



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PRISCILA PINI ZENATTI

**ESTUDO DO IL-7R NA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA
PEDIÁTRICA DE LINHAGEM T**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
PRISCILA PINI ZENATTI
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do título de doutor em
Genética e Biologia Molecular, na área
de Genética Animal e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Yunes

Co-orientador: Prof. Dr. Jörg Kobarg

Campinas - 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Z42e	Zenatti, Priscila Pini, 1981- Estudo do IL-7R na leucemia linfoide aguda pediátrica de linhagem T / Priscila Pini Zenatti. – Campinas, SP: [s.n.], 2012. Orientador: José Andrés Yunes. Coorientador: Jörg Kobarg. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Leucemia linfoide aguda. 2. Receptores de interleucina-7. 3. Linfócitos T. 4. Oncogenes. I. Yunes, José Andrés. II. Kobarg, Jörg. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.
------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Study of IL-7R in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia

Palavras-chave em Inglês:

Acute lymphoblastic leukemia

Interleukin-7 receptors

T-Lymphocytes

Oncogenes

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

José Andrés Yunes [Orientador]

Eduardo Magalhães Rego

Carlos Alberto Scridelli

Sara Teresinha Olalla Saad

Letícia Frohlich Archângelo

Data da defesa: 27-01-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 27 de Janeiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Andrés Yunes (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli



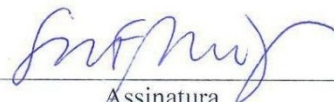
Assinatura

Profª. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad



Assinatura

Profª. Dra. Leticia Frohlich Archângelo



Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Prof. Dr. Fabio Pappes

Assinatura

Prof. Dr. André Vettore

Assinatura

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A HEMATOPOIESE.....	1
1.2 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA PEDIÁTRICA E PRINCIPAIS ALTERAÇÕES GÊNICAS	3
1.3 OS LINFÓCITOS T E A INTERLEUCINA 7 (IL-7)	6
1.4 RECEPTOR DA IL-7 (IL-7R)	7
1.5 <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO, POLIMORFISMO E MUTAÇÕES NO <i>IL7R</i>	11
1.6 PAPEL DO IL7/IL-7R NA LLA-T	13
1.7 HIPÓTESE DO TRABALHO	14
2. OBJETIVOS	17
3. MANUSCRITO	18
4. RESULTADOS COMPLEMENTARES E DISCUSSÃO	45
4.1. HÁ ALGUMA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO DO IL7R E OCORRÊNCIA DA LLA-T PEDIÁTRICA?.....	45
4.2. MUTAÇÕES EM OUTROS RECEPTORES DA FAMÍLIA GC	48
4.3. PAPEL DO TSLPR (CRLF2) E KIT NO FUNCIONAMENTO DO IL-7R MUTANTE.....	50
4.4. VARIEDADE DE MUTANTES – OPORTUNIDADE PARA CARACTERIZAR DETERMINANTES ESTRUTURAIS DO IL7RMUT	53
4.4.1. <i>Resíduo de cisteína e prolina em mutações ativadoras</i>	56
4.4.2. <i>A posição da cisteína no IL7Rmut deve ser ideal para ativar sinalização</i>	59
4.4.3. <i>Mutações sem resíduos de cisteína também conferem ganho de função ao IL-7Rα?</i>	61
4.5. LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DO IL-7RMUT.....	64
4.6. AS MUTAÇÕES DO IL-7R SÃO ONCOGÊNICAS?	71
5. CONCLUSÃO	75
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	76
7. ANEXOS	86

AGRADECIMENTOS

Agradecer não é algo tão simples e fácil neste momento. Não pela falta de motivos, mas sim pelo excesso de razões que tenho para ser grata. Uma conquista tão grande e sonhada que me faltam palavras para expressar minha gratidão a todos àqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, fizeram parte desta minha trajetória. Foram aproximadamente 5 anos lutando por um sonho, que hoje está prestes a se concretizar. Alcancei muito mais do que esperava, aprendi muito mais do que acreditava que iria aprender e hoje, vejo que as dificuldades enfrentadas valeram a pena.

Em especial, quero agradecer a Deus que guiou os meus passos, deu-me sabedoria, inteligência, saúde e todas as condições para que eu pudesse lutar em busca dos meus sonhos. Sem Sua proteção e ajuda eu poderia “desdobrar-me em mil”, porém tenho certeza que não seria tudo tão perfeito como foi. Deus sempre reserva o melhor!

Agradeço com importância especial também, à minha família: meu pai, minha mãe, meu irmão Dario e minha irmã Sara. Uma família maravilhosa que é minha estrutura, meu alicerce, a força que me impulsiona nas realizações dos meus objetivos. As palavras são insuficientes para agradecer tão grande amor que tenho em vocês. Nada faria sentido se não tivesse como compartilhar tamanha felicidade com vocês. Agradeço pela paciência e por todo apoio nos momentos mais difíceis que passei, pelas palavras amigas e confortantes e por acreditar que eu seria capaz! Amo vocês!

Agradeço ao meu orientador Dr José Andrés Yunes, uma pessoa muito boa e humilde, que além de chefe, é amigo, conselheiro e muito sábio. Suas filosofias, cantorias e “brigas” com as nossas porcanças o tornaram um orientador único, com características peculiares. Nunca vou me esquecer do dia que encontramos a primeira mutação no nosso gene de estudo e eu ouvi: “eu não dava nada para esse seu trabalho, hein, filha”... E pensar que juntos conquistamos algo que nem sonhávamos: um artigo na *Nature Genetics*! Foi merecido! Imensamente agradeço pelas oportunidades maravilhosas de realizar parte deste doutorado em Lisboa – Portugal e em Frederick – USA, tornando realidade algo que eu acreditava ser apenas sonho.

Agradeço ao meu co-orientador, Dr Jörg Kobarg, uma pessoa extremamente motivadora e otimista, sempre dando ânimo e incentivando minhas ideias. Obrigada pela oportunidade de orientar uma aluna, pelas ideias trocadas durante todos estes anos, pelas oportunidades no LNBio e por acreditar em mim também.

Agradeço ao Centro Infantil Boldrini, ao LNBio, à Unicamp, ao CNPq por toda infraestrutura fornecida e pelo auxílio financeiro; aos pacientes e familiares que tornaram esse trabalho realizável; aos nossos colaboradores e amigos de Lisboa e dos Estados Unidos, tanto pela colaboração profissional como pela amizade e recepção que me deram quando lá estive; ao Dr Kleber Franchini (diretor do LNBio) e a todos os amigos (impossível citar nomes) que me ajudaram e me apoiaram nas horas mais difíceis, nos experimentos mais complicados, nas noites a fora trabalhando sem parar, mas ainda pelas boas risadas, almoços, conversas “filosóficas”, bobagens, etc... Já sinto saudades.

RESUMO

A IL-7 é uma citocina essencial para o desenvolvimento, sobrevivência, e proliferação dos timócitos prematuros normais no timo e linfócitos T maduros nos órgãos linfoides periféricos. O receptor da IL-7 é um heterodímero constituído pela IL-7R α (codificado pelo gene *IL7R*) e IL-2R γ . A IL-2R γ participa também dos receptores da IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21, sendo por isso conhecida como cadeia comum gama ou γ c. A sinalização via IL-7 é imprescindível para o processo de rearranjo V(D)J dos receptores de células T (TCR), pois leva à modificação da cromatina que permite o acesso da recombinase aos loci TCR no DNA. Camundongos defeituosos para a cadeia alfa do receptor da IL-7 (IL-7R α) desenvolvem imunodeficiências devido à falta de células T. A via IL-7/IL-7R α é também importante para proliferação e sobrevivência da leucemia linfóide aguda de células T (LLA-T). Suspeitando da existência de mutações em *IL7R* resultando em ganho de função e hiperativação da via IL-7/IL-7R α , procurou-se por mutações no gene do IL-7R α em mais de 50 casos de LLA-T pediátrica. Procurou-se também mutações no domínio de autoinibição das JAK1 e JAK3, moléculas associadas ao IL-7R α e IL-2R γ , respectivamente. Aproximadamente 9% das LLA-T pediátricas apresentaram mutações no IL-7R α , resritas a uma região estreita do éxon 6, que resultaram, na maioria dos casos, em inserções de uma cisteína no domínio transmembrana/justamembrana da proteína. A presença dessa cisteína leva à homodimerização das cadeias IL-7R α mediante a formação de pontes de dissulfeto e à ativação constitutiva do IL-7R α independente de seu ligante, conforme verificado pela fosforilação de *JAK1*, *STAT5*, *AKT* e *BAD* e análise de mutantes artificiais do IL-7R α com subtração ou adição de resíduo de cisteína. Verificou-se também que o local de inserção da cisteína é crítico para que a homodimerização das cadeias IL-7R α mutantes resulte em ativação da via JAK/STAT. Receptores mutados tiveram um efeito transformante nas linhagens celulares D1 e Ba/F3, que sobreviveram na ausência dos fator de crescimento IL-7 e IL-3, respectivamente. Além disso, células D1 transduzidas com *IL7R* mutante, quando injetadas em camundongos *knockout* (KO) para *IL7*, causaram esplenomegalia, metástase e tumor no local da injeção. Resultados semelhantes foram obtidos com a expressão ectópica do *IL7R* mutante em células progenitoras hematopoiéticas de camundongos *knockout* para *IL7R*, *JAK3* e/ou *IL2RG*, demonstrando que o homodímero IL-7R α mutante atua independentemente dessas moléculas. Em conclusão, mutações no *IL7R* contribuem para a leucemogênese em 9% das crianças com LLA-T. Espera-se que a melhor caracterização do mecanismo responsável pela ativação constitutiva do IL-7R α mutante abra caminho para o desenho de novas drogas e anticorpos monoclonais, o que permitirá avaliar o valor terapêutico do bloqueio/inibição do IL-7R α mutante nas LLA-T.

ABSTRACT

The IL-7, a product of stromal cells, is normally required for T cells development and for survival of mature peripheral T cells. The IL-7R consists of two components, the IL-7R α (encoded by *IL7R*) and the common gamma chain (γ c), or IL-2R γ , that is shared by receptors for IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 and IL-21. The IL-7 signaling has a role in V(D)J recombination in developing T and B cells by controlling access of the V(D)J recombinase to the locus. IL-7R α deficiency mice showed a diminished T cell number and impaired lymphocyte development. Further, the IL-7/IL-7R α pathway is important for T-acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) proliferation and survival. Hypothesizing that *IL7R* gain-of-function mutation could be occurring in T-ALL, 50 T-ALL samples were analyzed for mutations. The kinases JAK1 and JAK3, that are associated with IL-7R α and γ c, respectively, were also studied for mutations. About 9% of childhood T-ALL presented mutations at the transmembrane domain encoded by exon 6, and all of them were in-frame insertions and deletions. In all but three cases there was an insertion of cysteine that is essential for disulfide bond formation and constitutive activation of the receptor independent of IL-7. The constitutive signaling was confirmed by phosphorylation of JAK1, STAT5, AKT and BAD, and analysis of IL-7R α artificial mutants with or without cysteine. The position of cysteine insertion is very important to disulfide bond formation, to activate the JAK/STAT pathway and to support the proliferation of Ba/F3 and D1 cell lines in the absence of cytokine. Moreover, *IL7R* mutant transduced D1 cells injected into *IL7*^{-/-} mice caused splenomegaly, metastasis and tumor at the injection site. Similar results were obtained with the ectopic expression of the *IL7R* mutant in hematopoietic progenitor cells of *IL7R*^{-/-}, *JAK3*^{-/-} and/or *IL2RG*^{-/-} mice, demonstrating that the mutant homodimer IL-7R α operates independently of these molecules. In conclusion, mutations in the *IL7R* contribute to leukemogenesis in 9% of children with ALL-T. We hope that a better comprehension of the mechanism responsible for the constitutive activation of IL-7R α mutant opens new perspectives into the design of new drugs and monoclonal antibodies, which may turn into valuable therapeutic treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Locais de hematopoiese humana nos períodos pré e pós-natal.	1
Figura 2: Hierarquia das células hematopoiéticas.	2
Figura 3: Representação da cadeia alfa do receptor da interleucina 7 (IL-7R α)	9
Figura 4: Vias de sinalização desencadeadas pelo IL-7R α	10
Figura 5: Representação esquemática das isoformas de <i>IL7R</i> geradas por <i>splicing</i> alternativo	12
Figura 6: Representação esquemática da estrutura primária de Janus quinase	15
Figura 7: Estratégia de sequenciamento dos genes <i>IL7Rα</i> , <i>JAK1</i> e <i>JAK3</i>	45
Figura 8: Receptores para citocinas da família γ c e para TSLP.	49
Figura 9: Homo-heteroduplex dos receptores de interleucinas dependentes de γ c	50
Figura 10: Expressão do <i>TSLPR</i> em LLA-T	51
Figura 11: Fosforilação de <i>KIT</i> por IL-7	52
Figura 12: Expressão de <i>KIT</i> em linhagens celulares e amostras de LLA-T	53
Figura 13: IL-7R α mutado forma dímeros em bactérias <i>E. coli</i> BL21	55
Figura 14: Dimerização e ativação constitutiva dos IL-7R α mutado	58
Figura 15: Representação esquemática dos dímeros de EpoR ligados por pontes dissulfeto	60
Figura 16: A inserção de uma única cisteína	61
Figura 17: Mutação sem cisteína não causa dimerização	63
Figura 18: Modelo proposto para o tráfico da cadeia alfa do IL7R	64
Figura 19: Representação do complexo de sinalização do IL-7R após a ligação da IL-7	65
Figura 20: Imunofluorescência da localização de IL-7R α e IL-7R α _intracelular	68
Figura 21: Frequência dos fenótipos observada entre as células COS-7 transfectadas	69
Figura 22: Expressão IL-7R α mutantes ou selvagem na superfície de células D1 transduzidas.	70
Figura 23: Camundongos receptores secundários IL-7 ^{-/-} que receberam o IL-7Rmut	72

1. INTRODUÇÃO

1.1.A hematopoiese

Todas as células do sangue são geradas a partir de um precursor celular comum e indiferenciado, conhecido como célula-tronco hematopoiética (HSC), através de um processo extremamente dinâmico denominado hematopoiese. Durante o desenvolvimento embrionário, a produção das células do sangue ocorre no saco vitelínico e na placenta (Gekas *et al.*, 2005). Após o nascimento, a hematopoiese acontece principalmente na medula dos ossos longos (tíbia e fêmur), porém processos de maturação, ativação e até proliferação de células linfóides podem ocorrer em órgãos linfóides secundários, como baço, timo e linfonodos (figura 1).

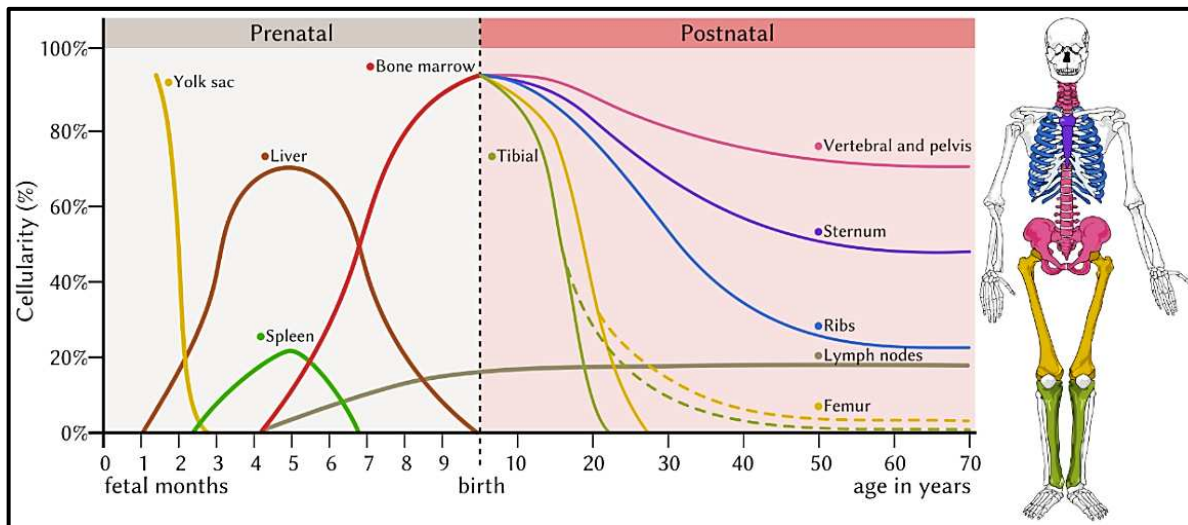


Figura 1: Locais de hematopoiese humana nos períodos pré e pós-natal. Cellularity (celularidade); Fetal months (meses fetal); Birth (nascimento); Age in years (idade em anos); yolk sac (saco vitelínico); liver (fígado); spleen (baço); bone marrow (medula óssea); tibial (tíbia); vertebral and pelvis (vértebras e pélvis); sternum (esterno); ribs (costelas); lymph nodes (linfonodos); femur (fêmur).

O desenvolvimento hematopoiético se divide em linhagem linfóide, que dará origem aos linfócitos B, T e NK, e em linhagem mieloide, de onde se originam os eritrócitos, plaquetas, granulócitos (neutrófilo, basófilo e eosinófilo) e macrófagos (figura 2). As células-tronco hematopoiéticas (HSC) dão origem às células multipotentes (MPP), as quais têm potencial para desenvolverem-se em múltiplas linhagens progenitoras (Christensen e Weissman, 2001; Morrison e Weissman, 1994). Um subgrupo de MPPs, que expressam o receptor da tirosina quinase Flt3, perde sua habilidade para diferenciar-se na linhagem eritroide-megacariocítica, porém mantém o potencial mieloide e linfóide. O aumento na expressão de Flt3 leva à perda do potencial mieloide, tornando as células restritas à

linhagem linfóide (Adolfsson *et al.*, 2005; Mansson *et al.*, 2007). No entanto, há evidências de que o potencial mieloide pode ser mantido em linhagens de células B e T, mesmo depois que elas já se divergiram (Katsura, 2002; Prohaska *et al.*, 2002; Kawamoto, 2006).

O desenvolvimento dos linfócitos envolve a diferenciação dos progenitores linfóides primários (ELPs) em dois subtipos progenitores diferentes: (1) os progenitores primários de células T (ETP) no timo e (2) os progenitores linfóides comuns (CLP) na medula óssea. O mecanismo pelo qual os ETP e CLP vão se comprometer com as linhagens T e B é ainda pouco conhecido, porém já é sabido que o fator de transcrição PAX5 e o receptor NOTCH1 são reguladores importantes no comprometimento das linhagens B e T, respectivamente (Nutt *et al.*, 1999; Rolink *et al.*, 1999; Izon *et al.*, 2002). Os CLP são assim chamados porque podem dar origem tanto a células T como a células B e diferenciam-se de outros progenitores devido à sua elevada expressão de IL7R, o “principal alvo” desta pesquisa (Kondo *et al.*, 1997). Apesar do IL7R ter uma expressão restrita aos linfócitos, não significa que este receptor tenha a função de direcionar a diferenciação dos progenitores hematopoiéticos em células de linhagem linfóide.

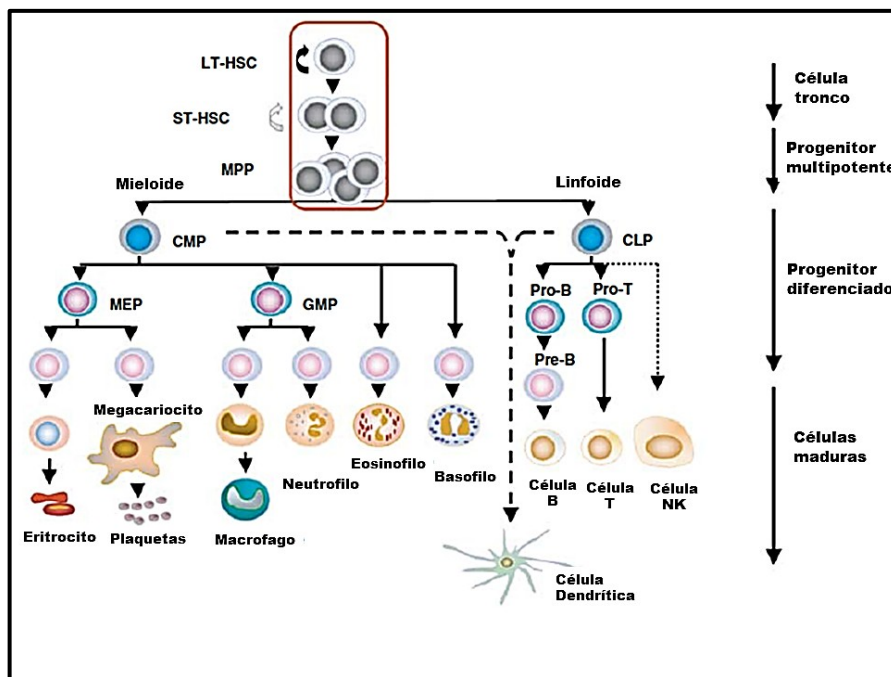


Figura 2: Hierarquia das células hematopoiéticas. No topo da figura está representado as células-tronco pluripotente com capacidade de auto-renovação. LT-HSC, *long-term repopulating*; ST-HSC, *short-term repopulating*; MPP, progenitor multipotente; CMP, progenitor mieloide comum; CLP, progenitor linfóide comum; MEP, progenitor megacariocito/eritroide; GMP, progenitor granulócito-macrofago. As 3 populações circuladas são negativas para marcadores de linhagem (Lin-) e positivas para Sca-1 e c-Kit. (adaptado de Larsson e Karlsson, 2005).

Todo o processo de diferenciação das HSCs é governado pelo padrão de expressão gênica de fatores de transcrição na célula e pela composição de sinais externos, como citocinas (IL-7 e Flt3) vindos do microambiente da medula óssea (Orkine Zon, 2002; Ahsberg *et al.*, 2010). O conjunto destes sinais é responsável pelo destino destas células tronco, ou seja, se devem permanecer quiescente, proliferar, entrar em apoptose, migrar para fora da medula óssea ou, ainda, pelo desenvolvimento de algum clone maligno capaz de crescer de forma descontrolada (Larsson e Karlsson, 2005).

1.2. Leucemia Linfóide Aguda pediátrica e principais alterações gênicas características

A leucemia é uma doença heterogênea, que se origina da proliferação descontrolada de células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea. Estas células são capazes de se multiplicarem indefinidamente por auto-renovação, levando à produção de precursores hematopoiéticos malignos e pouco diferenciados. A ocorrência de anomalias genéticas nestas células precursoras compromete todo o processo normal de maturação. Como consequência, há um acúmulo de células jovens (blastos) anormais na medula óssea prejudicando ou impedindo a produção de leucócitos, eritrócitos e plaquetas, o que leva à ocorrência de infecções, anemia e hemorragias constantes (Hoffbrand e Pettit, 1993). As leucemias podem ser classificadas quanto às células predominantemente envolvidas, em mieloide ou linfóide, e quanto ao tempo de sobrevida sem tratamento, em aguda ou crônica.

Leucemias linfóides agudas (LLA) são neoplasias agressivas caracterizadas pelo acúmulo de precursores linfóides (linfoblastos) não funcionais na medula óssea e/ou no sangue periférico. A LLA é o câncer mais comum na infância, correspondendo a cerca de um quarto de todos os distúrbios malignos nessa faixa etária e a 80% de todas as leucemias que ocorrem até os 15 anos de idade. Seu pico de incidência ocorre em crianças entre 2 e 5 anos (Sinnott *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2005; Margolin *et al.*, 1997).

LLA-T, um subtipo das LLAs, é uma malignidade dos tímócitos, ou seja, das células imaturas da linhagem T e representa de 10 a 15% dos casos de LLA infantil. Os 85% dos casos restantes são classificados como LLA-B derivada. É considerada uma doença biologicamente heterogênea com respeito ao fenótipo, perfil de expressão gênica e ativação de vias de sinalização intracelular. O paciente com LLA-T tende a apresentar-se ao diagnóstico com uma contagem muito alta de blastos circulantes, massa mediastinal e envolvimento do sistema nervoso central. O prognóstico das crianças

e adolescentes com LLA-T tem melhorado muito nos últimos anos, devido às terapias intensificadas, com uma taxa de 70% a 80% de sobrevida global em 5 anos. Porém 20 a 30% dos casos ainda recaem da doença e eventualmente vão a óbito (Pieters e Carroll, 2008; Pui e Evans, 2006). Daí a importância em se estudar a LLA-T.

É sabido que a LLA-T pode se originar a partir da expressão descontrolada de oncogênes ativados por translocações cromossômicas específicas, envolvendo genes receptores de células T (TCR) e fatores de transcrição (oncogênes), como TAL1; LMO2; TLX1; TLX3; MYB; NKX2-1 e MEF-2C (Homminga *et al.*, 2011; Ferrando *et al.*, 2002) bloqueando o desenvolvimento dos linfócitos T, bem como aumentando resistência à apoptose celular (Douet-Guilbert *et al.*, 2003; Pui *et al.*, 2008). Também se pode identificar, neste tipo de leucemia, translocações que não envolvem o gene TCR, tais como SIL-TAL, BCL11B-HOX11L2, MLL-ENL, NUP214-ABL1 e CALM-AF10 (Grabher *et al.*, 2006; Van Grotel *et al.*, 2008). Com base em dados de perfil de expressão gênica, estes oncogênes associam-se com 4 diferentes subgrupos de LLA-T: (1) TAL/LMO, (2) proliferativo, (3) TLX e (4) imaturo. No entanto, para 40% dos casos de LLA-T pediátrica, os rearranjos gênicos subjacentes ainda permanecem não identificados (Homminga *et al.*, 2011). Além das translocações cromossômicas, mutações pontuais, como deleção e/ou duplicação nos genes NOTCH1, FBXW7, PTEN, dentre outros, também parecem importantes para a patogênese da LLA-T.

No caso da LLA B-derivada, algumas anomalias cromossômicas, numéricas ou estruturais, que são identificadas ao diagnóstico, podem ser utilizadas na estratificação terapêutica, como a t(4;11) e t(9;22) (Pui e Evans, 2006; Piu *et al.*, 2004). Porém, no caso da LLA-T, anomalias como TLX3, TLX1, CALM-AF10, NUP214-ABL ou SIL-TAL, ou são encontradas em uma porcentagem muito pequena dos casos, ou são de significância clínica controversa (Ferrando *et al.*, 2004; Asnafi *et al.*, 2005; Baak *et al.*, 2008). Consequentemente, a classificação de pacientes com LLA-T em alto ou baixo risco baseia-se em características simples, como idade, e contagem de células brancas no sangue ao diagnóstico (Goldstone *et al.*, 2008).

Weng e colaboradores (2004) mostraram que mais de 50% dos casos de LLA-T apresentavam mutações ativadoras em Notch1. Notch1 é um receptor da família dos genes NOTCH e tem um papel central em muitos aspectos do desenvolvimento embrionário, controlando a geração de células tronco hematopoiéticas, podendo afetar a homeostase subsequente. O comprometimento com a linhagem de células T, bem como os estágios seguintes do desenvolvimento e montagem dos receptores de células T (TCR) em timócitos também são regulados por Notch1 (Sjölund *et al.*, 2005; Maillard *et al.*, 2005).

Estruturalmente, Notch1 é constituído por uma subunidade extracelular (NEC) e uma intracelular, ligadas não-covalentemente por um domínio de heterodimerização (HD). A sinalização de Notch1 é iniciada pela interação ligante-receptor entre duas células vizinhas, desencadeando sucessivas clivagens proteolíticas que irão liberar o domínio intracelular NICD, responsável pela regulação da expressão gênica no núcleo da célula (Bray, 2006). A maioria das mutações em Notch1, nas LLA-T, ocorre principalmente nas regiões PEST (éxon 34) e HD (éxon 26 e 27), e levam a ganho de função. O domínio PEST regula o *turnover* de NOTCH1 e quando deletado, aumenta a estabilidade da proteína truncada. Aproximadamente 45% de pacientes LLA-T apresentam mutações dentro do domínio HD, que induz sinalização independente de ligante. Notch1 se liga em um sítio conservado no promotor do gene IL-7R e regula a expressão de IL-7R α via o complexo CSL-MAML. Defeitos na sinalização de Notch1 prejudicam a expressão de IL-7R α e, conseqüentemente, o desenvolvimento dos tímócitos humanos (González-García *et al.*, 2009).

FBXW7, uma proteína oncosupressora, marca (ubiquitinação) para degradação os reguladores positivos (aceleradores) do ciclo celular, como CICLINA E, MYC, NOTCH1 e JUN. Mutações com perda de função do gene de *FBXW7* já foram encontradas em muitas malignidades, incluindo LLA-T (Song *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2007; O'Neil *et al.*, 2007; Malyukova *et al.*, 2007). Mutações em *NOTCH1* e/ou *FBXW7* levam à ativação da via de NOTCH1 e estão entre as mutações mais frequentes na LLA-T (Asnafi *et al.*, 2009). Estes mesmos autores analisaram 141 amostras de LLA-T em adultos e 62% apresentaram mutações em *NOTCH1*, 24% tinham *FBXW7* mutado e 28% eram selvagens para ambos os genes. Estes autores mostraram que a ativação da via de NOTCH1 por mutações, identifica um grande grupo de pacientes com um resultado favorável.

NOTCH1 também é um regulador negativo de PTEN, um supressor tumoral que, quando mutado, leva à ativação da via PI3K/AKT. Mutações em *NOTCH1* levam a um aumento no nível do transcrito *MYC* e diminuição da expressão do RNAm de *PTEN* (Silva *et al.*, 2010). O gene *PTEN* está envolvido com a manutenção das células tronco hematopoiéticas e prevenção da leucemogênese (Yilmaz *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). Resultados do nosso grupo mostram que aproximadamente 16% das LLA-T pediátricas apresentam mutações inativadoras em *PTEN*, e que pacientes com mutações em *PTEN* tem piores taxas de sobrevida (Jotta *et al.*, 2010).

1.3. Os linfócitos T e a interleucina 7 (IL-7)

Os linfócitos T são os principais efetores da imunidade celular adaptativa. Porém, diferentemente dos demais elementos do sangue, os precursores linfóides deixam a medula óssea e migram para o timo, onde se transformarão em células maduras e funcionais. O timo é um órgão situado na porção ântero-superior da cavidade torácica, logo acima do coração (Janeway *et al.*, 2005). É composto por vários lóbulos, cada um contendo uma capa cortical externa e uma região medular central, e contribui para a regulação da tolerância e prevenção da autoimunidade (Hakim e Gress, 2007).

O desenvolvimento das células T no timo prossegue por estágios bem definidos, baseados na expressão de marcadores moleculares na superfície celular. Os progenitores linfóides comuns (CLP) chegam ao timo em seu estágio inicial de maturação denominado duplo negativo (DN, CD4⁻CD8⁻) ou linhagem-negativo (Lin⁻). Sofrem expansão clonal no córtex tímico e começam a rearranjar os segmentos gênicos que codificam as cadeias α/β e γ/δ do TCR. Células com rearranjos bem sucedidos passarão a expressar TCR juntamente com CD3 (um complexo de proteínas co-ativadoras associadas ao TCR), CD4 e CD8. O estágio duplo-positivo (DP, CD4⁺CD8⁺) precede o processo de seleção positiva, no qual as células serão selecionadas em células T simples-positivas (SP) CD4⁺ ou CD8⁺ (Mazzucchelli e Durum, 2007). Os linfócitos T maduros deixam o timo e vão para os órgãos linfóides periféricos executar suas funções, como liberação de citocinas, destruição de células infectadas, e ainda coordenar a resposta imune (Janeway *et al.*, 2005).

A interleucina 7 (IL-7), uma glicoproteína de 25kDa, tem um papel essencial e não redundante (von Freuden-Jeffry *et al.*, 1995) no desenvolvimento normal das células T imaturas no timo e sobrevivência e proliferação homeostática dos linfócitos T *naive* e de memória nos órgãos linfóides periféricos (Khaled e Durum, 2002; Seddon *et al.*, 2003). Nos primeiros estágios da maturação, os segmentos gênicos V(D)J, que codificam os receptores de célula T (TCR) e Imunoglobulinas (Ig), são rearranjados através de um mecanismo linfóide-específico e dependente da sinalização por IL-7, a qual controla o acesso da recombinase V(D)J ao *locus* (Huang e Muegge, 2001). Durante a recombinação, segmentos gênicos que codificam parte dos receptores imunológicos são cortados, recombinados e remontados, resultando em uma grande diversidade de TCRs ou Ig. Na ausência da IL-7, o *locus* TCR γ é metilado e as histonas, hipoacetiladas. A IL-7 aumenta o estado de acetilação resultando em uma forma aberta da cromatina, o que facilita o acesso da maquinaria de transcrição e do heterodímero RAG1/RAG2 (*Recombination-activating gene*), responsável pela clivagem do DNA, ao *locus* (Schlissel *et al.*, 2000).

A IL-7 tem uma participação fundamental no processo de sobrevivência das células T, controlando, por exemplo, a expressão do gene que codifica a proteína anti-apoptótica Bcl-2. Esta proteína, localizada na membrana mitocondrial externa, impede a liberação de citocromo C, bloqueando o processo que leva à morte celular (Rich *et al.*, 1993). A progressão do ciclo celular dos linfócitos T também é mediada pela IL-7 (vonFreeden-Jeffry *et al.*, 1995; Barata *et al.*, 2004), a qual diminui a expressão de p27^{kip1}, um regulador negativo do ciclo celular que inibe a atividade de CDKs (quinases dependentes de ciclinas). A supressão temporária de p27^{kip1} coincide com o aumento significativo da atividade enzimática de CDK4 e CDK2, com a hiperfosforilação da proteína retinoblastoma (RB) (quando fosforilada torna-se inativa, liberando E2F, um fator de transcrição de genes da fase S) e progressão do ciclo celular para a fase S (Barata *et al.*, 2001).

Apesar de células LLA-T originarem-se da expansão clonal de progenitores hematopoiéticos, que passaram por transformações malignas durante diferentes estágios de diferenciação celular, elas ainda podem manter certas características de seus precursores linfóides normais e, inclusive, expressarem receptores funcionais para a interleucina 7 (Touw *et al.*, 1990).

1.4. Receptor da IL-7 (IL-7R)

O IL-7R α é expresso por células hematopoiéticas, especialmente da linhagem linfóide, o que inclui precursores de células dendríticas e *Natural Killer* (NK), precursores linfóides T e B comuns, células T e B em desenvolvimento, células T maduras e macrófagos derivados da medula óssea. Também já foi observada expressão de IL-7R α em células do epitélio intestinal humano normal, linfomas de células T cutâneos, células de câncer colo retal e câncer renal, bem como algumas outras linhagens celulares malignas de pulmão, mama, leucemia e melanoma. Células endoteliais e do estroma da medula óssea também expressam IL-7R α (Akashi *et al.*, 1998; Al Rawi *et al.*, 2004; Cosenza *et al.*, 2002; Di Santo *et al.*, 1995; Dus *et al.*, 2003; Hofmeister *et al.*, 1999; Iwata *et al.*, 2002).

A sinalização da IL-7 é iniciada pela sua ligação ao seu receptor heterodimérico (IL-7R) presente na superfície dos linfócitos T, que consiste de duas cadeias glicosiladas ancoradas na membrana por um único domínio transmembrana helicoidal: IL-7R α (Goodwin *et al.*, 1989) e γ c (cadeia gamma comum; Noguchi *et al.*, 1993; Kondo *et al.*, 1994). Lai e colaboradores (1997) provaram a real necessidade da cadeia gamma na função da IL-7 através de um receptor quimérico. Estes autores

observaram que apenas uma parte do domínio intracelular de γ_c é necessária para transdução de sinal do IL-7R e que a substituição do domínio intracelular por uma parte do receptor de eritropoietina não afetou a sinalização por IL-7. Estes dados apoiam o modelo no qual a cadeia γ serve primariamente para ativar a transdução de sinal do complexo IL-7R, enquanto que a cadeia alfa determina os eventos de sinalização específicos.

A cadeia γ comum, conhecida como γ_c ou IL-2R γ ou CD132 (56 kDa, 369 aminoácidos), é compartilhada pelos receptores de IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21 e liga JAK3 (Jiang *et al.*, 2005a). A cadeia α (IL-7R α), também conhecida como CD127 (65 kDa, 459 aminoácidos) é compartilhada pelo receptor da linfopoetina do estroma tímico (TSLPR) (Pandey *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000) e o gene IL-7R α está localizado no cromossomo 5 em humanos, com 8 éxons e 7 íntrons e um tamanho de 19,79 Kb (Lynch *et al.*, 1992).

O IL-7R α pertence à família de receptores de citocinas do tipo I e estruturalmente é caracterizado por um domínio extracelular de 219 aminoácidos, compreendendo dois domínios tipo fibronectina, quatro resíduos de cisteína conservados e um motivo WSxWS próximo ao único domínio transmembrana de 25 aminoácidos. Ainda tem um domínio intracelular, de 195 aminoácidos, que não apresenta uma atividade tirosina quinase intrínseca, mas contém potenciais sítios de ancoragem para proteínas da família JAK/STAT que desencadeiam a sinalização da IL-7. Um segmento próximo da membrana contém uma curta sequência rica em prolina denominada Box1, que é altamente conservada na família dos receptores de citocinas e essencial para transmissão dos sinais proliferativos da IL-7. Esse domínio intracitoplasmático contém três regiões parcialmente caracterizadas: uma região A, rica em resíduos ácidos, uma região S, rica em resíduos de serina e uma região T que contém três resíduos de tirosina (Y401, Y449 e Y456) altamente conservados entre humanos e camundongos (Jiang *et al.*, 2005a). A tirosina 449 quando fosforilada por JAK1, forma um sítio de ancoragem para STAT1, STAT3 e principalmente STAT5a e STAT5b (Palmer *et al.*, 2008). A quinase JAK1 está constitutivamente ligada à cadeia alfa através da região Box1, fazendo parte da via JAK/STAT (Jiang *et al.*, 2005a). A figura 3 mostra uma representação do IL-7R α na superfície da célula.

