevance to disease. *Free Radic. Res.* *33 Suppl*, S5-19.
84. Ott,M.G., Schmidt,M., Schwarzwaelder,K., Stein,S., Siler,U., Koehl,U., Glimm,H., Kuhlcke,K., Schilz,A., Kunkel,H., Naundorf,S., Brinkmann,A., Deichmann,A., Fischer,M., Ball,C., Pilz,I., Dunbar,C., Du,Y., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., Luthi,U., Hassan,M., Thrasher,A.J., Hoelzer,D., von,K.C., Seger,R., and Grez,M. (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat. Med.* *12*, 401-409.
85. Paganelli,R., Scala,E., Scarselli,E., Ortolani,C., Cossarizza,A., Carmini,D., Aiuti,F., and Fiorilli,M. (1992). Selective deficiency of CD4+/CD45RA+ lymphocytes in patients with ataxia-telangiectasia. *J. Clin. Immunol.* *12*, 84-91.
86. Paglia,L.L., Lauge,A., Weber,J., Champ,J., Cavaciuti,E., Russo,A., Viovy,J.L., and Stoppa-Lyonnet,D. (2010). ATM germline mutations in women with familial breast cancer and a relative with haematological malignancy. *Breast Cancer Res. Treat.* *119*, 443-452.

87. Painter,R.B. and Young,B.R. (1980). Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *77*, 7315-7317.
88. Pandita,T.K., Pathak,S., and Geard,C.R. (1995). Chromosome end associations, telomeres and telomerase activity in ataxia telangiectasia cells. *Cytogenet. Cell Genet.* *71*, 86-93.
89. Pashankar,F., Singhal,V., Akabogu,I., Gatti,R.A., and Goldman,F.D. (2006). Intact T cell responses in ataxia telangiectasia. *Clin. Immunol.* *120*, 156-162.
90. Peled,J.U., Kuang,F.L., Iglesias-Ussel,M.D., Roa,S., Kalis,S.L., Goodman,M.F., and Scharff,M.D. (2008). The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 481-511.
91. Qi,J., Shackelford,R., Manuszak,R., Cheng,D., Smith,M., Link,C.J., and Wang,S. (2004). Functional expression of ATM gene carried by HSV amplicon vector in vitro and in vivo. *Gene Ther.* *11*, 25-33.
92. Ray,P.D., Huang,B.W., and Tsuji,Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* *24*, 981-990.
93. Reichenbach,J., Schubert,R., Feinberg,J., Beck,O., Rosewich,M., Rose,M.A., and Zielen,S. (2006). Impaired interferon-gamma production in response to live bacteria and Toll-like receptor agonists in patients with ataxia telangiectasia. *Clin. Exp. Immunol.* *146*, 381-389.
94. Reiman,A., Srinivasan,V., Barone,G., Last,J.I., Wootton,L.L., Davies,E.G., Verhagen,M.M., Willemsen,M.A., Weemaes,C.M., Byrd,P.J., Izatt,L., Easton,D.F., Thompson,D.J., and Taylor,A.M. (2011). Lymphoid tumours and breast cancer in ataxia telangiectasia; substantial protective effect of residual ATM kinase activity against childhood tumours. *Br. J. Cancer* *105*, 586-591.
95. Revy,P., Buck,D., le,D.F., and de Villartay,J.P. (2005). The repair of DNA damages/modifications during the maturation of the immune system:

lessons from human primary immunodeficiency disorders and animal models. *Adv. Immunol.* *87*, 237-295.

