



VANESSA DOMINGUES RAMALHO

**EXPRESSÃO DO GENE DA TIROSINA QUINASE DE BRUTON E DE
SENSORES DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO NA
AGAMAGLOBULINEMIA LIGADA AO X**

***EXPRESSION OF BRUTON'S TYROSINE KINASE GENE AND
ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS SENSORS IN X-LINKED
AGAMMAGLOBULINEMIA***

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

VANESSA DOMINGUES RAMALHO

**EXPRESSÃO DO GENE DA TIROSINA QUINASE DE BRUTON E DE
SENSORES DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO NA
AGAMAGLOBULINEMIA LIGADA AO X**

***EXPRESSION OF BRUTON'S TYROSINE KINASE GENE AND
ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS SENSORS IN X-LINKED
AGAMMAGLOBULINEMIA***

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de Saúde da Criança e do Adolescente.

Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Sciences, in the area of Child and Adolescent Health.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA VANESSA
DOMINGUES RAMALHO E ORIENTADA PELA PROFA.
DRA. MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA

Assinatura da orientadora

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

R141e Ramalho, Vanessa Domingues, 1985-
Expressão do gene da tirosina quinase de Bruton e de sensores do estresse do retículo endoplasmático na agamaglobulinemia ligada ao X / Vanessa Domingues Ramalho. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Maria Marluce dos Santos Vilela.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Agamaglobulinemia. 2. Análise mutacional de DNA. 3. Estresse do retículo endoplasmático. I. Vilela, Maria Marluce dos Santos, 1947-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Expression of Bruton's tyrosine kinase gene and endoplasmic reticulum stress sensors in X-linked agammaglobulinemia

Palavras-chave em inglês:

Agammaglobulinemia
DNA mutational analysis
Endoplasmic reticulum stress

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Maria Marluce dos Santos Vilela [Orientador]
Adriana Gut Lopes Ricetto
Dewton de Moraes Vasconcelos
Pérsio Roxo Júnior

Cristina Miuki Abe Jacob

Data de defesa: 14-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Saúde da Criança e do Adolescente

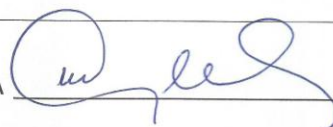
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

VANESSA DOMINGUES RAMALHO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA

MEMBROS:

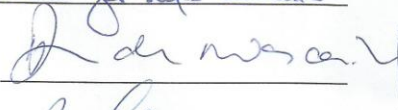
1. PROF(A). DR(A). MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILELA



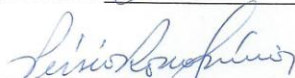
2. PROF(A). DR(A). ADRIANA GUT LOPES RICETTO

Adriana Gut Lopes Ricetto.

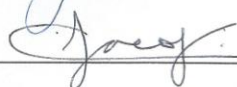
3. PROF(A). DR(A). DEWTON DE MORAES VASCONCELOS



4. PROF(A).DR(A). PÉRSIO ROXO JÚNIOR



5. PROF(A).DR(A). CRISTINA MIUKI ABE JACOB



Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 14 de fevereiro de 2014

Dedicatória

À minha irmã Márcia, por seu amor incondicional, pela certeza de sua
companhia ao longo da vida e sua alegria contagiante.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo apoio financeiro e à CAPES pela bolsa de estudos.

Aos pacientes e familiares pela disponibilidade em contribuir com este estudo.

Ao programa de pós – graduação em Saúde da Criança e do Adolescente.

À minha orientadora Profa. Dra. Marluce Vilela pela confiança, orientação, incentivo e carinho.

Ao Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Hospital das Clínicas e a todos os seus profissionais pela contribuição a esta pesquisa.

À administração do Ciped, Milton, Rosa e Simone.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Pediátrica, Beatriz, Carol, Jéssica, Júlia, Marcelo, Taís, Vanessa Oya, pela convivência e amizade.

À Profa. Dra. Lília Li e a seus alunos Ana Érika e Vinícius por toda a ajuda.

À Silvana, enfermeira do Ciped.

Ao Laboratório Multiusuário da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

Ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD).

À minha família e meu esposo por todo o apoio e estrutura nessa caminhada.

**Abraça o dever que a vida te assinala.
Serve e ora.
A prece te renovará energias.
O trabalho te auxiliará.
Deus não nos abandonará.
Fazê silêncio e não te queixes.
Alegra-te e espera porque o Céu te socorrerá.
Por meios que desconheces, Deus permanece agindo.**

O Auxílio Virá, Emmanuel

Resumo

A agamaglobulinemia ligada ao X (XLA; OMIM#300755) é caracterizada por um bloqueio na diferenciação dos linfócitos B na medula óssea, levando à profunda hipogamaglobulinemia e reduzido número ou ausência de linfócitos B periféricos. Os pacientes são susceptíveis a infecções recorrentes por bactérias encapsuladas e enterovírus. XLA é causada por mutações no gene da tirosina quinase de Bruton (*BTK*). Contudo, não há estudos de relação entre expressão protéica e o tipo de mutação, nem sobre as conseqüências da retenção intracelular do excesso de proteínas mal formadas. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a expressão de *BTK* e sua relação com o tipo de mutação em pacientes com XLA, assim como verificar suas conseqüências nos sensores de estresse do retículo endoplasmático. O diagnóstico de XLA foi baseado em infecções recorrentes, níveis significativamente reduzidos de IgM, IgG e IgA, linfócitos B circulantes <2% e mutação identificada no gene *BTK*. A expressão dos transcritos de *BTK* foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real em oito pacientes XLA e oito controles. Pela mesma técnica, foi avaliada a expressão de 10 genes do estresse do retículo endoplasmático em seis pacientes e seis controles. Foram caracterizadas quatro mutações *missense*, uma mutação *nonsense*, dois *frameshifts* e um defeito em sítio de *splicing*. As mutações do tipo *nonsense*, *frameshift* e defeito em sítio de *splicing* levaram à formação de *stop codon* prematuro. Foi detectado um perfil de expressão de *BTK* diferenciado nos pacientes com mutações com *stop codon* prematuro em comparação aos pacientes com mutações *missense* e controles saudáveis. Especificamente, os pacientes com mutações com *stop codon* prematuro apresentaram redução da expressão de *BTK* ($P = 0,004$). No entanto, verificamos que as mutações *missense* não afetaram a expressão de *BTK*. Por meio de imunocitoquímica,

encontramos que as mutações com *stop codon* prematuro levaram à deficiência da expressão da proteína BTK e as do tipo *missense* resultaram na localização anormal da proteína no citoplasma celular, o que evidencia a síntese de proteína não funcional. Os pacientes com XLA apresentaram expressão aumentada do marcador de estresse do retículo endoplasmático *XBPI* ($P = 0,002$). Em conclusão, a quantificação da expressão de mRNA para *BTK* é uma ferramenta para diferenciar as consequências mutacionais em pacientes com XLA. Ela também pode contribuir para o estudo de transcritos em outras doenças genéticas com diferentes tipos de mutação. Este é o primeiro relato de estresse do retículo endoplasmático na agamaglobulinemia ligada ao X.

Abstract

X-linked agammaglobulinemia (XLA, OMIM # 300755) is characterized by a block in differentiation of B lymphocytes in the bone marrow, leading to profound hypogammaglobulinemia and few or no peripheral B lymphocytes. Patients are susceptible to recurrent infections by encapsulated bacteria and enteroviruses. XLA is caused by mutations in the Bruton tyrosine kinase gene (*BTK*). However, there have been no studies on the relationship between protein expression and the type of mutation, nor on the consequences of the disruption of protein folding that results in intracellular retention. The objectives of this study were to evaluate *BTK* expression and its mutation type in patients with XLA, as well as to verify their consequences on the endoplasmic reticulum stress sensors. The XLA diagnosis was based on recurrent infections, significantly reduced levels of IgM, IgG and IgA, circulating B lymphocytes <2% and *BTK* gene mutation identified. The expression of *BTK* transcripts was assessed by quantitative real-time PCR in eight XLA patients and eight control subjects. By the same technique, the expression of 10 endoplasmic reticulum stress genes was measured in six patients and six controls. Four missense mutations, one nonsense mutation, two frameshifts and a splice site defect were characterized. Mutations of the nonsense type, frameshift and splice site defect led to a premature stop codon formation. A differential profile of expression of *BTK* was detected in patients with mutations that led to a premature stop codon compared to patients with missense mutations and healthy controls. Specifically, patients with mutations resulting in a premature stop codon exhibited reduced expression of *BTK* gene ($P = 0.004$). However, it was found that missense mutations did not affect *BTK* expression. By immunocytochemistry, we found that mutations with a premature stop codon impaired

expression of BTK protein and that missense mutations led to an abnormal localization of the protein in the cell cytoplasm, showing the synthesis of a non-functional protein. Patients with XLA showed increased expression of the endoplasmic reticulum stress marker *XBPI* ($P = 0.002$). In conclusion, the quantification of mRNA expression for *BTK* is a tool to differentiate mutational consequences in patients with XLA. It can also contribute to the study of transcripts in other genetic diseases with different types of mutation. This is the first report on endoplasmic reticulum stress in X-linked agammaglobulinemia.

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

μ L: microlitro

μ M: micromolar

ATF6: Activating transcription factor 6

bp: base pair (pares de base)

BTK: Bruton tyrosine kinase

cDNA: Complementary DNA

CMSP: Células mononucleares do sangue periférico

dL: decilitro

DNA: ácido desoxirribonucleico

ER: Endoplasmic reticulum

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HPRT1: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

Ig: Imunoglobulina

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IRE1: Inositol-requiring protein 1

Kb: Kilobase

M: Molar

mg: Miligrama

mL: Mililitro

mRNA: Messenger RNA

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PERK: PKR-like-ER kinase

PH: Pleckstrin homology domain

RNA: Ácido ribonucleico

RT-qPCR: PCR quantitativo em tempo real

RT-PCR: Reação da transcriptase reversa, seguida de PCR

SH1: Src homology 1

SH2: Src homology 2

SH3: Src homology 3

TH: Tec homology domain

UPR: Unfolded protein response

XBP1: X-box binding protein 1

XLA: X-linked agammaglobulinemia

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of our patients with X-linked agammaglobulinemia.....	47
---	----

Capítulo 2

Table 1. Relative mRNA expression of the unfolded protein response genes evaluated on monocytes from XLA patients and controls.....	60
--	----

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1. Estágios de desenvolvimento dos linfócitos B.....21

Figura 2. Distribuição dos defeitos genéticos em pacientes com doenças hereditárias no desenvolvimento inicial de linfócitos B.....23

Figura 3. Estrutura multimodular das quinases citoplasmáticas da família TEC.....25

Figura 4. Modelo esquemático de BTK mostrando os diferentes domínios e suas interações moleculares *in vivo* e *in vitro*.....26

Figura 5. A degradação das proteínas no retículo endoplasmático.....27

Figura 6. Vias de transdução de sinal na Unfolded Protein Response (UPR).....28

Capítulo 1

Figure 1. Relative *BTK* gene expression in XLA patients with mutations that led to a premature stop codon, XLA patients with missense mutations and controls.....48

Figure 2. Immunocytochemistry with fluorescent labeling of BTK in green (FITC), the cell nucleus in blue (Hoechst) and merged.....49

Capítulo 2

Figure 1. Relative gene expression of <i>XBPI</i> in the XLA patient group versus the control group.....	61
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Agamaglobulinemia ligada ao X (XLA)	20
1.2. Tirosina quinase de Bruton (BTK)	24
1.3. Estresse do retículo endoplasmático.....	26
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo Geral	32
2.2. Objetivos Específicos	32
3. CAPÍTULO 1	33
Functional consequences of BTK mutations on mRNA expression and protein synthesis.....	35
4. CAPÍTULO 2	50
Endoplasmic reticulum stress sensors in X-linked agammaglobulinemia	52
5. DISCUSSÃO GERAL	62
6. CONCLUSÃO GERAL	67
7. REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO 1.....	85
Métodos	85
ANEXO 2.....	93
Imagens de microscopia confocal.....	93
ANEXO 3.....	96
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	96

1. Introdução

1.1. Agamaglobulinemia ligada ao X (XLA)

A agamaglobulinemia ligada ao X (XLA) foi uma das primeiras imunodeficiências primárias descritas e é considerada um protótipo de imunodeficiência humoral (Usui *et al.*, 2001). Em 1952, Bruton reportou o caso de um menino de 8 anos de idade com múltiplos episódios de sepse por pneumococos e ausência da fração gama em eletroforese de proteínas do soro (Bruton, 1952). Esta observação foi possível devido ao desenvolvimento da técnica de eletroforese de proteínas do soro, juntamente com a identificação da fração gama como componente dos anticorpos no final de 1930 (Tiselius, 1937; Tiselius e Kabat, 1938), e o uso difundido de antibióticos na década de 40 (Keefer *et al.*, 1943). Outros pacientes foram rapidamente descritos (Janeway *et al.*, 1953; Good, 1954).

Foi observado que a agamaglobulinemia ocorria principalmente em meninos e freqüentemente seguia um padrão de herança ligada ao X (Janeway *et al.*, 1953; Good, 1954). Mais tarde, foi demonstrado que havia uma hipogamaglobulinemia em adultos a qual ficou conhecida como imunodeficiência comum variável (ICV). Diferente da agamaglobulinemia, a ICV afetava homens e mulheres (Grant e Wallace, 1954; Wall e Saslaw, 1955; Citron, 1957; Cooke *et al.*, 1957; Hermans *et al.*, 1976).

No início da década de 1970, foi demonstrado que pacientes com XLA apresentavam redução marcante no número de linfócitos B na circulação periférica, enquanto em pacientes com ICV o número era geralmente normal (Siegal *et al.*, 1971; Cooper e Lawton, 1972; Geha *et al.*, 1973; Preud'Homme *et al.*, 1973). A redução no

número de células B periféricas veio a ser explicada por um bloqueio na maturação dos linfócitos B resultante do efeito do gene responsável por XLA, na época ainda não identificado (Campana *et al.*, 1990; Figura 1).

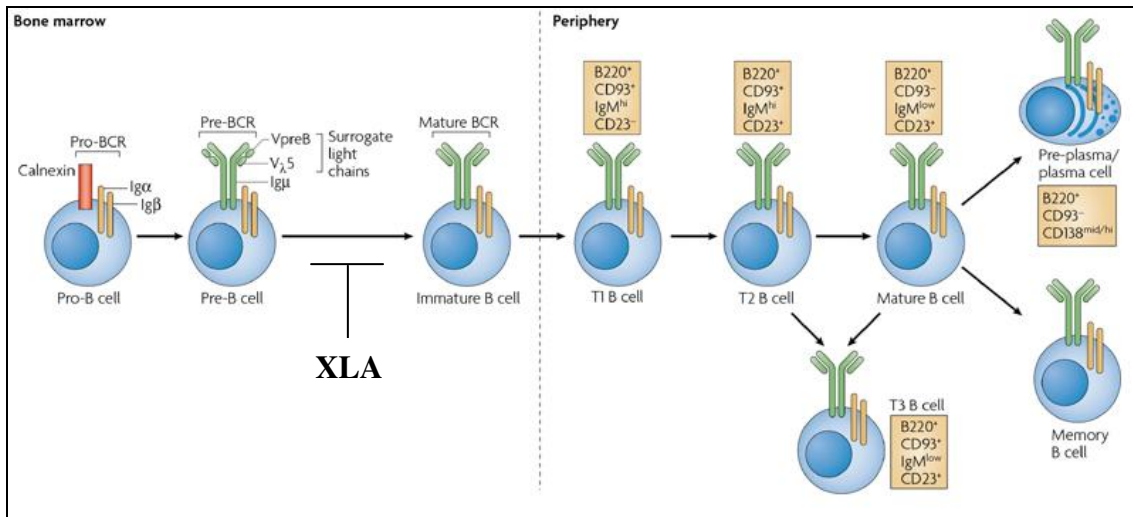


Figura 1. Estágios de desenvolvimento dos linfócitos B. Nos pacientes com XLA, o desenvolvimento dos linfócitos B é interrompido na medula óssea entre os estágios de pré-célula B e célula B imatura. Figura modificada de Cambier *et al.*, 2007.