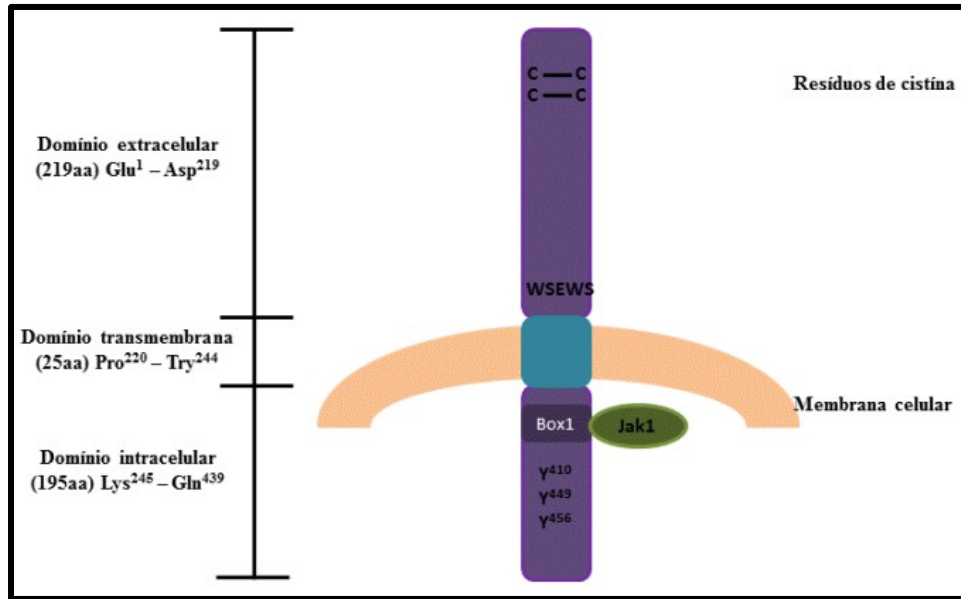


Figura 3: Representação da cadeia alfa do receptor da interleucina 7 (IL-7R α), com destaque para as principais porções do domínio intracelular. A quinase JAK1 mantém-se constantemente ligada à Box1 e, quando ativada, fosforila a tirosina 449 (Y⁴⁴⁹), criando um sítio de ancoragem para STAT5.

Anteriormente acreditava-se que apenas na presença de IL-7 é que ocorria a heterodimerização da cadeia IL-7R α com γ c. Porém, Rose e colaboradores (2010) mostraram pela primeira vez que IL-7R α e γ c formam heterodímeros espontaneamente na superfície de células CD4⁺ mesmo na ausência de IL-7. A cadeia α está presente em altas concentrações em células T CD4⁺ em repouso, enquanto que a cadeia γ está presente em baixas concentrações, restringindo a formação dos heterodímeros. Os autores também confirmaram que a cadeia α pode formar homodímeros, fato já sugerido anteriormente (Rose *et al.*, 2009; Leonard *et al.*, 1999). No entanto a afinidade de IL-7R α é 17 vezes maior por γ c do que por ela mesma, favorecendo a formação de heterodímeros. Tanto homodímeros como heterodímeros podem coexistir na superfície de células em repouso (Rose *et al.*, 2010).

Embora o mecanismo de ação molecular pelo qual as citocinas promovem a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular seja pouco conhecido, sabe-se que os eventos iniciais desencadeados pela ligação da IL-7 ao seu receptor incluem a mútua fosforilação de JAK1 (ancorada no IL7R α) e JAK3 (ancorada no γ c), seguida da fosforilação da tirosina 449 no IL-7R α , que permite ancoragem de STAT (principalmente STAT5). A STAT5 é então fosforilada por JAK e se desprende do receptor dimerizando (Groner *et al.*, 2000) e migrando para o núcleo, onde atua na regulação da transcrição de uma série de genes importantes para o metabolismo, proliferação e sobrevivência celular (Leonard *et al.*, 1999). Além da ativação da via STAT, ocorre ativação da fosfatidilinositol 3-

kinase (PI3K) e *turnover* do fosfolípido inositol (Dibirdiket *al*, 1991; Ihlee Kerr, 1995). A figura 4 ilustra de forma didática e resumida, as principais vias de sinalização desencadeadas pelo complexo IL-7/IL-7R.

Com a ligação da IL-7 ao seu receptor IL-7R α/γ c pré-formado, a interação entre as cadeias alfa e gama é estabilizada e ambas as cadeias são direcionadas em *lipidrafts*, onde as proteínas de sinalização JAK1, JAK3, STAT1, -3 e -5 associadas são encontradas para serem fosforiladas. Enquanto isso, o complexo IL-7/IL-7R interage com o citoesqueleto, através de proteínas FERM, que interrompem sua difusão lateral na membrana (Rose *et al.*, 2010).

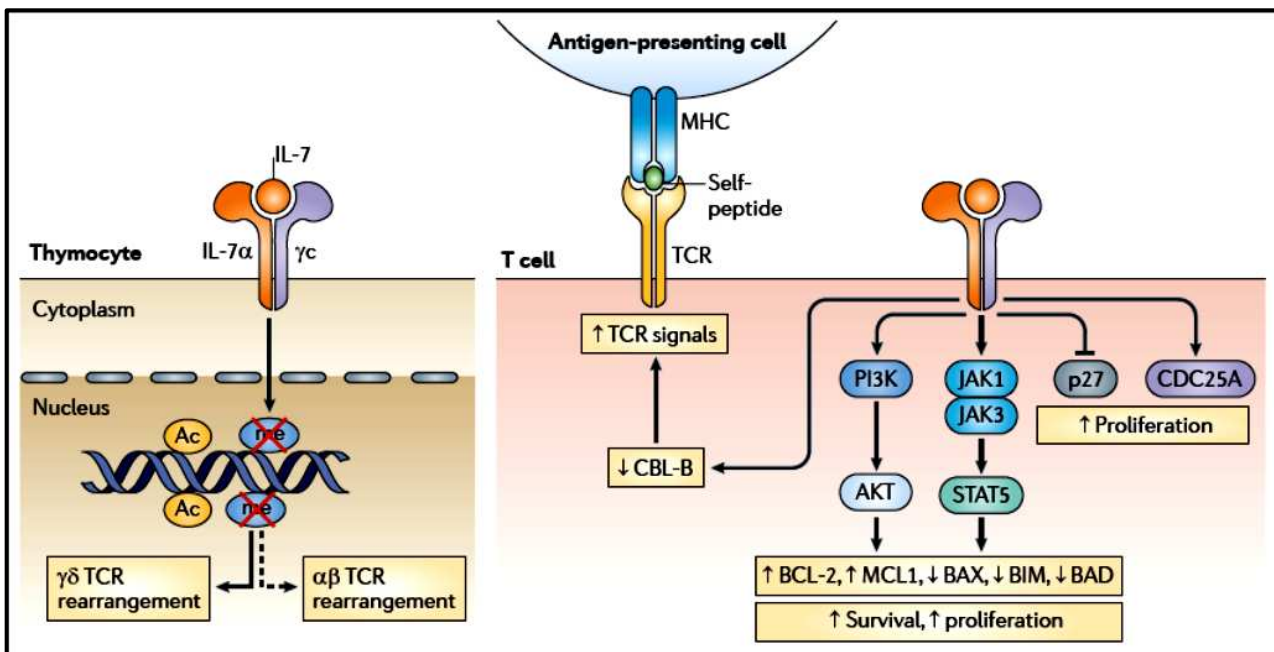


Figura 4: Vias de sinalização desencadeadas pelo IL-7R. Durante o desenvolvimento das células T no timo, a sinalização desencadeada pela IL-7 participa do rearranjo gênico do TCR através da demetilação do DNA e acetilação da histona (esquerda). Em todas as células T, a sinalização mediada por IL-7 é iniciada através de JAK1, JAK3 e PI3K, resultando na fosforilação de fatores de transcrição, como STAT5. Isto resulta em mudanças na expressão de membros da família BCL-2, tais como aumento na expressão de Bcl-2 e MCL-1 e diminuição na expressão de Bax, Bim e Bad, proteínas pró-apoptóticas. A sinalização iniciada por IL-7 também leva à diminuição nos níveis de p27^{Kip} (supressor tumoral), aumento nos níveis de CDC25A e mudanças na expressão dos moduladores de TCR como CBL-B. O resultado das vias de sinalização disparadas por IL-7 é aumento na sobrevivência celular, na proliferação, nos sinais de TCR e, para as células T recém-emigradas do timo, proliferação independente de TCR. (Adaptado de Mackall *et al.*, 2011).

Entre os reguladores negativos da via JAK/STAT, merecem destaque os genes SOCS. SOCS1 inibe fosforilação de STAT5 ligando-se diretamente em proteínas JAKs, impedindo os eventos de

sinalização subsequentes à ativação de STAT5 (Yasukawa *et al.*, 2000). Miz-1 é um fator de transcrição envolvido na diferenciação das células T primárias e sua expressão coincide com os estágios de maturação dependentes de IL-7. Miz-1 regula a expressão de SOCS1 (supressor de sinalização de citocinas) e, portanto, controla a ativação de STAT5 em resposta à IL-7, a fim de alcançar o nível de expressão de Bcl2 necessário para sobrevivência e desenvolvimento das células ETP/ DN1 e DN2 (Saba *et al.*, 2011).

1.5. *Splicing* alternativo, polimorfismo e mutações no IL-7R α

Na família das citocinas e dos receptores de citocinas é comum encontrar diferentes isoformas das proteínas, geradas através de *splicing* alternativo do pré-RNA mensageiro. As isoformas dos receptores de citocinas são, geralmente, receptores solúveis ou receptores que apresentam alterações em seus domínios citoplasmáticos. Desconfia-se que a expressão de receptores “anormais” possa contribuir para a leucemia, pois seriam capazes de burlar os mecanismos de controle retroativo, normalmente desencadeados pelos fatores de crescimento, ou alterar o balanço entre estímulo à proliferação e à diferenciação celular (Hodges e Bernstein, 1994; Atamas, 1997).

O gene que codifica o IL-7R α sofre *splicing* alternativo e sua transcrição produz 3 espécies de mRNA, que codificam 2 isoformas solúveis (isoforma 4 ou H6, e isoforma 2) e uma isoforma ligada à membrana, porém sem parte do domínio intracelular (isoforma 3 ou H6). A figura 5 representa o alinhamento das sequências de aminoácidos das diferentes isoformas. A isoforma secretada H6 tem a mesma capacidade de ligar IL-7 mesmo em solução (Goodwin *et al.*, 1990) e acredita-se que ela pode modificar a concentração do ligante (IL-7) por competição e, portanto, diminuir a resposta celular mediada pelo receptor ligado à membrana, podendo ser importante regulador da resposta imunológica e inflamatória (Heaney e Golde, 1996; Peters *et al.*, 1998; Rose *et al.*, 2009).

Além do *splicing* alternativo que ocorre no gene do IL-7R α , foram encontrados diversos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), que estão associados à esclerose múltipla (Gregory *et al.*, 2007; Lundmark *et al.*, 2007; Teutsch *et al.*, 2003), diabetes tipo 1 (Todd *et al.*, 2007) e sobrevivência após transplante de medula óssea em pacientes com leucemia (Shamim *et al.*, 2006). Mutações do IL-7R podem ocasionar a imunodeficiência combinada severa (SCID) do tipo T(-)B(+)NK(+) (Puel e Leonard, 2000; Karawajew *et al.*, 2000; Giliani *et al.*, 2005), caracterizada pela completa ausência de linfócitos T e presença de células B e NK. Estas mutações estão envolvidas, aparentemente, na inativação do IL-7R e, conseqüentemente, no desenvolvimento anormal das células T, levando à linfopenia dos linfócitos T periféricos, que é a causa para a imunodeficiência. Os dados acima apontam, mais uma vez, para a importância do IL-7R no desenvolvimento das células T.

1.6. Papel do IL-7/IL-7R na LLA-T

Barata e colaboradores (2004) mostraram que a via PI3K/AKT ativada por IL-7 é obrigatória para o aumento da expressão de BCL2, supressão de p27^{KIP}, hiperfosforilação de RB e, conseqüentemente, aumento da viabilidade e progressão do ciclo celular na LLA-T e nos linfócitos T normais. Outros estudos também mostraram que a ativação de Akt mediada por STAT5 regula a expressão de Glut1, um receptor envolvido na absorção de nutrientes e aumento da atividade metabólica (Wofford *et al.*, 2008; Rathmell *et al.*, 2000). TCR e IL-7R estão entre os estímulos externos que induzem a expressão de GLUT1 na superfície de células T maduras. Dessa forma, a IL-7 promove sobrevivência celular não apenas aumentando a expressão de BCL2, mas também proporcionando condições de geração de energia metabólica, necessária para iniciar a progressão do ciclo celular que, eventualmente, levará à proliferação e expansão celular (Barata *et al.*, 2004). Interessantemente, a IL-7 impede a apoptose espontânea na LLA-T, da mesma maneira que o faz nos linfócitos T normais (Karawajew *et al.*, 2000), além de estimular a formação de colônias de blastos em cultura em meio semi-sólido e estimular a síntese de DNA (replicação) (Touw *et al.*, 1990; Makrynika *et al.*, 1991). Barata e colaboradores (2001) mostraram que cultura com IL-7, células LLA-T não apenas escaparam da apoptose, mas também progrediram para a fase S+G2/M do ciclo celular. Camundongos deficientes para IL-7R são linfopênicos devido a um bloqueio nos primeiros estágios da diferenciação celular (Peschon *et al.*, 1994). Por outro lado, Rich e colaboradores (1993) demonstraram que camundongos transgênicos para IL-7 desenvolveram malignidades leucêmicas. É

sabido que o nível de expressão do IL-7R α na superfície dos linfócitos T normais é fortemente regulado, aumentando e diminuindo durante os vários estágios do desenvolvimento linfóide (Jiang *et al.*, 2005a). No entanto, Silva e colaboradores (2011) mostraram que amostras de pacientes LLA-T proliferam em resposta a IL-7 independentemente do estágio de diferenciação em que foram bloqueadas.

Diante destes achados e considerando que os principais locais produtores de IL-7, o estroma da medula óssea e do timo, (Goodwin *et al.*, 1989) coincidem com o microambiente onde as células leucêmicas se desenvolvem, esta citocina pode ser considerada um fator leucemogênico (Hofmeister *et al.*, 1999).

1.7. Hipótese do Trabalho

Neste trabalho, nós nos perguntamos se, ao contrário das mutações que levam à perda de função do IL-7R, não haveria também mutações capazes de levar a um ganho de função, hiperativando ou ocasionando a ativação constitutiva do IL-7R e, dessa forma, contribuindo para o surgimento ou progressão da LLA-T. Veja-se, por exemplo, o caso das JAKs. As proteínas JAKs (Figura 6) possuem um domínio pseudoquinase JH2 que não tem atividade catalítica, mas que regula a atividade do domínio quinase JH1. Mutações dentro do domínio JH2, artificiais ou encontradas em pacientes, podem anular a atividade quinase do domínio JH1 (Chen *et al.*, 2000; Saharinen *et al.*, 2000). Por outro lado, como primeiramente mostrado em *Drosophila*, mutações na região JH2 também são capazes de levar à ativação constitutiva da quinase *hop* (JAK de *Drosophila*) (Hanratty e Dearolf, 1993; Johansen *et al.*, 2003). Da mesma forma, mutações no domínio JH2 de JAK3 levam à ativação constitutiva dessa quinase (Choi *et al.*, 2007). Mutações introduzidas experimentalmente no domínio JH2 de JAK2 levam ao aumento da atividade basal e anulam a ativação dependente de ligante (Saharinen *et al.*, 2000, Saharinen e Silvennoinen, 2002). Há ainda a ocorrência de mutações pontuais na JAK2, que levam à sua ativação constitutiva, promovem transição da fase G1/S do ciclo celular e contribuem para o desencadeamento de doenças leucoproliferativas (Walz *et al.*, 2006).

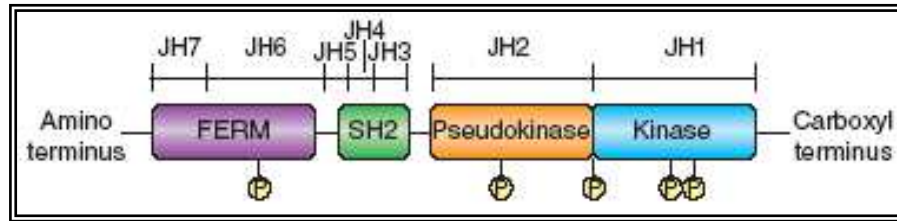


Figura 6. Representação esquemática da estrutura primária de Janus quinase (JAK), segundo Yamaoka e colaboradores (2004). Os domínios FERM e pseudoquinase regulam a atividade catalítica e parecem interagir com o domínio quinase.

A ocorrência de mutações hiperativadoras das vias de transdução de sinal não é algo exclusivo das JAKs. Um dos genes do herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), que codifica um receptor associado à proteína G, similar ao receptor CXCR2 da IL-8, apresenta-se constitutivamente ativado por causa de um polimorfismo em um único aminoácido (Arvanitakis *et al*, 1997). Outro exemplo pode ser encontrado no receptor de tirosina quinase, FLT3, que regula o início da proliferação, sobrevivência e diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas.

Considerando as características proliferativas do IL-7R α , como ativação de oncogênes (MCL1, Ciclina E, MYC, NOTCH, JUN), inibição de supressores tumorais (RB, p27, etc.), inibição da apoptose, indução da progressão do ciclo celular, bem como a ocorrência de mutações ativadoras em várias das proteínas da via IL7R/JAK/STAT, como já mencionado, o objetivo principal desta tese foi procurar por mutações em IL-7R α , JAK1 e JAK3 nos blastos leucêmicos de crianças com LLA-T, que poderiam de alguma forma contribuir para a progressão e/ou surgimento da leucemia.

Após o início do trabalho, surgiram evidências em favor do envolvimento de mutações ativadoras da via IL7R/JAK na LLA. Flex e colaboradores (2008) encontraram mutações somáticas (exclusivas dos blastos leucêmicos) em JAK1 em 18% de pacientes adultos e 2% em pacientes pediátricos com LLA-T, e em 3% de pacientes adultos com LLA-B derivada. Dentre as mutações encontradas, 3 promoviam ganho de função a JAK1 e tiveram um efeito transformante na linhagem celular Ba/F3, tornando-a independente de IL-3, além de conferirem resistência à apoptose induzida por dexametazona à linhagem celular BW5147, que é um linfoma de célula T. Esta foi a primeira evidência mostrando que defeitos em JAK1 estão associados com pior resposta à terapia, frequente recaída da doença e sobrevida reduzida, identificando estas mutações como um novo marcador prognóstico informativo ocorrendo em indivíduos adultos com LLA-T. Crianças com Síndrome de Down e LLA apresentaram mutações ativadoras em JAK2 e em CRLF2 (receptor de TSLP que, assim

como a γ_c , forma heterodímeros com o IL-7R α) que conferiram independência a fator de crescimento na linhagem celular Ba/F3, células pró-B de camundongo, dependentes de IL-3 (Hertzberg *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

- a. Buscar mutações na região codificadora do gene IL-7R α e em parte do gene das quinases JAK1 (domínio quinase - JH2) e JAK3 (domínios quinase - JH2, e pseudoquinase - JH1) em amostras de LLA-T pediátrica;
- b. Análise das consequências funcionais da(s) eventual(ais) mutação(ões) nas respectivas células leucêmicas e em linhagens celulares transfectadas, quando estimuladas ou não com IL-7:
 - i. Estudo da fosforilação de alvos *downstream* ao receptor, como AKT e STAT5,
 - ii. Estudo da viabilidade/proliferação e crescimento *in vitro* de células primárias LLA-T portadoras da proteína mutada,
 - iii. Estudo *in vivo* e *in vitro* de progenitores hematopoiéticos ou linfócitos T transduzidos com o receptor mutado e transplante em animais imunossuprimidos para verificar o potencial leucemogênico da(s) eventual(is) mutação (ões).

3. MANUSCRITO

**Oncogenic *IL7R* gain-of-function mutations in childhood T-cell acute
lymphoblastic leukemia**

**Priscila P. Zenatti, Daniel Ribeiro, Wenqing Li, Linda Zuurbier, Milene C. Silva,
Maddalena Paganin, Julia Tritapoe, Julie A. Hixon, André B. Silveira, Bruno A. Cardoso,
Leonor M. Sarmiento, Nádia Correia, Maria L. Toribio, Jörg Kobarg, Martin Horstmann,
Rob Pieters, Silvia R. Brandalise, Adolfo A. Ferrando, Jules P. Meijerink, Scott K. Durum,
J. Andrés Yunes, João T. Barata**

Oncogenic *IL7R* gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia

Priscila P Zenatti^{1,13}, Daniel Ribeiro^{2,13}, Wenqing Li^{3,13}, Linda Zuurbier⁴, Milene C Silva², Maddalena Paganin⁵, Julia Tritapoe³, Julie A Hixon³, André B Silveira¹, Bruno A Cardoso², Leonor M Sarmento², Nádia Correia², Maria L Toribio⁶, Jörg Kobarg⁷, Martin Horstmann^{8,9}, Rob Pieters⁴, Silvia R Brandalise^{1,10}, Adolfo A Ferrando^{5,11}, Jules P Meijerink⁴, Scott K Durum³, J Andrés Yunes^{1,12,14} & João T Barata^{2,14}

Interleukin 7 (IL-7) and its receptor, formed by IL-7R α (encoded by *IL7R*) and γ_c , are essential for normal T-cell development and homeostasis. Here we show that *IL7R* is an oncogene mutated in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). We find that 9% of individuals with T-ALL have somatic gain-of-function *IL7R* exon 6 mutations. In most cases, these *IL7R* mutations introduce an unpaired cysteine in the extracellular juxtamembrane-transmembrane region and promote *de novo* formation of intermolecular disulfide bonds between mutant IL-7R α subunits, thereby driving constitutive signaling via JAK1 and independently of IL-7, γ_c or JAK3. *IL7R* mutations induce a gene expression profile partially resembling that provoked by IL-7 and are enriched in the T-ALL subgroup comprising *TLX3* rearranged and *HOXA* deregulated cases. Notably, *IL7R* mutations promote cell transformation and tumor formation. Overall, our findings indicate that *IL7R* mutational activation is involved in human T-cell leukemogenesis, paving the way for therapeutic targeting of IL-7R-mediated signaling in T-ALL.

Signaling mediated by IL-7 and IL-7R is essential for normal T-cell development and homeostasis^{1,2}. Mice with IL-7 or IL-7R deficiency show an early block in thymocyte development and reduced numbers of non-functional peripheral T cells^{3,4}. In humans, *IL7R*-inactivating mutations result in severe combined immunodeficiency^{5,6}, whereas *IL7R* polymorphisms have been shown to confer susceptibility to multiple sclerosis^{7,8}. There is also evidence that IL-7 and IL-7R may contribute to T-cell leukemia progression. For example, IL-7 transgenic mice develop lymphomas^{9,10}, and AKR/J mice, which develop spontaneous thymic lymphomas, have high IL-7R levels¹¹. In addition, T-ALL cells respond to IL-7 *in vitro* in a majority of cases^{12–14}. Notably, IL-7R α is transcriptionally upregulated by NOTCH1 (ref. 15), one of the most commonly mutated genes in T-ALL¹⁶, and appears to be involved in Notch-mediated leukemia cell maintenance¹⁵. The possibility that IL-7R-mediated signaling may play a role in T-cell leukemia is further supported by the observation that 18% of adult and 2% of pediatric T-ALL cases have activating mutations in *JAK1*, which encodes a tyrosine kinase that directly binds IL-7R α ¹⁷, among other receptors. Here we provide direct evidence that IL-7R-mediated signaling plays an active role in the T-cell leukemogenesis process in humans.

RESULTS

Somatic *IL7R* mutations in diagnostic pediatric T-ALL samples

Based on the evidence that IL-7- and IL-7R-mediated signaling contribute to T-cell leukemia survival and proliferation *in vitro* and *in vivo* and given the existence of *JAK1* activating mutations in some T-ALL cases, we hypothesized that gain-of-function mutations in *IL7R* could be present in some T-ALL cases. Analysis of the complete coding sequence of *IL7R* in 68 pediatric diagnostic T-ALL samples treated in Centro Infantil Boldrini, Campinas, Brazil showed that five (7%) of the cases had heterozygous mutations in *IL7R* that exclusively affected exon 6. All cases with these mutations had in-frame insertions or deletions-insertions (Table 1, Fig. 1a and Supplementary Fig. 1) in the juxtamembrane-transmembrane domain at the interface with the extracellular region (Fig. 1a and Supplementary Fig. 2). The mutations were somatic, as they were detected at diagnosis but not in samples from the same individuals in remission ($n = 5$) (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1). Subsequent analysis of *IL7R* exon 6 in the Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) and the Cooperative Study Group for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (COALL) case series confirmed these results and showed the presence of heterozygous mutations in 12 out of 133 cases,

¹Laboratório de Biologia Molecular, Centro Infantil Boldrini, Campinas, São Paulo, Brazil. ²Cancer Biology Unit, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal. ³Immunological Cytokine Group, Laboratory of Molecular Immunoregulation, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Frederick, Maryland, USA. ⁴Department of Pediatric Oncology/Hematology, Erasmus Medical Center (MC) Sophia Children's Hospital, Rotterdam, The Netherlands. ⁵Institute for Cancer Genetics, Columbia University Medical Center, New York, New York, USA. ⁶Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain. ⁷Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brazil. ⁸German Cooperative Study Group for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (COALL), Hamburg, Germany. ⁹The Research Institute Children's Cancer Center Hamburg, Clinic of Pediatric Hematology and Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ¹⁰Serviço de Hematologia/Oncologia Pediátrica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. ¹¹Department of Pathology, Columbia University Medical Center, New York, New York, USA. ¹²Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. ¹³These authors contributed equally to this work. ¹⁴These authors jointly directed this work. Correspondence should be addressed to J.T.B. (joao_barata@fm.ul.pt).

Received 11 April; accepted 5 August; published online 4 September 2011; doi:10.1038/ng.924

Table 1 Mutational and immunophenotypical characteristics of T-ALL cases with mutated *IL7R*

Subject	Cohort	<i>IL7R</i> mutation ^a	<i>IL-7Rα</i> predicted amino acid alterations ^a	<i>NOTCH1</i> and <i>FBXW7</i> mutational status	<i>PTEN</i> mutational status	Oncogenetic group	EGIL maturation stage	CD3, CD4 or CD8 stage
P1	Boldrini	c.726_727insAACCCATGC	p.Leu242_Leu243insAsn ProCys	Wild type ^b	Wild type	Unknown	Cortical	TP
P2	Boldrini	c.731_732insTTGTCCCAC	p.Thr244_Ile245 insCysProThr	Unknown	Wild type	Unknown	Pre-T	DP
P3	Boldrini	c.722_730delTCTTACTAA insGCGCAAAGTGTGGGG	p.Ile241_Thr244delins SerAlaAsnCysGlyAla	HD ^b	Wild type	Unknown	Cortical	TP
P4	Boldrini	c.728_729insGGTATCTT GTCC	p.Leu243_Thr244insVal SerCysPro	Wild type ^b	Wild type	Unknown	Cortical	TP
P5	Boldrini	c.731C>T; 741delTinsCC AATGG	p.Thr244I; Ile247_Leu248 insGlnTrp	Wild type ^b	Exon 7 mutation	Unknown	Pre-T	ISP4
P6	DCOG	c.717_727delTCCTATCTTAC insCCAGTCCCCTCCTGCT	p.Pro240_Leu242 delinsGlnSerProSerCys	HD	Wild type	Unknown	Pre-T	ISP4
P7	DCOG	c.721_722delATinsTG; 726_727insGAAGGC	p.Ile241Cys; Leu242_Leu243insGluGly	HD/PEST	Wild type	<i>TLX3</i>	n.d.	DN
P8	DCOG	c.755_761del CTGTCCGinsGGAA	p.Ser252_254delinsTrpAsn	Wild type	Wild type	<i>HOXA/MLL</i>	Pre-T	DP
P9	COALL	c.719_731delCTATCTTACTA ACinsGGTTTTGTCCCA	p.Pro240_Thr244delins ArgPheCysProHis	HD	Wild type	<i>TLX3</i>	Pre-T	ISP4
P10	COALL	c.719_736delCTATCTTACT AACATCAinsTTAAGT	p.Pro240_Ser246delins LeuLysCys	Wild type	Wild type	<i>TLX3</i>	Pre-T	DN
P11	COALL	c.726_730delACTAAinsTCA CCCTTTTAACTGTGGAC	p.Leu242_Thr244delins PheHisProPheAsnCysGlyPro	HD	Wild type	<i>TLX3</i>	Mature	ISP4
P12	COALL	c.730_731insTGTGCCCAA	p.Leu243_The244isn MetCysPro	JM	Wild type	<i>HOXA</i>	Mature	DP
P13	COALL	c.757_758insGCCCATCCC	p.Val253delinsGlyPro SerLeu	PEST	Wild type	<i>HOXA</i>	Pre-T	DN
P14	COALL	c.727_728insGACTTGA GTGCG	p.Leu243delinsArgLeu GluCysVal	PEST	Wild type	<i>HOXA/inv-7</i>	Mature	DP
P15	COALL	c.724_736delTTACTAACC ATCAinsCCCCAGGGCGGGT	p.Leu242_Ser246delins ProGlnGlyGlyCys	HD/FBXW7	Wild type	<i>HOXA/SET-NUP214</i>	Mature	DP
P16	COALL	c.719_736delCTATCTTACT AACATCAinsTCCAATCAT	p.Pro240_Ser246delins LeuGlnSerCys	Wild type	Wild type	<i>TAL1/LMO2</i> -like	Cortical	DP
P17	COALL	c.726_729delACTA insTCCCCATCAGCATTGT	p.Leu242_Leu243delins PheProHisGlnHisCys	FBXW7	Wild type	Unknown	Mature	ISP4

^aAll mutations were heterozygous. ^b*FBXW7* mutational status not analyzed. n.d., not determined or inconclusive; HD, Notch heterodimerization domain; JM, Notch juxtamembrane region; PEST, Notch Pro-Glu-Ser-Thr-rich domain; pre-T, pre-T-ALL; TP, triple positive; DP, double positive; ISP4, immature CD4 single positive; DN, double negative.

with the majority of mutations targeting the same hotspot (Table 1 and Fig. 1a). In total, 17 of 201 (9%) T-ALL samples from three independent cohorts had *IL7R* exon 6 mutations (Fig. 1c). This frequency was independently confirmed by a parallel study describing *IL7R* mutations in 10.5% of T-ALL cases¹⁸.

Biological and clinical features associated with *IL7R* mutations
To identify possible transcriptional patterns associated with *IL7R* mutations in T-ALL, we analyzed microarray data from 8 *IL7R* mutated and 109 non-mutated diagnostic case samples. We tested differential gene expression by regression analysis using the LIMMA package

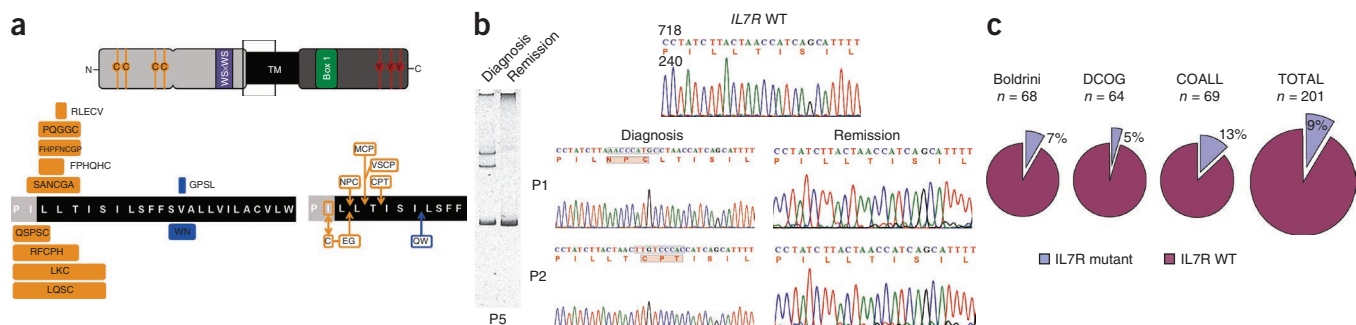
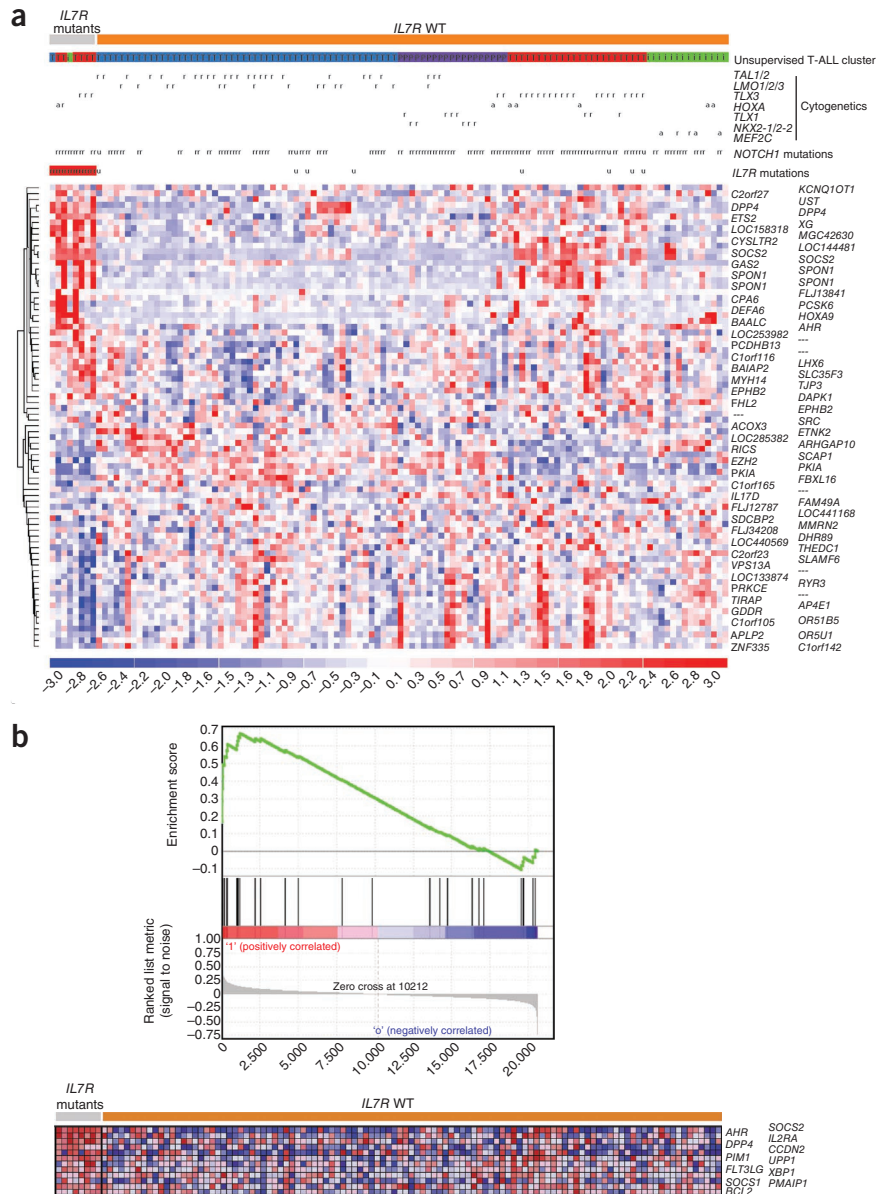


Figure 1 *IL7R* exon 6 somatic mutations in pediatric T-ALL. (a) Scheme of *IL-7R α* protein (top) and predicted amino acid alterations (bottom). Indicated are the two extracellular fibronectin type III-like domains containing four paired cysteines and a WS \times WS motif, the transmembrane domain and the cytoplasmic tail with the Box 1 motif and the tyrosine residues involved in signal transduction. The region where the mutations occur is denoted by an empty box. Amino acid changes involving *de novo* introduction of a cysteine are indicated in orange; filled boxes denote deletions-insertions and are aligned with the respective deleted amino acid sequence; arrows point to where simple insertions occur. (b) Representative homoduplex and heteroduplex analysis of PCR products (left) and sequencing chromatograms (right) of paired diagnosis and remission samples indicating the somatic, tumor-associated origin of exon 6 mutations. (c) Frequency of T-ALL mutations in the three different case cohorts analyzed.

Figure 2 Molecular signatures associated with *IL7R* mutations in T-ALL. (a) Heat-map diagram of the 80 top ranking differentially expressed genes (Supplementary Table 1) in *IL7R* mutant ($n = 8$) compared to wild-type ($n = 109$) T-ALLs as determined by empirical Bayes linear models (LIMMA package; cutoff false discovery rate $P = 0.05$). Genes are shown in rows; each individual sample is shown in one column. The scale bar shows color-coded differential expression from the mean in s.d. units, with red indicating higher expression and blue indicating lower expression. Unsupervised gene expression T-ALL clusters were defined as previously described²⁰ and are indicated as: T (blue), TAL/LMO; T (red), TLX; i (green), immature; and P (violet), proliferative. Cytogenetic defects are denoted as: r, rearranged or mutated; a, aberrant expression; and u, unavailable data. (b) Gene set enrichment analysis (GSEA) plot (top) showing that genes overexpressed in human normal lymphocytes following IL-7 exposure¹⁹ were significantly enriched in *IL7R* mutant T-ALL cases (enrichment score = 0.67, $P = 0.045$). Heat-map diagram (bottom) of the 12 top-ranking genes in the leading edge.



