

Validación de las variantes STAT1 encontradas en pacientes con inmunodeficiencias primarias y evaluación del efecto de la inhibición JAK

Guisado Hernández, Paloma¹, Olbrich, Peter¹, Blanco-Lobo, Pilar¹, de Felipe, Beatriz¹, Santero Santurino, Eduardo², Neth, Olaf^{1*}

¹Sección de Infectología e Inmunopatología, Unidad de Pediatría, Hospital Virgen del Rocío/Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Sevilla, Spain, Avenida Manuel Siurot S/N, Edificio de laboratorios 2ª planta izquierda, Sevilla
²Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide/Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Junta de Andalucía, and Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Universidad Pablo de Olavide, Spain

RESUMEN

La regulación de las respuestas celulares a los interferones, citoquinas, factores de crecimiento y hormonas está mediada por el transductor de señales y el activador de las proteínas de transcripción (STAT). Después de la unión al receptor de superficie correspondiente, se fosforilan las moléculas de la quinasa de Janus (JAK), seguido del acoplamiento y fosforilación de las proteínas STAT asociadas. Las STATs formarán homo o heterodímeros y se translocarán al núcleo para regular la transcripción de los genes diana pro-inflamatorios. Se sabe que las mutaciones en varios genes STAT provocan inmunodeficiencias y/o síndromes de desregulación inmunológica.

En este proyecto se validó la función de las variantes encontradas en el gen STAT1. Para este ensayo funcional se evaluó el grado de fosforilación de STAT1 (pSTAT1) y las variantes que mostraban hiperfosforilación se clasificaron como mutaciones de ganancia de función (GOF). Recientemente, se han propuesto nuevas estrategias de tratamiento dirigidas a la vía JAK-STAT (inhibidores de JAK) para pacientes con mutaciones de STAT1 GOF. En este estudio evaluamos el efecto del ruxolitinib, el inhibidor de JAK más utilizado, en un modelo in vitro. Para ello, se obtuvieron muestras de sangre entera de pacientes con mutaciones STAT1 GOF y controles sanos, y se estimularon las células con IFN γ y se trataron con el inhibidor JAK ruxolitinib. Se realizó una tinción extra e intracelular con anticuerpos conjugados antifluor humano y se determinó la expresión de STAT1 y pSTAT1 en los monocitos mediante citometría de flujo.

Se estudiaron dos pacientes pediátricos y un paciente adulto relacionado. Los pacientes fueron reclutados en este estudio debido a su grave fenotipo clínico con infecciones bacterianas y fúngicas recurrentes, así como manifestaciones autoinmunes. La secuenciación STAT1 utilizando una plataforma de secuenciación de próxima generación (IonTorrent) reveló variantes en el gen STAT1. El efecto patológico (GOF) de las variantes se confirmó como niveles de STAT1 y pSTAT1 en los pacientes tanto en la línea de base como después de que la estimulación de IFN γ aumentara notablemente, en comparación con los controles sanos. Hasta la fecha, no se dispone de protocolos de tratamiento estandarizados. Sin embargo, informes de casos recientes sugieren el beneficio de la inhibición del JAK en este entorno. En las células obtenidas de nuestros pacientes con mutaciones de STAT1 GOF, la administración in vitro de diferentes concentraciones del inhibidor JAK ruxolitinib resultó en la normalización de los niveles de pSTAT1. Por lo tanto, el ruxolitinib se prescribió a dos pacientes, lo que dio lugar a una notable respuesta clínica.