Em 1993, dois grupos reportaram que XLA era resultado de mutações no gene codificador de uma tirosina quinase citoplasmática, a qual denominaram BTK ou tirosina quinase de Bruton (Tsukada *et al.*, 1993; Vetrie *et al.*, 1993). O gene *BTK* consiste de 19 éxons e engloba aproximadamente 37,5 kb no cromossomo X humano (Ohta *et al.*, 1994). Atualmente, um grande número de mutações afetando *BTK* já foi descrito no banco internacional de mutações designado BTKbase (<http://bioinf.uta.fi/BTKbase>). De forma similar a outras doenças genéticas, as mutações incluem *missense*, *nonsense*, sítios de

splicing e deleções/inserções espalhadas pelo gene inteiro (Vihinen *et al.*, 1994; Vihinen *et al.*, 1997a; Conley *et al.*, 1998; Vihinen *et al.*, 1999; Lindvall *et al.*, 2005; Väliäho *et al.*, 2006; Winkelstein *et al.*, 2006). No entanto, não há descrição até o momento de mutação *missense* associada à doença no domínio Src homology 3 (SH3) de BTK. Muitas dessas mutações afetam resíduos conservados funcionalmente significantes e freqüentemente os locais alterados são dinucleotídeos CpG (Ollila *et al.*, 1996; Vihinen *et al.*, 1997b).

Mutações *missense* (40%) são as mais freqüentes de todas as mutações, enquanto as *nonsense* correspondem a 17%, deleções 20% e inserções 7%. Mutações envolvendo sítios de *splicing* somam 16% dos casos. A ocorrência de mutações é proporcional ao comprimento dos domínios. A distribuição dos tipos de mutações é muito semelhante comparada a outras bases de imunodeficiências - IDbases (Piirilä *et al.*, 2006).

As mutações em *BTK* representam aproximadamente 85% dos defeitos no desenvolvimento inicial de linfócitos B (Conley *et al.*, 1998). Aproximadamente metade dos defeitos restantes é devido a mutações em genes codificadores de componentes do receptor de pré-célula B (pré-BCR) ou BCR, incluindo a cadeia pesada μ (*IGHM*); as moléculas de transdução de sinal $Ig\alpha$ (*CD79A*) e $Ig\beta$ (*CD79B*); e $\lambda 5$ (*IGLL1*) que forma o substituto de cadeia leve com V pré-B (Yel *et al.*, 1996; Minegishi *et al.*, 1998; Minegishi *et al.*, 1999a; Schiff *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Dobbs *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2007; van Zelm *et al.*, 2008). Um pequeno número de pacientes com defeitos em BLNK (*B-cell linker protein*), proteína envolvida na transdução de sinal desencadeada pela ativação de BCR, também têm sido descritos (Minegishi *et al.*, 1999b; van Zelm *et al.*, 2008; Figura 2).

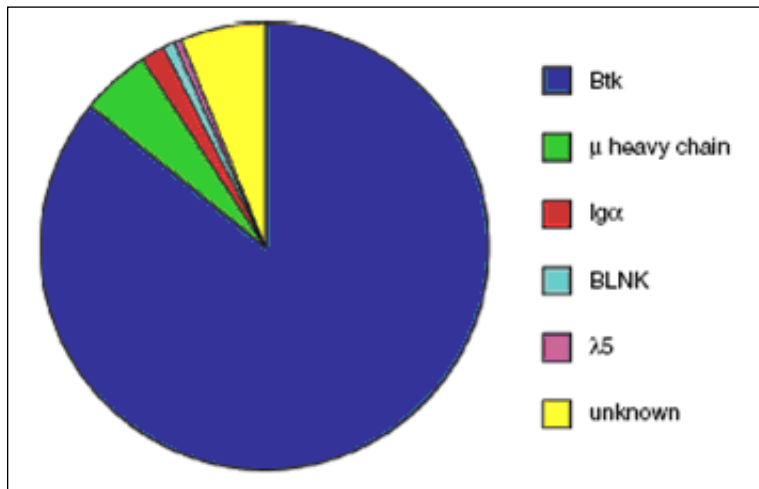


Figura 2. Distribuição dos defeitos genéticos em pacientes com doenças hereditárias no desenvolvimento inicial de linfócitos B. Figura de Conley *et al.*, 2005.

As mutações em *BTK* têm sido associadas com redução do mRNA, da proteína e da atividade da quinase (Tsukada *et al.*, 1993; Conley *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1996; Gaspar *et al.*, 1998; Lopez-Herrera *et al.*, 2008). No entanto, ainda não é possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo definitiva em XLA (Conley *et al.*, 2005; López-Granados *et al.*, 2005; Teimourian *et al.*, 2008; Basile *et al.*, 2009). Fenótipos discordantes podem surgir da mesma mutação, dando suporte à idéia de que outros fatores genéticos ou epigenéticos podem influenciar o fenótipo da doença (Bykowsky *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1996; Kornfeld *et al.*, 1996; Kanegane *et al.*, 2000).

Muitos estudos multicêntricos já foram realizados focando a descrição das características clínicas, imunológicas e das mutações nos pacientes com XLA (Kanegane *et al.*, 2001; Plebani *et al.*, 2002; Moin *et al.*, 2004; López-Granados *et al.*, 2005; Winkelstein *et al.*, 2006; Lopez-Herrera *et al.*, 2008; Basile *et al.*, 2009; Tóth *et al.*, 2009; Lee *et al.*,

2010). Entretanto, no Brasil os estudos com esses pacientes são escassos, principalmente em relação à descrição de mutações em *BTK* (Tani *et al.*, 2002; Ramalho *et al.*, 2010).

1.2. Tirosina quinase de Bruton (BTK)

A BTK é uma quinase citoplasmática que pertence à família das TEC quinases (TFKs) (Smith *et al.*, 2001; Gomez-Rodriguez *et al.*, 2007). A família TEC é a segunda maior família de quinases não receptoras nas células dos mamíferos e inclui BTK, TEC, ITK, TXK (também chamada de RLK) e BMX. Todas essas quinases apresentam estrutura multimodular que possibilita a diversidade de interações moleculares e de funções. Com exceção da TXK/RLK, as TFKs apresentam um domínio amino-terminal denominado PH (Pleckstrin Homology) que realiza a translocação da proteína para o lado interno da membrana plasmática (Debnath *et al.*, 1999). Em todos os membros da família TEC, o domínio amino-terminal é seguido pelos domínios de interação proteína-proteína: Tec Homology (TH), Src Homology 3 (SH3) e SH2. O domínio catalítico ou da quinase, SH1, está localizado na porção carboxi-terminal da molécula (Figura 3).

BTK é predominantemente expressa em linfócitos B, mas não em plasmócitos (Smith *et al.*, 1994). Além disso, com exceção de linfócitos T e NK, todas as outras linhagens hematopoiéticas expressam BTK. Nos linfócitos B, BTK promove a sua diferenciação e proliferação, enquanto nas demais células de linhagem hematopoiética seu papel permanece incompletamente definido (Brunner *et al.*, 2005).

A ativação de BTK é regulada por uma ampla variedade de receptores em células do sistema imune inato e adaptativo como RTK (*Receptor tyrosine kinases*), BCR (*B-cell receptor*), GPCR (*G-protein coupled receptors*), TLR (*Toll-like receptors*), sugerindo um

papel na diferenciação, proliferação e apoptose de outras linhagens celulares além das células B (Lindvall *et al.*, 2005; Figura 4).

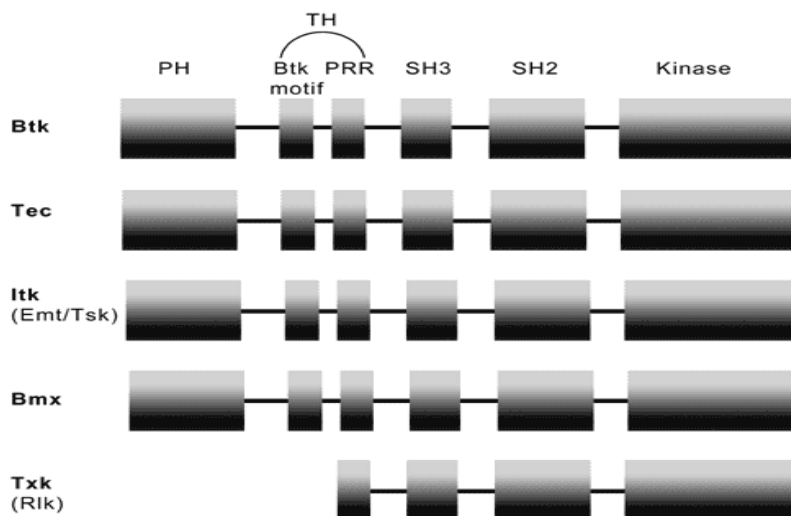


Figura 3. Estrutura multimodular das quinases citoplasmáticas da família TEC. O domínio Tec homology (TH) é dividido em BTK (*Btk motif*) e uma região rica em prolina (PRR; *proline-rich region*). Figura de Okoh, 2002.

BTK tem sido amplamente estudada na sinalização através dos receptores *Toll-like* (TLRs), tais como o TLR2, TLR4, TLR7, TLR8 e TLR9, e interage com MyD88, Mal (TIRAP) e IRAK1 (Gray *et al.*, 2006; Doyle *et al.*, 2007; O'Neill e Bowie, 2007; Piao *et al.*, 2008; Mohamed *et al.*, 2009; Jenkins e Mansell, 2010). A contribuição da BTK para o sistema imune inato humano também tem sido descrita em monócitos/macrófagos (Koprulu e Ellmeier, 2009), em neutrófilos (Honda *et al.*, 2012) e células NK (Bao *et al.*, 2012). Os pacientes com XLA apresentam a fagocitose e a quimiotaxia de monócitos

reduzida (Amoras *et al.*, 2003; Amoras *et al.*, 2007), comprometendo o reconhecimento e a eliminação de patógenos.

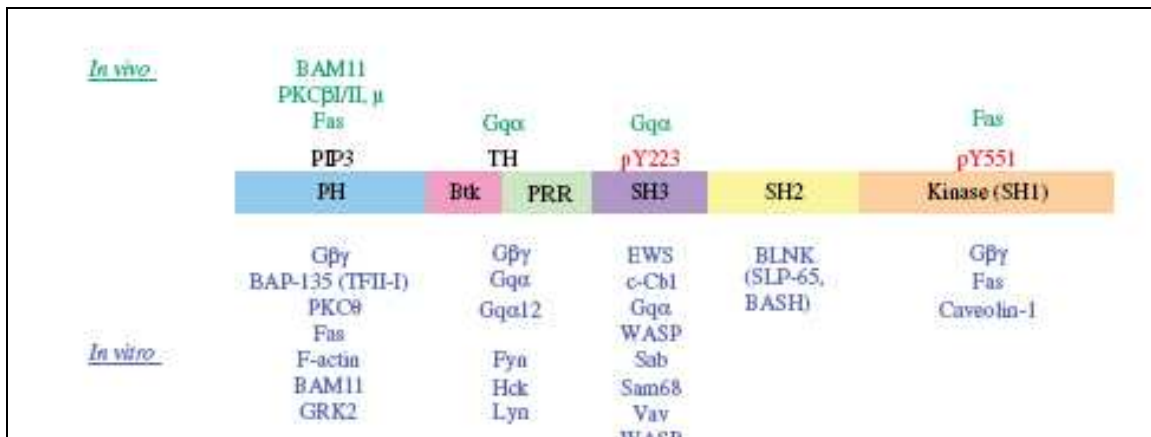


Figura 4. Modelo esquemático de BTK mostrando os diferentes domínios e suas interações moleculares *in vivo* e *in vitro*. O domínio Tec homology (TH) é dividido em BTK (*Btk motif*) e uma região rica em prolina (PRR; *proline-rich region*). PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) liga-se ao domínio PH e ativa BTK. Em vermelho são representados os dois sítios de fosforilação pY223 e pY551. Figura de Lindvall *et al.*, 2005.

1.3. Estresse do retículo endoplasmático

A modificação da seqüência de aminoácidos de uma proteína altera sua capacidade de enovelamento no retículo endoplasmático (RE) (Anfinsen, 1973). A maturação e o enovelamento protéico no RE são pré-requisitos para seu transporte e subsequente atividade funcional. Proteínas que não conseguem formar a estrutura correta ou reúnem-se em complexos multiprotéicos devem ser degradadas. O mecanismo de degradação

associado ao retículo endoplasmático (ERAD) elimina do RE as proteínas aberrantes e o potencial de formação de agregados tóxicos (Brodsky, 2012; Figura 5).

Quando a quantidade de proteína mal formada excede o limite do RE e a homeostase não é mantida, a condição chamada de estresse do retículo endoplasmático é atingida, o que desencadeia uma rede de eventos de sinalização e transcrição coletivamente chamada de Unfolded Protein Response (UPR) (Ron e Walter, 2007; Figura 6).

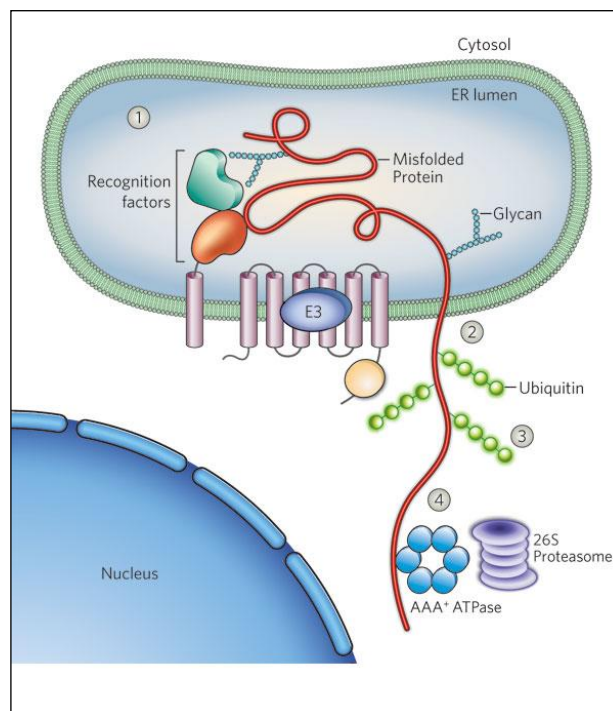


Figura 5. A degradação das proteínas no retículo endoplasmático. Passo 1: Ubiquitina ligases incorporadas na membrana do retículo endoplasmático cooperam com fatores de reconhecimento para identificar proteínas deformadas. Passo 2: As proteínas são exportadas para o citosol. Passo 3: O substrato é ubiquitinado por uma ligase E3. Passo 4: o substrato é removido da membrana pela ATPase AAA+ Cdc48 e conduzido para o proteossoma 26S para degradação. Figura de Hirsch *et al.*, 2009.

A UPR é ativada por três sensores principais, os quais são PKR-like ER kinase (PERK, codificado pelo gene *EIF2AK3*), inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease (IRE1, codificado pelo gene *ERN1*) e activating transcription factor 6 (ATF6, codificado pelo gene *ATF6*). Exatamente como os transdutores sentem o estresse do RE ainda está sob investigação (Gardner *et al.*, 2013). Vários modelos foram propostos para a ativação da UPR e sugerem que cada ramo desta via é regulado separadamente (Ron e Walter, 2007; Walter e Ron, 2011).