(see URLs). *IL7R* mutations were associated with upregulation of 39 and downregulation of 41 probe sets (false discovery rate $P < 0.05$) (Fig. 2a and Supplementary Table 1). Notably, gene set enrichment analysis (GSEA) of these T-ALL samples showed significant enrichment of a set of genes activated upon IL-7 stimulation in normal lymphocytes (enrichment score = 0.67, $P = 0.045$)¹⁹. These genes include *SOCS1*, *SOCS2*, *PIM1*, *BCL2*, *DPP4* (*CD26*) and *CCND2* (Fig. 2b), all of which have been reported as transcriptional targets of the JAK-STAT pathway.

Individuals with T-ALL are categorized into several oncogenetic subgroups that are characterized by rearrangements and aberrant expression of transcription factors such as *TAL1* and *LMO1* or *LMO2*, *TLX1* (*HOX11*), *TLX3* (*HOX11L2*), *HOXA*, *NKX2-1* or *MEF2C* (ref. 20). We found *IL7R* mutations predominantly in cases belonging to the *HOXA* subgroup (Table 2). Recently, we identified unsupervised T-ALL gene expression clusters that closely recapitulate oncogenetic T-ALL subgroups, namely the TAL/LMO subgroup (enriched for *TAL1* or *TAL2* and/or *LMO1*, *LMO2* or *LMO3* rearranged cases), the proliferative subgroup (enriched for *TLX1*, or *NKX2-1* or *NKX2-2* rearranged cases), the TLX subgroup (enriched for *TLX3* rearranged and *HOXA* deregulated cases) and the immature/ETP-ALL cases (enriched for *MEF2C* deregulated cases)²⁰. Our current analyses showed that *IL7R* mutations were especially associated with the TLX subgroup (Fig. 2a and Table 2), which is in agreement with the fact that this unsupervised gene expression T-ALL subset is enriched in *HOXA* deregulated cases.

As some oncogenic rearrangements in T-ALL are associated with specific immunophenotypic development stages^{21,22}, we evaluated whether *IL7R* mutations predominated in particular immunophenotypes. *IL7R* gene alterations did not associate with any specific T-ALL maturation stage based on European Group for the Classification of

Acute Leukemia (EGIL) criteria²³. Although *IL7R* mutations were negatively and positively associated with CD2 and CD10 expression, respectively (Supplementary Fig. 3), they did not associate with CD34, CD33, CD5, CD1, CD4, CD8, cytoplasmic CD3, TCR $\alpha\beta$ or TCR $\gamma\delta$ expression.

JAK1 and JAK3 are essential for physiologic IL-7-mediated signaling¹. None of the *IL7R* mutants analyzed ($n = 5$) had gene alterations in the JH2 pseudokinase domain of *JAK1* or *JAK3*, reported to be mutated in pediatric T-ALL¹⁷, and in breast cancer²⁴ and acute megakaryoblastic leukemia²⁵, respectively. The PI3K-Akt signaling pathway is activated by IL-7 in T-ALL cells²⁶, and *PTEN*, the major negative regulator of the PI3K-Akt signaling pathway, is mutated in up to 20% of T-ALL cases^{27–31}. Only 1 of the 17 mutated *IL7R* samples showed *PTEN* gene alterations (Table 1). *NOTCH1* is a major oncogene in T-ALL, with more than 60% of T-ALL cases having gene alterations in *NOTCH1* or *FBXW7*, which encodes the E3 ubiquitin ligase that targets *NOTCH1* for degradation^{16,32–34}. We observed no significant difference in the distribution of *IL7R* mutations in *NOTCH1*- and/or *FBXW7*-mutated versus non-mutated cases (Table 2).

Table 2 Association of *IL7R* mutations with genetic features of T-ALL cases

	<i>n</i>	<i>IL7R</i>		<i>P</i>
		Mutant (%)	Wild type (%)	
Gene expression clusters^a		8 (7)	101 (93)	
<i>TAL-LMO</i>	49	1 (2)	48 (98)	0.284
Proliferative	19	0 (0)	19 (100)	1.0
<i>TLX</i>	26	6 (23)	20 (77)	0.008
Immature	15	1 (7)	14 (93)	1.0
Genetics (oncogenetic subgroups)		12 (9)	123 (91)	
<i>TAL1</i> or <i>TAL2</i> ^b	28	0 (0)	28 (100)	0.568
<i>LMO1</i> , <i>LMO2</i> or <i>LMO3</i> ^b	19	0 (0)	19 (100)	1.0
<i>TLX3</i>	25	4 (16)	21 (84)	1.0
<i>TLX1</i>	8	0 (0)	8 (100)	1.0
<i>HOXA</i>	13	5 (38)	8 (62)	0.016
<i>NKX2-1</i> or <i>NKX2-2</i>	6	0 (0)	6 (100)	1.0
<i>MEF2C</i>	6	0 (0)	6 (100)	1.0
Unknown	32	3 (9)	29 (91)	1.0
<i>NOTCH1</i> or <i>FBXW7</i>		12 (9)	122 (91)	
Mutant	86	9 (10)	77 (90)	1.0
Wild type	48	3 (6)	45 (94)	

^aUnsupervised gene expression cluster analysis (109 T-ALL cases had known *IL7R* mutational status). The subgroups used are as previously defined²⁰. ^bTwo T-ALL cases have both *TAL1* and *TAL2* and *LMO1* and *LMO2* aberrations.

We also evaluated whether *IL7R* mutations could predict treatment response and clinical outcome. We did not find any association of these mutations to initial *in vivo* prednisone response. Moreover, there was no difference in survival between cases with wild-type and mutant

IL7R. Disease-free ($P = 0.82$, log-rank test), event-free ($P = 0.84$) and overall survival ($P = 0.51$; **Supplementary Fig. 4**) were similar for both groups.

IL7R mutations induce constitutive signaling

The high-affinity IL-7R complex is formed by IL-7R α and γ c. Triggering of IL-7R by IL-7 involves recruitment of both subunits and consequent activation of the tyrosine kinases JAK1 (associated with IL-7R α) and JAK3 (associated with γ c), leading to the downstream activation of different pathways, most prominently PI3K-Akt and STAT5 (refs. 1,2). We hypothesized that T-ALL-associated *IL7R* mutations should promote either constitutive signaling or increased responsiveness to IL-7. We first compared two primary leukemia samples collected at diagnosis that differed in their *IL7R* mutational status. In contrast to the T-ALL case with wild-type *IL7R*, the case sample harboring an *IL7R* mutation (P1, p.Leu242-Leu243insAsnProCys; **Table 1**) showed constitutive JAK1 and STAT5 phosphorylation (**Fig. 3a**). To exclude the possibility that this difference resulted from lesions other than *IL7R* mutation, we transduced the IL-7-dependent thymocyte cell line D1 (ref. 35) with retroviral vectors driving the expression of the human wild-type IL-7R α chain or two of the mutants (P1; and P2, p.Thr244-Ile245insCysProThr). Analysis of the JAK-STAT and PI3K-Akt pathways showed that the *IL7R* mutations are gain of function, inducing ligand-independent constitutive hyperactivation of IL-7R-mediated signal transduction. *IL7R* mutations induced phosphorylation of JAK1 and STAT5 (**Fig. 3b**), STAT1 and STAT3 (**Supplementary Fig. 5**), as well as Akt and its direct target Bad (**Fig. 3c**). Notably, the mutant proteins did not promote JAK3

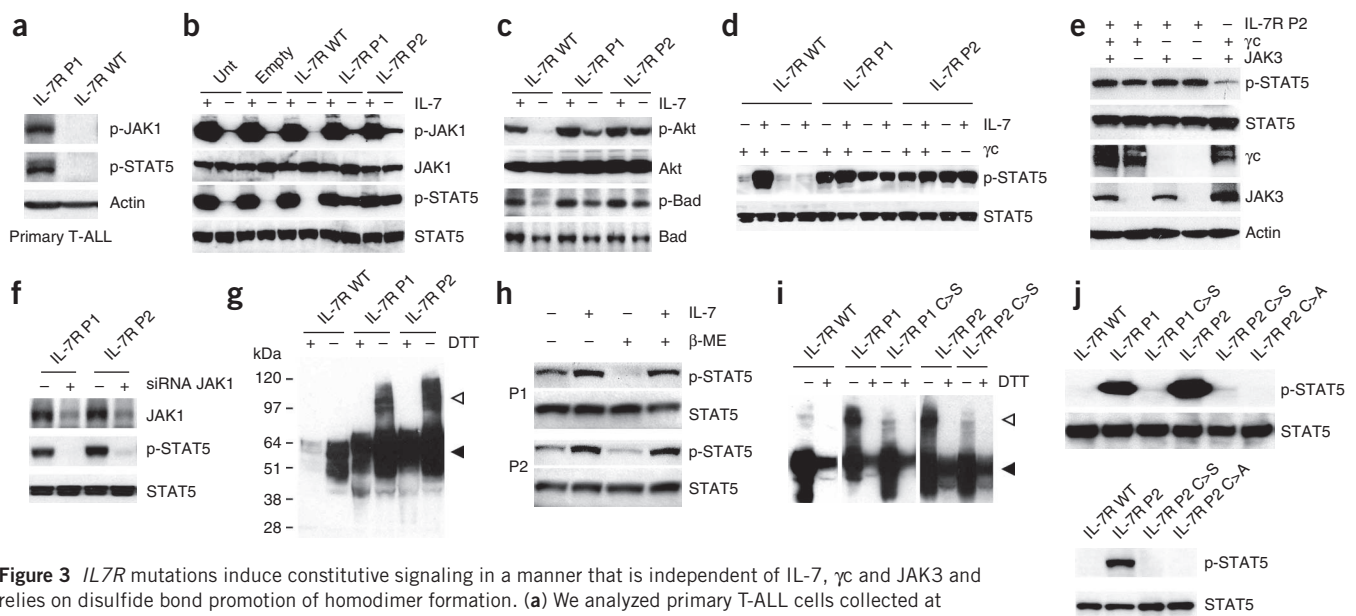
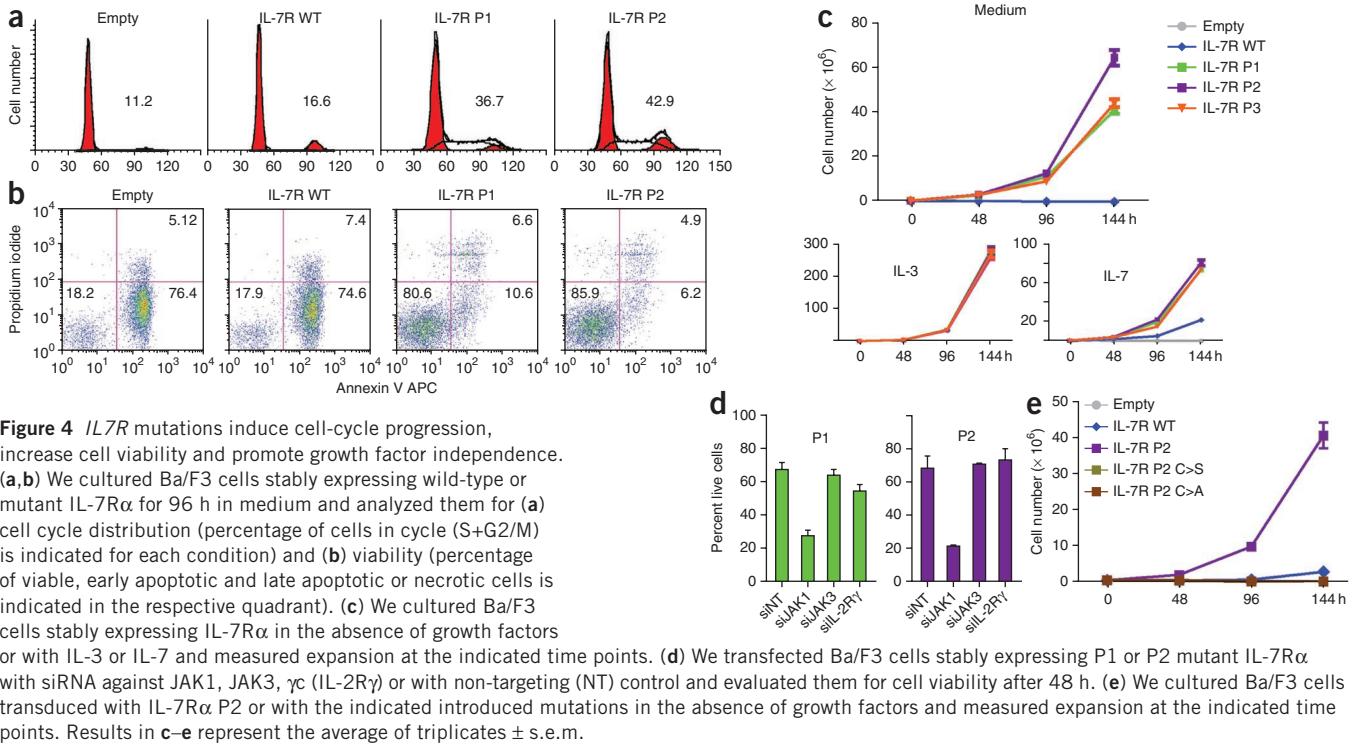


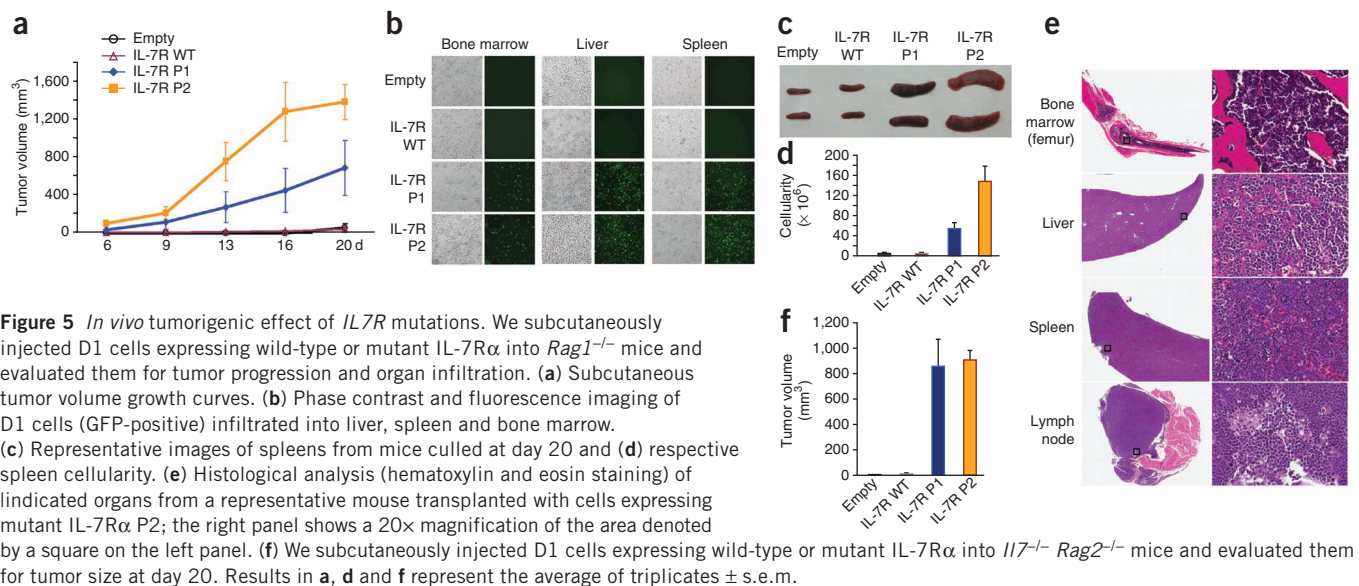
Figure 3 *IL7R* mutations induce constitutive signaling in a manner that is independent of IL-7, γ c and JAK3 and relies on disulfide bond promotion of homodimer formation. (a) We analyzed primary T-ALL cells collected at diagnosis from cases with mutant (P1) and wild-type *IL7R* by immunoblot for JAK1 and STAT5 phosphorylation. (b,c) We cultured D1 cells expressing human wild-type or mutant (P1 and P2) IL-7R α without IL-7 for 4 h, stimulated them or not with IL-7 for 20 min and evaluated them for activation of JAK-STAT (b) and PI3K-Akt (c) pathway activation by immunoblot. (d) We analyzed 293T cells reconstituted with JAK3, STAT5 and wild-type or mutant IL-7R α , and expressing or not expressing γ c, for constitutive and IL-7-induced (15 min stimulation) STAT5 phosphorylation. (e) We transfected 293T cells with IL-7R α P2 and the remaining components of the IL-7R signaling machinery as indicated and evaluated them for STAT5 phosphorylation. (f) We transfected 293T cells with IL-7R α P1 or P2 and small interfering RNA (siRNA) against JAK1 (+) or control non-targeting siRNA (-) and evaluated them after 36 h for JAK1 expression and STAT5 phosphorylation. (g) Lysates from D1 cells expressing wild-type or mutant IL-7R α were treated or untreated with the reducing agent DTT and analyzed for IL-7R α expression by immunoblot. The monomeric and dimeric forms of the receptor are denoted by black and white arrowheads, respectively. (h) We pretreated 293T cells expressing IL-7R α P1 and P2 and the remaining components of the IL-7R signaling machinery with β -mercaptoethanol (β -ME), stimulated or unstimulated them with IL-7 for 15 min and subsequently evaluated them for STAT5 phosphorylation by immunoblot. (i) We analyzed the D1 cells expressing each of the indicated IL-7R constructs for IL-7R α expression by immunoblot. (j) We assessed the signaling elicited by each indicated mutant form expressed in D1 (top) or 293T (bottom) cells by detection of STAT5 phosphorylation.

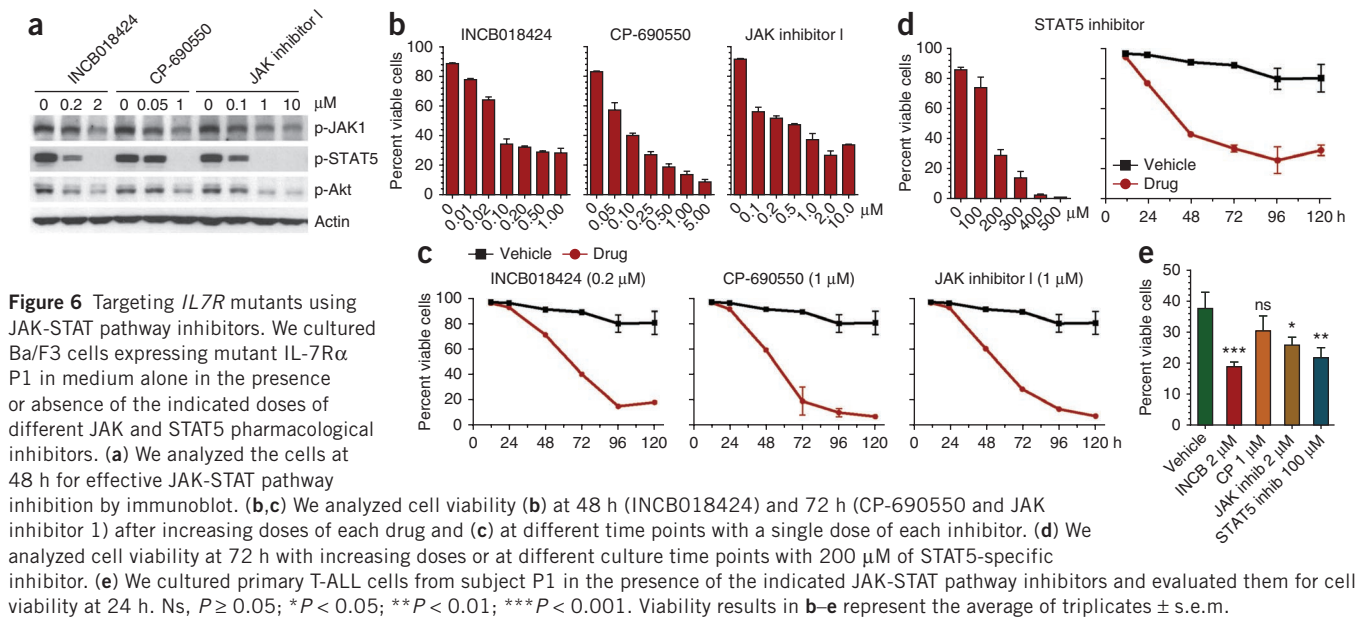


phosphorylation, which is a hallmark of physiological *IL-7*-mediated signaling (Supplementary Fig. 5). We obtained similar results with Ba/F3 cells (Supplementary Fig. 6). Strikingly, reconstitution of the *IL-7R* machinery in 293T cells (which express endogenously only JAK1 and lack *IL-7Rα*, γ and JAK3) further showed that the *IL-7Rα* mutant proteins signal constitutively in a manner that is independent of γ (Fig. 3d,e) and JAK3 (Fig. 3e). In contrast, knockdown of JAK1 resulted in abrogation of mutant *IL7R*-dependent constitutive STAT5 phosphorylation (Fig. 3f and Supplementary Fig. 7). Because, similar to JAK3, JAK2 and TYK2 are not activated by the *IL7R* mutants (Supplementary Fig. 5), our results indicate that JAK1 is the only Janus kinase that is mandatory for signaling triggered by mutant *IL-7Rα*.

IL7R mutant proteins form homodimers via disulfide bonds

Most *IL7R* mutations (14/17; 82%) created an unpaired cysteine residue in the extracellular juxtamembrane-transmembrane interface region (Fig. 1a and Supplementary Fig. 2). Mutations that introduce cysteines in this region in receptors such as EpoR³⁶, RET³⁷ and Her2/Neu³⁸ have been implicated in intermolecular disulfide bond formation with consequent homodimerization and signaling activation. A similar mechanism was suggested to account for the oncogenic activity of the p.Phe232Cys alteration in the TSLP receptor (encoded by *CRLF2*) recently found in B-ALL³⁹. Expression of human *IL-7Rα* in γ -expressing D1 cells or in 293T cells, which do not express γ , followed by immunoblot analysis under non-reducing conditions showed that the mutants are detected mostly as dimers and





oligomers, whereas wild-type IL-7R α is found mainly in a monomeric form. In contrast, we detected both wild-type and mutant IL-7R α essentially in the monomeric form when we resolved the protein lysates under reducing conditions (Fig. 3g and Supplementary Fig. 8). We obtained similar results by transducing *Il7r*^{-/-} bone marrow cells (Supplementary Fig. 9). Accordingly, constitutive, ligand-independent phosphorylation of STAT5 was markedly downregulated by pretreatment of mutant IL-7R α -expressing cells with β -mercaptoethanol (Fig. 3h). Furthermore, receptor dimerization and constitutive signaling were abrogated upon substitution of the mutated cysteine to alanine or serine (Fig. 3i,j). These data indicate that constitutive hyperactivation of IL-7R-mediated signaling in T-ALL cells results, in most cases, from intermolecular disulfide bond formation arising from the introduction of an unpaired cysteine in the extracellular juxtamembrane-transmembrane region of IL-7R α that leads to homotypic dimerization and/or oligomerization.

IL7R mutations promote transformation and tumor formation

We then investigated the cellular consequences of constitutive signaling emanating from IL-7R α mutants. Expression of mutant, but not wild-type, IL-7R α into IL-7-dependent D1 cells and IL-3-dependent Ba/F3 cells promoted both cell cycle progression (Fig. 4a and Supplementary Figs. 10 and 11) and viability (Fig. 4b and Supplementary Figs. 10 and 11) independently of IL-7. Accordingly, mutation of IL-7R α conferred growth factor independence to Ba/F3 cells (Fig. 4c), indicating that the *IL7R* mutants have a transforming capacity. In agreement with the signaling data (Fig. 3d–f), the functional effect of the mutants was also independent of γ c and JAK3, as shown by increased survival of bone marrow cells from *Il2rg*^{-/-} (Supplementary Fig. 12) and *Jak3*^{-/-} (Supplementary Fig. 13) mice transduced with two of the mutants, and was dependent on JAK1, as determined by inhibition of mutant *IL7R*-mediated survival in Ba/F3 and D1 cells upon JAK1, but not γ c or JAK3, knockdown (Fig. 4d and Supplementary Fig. 14). Furthermore, substitution of the *de novo* inserted cysteine residue to serine or alanine resulted in reversal of the transforming capacity of the IL-7R α mutants (Fig. 4e and Supplementary Fig. 15), suggesting that intermolecular disulfide-bond-dependent homodimerization is mandatory not only for signaling but also for the functional effects of IL-7R α mutants.

Although *IL7R* mutations induced cell transformation, growth factor independence or immortalization *in vitro* does not necessarily implicate the acquisition of a malignant phenotype *in vivo*. Therefore, we next evaluated the *in vivo* tumorigenic potential of *IL7R* mutations. In contrast to D1 cells transduced with empty vector or wild-type IL-7R α , subcutaneous injection of mutant IL-7R α -expressing D1 cells in *Rag1*^{-/-} mice resulted in tumor formation (Fig. 5a). Notably, ill mice showed a phenotype typical of T-ALL, with substantial homing of mutant IL-7R α -expressing cells into their bone marrow and with infiltration into various organs that are normally affected in advanced-stage disease, such as the lymph nodes, liver and spleen (Fig. 5b–e, Supplementary Fig. 16 and data not shown). The tumors were transplantable into secondary recipient animals (data not shown) and were not dependent on the presence of IL-7, as injection of mutant IL-7R α -expressing cells led to tumor development in IL-7-deficient mice (Fig. 5f). Taken together, our results indicate that *IL7R* mutational activation is an oncogenic event involved in T-ALL.

Targeting *IL7R* mutant cells with JAK-STAT pathway inhibitors

To test the potential therapeutic application of our findings, we reasoned that mutant IL-7R α -expressing cells should rely on constitutive signaling downstream from the receptor. We first evaluated the efficacy of several JAK inhibitors, including Pyridone 6 (JAK inhibitor I), CP-690550 and INCB018424. The latter two inhibitors are of particular relevance because they are currently being used in clinical trials for rheumatoid arthritis and several cancers, including hematological malignancies. Notably, all three drugs significantly downregulated JAK1 phosphorylation and consequent downstream activation of STAT5 and Akt (Fig. 6a) and induced cell death in a dose- and time-dependent manner (Fig. 6b,c and Supplementary Fig. 17) in Ba/F3 cells expressing mutant IL-7R α . Likewise, CP-690550, INCB018424 and another clinically relevant JAK inhibitor, CYT387, inhibited the proliferation of mutant IL-7R α -expressing D1 cells (Supplementary Fig. 18). Furthermore, a STAT5-specific small-molecule inhibitor⁴⁰ promoted significant killing of Ba/F3 cells expressing mutant IL-7R α (Fig. 6d and Supplementary Fig. 19). Finally, we found that primary T-ALL cells harboring *IL7R* mutations are also sensitive to JAK-STAT pathway inhibition. With the exception of CP-690550, the remaining



drugs had differential but always significant cytotoxic effects on diagnostic leukemia cells (Fig. 6e). These results illustrate the potential therapeutic value of JAK-STAT pathway small-molecule inhibitors in the context of *IL7R* mutant T-ALL.

DISCUSSION

T-ALL is an aggressive hematological cancer resulting from leukemic transformation of thymocytes. Although there has been a remarkable increase in our knowledge of T-ALL molecular pathogenesis, the identification and characterization of the players and mechanisms driving proliferation and survival of leukemia T cells remains relatively poor. IL-7 and its receptor are essential for normal T-cell development and have been suggested to play a role in T-ALL. In the present study, we showed that 9% of pediatric T-ALL cases have *IL7R* exon 6 mutations that are gain of function and have oncogenic ability. Thus, our findings expand the spectrum of disease-associated *IL7R* genetic alterations to cancer. Moreover, this is the first example of an oncogene in the γc family of cytokine receptors, which is critically involved in numerous lymphoid cell functions⁴¹.

Notably, *IL7R* mutations do not occur in the cytoplasmic tail, which recruits signaling effectors, but do occur at the extracellular juxtamembrane-transmembrane interface. The vast majority of *IL7R* mutations we identified create an unpaired cysteine residue, which is necessary for disulfide-bond-dependent IL-7R α homodimerization and bypasses the requirement for ligand binding and γc heterodimerization to trigger downstream signaling. Moreover, all *IL7R* mutations insert additional amino acids rather than involving a single amino acid change to cysteine. This may indicate that these additional amino acids are required for the optimal conformation leading to maximal signaling, perhaps by allowing for the most adequate alignment and exposure of the unpaired cysteine and/or by maximizing the interactions between downstream effectors at the cytoplasmic tail of the receptor. The three remaining T-ALL cases resulted in the inclusion of either a tryptophan or an SxxxG motif in the transmembrane domain. Although we did not analyze the mechanisms by which these mutations might contribute to T-cell leukemia, tryptophan residues and SxxxG motifs have both been reported to promote association of transmembrane helices^{42,43} that could result in homodimer or heterodimer formation with possibly similar outcomes to cysteine mutations. However, preliminary analyses of mutant P5, which has the insertion of a tryptophan in the transmembrane domain (Table 1), suggest that it does not form dimers (data not shown) and suggest that the pro-survival effect of this mutation is relatively minor: P5 expression in D1 cells deprived of IL-7 for 48 h resulted in a 2.8-fold increase in viability relative to wild-type IL-7R, as compared to 7.4-, 9.1- and 6.0-fold increases for P1, P2 and P4, respectively. In accordance, P5 appears to be relatively inefficient at inducing constitutive signaling as compared to the other *IL7R* mutations (Supplementary Fig. 7). These results suggest that *IL7R* mutations not involving cysteine insertion are not as potent and probably require additional cooperating oncogenic events compared to those that result in the introduction of an unpaired cysteine, which constitute the vast majority of the cases we identified in childhood T-ALL and characterized in our study.

IL7R gene alterations appear to be highly predominant in T-cell compared to B-cell leukemia. We did not detect exon 6 mutations in any of the 50 childhood pre-B-ALL cases we analyzed, and a recent report indicated that *IL7R* mutations occur in only 0.6% pre-B-ALL cases. In contrast to T-ALL, half of the B-cell-associated mutations affect exon 5, rather than exclusively exon 6, and require cooperation with TSLPR (CRLF2) overexpression¹⁸. TSLPR expression is rare in

T-ALL and is not necessary for signaling driven by the *IL7R* mutations, as we showed here in 293T cells, which do not express TSLPR yet display constitutive signaling after expression of mutant *IL7R*. Notably, the fact that IL-7R α is apparently expressed in various carcinoma cell lines and breast cancer tissue⁴⁴ raises the intriguing question of whether mutations in *IL7R* might also occur in solid tumors.

We found *IL7R* mutations in different T-ALL oncogenetic subgroups, but they tended to associate predominantly with *HOXA* aberrant expression. Although the exact biological importance of this link remains to be fully understood, it is noteworthy that *Hoxa9*^{-/-} mice show impaired early T-cell development with reduced Bcl-2 and IL-7R α expression⁴⁵. Curiously, *IL7R* gene alterations did not associate with T-ALL maturation stage or with most T-cell differentiation markers. These observations are reminiscent of the fact that primary T-ALL cells, in contrast to normal developing thymocytes, respond to IL-7 independent of their maturation stage¹⁴.

We showed that pharmacological inhibition of the JAK-STAT pathway induces cell death of mutant IL-7R α -expressing cells. The preliminary data on the effect of these inhibitors in one primary T-ALL case sample was evident but not as striking as in cell lines. This may relate to the early time point at which we assessed viability (which may have prevented the inhibitors from having the maximal effect), to the importance of other alternative downstream signaling pathways in the regulation of cell survival in primary leukemia and/or to higher dependence on other oncogenic defects in the leukemia cells of the case analyzed. Irrespective of these considerations, our results suggest that JAK-STAT pathway inhibitors are cytotoxic to mutated IL-7R α -expressing T-ALL cells. Whether inhibitors of other signaling components activated by gain-of-function *IL7R* mutations, such as Akt, can be exploited on their own or in combination with JAK-STAT antagonists to target *IL7R* mutant T-ALL cells requires further investigation.

The extraordinary improvement in T-ALL treatment outcome in recent years is mitigated by the long-term side effects associated with current regimens and by the dismal prognosis of relapsed cases. Further improvement requires an in-depth understanding of T-ALL molecular genetics and leukemogenic pathways, which will ultimately lead to the identification of new molecular players and to the development of effective targeted therapies. This line of reasoning has led, for instance, to the identification of *CREBBP* (*CBP*) mutations that are associated with ALL relapse⁴⁶ or *CRLF2* rearrangements, which are particularly frequent in Down syndrome ALL⁴⁷. *PTPN2* and *PHF6* mutational loss^{48,49} are among the most recently characterized genetic lesions involved in T-ALL. Our present work, and that of a parallel study¹⁸, indicates that *IL7R* mutational activation takes part in human T-cell leukemogenesis, thereby expanding the spectrum of genetic alterations in T-ALL to a long recognized major regulator of lymphoid biology. Notably, our findings provide a strong rationale for specific targeting of IL-7R-mediated signaling as a treatment option for T-ALL.