96. Rivero-Carmena, M., Porras, O., Pelaez, B., Pacheco-Castro, A., Gatti, R.A., and Regueiro, J.R. (2000). Membrane and transmembrane signaling in Herpesvirus saimiri-transformed human CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes is ATM-independent. *Int. Immunol.* *12*, 927-935.
97. Romero, Z., Torres, S., Cobo, M., Munoz, P., Unciti, J.D., Martin, F., and Molina, I.J. (2011). A tissue-specific, activation-inducible, lentiviral vector regulated by human CD40L proximal promoter sequences. *Gene Ther.* *18*, 364-371.
98. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 39-85.
99. Sandoval, N., Platzter, M., Rosenthal, A., Dork, T., Bendix, R., Skawran, B., Stuhmann, M., Wegner, R.D., Sperling, K., Banin, S., Shiloh, Y., Baumer, A., Bernthaler, U., Sennefelder, H., Brohm, M., Weber, B.H., and Schindler, D. (1999). Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 69-79.
100. Saviozzi, S., Saluto, A., Taylor, A.M., Last, J.I., Trebini, F., Paradiso, M.C., Grosso, E., Funaro, A., Ponzio, G., Migone, N., and Brusco, A. (2002). A late onset variant of ataxia-telangiectasia with a compound heterozygous genotype, A8030G/7481insA. *J. Med. Genet.* *39*, 57-61.
101. Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S.R., Simmons, A., Clines, G.A., Sartiel, A., Gatti, R.A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M.F., Jaspers, N.G., Taylor, A.M., Arlett, C.F., Miki, T., Weissman, S.M., Lovett, M., Collins, F.S., and Shiloh, Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* *268*, 1749-1753.
102. Schubert, R., Reichenbach, J., and Zielen, S. (2002). Deficiencies in CD4+ and CD8+ T cell subsets in ataxia telangiectasia. *Clin. Exp. Immunol.* *129*, 125-132.
103. Schwartz, G.K. (2002). CDK inhibitors: cell cycle arrest versus apoptosis. *Cell Cycle* *1*, 122-123.

104. Singer,O., Marr,R.A., Rockenstein,E., Crews,L., Coufal,N.G., Gage,F.H., Verma,I.M., and Masliah,E. (2005). Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat. Neurosci.* *8*, 1343-1349.
105. Slatter,M.A. and Gennery,A.R. (2010). Primary immunodeficiency syndromes. *Adv. Exp. Med. Biol.* *685*, 146-165.
106. Stankovic,T., Kidd,A.M., Sutcliffe,A., McGuire,G.M., Robinson,P., Weber,P., Bedenham,T., Bradwell,A.R., Easton,D.F., Lennox,G.G., Haites,N., Byrd,P.J., and Taylor,A.M. (1998b). ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 334-345.
107. Stankovic,T., Kidd,A.M., Sutcliffe,A., McGuire,G.M., Robinson,P., Weber,P., Bedenham,T., Bradwell,A.R., Easton,D.F., Lennox,G.G., Haites,N., Byrd,P.J., and Taylor,A.M. (1998a). ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 334-345.
108. Staples,E.R., McDermott,E.M., Reiman,A., Byrd,P.J., Ritchie,S., Taylor,A.M., and Davies,E.G. (2008). Immunodeficiency in ataxia telangiectasia is correlated strongly with the presence of two null mutations in the ataxia telangiectasia mutated gene. *Clin. Exp. Immunol.* *153*, 214-220.
109. Stavnezer,J., Guikema,J.E., and Schrader,C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 261-292.
110. Stewart,G.S., Maser,R.S., Stankovic,T., Bressan,D.A., Kaplan,M.I., Jaspers,N.G., Raams,A., Byrd,P.J., Petrini,J.H., and Taylor,A.M. (1999). The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* *99*, 577-587.
111. Stracker,T.H., Roig,I., Knobel,P.A., and Marjanovic,M. (2013). The ATM signaling network in development and disease. *Front Genet.* *4*, 37.