VALIDACIÓN ENSAYO FUNCIONAL

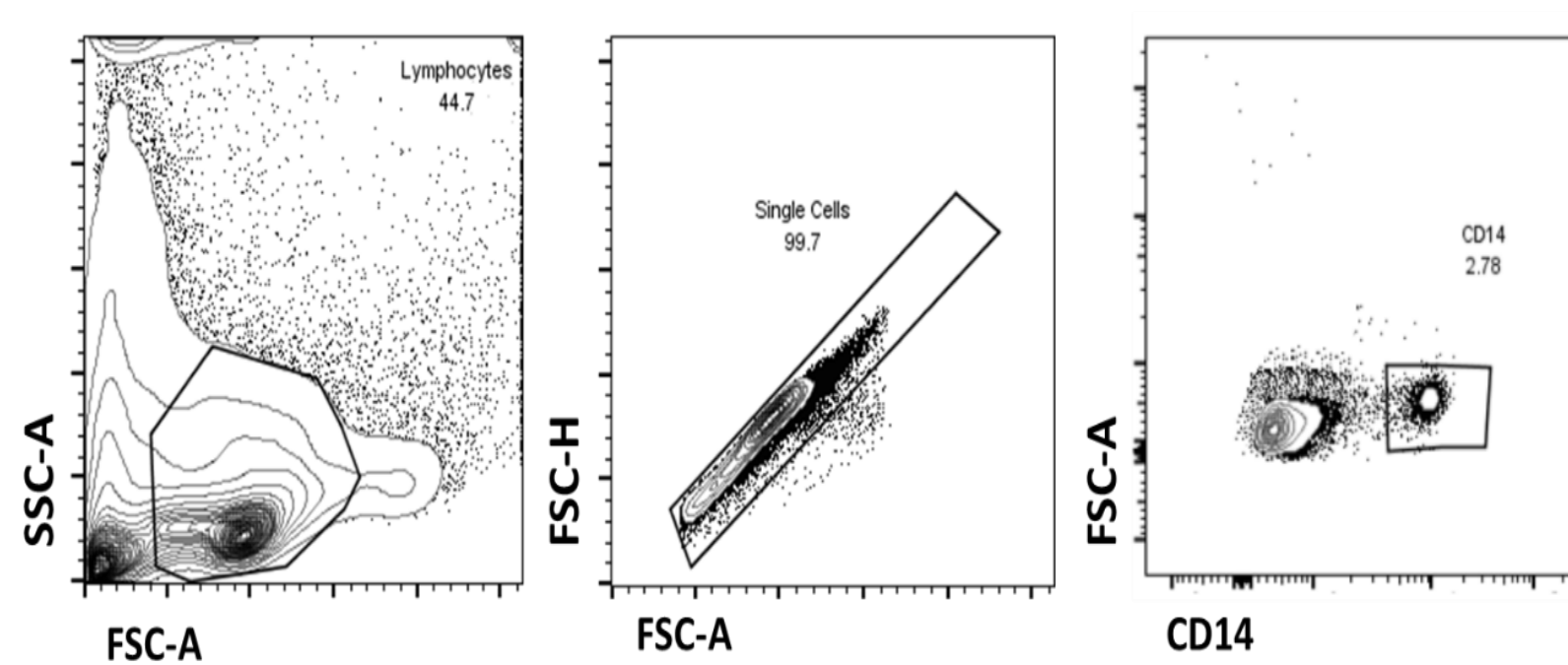


Figura 1. Estrategia de gating en sangre completa para el análisis de los datos obtenidos tras el ensayo funcional de citometría: 1) representación de las células sesgadas por tamaño (FSC) y complejidad (SSC); 2) eliminación de dobletes; 3) selección de células positivas para CD14+ (monocitos).