URLs. LIMMA, <http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturegenetics/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Genetics website.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the subjects and their families for providing the specimens for this study. We thank S. Walsh (University of Maryland) for helpful discussions

on the IL7R transmembrane domain; K. Czarrá and M. Karwan for animal technical assistance; A. Silva, I. Antunes, A. Melão and J. Buijs-Gladdines for experimental support; P. Vandenebeel for kindly providing the WEHI3B cell line; and J. O'Shea for providing *Jak3*^{-/-} bone marrow and CP-690550. This work was supported by grants from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT); PTDC/SAU-OB/104816/2008, J.T.B.), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 08/10034-1, J.A.Y.) and the intramural program of the National Cancer Institute, US National Institutes of Health (NIH) (S.K.D.). P.P.Z. and A.B.S. have Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) PhD scholarships. L.M.S. has a postdoctoral fellowship; D.R., B.A.C. and N.C. have PhD scholarships, and M.C.S. had a Bolsa de Investigação (BI) fellowship, all from the FCT. L.Z. was supported by a grant (2007-012) from the foundation Children Cancer-Free (Stichting Kinderen Kankervrij; KiKa).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.T.B. and J.A.Y. conceived and supervised the study. J.T.B., J.A.Y., S.K.D. and J.P.M. designed the experiments. J.T.B. coordinated the different contributions and wrote the paper. J.A.Y., S.K.D., J.P.M., A.A.F., W.L., D.R. and P.P.Z. contributed to the writing of portions of the paper. P.P.Z., D.R., W.L., L.Z., M.C.S., M.P., J.T., J.A.H., A.B.S., B.A.C., L.M.S. and N.C. performed experiments. J.T.B., J.A.Y., S.K.D., J.P.M., A.A.F., P.P.Z., D.R., W.L., M.C.S., A.B.S., N.C. and L.M.S. analyzed the data. M.L.T., J.K., R.P., M.H. and S.R.B. contributed reagents or clinical information.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturegenetics/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Jiang, Q. *et al.* Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 513–533 (2005).
- Fry, T.J. & Mackall, C.L. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J. Immunol.* **174**, 6571–6576 (2005).
- von Freeden-Jeffry, U. *et al.* Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* **181**, 1519–1526 (1995).
- Peschon, J.J. *et al.* Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* **180**, 1955–1960 (1994).
- Puel, A., Ziegler, S.F., Buckley, R.H. & Leonard, W.J. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat. Genet.* **20**, 394–397 (1998).
- Roifman, C.M., Zhang, J., Chitayat, D. & Sharfe, N. A partial deficiency of interleukin-7R α is sufficient to abrogate T-cell development and cause severe combined immunodeficiency. *Blood* **96**, 2803–2807 (2000).
- Lundmark, F. *et al.* Variation in interleukin 7 receptor α chain (*IL7R*) influences risk of multiple sclerosis. *Nat. Genet.* **39**, 1108–1113 (2007).
- Hafler, D.A. *et al.* Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome-wide study. *N. Engl. J. Med.* **357**, 851–862 (2007).
- Rich, B.E., Campos-Torres, J., Tepper, R.I., Moreadith, R.W. & Leder, P. Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas in interleukin 7 transgenic mice. *J. Exp. Med.* **177**, 305–316 (1993).
- Abraham, N. *et al.* Haploinsufficiency identifies STAT5 as a modifier of IL-7-induced lymphomas. *Oncogene* **24**, 5252–5257 (2005).
- Laouar, Y., Crispe, I.N. & Flavell, R.A. Overexpression of IL-7R α provides a competitive advantage during early T-cell development. *Blood* **103**, 1985–1994 (2004).
- Touw, I. *et al.* Interleukin-7 is a growth factor of precursor B and T acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **75**, 2097–2101 (1990).
- Barata, J.T., Cardoso, A.A., Nadler, L.M. & Boussiotis, V.A. Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1). *Blood* **98**, 1524–1531 (2001).
- Barata, J.T., Keenan, T.D., Silva, A., Boussiotis, V.A. & Cardoso, A.A. Common γ chain-signaling cytokines promote proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **89**, 1459–1467 (2004).
- González-García, S. *et al.* CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7R α gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J. Exp. Med.* **206**, 779–791 (2009).
- Weng, A.P. *et al.* Activating mutations of *NOTCH1* in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**, 269–271 (2004).
- Flex, E. *et al.* Somatic acquired *JAK1* mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.* **205**, 751–758 (2008).
- Shochat, C. *et al.* Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (*IL7R*) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J. Exp. Med.* **208**, 901–908 (2011).
- Kovanen, P.E. *et al.* Analysis of γ c-family cytokine target genes. Identification of dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a regulator of mitogen-activated protein kinase activity in interleukin-2 signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 5205–5213 (2003).
- Homminga, I. *et al.* Integrated transcript and genome analyses reveal *NKX2-1* and *MEF2C* as potential oncogenes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **19**, 484–497 (2011).
- Ferrando, A.A. *et al.* Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **1**, 75–87 (2002).
- van Grotel, M. *et al.* Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences. *Leukemia* **22**, 124–131 (2008).
- Bene, M.C. *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* **9**, 1783–1786 (1995).
- Jeong, E.G. *et al.* Somatic mutations of *JAK1* and *JAK3* in acute leukemias and solid cancers. *Clin. Cancer Res.* **14**, 3716–3721 (2008).
- Walters, D.K. *et al.* Activating alleles of *JAK3* in acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Cell* **10**, 65–75 (2006).
- Barata, J.T. *et al.* Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Exp. Med.* **200**, 659–669 (2004).
- Maser, R.S. *et al.* Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. *Nature* **447**, 966–971 (2007).
- Palomero, T. *et al.* Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat. Med.* **13**, 1203–1210 (2007).
- Silva, A. *et al.* PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J. Clin. Invest.* **118**, 3762–3774 (2008).
- Gutierrez, A. *et al.* High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **114**, 647–650 (2009).
- Jotta, P.Y. *et al.* Negative prognostic impact of *PTEN* mutation in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **24**, 239–242 (2010).
- O'Neil, J. *et al.* *FBW7* mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to γ -secretase inhibitors. *J. Exp. Med.* **204**, 1813–1824 (2007).
- Thompson, B.J. *et al.* The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J. Exp. Med.* **204**, 1825–1835 (2007).
- Zuurbier, L. *et al.* *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutations predict for initial good prednisone response but not for improved outcome in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia patients treated on DCOG or COALL protocols. *Leukemia* **24**, 2014–2022 (2010).
- Kim, K. *et al.* Characterization of an interleukin-7-dependent thymic cell line derived from a p53(-/-) mouse. *J. Immunol. Methods* **274**, 177–184 (2003).
- Lu, X., Gross, A.W. & Lodish, H.F. Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. *J. Biol. Chem.* **281**, 7002–7011 (2006).
- Kjaer, S., Kurokawa, K., Perrinjaquet, M., Abrescia, C. & Ibanez, C.F. Self-association of the transmembrane domain of RET underlies oncogenic activation by *MEN2A* mutations. *Oncogene* **25**, 7086–7095 (2006).
- Burke, C.L. & Stern, D.F. Activation of Neu (ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface. *Mol. Cell Biol.* **18**, 5371–5379 (1998).
- Yoda, A. *et al.* Functional screening identifies *CRLF2* in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 252–257 (2010).
- Liu, X. *et al.* Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease. *Nat. Med.* **16**, 191–197 (2010).
- Kovanen, P.E. & Leonard, W.J. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the γ (c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol. Rev.* **202**, 67–83 (2004).
- Ridder, A., Skupjen, P., Unterreitmeier, S. & Langosch, D. Tryptophan supports interaction of transmembrane helices. *J. Mol. Biol.* **354**, 894–902 (2005).
- Russ, W.P. & Engelman, D.M. The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.* **296**, 911–919 (2000).
- Al-Rawi, M.A., Mansel, R.E. & Jiang, W.G. Interleukin-7 (IL-7) and IL-7 receptor (IL-7R) signalling complex in human solid tumours. *Histol. Histopathol.* **18**, 911–923 (2003).
- Izon, D.J. *et al.* Loss of function of the homeobox gene *Hoxa-9* perturbs early T-cell development and induces apoptosis in primitive thymocytes. *Blood* **92**, 383–393 (1998).
- Mullighan, C.G. *et al.* *CREBBP* mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **471**, 235–239 (2011).
- Mullighan, C.G. *et al.* Rearrangement of *CRLF2* in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **41**, 1243–1246 (2009).
- Kleppe, M. *et al.* Deletion of the protein tyrosine phosphatase gene *PTPN2* in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **42**, 530–535 (2010).
- Van Vierberghe, P. *et al.* *PHF6* mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **42**, 338–342 (2010).

ONLINE METHODS

Cells. Primary leukemia cells were obtained from the bone marrow and/or peripheral blood of diagnostic pediatric T-ALL and pre-B-ALL cases. Samples were enriched by density centrifugation over Ficoll-Paque (GE Healthcare), washed twice in culture medium (RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine and penicillin streptomycin), subjected to immunophenotypic analysis by flow cytometry and classified according to their maturation stage (Table 1). Informed consent and institutional review board approval were obtained for all primary leukemia collections from Centro Infantil Boldrini, Campinas, São Paulo, Brazil (Boldrini); the Cooperative Study Group for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia, Germany (COALL); and the Dutch Childhood Oncology Group, The Hague, The Netherlands (DCOG). Primary leukemia cells from subject P1 were cultured in culture medium as 2×10^6 cells/ml. Growth-factor-dependent D1 and Ba/F3 cells were maintained in culture medium plus 50 ng/ml rmIL-7 (PeproTech) or 1% (v/v) WEHI-3B-conditioned medium as source of mIL-3, respectively. The phoenix-Eco packaging cell line and 293T cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Mediatech or Gibco) supplemented with 10% FBS and penicillin streptomycin.

IL7R sequencing and mutational analysis. Total RNA was extracted and RNA integrity was confirmed by agarose gel electrophoresis. We reverse transcribed 1 μ g of total RNA to complementary DNA (cDNA) using the ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega). The complete coding sequence of *IL7R* and the JH2 domain of *JAK1* and *JAK3* were amplified by RT-PCR and sequenced on both strands for a total of 68, 52 and 52 T-ALL samples, respectively, from Centro Infantil Boldrini. The same primers were used for amplification and sequencing (Supplementary Table 2). Mutations found in the *IL7R* were confirmed in the corresponding genomic DNA by PCR amplification of exon 6 coding and flanking intronic sequences followed by homoduplex formation analysis³² and/or sequencing. Mutations in exon 6 coding and flanking intronic sequences were further investigated in 119 T-ALL cases from the DCOG and COALL case series by sequencing and in 50 precursor B-ALL cases from Centro Infantil Boldrini by homoduplex and heteroduplex formation analysis.

Gene expression microarray analysis and unsupervised cluster analysis. RNA isolation for 117 pediatric T-ALL case samples, integrity analyses of RNA, copy-DNA and cRNA syntheses and hybridizations to Human Genome U133 plus 2.0 oligonucleotide microarrays have been described²⁰. Differentially expressed genes associated with *IL7R* mutations were obtained by regression analysis using the LIMMA package. Unsupervised cluster analyses were performed in dChip as described²⁰.

Geneset enrichment analysis (GSEA). GSEA was performed on our Affymetrix U133 plus 2.0 microarray expression dataset for 117 T-ALL cases²⁰ using 100 random permutations. The microarray dataset is available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> under accession number GSE26713. An enrichment score and nominal *P* value were obtained for genes that are upregulated in human lymphocytes following exposure to IL-7 as described¹⁹, for which probesets were present on the U133 plus 2.0 expression array (*SOCS2*, *CCL4*, *CCL3*, *TNF*, *PMAIP1*, *LRP1*, *PIMI*, *AHR*, *UPP1*, *GARS*, *CCND2*, *DUSP5*, *FLT3LG*, *IL2RA*, *LIF*, *CEACAM1*, *MX1*, *TNFSF10*, *CSF2*, *CD69*, *CXCR4*, *CSF1*, *SOCS1*, *IL18R1*, *DPP4*, *CASP3*, *XBP1* and *BCL2*).

Construction of *IL7R* expression vectors. The coding sequence of *IL7R* was PCR amplified from cDNA of blood mononuclear cells of a healthy donor using primers *IL7R* 3U32 and *IL7R* 1434L39 (Supplementary Table 2). The reverse primer did not incorporate the stop codon. The undigested PCR product was cloned into pGEM-T Easy (Promega) and verified by sequencing. The cloned fragment was subsequently digested with *Xma*I, treated with the Klenow fragment of DNA polymerase I and then digested with *Kpn*I and cloned into the *Xba*I (blunted with Klenow) and *Kpn*I sites of the pUC19 vector, resulting in the clone pUC19/*IL7R*. By doing so, a stop codon was re-inserted, but the last C-terminal amino acids QN of the normal *IL7R α* were changed to QNPG. A lentiviral expression vector of *IL7R*, #304/*IL7R*, was obtained by subcloning the *IL7R* EcoRI(Klenow)-Sall fragment of pUC19/*IL7R* in place of the Δ NGFR

SmaI-Sall fragment of a pCCL.sin.cPPT.minCMV.eGFP.PGK. Δ NGFR.WPRE lentivirus vector⁵⁰ (kindly provided by L. Naldini). To obtain a retroviral expression vector, the *IL7R* fragment was amplified from pUC19/*IL7R* using primers hIL7R5'BglII and hIL7R3'EcoRI. The PCR product was digested with BglII and EcoRI and cloned into pMIG (Addgene 9044, contributed by W. Hahn). Equal procedures were used to obtain the expression vectors for the mutant *IL7R* cDNAs. Site-directed mutagenesis of the new cysteine was obtained by PCR amplification of a BamHI-BbsI fragment spanning positions 803–934 of the *IL7R* sequence (NM_002185.2) using the pUC19/*IL7R* clone as a template, one of the following forward primers (hIL7R_cP1s, hIL7R_cP2s, hIL7R_cP2a) and the reverse primer hIL7R_BbsI. The amplified fragments were digested with BamHI and BbsI and inserted into pUC19/*IL7R*, thus replacing the *IL7R* fragment containing the cysteine codon. Subsequently, the mutants of the *IL7R* coding sequences were cloned into the lentiviral and retroviral vectors, as described above. All of the above clones were verified by sequencing.

Retroviral infection of D1, Ba/F3 and mouse bone marrow cells. Wild-type or mutant full-length human *IL7R* was cloned into pCCL.sin.cPPT.minCMV.eGFP.PGK. Δ NGFR.WPRE lentivirus⁵⁰ or pMIG retroviral vectors, both of which also drive the expression of enhanced GFP. Where indicated, C>A or C>S mutations were introduced into the mutant *IL7R* using PCR strategies. All subcloned genes and constructs were verified by DNA sequencing. D1 cells were infected in RetroNectin (TaKaRa)-coated plates with pMIG supernatant produced using the phoenix-Eco packaging cell line. Ba/F3 cells were infected with either pMIG or lentiviral supernatants produced in 293T cells. Equivalent levels of expression of GFP and IL-7R α were confirmed for all established D1 and Ba/F3 cell lines. Bone marrow cells were harvested from tibia and femur of *Il7r^{-/-}* or *Il2rg^{-/-}* mice, and progenitors were enriched by lineage cell depletion kit (Miltenyi Biotec) and cultured in X-vivo 10 medium (Bio Whittaker) supplemented with 5% FBS, mouse SCF (100 ng/ml), mouse IL-6 (50 ng/ml) and flt-3 ligand (100 ng/ml) (PeproTech). After 48 h, cells were infected on RetroNectin (TaKaRa)-coated plates overnight with different retroviral supernatant from the packaging line, and the infection was repeated after 72 h. On the fourth day, cells were harvested, washed and cultured with or without IL-7.

Transfection of 293T cells. pCDNA3.1 vectors (Invitrogen) bearing human *JAK3*, human γ_C and mouse *Stat5a*, and pMIG-*IL7R* constructs were used, in the indicated combinations, to transfect 293T cells by calcium phosphate precipitation. Transfected cells were stimulated or not with IL-7 (100 ng/ml) for 15 min at 37 °C. Where indicated, cells were pretreated with 1 mM β -mercaptoethanol or vehicle (PBS) for 2 h at 37 °C. Reactions were stopped by placing samples on ice.

Small interfering RNA (siRNA) transfection of 293T and Ba/F3 cells. For 293T cells, 50 pmol of ON-TARGETplus Non-Targeting pool or ON-TARGETplus SMARTpool JAK1 siRNA (Dharmacon) were co-transfected with the indicated plasmid DNA constructs (600 ng) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Cells were harvested 36 h after transfection, and whole-cell lysates were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Ba/F3 cells were electroporated (300 V, 1,500 microfarads) in a Gene Pulser II (Bio-Rad) with 200 pmol of ON-TARGETplus Non-Targeting pool, ON-TARGETplus SMARTpool *Jak1* or *Jak3* (Dharmacon) or Silencer siRNA *Il2rg* (Ambion) siRNAs. At the indicated time points, cells were harvested for viability assay and cell counts.

Short hairpin RNA (shRNA) transduction of D1 cells. The retroviral vector containing mouse *Jak1*-specific 29-mer shRNA expressed under U6 promoter and the puromycin selection marker was bought from OriGene. Retroviral supernatant from the packaging line was used to infect mutant IL-7R α -expressing D1 cells on RetroNectin-coated plates overnight. At 24 h after infection, cells were put in fresh culture medium containing 50 ng/ml of mIL-7 and 5 μ g/ml of puromycin (Invitrogen) for another 48h. mIL-7 and puromycin were washed away, and cells were placed in culture without mIL-7 for 48 h. Cell viability and proliferation were measured by MTT assay.

Treatment with pharmacological inhibitors. Ba/F3 cells stably expressing mutant *IL7R* or primary T-ALL cells bearing *IL7R* mutations were cultured



in medium alone or with the indicated concentrations of Pyridone 6 (JAK Inhibitor I), STAT5 inhibitor *N'*-((4-Oxo-4H-chromen-3-yl)methylene)nicotinohydrazide (both purchased from Calbiochem), Ruxolitinib (INCB 018424) or Tasocitinib (CP-690550) (both purchased from Axon Medchem), and viability was determined at the indicated time by flow cytometry analysis. D1 cells stably expressing mutant *IL7R* were plated in 96-well plate at a density of 1×10^5 cells per well in IL-7-free medium and incubated for 48 h with or without JAK inhibitors at the indicated concentrations. Cell viability and proliferation were determined by MTT assay.

Immunoblotting. Cell lysates were resolved by 10% or 12% SDS-PAGE, and equal amounts of protein were transferred onto nitrocellulose membranes and immunoblotted with antibodies against p-JAK3 (Y980), JAK3, JAK1, STAT5, γ_C , actin, (Santa Cruz Biotechnology), p-STAT5a/b (Y694/Y699) (Upstate Biotechnology), p-TYK2 (Y1054/1055), p-JAK1 (Y1022/1023), p-JAK2 (Y1007/1008), JAK1, p-STAT5 (Y694), p-STAT3 (Y705), p-STAT1 (Y701), p-Akt (S473), Akt, p-Bad (S112), Bad (Cell Signaling Technology) and IL-7R α (R&D Systems). Immunodetection was performed by incubation with horseradish-peroxidase-conjugated appropriate secondary antibodies and developed by chemiluminescence. For the analysis of IL-7R α dimer formation, whole-cell lysates were resolved in denaturing, non-reducing SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membranes and immunoblotted. When indicated, lysates were incubated with 100 mM dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich) for 5 min at room temperature (20–25 °C) before non-reducing SDS-PAGE.

Cell-cycle analysis. Cells were either permeabilized in 0.1% BSA, 0.01 M HEPES, 0.1% saponin in PBS at a concentration of 1×10^6 cells/ml and an equal volume of detergent buffer containing 50 μ g/ml of propidium iodide (Sigma) and 50 μ g/ml of RNase (Puregene), or treated as described¹³, and analyzed by flow cytometry. Cell cycle distribution was determined using ModFit LT software (Verity).

Cell viability assay. Quantitative determination of cell viability was performed using Annexin V-based apoptosis detection kits and the manufacturer's instructions (R&D Systems or eBioscience). Briefly, cells were resuspended in the appropriate binding buffer, stained with APC-conjugated Annexin V and propidium iodide or 7-AAD at room temperature for 15 min and subsequently analyzed by flow cytometry.

Cell counts. Ba/F3 cells were cultured as 2×10^5 /ml in medium deprived of growth factors or in the presence of IL-3-conditioned medium (1%; v/v) or IL-7 (10 ng/ml). Total cell counts were calculated by trypan blue exclusion using a hemocytometer at the indicated time points.

MTT assay. We added 8 μ l of MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 5 mg/ml; Sigma) to each well and kept cells at 37 °C for 4 h, after which 100 μ l of solubilization solution (Promega) was added, and cells were incubated overnight at 37 °C. Absorbance was measured by spectrophotometry at wavelengths of 590 and 630 nm.

Mouse. *Rag1*^{-/-} mice were originally purchased from The Jackson Laboratory, and *IL7*^{-/-} *Rag2*^{-/-} mice were obtained from R. Murray (DNAX Research Institute). Mice were maintained by homozygous breeding at the National Cancer Institute (NCI)-Frederick, Maryland. Animal care was provided in accordance with US NIH Animal Use and Care guidelines. Experiments were performed following protocols approved by NCI-Frederick Animal Care and Use Committee. All mice used were 8–12 weeks old.

Tumor model. Mice were treated with 0.64 mg/ml of sulfamethoxazole in drinking water 2 days before the injection, and treatment continued for up to a week after the injection. Mice received 3 Gy of whole-body γ irradiation 4 h before the injection. D1 cells harboring the empty vector or human *IL7R* (2×10^6 cells in 100 μ l of PBS) were injected subcutaneously into the right flank. On day 20, mice were killed, and tumor size was measured by caliper. Tumor volume was calculated by the modified ellipsoidal formula⁵¹: tumor volume = $\frac{1}{2}$ (length \times width²).

Statistical analysis. A Fisher's exact test with Bonferroni correction was used to compare the frequency of *IL7R* mutations between T-ALL subgroups. Differences between populations were calculated using an unpaired two-tailed Student's *t*-test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

50. Amendola, M., Venneri, M.A., Biffi, A., Vigna, E. & Naldini, L. Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters. *Nat. Biotechnol.* **23**, 108–116 (2005).

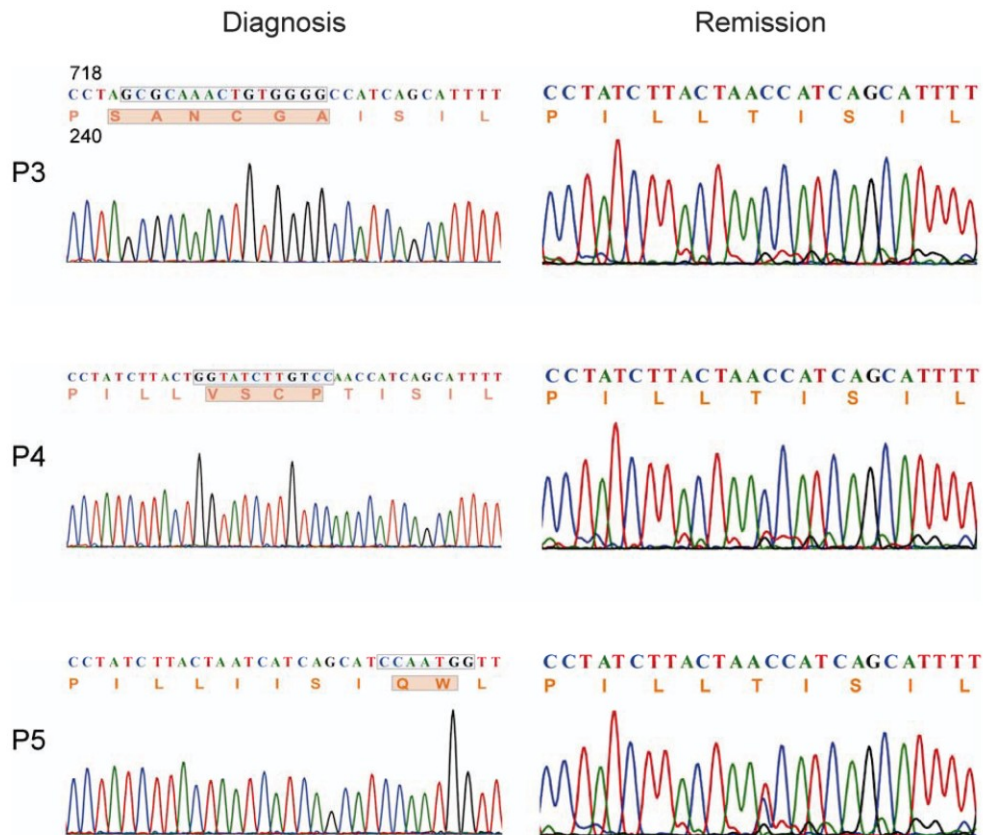
51. Jensen, M.M., Jorgensen, J.T., Binderup, T. & Kjaer, A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. *BMC Med. Imaging* **8**, 16 (2008).

FIGURAS SUPLEMENTARES 1 A 19,

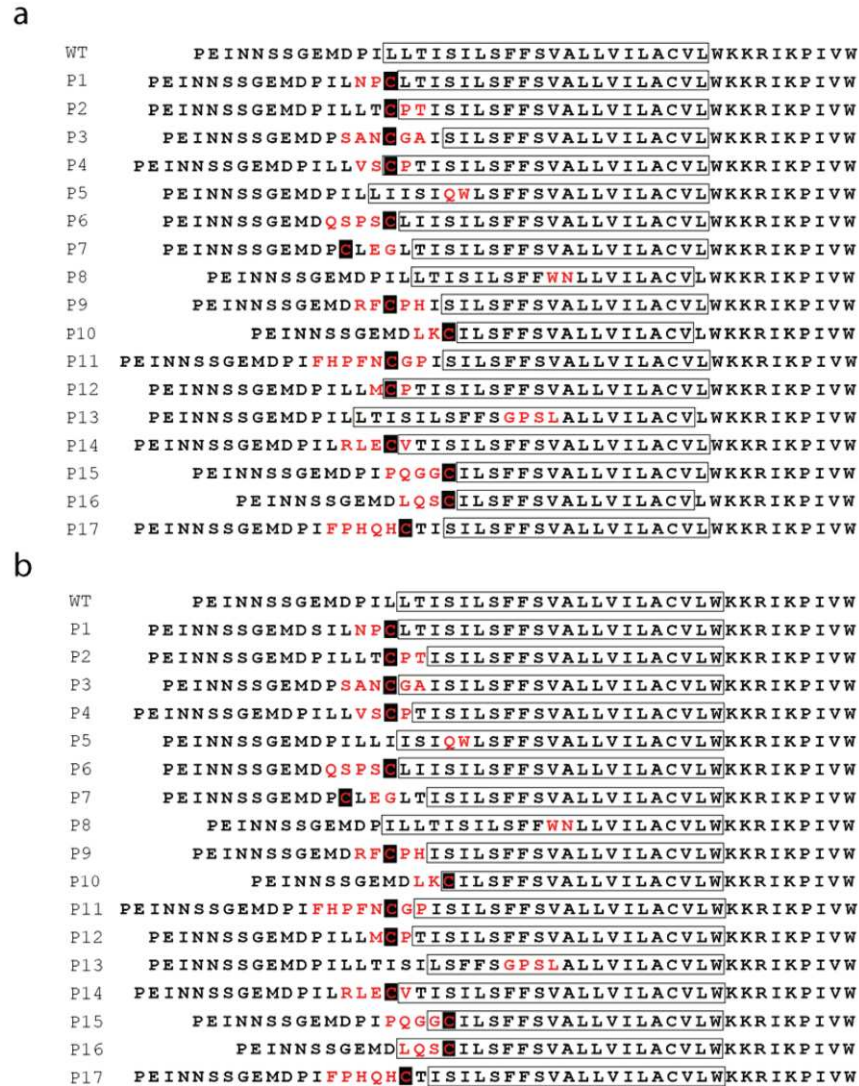
TABELAS 1 e 2

REFERÊNCIAS

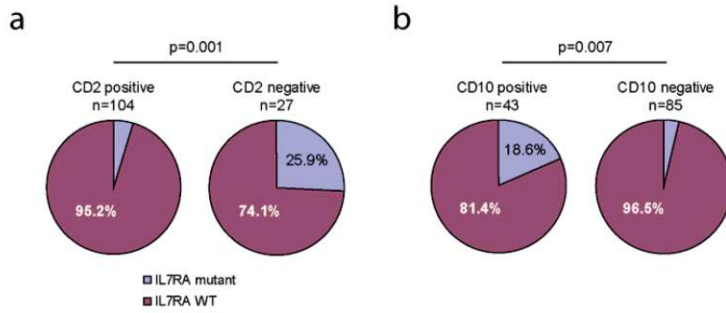
Supplementary Figures



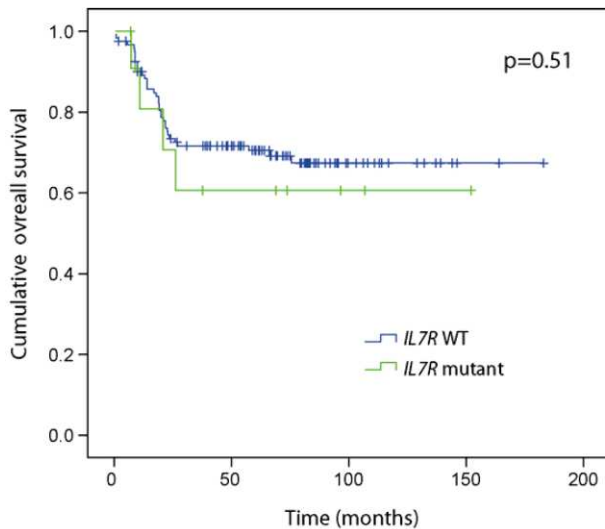
Supplementary Figure 1. *IL7R* exon 6 somatic mutations in pediatric T-ALL. DNA chromatograms of 3 patients from the Boldrini cohort showing the mutated sequences at diagnosis and lack of mutation at remission. The corresponding chromatograms of the remaining 2 patients from the same cohort are shown in Figure 1. Highlighted are the DNA and respective amino acid sequence alterations in each case. Patient P5 has a SNP (c.731C>T; p.T244I) in addition to the indicated QW mutation.



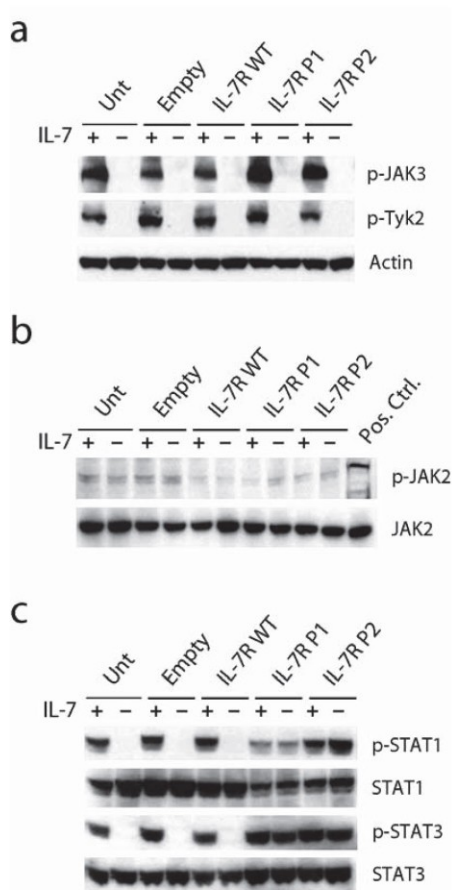
Supplementary Figure 2. The majority of unpaired cysteines created by *IL7R* mutations are predicted to localize extracellularly at the juxtamembrane-transmembrane domain interface. Prediction of core transmembrane helices (TMH, boxed) and localization of mutated amino acids (red), using two distinct bioinformatics tools. **(a)** According to DAS¹ using TM-Library size of 32, the cysteine (cyan) is located extracellularly in 12 patients (6 at the TMH border) and at the extracellular border within the TMH in 2 patients. **(b)** According to TMPRED² the cysteine is located extracellularly in 11 patients (4 at the TMD border) and within the TMD in 3 patients (with 1 at the extracellular border).



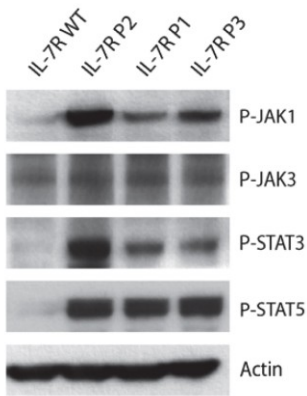
Supplementary Figure 3. Association of *IL7R* mutations with CD2 and CD10. Distribution of *IL7R* mutations among (a) CD2 and (b) CD10 positive versus negative patient samples. P values were calculated using Fisher's exact test.



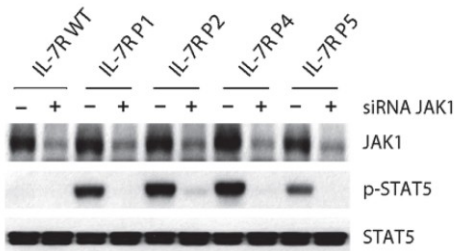
Supplementary Figure 4. Overall survival in pediatric T-ALL cases with and without *IL7R* mutation. Kaplan-Meier survival curve in pediatric T-ALL cases with (*IL7R* mutant, n=12) and without (*IL7R* WT, n=123) mutations in *IL7R* treated on DCOG ALL-7/-8 and -9 (n=66) and COALL-97 protocols (n=69). P value was calculated using Log-Rank test.



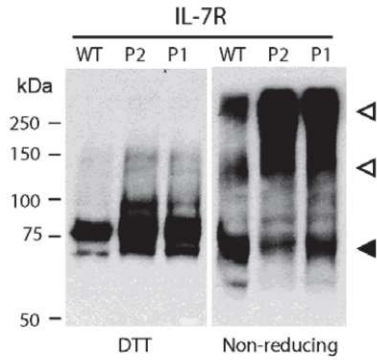
Supplementary Figure 5. Further characterization of JAK/STAT pathway activation in IL-7- versus mutant IL7R-dependent signaling in D1 cells. D1 cells expressing human WT or mutated (P1 and P2) IL-7R α were cultured without IL-7 for 4 hr, stimulated or not with IL-7 for 20 min and evaluated by immunoblot for phosphorylation of **(a)** JAK3 and TYK2, **(b)** JAK2, and **(c)** STAT1 and STAT3. Whereas *IL7R* mutations induce constitutive phosphorylation of STAT1 and STAT3, they do not drive TYK2, JAK2 or JAK3 phosphorylation.



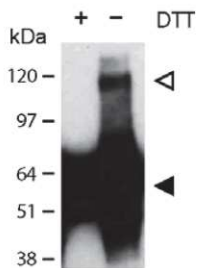
Supplementary Figure 6. *IL7R* mutations induce JAK1, STAT3 and STAT5, but not JAK3, phosphorylation in Ba/F3 cells. Ba/F3 cells expressing human WT or mutated (P1 and P2) *IL-7R α* were cultured without IL-3 for 4 hr and evaluated by immunoblot for phosphorylation of the indicated proteins.



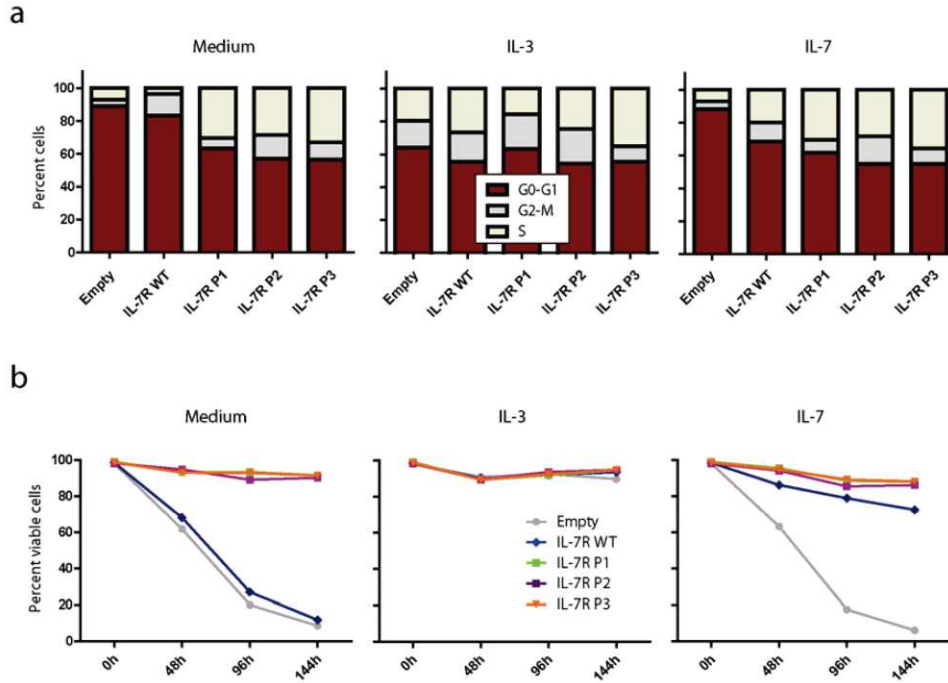
Supplementary Figure 7. JAK1 knockdown abrogates mutant *IL7R*-mediated signaling. 293T cells were transfected with WT or the indicated mutant *IL-7R α* together with siRNA against JAK1 (+) or control non-targeting siRNA (-) and evaluated after 36 hr for JAK1 expression and STAT5 phosphorylation. This blot further illustrates that P5, which displays a mutation not introducing a *de novo* cysteine (T244I, I247_L248insQW; Table 1) is able to promote some degree of constitutive STAT5 phosphorylation, which is also sensitive to JAK1 knockdown.



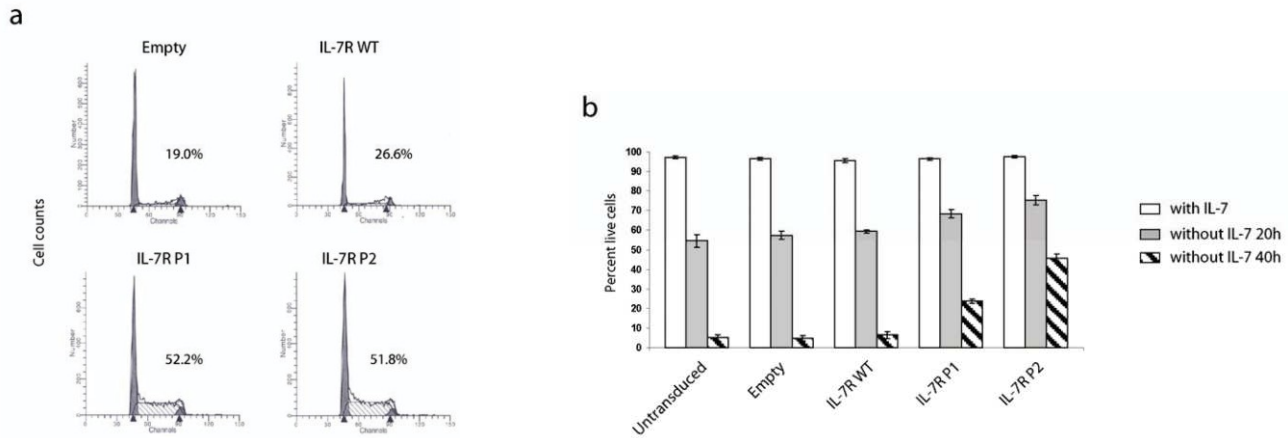
Supplementary Figure 8. IL-7R α mutant, but not wild type, proteins constitutively form redox-sensitive dimers/oligomers in 293T cells. Lysates from 293T cells expressing wild type (WT) or mutant (P1 and P2) IL-7R α were treated or not with the reducing agent DTT and analyzed for IL-7R α expression by immunoblot. The monomeric and dimeric/oligomeric forms of the receptor are denoted by black and white arrows, respectively.



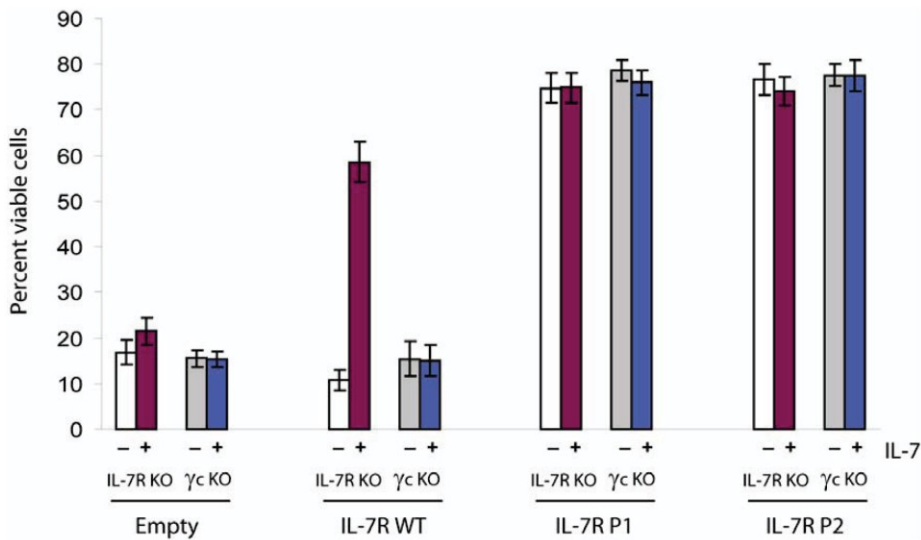
Supplementary Figure 9. IL-7R α mutant proteins constitutively form redox-sensitive dimers/oligomers in *Il7r*^{-/-} BM cells. Lysates from BM cells from *Il7r*^{-/-} mice transduced with P1 mutant *IL7R* were treated or not with the reducing agent DTT and analyzed for IL-7R α expression by immunoblot. The monomeric and dimeric forms of the receptor are denoted by black and white arrows, respectively.