112. Stucki,M. and Jackson,S.P. (2004). MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Repair (Amst)* *3*, 953-957.
113. Sun,X., Becker-Catania,S.G., Chun,H.H., Hwang,M.J., Huo,Y., Wang,Z., Mitui,M., Sanal,O., Chessa,L., Crandall,B., and Gatti,R.A. (2002). Early diagnosis of ataxia-telangiectasia using radiosensitivity testing. *J. Pediatr.* *140*, 724-731.
114. Sun,Y., Jiang,X., Chen,S., Fernandes,N., and Price,B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 13182-13187.
115. Swift,M. (1985). Genetics and epidemiology of ataxia-telangiectasia. *Kroc. Found. Ser.* *19*, 133-146.
116. Swift,M., Reitnauer,P.J., Morrell,D., and Chase,C.L. (1987). Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N. Engl. J. Med.* *316*, 1289-1294.
117. Takai,H., Smogorzewska,A., and de,L.T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* *13*, 1549-1556.
118. Taniguchi,T., Garcia-Higuera,I., Xu,B., Andreassen,P.R., Gregory,R.C., Kim,S.T., Lane,W.S., Kastan,M.B., and D'Andrea,A.D. (2002). Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* *109*, 459-472.
119. Taylor,A.M. and Byrd,P.J. (2005). Molecular pathology of ataxia telangiectasia. *J. Clin. Pathol.* *58*, 1009-1015.
120. Taylor,A.M., Metcalfe,J.A., Thick,J., and Mak,Y.F. (1996). Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* *87*, 423-438.
121. Tchirkov,A. and Lansdorp,P.M. (2003). Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 227-232.
122. Tembhre,M.K., Sharma,V.K., Sharma,A., Chattopadhyay,P., and Gupta,S. (2013). T helper and regulatory T cell cytokine profile in active, stable and narrow band ultraviolet B treated generalized vitiligo. *Clin. Chim. Acta.*
123. Teraoka,S.N., Telatar,M., Becker-Catania,S., Liang,T., Onengut,S., Tolun,A., Chessa,L., Sanal,O., Bernatowska,E., Gatti,R.A., and Concannon,P. (1999).

Splicing defects in the ataxia-telangiectasia gene, ATM: underlying mutations and consequences. *Am. J. Hum. Genet.* *64*, 1617-1631.

124. Thompson,D., Duedal,S., Kirner,J., McGuffog,L., Last,J., Reiman,A., Byrd,P., Taylor,M., and Easton,D.F. (2005). Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* *97*, 813-822.
125. Toscano,M.G., Frecha,C., Benabdellah,K., Cobo,M., Blundell,M., Thrasher,A.J., Garcia-Olivares,E., Molina,I.J., and Martin,F. (2008). Hematopoietic-specific lentiviral vectors circumvent cellular toxicity due to ectopic expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Hum. Gene Ther.* *19*, 179-197.
126. Toyoshima,M., Hara,T., Zhang,H., Yamamoto,T., Akaboshi,S., Nanba,E., Ohno,K., Hori,N., Sato,K., and Takeshita,K. (1998). Ataxia-telangiectasia without immunodeficiency: novel point mutations within and adjacent to the phosphatidylinositol 3-kinase-like domain. *Am. J. Med. Genet.* *75*, 141-144.
127. Uziel,T., Savitsky,K., Platzer,M., Ziv,Y., Helbitz,T., Nehls,M., Boehm,T., Rosenthal,A., Shiloh,Y., and Rotman,G. (1996). Genomic Organization of the ATM gene. *Genomics* *33*, 317-320.
128. Varon,R., Vissinga,C., Platzer,M., Cerosaletti,K.M., Chrzanowska,K.H., Saar,K., Beckmann,G., Seemanova,E., Cooper,P.R., Nowak,N.J., Stumm,M., Weemaes,C.M., Gatti,R.A., Wilson,R.K., Digweed,M., Rosenthal,A., Sperling,K., Concannon,P., and Reis,A. (1998). Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* *93*, 467-476.
129. Verhagen,M.M., Last,J.I., Hogervorst,F.B., Smeets,D.F., Roeleveld,N., Verheijen,F., Catsman-Berrevoets,C.E., Wulffraat,N.M., Cobben,J.M., Hiel,J., Brunt,E.R., Peeters,E.A., Gomez Garcia,E.B., van der Knaap,M.S., Lincke,C.R., Laan,L.A., Tijssen,M.A., van Rijn,M.A., Majoor-Krakauer,D., Visser,M., van, V, Kleijer,W.J., van de Warrenburg,B.P., Warris,A., de,G., I, de,G.R., Broeks,A., Preijers,F., Kremer,B.H., Weemaes,C.M., Taylor,M.A., van,D.M., and Willemsen,M.A. (2012). Presence of ATM protein and residual