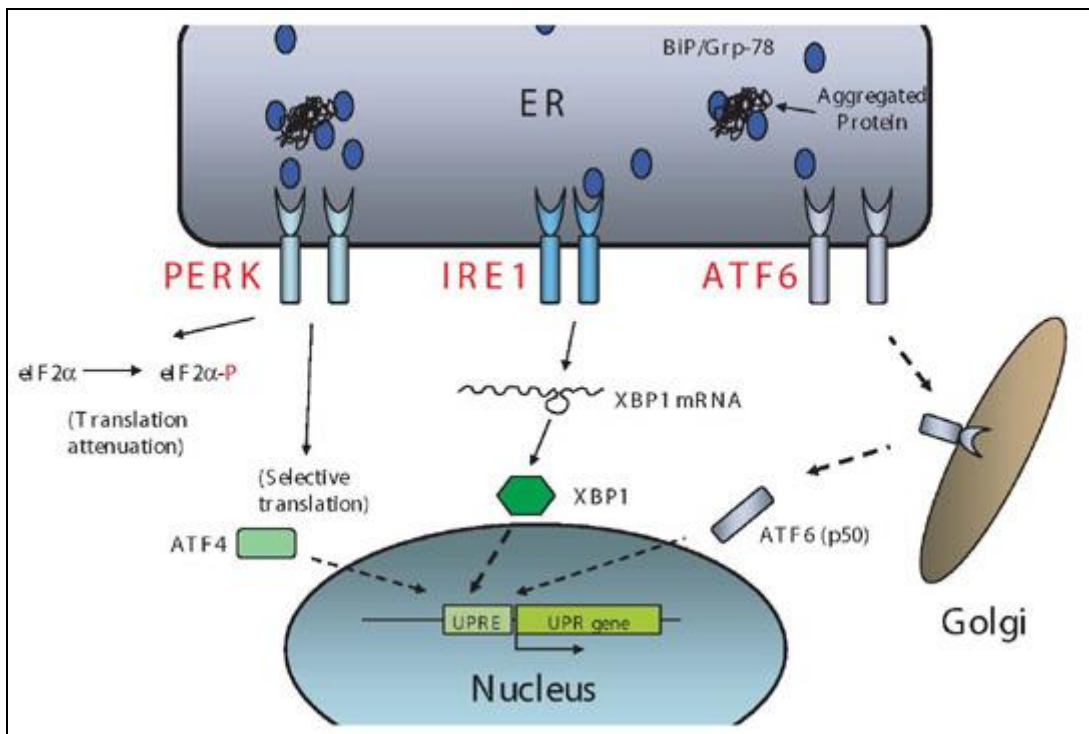


Figura 6. Vias de transdução de sinal na Unfolded Protein Response (UPR). Figura de <http://biochemistry.utoronto.ca/volchuk/images/UPR.jpg>

IRE1, com duas formas, α e β , é uma ribonuclease que é ativada por autofosforilação após separação da chaperona GRP78 (produto do gene *HSPA5* ou *BiP*) e/ou reconhecimento direto de complexos de proteínas mal formadas. O principal substrato para a ribonuclease IRE1 é o mRNA codificador do fator de transcrição XBP1 (X-box binding protein 1, produto do gene *XBPI*). IRE1 realiza o *splicing* do mRNA de XBP1 que controla a expressão de genes envolvidos no enovelamento, secreção e controle de qualidade das proteínas, e na degradação protéica associada ao retículo endoplasmático (Yoshida *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Acosta-Alvear *et al.*, 2007).

PERK apresenta estrutura similar a IRE1 e é também ativado por autofosforilação após separação de GRP78 e/ou detecção de proteínas mal formadas. A função primária de PERK é fosforilar eIF2- α (eukaryotic initiation factor-2, codificado por *EIF2S1*), componente do complexo de iniciação da tradução, detendo a tradução protéica e reduzindo assim o montante de proteínas que entra no RE (Harding *et al.*, 1999; Harding *et al.*, 2000). No entanto, a fosforilação de eIF2- α por PERK também influencia a transcrição via ATF4 promovendo a produção de proteínas específicas do RE importantes para a restauração da homeostase.

ATF6 (duas formas, α e β) move-se após a retirada de GRP78 e/ou detecção de proteínas mal formadas do RE para o complexo de Golgi, onde é clivada pelas proteases esfingosina-1-fosfato e esfingosina-2-fosfato. Esse processo libera para o citoplasma o fator de transcrição ATF6 ativo, que se move para o núcleo para modular a expressão gênica (Haze *et al.*, 1999).

Existem três resultados principais promovidos pelas vias da UPR: 1) decréscimo da tradução protéica, 2) restauração do enovelamento de proteínas, e 3) degradação de proteínas mal formadas (ERAD) (McGuckin *et al.*, 2010).

O estresse de RE prolongado pode ter implicações importantes na capacidade de síntese protéica da célula, afetando outras funções celulares e podendo levar a apoptose prematura (Rutkowski *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008). Esse processo envolve uma alteração no balanço entre inibidores apoptóticos (família Bcl2) e proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak), causando a liberação de citocromo C da mitocôndria, ativação de caspases, e subsequente degradação intracelular controlada (Green, 2005). A ativação do sensor PERK induz a expressão do fator de transcrição CHOP (codificado pelo gene *DDIT3*), o qual diminui a expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 (McCullough *et al.*, 2001).

O significado funcional da UPR não está completamente elucidado, mas ela é conhecida por contribuir para a patogênese de muitas doenças, incluindo diabetes, câncer, aterosclerose, doenças neurológicas e doença inflamatória intestinal (Ozcan *et al.*, 2004; Marciniak e Ron, 2006; Kaser *et al.*, 2008; Ozcan *et al.*, 2009; Wang e Kaufman, 2012). Dessa forma, a UPR tem sido estudada a fim também de se entender os potenciais terapêuticos desta resposta (Park e Ozcan, 2013).

Condições fisiopatológicas tais como hipóxia, níveis elevados de ácidos graxos ou colesterol, estresse oxidativo, níveis altos ou baixos de glicose, e citocinas inflamatórias podem induzir o estresse do RE e ativar a UPR de forma crônica. A sinalização da UPR está interligada com o estresse oxidativo e as vias de resposta inflamatória presentes em uma variedade de doenças. Os três braços da UPR, IRE1 α -XBP1, PERK-eIF2 α -ATF4, e ATF6 são importantes para a sobrevivência e crescimento de células tumorais sob condições de hipóxia (Wang e Kaufman, 2012). IRE1 α e PERK podem ativar a quinase JNK e NF κ B contribuindo para a inflamação na obesidade e para a apoptose de células β do pâncreas na diabetes (Wang e Kaufman, 2012). A apoptose, consequência fisiológica do

estresse crônico do RE, é uma chave para a patogênese de muitas doenças, incluindo doença metabólica, inflamação, doenças neurodegenerativas e câncer.

O meio ambiente em células com alta atividade secretora pode induzir inflamação. Nesses casos, a indução de estresse do RE in vivo em células específicas deficientes de XBP1 pode fornecer uma explicação do mecanismo de início de muitas doenças. O mesmo pode ser observado nas doenças inflamatórias intestinais. A deficiência de XBP1 nas células epiteliais do intestino resulta em enterite espontânea devido à incapacidade dessas células de gerir corretamente a atividade antimicrobiana e responder apropriadamente aos sinais inflamatórios do meio local (Kaser *et al.*, 2008). Vários polimorfismos em XBP1 conferem risco para a doença de Crohn e a colite ulcerativa, estabelecendo o estresse do retículo endoplasmático como um contribuinte genético para as doenças inflamatórias intestinais na população humana (Kaser *et al.*, 2008).

Embora o efeito da UPR e de seu fator de transcrição XBP1 tenha sido descrito na patogênese de muitas doenças, sua participação na agamaglobulinemia ligada ao X ainda não está descrita na literatura.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar em pacientes com XLA a expressão de *BTK* e sua relação com o tipo de mutação, assim como verificar suas conseqüências nos sensores de estresse do retículo endoplasmático.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a expressão de mRNA para *BTK* por PCR quantitativo em tempo real;
2. Verificar a presença e localização da proteína BTK por imunocitoquímica e microscopia confocal;
3. Avaliar a expressão de mRNA para sensores de estresse do retículo endoplasmático por PCR quantitativo em tempo real.

3. Capítulo 1

O capítulo 1 corresponde ao artigo intitulado: “Functional consequences of *BTK* mutations on mRNA expression and protein synthesis”, cujo objetivo foi avaliar as conseqüências de diferentes tipos de mutação nos processos de transcrição e tradução da tirosina quinase de Bruton (BTK) nos pacientes com agamaglobulinemia ligada ao X.

Capítulo 1

“Functional consequences of *BTK* mutations on mRNA expression and protein synthesis”

Functional consequences of *BTK* mutations on mRNA expression and protein synthesis

Vanessa D. Ramalho, MS, Marcelo A. Teocchi, PhD, Beatriz M. Abramczuk, MS, Taís N. Mazzola, MS, Marcos T.N. da Silva, MD, PhD, Lília D'Souza-Li, MD, PhD, Maria Marluce S. Vilela, MD, PhD

Center for Investigation in Pediatrics and Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author

Maria Marluce dos Santos Vilela, MD, PhD

Center for Investigation in Pediatrics, Department of Pediatrics

Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, UNICAMP

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, CEP 13083-887

Campinas, São Paulo, Brazil

Telephone: 55-19-35218963

Fax: 55-19-35218972

E-mail: marluce@fcm.unicamp.br

This study was financially supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo 2011/50589-5) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Running title: Mutational consequences in *BTK* expression.

Abstract

X-linked agammaglobulinemia (XLA) is characterized by a B lymphocyte differentiation block in the bone marrow, leading to hypogammaglobulinemia with absent or few peripheral B lymphocytes. Mutations in the *BTK* gene are responsible for XLA and in most cases lead to low protein expression. We evaluated eight male Brazilian patients whose diagnosis was based on recurrent infections, markedly reduced levels of IgM, IgG and IgA, circulating B cell numbers <2% and *BTK* mutation identified. *BTK* mRNA expression was evaluated by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) technology and BTK protein was assessed by immunocytochemistry and confocal microscopy. Quantitative real-time detection PCR measurements showed a reduced expression of *BTK* mRNA in patients with mutations that resulted in a premature stop codon. However, we found that missense mutations did not affect *BTK* mRNA expression. By immunocytochemistry, we found that mutations with a premature stop codon led to a lack of BTK protein and missense mutations led to an abnormal localization of the protein in the cell cytoplasm. The quantification of *BTK* mRNA expression is an interesting tool to identify and differentiate the mutational consequences in XLA patients. It can also contribute to the study of transcripts in other genetic diseases with different types of mutation.

Key-words: Immunodeficiency; B cells; X-linked agammaglobulinemia; Bruton tyrosine kinase; Genome analysis; mRNA expression.

Introduction

X-linked agammaglobulinemia (XLA, OMIM # 300755) is characterized by a block in differentiation of B lymphocytes in bone marrow, leading to profound hypogammaglobulinemia, few or absent peripheral B lymphocytes and recurrent infections with encapsulated bacteria and enteroviruses.¹⁻³

The gene causing XLA was identified as Bruton's tyrosine kinase (*BTK*)^{4,5} which encompasses 37.5 kb containing 19 exons⁶ and encodes a multidomain protein composed of five different domains.⁵

The *BTK* mutations have been reported from many different countries⁷ including Brazil.^{8,9} Despite the large number of mutations identified, most of these individuals do not express protein regardless of their mutation.¹⁰⁻¹³ However, it is not clear how specific mutations may affect the function of *BTK* and cause XLA, as well as it has not been possible to correlate the genetic defect with the severity of the resulting clinical phenotype.¹⁴

Additionally, the severity of a particular genetic disease can vary from patient to patient as a consequence of differences in the causative mutations.¹⁵ In this study, we show how specific types of mutations affect *BTK* gene expression and protein synthesis in XLA patients.

Material and Methods

Subjects

XLA was diagnosed by low levels of circulating B cells (measured by levels of CD19-positive cells in blood samples), decreased or absent immunoglobulins in serum, a

typical clinical history with recurrent bacterial infection or a positive family history and *BTK* gene mutation identified.

Eight male patients with X-linked agammaglobulinemia (median age 17.73; range from 6.36 to 32.02 years old) and eight healthy male volunteers (median age 18.62; range from 6.39 to 32.45 years old) were enrolled for the study. There was no difference in age between the groups ($P = 0.873$, Mann - Whitney U test).

The study was approved by the Research Ethics Committee of the State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil, and all patients gave written informed consent to participate. Clinical characteristics, including the levels of immunoglobulins and B cell numbers, are described in Table 1.

Detection of *BTK* mutations

Briefly, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared from heparinized venous blood using Ficoll-Hypaque separation. Total RNA was extracted from PBMC with TRIzol Reagent (Life Technologies, Foster City, CA, USA) and used for first-strand cDNA synthesis. PCR amplification of the *BTK* gene from cDNA involved seven overlapping primers.¹⁰ To confirm the mutation detected, genomic DNA was purified from EDTA anticoagulant-treated venous blood with a Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen, USA) and amplified with primers encompassing the changed region in *BTK* gene.¹⁶ PCR products were sequenced by an ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies).

Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR)

To extract total RNA, 1 ml of TRIzol Reagent (Life Technologies) was added per 5×10^6 of PBMC samples, homogenized and then further processed according to the

manufacturer's instructions. Subsequently, 1 µg of total RNA of each sample was reverse transcribed into cDNA using 200 U of Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) and 3 µg of Random Primers (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA samples derived from the investigated gene was detected using an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Life Technologies) and TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies): 5'-FAM-labeled probes and corresponding primer pairs.

Each qPCR was run as triplicates with 10 ng cDNA sample in 6.25 µl TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies), 0.625 µl of the respective probe/primer mix, and 0.625 µl purified and deionized H₂O. Relative gene expression quantification data was generated and analyzed using the 7500 Software version 2.0.5 (Life Technologies). Expression levels of genes were calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using *GAPDH* and *HPRT1* as internal control genes.

Immunocytochemistry and confocal fluorescence microscopy

PBMC were plated in 6-well culture plates in RPMI 1640 and incubated at 37°C. After 1 hour, non-adherent cells were removed by washing with PBS.¹⁷ The adherent cells were fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde in PBS and 0.12 M sucrose, then were made permeable with 0.2% Triton X-100 in PBS for 20 minutes.

Non-specific binding sites were blocked using 6% goat serum. The cells were incubated overnight at 4 °C with monoclonal anti-BTK (Santa Cruz Biotechnology, Inc), that recognizes the epitope at amino acid positions 459-659 of the human BTK. Further, we used the secondary antibody goat anti-mouse IgG1 conjugated to FITC (Southern Biotechnology Associates, Inc, Birmingham, AL, USA - 1:1000). After extensive washing

with PBS, coverslips were incubated with Hoechst (Life Technologies) for visualization of the nucleus and mounted on slides using Prolong Gold antifade (Life Technologies). Slides were viewed and images obtained from a confocal fluorescence microscope (LSM - 510 Meta, Zeiss) with a magnification of 63x.

Statistical analysis

The GraphPad Prism 5 software version 5.04 for Windows was used for the statistical analysis (San Diego, CA, USA; www.graphpad.com). The Mann–Whitney U test was applied to assess significant differences between groups. Statistical significance was determined as $P < 0.05$.

Results and discussion

Mutational analysis of *BTK* is critical in confirming XLA¹⁸, especially in cases of overlapping clinical features with other primary immunodeficiencies, such as common variable immunodeficiency (CVID).¹⁹ The heterogeneity of mutations throughout the *BTK* gene hampers the hot spot selection of points for starting the analysis, and requires the screening of all exons in all patients.