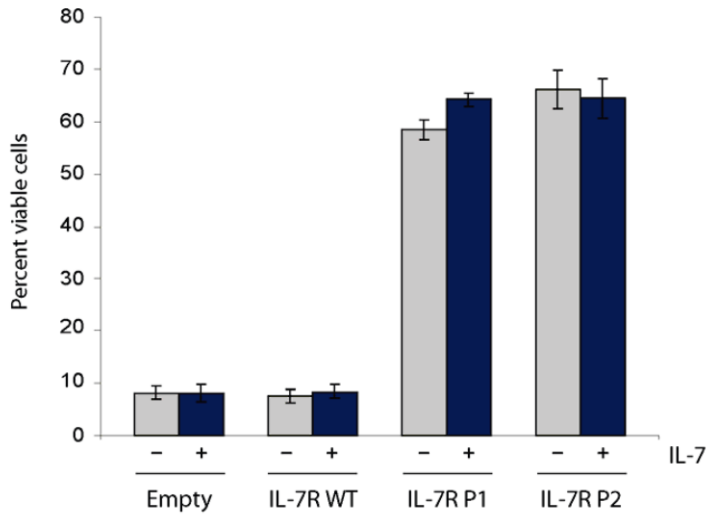
Supplementary Figure 10. *IL7R* mutations induce cell cycle progression and viability in Ba/F3 cells independently of IL-3 or IL-7. Ba/F3 cells stably expressing WT or mutated *IL7R α* were cultured in the absence of growth factors or with IL-3 or IL-7. **(a)** Cell cycle was determined at 96h. **(b)** Viability was evaluated by Annexin V/ 7-AAD staining at the indicated time points. Data represent average of triplicates \pm sem.



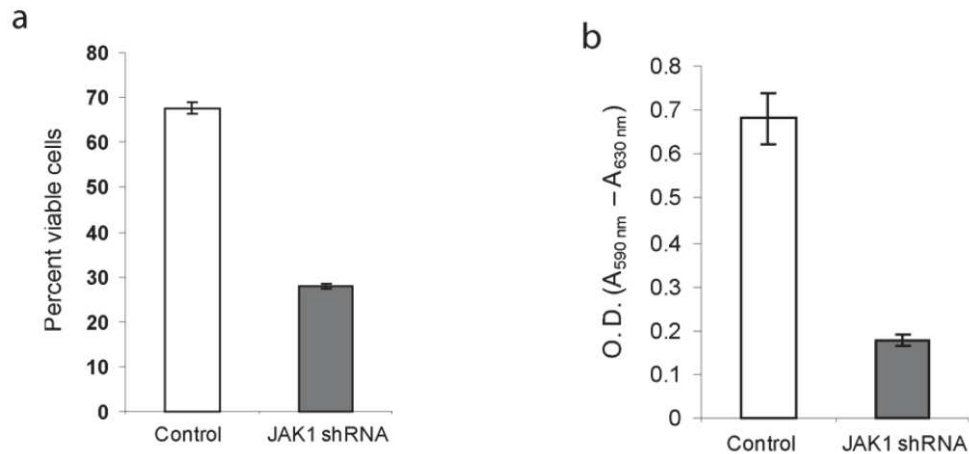
Supplementary Figure 11. *IL7R* mutations induce cell cycle progression and viability in D1 cells independently of IL-7. (a) D1 cells transduced with empty pMIG vector (Empty), IL-7R α wild type (WT), IL-7R α P1 or IL-7R α P2 were analyzed for cell cycle distribution after 24h of IL-7 deprivation. Percentage of cells in cycle (S+G2/M) is indicated for each condition. (b) Viability of D1 cells transduced with empty pMIG vector (Empty), IL-7R α WT, IL-7R α P1 or IL-7R α P2 was assessed after 20h and 40h of IL-7 deprivation. D1 cells cultured in the presence of IL-7 are shown as positive controls. Data represent average of triplicates \pm sem.



Supplementary Figure 12. *IL7R* mutations induce cell viability independently of γ c expression. Bone marrow cells from *Il7r*^{-/-} (IL-7R KO) or *Il2rg*^{-/-} (γ c KO) mice were transduced with the empty pMIG vector (Empty), *IL7R* (IL-7R) WT, *IL7R* P1 or *IL7R* P2 and cultured for 96h with or without IL-7. Viability was evaluated by Annexin V/ 7-AAD staining. Data represent average of triplicates \pm sem.

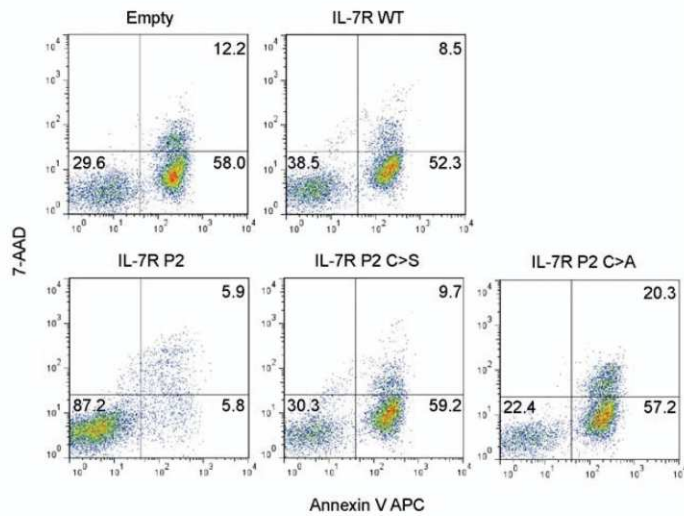


Supplementary Figure 13. *IL7R* mutations induce cell viability independently of JAK3 expression. Bone marrow cells from *Jak3* $-/-$ mice were transduced with the empty pMIG vector (Empty), *IL7R* (IL-7R) WT, *IL7R* P1 or *IL7R* P2 and cultured for 96h with or without IL-7. Viability was evaluated by Annexin V/ 7-AAD staining. Mean \pm sem is indicated for triplicates of each condition.

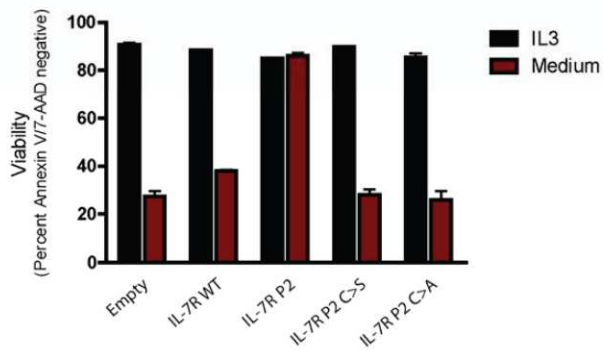


Supplementary Figure 14. *IL7R* mutations induce cell viability and proliferation in a JAK1-dependent manner. D1 cells expressing P1 mutant *IL7R α* were transduced with *Jak1* or control shRNAs. After 24 hr of infection, cells were cultured with IL-7 (50 ng/ml) and puromycin (5 μ g/ml) for 48 hr, and then cultured in medium alone for 48 hr. Viability/Proliferation was analyzed by Annexin V/7-AAD staining (a) and by an MTT assay (b). Mean \pm sem is indicated for triplicates of each condition.

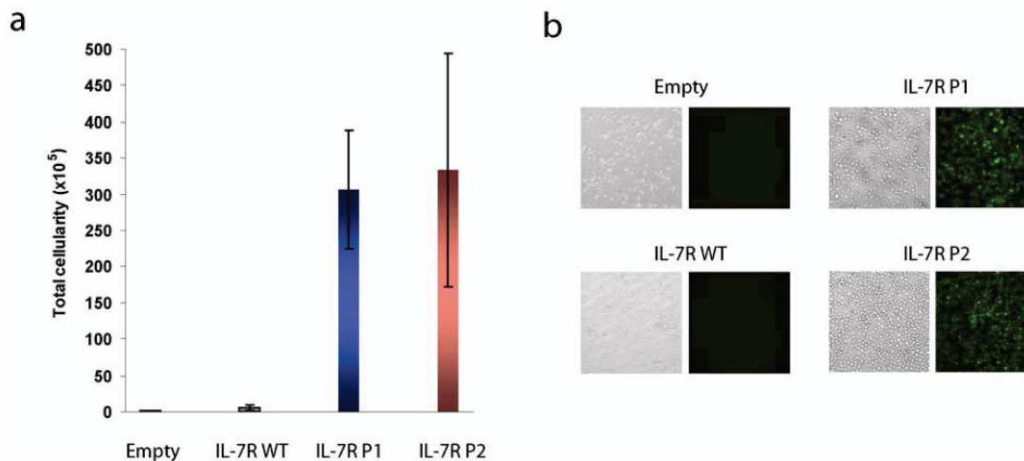
a



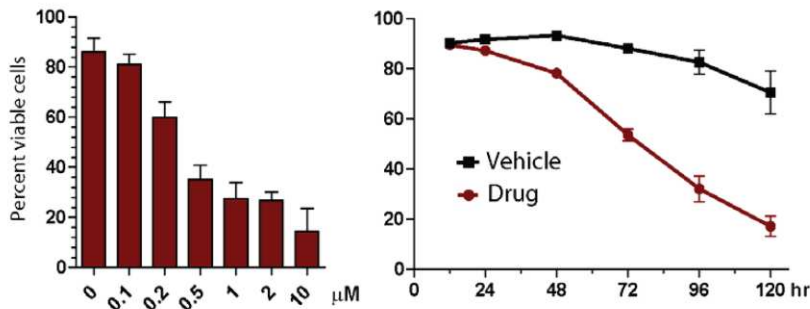
b



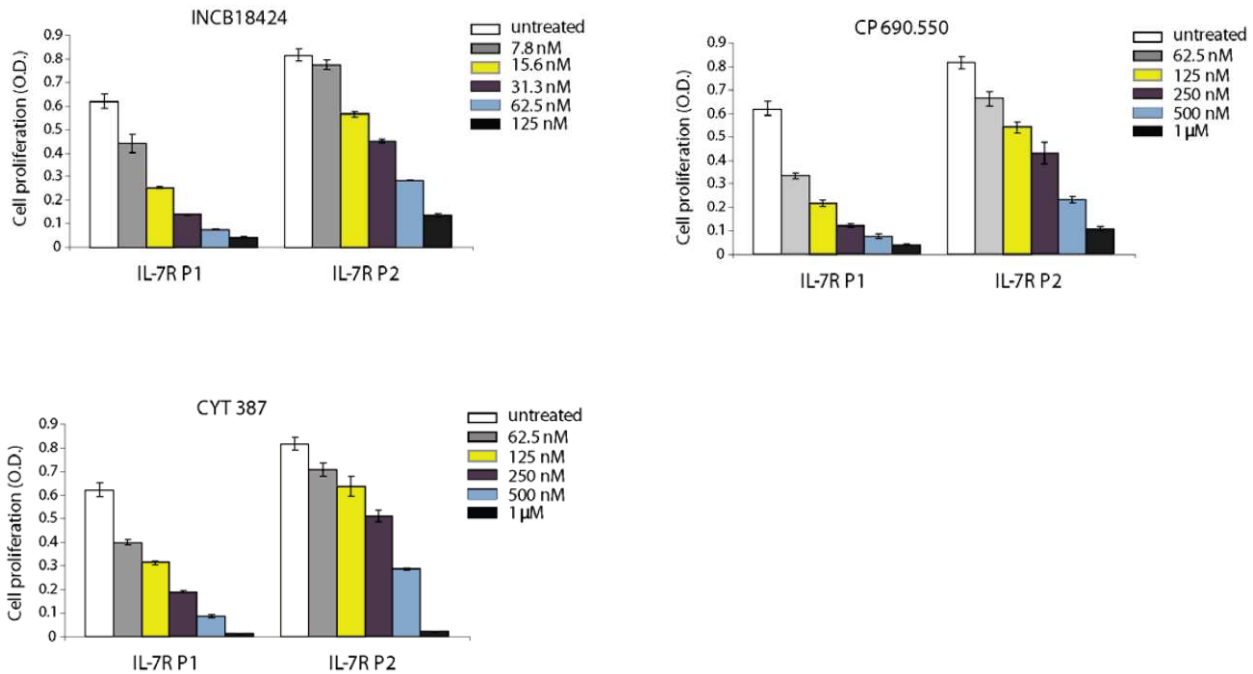
Supplementary Figure 15. Cell viability promoted by *IL7R* mutations depends on the presence of the cysteine introduced *de novo*. Ba/F3 cells stably transduced with pMIG vector (Empty), *IL-7R α* WT, or *IL-7R α* P2 or the indicated P2 cysteine mutants were cultured in cytokine-deprived medium or in the presence of IL-3, and analyzed for cell viability at 48h. Viability was evaluated by Annexin V/ 7-AAD staining. **(a)** Representative dot plots of cells cultured in the absence of cytokines. **(b)** Mean \pm sem of duplicates of each condition.



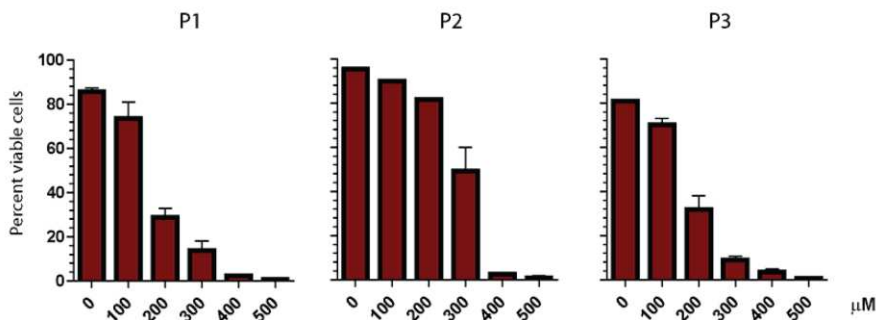
Supplementary Figure 16. Lymph node and liver infiltration in *Rag1*^{-/-} mice subcutaneously injected with D1 cells. (a) Lymph node cellularity and **(b)** representative phase contrast and fluorescence images of lymph nodes from *Rag1*^{-/-} mice 20 days post subcutaneous transplantation of D1 cells. Mean \pm sem is indicated for triplicates of each condition.



Supplementary Figure 17. JAK inhibition reduces cell viability of P2 mutant IL-7R α -expressing Ba/F3 cells. Ba/F3 cells stably expressing mutant IL-7R α P2 were cultured in medium alone with or without JAK inhibitor I at the indicated doses for 72 hr (left) or for the indicated culture periods at 1 μ M (right) and analyzed for cell viability by flow cytometry. Mean \pm sem is indicated for triplicates of each condition.



Supplementary Figure 18. JAK pharmacological inhibitors in clinical use reduce cell viability/proliferation of mutant IL-7R α -expressing D1 cells. D1 cells stably expressing mutant IL-7R α were cultured in medium deprived of IL-7 with or without the indicated clinically-relevant JAK inhibitors and viability/proliferation (shown as O.D.) was determined at 48 hr using an MTT assay. Mean \pm sem is indicated for triplicates of each condition.



Supplementary Figure 19. Dose-dependent cell death induced by STAT5 inhibition in P1, P2 and P3 mutant IL-7R α -expressing Ba/F3 cells. Ba/F3 cells stably expressing the indicated mutant IL-7R α were cultured in medium alone with or without STAT5 inhibitor at the indicated concentrations for 72 hr and analyzed for cell viability by flow cytometry. Mean \pm sem is indicated for triplicates of each condition.

Estudo do IL-7R na Leucemia Linfóide Aguda Pediátrica de linhagem T

Supplementary Table 1. Differentially expressed genes in IL7R mutant versus IL7R wild type pediatric T-ALLs (LIMMA analysis; cut-off FDR p-value=0.05).

Gene Title	Gene Symbol	ID	P.Value	adj.P.Val	logFC
similar to hypothetical protein MGC42630 /// hypothetical protein MGC42630 /// hypothetical LOC504188	LOC158318 /// MGC42630 /// LOC504188	1553590_at	3,77E-09	0,000103	1,284223
proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	PCSK6	207414_s_at	3,54E-09	0,000103	1,435284
---	---	220701_at	2,07E-08	0,000378	-0,86895
carboxypeptidase A6	CPA6	1552511_a_at	1,04E-07	0,001417	1,247438
protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	PKIA	204612_at	1,62E-07	0,001478	-1,70916
interleukin 17D	IL17D	227401_at	1,38E-07	0,001478	-1,51526
dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	DPP4	203716_s_at	2,35E-07	0,001839	2,149853
BAI1-associated protein 2	BAIAP2	1556145_a_at	3,57E-07	0,002443	0,85672
Aryl hydrocarbon receptor	AHR	1559035_a_at	4,21E-07	0,002557	1,263743
hypothetical protein LOC253982	LOC253982	214993_at	6,09E-07	0,003328	0,657823
chromosome 2 open reading frame 23	C2orf23	204365_s_at	7,23E-07	0,003592	-0,77833
toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein	TIRAP	1554091_a_at	1,34E-06	0,005045	-1,07611
tight junction protein 3 (zona occludens 3)	TJP3	213412_at	1,24E-06	0,005045	1,056165
hypothetical protein FLJ13841	FLJ13841	219995_s_at	1,38E-06	0,005045	1,495932
olfactory receptor, family 51, subfamily 8, member 5	OR5185	234775_at	1,14E-06	0,005045	-0,86369
suppressor of cytokine signaling 2	SOC52	203372_s_at	1,96E-06	0,006691	2,636933
CDNA clone IMAGE:5265747	---	1555994_at	3,03E-06	0,009742	0,923981
F-box and leucine-rich repeat protein 16	FBXL16	227641_at	3,73E-06	0,011327	-1,11153
chromosome 1 open reading frame 142	C1orf142	230810_at	4,01E-06	0,011552	-0,71443
dipeptidylpeptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)	DPP4	211478_s_at	4,52E-06	0,012143	2,123167
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	DHRS9	219799_s_at	4,66E-06	0,012143	-0,69388
suppressor of cytokine signaling 2	SOC52	203373_at	5,33E-06	0,01317	2,454919
EPH receptor B2	EPHB2	234158_at	5,54E-06	0,01317	0,806845
spondin 1, extracellular matrix protein	SPON1	209436_at	8,37E-06	0,018298	1,19454
Acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl	ACOX3	243817_at	8,07E-06	0,018298	-0,77482
spondin 1, extracellular matrix protein	SPON1	213994_s_at	9,16E-06	0,019257	1,870146
Xg blood group (pseudautosomal boundary-divided on the X chromosome)	XG	1563420_at	1,23E-05	0,021793	1,451362
spondin 1, extracellular matrix protein	SPON1	209437_s_at	1,15E-05	0,021793	1,246723
Protein kinase C, epsilon	PRKCE	216753_at	1,24E-05	0,021793	-0,81188
hypothetical protein MGC42630	MGC42630	227563_at	1,23E-05	0,021793	0,952581
zinc finger protein 335	ZNF335	78330_at	1,18E-05	0,021793	-0,95327
hypothetical gene supported by AK091454	LOC285382	242447_at	1,37E-05	0,023389	-0,8158
Ryanodine receptor 3	RYR3	241901_at	1,52E-05	0,025124	-0,944
v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	ETS2	201329_s_at	1,57E-05	0,025297	1,003391
LIM homeobox 6	LHX6	224556_s_at	1,62E-05	0,025355	0,707445
growth arrest-specific 2	GAS2	205848_at	1,7E-05	0,02579	2,442036
SH3-domain GRB2-like 3	---	230959_at	1,84E-05	0,027152	1,09072
Death-associated protein kinase 1	DAPK1	237409_at	2,1E-05	0,030229	1,255728
family with sequence similarity 49, member A /// family with sequence similarity 49, member A	FAM49A	208092_s_at	2,22E-05	0,03109	-0,89989
hypothetical gene supported by BC028053	LOC440569	1569386_at	2,34E-05	0,03183	0,901727
cysteinyl leukotriene receptor 2	CYSLTR2	220813_at	2,5E-05	0,03183	1,224922
protocadherin beta 13	PCDH13	221450_x_at	2,41E-05	0,03183	0,676771
Adaptor-related protein complex 4, epsilon 1 subunit	AP4E1	241174_at	2,46E-05	0,03183	-0,90015
syndecan binding protein (syntenin) 2	SDCBP2	233565_s_at	2,62E-05	0,032525	-0,83116
src family associated phosphoprotein 1	SCAP1	205790_at	2,74E-05	0,032776	-1,33791
homeo box A9	HOXA9	209905_at	2,82E-05	0,032776	2,043246
Rho GTPase activating protein 10	ARHGAP10	239567_at	2,78E-05	0,032776	-1,09894
Rho GTPase-activating protein	RIC5	203431_s_at	2,9E-05	0,033081	-1,34478
enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	EZH2	203358_s_at	3,19E-05	0,034046	-0,65741
defensin, alpha 6, Paneth cell-specific	DEFA6	207814_at	3,3E-05	0,034046	1,288429
chromosome 1 open reading frame 105	C1orf105	214357_at	3,17E-05	0,034046	-1,08944
brain and acute leukemia, cytoplasmic	BAALC	218899_s_at	3,24E-05	0,034046	1,652154
chromosome 1 open reading frame 116	C1orf116	219856_at	3,17E-05	0,034046	0,519867
Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	KCNQ10T1	237249_at	3,36E-05	0,034049	0,77784
olfactory receptor, family 5, subfamily U, member 1	OR5U1	234545_at	3,57E-05	0,035492	-0,88816
hypothetical gene LOC133874	LOC133874	1554115_at	3,76E-05	0,036728	-0,59776
spondin 1, extracellular matrix protein	SPON1	213993_at	3,88E-05	0,036764	1,5679
chromosome 1 open reading frame 165	C1orf165	219670_at	3,97E-05	0,036764	-0,95235
Hypothetical protein LOC441168	LOC441168	228362_s_at	4,02E-05	0,036764	0,930994
Solute carrier family 35, member F3	SLC35F3	231520_at	4,03E-05	0,036764	0,83601
Protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	PKIA	1563217_at	4,17E-05	0,037264	-1,61645
myosin, heavy polypeptide 14	MYH14	217660_at	4,23E-05	0,037264	0,906789
CDNA clone IMAGE:4828909	---	1563283_at	4,32E-05	0,037511	-1,00588
down-regulated in gastric cancer GDDR	GDDR	238222_at	4,48E-05	0,038288	-0,75619
v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)	SRC	1558211_s_at	4,58E-05	0,038522	-0,7583
EPH receptor B2	EPHB2	210651_s_at	4,67E-05	0,038692	-0,68255
CDNA clone IMAGE:4694535	---	1564760_at	4,79E-05	0,039111	-0,8968
Chromosome 2 open reading frame 27	C2orf27	230336_at	4,9E-05	0,039372	1,039966
Vacuolar protein sorting 13A (yeast)	VPS13A	1570295_at	4,99E-05	0,039466	-0,87781
ethanolamine kinase 2	ETNK2	219268_at	5,05E-05	0,039466	-0,76813
uronyl-2-sulfotransferase	UST	205138_s_at	5,16E-05	0,039748	0,855043
hypothetical protein LOC144481	LOC144481	1559315_s_at	5,42E-05	0,040594	1,169696
thioesterase domain containing 1	THEDC1	222945_x_at	5,36E-05	0,040594	-1,00074
UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast)	FLJ12787	221038_at	5,56E-05	0,041075	-0,9038
Similar to ZNF43 protein	---	1565748_at	5,74E-05	0,041867	-0,69271
SLAM family member 6	SLAMF6	1552497_a_at	6,07E-05	0,043684	-0,6851
Four and a half LIM domains 2	FHL2	1557274_at	6,62E-05	0,046982	-0,70083
multimerin 2	MMRN2	219091_s_at	6,8E-05	0,047662	-0,67255
hypothetical gene supported by AK091527	FLJ34208	1566761_a_at	7,11E-05	0,048614	-0,64129
Amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	APLP2	208701_at	7,05E-05	0,048614	-0,91316

Supplementary Table 2. Primers used for *IL7R*, *JAK1* (JH2), and *JAK3* (JH2) RT-PCR, sequencing and cloning.

Primer	Sequence (5' → 3')	5'-3' position (size)	Fragment size
IL7R_exF	CCCTCCCTTCTCTTACTCTCA	13 – 34 (22) ^a	589 bp
IL7R_exR	TGGCGGTAAGCTACATCGTG	601 – 582 (20) ^a	
IL7R_trF	AGCCAATGACTTTGTGGTGAC	515 – 535 (21) ^a	606 bp
IL7R_trR	ACATCCCTCCAAGCCTCT	1120 – 1102 (19) ^a	
IL7R_inF	CAGAGGCTTGGAGGGGATGT	1101 – 1120 (20) ^a	416 bp
IL7R_inR	AATCATCTTTGTGCTCACGGT	1516 – 1495 (22) ^a	
IL7R_hapF	CACTCACTGACCTGTGCTTTT	246 – 266 (21) ^a	673bp
IL7R_hapR	GGAGACTGGGCCATACGATA	918 – 899 (20) ^a	
IL7R_ex8F	TCCTATCTTACTAACCATCAGCATTT	806 – 831 (26) ^a	788bp
IL7R_ex8R	GACTGTGTAGTGGGGTTTTGCT	1593 – 1572 (22) ^a	
Jak1JH2_aF	AGGAGTGGCAGCCCGTCTA	1934 – 1952 (19) ^a	485 bp
Jak1JH2_aR	GGCCAGGAGGAGTTTTTAGT	2418 – 2398 (21) ^a	
Jak1JH2_bF	AATCAAAGTTGCCAAACAGCT	2321 – 2342 (22) ^a	527 bp
Jak1JH2_bR	GTCCAATTCAGTTGCTGGTTTT	2847 – 2826 (22) ^a	
Jak3JH2_aF	CGTAGATGGGGTGGCAGTG	1489 – 1507 (19) ^a	526 bp
Jak3JH2_aR	CAGATAGTTGAGGGCGTAGGC	2014 – 1994 (21) ^a	
Jak3JH2_bF	GCCTACGCCCTCAACTATCTG	1994 – 2014 (21) ^a	523 bp
Jak3JH2_bR	CACCATTCCACAGCCCATC	2516 – 2498 (19) ^a	
IL7R_exon6F	CAAAGCACCTGAGACCCTAC	17400 – 17420 (21) ^b	278bp
IL7R_exon6R	TTCGTGAAATGCCTTAATCCC	17667 – 17657 (21) ^b	
IL7R 3U32	<u>GTGGTACCCTCCCTCCCTTCTCTTACTCTCA</u>	(32) ^c	1470bp
IL7R 1434L39	<u>GGGCCCGGGTTTTGGTAGAAGCTGGACATGGTGACATA</u>	(39) ^c	
hIL7R5'BglIII	CGTACAGATCTCCCTTCTCTTACTCTCA	(29) ^c	1476bp
hIL7R3'EcoRI	TACGGAAATTCAGCCGGGGTTTTGGTA	(27) ^c	
hIL7R_cP1s	AGATGGATCCTATCTTAAACCCAaGCCTAACCATCAGCAT	799 – 829 (40) ^c	151bp
hIL7R_cP2s	AGATGGATCCTATCTTACTAACTTcTCCCACCATCAGCATTTT	799 – 832 (43) ^c	
hIL7R_cP2a	AGATGGATCCTATCTTACTAACTgcTCCCACCATCAGCATTT	799 – 831 (42)	
hIL7R_BbsI	CAAAGATGTTCCAGAGTCTTCTTATGATCGGGGAGACTG	949 – 911 (39)	

^a Positions according to NCBI reference of coding sequences NM_002185.2 (*IL7R*), NM_002227.2 (*JAK1*), NM_000215.3 (*JAK3*).

^b Positions refer to flanking intronic regions of exon 6 according to NCBI reference of genomic sequence NT_006576.16

^c The cloning restriction sites are underlined. Nucleotide changes for site-directed mutagenesis are noted in small caps. Positions refer to hybridization in the coding sequences of NM_002185.2 (*IL7R*).

Supplementary References

1. Cserzo, M., Eisenhaber, F., Eisenhaber, B. & Simon, I. On filtering false positive transmembrane protein predictions. *Protein Eng* **15**, 745-52 (2002).
2. Hofmann, K. & Stoffel, W. TMbase: A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **374**, 166 (1993).

4. RESULTADOS COMPLEMENTARES E DISCUSSÃO

Nesta seção serão discutidos mais detalhadamente alguns pontos apresentados no artigo publicado na revista *Nature Genetics*, bem como resultados complementares e perspectivas. No entanto, é importante dizer que não serão detalhados os resultados de microarranjo, agrupamento gênico e inibidores de JAK e STAT. Vale lembrar que esta tese é fruto da colaboração com centros de pesquisa da Europa e dos Estados Unidos, de modo que nem todos os resultados publicados no artigo foram realizados pela doutoranda.

4.1. Há alguma associação de polimorfismo do IL7R e ocorrência da LLA-T pediátrica?

Como já dito anteriormente, o gene do IL-7R α sofre *splicing* alternativo, gerando isoformas solúvel e ligada à membrana, além de apresentar polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs). Estes SNPs foram relacionados a um maior risco de desenvolver esclerose múltipla e podem influenciar na distribuição relativa das variantes de *splicing* do IL-7R α (Gregory *et al.*, 2007; Lundmark *et al.*, 2007).

Sabendo da importância da IL-7 e das moléculas envolvidas nas vias de sinalização desencadeadas pelo IL-7R na leucemogênese, procuramos por polimorfismos genéticos no transcrito de IL-7R α que estivessem associados aos casos de LLA-T em comparação com doadores normais. A figura 7 mostra a localização dos *primers* utilizados na amplificação dos transcritos de IL-7R α , JAK1 e JAK3.

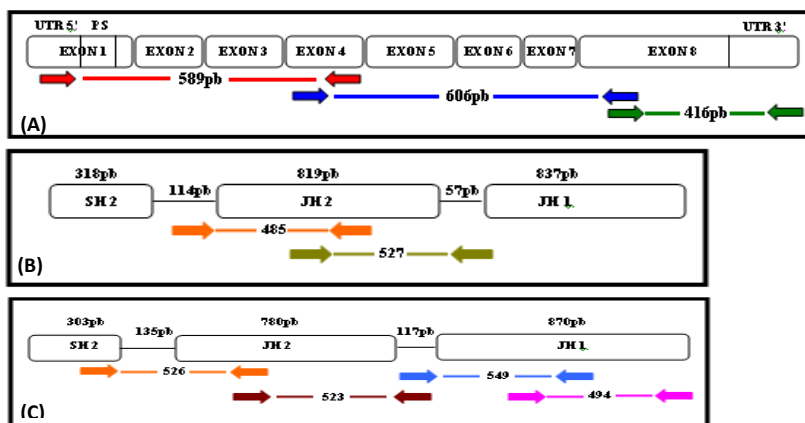


Figura 7. Estratégia de sequenciamento dos genes IL7R α , JAK1 e JAK3. Fragmentos amplificados para os transcritos de (A) IL-7R, (B) domínio JH2 de JAK1 e (C) domínios JH1 e JH2 de JAK3. Os oligonucleotídeos foram estrategicamente desenhados para amplificarem fragmentos intercalantes entre 500 e 700pb de, aproximadamente, 76 pacientes consecutivos de LLA-T.

Na análise dos domínios JH1 e JH2 de JAK3 não encontramos nenhuma variação genética nos pacientes LLA-T estudados, mas encontramos 3 polimorfismos sinônimos em JAK1-JH2, sendo dois no éxon 14 e um, no éxon 15 (tabela 1). Neste caso, não foi feita análise de doadores normais.

Tabela 1. Polimorfismos encontrados em JAK1-JH2 nos pacientes LLA-T pediátricos. Nenhum dos polimorfismos encontrados levou à mudança de aminoácido.

JAK1-JH2	éxon 14 Serina AGC(683)	éxon 14 Alanina GCC(699)	éxon 15 Prolina CCA(733)
Pacientes analisados	52	52	50
Genotipos	CC = 37 (0,71)	CC = 47 (0,9)	AA = 25 (0,5)
	CT = 14 (0,27)	CG = 04 (0,08)	AG = 21 (0,42)
	TT = 01 (0,02)	GG = 01 (0,02)	GG = 4 (0,08)
Alelos	104	104	100
	C = 88 (0,85)	C = 98 (0,94)	A = 71 (0,71)
	T = 16 (0,15)	G = 6 (0,06)	G = 29 (0,29)

Quanto ao IL-7R α , as amostras de LLA-T analisadas apresentaram 5 SNPs que já são descritos na literatura. Todos os SNPs encontrados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e 4 deles levam à mudança de aminoácido. A tabela 2 mostra maiores detalhes e compara a frequência do alelo menos abundante encontrado na LLA-T com os resultados da literatura. Foi identificada uma tendência da LLA-T apresentar o alelo 138I (rs1494555, éxon 4) ($p = 0,0920$). O SNP rs1494555/GG (éxon 4) foi descrito como associado a risco de doença de enxerto versus hospedeiro em transplante de medula óssea (Shamim *et al.*, 2011). Futuros estudos serão necessários para identificar algum possível efeito funcional deste SNP na LLA-T.

Houve também tendência a maior frequência do alelo 244T (rs6897932, éxon 6) ($p = 0,0932$). Este SNP faz parte do haplótipo 2 do IL-7R α (Teutsch *et al.*, 2003) e tem um efeito funcional na expressão gênica, sendo considerado um polimorfismo de risco para esclerose múltipla quando o alelo ‘C’ é encontrado em homozigose, pois favorece a formação da isoforma solúvel do IL-7R α , interferindo na sinalização pela IL-7 nos linfócitos T. A esclerose múltipla é uma doença autoimune, na qual células T antigênicas causam a destruição da bainha de mielina que recobrem e isolam as fibras nervosas. Um desbalanço na proporção de IL-7R α ligado à membrana e isoformas solúvel ira reforçar essa resposta autoimune das células T, visto que o IL-7R α tem um papel fundamental na resposta inflamatória e imunológica, bem como no desenvolvimento dos

linfócitos T (Gregory *et al.*, 2007). O efeito destes SNPs na função do IL7R α na LLA-T ainda tem que ser melhor estudado.

Tabela 2. Polimorfismos no gene da IL7R, em amostras de pacientes com LLA-T e indivíduos saudáveis.

SNPs ^a	LLA-T	Controle	Teutsch <i>et al</i> (2003) ^b	Gregory <i>et al</i> (2007) ^b	Chi-square <i>p</i> -value LLA-T vs Controle
éxon 2 (ATC)	n=68	n=34			
TT	8	4	0.12		0.9887
TC	25	13	0.37		
CC	35	17	0.51		
T			0.30	0.31	0.38
éxon 4.1 (GTC)	n=70	n=65			
GG	3	10	0.04	0.15	0.0920
GA	29	24	0.41	0.37	
AA	38	31	0.54	0.48	
G			0.25	0.34	0.31
éxon 4.2 (CAC)	n=70	n=65			
TT	1	1	0.01	0.15	0.3341
TC	12	18	0.17	0.28	
CC	57	46	0.81	0.70	
T			0.10	0.15	0.15
éxon 6 (ACC)	n=73	n=97			
TT	5	1	0.07	0.01	0.0932
TC	23	27	0.32	0.28	
CC	45	69	0.62	0.71	
T			0.23	0.15	0.67 ^c
éxon 8 (ATC)	n=47				
GG	9		0.19		
GA	18		0.38		
AA	20		0.43		
G			0.38	0.26	

^a SNPs: éxon 2 (rs1494558), I66T; éxon 4.1 (rs1494555), V138I; éxon 4.2 (rs7737000), sinônimo H165H; éxon 6 (rs6897932), I244T; éxon 8 (rs3194051), V356I. ^b Frequência do alelo menos abundante em controles normais dos estudos citados. ^c Teutsch *et al.* calcularam frequência de 'pooled DNA' com mistura de 187 amostras.

4.2. Mutações em outros receptores da família γc

A identificação de sinais críticos para a fisiopatologia da LLA-T deve contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas mais eficazes. As interleucinas (IL)-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 pertencem a uma família de citocinas, cujos receptores compartilham a cadeia γ comum (γc). Apesar da existência de alguma redundância na função destas citocinas, elas também têm efeitos essencialmente distintos e muitas vezes críticos para os processos de regulação normal do desenvolvimento, sobrevivência, proliferação e diferenciação das células T.

A IL-2 é um fator de crescimento relacionado com a regulação da proliferação e apoptose de células T ativadas (D'Souza e Lefrançois, 2003), induzem função de lise nas NK e produção de imunoglobulinas pelas células B (Kim *et al.*, 2006). A IL-4 está envolvida com o desenvolvimento e função das células Th2 e tem função na troca de classes da imunoglobulina IgG1 para IgE (Holgate e Polosa, 2008; Nelms *et al.*, 1999). A IL-9 é produzida por células CD4+ (Nowak e Noele, 2010) e induz ativação de células epiteliais, células B, eosinófilos e mastócitos, porém sua função na biologia das células T ainda não é muito clara. Camundongos deficientes para IL-9 não apresentam alterações no desenvolvimento do compartimento linfóide, no entanto eles apresentaram uma excessiva produção de muco e elevada proliferação de mastócitos (Townsend *et al.*, 2000). A IL-15 é essencial para o desenvolvimento de células NK (Lodolce *et al.*, 1998) e proliferação homeostática das células T CD8⁺ de memória (Suhr e Sprent, 2008). A IL-21 é a mais recentemente descrita entre os membros de interleucinas da família de γc . Tem um amplo espectro de ação, incluindo indução da diferenciação de células B em plasmócitos, efeito sinérgico com IL-7 ou IL-15 na expansão das CD8⁺, além de atuar como um fator pro-apoptótico para células NK e células B incompletamente ativadas (Spolski e Leonard, 2008).