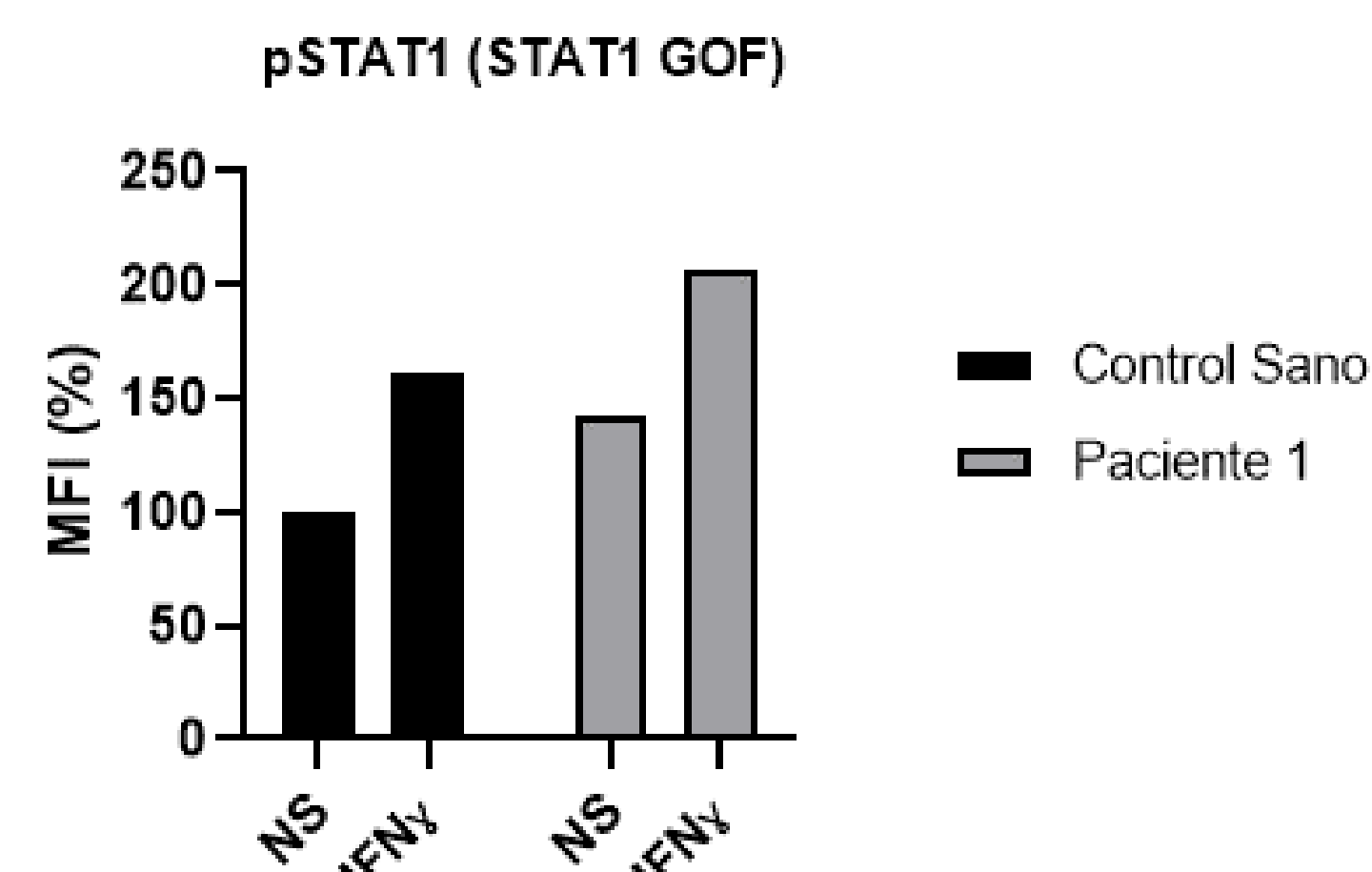


Figura 2. Ensayo funcional para la validación de STAT1 GOF (ganancia de función). % de MFI: intensidad media de fluorescencia de pSTAT1 (considerándose 100% el % MFI de la muestra control no estimulada); IFN γ : estimulado con interferón gamma; NS: no estimulado.

