

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOLOGÍA CEL·LULAR, FISIOLÓGIA I
D'IMMUNOLOGÍA

RESUMEN

de la tesis doctoral con el título:

**STAT1 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR
FLUDARABINA E INHIBIDORES DE JAK KINASAS EN
LAS CELULAS DE LLC-B.
PAPEL DE LAS CELULAS ADHERENTES EN LA
APOPTOSIS INDUCIDA POR FLUDARABINA**

Presentada para la obtención del título de Doctor en Inmunología por la
Universitat Autònoma de Barcelona

Luis Martinez Lostao
Barcelona, Diciembre del 2004

**STAT1 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR FLUDARABINA E INHIBIDORES
DE JAK KINASAS EN LAS CELULAS DE LLC-B.
PAPEL DE LAS CELULAS ADHERENTES EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR
FLUDARABINA.**

La vía JAK/STAT está implicada en diversos eventos celulares como la diferenciación, proliferación, supervivencia celular y apoptosis. Sin embargo, la activación aberrante de los STAT da lugar a varias situaciones patológicas, incluida la oncogénesis. La implicación de la vía JAK/STAT en oncogénesis ha sido ampliamente estudiada. Los STAT están constitutivamente activadas en diversos cánceres humanos incluyendo varias leucemias.

La Leucemia Linfocítica Crónica de células B (LLC-B), la leucemia más común en el mundo occidental, se caracteriza por la acumulación de células B maduras CD5+ detenidas en la fase de G0/ G1 del ciclo celular. Existen fuertes evidencias de que la LLC-B está relacionada con defectos en la apoptosis. Tanto defectos genéticos como estímulos externos influyen en el anormal comportamiento de estas células.

Fludarabina (F-ara-A) es un análogo de adenosina resistente a la adenosina deaminasa ampliamente utilizado en el tratamiento de la LLC-B. Aunque la principal acción de F-ara-A es la inhibición de la síntesis de ADN, se ha demostrado su acción terapéutica en LLC-B y otros cuadros linfoproliferativos indolentes con índice muy bajo de proliferación. Se han descrito otros mecanismos de acción para F-ara-A, pero los mecanismos exactos por los que fludarabina mata las células de LLC-B no están aclarados.

La inhibición específica de la señalización por STAT1 ha sido implicada en el efecto de fludarabina en la LLC-B. Se ha descrito que fludarabina inhibía específicamente STAT1 suprimiendo la capacidad de las células de responder a los interferones. Por tanto, aunque no se ha observado la fosforilación en tirosinas de STAT1 en células sin estimular de pacientes con LLC-B, STAT1 podría ser un importante factor en la transmisión de señales antiapoptóticas en la LLC-B. Esto, justifica el estudio de otras drogas capaces de bloquear la activación de STAT1, como los inhibidores de JAK kinasas AG490 y WHI-P131 para su uso como agentes terapéuticos en la LLC-B.

En este trabajo, analizamos la capacidad de fludarabina, un conocido inductor de la apoptosis en células de LLC-B, y de dos inhibidores de JAK kinasas, AG490 y WHI-P131, para bloquear la activación STAT1 en las células de LLC-B. También estudiamos la capacidad de estas drogas para inducir apoptosis en estas células.

Nuestros datos demuestran que mientras que todas las drogas inducían la apoptosis en las LLC-B analizadas, sólo AG490 y WHI-P131 inhibían significativamente la activación STAT1 por interferón-gamma en las células de LLC-B.

A pesar de su longevidad *in vivo*, las células de LLC-B sufren frecuentemente una apoptosis espontánea *in vitro*. Esto implica que la muerte celular programada de las células de LLC-B cultivadas resulta de la ausencia de señales esenciales en la supervivencia. Estas señales externas pueden provenir de otros tipos celulares bien por la producción de factores de crecimiento o bien por el contacto célula-célula. Entre las células implicadas en la supervivencia *in vitro* de la LLC-B, se ha descrito un subgrupo de células derivadas de sangre periférica capaces de diferenciarse espontáneamente *in vitro*. Estas células adherentes expresan marcadores de estirpe monocítica y protegen a las células de LLC-B de la apoptosis espontánea desempeñando un papel como células “*nurselike cells*” (NLC).