Among the patients studied, four have missense mutations, where the substitution of one nucleotide (XLA01, XLA02, XLA03 and XLA08) leads to an aminoacid replacement in the protein, without the creation of a premature stop codon. However, these missense mutations affect known conserved residues in *BTK*. R28 is one of the most affected residues by mutations in *BTK*. In the PH domain, this residue is essential for binding to phosphatidyl inositol, allowing the protein to reach the plasma membrane.²⁰ Also in the PH domain, the substitution of residue Y40 has implications for the conformation of the loop

between β strands and the binding site with phosphatidyl inositol.²¹ The residue G613 is part of a structural assembly of functionally important residues of the BTK kinase domain.²² The G613D mutation may prevent the interaction of this domain with other BTK domains or with their substrates. The M501T mutation also affects the kinase domain, suggesting an interference with the enzymatic activity of BTK.

In patients XLA04 to XLA07, we have premature terminations caused by nonsense mutation (XLA04), frameshifts (XLA05 and XLA06) and a splice donor-site defect (XLA07).

Distinct patterns of *BTK* expression was observed among patients with a premature stop codon and patients with missense mutations (Figure 1). Specifically, patients with mutations resulting in a premature stop codon exhibited reduced expression of *BTK* gene ($P = 0.004$, regardless of the reference gene). However, it was found that missense mutations did not affect *BTK* expression.

These findings are explained by nonsense codons leading to a reduction in mRNA level.²³ The NMD (nonsense-mediated mRNA decay) pathway is a specialized mechanism which targets transcripts with premature termination codons (PTCs) to decay. According to the literature, it is estimated that 30% of known mutations associated with disease are due to mRNAs containing PTCs.²⁴

On protein level, we found by immunocytochemistry that mutations with premature stop codon impaired expression of BTK protein. On the other hand, missense mutations resulted in BTK abnormal location in the cell cytoplasm, demonstrating the synthesis of non-functional protein (Figure 2). In its active state, BTK is found close to the inner surface of the plasma membrane. In fact, BTK phosphorylation is linked to membrane

localization.^{25,26} The absence of functional BTK is further confirmed by the very low levels of circulating B lymphocytes observed in all patients studied (CD19⁺ percentage; Table 1).

In the endoplasmic reticulum, newly synthesized polypeptides must be folded correctly in the formation of tertiary structures that enable the protein functional activity, before being transported to their action sites. Proteins which do not have the required conformation, as in the presence of mutations, are subject to ER protein quality control, leading to ER retention and degradation process associated with the endoplasmic reticulum (ERAD). This mechanism retrotranslocate misfolded proteins from reticulum to the cytosol, in order to be degraded via the ubiquitin - proteasome.²⁷

In response to the presence of a mutation, most mutant mRNAs and proteins activate quality control mechanisms to reduce their impact. However, misfolded or unfolded proteins can trigger stress pathways in endoplasmic reticulum, which has been associated with many diseases.²⁸

In this study we observed the different mutational consequences in the expression of transcripts and protein synthesis. There are many check points for mRNA and protein quality control during the process of BTK biogenesis that ensures that this kinase is mature and functional. The XLA studies need to be done considering the multiple consequences of different types of *BTK* mutations on mRNA or protein level.

References

1. Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJP. The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med* 1995;333:431-40.
2. Lederman HM, Winkelstein JA. X-linked agammaglobulinemia. An analysis of 96 patients. *Medicine* 1985;64:145-56.

3. Ochs HD, Smith CIE. X-linked agammaglobulinemia. A clinical and molecular analysis. *Medicine* 1996;75:287-99.
4. Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993;72:279-90.
5. Vetrie D, Vörechovský I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993;361:226-33.
6. Ohta Y, Haire RN, Litman RT, Fu SM, Nelson RP, Kratz J, et al. Genomic organization and structure of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase: localization of mutations associated with varied clinical presentations and course in X chromosome-linked agammaglobulinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9062-6.
7. Toth B, Volokha A, Mihas A, Pac M, Bernatowska E, Kondratenko I, et al. Genetic and demographic features of X-linked agammaglobulinemia in Eastern and Central Europe: a cohort study. *Mol Immunol* 2009;46:2140-6.
8. Tani SM, Wang Y, Kanegane H, Futatani T, Pinto J, Vilela MM, et al. Identification of mutations of Bruton's tyrosine kinase gene (BTK) in Brazilian patients with X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat* 2002; 20:235-6.
9. Ramalho VD, Oliveira Júnior EB, Tani SM, Roxo Júnior P, Vilela MM. Mutations of Bruton's tyrosine kinase gene in Brazilian patients with X-linked agammaglobulinemia. *Braz J Med Biol Res* 2010;43:910-3.
10. Hashimoto S, Tsukada S, Matsushita M, Miyawaki T, Niida Y, Yachie A, et al. Identification of Bruton's tyrosine kinase (Btk) gene mutations and characterization of the

derived proteins in 35 X-linked agammaglobulinemia families: a nationwide study of Btk deficiency in Japan. *Blood* 1996;88:561-73.

11. Gaspar HB, Lester T, Levinsky RJ, Kinnon C. Bruton's tyrosine kinase expression and activity in X-linked agammaglobulinaemia (XLA): the use of protein analysis as a diagnostic indicator of XLA. *Clin Exp Immunol* 1998;111:334-8.

12. Kanegane H, Futatani T, Wang Y, Nomura K, Shinozaki K, Matsukura H, et al. Clinical and mutational characteristics of X-linked agammaglobulinemia and its carrier identified by flow cytometric assessment combined with genetic analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:1012-20.

13. Lopez-Herrera G, Berron-Ruiz L, Mogica-Martinez D, Espinosa-Rosales F, Santos-Argumedo L. Characterization of Bruton's tyrosine kinase mutations in Mexican patients with X-linked agammaglobulinemia. *Mol Immunol* 2008;45:1094-8.

14. López-Granados E, Pérez de Diego R, Ferreira Cerdán A, Fontán Casariego G, García Rodríguez MC. A genotype-phenotype correlation study in a group of 54 patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:690-7.

15. Maquat LE. Defects in RNA splicing and the consequence of shortened translational reading frames. *Am J Hum Genet* 1996;59:279-86.

16. Vörechovský I, Vihinen M, de Saint Basile G, Honsová S, Hammarström L, Müller S, et al. DNA-based mutation analysis of Bruton's tyrosine kinase gene in patients with X-linked agammaglobulinaemia. *Hum Mol Genet* 1995;4:51-8.

17. Cunningham-Rundles C, Radigan L. Deficient IL-12 and dendritic cell function in common variable immune deficiency. *Clin Immunol* 2005;115:147-53.

18. Conley ME, Mathias D, Treadaway J, Minegishi Y, Rohrer J. Mutations in Btk in patients with presumed X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* 1998;62:1034-43.
19. Kanegane H, Tsukada S, Iwata T, Futatani T, Nomura K, Yamamoto J, et al. Detection of Bruton's tyrosine kinase mutations in hypogammaglobulinaemic males registered as common variable immunodeficiency (CVID) in the Japanese Immunodeficiency Registry. *Clin Exp Immunol* 2000; 120:512-7.
20. Lindvall JM, Blomberg KE, Väliäho J, Vargas L, Heinonen JE, Berglöf A, et al. Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol Rev* 2005;203:200-15.
21. Saha BK, Curtis SK, Vogler LB, Vihinen M. Molecular and structural characterization of five novel mutations in the Bruton's tyrosine kinase gene from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Mol Med* 1997;3:477-85.
22. Vihinen M, Vetrie D, Maniar HS, Ochs HD, Zhu Q, Vörechovský I, et al. Structural basis for chromosome X-linked agammaglobulinemia: a tyrosine kinase disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12803-7.
23. Losson R, Lacroute F. Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:5134-7.
24. Khajavi M, Inoue K, Lupski JR. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet* 2006;14:1074-81.
25. Kawakami Y, Yao L, Miura T, Tsukada S, Witte ON, Kawakami T. Tyrosine phosphorylation and activation of Bruton tyrosine kinase upon Fc epsilon RI cross-linking. *Mol Cell Biol* 1994;14:5108-13.

26. Li T, Tsukada S, Satterthwaite A, Havlik MH, Park H, Takatsu K, et al. Activation of Bruton's tyrosine kinase (BTK) by a point mutation in its pleckstrin homology (PH) domain. *Immunity* 1995;2:451-60.
27. Brodsky JL. Cleaning up: ER-associated degradation to the rescue. *Cell* 2012; 151:1163-7.
28. Park SW, Ozcan U. Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease. *Semin Immunopathol* 2013;35:351-73.

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of our patients with X-linked agammaglobulinemia.

Patient	Age (years)	Age at onset	Age at diagnosis ^a	Family history ^b	Ig levels (mg/dL)			CD19 ⁺ (%)	<i>BTK</i> mutation
					IgG	IgM	IgA		
XLA01	20.67	4 y	6 y	+	298 (750-1780)	6 (28-212)	20 (90-450)	0.04	R28L
XLA02	24.11	6 y	6 y	+	180 (750-1780)	18 (28-212)	22 (90-450)	0.3	G613D
XLA03	24.76	6 y	6 y	+	UD (750-1780)	UD (28-212)	3 (90-450)	0.09	Y40C
XLA04	6.36	no infection	11 mo	+	126 (282-1115)	31 (40-156)	18 (12-104)	0.14	Q196X
XLA05	9.31	3 mo	2y8mo	+	149 (610-1610)	22 (29-195)	1 (40-289)	0.3	Ala347fsX55
XLA06	13.94	4 mo	2 y	+	86 (610-1610)	26 (29-195)	23 (40-289)	0.1	Thr324fsX24
XLA07	14.80	no infection	1y6mo	+	unregistered	unregistered	unregistered	0.09	exon 5 skipping
XLA08	32.02	2 y	8 y	-	54 (750-1780)	UD (28-212)	UD (90-450)	0.1	M501T

UD = undetectable

^a Age at the start of intravenous immunoglobulin replacement

^b “+” indicates that boy(s) in the same family died at a young age because of infection.

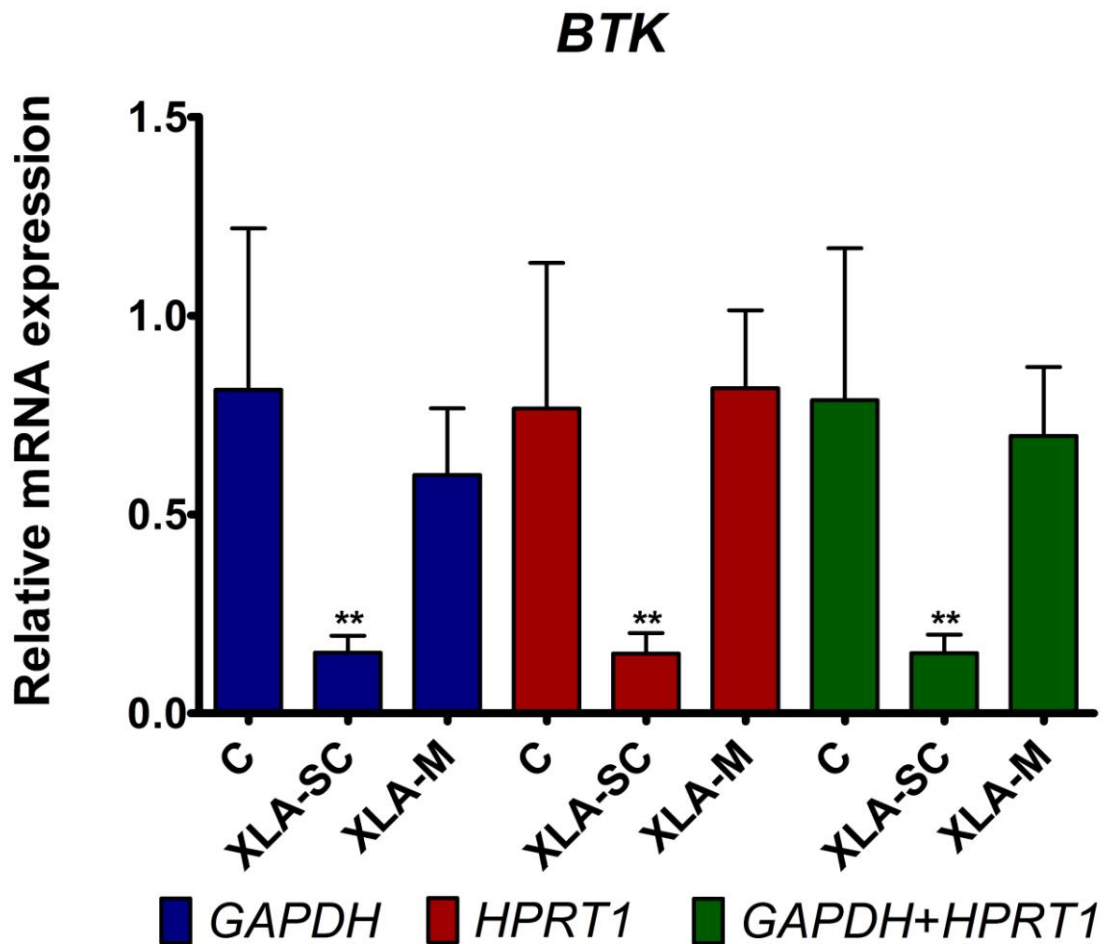


Figure 1. Relative *BTK* gene expression in XLA patients with mutations that led to a premature stop codon (XLA-SC), XLA patients with missense mutations (XLA-M) and controls (C). Different colors represent the two reference genes used: *GAPDH* (blue), *HPRT1* (red) and the combination of *GAPDH* and *HPRT1* (green). The y-axis represents the quantitative data of the relative mRNA expression of the *BTK* gene. Data are presented as mean and SD. Mann–Whitney U tests were used for comparisons between groups. **P < 0.01.

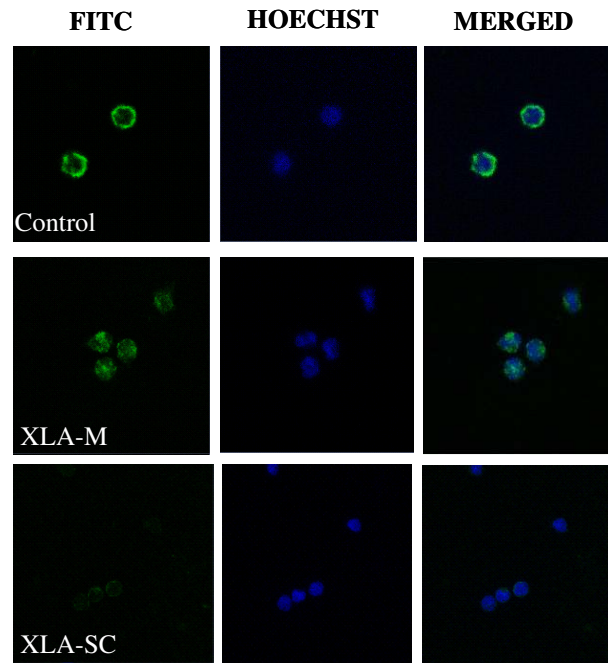


Figure 2. Immunocytochemistry with fluorescent labeling of BTK in green (FITC), the cell nucleus in blue (Hoechst) and merged. Original magnification, x63. XLA-M: XLA patient with missense mutation. XLA-SC: XLA patient with premature stop codon.

4. Capítulo 2

O capítulo 2 corresponde ao artigo intitulado “Endoplasmic reticulum stress sensors in X-linked agammaglobulinemia”, em análise na revista *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (JACI).