En base a búsquedas bibliográficas se aplicó el ensayo funcional más utilizado para la evaluación de la patogenicidad de las variantes genéticas en STAT1. Dado que la paciente 1 tiene una mutación en STAT1 previamente descrita como causante de una ganancia de función, se usó como control positivo para la validación del ensayo funcional. Por citometría de flujo se examinaron los niveles de pSTAT1 (Tyr701) en los monocitos CD14+ de la paciente 1 y se compararon con un control sano, siguiendo la estrategia de *gating* marcada para este tipo celular (Figura 1). Los niveles de expresión de pSTAT1 a nivel basal y tras la estimulación con IFN γ fueron más elevados en la paciente que en el control sano (Figura 2), confirmando, por tanto, el estado de ganancia de función de STAT1 y como consecuencia validando el ensayo funcional que utilizamos.

EVALUACIÓN DE PATOGENICIDAD VARIANTE P. P326S STAT1

Siguiendo el ensayo funcional previamente testado, se evaluó la patogenicidad de la variante que poseen las pacientes 2 y 3. Los niveles de pSTAT1 obtenidos para los pacientes 2 y 3 fueron mayores que los obtenidos en el control sano (Figura 3) siendo la ratio del incremento de fosforilación en respuesta a la estimulación de 2 veces en el control sano y de 3 veces para las pacientes 2 y 3, sugiriendo una hiperfosforilación ante el estímulo con IFN γ compatible con una ganancia de función.