Para conocer mejor los mecanismos implicados en el efecto antitumoral de fludarabina en las células LLC-B, estudiamos el efecto de fludarabina en las NLC y sus consecuencias sobre la viabilidad de las células LLC-B realizando cultivos cruzados. Nuestros datos demuestran que fludarabina puede bloquear el desarrollo de las NLC en cultivo e inducir la muerte de las NLC diferenciadas cuando se permite su crecimiento y que fludarabina induce la apoptosis *in vitro* de las células LLC-B principalmente por una acción directa sobre dichas células tumorales.

**STAT1 IN APOPTOSIS INDUCED BY FLUDARABINE AND JAK KINASE
INHIBITORS IN B-CLL CELLS.**

ROLE OF THE ADHERENT CELLS IN APOPTOSIS INDUCED BY FLUDARABINE.

The JAK/STAT pathway is involved in normal cellular events, such as differentiation, proliferation, cell survival and apoptosis. However, aberrant activation of STAT signaling gives rise to various pathological events, such as oncogenesis. Implication of the JAK/STAT pathway in oncogenesis has been widely reported. STAT proteins are constitutively activated in an increasing number of human cancers including a variety of leukemias.

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), the most common leukemia in the Western world, is characterized by the accumulation of mature CD5+ B-cells arrested in the G0/early G1 phase of the cell cycle. There is strong evidence that the B-CLL is primarily related to defective apoptosis. Genetic defects and external stimuli may both influence the cell's abnormal behavior.

Fludarabine (F-ara-A) is an adenine nucleoside analog resistant to adenosine deaminase that has been extensively used to successfully treat B-CLL. Although F-ara-A's major action is inhibition of DNA synthesis, clinical investigations have shown strong therapeutic activity in B-CLL and other indolent lymphocytic malignancies with a very low rate of proliferation. Other mechanisms of action have been shown for F-ara-A, but the precise mechanisms by which fludarabine kills B-CLL cells remain unclear.

Inhibition of STAT1 signaling have been implicated in the effects of fludarabine on B-CLL. It was reported that fludarabine was able to inhibit specifically STAT1 signaling suppressing the ability of the cells to respond to interferons. Therefore, although tyrosine phosphorylation of STAT1 has not been observed in unstimulated cells from B-CLL patients, STAT1 could be a key factor in the transmission of antiapoptotic signals in B-CLL. It also supports further studies on drugs able to block the STAT1 activation, such as the JAK kinase inhibitors AG490 and WHI-P131, for use as therapeutic drugs on B-CLL patients.

In this study, we analyzed the ability of fludarabine, a well-known inducer of apoptosis in B-CLL cells, and two JAK kinase inhibitors, AG490 and WHI-P131, to block STAT1 activation on B-CLL cells. We also studied the ability of these drugs to induce apoptosis on these cells. Our data show that while all drugs were able to induce apoptosis on the B-CLL samples analyzed, only AG490 and WHI-P131 were able to strongly suppress STAT1 activation by interferon-gamma on B-CLL cells.

Despite their longevity *in vivo*, B-CLL cells often undergo spontaneous apoptosis *in vitro*. This implies that programmed cell death in cultured B-CLL cells results of the absence of essential survival signals. These external signals can arise from other cell types either producing growth factors or by cell-cell contact. Among the cells implicated in the survival of B-CLL *in vitro*, a subset of blood-derived cells that spontaneously differentiate *in vitro* has been described. These adherent cells expressed surface markers of monocytic lineage and protected to B-CLL cell from spontaneous apoptosis playing a role as “nurselike” cells (NLCs).

To gain insight into the mechanisms implicated in the antitumoral effect of fludarabine in B-CLL cells, we studied the effect of this drug in NLCs performing cross-cultures to know the role that NLCs play in the fludarabine induced-apoptosis in B-CLL cells. Our data showed that fludarabine was able to block the development of NLCs in culture and induced the death of these differentiated NLCs when their growth was allowed. Our study also indicates that fludarabine was able to induce apoptosis in B-CLL cells *in vitro* mainly by a direct action on these tumoral cells.