kinase activity correlates with the phenotype in ataxia-telangiectasia: a genotype-phenotype study. *Hum. Mutat.* *33*, 561-571.

130. Vorechovsky,I., Luo,L., Lindblom,A., Negrini,M., Webster,A.D., Croce,C.M., and Hammarstrom,L. (1996). ATM mutations in cancer families. *Cancer Res.* *56*, 4130-4133.
131. Waddington,S.N., Nivsarkar,M.S., Mistry,A.R., Buckley,S.M., Kemball-Cook,G., Mosley,K.L., Mitrophanous,K., Radcliffe,P., Holder,M.V., Brittan,M., Georgiadis,A., Al-Allaf,F., Bigger,B.W., Gregory,L.G., Cook,H.T., Ali,R.R., Thrasher,A., Tuddenham,E.G., Themis,M., and Coutelle,C. (2004). Permanent phenotypic correction of hemophilia B in immunocompetent mice by prenatal gene therapy. *Blood* *104*, 2714-2721.
132. Wang,H., Wang,M., Wang,H., Bocker,W., and Iliakis,G. (2005). Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *J. Cell Physiol* *202*, 492-502.
133. Watters,D., Kedar,P., Spring,K., Bjorkman,J., Chen,P., Gatei,M., Birrell,G., Garrone,B., Srinivasa,P., Crane,D.I., and Lavin,M.F. (1999). Localization of a portion of extranuclear ATM to peroxisomes. *J. Biol. Chem.* *274*, 34277-34282.
134. Williams,G.J., Lees-Miller,S.P., and Tainer,J.A. (2010). Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* *9*, 1299-1306.
135. Williams,G.M. and Jeffrey,A.M. (2000). Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *32*, 283-292.
136. Woods,C.G., Bunday,S.E., and Taylor,A.M. (1990). Unusual features in the inheritance of ataxia telangiectasia. *Hum. Genet.* *84*, 555-562.
137. Wu,X., Ranganathan,V., Weisman,D.S., Heine,W.F., Ciccone,D.N., O'Neill,T.B., Crick,K.E., Pierce,K.A., Lane,W.S., Rathbun,G., Livingston,D.M., and Weaver,D.T. (2000). ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature* *405*, 477-482.
138. Wyman,C. and Kanaar,R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* *40*, 363-383.

139. Xu,B., Kim,S.T., Lim,D.S., and Kastan,M.B. (2002). Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. *Mol. Cell Biol.* *22*, 1049-1059.
140. Yamada,K., Ramezani,A., Hawley,R.G., Ebell,W., Arwert,F., Arnold,L.W., and Walsh,C.E. (2003). Phenotype correction of Fanconi anemia group A hematopoietic stem cells using lentiviral vector. *Mol. Ther.* *8*, 600-610.
141. Yang,H., Spitz,M.R., Stewart,D.J., Lu,C., Gorlov,I.P., and Wu,X. (2007). ATM sequence variants associate with susceptibility to non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* *121*, 2254-2259.
142. Yazdi,P.T., Wang,Y., Zhao,S., Patel,N., Lee,E.Y., and Qin,J. (2002). SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev.* *16*, 571-582.
143. Zhou,B.B. and Elledge,S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* *408*, 433-439.
144. Zhu,X.D., Kuster,B., Mann,M., Petrini,J.H., and de,L.T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat. Genet.* *25*, 347-352.