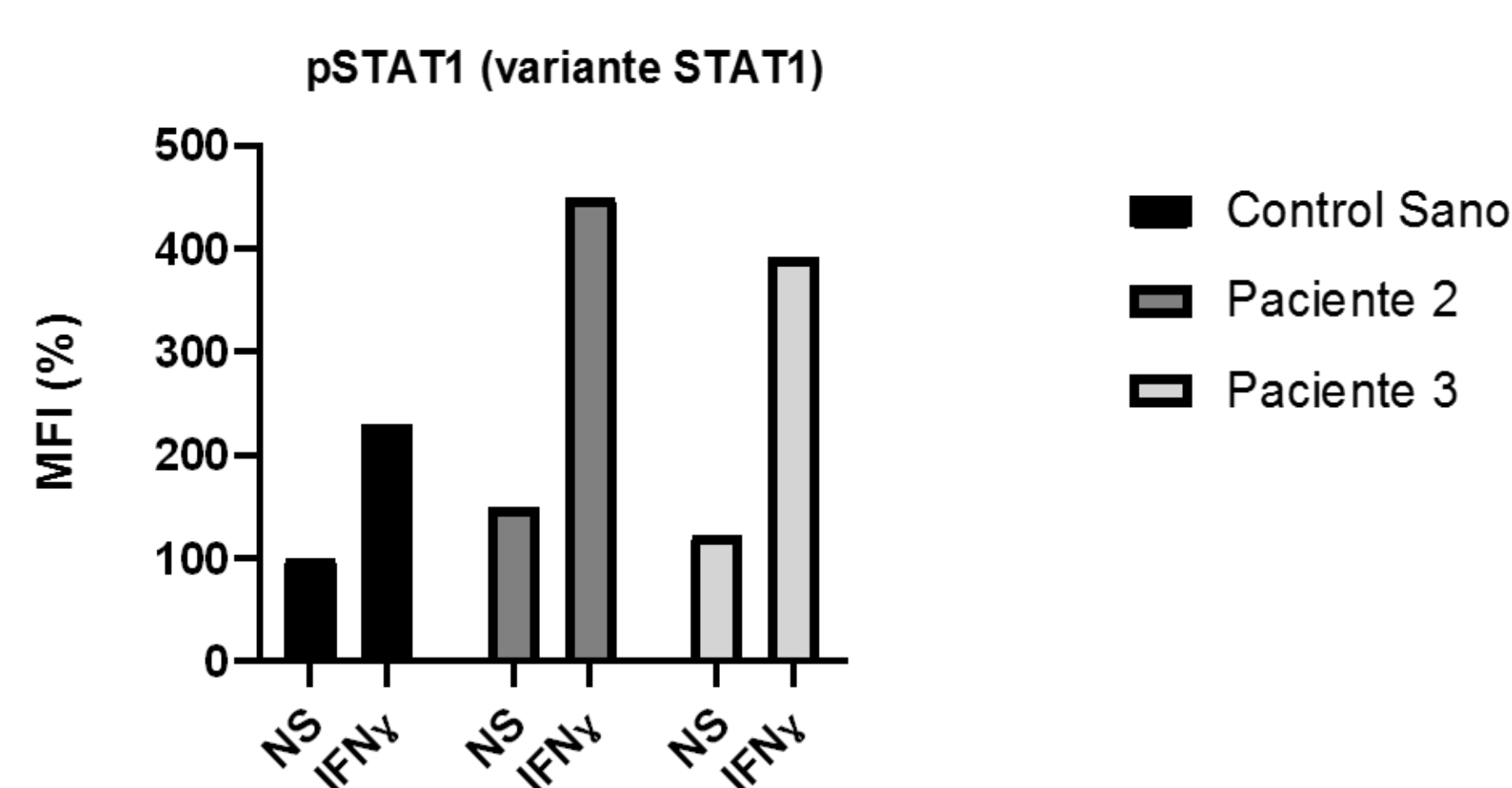


Figura 3. Ensayo funcional para la evaluación de la variante de STAT1 GOF (ganancia de función). % de MFI: intensidad media de fluorescencia de pSTAT1 (considerándose 100% el % MFI de la muestra control no estimulada); IFN γ : estimulado con interferón gamma; NS: no estimulado.