Capítulo 2

**“Endoplasmic reticulum stress sensors in X-linked
agammaglobulinemia”**

TITLE PAGE

Letter to the Editor

Endoplasmic reticulum stress sensors in X-linked agammaglobulinemia

Vanessa D. Ramalho, MS, Marcelo A. Teocchi, PhD, Beatriz M. Abramczuk, MS, Taís N. Mazzola, MS, Marcos T.N. da Silva, MD, PhD, Lília D'Souza-Li, MD, PhD, Maria Marluce S. Vilela, MD, PhD

Center for Investigation in Pediatrics and Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author

Maria Marluce dos Santos Vilela, MD, PhD

Center for Investigation in Pediatrics, Department of Pediatrics

Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, UNICAMP

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, CEP 13083-887

Campinas, São Paulo, Brazil

Telephone: 55-19-35218963

Fax: 55-19-35218972

E-mail: marluce@fcm.unicamp.br

This study was financially supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo 2011/50589-5) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Competing interest

All authors declare that they have no competing interest.

Word count: 832

Capsule summary

The endoplasmic reticulum stress contributes to the pathogenesis of many diseases. This is the first report of the endoplasmic reticulum stress process in X-linked agammaglobulinemia.

Key words

X-linked agammaglobulinemia, Bruton tyrosine kinase, endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, X-box binding protein 1.

Abbreviations used

ATF6: Activating transcription factor 6

BTK: Bruton tyrosine kinase

cDNA: Complementary DNA

ER: Endoplasmic reticulum

IRE1: Inositol-requiring protein 1

mRNA: messenger RNA

PERK: PKR-like-ER kinase

UPR: Unfolded protein response

XBP1: X-box binding protein 1

XLA: X-linked agammaglobulinemia

To the Editor:

X-linked agammaglobulinemia (XLA) is caused by mutations in Bruton tyrosine kinase gene (*BTK*) that lead to a block in differentiation of B lymphocytes in bone marrow, resulting in profound hypogammaglobulinemia, few or absent peripheral B lymphocytes and recurrent infections with encapsulated bacteria and enteroviruses due to antibody deficiency. Despite the large number of mutations identified, it has not been possible to correlate the genetic defect with the severity of the resulting clinical phenotype.¹

Accumulation of unfolded or misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) can trigger stress pathways, denominated unfolded protein response (UPR). The ER contains three branches of stress sensors, IRE1, PERK and ATF6, which together mediate changes in gene expression that characterize the UPR process.² The IRE1 α -XBP1 pathway is the most highly conserved and is critical for ER biogenesis and the secretory capacity of cells.³

The association between UPR and human disease has not been fully investigated yet, but it is known that endoplasmic reticulum stress contributes to the pathogenesis of many diseases.⁴ A better understanding of how mutations in *BTK* may interfere in the endoplasmic reticulum stress is crucial to reveal more about clinical manifestations and to improve long term patient care. In this study, we report for the first time the overexpression of *XBP1* found in X-linked agammaglobulinemia patients, indicating a process of cellular stress.

To elucidate the molecular features of the UPR genes expression on XLA patients, reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis was performed on CD14⁺ monocytes

isolated by magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec, Germany) from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of six patients with XLA (median age 14.36; range from 6.36 to 32.02 years old) along with six age and sex matched healthy volunteers. Total RNA was extracted from monocytes with an illustra RNAspin Mini Isolation kit (GE Healthcare) and reverse transcribed in cDNA. Complementary DNA samples derived from the investigated genes were amplified and detected using an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Life Technologies, Foster City, CA, USA) and TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies): 5'-FAM-labeled probes and corresponding primer pairs. Relative gene expression quantification data was generated and analyzed using the 7500 Software version 2.0.5 (Life Technologies). Expression levels of genes were calculated with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using *GAPDH* and *HPRT1* as internal control genes. Data are expressed as mean and SD and the differences were analyzed by Mann-Whitney U test. The definitive diagnosis of XLA was confirmed by mutations identified in *BTK* gene (Y40C, Q196X, Ala347fsX55, Thr324fsX24, IVS5+1G>A, M501T).

Among evaluated genes, the expression of *XBPI* was significantly higher ($P = 0.002$, regardless of the reference gene) in the patients with XLA than in healthy volunteers (see Table I and Figure 1).

The remarkable *XBPI* upregulation founded in XLA patients indicates a cellular stress process. The *XBPI* mRNA level is kept low in cells not stressed and its transcription is induced under ER stress.⁵ The *XBPI* mRNA must be increased prior to the IRE1 α -mediated splicing reaction to overcome degradation by the proteasome and to produce significant

amounts of the active spliced form of *XBPI*.⁶ Regulation through induction or repression of *XBPI* expression allows the maintenance of ER homeostasis.³

Yoshida *et al.* studying Chinese hamster ovary cells deficient in Site-2 protease, found that the reduction of the *XBPI* mRNA induction and activation of its target genes make the cells more susceptible to early apoptosis and DNA fragmentation. However, overexpression of *XBPI* mRNA was able to reverse all these phenotypes.⁵

The *XBPI* activity is regulated at multiple levels and may modulate ER homeostasis independently of classical UPR activation.³ Studies demonstrated that *XBPI* plays a role in innate and adaptive immune responses, as in macrophage responses induced via Toll-like receptors.⁷ Up to now, the literature demonstrated that Bruton tyrosine kinase is critical for B cell development and differentiation, but is also involved in the regulation of other cell types, such as in TLR-induced cytokine production in primary human cells⁸, indicating novel roles for this protein in innate immunity. However, there are no reports in the literature linking *BTK* and ER modulation, especially with *XBPI* imbalance, which can contribute for the innate immune system changes observed in individuals with XLA.

Crosstalk among various signaling pathways and other stress responses may turn it difficult to assess ER stress and UPR activation at the level of UPR sensors.⁹ Therefore, it is well known that the *XBPI* transcription events are critical for the maintenance of ER homeostasis under physiological conditions and prevent deleterious consequences of prolonged UPR activation.

This is the first report on *XBPI* in X-linked agammaglobulinemia. Increased understanding of the molecular actions and transcriptional networks regulated by *XBPI* in XLA may be a contributory factor to the pathophysiology of this primary immunodeficiency.

Vanessa D. Ramalho, MS

Marcelo A. Teocchi, PhD

Beatriz M. Abramczuk, MS

Taís N. Mazzola, MS

Marcos T.N. da Silva, MD, PhD

Lília D'Souza-Li, MD, PhD

Maria Marluce S. Vilela, MD, PhD

Center for Investigation in Pediatrics and Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

References

1. López-Granados E, Pérez de Diego R, Ferreira Cerdán A, Fontán Casariego G, García Rodríguez MC. A genotype-phenotype correlation study in a group of 54 patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:690-7.
2. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:519-29.
3. He Y, Sun S, Sha H, Liu Z, Yang L, Xue Z, et al. Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. *Gene Expr* 2010;15:13-25.
4. Park SW, Ozcan U. Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease. *Semin Immunopathol* 2013;35:351-73.
5. Yoshida H, Nadanaka S, Sato R, Mori K. XBP1 is Critical to Protect Cells from Endoplasmic Reticulum Stress: Evidence from Site-2 Protease-deficient Chinese Hamster Ovary Cells. *Cell Struct Funct* 2006;31:117-25.
6. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001;107:881-91.
7. Martinon F, Chen X, Lee AH, Glimcher LH. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol* 2010;11:411-8.
8. Marron TU, Martinez-Gallo M, Yu JE, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor 4-, 7-, and 8-activated myeloid cells from patients with X-linked agammaglobulinemia produce enhanced inflammatory cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:184-90.
9. Yang L, Xue Z, He Y, Sun S, Chen H, Qi L. A Phos-tag-based method reveals the extent of physiological endoplasmic reticulum stress. *PLoS ONE* 2010;5:e11621.

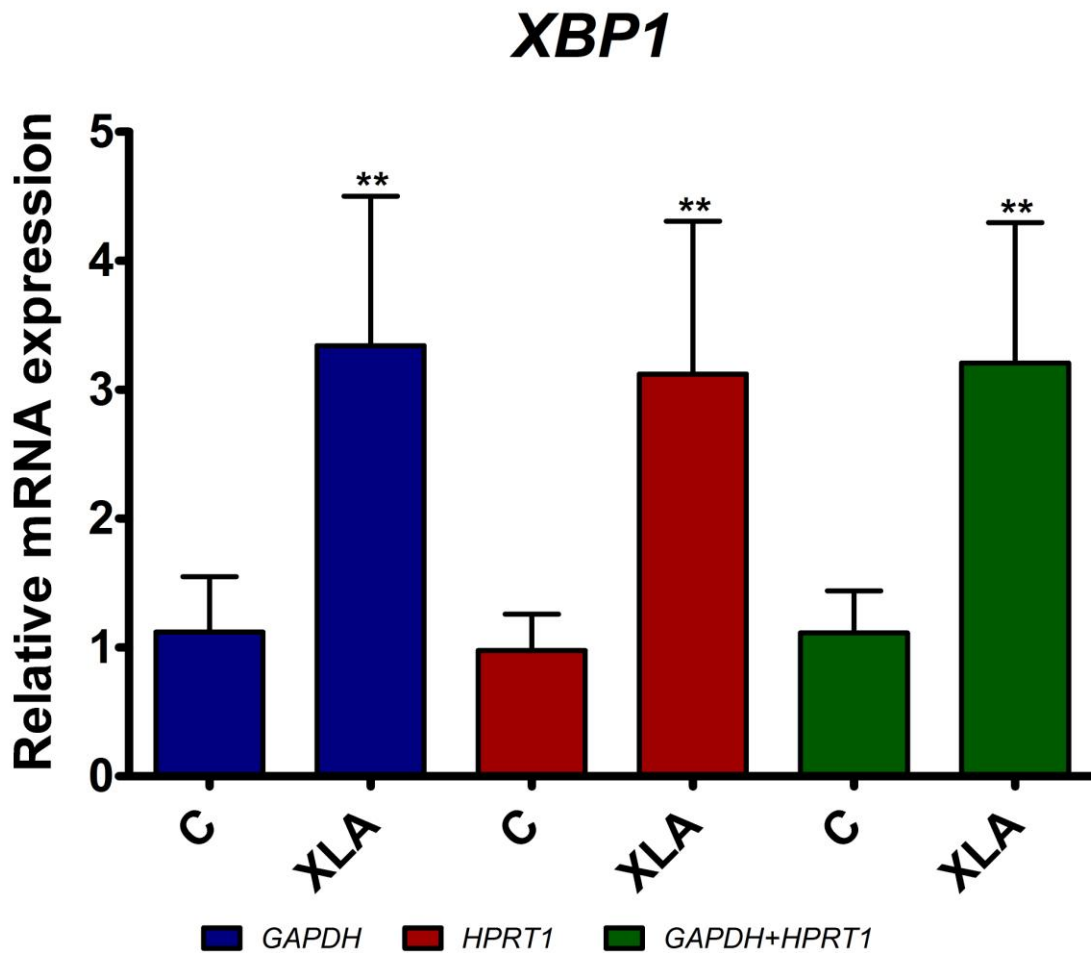
Table I. Relative mRNA expression of the unfolded protein response genes evaluated on monocytes from XLA patients and controls.

Gene symbol	Name	XLA patients	Controls	<i>P</i>
<i>ATF4</i>	Activating transcription factor 4	1.71±0.56	1.27±0.40	0.18
<i>ATF6</i>	Activating transcription factor 6	0.92±0.23	0.98±0.33	0.70
<i>BAX</i>	BCL2-associated X protein	0.78±0.39	0.71±0.19	0.82
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	0.62±0.35	0.77±0.27	0.48
<i>DDIT3</i>	DNA-damage-inducible transcript 3	1.74±0.83	1.31±0.81	0.39
<i>EIF2AK3</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	2.57±1.11	1.95±1.22	0.31
<i>EIF2S1</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa	0.51±0.16	0.91±0.39	0.09
<i>ERN1</i>	Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	1.23±0.33	1.17±0.15	0.59
<i>HSPA5</i>	Heat shock 70kDa protein 5	1.01±0.38	1.03±0.36	0.94
<i>XBPI</i>	X-box binding protein 1	3.21±1.09	1.11±0.33	0.002

Data are means ± SD. Mann-Whitney U test was used to calculate the *P* value. The combination of *GAPDH* and *HPRT1* was used as the reference gene.

Figure legend

Figure 1. Relative gene expression of *XBPI* in the XLA patient group versus the control group. Different colors represent the two reference genes used: *GAPDH* (blue), *HPRT1* (red) and the combination of *GAPDH* and *HPRT1* (green). The y-axis represents the quantitative data of the relative mRNA expression of the *XBPI* gene in monocytes of the XLA patient group compared with the control group. **P <0.01.



5. DISCUSSÃO GERAL

De acordo com nossos resultados, as mutações em *BTK* que levam a códons de parada prematura podem ser diferenciadas devido a reduzida expressão de mRNA. Os códons de terminação prematura podem ser originados por uma variedade de mutações, como as do tipo *nonsense*, *frameshifts* e alterações em sítios de *splicing*.

O processo de expressão gênica eucariótica envolve uma série de etapas interligadas de transcrição, *splicing* e poliadenilação, tradução e degradação do mRNA. Estes processos são regulados para manter a fidelidade da expressão de cada gene. Dentre esses mecanismos de regulação, um mecanismo de vigilância especializada é a via NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*), a qual tem como alvo as transcrições com códons de terminação prematura (PTCs) (Losson e Lacroute, 1979).

A ativação da via NMD requer a distinção de um PTC a partir de um códon de terminação adequada da tradução. Este processo envolve a deposição de complexos protéicos no mRNA, denominados EJC (*exon junction complexes*), que especificam a posição da junção de éxons. Os complexos de terminação da tradução, incluindo os fatores de liberação eRF1 e eRF3, interagem com os EJCs através dos fatores UPF (*up-frameshift*), induzindo a fosforilação da proteína Upf1, pela quinase SMG1, que provoca a degradação exo- e endonucleolítica do mRNA (Ohnishi *et al.*, 2003; Kashima *et al.*, 2006; Eberle *et al.*, 2009). Deste modo, o reconhecimento dos transcritos com *stop codon* prematuro pela via NMD reduz os níveis intracelulares de proteínas truncadas potencialmente deletérias (Kuzmiak e Maquat, 2006).

Em contraste, as consequências funcionais das mutações *missense* não são imediatamente aparentes, tendo em vista que nestes casos a expressão do mRNA de *BTK*

foi mantida. Assim, foi necessário avaliar os efeitos das mutações *missense* no processo de tradução do mRNA em proteína.

Nas imagens obtidas por microscopia confocal observamos que a amostra de controle saudável exibe a marcação da proteína BTK ao redor da parte interna da membrana plasmática. Em seu estado ativo, BTK é translocada para a parte interna da membrana plasmática pelo domínio PH, onde fica na proximidade de proteínas da família Src, possibilitando sua fosforilação em um resíduo de tirosina (Y551) na alça de ativação do domínio da quinase (Varnai *et al.*, 1999; Nore *et al.*, 2000). Nos pacientes, as imagens mostram que as mutações com *stop codon* prematuro levaram à deficiência da expressão de BTK e as do tipo *missense* resultaram na localização anormal da proteína no citoplasma celular, o que evidencia a síntese de proteína não funcional.

No retículo endoplasmático, os polipeptídeos recém-sintetizados devem ser dobrados corretamente na formação das estruturas terciárias, que possibilitam a atividade funcional da proteína, antes de serem transportados para os seus locais de ação. As proteínas que não apresentam a conformação adequada, como na presença de mutações, são alvos do processo de degradação associado ao retículo endoplasmático (ERAD). Este mecanismo faz a retrotranslocação das proteínas mal formadas do retículo para o citosol, a fim de que sejam degradadas através do sistema ubiquitina - proteassoma (Brodsky, 2012).

O aumento de proteínas mal formadas desencadeia o processo de estresse do retículo endoplasmático (RE). A via IRE1 α -XBP1 é a mais conservada e crítica para a biogênese do RE e para a capacidade secretória das células (He *et al.*, 2010).