Além das funções mencionadas, estas citocinas dependentes de γc também têm importante participação na sobrevivência de células ativadas do sistema imunológico. A regulação da sobrevivência e apoptose celular deve ser bastante ajustada, de maneira que a ação balanceada de todas estas interleucinas é extremamente importante. Um desajuste na função de uma delas pode ter um impacto profundo na homeostase do sistema imune. Numerosos estudos já têm mostrado que estas interleucinas também estão implicadas, direta ou indiretamente, na leucemogênese de células T (Barata *et al.*, 2004). A figura 8 mostra um esquema de todos os receptores que compartilham γc .

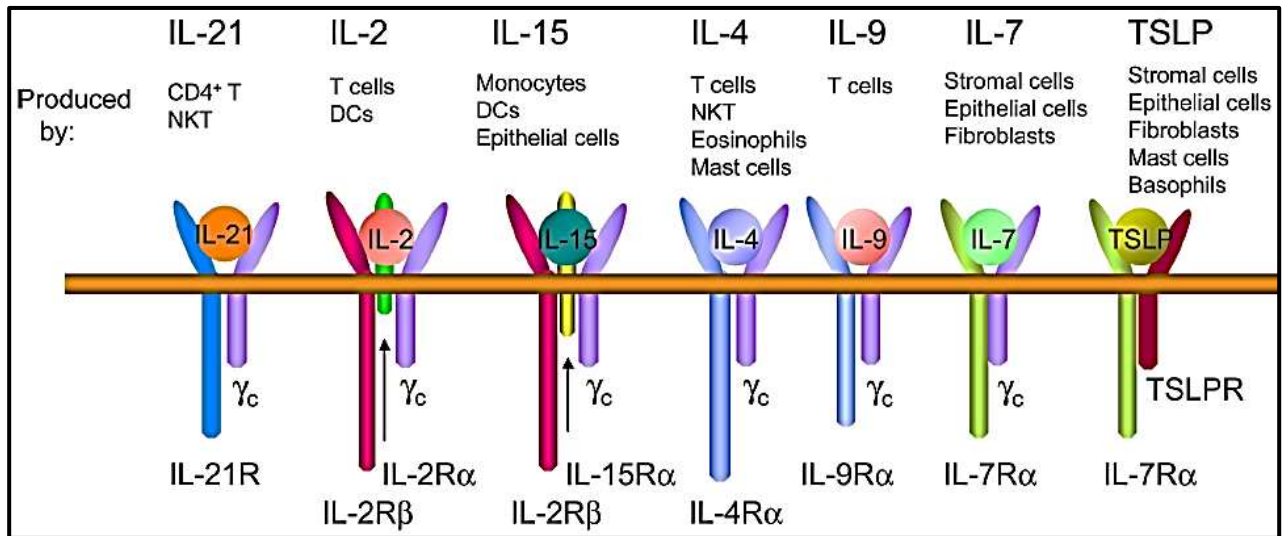


Figura 8: Receptores para citocinas da família γ_c e para TSLP. Mostrando os receptores para IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 e TSLP. IL-2 e IL-15 são as únicas que têm receptores com 3 cadeias. De todas as citocinas mostradas, o único que não compartilha γ_c é o TSLP, que compartilha a cadeia alfa de IL-7. Cada uma das citocinas da família γ_c ativa JAK1 e JAK3, exceto TSLP que não ativa JAK (Liu *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2000).

Sabendo do potencial efeito destas interleucinas no surgimento da LLA-T, surgiu a questão se não poderiam ocorrer mutações ativadoras nestes receptores que compartilham γ_c , igualmente às identificadas em IL-7R α . Assim, amostras de DNA de 50 pacientes LLA-T, incluindo os 5 portadores do IL-7R α mutado (daqui para frente IL-7Rmut), e de 50 doadores normais foram analisadas para mutações no domínio transmembrana dos receptores de IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21. Oligonucleotídeos flanqueando os éxons correspondentes ao domínio transmembrana foram utilizados para as reações de PCR, realizadas do mesmo modo descrito para IL-7R α (materiais e métodos no manuscrito). A tabela 3 contém maiores detalhes sobre os oligonucleotídeos utilizados. A presença de mutação foi verificada pelo sistema de homo-heteroduplex de acordo com Langerak e colaboradores (1997).

O resultado seria considerado positivo para presença de mutação se houvesse presença de bandas com tamanho diferente do esperado. Na figura 9 estão alguns géis das amostras analisadas. Algumas amostras foram sequenciadas devido à ocorrência de bandas diferenciadas, no entanto, o sequenciamento não confirmou a ocorrência de mutação. Provavelmente estes heteroduplex são formados devido à presença de sequências repetitivas que causam uma renaturação errada, formando alças no DNA.

Tabela 3: Primers utilizados na amplificação do domínio transmembrana dos receptores da família γc .

Receptor	Primer	Sequencia (5'-3')	TM	Tamanho
IL2R α	IL2Raex6F	AGCCTCGTGCTGTCTAAAAGT	58.4	313bp
	IL2Raex6R	CAACTAACCTCCCAACCTACGA	58.8	
	IL2Raex7F	AGCCTCCGCCTTGCTCTT	59.7	302bp
	IL2Raex7R	CCCTTTGCCACTCCCTGAACTG	58	
IL4R	IL4Rex6F	CATGGCTGACCTCAGCTCATGG	61.9	233bp
	IL4Rex6R	AGTAAATGCGTATTATTGACTGAGAGG	60.4	
IL9R	IL9Rex6F	CCTTTGCCAGGTGGGTTTG	61	455bp
	IL9Rex6R	CCTTATCTTCAGCCTCTGCCTC	60.1	
IL15R	IL15Raex6Fa	CGAGCCGTGATGCTGTCC	60.1	114bp
	IL15Raex6Ra	ACTGCGGTCACCTGATCATA	60.1	
	IL15Raex6Fb	GTGGTTCGTAGCAATGAATGTG	58.2	188bp
	IL15Raex6Rb	CTTTTCTCATGGGGAAGTCTAAC	57.1	
IL21R	IL21Rex6F	CTACCCTCTTCCACTCTACCCC	58.8	285bp
	IL21Rex6R	GTTTTCCAACCTGCATGTATC	58.8	

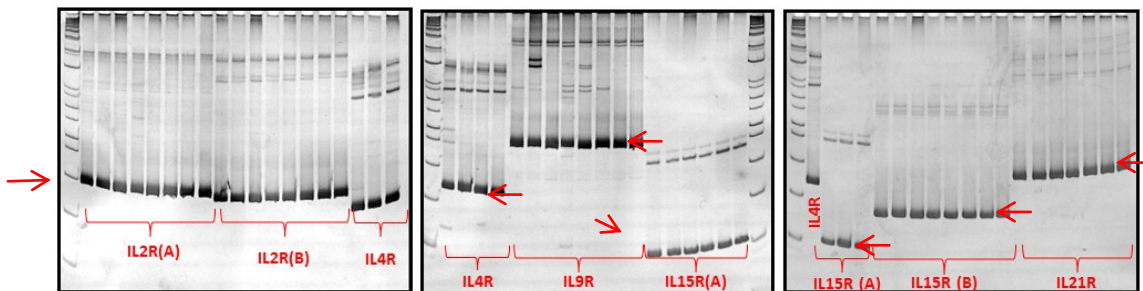


Figura 9: Homo-heteroduplex dos receptores de interleucinas dependentes de γc . As setas indicam o tamanho esperado do fragmento amplificado em cada receptor.

4.3. Papel do TSLPR (CRLF2) e KIT no funcionamento do IL7R mutante

É sabido que o IL7R α forma heterodímeros com o receptor da linfopoetina do estroma tímico (TSLPR ou CRLF2) (Park *et al.*, 2000). Sendo assim, era interessante saber se o TSLPR poderia contribuir ou modificar a ativação constitutiva do IL-7Rmut. Recentemente foram descritas alterações gênicas no locus do TSLPR que levam a um tipo mais agressivo de LLA pediátrica B-derivada (Mullighan *et al.*, 2009 Yoda *et al.*, 2010; Russel *et al.*, 2009). Essa questão foi facilmente abordada, simplesmente averiguando se as amostras de LLA-T expressavam o TSLPR juntamente com o IL7R

mutado. Como mostra a figura 10, nem todas as amostras de LLA-T analisadas apresentaram expressão de TSLPR, o que descarta a hipótese de alguma interação com o IL-7Rmut.

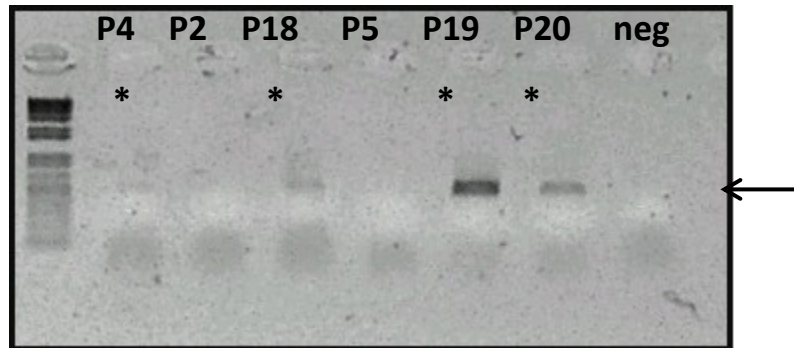


Figura 10: Expressão do TSLPR em LLA-T. Amplificação do transcrito de TSLPR em amostras de LLA-T ao diagnóstico por PCR. Os asteriscos nas amostras LLA-T P4, P18, P19 e P20 destacam as amostras que amplificaram o transcrito de TSLPR; P4, P2 e P5 são amostras de pacientes LLA-T com mutação no IL7R.

Na publicação do nosso artigo de tese, outro grupo de pesquisa publicou uma análise extensiva de mutações no IL-7R α em LLA B-derivada, inicialmente em pacientes com síndrome de Down. Tendo como pista inicial a presença de mutações no *TSLPR*, eles previam que mutações no IL7R α também poderiam existir na LLA. A LLA-B derivada é um tipo de leucemia que tem o IL-7R α constitutivamente expresso e forma um receptor ativo para TSLP (mas não para IL-7) quando há uma expressão aberrante do CRLF2 (TSLPR). Os autores encontraram 0,6% de mutações envolvendo substituição de serina para cisteína, ou inserções *in frame* e/ou deleções no domínio transmembrana do IL-7R α , que conferiram um fenótipo ativado para os receptores mutados. Eles também estudaram pacientes com LLA-T e encontraram mutações no IL-7R α , que inseriram cisteína e conferiram ganho de função e crescimento independente de TSLP em 10,5% dos casos. Porém alguns mutantes eram dependentes de CRLF2 para sinalizar (Shochat *et al.*, 2011).

Outra proteína de membrana que interage diretamente com IL-7R α é KIT. Em células T e em células não linfóides, esta onco-proteína e o IL-7R α interagem diretamente através do domínio transmembrana (Jahn *et al.*, 2007). KIT ativada é capaz de induzir a fosforilação de IL-7R α ou γ c independentemente de JAK3, indicando que estas cadeias são substratos diretos de KIT e que esta proteína também é capaz de ativar alvos *downstream* ao IL-7R, como JAK3 e STAT5. Como a mutação do IL-7R α é no domínio TM, desconfiamos que o mesmo (IL7Rmut) poderia estar

interagindo diferentemente com KIT. Sendo KIT um oncogene ‘consagrado’, que se apresenta mutado nas leucemias agudas - principalmente nas de linhagem mieloide, mas também nas linfóides – poderíamos supor que o maior efeito das mutações no IL-7Rmut seria alterar a via de KIT. Para abordar estes questionamentos, verificamos fosforilação de KIT em linhagem de timócitos D1 (ver abaixo maiores detalhes desta linhagem celular) transduzidas com o IL-7Rmut ou selvagem. Como mostra a figura 11, nem a IL-7, nem o IL-7Rmut foram capazes de ativar esta onco-proteína.

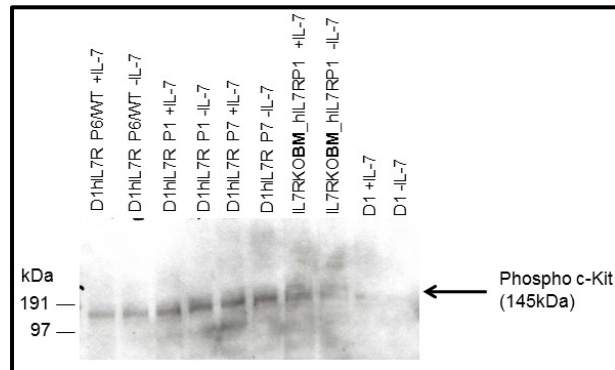


Figura 11: Fosforilação de c-KIT por IL-7. Células D1 e células da medula óssea (BM) de camundongos deficientes para IL-7R, foram transfectadas com IL-7Rmut ou IL-7R selvagem e tratadas por 20 minutos com IL-7 ou não. A fosforilação não foi diferente para os tratamentos, indicando que a via da IL-7 não está interferindo na ativação de c-KIT.

É sabido que mutações nos éxons 11 e 18 do DNA de KIT estão fortemente relacionadas com a ocorrência de melanomas (Torres-Cabala *et al.*, 2009), ativação constitutiva de KIT em linhagens de células hematopoiéticas (Kitayama *et al.*, 1995), em câncer de pulmão (SCLC) (Burger *et al.*, 2003) e outros. Sendo assim, os éxons 11 e 18 do DNA de KIT, de 8 tipos de linhagens celulares e em 9 pacientes com LLA-T, incluindo os pacientes P1 a P5, foram amplificados por PCR e sequenciados a fim de verificar possíveis ocorrências de mutações (figura 12). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar o DNA de KIT são descritos na tabela 4. Novamente, a hipótese foi refutada, pois nenhuma mutação ou algum polimorfismo em KIT foram detectados, o que indica que a ativação constitutiva do IL-7R α é devida apenas à homodimerização das cadeias alfa como descrito no manuscrito que compõe esta tese. Restava então entender como que as mutações estavam possibilitando a formação destes dímeros, bem como confirmar o mesmo resultado em células de mamífero expressando a cadeia alfa completa.

Tabela 4: Primers utilizados na amplificação do DNA de KIT.

DNA <i>KIT</i>	Sequencia 5' - 3'	TM	Tamanho
Éxon 11 (sense)	TGCATTATTGTGATGATTCTGACC	61	320bp
Éxon 11 (anti-sense)	CCTTAAAGTCACTGTTATGTGTACCC	59	
Éxon 18 (sense)	TTTCAGCAACAGCAGCATCTATAAG	62	296bp
Éxon 18 (anti-sense)	TAATCACAAGGAAGCAGGACACC	63	

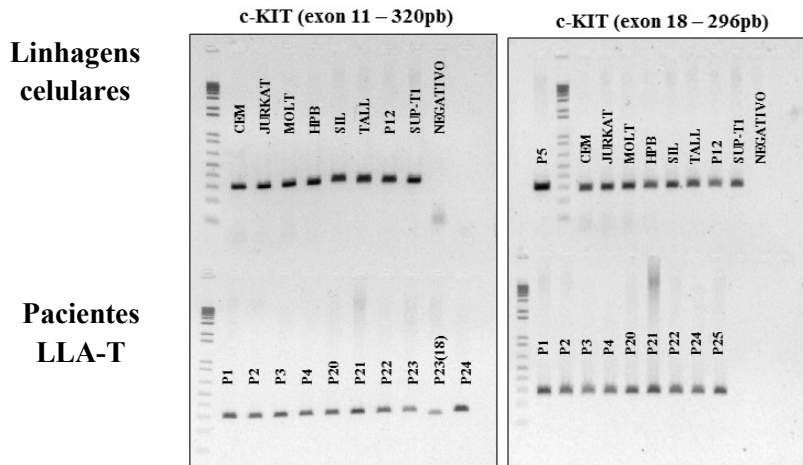


Figura 12: Expressão de *KIT* em linhagens celulares e amostras de LLA-T. Os éxons 11 e 18 do DNA de *KIT* foram amplificados por PCR, visualizados em gel de agarose 1% e sequenciados.

4.4. Variedade de mutantes - oportunidade para caracterizar determinantes estruturais do IL-7Rmut

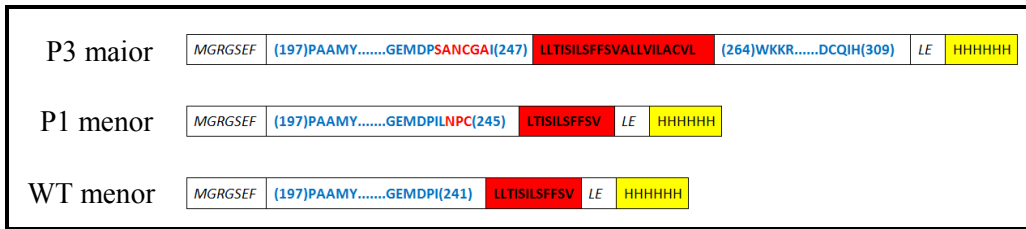
A ligação de fatores de crescimento hematopoiéticos aos seus receptores cognatos na superfície da célula regula a diferenciação, proliferação, maturação e sobrevivência de células hematopoiéticas. A formação de um receptor complexo ativado leva à fosforilação de tirosinas dos substratos intracelulares e ativação de numerosas vias de sinalização. Apesar do mecanismo exato pelo qual os diversos receptores se tornam ativados ainda não ser totalmente entendido, uma característica essencial é a homo ou heterodimerização das cadeias do receptor ou a mudança conformacional do oligômero pré-formado, induzida por ligante (Heldin, 1995; Ihle, 1996; Livnahet *al.*, 1999).

Como já dito anteriormente, a cadeia alfa do receptor da IL-7, o principal alvo de estudo nesta tese de doutorado, tem efeitos proliferativo e de sobrevivência nos linfócitos T e, potenciais expressões aberrantes deste receptor na LLA-T, poderiam ajudar no surgimento e/ou progressão da

doença. A magnitude deste trabalho está na descoberta de mutações causadoras da ativação constitutiva desta proteína, o que é realmente interessante, visto que até então todo conhecimento de alterações no gene do IL-7R α relacionava-se à perda de função deste receptor, prejudicando o desenvolvimento linfóide, com consequente leucopenia.

A primeira hipótese que surgiu quando descobrimos o efeito ativador do IL-7Rmut foi que as mutações estavam causando alguma modificação ou defeito no enovelamento da proteína e, conseqüentemente alteravam a porção intracelular da cadeia alfa, favorecendo a estabilização do heterodímero IL-7R α / γ c na superfície celular, mesmo na ausência de ligante. Para entender as possíveis modificações conformacionais que estavam ocorrendo, seria necessário um estudo estrutural da porção transmembrana e intracelular da cadeia alfa, pois até o momento, só se tem conhecimento da estrutura do domínio extracelular deste receptor (McElroy *et al.*, 2009). A estratégia inicial então era obter uma proteína recombinante composta apenas da porção transmembrana do IL-7R α , purificá-la e estudar sua estrutura por ressonância magnética nuclear (RMN). A linhagem bacteriana *E. coli* BL21 foi utilizada como modelo para a expressão da proteína recombinante, constituída por parte do domínio transmembrana do IL-7R α fusionado com uma cauda de histidina (figura 13). O resultado obtido foi surpreendente, pois se verificou a ocorrência de dímeros e oligômeros apenas nas formas mutantes do receptor. Daí surgiu a hipótese, publicada no manuscrito desta tese, de que a ativação constitutiva da sinalização era devido à homodimerização de duas cadeias IL-7R α e não por estabilização do heterodímero na ausência de ligante ou pela interação com TSLPR ou KIT.

(A)



(B)

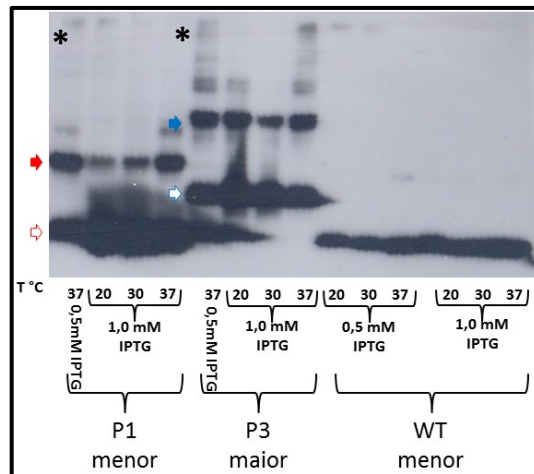


Figura 13: IL-7R α mutado forma dímeros em bactérias *E. coli* BL21. (A) Duas construções diferentes incluindo a região transmembrana do IL-7R α foram clonadas em fusão com uma cauda de histidina no C-terminal, no vetor de expressão pET28a. Foram usados os receptores mutantes P1 para a construção menor, com 8,48 KDa, P3 para a construção maior, com 15KDa e, como controle, a sequência selvagem (WT). No esquema estão representadas as formas maior e menor das proteínas expressas. A maior é formada por uma sequência de 7 aminoácidos originadas do próprio vetor, porção C-terminal do domínio extracelular, região transmembrana, porção N-terminal do domínio intracelular, dois aminoácidos do vetor e uma cauda com 6 resíduos de histidina. A menor difere da maior no tamanho do domínio transmembrana, que contém apenas os primeiros 14 resíduos de aminoácidos (P240 ao V253), e na ausência da porção intracelular. (B) As bactérias BL21 transformadas com cada uma das construções, foram cultivadas em diferentes condições (variando temperatura e concentração de indutor IPTG) durante 16h, foram lisadas e a porção solúvel foi visualizada por *Western Blot*, em gel desnaturante 10%, usando anticorpo anti-6xHis. O monômero menor é indicado na linha da seta vermelha vazia; o monômero maior é indicado na linha da seta azul vazia; os dímeros menor e maior são representados nas linhas das setas cheias vermelha e azul, respectivamente. As bandas mais fortes representam a melhor condição de expressão (destacadas por um asterisco). A construção selvagem não apresentou formação de dímeros.

4.4.1. Resíduo de Cisteína e Prolina em mutações ativadoras

Dentre os pacientes estudados neste trabalho (n=201), 17 apresentaram mutações somáticas no éxon 6 (porção transmembrana) do IL-7R α . Destas, 14 envolviam a inserção de uma cisteína responsável pela formação de ponte dissulfeto entre cadeias alfa mutadas. Recentemente, foi mostrado que a cadeia alfa pode formar homodímeros na superfície celular mesmo na ausência de IL-7 (Rose *et al.*, 2010), porém considerava-se que a sinalização só era ativada na presença de γ c (Ziegle *et al.*, 1995) e com a ligação de IL-7, que estabiliza a heterodimerização e causa mudanças conformacionais definidas na porção intracelular do receptor (Brian *et al.*, 1992).

No entanto, nós demonstramos que a presença de mutações que inserem uma cisteína na porção extracelular/justamembrana da cadeia IL-7R α , foi suficiente para permitir a homodimerização entre cadeias alfa e ativar constitutivamente a via de sinalização JAK/STAT, independentemente de IL-7 e de γ c, nos pacientes estudados (resultados apresentados no artigo publicado).

A ocorrência de mutações com ganho de função em receptores de membrana já é conhecida e, uma característica comum entre elas, é a inserção/substituição de um resíduo de cisteína. Em 2006 um trabalho mostrou que a inserção artificial de resíduos de cisteínas em posições estratégicas na região transmembrana de EpoR, foi responsável pela homodimerização das cadeias do receptor e pela ativação constitutiva das suas vias de sinalização. Além disso, a adição de 1, 2 ou 3 resíduos de aminoácidos no N terminal do domínio transmembrana deste mesmo receptor, provou que a ativação constitutiva não era devido à mudança de tamanho desta região hidrofóbica (Lu *et al.*, 2006). Em 2010, outro grupo de pesquisadores identificou TSLPR constitutivamente ativado em pacientes LLA B-derivada devido a mutações que substituíram uma fenilalanina por uma cisteína na porção extracelular/justamembrana deste receptor. Além disso, o transplante de células da medula óssea de camundongo, transfectadas com a proteína TSLPR mutada, causou mieloproliferação e esplenomegalia (Chapiro *et al.*, 2010). Há ainda o trabalho de Shochat *et al.* (2011), com LLA em crianças com Síndrome de Down e também em LLA-T, já citado anteriormente, que identificou mutações com ganho de função no IL-7R α , sempre envolvendo a presença da cisteína.

A inserção indispensável de uma cisteína na porção extracelular/justamembrana dos receptores é responsável pela formação de pontes dissulfeto intermolecular. Este é um tipo de ligação forte, covalente, entre dois grupos sulfidril (-SH) da cadeia lateral de cisteína. Em células eucarióticas as pontes dissulfeto são formadas no lúmen do RER (retículo endoplasmático rugoso), porque esse ambiente, ao contrário do citoplasma, é um meio oxidativo. Sendo assim, pontes dissulfeto são

desfeitas no citoplasma e apenas proteínas lisossomais, secretórias e do glicocálice as possuem. No entanto, em condições de estresse celular, por exemplo, o citoplasma se torna oxidativo e possibilita a ocorrência de proteínas com pontes dissulfeto.

Além da presença comum de um resíduo de cisteína, a maioria das mutações encontradas neste trabalho também inseriu um resíduo de prolina, que é um aminoácido rígido, que causa uma dobra na estrutura da proteína. A fim de entendermos o porquê de estas mutações terem, quase sempre, um resíduo de cisteína e um de prolina, construímos alguns mutantes artificiais (IL-7R_{MA}), alterando a cisteína para serina (dados já mostrados no artigo) e a prolina para glicina (dados não apresentados no artigo), que é um aminoácido que confere alto grau de flexibilidade (figura 14a). Células D1 transfectadas com os IL-7R_{MA} foram analisadas quanto à formação de dímero na presença e ausência de agente redutor (figura 14b), fosforilação de STAT5 na ausência de IL-7 (figura 14c) e viabilidade com e sem IL-7 (figura 14d). Os resultados mostraram que sempre que a cisteína foi trocada por algum outro resíduo de aminoácido, a dimerização desapareceu ou ficou mais fraca e a sinalização também foi prejudicada, confirmando que a formação de ponte dissulfeto entre duas cadeias IL-7R α é dependente de um resíduo de cisteína. Porém, estes resultados também estão apontando para a importância da prolina na sinalização destes receptores mutantes, como pode ser visto pelo mutante “P2 p>g” (substituição de uma prolina por uma glicina) que, apesar de ainda conservar uma cisteína e dimerizar (figura 14b), não é capaz de ativar a sinalização, avaliada pela fosforilação de STAT5 (figura 14c), nem de manter a viabilidade celular (medida por Annexina V_7AAD) na ausência de IL-7 (figura 14d). Porém, estes resultados são preliminares, uma vez que apenas um tipo de mutante foi avaliado. Serão necessários futuros estudos com os demais mutantes para se confirmar os resultados encontrados até agora.

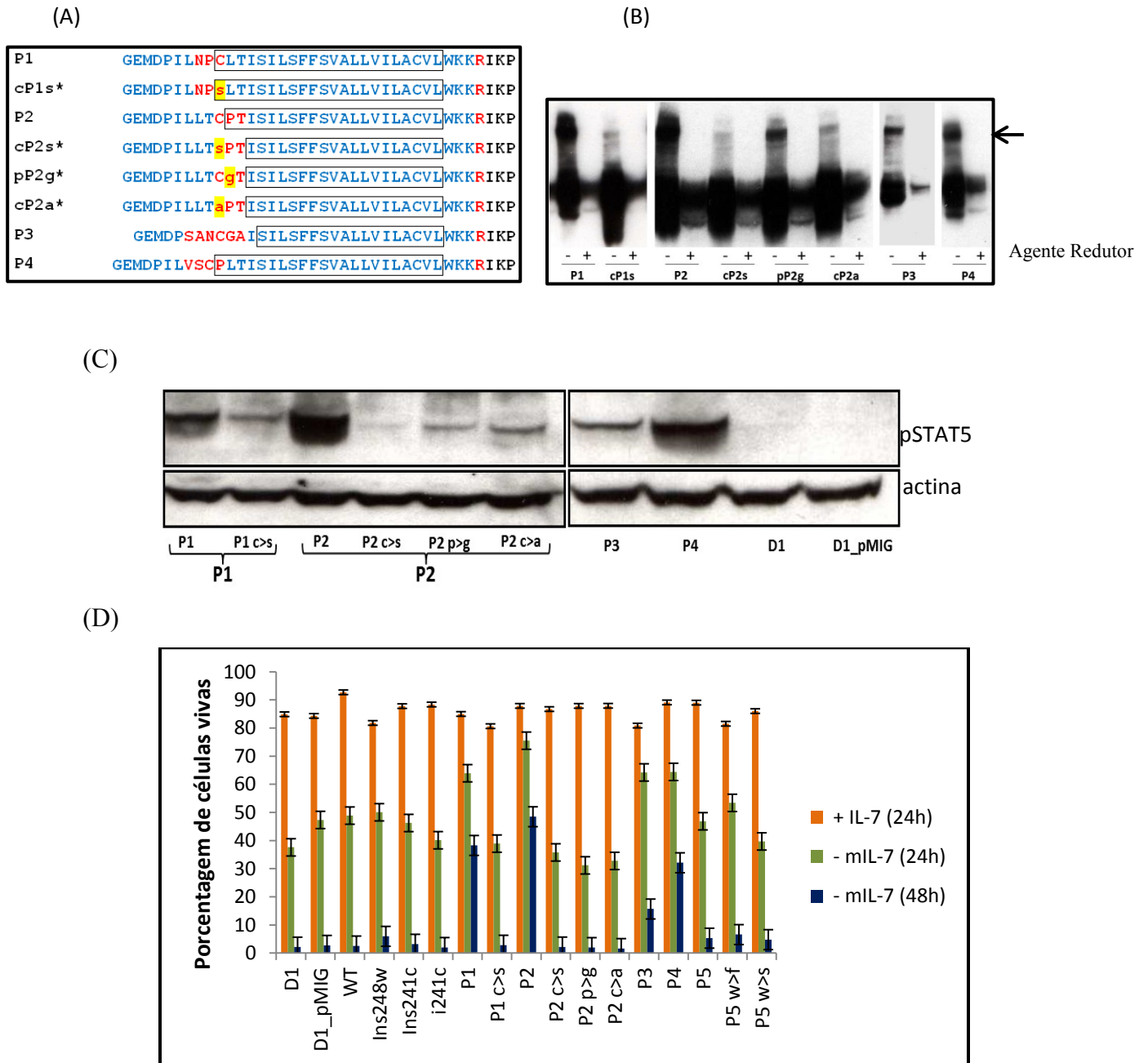


Figura 14: Dimerização e ativação constitutiva dos IL-7Rmut. (A) Sequências da região transmembrana dos IL-7Rmut e dos IL-7R_{MA}. (B) Apenas receptores com mutações que inserem cisteína conseguem dimerizar. A substituição da cisteína por uma serina prejudica grandemente a formação de dímeros (indicado pela seta) entre cadeias IL-7R α . A substituição da prolina por glicina não afeta a formação do dímero. (C) A ativação constitutiva de STAT5, observada pela sua fosforilação, é grandemente prejudicada quando a cisteína é substituída por serina ou alanina, e quando a prolina é substituída por glicina. A formação de dímeros não implicam na ativação da sinalização. (D) Sobrevivência de células D1 transfectadas com o IL-7Rmut e com IL-7R_{MA}, tratadas ou não com IL-7, durante 48h. P1, P2 e P4 mostraram maior sobrevivência ao final de 48h, na ausência de IL-7.

4.4.2. A posição da cisteína no IL-7Rmut deve ser ideal para ativar sinalização

Como não foi possível analisarmos as características funcionais das 17 mutações diferentes encontradas, estudos futuros serão necessários para determinar se todas realmente causam o fenótipo constitutivamente ativado. Lu e colaboradores (2006) provaram que mutações onde a cisteína estava muito para dentro do domínio transmembrana, ou ainda na porção intracelular, não formavam dímeros ligados por pontes dissulfeto. Isso, provavelmente acontece porque estes resíduos estão escondidos das enzimas que catalisam a formação destas ligações no lúmen do retículo endoplasmático. Além disso, a ocorrência de homodimerização não implica necessariamente na ativação da sinalização independente de ligante, pois para que a sinalização ocorra é necessário que as cadeias alfa estejam em uma conformação estratégica para a interação das JAK1 quando da homodimerização. Dependendo do tipo de mutação ocorrido no IL-7R α (considerando o número de resíduos de aminoácidos adicionados e a presença/localização de cisteína), este irá sofrer mudanças no seu enovelamento, bem como alterações conformacionais decorrentes da dimerização. Tais modificações podem esconder ou expor sítios importantes para ligação e/ou ativação de proteínas que iniciarão a via de sinalização *downstream* ao receptor, como JAK1. Dessa forma, dímeros IL-7R α em conformação ótima irão sinalizar mais fortemente, o que pode ser identificado pelo nível de fosforilação de JAK1, STAT5 e AKT.

Nos resultados apresentados no artigo, pode-se ver que a intensidade de ativação do receptor entre os pacientes P1 (inserção de Asn-Pro-Cys entre as posições 242 e 243) e P2 (inserção de Cys-Pro-Thr entre as posições 244 e 245) mostra-se claramente diferenciada quanto à fosforilação de AKT (figura 3c artigo), STAT1 (Figura suplementar 5c artigo), JAK1 e STAT3 (figura suplementar 6 artigo), quanto à viabilidade na ausência de fator de crescimento (figura suplementar 11b artigo) e quanto ao efeito tumorigênico, medido pela esplenomegalia em camundongo Rag1^{-/-} que recebeu o receptor mutado de P1 e P2 (figura 5c artigo). Ou seja, o receptor do paciente P2 quase sempre mostrou uma sinalização mais intensa em relação a P1. Descartando a possibilidade da ocorrência de erro experimental (pois todos os resultados foram feitos em triplicatas), esta diferença pode refletir diferentes topologias do homodímero, sendo que em P2 ocorre a forma mais favorável. Lu e colaboradores (2006) mostraram que cisteínas em diferentes posições podem formar ligações dissulfeto entre as duas cadeias do EpoR fixando-as na conformação ativa ou inativa, como representado na figura 15.

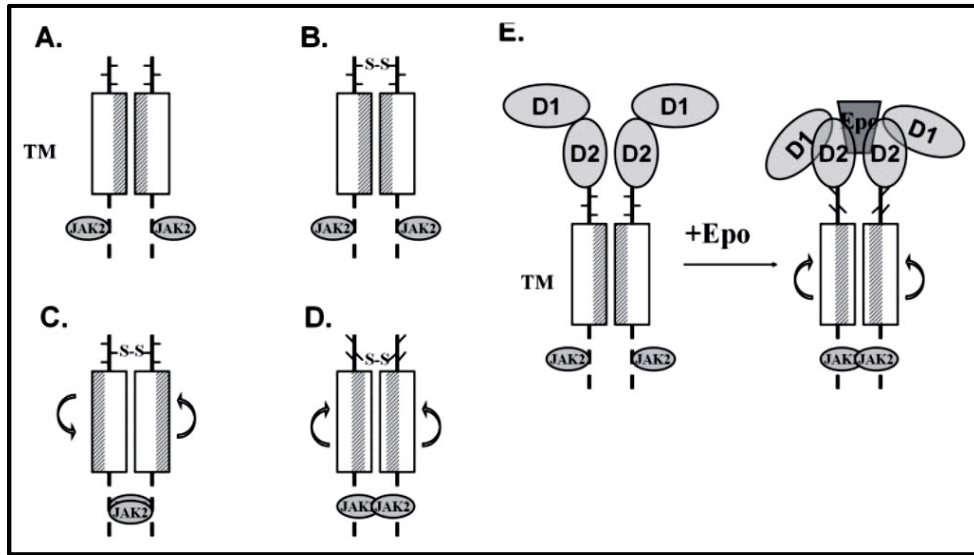


Figura 15: Representação esquemática dos dímeros de EpoR ligados por pontes dissulfeto. Estes receptores inativos são formados por dímeros assimétricos na superfície da célula e são ativados na presença do ligante Epo. As barras retangulares representam o domínio transmembrana e o lado hachurado, a superfície de interação no dímero ativo, envolvendo o mesmo conjunto de aminoácidos nas duas subunidades. As linhas pontilhadas representam o domínio intracelular, as linhas verticais acima do domínio transmembrana representam os aminoácidos no domínio extracelular/justamembrana e as linhas horizontais representam a direção das cadeias laterais dos resíduos nesta região de junção. Em A, mostra a dimerização do receptor inativo, que é mediada pelo domínio transmembrana e, nesta condição, as moléculas JAK2 estão separadas e não são transfosforiladas. Em B, representa a formação de uma ligação dissulfeto que mantém a mesma conformação inativa das cadeias laterais do receptor. Em C, a formação da ponte dissulfeto está conectando resíduos do lado oposto da interface original inativa, causando uma rotação simétrica nas duas cadeias e fixando-as na conformação ativa que aproxima as moléculas de JAK2. Em D, mostra que pontes dissulfeto em determinadas posições causam uma rotação assimétrica entre as duas cadeias, criando uma nova interface de interação entre diferentes grupos de resíduos. Em E, mostra a modificação estrutural causada no receptor com a ligação de Epo e a fosforilação da JAK2. (Adaptado de Lu e colaboradores, 2006).