ENSAYO FUNCIONAL CON RUXOLITINIB

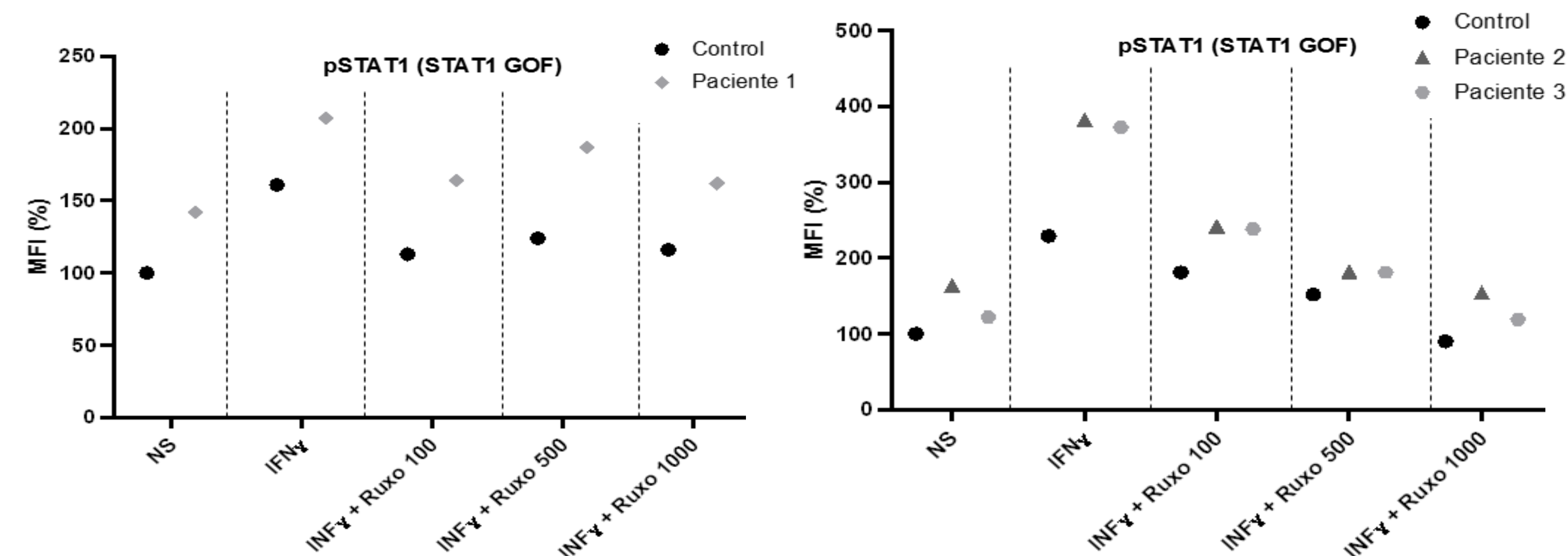


Figura 4. Ensayo funcional en paciente 1 con mutación L351F en STAT1 (GOF) con IFN γ y ruxolitinib. % de MFI: intensidad media de fluorescencia (considerándose 100% el % MFI de la muestra control no estimulada); IFN γ : estimulado con interferón gamma; IFN γ + R100: estimulado con interferón gamma y ruxolitinib a 100nm; IFN γ + R500: estimulado con interferón gamma y ruxolitinib a 500nm; IFN γ + R1000: estimulado con interferón gamma y ruxolitinib a 1000nm; NS: no estimulado.

Figura 5. Ensayo funcional en pacientes 2 y 3 con mutación P326S en STAT1 (GOF) con IFN γ y ruxolitinib. % de MFI: intensidad media de fluorescencia (considerándose 100% el % MFI de la muestra control no estimulada); IFN γ : estimulado con interferón gamma; IFN γ + R100: estimulado con interferón gamma y ruxolitinib a 100nm; IFN γ + R500: estimulado con interferón gamma y ruxolitinib a 500nm; IFN γ + R1000: estimulado con interferón gamma y ruxolitinib a 1000nm; NS: no estimulado.

DISCUSIÓN

STAT1 GOF es una patología enmarcada en el área de enfermedades raras, cuya incidencia real se desconoce. Por ello, la búsqueda de nuevas aproximaciones que agilicen su diagnóstico permitirá la administración temprana y dirigida de tratamientos específicos y con ellos la mejora de la calidad de vida de los pacientes. Asimismo, con el objetivo de establecer un sistema para la determinación del potencial patológico de una variante genética en STAT1, un ensayo funcional aplicable para la evaluación de la vía JAK-STAT1 ha sido optimizado.

En este estudio, las tres pacientes sufrían infecciones recurrentes, mayoritariamente por *Candida albicans*. La mutación en STAT1 identificada en la paciente 1 (V351F) ha sido descrita previamente como causante de GOF y asociada a CMC. Sin embargo, el efecto de la variante P326S en la expresión de STAT1 y su relación con CMC no ha sido evaluada hasta el momento. La aplicación del ensayo funcional al estudio de las variantes encontradas en los pacientes 2 y 3 nos permitió clasificar estas variantes como patológicas y con efecto de ganancia de función en concordancia con el fenotipo clínico con la presencia de CMC y las infecciones respiratorias recurrentes (Figura 3).

Según los resultados obtenidos, el tratamiento con ruxolitinib fue efectivo en la modulación in vitro de la hiperfosforilación de STAT1 de ambos pacientes (Figura 6), con resultados similares a los publicados por otros autores. En conjunto, estos resultados sugieren que la administración de inhibidores de JAK en pacientes, con mutaciones V351F y P326S en STAT1 podría estar indicada.