A hiperexpressão de *XBP1* encontrada nos pacientes com XLA indica um processo de estresse celular. O nível de expressão do mRNA de *XBP1* é mantido baixo em células não estressadas e sua transcrição é induzida por estresse do retículo endoplasmático

(Yoshida *et al.*, 2006). Como a UPR é constitutivamente ativa em um nível basal (Shen *et al.*, 2005; Acosta-Alvear *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010), a regulação pela indução ou repressão da expressão de *XBPI* é fundamental na manutenção da homeostase do RE (He *et al.*, 2010).

XBPI é um fator de transcrição da UPR que induz a expressão de genes do controle de qualidade do retículo endoplasmático, aumentando a capacidade funcional da organela. É necessário na diferenciação de células plasmáticas secretoras do sistema imune adaptativo e tem sido descrito em outros processos envolvendo imunidade e inflamação, incluindo a diferenciação de células T CD8⁺ efectoras, a sobrevivência de células dendríticas e as respostas de macrófagos induzidas via receptores Toll-like (Reimold *et al.*, 2001; Iwakoshi *et al.*, 2007; Kamimura e Bevan, 2008; Martinon *et al.*, 2010). A ativação dos TLR4 e TLR2 por produtos microbianos promove especificamente a ativação de *XBPI* (Martinon *et al.*, 2010). A deficiência de *XBPI* aumenta significativamente a carga bacteriana em camundongos infectados com o patógeno *Francisella tularensis*, o qual é reconhecido pelo TLR2 (Martinon *et al.*, 2010). Da mesma forma, a infecção por *Caenorhabditis elegans* leva a ativação de *XBPI* para promover a defesa imune (Bischof *et al.*, 2008).

A proteína BTK também desempenha um papel importante na sinalização através dos receptores Toll-like. Por exemplo, BTK sofre autofosforilação após estimulação com LPS na linhagem celular de monócitos humanos THP1, em macrófagos derivados da medula óssea de camundongo e em linfócitos B do baço de ratos (Jefferies *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2006; Doyle *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008). BTK interage com o domínio TIR (Toll/IL-1 receptor) dos TLRs 4, 6, 8, e 9, e se associa com os componentes principais

do complexo de sinalização dos Toll-like, como MyD88, TIRAP e IRAK1 (Jefferies *et al.*, 2003).

Estudos com pacientes XLA mostram que a deficiência de BTK interfere na produção de citocinas induzidas por LPS via TLRs, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 (Horwood *et al.*, 2003; Sochorova *et al.*, 2007; Taneichi *et al.*, 2008; Marron *et al.*, 2012).

Entretanto, não há até o momento estudo relacionando BTK e XBP1, o que pode contribuir para as diferenças observadas no sistema imune inato dos indivíduos com XLA. Assim, as condições atribuídas à deficiência de BTK na XLA podem ser resultantes ou intensificadas pela perda da homeostase celular. Mais estudos são necessários para responder a esta pergunta.

O papel de XBP1 como um fator de transcrição crítico e mediador da sinalização da UPR está muito bem documentado na literatura, no entanto o conhecimento recente mostra que este fator de transcrição também é requerido em vários aspectos da imunidade, como já citado anteriormente. Dessa forma, observa-se que XBP1 pode modular a homeostase do RE independentemente da ativação clássica da UPR.

Uma questão em aberto a partir destes estudos é se os sinais responsáveis pela ativação de XBP1 nestes diversos processos surgem a partir da acumulação de proteínas mal formadas no lúmen do RE ou de sinais independentes do RE. O cruzamento entre as várias vias de sinalização e outras respostas de estresse pode confundir a avaliação do estresse do RE e da ativação da UPR. Novos métodos para avaliar e quantificar com precisão a ativação dos sensores da UPR e do estresse do RE em condições fisiológicas e patológicas estão sendo desenvolvidos (Yang *et al.*, 2010).

Nossos resultados mostram que os monócitos CD14+ dos pacientes com XLA estão susceptíveis à hiperexpressão de *XBPI*, que pode desempenhar um papel na função

imunológica desses pacientes. Investigações adicionais são necessárias para discernir os mecanismos de indução da hiperexpressão de *XBPI* nos monócitos dos pacientes com XLA.

6. CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, apresentamos que as mutações no gene *BTK* resultam na deficiência de proteína BTK, refletindo uma redução do mRNA ou a inatividade da proteína sintetizada. A ausência de uma BTK funcional é confirmada pelos níveis muito reduzidos de linfócitos B circulantes nesses pacientes.

A quantificação da expressão do mRNA de *BTK* mostrou ser uma ferramenta de grande aplicabilidade para identificação e diferenciação das mutações nos pacientes com XLA. Esta avaliação pode contribuir para o estudo de transcritos em outras doenças genéticas com diferentes tipos de mutação.

Apresentamos também os resultados da análise da expressão de 10 genes da UPR. Dentre os resultados, destaca-se a elevada expressão de *XBPI* obtida nos pacientes com XLA, indicando um processo de estresse celular.

O estresse do retículo endoplasmático tem sido relacionado a um grande número e variedade de doenças humanas genéticas e esporádicas, incluindo diabetes, câncer, aterosclerose, doenças neurológicas e doença inflamatória intestinal. No entanto, não existem publicações até o momento sobre esse processo na agamaglobulinemia ligada ao X.

O desenvolvimento deste projeto trouxe contribuições originais para a elucidação da fisiopatologia de BTK e da agamaglobulinemia ligada ao X.

7. Referências

Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, et al. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* 2007;27:53-66.

Amoras AL, da Silva MT, Zollner RL, Kanegane H, Miyawaki T, Vilela MM. Expression of Fc gamma and complement receptors in monocytes of X-linked agammaglobulinaemia and common variable immunodeficiency patients. *Clin Exp Immunol* 2007;150:422-8.

Amoras AL, Kanegane H, Miyawaki T, Vilela MM. Defective Fc-, CR1- and CR3-mediated monocyte phagocytosis and chemotaxis in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2003;13:181-8.

Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 1973; 181:223-30.

Bao Y, Zheng J, Han C, Jin J, Han H, Liu Y, et al. Tyrosine kinase Btk is required for NK cell activation. *J Biol Chem* 2012;287:23769-78.

Basile N, Danielian S, Oleastro M, Rosenzweig S, Prieto E, Rossi J, et al. Clinical and molecular analysis of 49 patients with X-linked agammaglobulinemia from a single center in Argentina. *J Clin Immunol* 2009;29:123-9.

Bischof LJ, Kao CY, Los FC, Gonzalez MR, Shen Z, Briggs SP, et al. Activation of the unfolded protein response is required for defenses against bacterial poreforming toxin in vivo. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000176.

Brodsky JL. Cleaning up: ER-associated degradation to the rescue. *Cell* 2012;151:1163 -7.

Bykowsky MJ, Haire RN, Ohta Y, Tang H, Sung SS, Veksler ES, et al. Discordant phenotype in siblings with X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* 1996; 58:477-83.

Brunner C, Müller B, Wirth T. Bruton's Tyrosine Kinase is involved in innate and adaptive immunity. *Histol Histopathol* 2005;20:945-55.

Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952;9:722-8.

Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat Rev Immunol* 2007;7:633-43.

Campana D, Farrant J, Inamdar N, Webster ADB, Janossy G. Phenotypic features and proliferative activity of B cell progenitors in X-linked agammaglobulinemia. *J Immunol* 1990;145:1675-80.

Citron KM. Agammaglobulinaemia with splenomegaly. *Br Med J* 1957;1:1148-51.

Conley ME, Broides A, Hernandez-Trujillo V, Howard V, Kanegane H, Miyawaki T, et al. Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development. *Immunol Rev* 2005;203:216-34.

Conley ME, Fitch-Hilgenberg ME, Cleveland JL, Parolini O, Rohrer J. Screening of genomic DNA to identify mutations in the gene for Bruton's tyrosine kinase. *Hum Mol Genet* 1994;3:1751-6.

Conley ME, Mathias D, Treadaway J, Minegishi Y, Rohrer J. Mutations in Btk in patients with presumed X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* 1998; 62:1034-43.

Cooke WT, Weiner W, Shinton NK. Agammaglobulinaemia: report of two adult cases. *Br Med J* 1957;1:1151-2.

Cooper MD, Lawton AR. Circulating B-cells in patients with immunodeficiency. *Am J Pathol* 1972;69:513-28.

Cunningham-Rundles C, Radigan L. Deficient IL-12 and dendritic cell function in common variable immune deficiency. *Clin Immunol* 2005;115:147-53.

Debnath J, Chamorro M, Czar MJ, Schaeffer EM, Lenardo MJ, Varmus HE, et al. rlk/TXK encodes two forms of a novel cysteine string tyrosine kinase activated by Src family kinases. *Mol Cell Biol* 1999;19:1498-507.

Dobbs AK, Yang T, Farmer D, Kager L, Parolini O, Conley ME. A hypomorphic mutation in Ig β (CD79b) in a patient with immunodeficiency and a leaky defect in B cell development. *J Immunol* 2007;179:2055-9.

Doyle SL, Jefferies CA, Feighery C, O'Neill LA. Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton's tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2007;282:36953-60.

Eberle AB, Lykke-Andersen S, Muhlemann O, Jensen TH. SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16:49-55.

Ferrari S, Lougaris V, Caraffi S, Zuntini R, Yang J, et al. Mutations of the Ig β gene cause agammaglobulinemia in man. *J Exp Med* 2007;204:2047-51.

Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5:a013169.

Gaspar HB, Lester T, Levinsky RJ, Kinnon C. Bruton's tyrosine kinase expression and activity in X-linked agammaglobulinaemia (XLA): the use of protein analysis as a diagnostic indicator of XLA. *Clin Exp Immunol* 1998;111:334-8.

Geha RS, Rosen FS, Merler E. Identification and characterization of subpopulations of lymphocytes in human peripheral blood after fractionation on discontinuous gradients of albumin. *J Clin Invest* 1973;52:1726-34.

Gomez-Rodriguez J, Readinger JA, Viorritto IC, Mueller KL, Houghtling RA, Schwartzberg PL. Tec kinases, actin, and cell adhesion. *Immunol Rev* 2007;218:45-64.

Good RA. Clinical investigations in patients with agammaglobulinemia. *J Lab Clin Med* 1954;44:803.

Grant GH, Wallace WD. Agammaglobulinaemia. *Lancet* 1954;267:671-3.

Gray P, Dunne A, Brikos C, Jefferies CA, Doyle SL, O'Neill LA. MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. *J Biol Chem* 2006;281:10489-95.

Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 2005;121:671-4.

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 2000;5:897-904.

Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999;397:271-4.

Hashimoto S, Tsukada S, Matsushita M, Miyawaki T, Niida Y, Yachie A, et al. Identification of Bruton's tyrosine kinase (Btk) gene mutations and characterization of the derived proteins in 35 X-linked agammaglobulinemia families: a nationwide study of Btk deficiency in Japan. *Blood* 1996;88:561-73.

Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 1999;10:3787-99.

He Y, Sun S, Sha H, Liu Z, Yang L, Xue Z, et al. Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. *Gene Expr* 2010;15:13-25.

Hermans PE, Diaz-Buxo JA, Stobo JD. Idiopathic late-onset immunoglobulin deficiency: clinical observations in 50 patients. *Am J Med* 1976;61:221-37.

Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* 2009;458:453-60.

Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim ES, Lee SK, et al. The kinase Btk negatively regulates the production of reactive oxygen species and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nat Immunol* 2012;13:369-78.

Horwood NJ, Mahon T, McDaid JP, Campbell J, Mano H, Brennan FM, et al. Bruton's tyrosine kinase is required for lipopolysaccharide induced tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 2003;197:1603-11.

Iwakoshi NN, Pypaert M, Glimcher LH. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med* 2007;204:2267-75.

Janeway CA, Apte L, Gitlin D. Agammaglobulinemia. *Trans Assoc Am Phys* 1953;66:200-2.

Jefferies CA, Doyle S, Brunner C, Dunne A, Brint E, Wietek C, et al. Bruton's tyrosine kinase is a Toll/interleukin-1 receptor domain binding protein that participates in nuclear factor kappaB activation by Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2003;278:26258-64.

Jenkins KA, Mansell A. TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Cytokine* 2010;49:237-44.

Kamimura D, Bevan MJ. Endoplasmic reticulum stress regulator XBP-1 contributes to effector CD8+ T cell differentiation during acute infection. *J Immunol* 2008;181:5433-41.

Kanegane H, Futatani T, Wang Y, Nomura K, Shinozaki K, Matsukura H, et al. Clinical and mutational characteristics of X-linked agammaglobulinemia and its carrier identified by flow cytometric assessment combined with genetic analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:1012-20.

Kanegane H, Tsukada S, Iwata T, Futatani T, Nomura K, Yamamoto J, et al. Detection of Bruton's tyrosine kinase mutations in hypogammaglobulinaemic males registered as common variable immunodeficiency (CVID) in the Japanese Immunodeficiency Registry. *Clin Exp Immunol* 2000;120:512-7.

Kaser A, Lee AH, Franke A, Glickman JN, Zeissig S, Tilg H, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 2008;134:743-56.

Kashima I, Yamashita A, Izumi N, Kataoka N, Morishita R, Hoshino S, et al. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 2006;20:355-67.

Keefer CS, Blake FG, Marshall EK Jr, Lockwood JS, Wood BW. Penicillin and treatment of infections. A report of 500 cases. Statement by the Committee on Chemotherapeutic and Other Agents, Division of Medical Sciences, National Research Council. *J Am Med Assoc* 1943;122:1217-24.

Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:1013-30.

Koprulu AD, Ellmeier W. The role of Tec family kinases in mononuclear phagocytes. *Crit Rev Immunol* 2009;29:317-33.

Kornfeld SJ, Haire RN, Strong SJ, Tang H, Sung SS, Fu SM, et al. A novel mutation (Cys145-->Stop) in Bruton's tyrosine kinase is associated with newly diagnosed X-linked agammaglobulinemia in a 51-year-old male. *Mol Med* 1996;2:619-23.

Kuzmiak HA, Maquat LE. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* 2006;12:306-16.

Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003;23:7448-59.

Lee KG, Xu S, Wong ET, Tergaonkar V, Lam KP. Bruton's tyrosine kinase separately regulates NFkappaB p65RelA activation and cytokine interleukin (IL)-10/IL-12 production in TLR9-stimulated B Cells. *J Biol Chem* 2008;283:11189-98.

Lee PP, Chen TX, Jiang LP, Chan KW, Yang W, Lee BW, et al. Clinical Characteristics and Genotype-phenotype Correlation in 62 Patients with X-linked Agammaglobulinemia. *J Clin Immunol* 2010;30:121-31.

Lindvall JM, Blomberg KE, Väliäho J, Vargas L, Heinonen JE, Berglöf A, et al. Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. *Immunol Rev* 2005;203:200-15.

López-Granados E, Pérez de Diego R, Ferreira Cerdán A, Fontán Casariego G, García Rodríguez MC. A genotype-phenotype correlation study in a group of 54 patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:690-7.

Lopez-Herrera G, Berron-Ruiz L, Mogica-Martinez D, Espinosa-Rosales F, Santos-Argumedo L. Characterization of Bruton's tyrosine kinase mutations in Mexican patients with X-linked agammaglobulinemia. *Mol Immunol* 2008;45:1094-8.

Losson R, Lacroute F. Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:5134-7.

Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 2006;86:1133-49.

Marron TU, Martinez-Gallo M, Yu JE, Cunningham-Rundles C. Toll-like receptor 4-, 7-, and 8-activated myeloid cells from patients with X-linked agammaglobulinemia produce enhanced inflammatory cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:184-90.

Martinon F, Chen X, Lee AH, Glimcher LH. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol* 2010;11:411-18.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001;21:1249-59.