Como uma análise preliminar para verificar se uma única cisteína seria suficiente para dimerização de duas cadeias alfas e ativação constitutiva do receptor, construímos dois mutantes artificiais, inserindo uma cisteína na posição 241 e outro, substituindo a isoleucina 241 por uma cisteína, como mostra a figura 16. Os nossos resultados confirmam o resultado encontrado para EpoR acima descrito, deixando evidente que a mutação deve ocorrer de maneira estratégica, para que a modificação estrutural da cadeia alfa favoreça a interação das JAK1 quando aquelas se homodimerizarem.

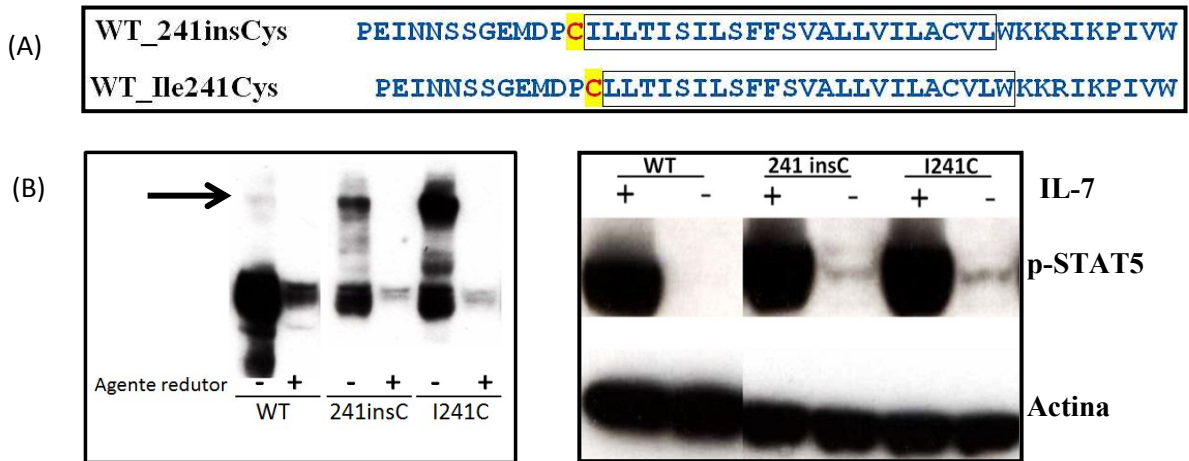


Figura 16: A inserção de uma única cisteína na posição 241 não é suficiente para induzir sinalização constitutiva mediada por IL-7R α . Em (A) está representado a sequência de parte do domínio extracelular (à esquerda), o domínio transmembrana (dentro da caixa) e parte do domínio intracelular do IL-7R α . Em destaque estão as mutações de cisteínas. (B) Células D1 foram transfectadas com IL-7R α selvagem (WT) ou com o receptor artificialmente mutado conforme indicado e tratadas com IL-7. Os lisados foram ou não tratados com agente redutor e analisados para a expressão de IL-7R α . À esquerda estão representadas as formas diméricas (seta) dos dois mutantes artificiais, comparado com a forma selvagem (WT). Estas mesmas células também foram tratadas sem IL-7 por 4h, estimuladas ou não com IL-7 por 20 minutos e avaliada para fosforilação de STAT5. Nenhuma das mutações artificiais induziu sinalização na ausência de ligante.

Dessa maneira, futuros estudos serão necessários para identificar qual é a conformação favorável que ativa o receptor sem a necessidade de IL-7, γ c e JAK3. A estratégia inicial é construir mutantes, substituindo cada um dos resíduos de aminoácidos da região justamembrana/transmembrana por uma cisteína e também mutantes inserindo, junto com a cisteína, mais um, dois ou três aminoácidos. Estes poderão nos fornecer maiores informações sobre as superfícies de contato entre duas cadeias alfa, bem como possibilitar comparação nos níveis de expressão da proteína na superfície celular ou retenção no retículo endoplasmático. Uma mutação que causa defeito no enovelamento da proteína pode dificultar/impedir seu transporte até a superfície da célula, causando uma ativação precoce da sinalização ou indicando para degradação da proteína mutada.

4.4.3. Mutações sem resíduo de cisteína também conferem ganho de função ao IL-7R α ?

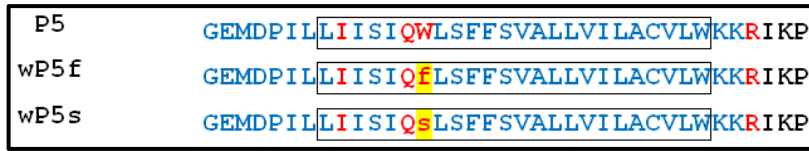
Uma ocorrência interessante que também merece ser destacada foi termos encontrado três pacientes LLA-T portando mutações no IL-7R α que não introduziram um resíduo de cisteína e que, portanto não se encaixam conceitualmente dentro do modelo que apresentamos até agora. Provavelmente estas mutações devem oferecer alguma vantagem às células através de uma

cooperação oncogênica. Este tipo de mutação já foi encontrado em pacientes com neoplasias mieloproliferativas. Pikman e colaboradores (2006) identificaram uma substituição de um triptofano por uma leucina no domínio transmembrana, perto da porção citoplasmática, de trombopoietina (MPL) que tornou as linhagens celulares 32D, UT7 ou Ba/F3 independentes de IL-3, hipersensíveis à TPO e causou esplenomegalia em camundongos transplantados com células portadoras da mutação.

As três mutações sem resíduos de cisteína que encontramos consistiram (1) na inserção de Gln-Trp (P5), (2) deleção de Ser-Val-Ala e inserção de Trp-Asn (P8) e (3) deleção de Val e inserção de Gly-Pro-Ser-Leu (P13). Todas ocorreram numa porção mais interna do domínio transmembrana do IL-7R α , como pode ser observada na figura suplementar 2 do artigo. Uma análise preliminar do paciente P5 em células 293T mostrou que esta mutação parece causar uma ativação constitutiva do receptor, verificada pela fosforilação de STAT5 na ausência de IL-7 (figura suplementar 7 artigo). No entanto células D1 transfectadas com P5 e cultivadas na ausência de IL-7 não mostraram ativação de STAT5, nem a formação de dímeros. Além disso, construímos dois receptores P5 mutantes artificiais, trocando o triptofano por fenilalanina (wP5f) ou por serina (wP5s). Assim, pudemos testar se o triptofano poderia estar favorecendo alguma interação entre 2 cadeias alfa do IL-7R, pois é sabido que o triptofano reforça a interação entre segmentos transmembrana (Ridder *et al.*, 2005). A justificativa por termos escolhido uma mutação para fenilalanina é que este aminoácido tem características semelhantes ao triptofano, de maneira que não causaria muita alteração na estrutura do receptor. Ambos possuem cadeia lateral apolar, hidrofóbica e são classificados dentro do grupo de aminoácidos alifáticos. Já a serina foi escolhida para o segundo mutante para comparar com os outros mutantes artificiais construídos (discutidos mais adiante), nos quais os resíduos de cisteína foram sempre substituídos por serina.

Nenhum dos IL-7R_{MA} mostrou alguma resposta diferente em relação ao mutante natural, ou dimerização (figura 17). Como é sabido que o triptofano pode favorecer homodimerização, nós criamos um mutante artificial inserindo um triptofano na mesma posição do P5, mas também não observamos dimerização, nem sinalização em D1 transfectada. Estas mutações dentro do domínio transmembrana podem não levar à ativação constitutiva do receptor, mas podem torná-lo mais sensível à IL-7, capaz de dar vantagens proliferativas às células mesmo em concentrações fisiológicas da citocina.

(A)



(B)

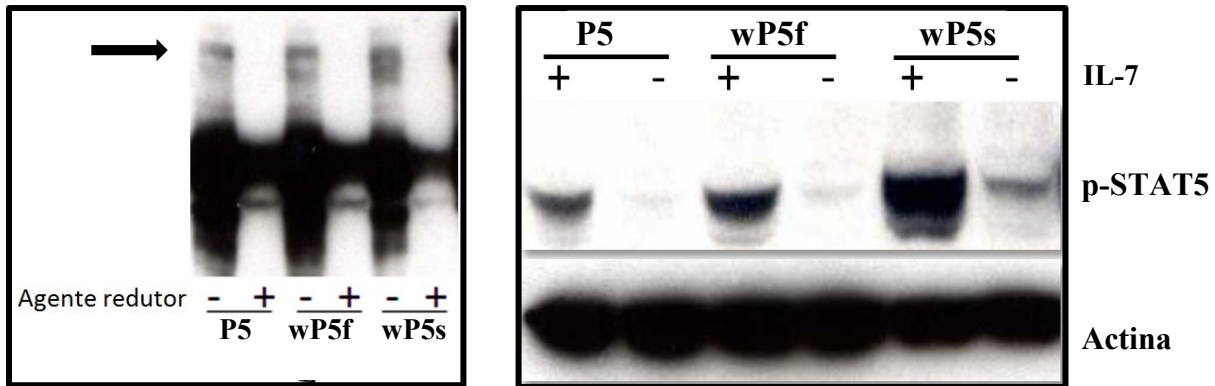


Figura 17: Mutação sem cisteína não causa dimerização da cadeia IL-7R α nem ativação constitutiva em células D1. Células D1 foram transfectadas com IL-7R α selvagem (WT) ou com o receptor artificialmente mutado conforme indicado e tratadas com IL-7. Os lisados foram ou não tratados com agente redutor e analisados para a expressão de IL-7R α . À esquerda estão representados os receptores na forma monomérica, indicando que estas mutações não induzem dimerização entre as cadeias alfa (seta). É visível uma dimerização mínima que, provavelmente, ocorre entre IL-7R α normais, uma vez que as D1 têm expressão endógena do receptor e estas bandas também são encontradas em experimentos com células transfectadas com o receptor selvagem. Estas mesmas células também foram tratadas sem IL-7 por 4h, estimuladas ou não com IL-7 por 20 minutos e avaliada para fosforilação de STAT5. Nenhuma das mutações induziu sinalização na ausência de ligante (direita).

Diante dos resultados apresentados até agora, fica claro que a posição em que a mutação ocorre dentro do *hotspot*, bem como o número de resíduos inseridos ou deletados interfere grandemente na função da proteína mutada. Isso pode ativá-la ou não de maneira autônoma, devido a uma alteração na conformação estrutural do receptor na membrana da célula. No entanto, mutações oncogênicas em receptores de tirosinas quinase também podem levar a uma ativação precoce do receptor no citoplasma ou em compartimentos intracelulares, onde eles poderão iniciar vias de sinalização aberrantes (Choudhary *et al.*, 2009). Mutações ou superexpressão destes oncogênes podem causar um enovelamento errado e agregação das proteínas, prejudicando o tráfico até a superfície celular.

4.5. Localização subcelular do IL7-Rmut

Mutações oncogênicas em receptores na membrana da célula podem ocasionar erros ou desajustes na ativação destes receptores, tanto no citoplasma, como em compartimentos intracelulares (Blume-Jensen e Hunter, 2001). Recentemente, descobriu-se que mutações oncogênicas em receptores de tirosina quinase prejudicam seu deslocamento até a membrana da célula, causando um acúmulo da proteína mutada no retículo endoplasmático. Essa localização errada leva a uma ativação precoce de STAT5 e aumenta a expressão de seus alvos, Pim-1/2, porém falha em ativar a sinalização de outras vias, como PI3K e MAPK, que aconteceria quando o receptor estivesse na superfície da célula (Choudhary *et al.*, 2009).

No caso do IL-7R α normal, sabe-se que sua sinalização é finamente regulada pela presença ou ausência de fator externo, a IL-7. Nas células T em repouso, parte das cadeias α do IL-7R é lentamente internalizada e degradada, enquanto que outras são recicladas de volta para a superfície. Na presença da IL-7 a célula é ativada e ocorre rápida endocitose de IL-7R α , via invaginações da membrana revestidas com clatrina, diminuição da reciclagem do receptor e um aumento na degradação dependente de lisossoma e proteasoma (Henriques *et al.*, 2010) (figura 18). O receptor desaparece da superfície da célula 12 horas depois, enquanto que a expressão de γc aumenta rapidamente (Park *et al.*, 2004; Colle *et al.*, 2006).

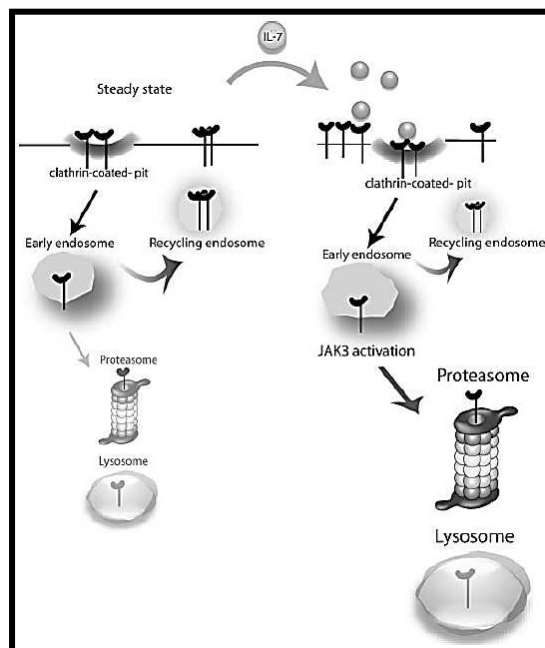


Figura 18: Modelo proposto para o tráfego da cadeia alfa do IL-7R. Quando a célula está em estado estacionário (ausência de IL-7), a IL-7R α é lentamente internalizado por invaginação da membrana forrada com clatrina. Algumas são recicladas de volta para superfície da célula, enquanto outras são degradadas via

proteasoma e/ou lisossoma. Novos receptores recém-sintetizados substituem os que foram degradados. Na presença da IL-7, o equilíbrio é rapidamente deslocado para endocitose do receptor e subsequente degradação. A ativação de JAK3, que parece depender da internalização do receptor, é fundamental para desencadear a degradação do receptor. (Adaptado de Henriques *et al.*, 2010).

Na ausência de IL-7, o mRNA de IL-7R α e, conseqüentemente, a proteína expressa na superfície celular, reaparecem dentro de 7 horas (Alves *et al.*, 2008). O receptor livre de citocina difunde livremente pela superfície de linfócitos T CD4, enquanto que a ligação da IL-7 interrompe quase que totalmente a difusão lateral do receptor, que é, então, recrutado pelo citoesqueleto e interage com outras proteínas (STAT5, JAKs, etc.) embutidas em *lipidrafts* (figura 19). Ainda não se sabe se o receptor é direcionado para dentro de *lipidrafts* na presença da IL-7, ou se estes são formados ao redor do receptor ligado ao seu ligante (Rose *et al.*, 2010). Toda essa dinâmica no controle da expressão de IL-7R α é necessária para ativação dos alvos *downstream* ao receptor.

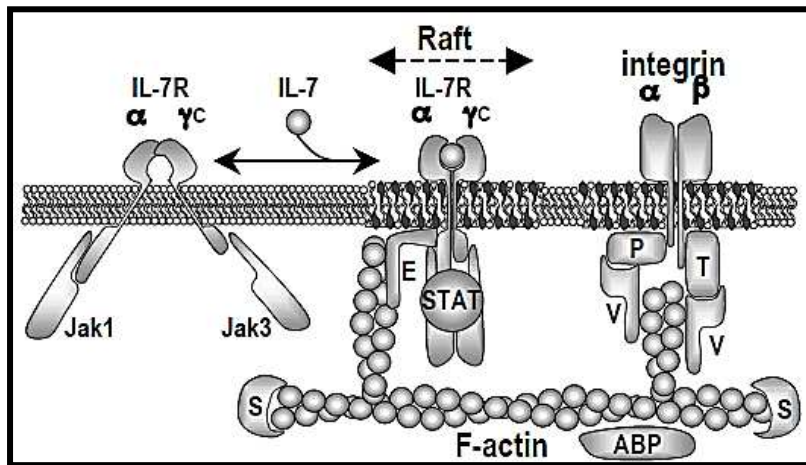


Figura19: Representação esquemática da montagem do complexo de sinalização do IL-7R após a ligação da IL-7. Na parte esquerda está representado o heterodímero livre de IL-7, embutido na membrana celular, mas fora do *raft*. JAK1 e JAK3 constitutivamente ligadas às cadeias IL-7R α e γ c, respectivamente. Na presença da IL-7, o heterodímero é estabilizado e direcionado para dentro dos *lipidrafts*, onde ocorre a ativação de STAT. Proteínas FERM (E) conectam IL-7R α à F-actina. Cadeias de integrinas são ligadas a F-actina por praxilina (P) ou talina (T) complexadas a vinculina (V) e Arp2-3. (ABP) proteínas que se ligam a actina; (S) proteínas que inibem a elongação de F-actina; (R) proteínas envolvidas na ramificação dos filamentos. (Adaptado de Rose e colaboradores, 2010).

Como mostrado, a dimerização do IL7Rmut, parece permitir a interação de JAK1-JAK1 e fosforilação de STAT5, desencadeando o sinal constitutivo, independente de IL7. Há porém outras duas possibilidades a considerar, que poderiam contribuir com o ganho de função do receptor

mutante: (1) as mutações podem atrapalhar no enovelamento da proteína e dificultar sua expressão na superfície celular, causando um acúmulo no retículo endoplasmático ou no Golgi e o ‘*mislocalized signaling*’; (2) os IL-7Rmut que eventualmente chegam até a superfície da célula, podem não ser reciclados e/ou degradados da mesma maneira que o selvagem, aumentando o círculo vicioso da autoativação do IL-7Rmut.

Na tentativa de responder a hipótese #1, foi realizado um ensaio de imunofluorescência da localização do IL-7Rmut. A linhagem celular de mamífero COS-7 (*monkey African green kidney*) foi transfectada com a forma selvagem do IL7R, com o *IL7R* mut P5 e com uma construção contendo apenas o domínio intracelular do receptor (*IL7R_{IC}*), todos separadamente. Estes transcritos gênicos de *IL7R* foram clonados no vetor de expressão pEF6/V5-His TOPO, entre os sítios de enzimas de restrição KpnI e XmaI, fusionados a uma cauda de histidina (6xHis) na porção C-terminal. Transfectamos 4µg de plasmídeo em células de mamífero COS-7 e, para certificarmos que esta linhagem celular não expressava IL-7R e IL-2Rγ endógenos, extraímos o RNA mensageiro, sintetizamos cDNA e fizemos uma RT-PCR com primers específicos. Para a imunocitoquímica utilizamos o anticorpo primário Anti-V5 (Sigma). As transfecções foram feitas em triplicata e visualizamos as células transfectadas em microscópio de fluorescência. A localização intracelular do receptor foi observada por imunofluorescência (figura 20). A transfecção com o domínio intracelular do *IL7R* mostrou uma marcação difusa dentro da célula, sem localização específica, provavelmente porque este domínio não apresenta peptídeo sinal que direcionaria sua localização na membrana. As células transfectadas com o *IL7R* selvagem e P5 apresentaram padrões diferentes de localização da proteína, sendo que em algumas células observamos a ocorrência de vesículas ao longo de todo o citoplasma e também no núcleo (fenótipo 1), enquanto outras apresentaram uma quantidade menor de vesículas, porém uma marcação mais intensa na membrana (fenótipo 2). Em ambos os fenótipo observamos a ocorrência de uma fluorescência bastante intensa próxima ao núcleo aparentando marcação do complexo de Golgi ou de retículo endoplasmático. Ambas são organelas envolvidas no transporte de proteínas dentro da célula, podendo indicar a mobilização do IL-7Rα entre a membrana celular e o núcleo. Encontramos uma célula sem a marcação próxima ao núcleo (fenótipo 3) e as células transfectadas com o *IL7R_{IC}* apresentaram o fenótipo 4 – marcação difusa. Apesar das diferenças (figura 21), as classificações fenotípicas são subjetivas e por isso não podemos concluir que exista diferença de localização entre a proteína selvagem e a mutada. No entanto, vale lembrar que o receptor mutante utilizado neste ensaio não tem inserção de uma cisteína e, conseqüentemente, não forma homodímeros. Futuros estudos

incluindo outros mutantes com cisteína, tratamento das células com IL-7, inclusão da cadeia γc e visualização das imagens em microscopia confocal poderão fornecer resultados mais confiáveis e até alguma diferença significativa entre o receptor mutado e o normal.

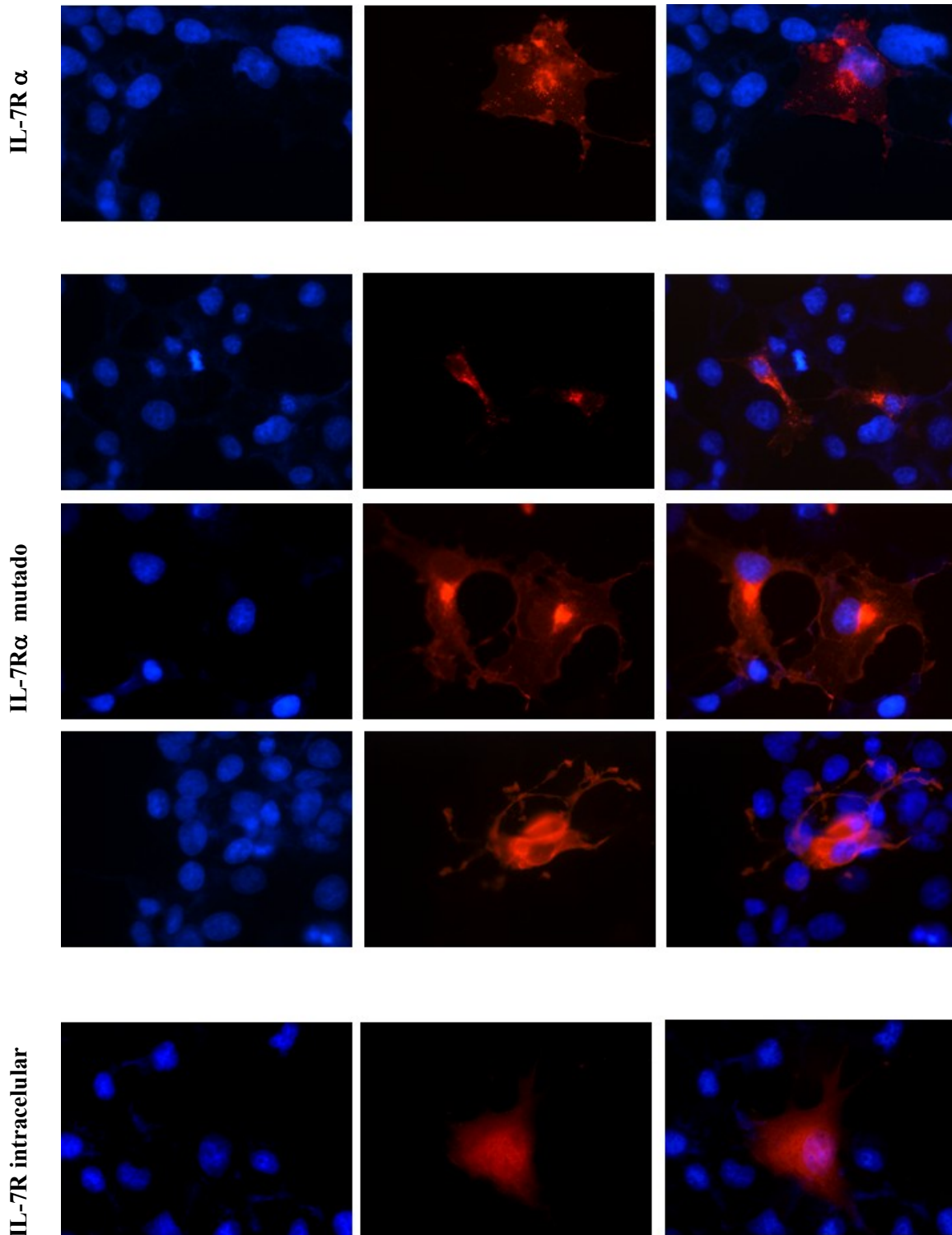


Figura 20: Imunofluorescência da localização de IL-7R α e IL-7R α intracelular. As células transfectadas com *IL7R_WT*, *IL7R_P5* e *IL7R_{IC}* foram fixadas com paraformaldeído e incubadas com anticorpo anti-V5. A ligação do anticorpo foi detectada com anticorpos secundários. O núcleo das células foi corado com DAPI, HOECHST.

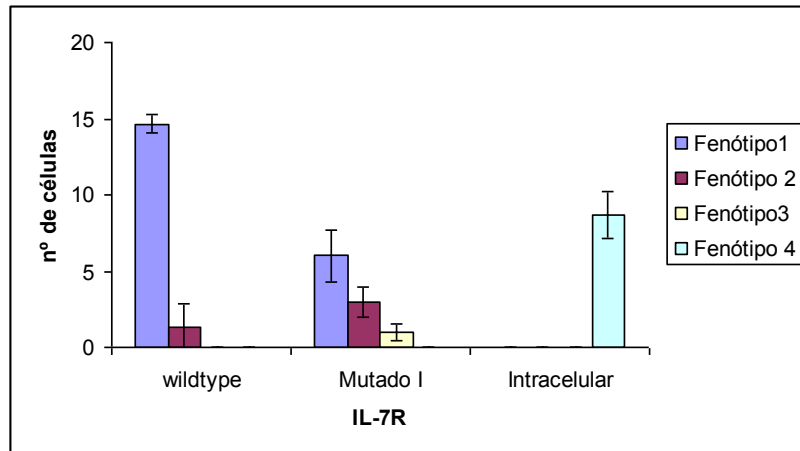
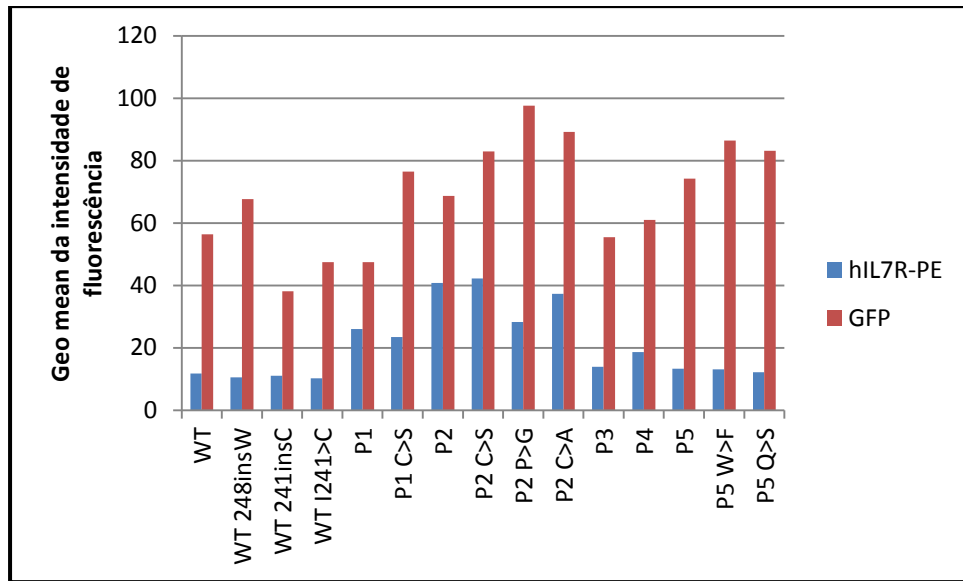


Figura 21: Frequência dos fenótipos observada entre as células transfectadas com $IL7R_{WT}$, $IL7R_{mut}(P5)$ e $IL7R_{IC}$.

Resta saber se, caso o $IL7R_{mut}$ seja retido no ER/Golgi, pode ou não desencadear sinalização via STAT5. Para descobrir se há alguma ativação intracelular precoce da sinalização destes receptores de IL-7 mutados, será necessário um estudo utilizando Brefeldin A, que inibe o transporte de proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e, portanto, para a superfície da célula. Se a localização do $IL-7R\alpha$ na superfície da célula for fundamental para ativar vias de sinalização, o tratamento com o inibidor deverá interromper a sinalização, caso contrário é sinal de que a sinalização está ocorrendo dentro do retículo endoplasmático/Golgi.

Para verificar a questão de retenção do $IL7R_{mut}$ na superfície da célula, ou seja, um defeito de internalização ou *turnover*, que contribui-se com a hiperativação desse receptor, analisou-se, por citometria de fluxo, o nível de expressão dos $IL-7R_{mut}$ na superfície de células D1. Os valores de $IL7R_{mut}$ foram normalizados pelo valor de GFP, gene marcador expresso no mesmo mRNA do $IL7R_{mut}$ (transcrito bicistrônico, com uso de IRES) (figura 22a). Os dados de expressão do $IL7R_{mut}/GFP$ foram correlacionados à porcentagem de sobrevivência *in vitro* de células D1 transduzidas, mas mantidas sem IL7. Como mostra a figura 22b, a maior expressão do $IL7R_{mut}$ na superfície da célula está diretamente associada com maior sobrevivência das células. Este resultado parece descartar a ideia de uma contribuição/sinalização via ER/Golgi, e indica que os receptores mutantes que tem maior apresentação e/ou retenção na superfície da célula são os que levam a um maior ganho de função em termos de sobrevivência celular. A tabela 5 mostra os dados para a construção da figura 22b.

(A)



(B)

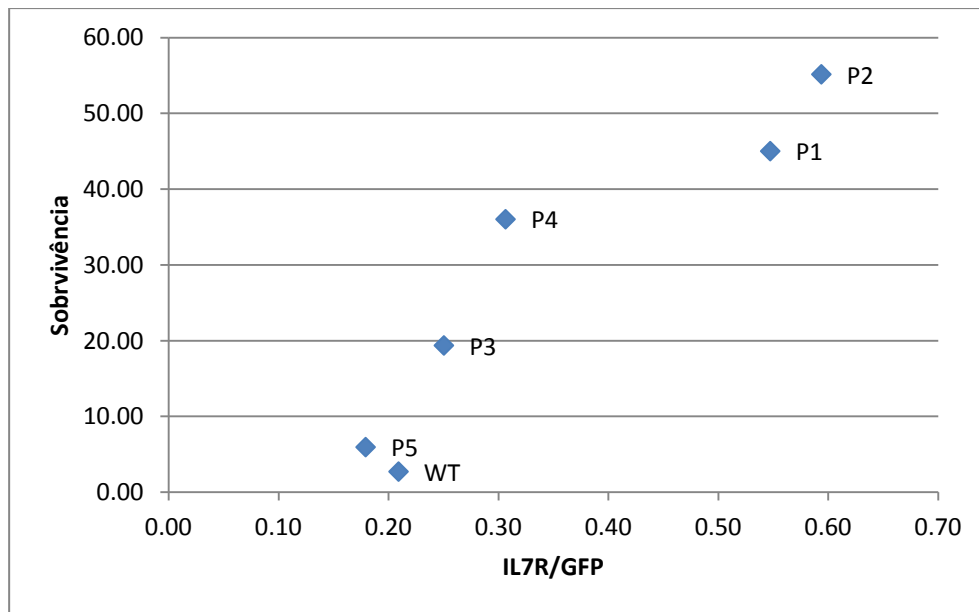


Figura 22: Expressão hIL-7R mutantes ou selvagem na superfície de células D1 transduzidas. (A) Células D1 transfectadas com *IL7R* foram cultivadas na ausência de IL-7 por 4 horas, marcadas com anticorpo anti-IL-7R-PE e analisadas em citômetro de fluxo. O plasmídeo pMIG também expressa a proteína GFP. Dentro do grupo de células GFP⁺, analisamos a expressão do IL-7R α . A barra vermelha (representa expressão de GFP) reflete a expressão total do IL-7R α na célula, enquanto que a barra azul reflete a parte que está sendo expressa na superfície. (B) Representação gráfica da expressão do IL-7R e sobrevivência celular. Eixo Y: Sobrevivência; Eixo X: FACS IL7R/GFP.

Tabela 5: Células D1 transfectadas com o IL7Rmut foram avaliadas, por citometria de fluxo, para expressão de IL-7R α na superfície e para expressão de GFP, uma análise indireta da expressão total de IL-7R dentro da célula. *mutação que não apresenta inserção de resíduo de cisteína.

Paciente	Mutação	AA inseridos	viab 48h sem IL7	Marcação para:		IL7R/GFP
				hIL7R	GFP	
WT	-	-	2.73%	11.8	56.4	0,21
P1	NPC	+3 AA	45.03%	26	47.5	0,55
P2	CPT	+3 AA	55.17%	40.8	68.7	0,59
P3	SANCGA	+2 AA	19.38%	13.9	55.5	0,25
P4	VSCP	+4 AA	36.04%	18.7	61	0,31
P5	QW	+2 AA*	5.96%	13.3	74.2	0,18

Não sabemos se o transporte da proteína até a membrana celular, ou mesmo a movimentação lateral na membrana, ou o processo de degradação podem estar alterados por conta das mutações. Então, mais estudos serão necessários para entender qual é a influência destas mutações na sinalização do IL-7R α . Varias perguntas precisam ser respondidas, como: Será que receptor mutado ativa as mesmas vias de sinalização que são ativadas pelo receptor selvagem? Será que o transporte da proteína mutada até à superfície da célula não está alterado? Será que não está havendo um acúmulo desta proteína no retículo endoplasmático e causando uma ativação precoce de STAT 5, como visto para FLT3? Como ocorre a internalização das proteínas mutadas que chegam na superfície da célula, uma vez que elas não dependem de IL-7? Como acontece o *turnover* destes receptores?

4.6.As mutações do IL7R são oncogênicas?

Os *Hallmarks* do câncer, ou seja, as características típicas do câncer são (1) manutenção da sinalização proliferativa, (2) capacidade de escapar dos supressores de crescimento, (3) resistência à morte celular, (4) permitir imortalidade replicativa, (5) indução da angiogênese e (6) ativação de invasão e metástase. Além disso, a (7) instabilidade genômica e a (8) ativação de processos inflamatórios aceleram a aquisição das características acima (Hanahan e Weinberg, 2011).

Resumindo os resultados apresentados até agora nesta seção, vimos que os receptores mutados homodimerizam devido à presença de uma cisteína na região transmembrana/justamembrana. Com isso, ativavam constitutivamente vias de sinalização JAK/STAT5 e PI3K/AKT independente de IL-7, γ c e JAK3. As mutações também tornaram as células D1 e Ba/F3 independentes de IL-7 e IL-3, respectivamente, dando a elas capacidade de proliferar e sobreviver na ausência destes fatores de

crescimento. Quando células D1 transduzidas com o IL-7Rmut foram transplantadas subcutaneamente em camundongos imunodeficientes ($Rag1^{-/-}$), verificou-se infiltração de baço, fígado, linfonodos e medula óssea, demonstrando assim a capacidade de migração e infiltração de órgãos das células portadoras do receptor mutante (*hallmark* #6). Além disso, o tumor que se desenvolveu no local da inoculação das células D1 cresceu mais rápido quando portadores do IL-7Rmut. Camundongos IL-7^{-/-} foram utilizados para comprovar que células D1 portadoras do IL-7Rmut cresceriam *in vivo* sem estímulo desta citocina e também eram capazes de causar o mesmo efeito observado nos $Rag1^{-/-}$. Células do tumor transferidas para um segundo camundongo IL-7^{-/-} geraram um mesmo fenótipo, ou seja, o camundongo ficou doente em aproximadamente 20 dias, apresentou esplenomegalia e formação de tumor no local da injeção (figura 23).

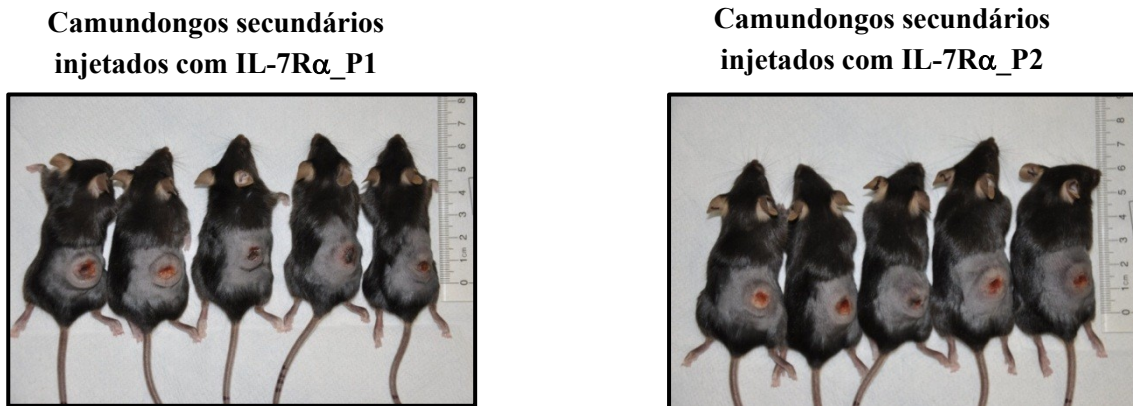


Figura 23: Camundongos receptores secundários IL-7^{-/-} que receberam o IL-7Rmut, adquiriram fenótipo característico dos estágios avançados da leucemia e desenvolvem tumor no local da injeção. Injeção subcutânea de células D1 expressando o plasmídeo pMIG vazio (controle negativo), ou o IL-7R α selvagem (WT), ou P1, ou P2 em camundongo $Rag1^{-/-}$ levaram à formação de tumor no local da injeção. Células deste tumor foram transplantadas em camundongos deficientes para IL-7, causando metástase e formação de tumor, provando a independência de IL-7 nas células portadoras do receptor mutado.