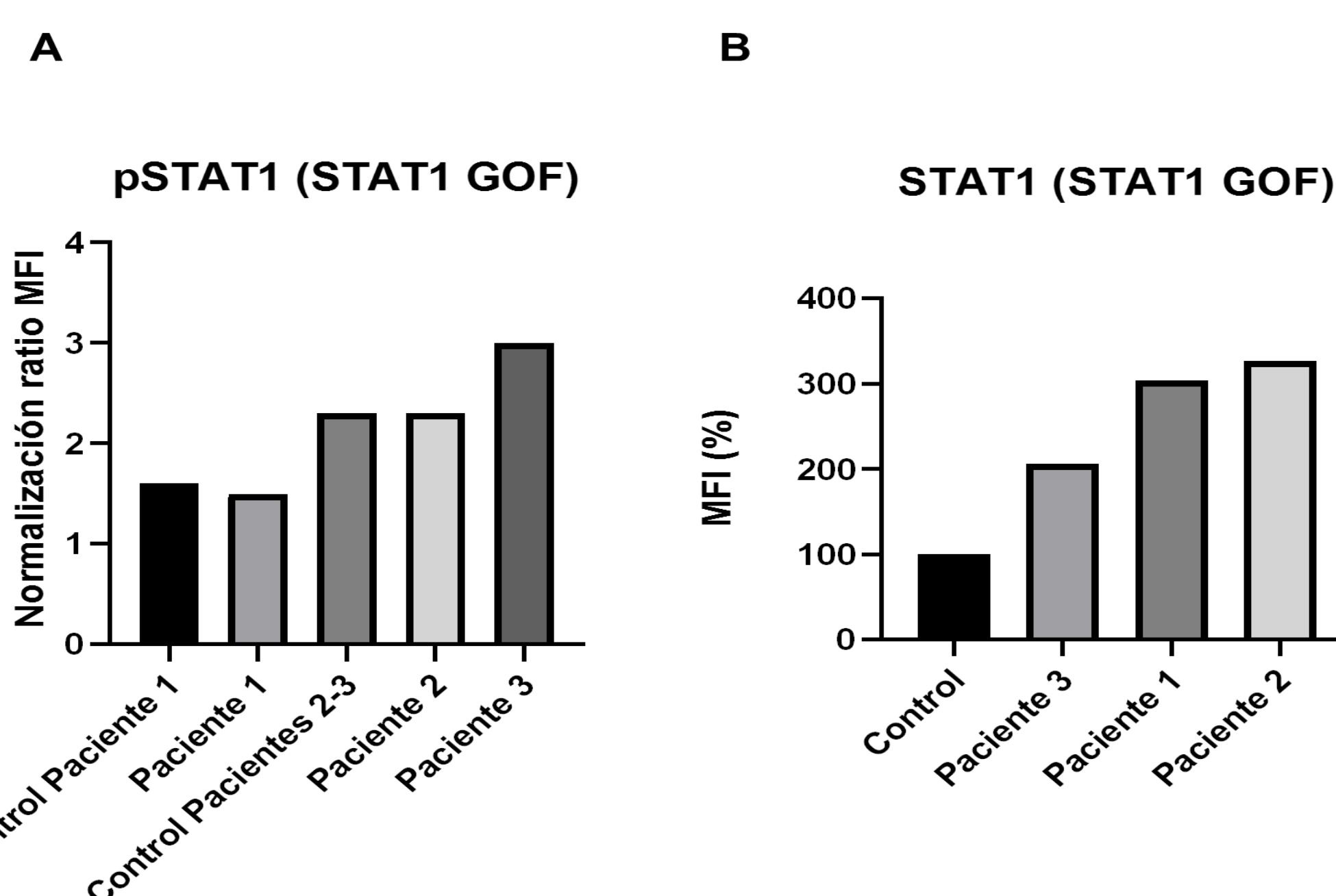


Figura 6. Evaluación del efecto del tratamiento del ruxolitinib en los niveles de pSTAT1 y STAT1. Ensayo de la evolución in vivo usando células estimuladas in vitro. A: normalización de la ratio de MFI (diferencia de fosforilación en la estimulación con respecto al no estimulado). B: % de MFI: intensidad media de fluorescencia (donde el 100% corresponde de la muestra control no estimulada) de la proteína STAT1 total sin estimular.