McGuckin MA, Eri RD, Das I, Lourie R, Florin TH. ER stress and the unfolded protein response in intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298: 20-32.

Minegishi Y, Coustan-Smith E, Rapalus L, Ersoy F, Campana D, Conley ME. Mutations in Iga (CD79a) result in a complete block in B cell development. *J Clin Invest* 1999a;104:1115-21.

Minegishi Y, Coustan-Smith E, Wang YH, Cooper MD, Campana D, Conley ME. Mutations in the human λ 5/14.1 gene result in B cell deficiency and agammaglobulinemia. *J Exp Med* 1998;187:71-7.

Minegishi Y, Rohrer J, Coustan-Smith E, Lederman HM, Pappu R, Campana D, et al. An essential role for BLNK in human B cell development. *Science* 1999b;286:1954-7.

Mohamed AJ, Yu L, Bäckesjö CM, Vargas L, Faryal R, Aints A, et al. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunol Rev* 2009;228:58-73.

Moin M, Aghamohammadi A, Farhoudi A, Pourpak Z, Rezaei N, Movahedi M, et al. X-linked agammaglobulinemia: a survey of 33 Iranian patients. *Immunol Invest* 2004;33:81-93.

Nore BF, Vargas L, Mohamed AJ, Brandén LJ, Backesjo CM, Islam TC, et al. Redistribution of Bruton's tyrosine kinase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho-family GTPases. *Eur J Immunol* 2000;30:145-54.

Ollila J, Lappalainen I, Vihinen M. Sequence specificity in CpG mutation hotspots. *FEBS Lett* 1996;396:119-22.

Ohnishi T, Yamashita A, Kashima I, Schell T, Anders KR, Grimson A, et al. Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol Cell* 2003;12:1187-1200.

Ohta Y, Haire RN, Litman RT, Fu SM, Nelson RP, Kratz J, et al. Genomic organization and structure of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase: localization of mutations associated with varied clinical presentations and course in X chromosome-linked agammaglobulinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9062-6.

Okoh MP. Molecular and biophysical analysis of the non-catalytic PH, TH, SH3 and SH2 domains of Bruton tyrosine kinase (Btk) protein [dissertation]. Faculty of Science of the University of Helsinki; 2002.

O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007;7:353-64.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306:457-61.

Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 2009;9:35-51.

Park SW, Ozcan U. Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease. *Semin Immunopathol* 2013;35:351-73.

Piao W, Song C, Chen H, Wahl LM, Fitzgerald KA, O'Neill LA, et al. Tyrosine phosphorylation of MyD88 adapter-like (Mal) is critical for signal transduction and blocked in endotoxin tolerance. *J Biol Chem* 2008;283:3109-19.

Piirilä H, Väliäho J, Vihinen M. Immunodeficiency mutation databases (IDbases). *Hum Mutat* 2006;27:1200-8.

Plebani A, Soresina A, Rondelli R, Amato GM, Azzari C, Cardinale F, et al. Clinical, immunological, and molecular analysis in a large cohort of patients with X-linked agammaglobulinemia: an Italian multicenter study. *Clin Immunol* 2002;104:221-30.

Preud'Homme JL, Griscelli C, Seligmann M. Immunoglobulins on the surface of lymphocytes in fifty patients with primary immunodeficiency diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1973;1:241-56.

Ramalho VD, Oliveira Júnior EB, Tani SM, Roxo Júnior P, Vilela MM. Mutations of Bruton's tyrosine kinase gene in Brazilian patients with X-linked agammaglobulinemia. *Braz J Med Biol Res* 2010;43:910-3.

Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravallesse EM, et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 2001;412:300-07.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:519-29.

Rutkowski DT, Kaufman RJ. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci* 2007;32:469-76.

Schiff C, Lemmers B, Deville A, Fougereau M, Meffre E. Autosomal primary immunodeficiencies affecting human bone marrow B-cell differentiation. *Immunol Rev* 2000;178:91-8.

Schmidt NW, Thieu VT, Mann BA, Ahyi AN, Kaplan MH. Bruton's tyrosine kinase is required for TLR-induced IL-10 production. *J Immunol* 2006;177:7203-10.

Shen X, Ellis RE, Sakaki K, Kaufman RJ. Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*. *PLoS Genet* 2005;1:e37.

Siegal FP, Pernis B, Kunkel HG. Lymphocytes in human immunodeficiency states: a study of membrane-associated immunoglobulins. *Eur J Immunol* 1971;1:482-6.

Smith CIE, Baskin B, Humire-Greiff P, Zhou JN, Olsson PG, Maniar HS, et al. Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. *J Immunol* 1994;152:557-65.

Smith CIE, Islam TC, Mattsson PT, Mohamed AJ, Nore BF, Vihinen M. The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species. *Bioessays* 2001;23:436-46.

Sochorova K, Horvath R, Rozkova D, Litzman J, Bartunkova J, Sediva A, et al. Impaired Toll-like receptor 8-mediated IL-6 and TNF-alpha production in antigen-presenting cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Blood* 2007;109:2553-6.

Taneichi H, Kanegane H, Sira MM, Futatani T, Agematsu K, Sako M, et al. Toll-like receptor signaling is impaired in dendritic cells from patients with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol* 2008;126:148-54.

Tani SM, Wang Y, Kanegane H, Futatani T, Pinto J, Vilela MM, et al. Identification of mutations of Bruton's tyrosine kinase gene (BTK) in Brazilian patients with X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat* 2002;20:235-6.

Teimourian S, Nasser S, Pouladi N, Yeganeh M, Aghamohammadi A. Genotype-phenotype correlation in Bruton's tyrosine kinase deficiency. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30:679-83.

Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans Faraday Soc* 1937;33:524-31.

Tiselius A, Kabat EA. Electrophoresis of immune serum. *Science* 1938;87:1464-77.

Tóth B, Volokha A, Mihás A, Pac M, Bernatowska E, Kondratenko I, et al. Genetic and demographic features of X-linked agammaglobulinemia in Eastern and Central Europe: a cohort study. *Mol Immunol* 2009;46:2140-6.

Tsukada S, Saffran DC, Rawlings DJ, Parolini O, Allen RC, Klisak I, et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993;72:279-90.

Usui K, Sasahara Y, Tazawa R, Hagiwara K, Tsukada S, Miyawaki T, et al. Recurrent pneumonia with mild hypogammaglobulinemia diagnosed as X-linked agammaglobulinemia in adults. *Respir Res* 2001;2:188-92.

Väliäho J, Smith CI, Vihinen M. BTKbase: the mutation database for X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat* 2006;27:1209-17.

van Zelm MC, Geertsema C, Nieuwenhuis N, de Ridder D, Conley ME, Claudine Schiff, et al. Gross deletions involving IGHM, BTK, or Artemis: a model for genomic lesions mediated by transposable elements. *Am J Hum Genet* 2008;82:320-32.

Varnai P, Rother KI, Balla T. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. *J Biol Chem* 1999;274:10983-9.

Vetrie D, Vöřečovský I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993;361:226-33.

Vihinen M, Belohradsky BH, Haire RN, Holinski-Feder E, Kwan SP, Lappalainen I, et al. BTKbase, mutation database for X-linked agammaglobulinemia (XLA). *Nucleic Acids Res* 1997a;25:166-71.

Vihinen M, Kwan SP, Lester T, Ochs HD, Resnick I, Väliäho J, et al. Mutations of the human BTK gene coding for bruton tyrosine kinase in X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat* 1999;13:280-5.

Vihinen M, Nore BF, Mattsson PT, Bäckesjö CM, Nars M, Koutaniemi S, et al. Missense mutations affecting a conserved cysteine pair in the TH domain of Btk. *FEBS Lett* 1997b;413:205-10.

Vihinen M, Vetrie D, Maniar HS, Ochs HD, Zhu Q, Vörechovský I, et al. Structural basis for chromosome X-linked agammaglobulinemia: a tyrosine kinase disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12803-7.

Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 2012;197:857-67.

Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011;334:1081-86.

Wang Y, Kanegane H, Sanal O, Tezcan I, Ersoy F, Futatani T, et al. Novel Iga (CD79a) gene mutation in a Turkish patient with B cell-deficient agammaglobulinemia. *Am J Med Genet* 2002;108:333-6.

Wall RL, Saslaw S. Adult agammaglobulinemia. *AMA Arch Intern Med* 1955;95:33-6.

Winkelstein JA, Marino MC, Lederman HM, Jones SM, Sullivan K, Burks AW, et al. X-linked agammaglobulinemia: report on a United States registry of 201 patients. *Medicine* 2006;85:193-202.

Yel L, Minegishi Y, Coustan-Smith E, Buckley RH, Trubel H, Pachman LM, et al. Mutations in the mu heavy chain gene in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med* 1996;335:1486-93.

Yang L, Xue Z, He Y, Sun S, Chen H, Qi L. A Phos-tag-based method reveals the extent of physiological endoplasmic reticulum stress. *PLoS ONE* 2010;5:e11621.

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001;107:881-91.

Yoshida H, Nakanaka S, Sato R, Mori K. XBP1 is Critical to Protect Cells from Endoplasmic Reticulum Stress: Evidence from Site-2 Protease-deficient Chinese Hamster Ovary Cells. *Cell Struct Funct* 2006;31:117-25.

Anexo 1

Métodos

Extração de DNA

A extração de DNA genômico (gDNA) foi realizada a partir de 3 mL de sangue periférico, coletado em tubo com EDTA, utilizando-se de kit de extração comercial (Gentra, Qiagen).

Alíquotas de 3 mL de sangue foram homogeneizadas com 9 mL de solução de lise de hemáceas, incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente (15-25°C) e centrifugadas por 2 minutos a 2000g. O *pellet* de células resultante foi homogeneizado com 3 mL de solução de lise celular. Na seqüência, foi adicionado ao tubo 1 mL de solução de precipitação de proteínas, seguida de centrifugação por 5 minutos a 2000g.

O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo contendo 3 mL de isopropanol para a precipitação de DNA. Após centrifugação (3 minutos, 2000g), o DNA precipitado foi lavado com 1 mL de solução de etanol 70% e centrifugado por mais 1 minuto a 2000g. O sobrenadante da centrifugação foi descartado e o DNA precipitado ressuspenso em 250 µL de solução de hidratação de DNA. As amostras foram incubadas por 1 hora a 65°C em banho-maria para completa solubilização.

As amostras de DNA genômico foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop) onde as leituras da $D_{260\text{nm}}$ e $D_{280\text{nm}}$ foram obtidas, assim como a razão entre elas $D_{260/280}$. As amostras usadas nas reações de PCR foram diluídas a 50 ng/µL. Os estoques foram armazenados a -20°C.

Extração de RNA

Células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) foram isoladas de sangue periférico, coletado em tubo com heparina sódica, através de centrifugação com um gradiente de densidade (Ficoll-Paque, GE Healthcare, Suécia), por 20 minutos a 1800 rpm, com posterior lavagem em salina por 10 minutos a 1200 rpm. Para cada $5-10 \times 10^6$ células foi acrescentado 1mL de Trizol[®] (Invitrogen[™]), seguido de incubação por 5 minutos em temperatura ambiente (15-25°C). Na seqüência, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio com posterior incubação (3 min, 15-25°C) e centrifugação (1200g, 15 min, 2-8°C). A fase aquosa resultante da centrifugação foi transferida para um microtubo limpo. O RNA foi precipitado da fase aquosa com 0,5mL de álcool isopropílico e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação (1200g por 10 minutos entre 2-8°C), o RNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% em água DEPC e centrifugado a 10.000g durante 5 minutos entre 2-8°C. O sobrenadante da centrifugação foi descartado e o RNA ressuspendido em 20 µL de água DEPC. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 55-60°C em banho-maria para completa solubilização.

As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop) onde as leituras da D_{260} e D_{280} foram obtidas, assim como a razão entre elas $D_{260}/280$. Nas reações de transcriptase reversa (RT) foram utilizados 1 µg de RNA. Os estoques foram armazenados a -80°C.

Reação em cadeia da polimerase - PCR (*Polymerase chain reaction*)

Os segmentos do gene *BTK* foram amplificados a partir de gDNA utilizando-se de um conjunto de pares de primers, flanqueadores de cada éxon e da região promotora, baseados na seqüência de Vřechovský *et al.* (1995). O ensaio de PCR foi padronizado

para o volume de reação de 25µL contendo 100ng de DNA, 1,0 µL de cada primer, 2,0 µL de dNTPs (Invitrogen™), 1,5 µL de MgCl₂ e 0,5 µL de *Taq polimerase* (Invitrogen™) em termociclador (Mastercycler - Eppendorf), sendo a desnaturação inicial realizada por 4 minutos na temperatura de 94°C, a amplificação com 32 ciclos na temperatura de 94°C por 30 segundos, o pareamento a 57°C por 30 segundos e a extensão a 72°C por 30 segundos.

Reação de Transcriptase Reversa – RT- PCR

As reações de RT foram realizadas em um volume de 20 µL contendo 1 µg de RNA, 2 µL de dNTPs (Invitrogen™), 2 µL de random primers (Invitrogen™), 1 µL de enzima transcriptase reversa (SuperScript III, Invitrogen™), 1 µL de DTT , 4 µL de 5x First Strand Buffer e água DEPC (diethylpirocarbonato). O gene *BTK* foi amplificado do cDNA utilizando-se de 7 pares de iniciadores (Hashimoto *et al.*, 1996). A reação de RT-PCR foi realizada no volume de 25µL contendo 2,0 µL de cDNA, 1,0 µL de cada iniciador, 2,0 µL de dNTPs (Invitrogen™), 1,5 µL de MgCl₂ e 0,5 µL de *Taq polimerase* (Invitrogen™) em termociclador (Mastercycler - Eppendorf), sendo a desnaturação inicial realizada por 4 minutos na temperatura de 94°C, a amplificação com 33 ciclos na temperatura de 94°C por 30 segundos, o pareamento a 54°C por 30 segundos e a extensão a 72°C por 40 segundos.

Seqüenciamento

Os produtos das amplificações foram purificados com GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e quantificados em gel de agarose a 2% por comparação com padrão de massa molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™). Após a quantificação, as amostras foram seqüenciadas (seqüenciamento automático ABI 3730

DNA Analyser - Applied Biosystems) utilizando-se dos mesmos pares de iniciadores descritos e o BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Estes seqüenciamentos foram realizados pelo Centro de Estudos do Genoma Humano - IB - USP.

A análise dos seqüenciamentos foi realizada confrontando a seqüência obtida com a seqüência referência (DNA genômico gi: 2281904/locusHSU78027; DNA complementar: NM_000061) depositada no banco internacional de genomas - GenBank utilizando o programa Blast (Basic Local Alignment Tool) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e o editor de seqüências biológicas BioEdit (Íbis Therapeutics - Carlsbad, CA, EUA).

Imunocitoquímica

CMSP foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços em meio RPMI 1640 e incubadas a 37 °C. Após 1 hora, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS (Cunningham-Rundles e Radigan, 2012). As células aderentes foram fixadas em 4% paraformaldeído em PBS e 0,12 M de sacarose por 20 minutos à temperatura ambiente. Para o processo de permeabilização, as células foram tratadas com 0,2% de Triton X-100 em PBS por 20 minutos.

Locais não específicos de ligação foram bloqueados com o uso de soro de cabra a 6%. As células foram incubadas, durante a noite a 4°C, com anticorpo monoclonal anti-BTK (Santa Cruz Biotecnologia, Inc), que reconhece o epítipo nas posições dos aminoácidos 459-659 da BTK humana. Na seqüência, foi utilizado o anticorpo secundário goat anti-mouse IgG₁ conjugado com FITC (Southern Biotechnology Associates, Inc, Birmingham, AL, EUA - 1:1000). Após lavagem intensa com PBS, as lamínulas foram incubadas com Hoechst (Molecular Probes) para visualização do núcleo e montadas em

lâminas usando ProLong Gold antifade (Molecular Probes). As lâminas foram visualizadas e as imagens obtidas em microscópio de fluorescência confocal (LSM - 510 Meta, Zeiss) com aumento de 63x.