A transformação de uma célula hematopoiética em uma célula leucêmica requer, pelo menos, a ocorrência de duas anomalias envolvendo perda de controle no crescimento/sobrevivência e bloqueio no processo de diferenciação linfóide. Já é sabido que mutações com ganho de função contribuem para a leucemogênese (Schindler *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2008; Mullighan *et al.*, 2009; Shochat *et al.*, 2011) e os nossos resultados corroboram esta afirmação, pois 9% dos pacientes com LLA-T estudados apresentaram mutações com ganho de função para o IL-7R α . Entretanto, devemos notar que as células D1 são p53 *knockout*, que muito provavelmente é a alteração responsável pela

resistência à morte celular (*hallmark* #3). É possível que, assim como neste modelo experimental com células D1, também no caso das LLA-T dos pacientes, exista alteração de um outro gene, ou mais de um gene, que coopere com o IL-7Rmut para o surgimento e/ou progressão da leucemia.

A linhagem celular D1 foi estabelecida a partir de timócitos DN (CD4⁻CD8⁻) originados de camundongo p53^{-/-} por Kim e colaboradores (2003). Os autores esperavam que a ausência de p53 possibilitaria a immortalização desta linhagem dependente de IL-7. Então, surge a questão se os resultados destes experimentos *in vivo*, utilizando células D1, são devidos apenas às mutações em IL-7R α , ou se houve interferência da ausência de p53, que é um supressor tumoral. Uma abordagem que poderá solucionar este impasse será o sequenciamento do genoma de blastos com o IL7Rmut, para identificar possível ocorrência de mutações cooperativas.

Outro resultado que também chamou a atenção nos experimentos *in vivo*, foi a ocorrência de mielopoiese nos camundongos que receberam o IL-7Rmut, ou seja, uma esplenomegalia devido ao aumento no número de neutrófilos. Este mesmo resultado já foi observado em camundongos Rag^{-/-} transplantados com células progenitoras da medula óssea IL-7R^{-/-} transfectadas com IL-7R α normal. Células tronco IL-7R^{-/-}, transfectadas com o IL-7R α ou com plasmídeo vazio, sorteadas para Scal-1⁺c-Kit⁺GFP⁺ e cultivadas por 6 dias com IL-7, expressaram marcadores de neutrófilos maduros e em diferentes estágios de maturação, além de macrófagos e megacariócitos. O mesmo resultado não foi observado com os progenitores sem o IL-7R α (Jiang *et al.*, 2005b).

Apesar da mielopoiese também ser detectada na expressão ectópica do IL-7R α selvagem, é claramente notado que a ativação da proliferação mieloide observada nos nossos resultados foi muito mais impactante comparada à ocorrida na expressão do IL-7R α normal. Ou seja, embora não se possa concluir que o IL-7Rmut provoca o bloqueio do processo de diferenciação dos precursores linfóides, podemos ao menos concluir que ele promove manutenção da sinalização proliferativa (*hallmark* #1). Há vários relatos de que a expressão ectópica de receptores hematopoiéticos linhagem-específicos podem induzir outras linhagens, como EpoR (Goldsmith *et al.*, 1998; Dubart *et al.*, 1994), CSF-1R (Pharr *et al.*, 1994), GM-CSF (Nishijima *et al.*, 1995), GCSF (Yang *et al.*, 1998; Semerad *et al.*, 1999) e IL-5R (Takagi *et al.*, 1995). Apesar do IL-7R α ser necessário para o desenvolvimento e sobrevivência linfóide, se ele for expresso nos progenitores hematopoiéticos, responderá à IL-7 e dará origem a células não linfóides, especialmente neutrófilos (Jiang *et al.*, 2005b).

A IL-7 é considerada primariamente um fator de crescimento anti-apoptótico para linfócitos, com potencial para uso clínico no tratamento de imunodeficiências. Porém, ainda é pouco explorado o

efeito desta interleucina em linhagens não linfóides. É sabido que a deleção da IL-7 não afeta o desenvolvimento de linhagens hematopoiéticas não-linfóide (Freedman *et al.*, 1995), porém sua administração ectópica em camundongos, leva a um aumento no número de mielócitos, monócitos e eritrócitos no baço, e neutrófilos e monócitos no sangue (Aiello *et al.*, 2007). Outros estudos também mostraram que a IL-7 aumenta a mobilização de progenitores hematopoiéticos pluripotente da medula óssea para o sangue periférico quando administrada em camundongos (Damia *et al.*, 1992; Faltynek *et al.*, 1992; Grzegorzewski *et al.*, 1995).

Os progenitores mielóides primitivos, bem como células mielóides maduras não expressam IL-7R (Park *et al.*, 1990; Akashi *et al.*, 2000; Girard e Beaulieu, 1997). Já o efeito eritropoietico da IL-7 parece ser independente de células T e age diretamente em um sub-grupo de progenitores eritroides IL-7R⁺ (Aiello *et al.*, 2007). Seria interessante estudar presença de mutações do IL7R α em eritroleucemias.

5. CONCLUSÃO

- 9% das LLA-T de crianças apresentam mutações do IL-7R α ;
- As LLA-T de crianças não apresentam mutações do domínio pseudoquinase (JH2) de JAK1 e nos domínios quinase (JH1) e pseudoquinase (JH2) de JAK3;
- As mutações ocorrem em um *hotspot*, compreendido entre os resíduos de aminoácidos 240 e 247, no éxon 6 do IL7R α ;
- As mutações encontradas no *IL7R* em pacientes LLA-T conferem ativação constitutiva das vias JAK-STAT e PI3K/AKT;
- A presença de um resíduo de cisteína nas inserções/deleções no IL-7R α causa homodimerização entre cadeias IL-7R α através da formação de pontes dissulfeto;
- A homodimerização entre IL-7R α por ponte dissulfeto não implica, necessariamente, em ativação constitutiva da via de sinalização;
- Células transduzidas com o IL-7R α mutante apresentam aumento de sobrevivência e proliferação, independentemente de fatores de crescimento, e levam a desenvolvimento de tumores e infiltração de órgãos quando transplantadas em camundongos;
- IL-7R α mutantes sinaliza constitutivamente via JAK/STAT e promove a sobrevivência e proliferação celular independentemente de IL-7, JAK3 e γc ;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adolfsson J. *et al.* Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. **Cell**, 2005. **121**: p 295–306.
- Ahsberg J. *et al.* Interleukin-7-induced Stat-5 acts in synergy with Flt-3 signaling to stimulate expansion of hematopoietic progenitor cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 2010. **285**(47): p. 36275 – 36284.
- Aiello F.B. *et al.* IL-7 Induces myelopoiesis and erythropoiesis. **Journal Of Immunology**, 2007. **178**(3): p.1553-1563.
- Akashi K. *et al.* Two distinct pathways of positive selection for thymocytes. **Proceedings of the National Academy of Science**, 1998. **95**: p. 2486–2491.
- Akashi K. *et al.* A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. **Nature**, 2000.**404**: p. 193–197.
- Al Rawi M.A. *et al.* Aberrant expression of interleukin-7 (IL-7) and its signalling complex in human breast cancer. **European Journal of Cancer**, 2004. **40**: p. 494–502.
- Alves N.L. *et al.* Differential regulation of human IL-7 receptor α expression by IL-7 and TCR signaling. **The journal of Immunology**, 2008. **180**: p. 5201–5210.
- Arvanitakis L. *et al.* Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. **Nature**, 1997. **385** (6614): p. 347-350.
- Asnafi V. *et al.* Impact of TCR status and genotype on outcome in adult T acute lymphoblastic leukemia: a LALA-94 study. **Blood**, 2005.**105**: p.3072-3078.
- Asnafi V. *et al.* *NOTCH1/FBXW7* mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study. **Blood**, 2009. **113**: p. 3918-3924.
- Atamas S.P. Alternative splice variants of cytokines: making a list. **Life Sciences**, 1997. **61**: p.1105 - 1112.
- Baak U. *et al.* Thymic adult T-cell acute lymphoblastic leukemia stratified in standard- and high-risk group by aberrant HOX11L2 expression: experience of the German multicenter ALL study group. **Leukemia**, 2008. **22**: p. 1154-1160.
- Barata J.T. *et al.* Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1}. **Blood**, 2001. **98**(5): 1524-1531.
- Barata J.T. *et al.* Common gamma chain-signaling cytokines promote proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, 2004. **89**(12): p. 1459-67.
- Blume-Jensen P. and Hunter T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, 2001. **411**: p. 355–365
- Bray S.J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2006.**7**: 678–689.

- Brian M.J. et al. Activation induced changes in expression and structure of the IL-7 receptor on human T cells. **International Immunology**, 1992. **4**(.2): p 277-282.
- Burger H. et al. Lack of c-kit exon 11 activating mutations in c-KIT/CD117-positive SCLC tumour specimens. **European Journal of Cancer**, 2003. **39**: 793–799.
- Torres-Cabala C.A. et al. Correlation between KIT expression and KIT mutation in melanoma: a study of 173 cases with emphasis on the acral-lentiginous/mucosal type. **Modern Pathology**, 2009. **22**(11): p. 1446 – 1456.
- Chapiro E. et al. Activating mutation in the TSLPR gene in B-cell precursor lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, 2010. **24**(3): p. 642 – 645.
- Chen M. et al. Complex effects of naturally occurring mutations in the JAK3 pseudokinase domain: evidence for interactions between the kinase and pseudokinase domains. **Molecular and Cellular Biology**, 2000. **20**: p.947-956.
- Choi Y.L. et al. Identification of a constitutively active mutant of JAK3 by retroviral expression screening. **Leukemia Research**, 2007. **31**(2): p.203-9.
- Choudhary C. et al. Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. **Molecular Cell**, 2009. **36**: p. 326–339.
- Christensen J.L. and Weissman I L. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: A simple method to isolate long-term stem cells. **Proceedings of the National Academy of Science**, 2001. **98**: p. 14541–14546.
- Colle J.H. et al. CD127 expression and regulation are altered in the memory CD 8 T cells of HIV-infected patients - reversal by highly active anti-retroviral therapy (HAART). **Clinical and Experimental Immunology**, 2006. **143**: p. 398 – 403.
- Cosenza L. et al. Interleukin-7 receptor expression and activation in nonhaematopoietic neoplastic cell lines. **Cellular Signalling**, 2002. **14**: p.317–25.
- D'Souza W.N. and Lefrançois L. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. **The Journal of Immunology**, 2003. **171**: p. 5727–5735.
- Damia, G. et al. Administration of recombinant human interleukin-7 alters the frequency and number of myeloid progenitor cells in the bone marrow and spleen of mice. **Blood**, 1992. **79**: p. 1121–1129.
- Di Santo J.P. et al. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. **Proceedings of the National Academy of Science**, 1995. **92**: p. 377–81.
- Dibirdik I. et al. Engagement of interleukin-7 receptor stimulates tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and clonal proliferation of human T-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. **Blood**, 1991. **78**: p.546-570.
- Douet-Guilbert N. et al. t(4;11)(q21;p15), including one complex translocation t(1;4;11)(p32;q21;p15), in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**, 2003. **27**: p. 965-967.
- Dus D. et al. IL-7 receptor is present on human microvascular endothelial cells. **Immunology Letters**, 2003. **86**: p. 163–8.

- Faltynek C.R. *et al.* Administration of human recombinant IL-7 to normal and irradiated mice increases the numbers of lymphocytes and some immature cells of the myeloid lineage. **The Journal of Immunology**, 1992. **149**; p. 1276–1282.
- Ferrando A.A. *et al.* Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Cell**, 2002. **1**(1): p. 75 – 87.
- Ferrando A.A. *et al.* Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, 2004. **363**: p. 535-536.
- Flex E. *et al.* Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. **The Journal of Experimental Medicine**, 2008. **205**(4): p.751-758.
- Freden-Jeffrey U. *et al.* Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. **The Journal of Experimental Medicine**, 1995. **181**: p. 1519–1526.
- Gekas C. *et al.* The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. **Developmental Cell**, 2005. **8**(3): p. 365-375.
- Ghebranious N. and Donehower L.A. Mouse models in tumor suppression. **Oncogene**, 1998. **17**: p. 3385–3400.
- Giliani S. *et al.* Cytokine-mediated signalling and early defects in lymphoid development. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, 2005. **5**: p. 519–524.
- Girard D. and Beaulieu A.D. Absence of the IL-7 receptor component CDw127 indicates that gamma(c) expression alone is insufficient for IL-7 to modulate human neutrophil responses. **Clinical Immunology and Immunopathology**, 1997. **83**: p. 264–271.
- Goldstone AH, Richards SM, Lazarus HM, et al. In adults with standard-risk acute lymphoblastic leukemia, the greatest benefit is achieved from a matched sibling allogeneic transplantation in first complete remission, and an autologous transplantation is less effective than conventional consolidation/ maintenance chemotherapy in all patients: final results of the International ALL Trial (MRC UKALL XII/ECOG E2993). **Blood**. 2008; **111**: p.1827-1833.
- González-García S. *et al.* CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7R α gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. **The Journal of Experimental Medicine**, 2009. **206**(4): p.779-91
- Goodwin R.G. *et al.* Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. **Proceedings of the National Academy of Science**, 1989. **86**(1): p. 302-306.
- Goodwin R.G. *et al.* Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. **Cell**, 1990. **60**(6): p. 941-51.
- Grabher C. *et al.* Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, 2006. **6**(5): p.347-59
- Gregory S.G. *et al.* Interleukin-7 receptor α chain (IL-7R α) show allelic and functional association with multiple sclerosis. **Nature Genetics**, 2007. **39**(9): p.1083-1091.

- Groner *et al.* Regulation of the trans-activation potential of STAT5 through its DNA-binding activity and interactions with heterologous transcription factors. **Growth Hormone & IGF Research**, 2000. Suppl B:S15-20. Review
- Grzegorzewski K.J. *et al.* Mobilization of long-term reconstituting hematopoietic stem cells in mice by recombinant human interleukin 7. **The Journal of Experimental Medicine**, 1995. **181**: 369–374.
- Hakim F.T. and Gress R.E. Thymic involution. **Methods in Molecular Biology**, 2007. **380**: p. 377 – 390.
- Hanahan D. and Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 2011. **144**(5): p. 646-74.
- Hanratty W.P. and Dearolf C.R. The *Drosophila* Tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the *hopscotch* locus. **Molecular and General Genetics**, 1993. **238**: p. 33-37.
- Heaney M.L. and Golde D.W. Soluble cytokine receptors. **Blood**, 1996. **87**(3): p. 847-57.
- Heldin C.H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. **Cell**, 1995. **80**(2): p. 213-23.
- Henriques C.M. *et al.* IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R α in T cells. **Blood**, 2010. **115**(16): p.3269-3277.
- Hertzberg L. *et al.* Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. **Blood**, 2010. **115**: p.1006–1017.
- Hodges D. and Bernstein S.I. Genetic and biochemical analysis of alternative RNA splicing. **Adv Genet**, 1994. **31**: p. 207 - 281.
- Hoffbrand A.V. and Pettit J.E. Acute Leukaemias. *Essential Haematology*, **Blackwell Science**, 1993. 3ed: p. 209
- Hofmeister R. *et al.* Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, 1999. **10**: p. 41–60.
- Holgate S.T. and Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma, **Nature**, 2008. **8**: p. 218–230.
- Homminga I. *et al.* Integrated Transcript and Genome Analyses Reveal NKX2-1 and MEF2C as Potential Oncogenes in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer Cell**, 2011. **19**: 484–497.
- Huang J. and Muegge K. Control of chromatin accessibility for V(D)J recombination by interleukin-7. **Journal of Leukocyte Biology**, 2001. **69**: p. 907-911.
- Ihle J.N. and, Kerr I.M. JAKs and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. **Trends Genet**, 1995. **11**: 69-74.
- Ihle J.N. Signaling by the cytokine receptor superfamily in normal and transformed hematopoietic cells. **Advances in Cancer Research**, 1996. **68**: p 23 – 65.
- Iwata M. *et al.* Functional interleukin-7 receptors (IL-7Rs) are expressed by marrow stromal cells: binding of IL-7 increases levels of IL-6 mRNA and secreted protein. **Blood**, 2002. **100**: p. 1318–1325.

- Izon D.J. *et al.* Deciphering the role of Notch signaling in lymphopoiesis. **Current Opinion in Immunology**, 2002. **14**: p. 192–199.
- Jahn T. *et al.* Direct interaction between Kit and the interleukin-7 receptor. **Blood**, 2007. **110**: p. 1840-1847.
- Janeway C.A. *et al.* Immunobiology: the immune system in health and disease. **New York: Garland Science**, 2005. 6 ed.
- Jeong E.G. *et al.* Somatic Mutations of JAK1 and JAK3 in Acute Leukemias and Solid Cancers. **Clinical Cancer Research**, 2008. **14**: p. 3716-3721.
- Jiang Q. *et al.* Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 2005a. **16**: p. 513–533.
- Jiang Q. *et al.* Retroviral transduction of IL-7R α into IL-7R $\alpha^{-/-}$ bone marrow progenitors: correction of lymphoid deficiency and induction of neutrophilia. **Gene Therapy**, 2005b. **12**: p 1761–1768.
- Johansen K.A. *et al.* Localized JAK/STAT signaling is required for oriented cell rearrangement in a tubular epithelium. **Development**, 2003. **130**: p.135-145.
- Jotta P.Y. *et al.* Negative prognostic impact of PTEN mutation in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, 2010. **24**(1): p. 239-242.
- Karawajew L. *Et al.* Inhibition of in vivo spontaneous apoptosis by IL-7 correlates with Bcl-2 up-regulation, cortical/mature immunophenotype, and better early cyto-reduction of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 2000. **96**(1): p. 297-306.
- Katsura Y. Redefinition of lymphoid progenitors. **Nature. Reviews Immunology**, 2002.2: p. 127–132.
- Kawamoto H. A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. **Trends Immunol**, 2006.27: p. 169–175.
- Khaled A.R. *et al.* Lymphocide: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. **Nature. Reviews Immunology**, 2002. **2**: p. 817–30.
- Kim H.P. *et al.* Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 2006. **17**: p. 349–366.
- Kitayama H. *et al.* Constitutively activating mutations of c-KIT receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. **Blood**, 1995. **85**(3): p. 790-798.
- Koch U. and Radtke F. Notch in T-ALL: new players in a complex disease. **Trends in Immunology**, 2011. **32**(9): p. 434 – 442.
- Kondo M. *et al.* Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes. **Science**, 1994. **263**: p. 1453-1454.
- Kondo M. *et al.* Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. **Cell**, 1997. **91**: p. 661–672.

- Lai S.Y. *et al.* Shared gamma(c) subunit within the human interleukin-7 receptor complex: a molecular basis for the pathogenesis of X-linked severe combined immunodeficiency. **The Journal of Clinical Investigation**, 1997. **99**: p. 169-177.
- Langerak A.W. *et al.* Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. **Leukemia**, 1997. **11**(12): p. 2192-2199.
- Larsson J. and Karlsson S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. **Oncogene**, 2005. **24**: p. 5676–5692.
- Leonard W.J. *et al.*, Signaling via the IL-2 and IL-7 receptors from the membrane to the nucleus. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, 1999. **64**: p. 417 – 424.
- Liu Y.J. *et al.* TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. **Annual Review of Immunology**, 2007. **25**: p. 193–219.
- Livnah O. *et al.* Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. **Science**, 1990. **283**: p., 987 - 990.
- Lodolce J. P. *et al.* IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation, **Immunity**, 1998. **9**: p. 669–676.
- Lu X. *et al.* Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. **The Journal of Biological Chemistry**, 2006. **281**: p. 7002–7011.
- Lundmark F. *et al.* Variation in interleukin 7 receptor a chain (IL-7R) influences risk of multiple sclerosis. **Nature Genetics**, 2007. **39**(9): p. 1108 – 1113.
- Lynch M. *et al.* The interleukin-7 receptor gene is at 5p13. **Human Genetics**, 1992. **89**: p. 566–8.
- Mackall C.L. *et al.* Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. **Nature Reviews. Immunology**, 2011. **11**(5): 330 – 342.
- Maillard *I et al.* Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the NOTCH pathway. **Annual Review of Immunology**, 2005. **23**: p. 945–74.
- Makrynikola V. *et al.* Effects of interleukin 7 on the growth of clonogenic cells in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Leukemia Research**, 1991. **15**: p. 879-882.
- Malyukova A. *et al.* The tumor suppressor gene hCDC4 is frequently mutated in human T-cell acute lymphoblastic leukemia with functional consequences for Notch signaling. **Cancer Research** 2007; **67**: p. 5611-5616.
- Månsson R. *et al.* Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. **Immunity**, 2007. **26**: p. 407–419.
- Maraskovsky E. *et al.* Impaired survival and proliferation in IL-7 receptor-deficient peripheral T cells. **The Journal of Immunology**, 1996. **157**: p. 5315–5323.
- Mazzucchelli R. and Durum S.K. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. **Nature reviews Immunology**, 2007. **7**: p. 144-154.

- McElroy C.A. *et al.* Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7R α and bioph **Structure**, 2009. **17**: p. 54–65.
- Morrison S.J. and Weissman I.L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. **Immunity**, 1994. **1**(8): p. 661 – 673.
- Mullighan C.G. *et al.* JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Science** 2009; **106**(23): p. 9414-9418.
- Nelms K. *et al.* The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annual Review of Immunology**, 1999. **17**: p. 701–738.
- Noguchi M. *et al.* Interleukin-2 Receptor γ Chain: A Functional Component of the Interleukin-7 Receptor. **Science**, 1993. **262** (5141): p. 1877-1880.
- Nowak E.C. and Noelle R.J. Interleukin-9 as a T helper type 17 cytokine. **Immunology**, 2010. **131**: p 169–173.
- Nutt S.L. *et al.* Commitment of the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. **Nature**, 1999. **401**: p: 556–562.
- O’Neil J. *et al.* FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to γ -secretase inhibitors. **The Journal of Experimental Medicine**, 2007. **204**: p. 1813-24.
- Orkin S.H. and Zon L.I. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. **Nature Immunology**, 2002. **3**(4): p.323 – 328.
- Palmer M.J. *et al.* Interleukin-7 receptor signaling network: an integrated systems perspective. **Cellular and Molecular Immunology**, 2008. **5**(2): p. 79–89.
- Pandey A. *et al.* Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. **Nature Immunology**, 2000. **1**(1): p. 59–64.
- Park J.H. *et al.*, Suppression of IL7R α Transcription by IL-7 and Other Prosurvival Cytokines: A Novel Mechanism for Maximizing IL-7-Dependent T Cell Survival. **Immunity**, 2004. **21**(2): p. 289-302.
- Park L.S. *et al.* Murine interleukin 7 (IL-7) receptor: characterization on an IL-7-dependent cell line. **The Journal of Experimental Medicine**, 1990. **171**(4): p. 1073–1089.
- Park L.S. *et al.* Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, 1990. **192**(5): p. 659-70.
- Peschon J.J. *et al.* Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**, 1994. **180**: p. 1955-1960.
- Peters M. *et al.* Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. **Blood**, 1998. **92**: p. 3495–3504.
- Pieters R. and Carroll W.L. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Clinics of North America**, 2008. **55**: p. 1–20.

- Pikman Y. *et al.* MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. **PloS Medicine**, 2006. **3**(7): p. e270.
- Pui C.H. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, 2004. **350**(15): p. 1535- 1548.
- Prohaska S.S. *et al.* Developmental plasticity of lymphoid progenitors. *Seminars in Immunology*, 2002.**14**(6): p. 377–384.
- Puel A. and Leonard W.J. Mutations in the gene for the IL-7 receptor result in T–B+NK+ severe combined immunodeficiency disease. **Current Opinion in Immunology**, 2000.**12**(4): p. 468–473.
- Pui C.H. and Evans W.E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **The New England Journal of Medicine**, 2006. **354**(2): p. 166-178.
- Pui C.H. *et al.* Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, 2008. **371**(9617): p. 1030-1043.
- Rathmell J.C. *et al.* In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. **Molecular Cell**, 2000. **6**(3): p. 683–692.
- Rich B.E. *et al.* Cutaneous lymphoproliferation and lymphomas in interleukin 7 transgenic mice. **The Journal of Experimental Medicine**, 1993. **177**(2): p. 305-316.
- Ridder A. *et al.* Tryptophan supports interaction of transmembrane helices. **Journal of Molecular Biology**, 2005. **354**(4): p. 894-902.
- Rolink A.G. *et al.* Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. **Nature**, 1999. **401**(6753): p. 603–606.
- Rose T. *et al.* Identification and Biochemical Characterization of Human Plasma Soluble IL-7R: Lower Concentrations in HIV-1-Infected Patients. **The Journal of Immunology**, 2009. **182**: 7389–7397.
- Rose T. *et al.* Interleukin-7 compartmentalizes its receptor signaling complex to initiate CD4 T lymphocyte response. **The Journal of Biological Chemistry**, 2010.**285**(20): p. 14898–14908.
- Roy M. *et al.* The multifaceted role of Notch in cancer. **Current Opinion in Genetics and Development**, 2007.**17**(1): p. 52–59.
- Russell L.J. *et al.* Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 2009.**114**(13): p. 2688 – 2698.
- Saba I. *et al.* IL-7R–dependent survival and differentiation of early T-lineage progenitors is regulated by the BTB/POZ domain transcription factor Miz-1. **Blood**, 2011.**117**(12): p. 3370-3381.
- Sablina A.A. *et al.* The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. **Nature Medicine**, 2005. **11**(12): p.1313 – 1306.
- Saharinen P. and Silvennoinen O. The Pseudokinase Domain Is Required for Suppression of Basal Activity of JAK2 and JAK3 Tyrosine Kinases and for Cytokine-inducible Activation of Signal Transduction. **The Journal of Biological Chemistry**, 2002. **277**(49): p. 47954 – 47963.

- Saharinen P. *et al.* Regulation of the JAK2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. **Molecular and Cell Biology**, 2000. **20**: p. 3387-3395.
- Schindler C. *et al.* JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. **The Journal of Biological Chemistry**, 2007. **282**(28): p. 20059-20063.
- Schlissel M.S. *et al.* The interleukin 7 receptor is required for T cell receptor γ locus accessibility to the V(D)J recombinase. **The Journal of Experimental Medicine**, 2000. **191**(6): p.1045-50.
- Seddon B.*et al.* Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. **Nature Immunology**, 2003. **4**(7): 680–686.
- Shamim Z. *et al.*, Prognostic Significance of Interleukin-7 Receptor- α Gene Polymorphisms in Allogeneic Stem-Cell Transplantation: A Confirmatory Study. **Transplantation**, 2011. **91**(7): p. 731–736.
- Shamim Z.*et al.* Genetic polymorphisms in the genes encoding human interleukin-7 receptor-alpha: Prognostic significance in allogeneic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 2006. **37**: 485.
- Shochat C. *et al.* Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (*IL7R*) in childhood acute lymphoblastic leukemias. **The Journal of Experimental Medicine**, 2011.**208**:p. 901–908.
- Silva A. *et al.* Regulation of PTEN by CK2 and Notch1 in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia: rationale for combined use of CK2- and g-secretase inhibitors. **Haematologica**, 2010. **95**: p. 674-678.
- Silva *et al.* IL-7 Contributes to the Progression of Human T-cell Acute Lymphoblastic Leukemias. **Cancer Research**, 2011. **71**(14): p. 4780–4789.
- Sinnet D. *et al.* Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers – the childhood leukemia experience. **Familial Cancer**, 2006.**5**: p. 35-47.
- Sjölund J. *et al.* The Notch pathway in cancer: Differentiation gone awry. **European Journal of Cancer**, 2005.**41**: p. 2620–2629.
- Smith M.T.*et al.* Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2005.**206**: p. 237-245.
- Song J.H. *et al.* FBXW7 mutation in adult T-cell and B-cell acute lymphocytic leukemias. **Leukemia Research**, 2008.**32**: p. 1751-5.
- Spolski R. and Leonard W.J. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity, *Annual Review of Immunology*, 2008.**26**: p. 57–79.
- Surh C.D. and Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells, **Immunity**, 2008. **29**: p. 848–862.
- Teutsch S.M. *et al.* Identification of 11 novel and common single nucleotide polymorphisms in the interleukin-7 receptor-a gene and their associations with multiple sclerosis. **European Journal of Human Genetics**, 2003. **11**: p. 509–515.
- Thompson B.J. *et al.* The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. **The Journal of Experimental Medicine**, 2007.**204**: p. 1825-1835.

- Todd J.A. *et al.* Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. **Nature Genetics**, 2007. **39**: p. 857–864.
- Touw I. *et al.* Interleukin-7 is a growth factor of precursor B and T acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 1990.**75**: p. 2097-2101.
- Townsend J.M. *et al.* IL-9 deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development, **Immunity**, 2000.**13**:p.573–583.
- Van Grotel M. *et al.* Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences. **Leukemia**, 2008. **22**(1): p.124-31.
- von Freeden Jeffry U. *et al.* Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. **The Journal of Experimental Medicine**, 1995**181**(4): p.1519 – 1526.
- Walz C. *et al.* Activated JAK2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. **The Journal of Biological Chemistry**, 2006. **281**(26): p. 18177-83.
- Weng A.P. *et al.* Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. **Science**, 2004.**306**:p. 269–271.
- Wofford J.A. *et al.* IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. **Blood**, 2008. **111**(4): p. 2101-2111.
- Yamaoka K. *et al.* The Janus kinases (JAKs). **Genome Biology**, 2004.**5**(12): p.253.
- Yasukawa H. *et al.* Negative regulation of cytokine signaling pathways. **Annual Review of Immunology**, 2000. **18**: p.143-164.
- Yilmaz O.H. *et al.* PTEN dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia initiating cells. **Nature**, 2006. **441**: p. 475–482.
- Yoda A. *et al.* Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Science**, 2010. **107**(1): p. 252-257.
- Zhang J. *et al.* PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. **Nature**, 2006.**441**: p. 518–522.
- Ziegler S.F. and Liu Y.J. Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. **Nature Immunology**, 2006.**7**: p. 709–714.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

CEP, 12/02/09.
(Grupo II)

PARECER CEP: Nº 1105/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0014.0.144.146-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA E PI3K NA RESISTÊNCIA A DROGAS DA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA PEDIÁTRICA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Andrés Yunes.

INSTITUIÇÃO: Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/12/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 12/02/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

1- Quantificar aminoácidos no meio de cultura de células de estroma da medula óssea tratadas com IGFBP7 + ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2); 2- Avaliar efeito de IGFBP7+ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2) na sobrevivência de células primárias de LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA) frente à aspariginase, quando em cultura de curta duração, sem estroma; 3- Avaliar efeito de IGFBP7+ligantes (insulina, IGF-1, IGF-2) na expressão de mRNA de ASNS, glutamina sintetase (GS) e de transportadores de aminoácidos nas células de LLA e do estroma; 4- Tratar células de LLA com diferentes doses de EBIO e verificar viabilidade celular frente a diferentes doses de daunorubicina, quantificando a incorporação intracelular da droga através de citometria de fluxo; 5- Desvendar o mecanismo de fluxo intracelular ligado ao KCNN4, usando substratos e inibidores específicos para os diferentes transportadores; 6- Analisar distribuição intracelular da daunorubicina em células de LLA tratadas ou não com EBIO, por microscopia de fluorescência e co-marcação de lisossomos com Lysotracker blue, do Golgi com NBD-C6-Ceramide e do retículo endoplasmático com DiOC6; 7- avaliar uso do clotrimazol (ou TRAM-34) na sensibilização das células de LLA aos agentes quimioterápicos, in vitro e in vivo (em camundongos); 8- Quantificar níveis de mRNA de GPR56 em amostras de 150 pacientes com LLA e buscar associações com características biológico-clínicas dos pacientes; 9- Confirmar a expressão da proteína GPR56 na superfície das células de LLA, por imunocitoquímica; 10- Seqüenciar os exons 3,5,8 e 9 de GPR56 em 30 amostras de DNA ou cDNA de blastos de pacientes e de linhagens de LLA. Serão analisados 3 grupos de pacientes: (i) com doença extramedular ao diagnóstico, (ii) com baixa expressão de GPR56 (<0,05 moléculas de GPR56/ABL), (iii) grupo de pacientes com expressão de GPR56 na mediana; 11- silenciar o GPR56 por iRNA em uma linhagem de LLA e analisar resistência das células a aspariginase quando em cultura com ou sem estroma de medula óssea.

III - SUMÁRIO

O autor relata que 20% a 30% das crianças com leucemia linfóide aguda (LLA) sofrem recaídas da doença e apresentam maior resistência aos quimioterápicos. Métodos modernos de



análise de expressão gênica possibilitam a identificação de genes relacionados ao processo de resistência à drogas. Segundo referências apresentadas pelo autor, as células da recaída são altamente proliferativas e mesmo assim mais resistente à quimioterapia, esse processo pode estar relacionado com a maior expressão de genes de reparo do DNA e de anti-apoptose, que compensariam os efeitos da quimioterapia. A interação de blastos leucêmicos com as células estromais da medula óssea (obs: o estroma é o tecido conjuntivo de sustentação de um órgão) aumenta a resistência da LLA à leucemia.

Dois sub-projetos fazem parte do projeto maior. No primeiro a proposta é estudar a função dos genes IGFBP7, KCNN4 e GPR56 na resistência à drogas para o tratamento de LLA, no contexto da interação leucemia-estroma. Para realização desses sub-projetos serão incluídas amostras de sangue/medula óssea de crianças portadoras de leucemia linfóide aguda, sem tratamento prévio, atendidas integralmente no Centro Infantil Boldrini, a pesquisa será feita com o restante do material colhido para diagnóstico e não acarretará em nenhum procedimento ao paciente. É prevista a utilização de 150 amostras retrospectivas. São descritos os procedimentos para obtenção de amostras com, pelo menos, 85% de blastos leucêmicos, basicamente centrifugação diferencial e filtração. As amostras são preservadas em nitrogênio líquido. O controle será feito com amostras provenientes de doadores normais e de pacientes com resultado negativo após exame. O DNA de indivíduos normais será obtido de cartões de triagem neonatal (CIPOI-UNICAMP). Os testes laboratoriais serão realizados com amostras não identificadas e descartadas após seu uso. Segundo o autor a pesquisa com o DNA de tecido estocado não precisa de autorização, desde que seja mantido o anonimato do depositante. O teste de viabilidade e apoptose celular será realizado em cultura em placa, sendo adicionados os produtos de estudo (IGFBP7, insulina, IGF-1, IGF-2, EBIO, clotrimazol, AS605240, daunorubicina, vincristina, asparaginase, corticóide) e avaliação final será colorimétrica.

A quantificação da expressão gênica será por extração total de RNA e síntese de DNA e os mesmos primers utilizados para o PCR também serão usados no sequenciamento.

No segundo sub-projeto existe a proposta de seqüenciar o cDNA de IL-7R, e o domínio JH2 de Jak1 e Jak3, dos blastos leucêmicos de 50 casos de LLA-T (linhagem linfocitária - T). Os dados de polimorfismos do IL-7R serão comparados com freqüências publicadas da população caucasiana. Além disso, pretende-se analisar a freqüência dos mesmos polimorfismos em amostras de 40 indivíduos saudáveis da nossa população. Caso seja encontrada alguma mutação no IL-7R ou Jak, o cDNA mutante será clonado, assim como o receptor IL-2R, e ambos serão transfectados em células HEK293 e uma série de testes será realizada.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

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.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI I- DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de janeiro de 2009.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

Uso exclusivo da CIBio:

Número de projeto / processo:

JK 9.1

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron

Título do projeto: Estudo do IL-7R na leucemia linfóide aguda pediátrica de linhagem T

Pesquisador responsável: Dr José Andrés Yunes (orientador)/ Dr Jörg Kobarg (co-orientador)

Experimentador: Priscila Pini Zenatti

Nível do treinamento do experimentador: []-Iniciação científica, []-mestrado, [X]-doutorado, []-doutorado direto, []-pós-doutorado, []-nível técnico, []-outro, especifique: _____

Resumo do projeto:

A IL-7 é uma citocina essencial para sobrevivência e proliferação dos tímócitos prematuros normais e linfócitos T maduros. Embora o mecanismo de ação molecular pelo qual as citocinas promovem a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular seja pouco conhecido, sabe-se que o IL-7R pode ativar vias de sinalização nas LLA-T que normalmente não são ativadas nas células T normais (por exemplo, a via MEK/Erk). Isto indica que a sinalização via IL-7R nas LLA-T pode ocorrer de maneira diferente dos linfócitos T normais, abrindo caminho para o desenho de terapias específicas contra a leucemia que não afetem as células normais. Daí a importância de empreender o estudo da via de sinalização desencadeada pelo IL-7R. No presente projeto, propomos usar o sistema triplo-híbrido para identificar proteínas que interagem com a região intracitoplasmática do IL-7R, que eventualmente poderão representar alvos interessantes para o desenho de novas drogas e contribuir para a melhor compreensão da biologia da LLA. Além disso, propomos investigar ocorrência de mutações capazes de levar a um ganho de função, hiperativando ou ocasionando a ativação constitutiva do IL-7R, as quais estariam contribuindo para o surgimento ou progressão da LLA-T

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 26.4.11

Parecer final: [X]-projeto aprovado, []-projeto recusado, []-projeto com deficiências, favor comentários anexo.

Jörg Kobarg
Presidente de CIBio – ABTLuS-LNBio
Jörg Kobarg

Celso Eduardo Benedetti
Membro da CIBio – ABTLuS-LNBio
Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Andrea Balan
Membro da CIBio – ABTLuS-LNBio
Andrea Balan

Carolina Barbosa Marini
Membro da CIBio – ABTLuS-SGT
Carolina Barbosa Marini

Fabio Squina
Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
Fabio Squina

Sindelia Freitas Azzoni
Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
Sindelia Freitas Azzoni

Roberto Ruller
Membro da CIBio da ABTLuS-CTBE
Roberto Ruller