Análise da expressão de *BTK*

RNA total foi obtido de CMSP com reagente Trizol[®] (Invitrogen[™]) conforme já descrito. A reação de RT foi realizada em um volume de 20 µL contendo 1 µg de RNA, 2 µL de dNTPs (Invitrogen[™]), 2 µL de random primers (Invitrogen[™]), 1 µL de enzima transcriptase reversa (SuperScript III, Invitrogen[™]), 1 µL de DTT , 4 µL de 5x First Strand Buffer e água DEPC (diethylpirocarbonato). As análises de expressão relativa de mRNAs foram realizadas por RT-qPCR. Todos os pares de iniciadores foram obtidos a partir da biblioteca de reagentes de ensaio TaqMan (Tabela 1).

Tabela 1. Genes e iniciadores utilizados.

Símbolo	Nome	Função	Taqman Assay	Amplicon (pb)
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GR	4333764 F	122
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	GR	4333768 F	100
<i>BTK</i>	Bruton tyrosine kinase	GA	Hs00163761_m1	66

GR - gene de referência; GA - gene alvo; pb - pares de base

Análise da expressão de sensores do estresse do retículo endoplasmático

Após isolamento por gradiente de densidade (Ficoll-Paque, GE Healthcare, Suécia), CMSP foram ressuspensas em tampão para separação magnética de células (Miltenyi Biotec, Alemanha), de modo que a concentração foi de 1×10^7 células em $80 \mu\text{L}$ de tampão. Monócitos foram separados dentre as CMSP usando $20 \mu\text{L}$ de esferas magnéticas contendo Anti-CD14 para cada 1×10^7 células, de acordo com o protocolo do fabricante (Miltenyi Biotec, Alemanha). A suspensão foi homogeneizada e incubada durante 15 minutos a 4°C . As células foram lavadas no tampão de separação e ressuspensas em $500 \mu\text{L}$ de tampão de separação para cada 1×10^8 células, para assim proceder a separação magnética no equipamento VarioMacs (Miltenyi Biotec, Alemanha). RNA total foi obtido dos monócitos utilizando-se o kit ilustra RNAspin Mini Isolation (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop) onde as leituras da D_{260} e D_{280} foram obtidas, assim como a razão entre elas $D_{260}/280$. A reação de RT foi realizada em um volume de $20 \mu\text{L}$ contendo $1 \mu\text{g}$ de RNA, $2 \mu\text{L}$ de dNTPs (InvitrogenTM), $2 \mu\text{L}$ de random primers (InvitrogenTM), $1 \mu\text{L}$ de enzima transcriptase reversa (SuperScript III, InvitrogenTM), $1 \mu\text{L}$ de DTT, $4 \mu\text{L}$ de 5x First Strand Buffer e água DEPC (diethylpirocarbonato). As análises de expressão relativa de mRNAs foram realizadas por RT-qPCR. Todos os pares de iniciadores foram obtidos a partir da biblioteca de reagentes de ensaio TaqMan (Tabela 2).

Tabela 2. Genes e iniciadores utilizados.

Símbolo	Nome	Função	Taqman Assay	Amplicon (pb)
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GR	4333764 F	122
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	GR	4333768 F	100
<i>ATF4</i>	Activating transcription factor 4	GA	Hs00909569_g1	68
<i>ATF6</i>	Activating transcription factor 6	GA	Hs00232586_m1	95
<i>BAX</i>	BCL2-associated X protein	GA	Hs00180269_m1	62
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	GA	Hs00608023_m1	81
<i>DDIT3</i>	DNA-damage-inducible transcript 3	GA	Hs01090850_m1	78
<i>EIF2AK3</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	GA	Hs00984006_m1	83
<i>EIF2S1</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa	GA	Hs00187953_m1	79
<i>ERN1</i>	Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	GA	Hs00176385_m1	81
<i>HSPA5</i>	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	GA	Hs99999174_m1	101
<i>XBPI</i>	X-box binding protein 1	GA	Hs00231936_m1	60

GR - gene de referência; GA - gene alvo; pb - pares de base

Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (Real Time - qPCR)

Os produtos das transcrições reversas (cDNA) foram utilizados nas reações de Real Time - qPCR em um volume total de reação de 12,5µL pelo método TaqMan[®] (Applied Biosystems).

As reações foram preparadas em triplicata tanto para os genes alvo quanto para os genes de referência. As leituras de fluorescência foram realizadas no equipamento ABI PRISM[®] 7500 Sequence Detection system e, posteriormente, analisadas pelo Software 7500 v2.0.5 (Applied Biosystems).

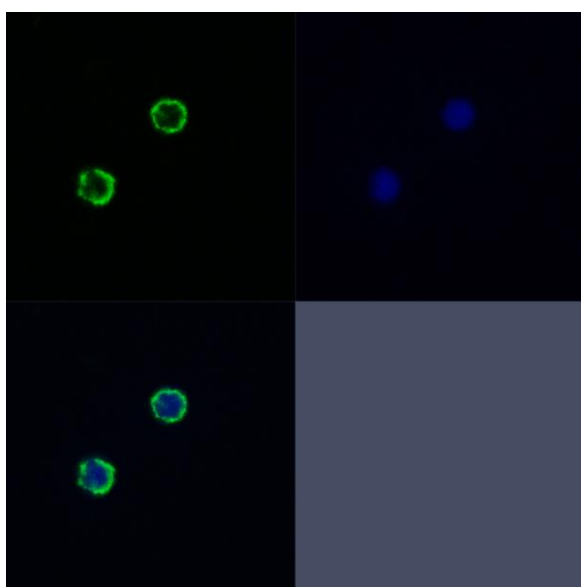
A quantificação relativa foi obtida pelos valores do ciclo C_T (threshold cycle), no qual o aumento do sinal associado à fase exponencial de amplificação dos produtos de PCR começa a ser detectado. A avaliação da expressão gênica foi realizada pelo método $\Delta\Delta C_T$ utilizando *GAPDH* e *HPRT1* como genes de referência.

Anexo 2

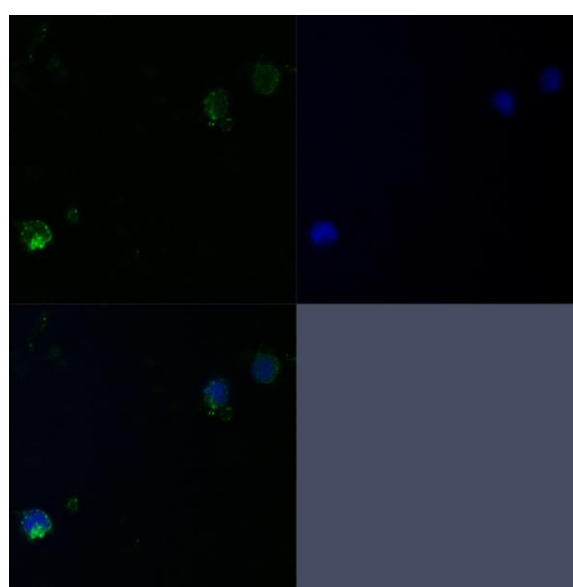
Imagens de microscopia confocal

Legenda: 1º quadro: BTK (FITC, verde), 2º quadro: Núcleo celular (Hoechst, azul), 3º quadro: Merged, sobreposição das imagens.

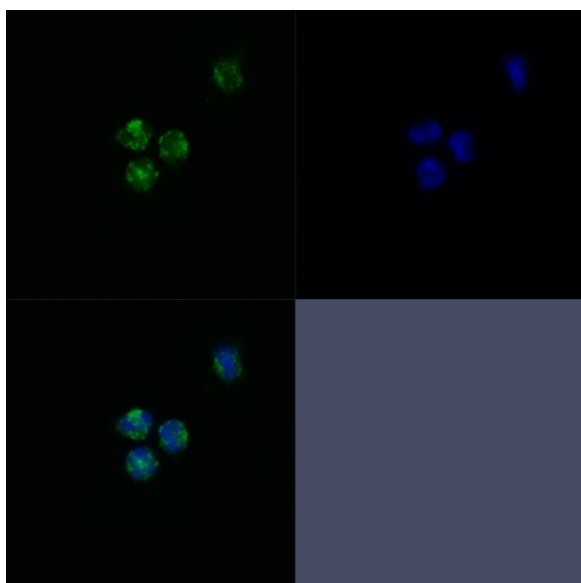
Controle



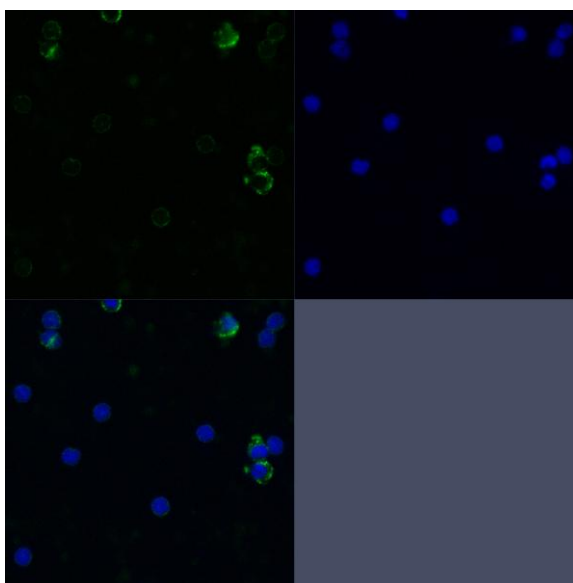
XLA01



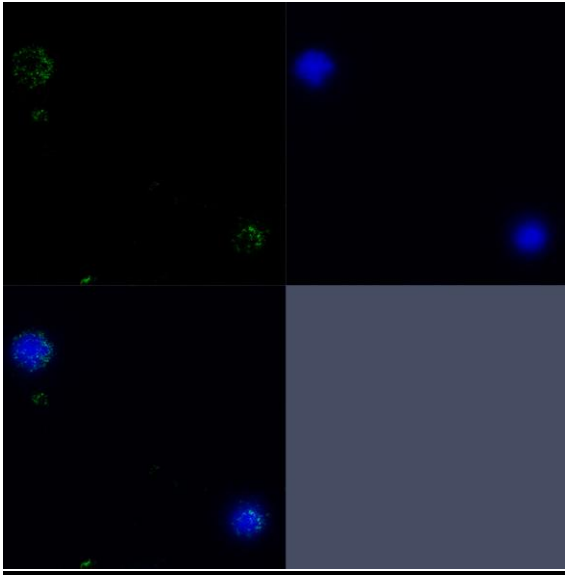
XLA02



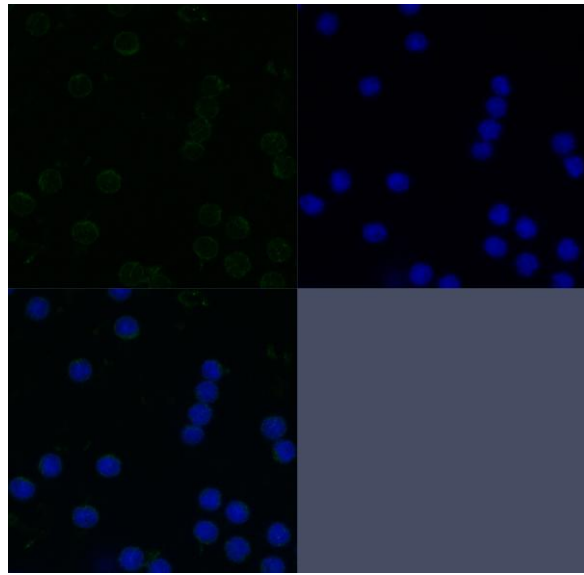
XLA03



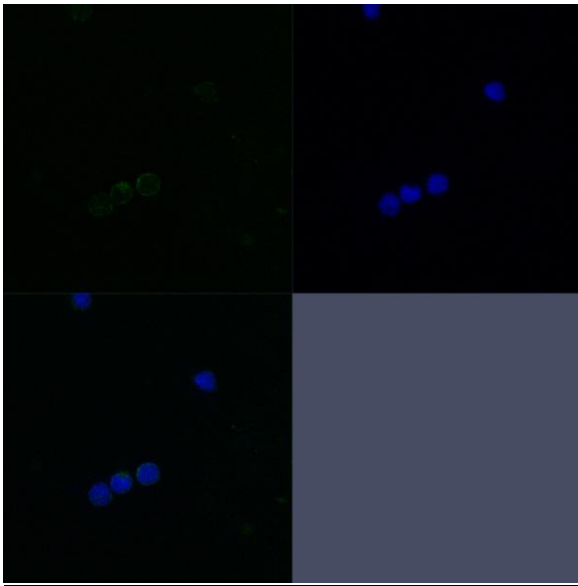
XLA04



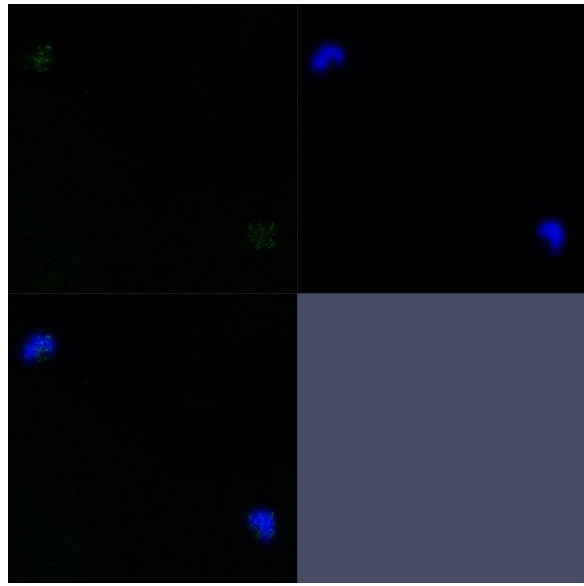
XLA05



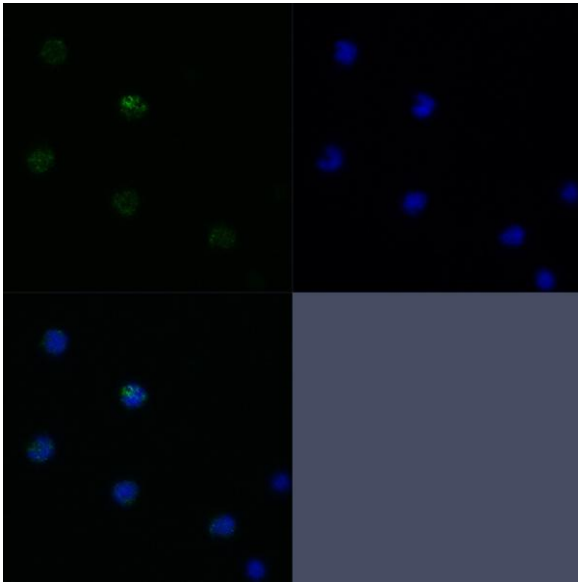
XLA06



XLA07



XLA08



Anexo 3

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 22/07/08.
(PARECER CEP: N° 759/2005)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA EM PACIENTES COM AGAMGLOBULINEMIA LIGADA AO X E IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL FRENTE À ANTIGENOS VACINAIS”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Maráisa Centeville/Maria Marluce dos Santos Vilela

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui o projeto intitulado “ATIVIDADE CITOTÓXICA DE NK E PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T PARA BCG EM PACIENTES COM IMUNODEFICIÊNCIA COMUM VARIÁVEL (ICV) AGAMGLOBULINEMIA LIGADA AO X (ALX)”, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de julho de 2008.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

fone (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br