



UNIVERSITY OF SÃO PAULO

FACULTY OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO

CESAR ALEXANDER ORTIZ ROJAS

Quantification of *TP73* gene transcripts in acute promyelocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment response

Ribeirão Preto

2022

CESAR ALEXANDER ORTIZ ROJAS

Quantificação dos transcritos do gene *TP73* na leucemia promielocítica aguda e seu impacto no prognóstico e resposta à terapia

Quantification of *TP73* gene transcripts in acute promyelocytic leukemia and its impact on prognosis and treatment response

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular

Thesis presented to the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo to obtain the Doctor of Philosophy Degree in Sciences by the Graduate Program in Clinical Oncology, Stem Cells and Cell Therapy

Área de concentração / Area: Diferenciação celular Normal e Neoplásica/ *Normal and neoplastic cell differentiation*

Orientador / Supervisor: Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego

Ribeirão Preto

2022

RESUMO

Ortiz, C. **Quantificação dos transcritos do gene *TP73* na leucemia promielocítica aguda e seu impacto no prognóstico e resposta à terapia.** 2022. 80 p. Ph.D. Tese – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Atualmente, a leucemia promielocítica aguda (LPA) é tratada com ácido all-trans retinóico (ATRA) associado à antraciclinas ou ao trióxido de arsênio (ATO). Infelizmente, alguns pacientes apresentam recaídas ou são refratários a esse tratamento. Lucena-Araújo et al. (2015) demonstraram que valores elevados da razão entre o número de transcritos das isoformas $\Delta Np73$ e $TAp73$ do gene *TP73* estão associados a um pior desfecho de tratamento em pacientes com LPA. Aqui ampliamos o conhecimento sobre a associação das isoformas *p73* e o prognóstico na LPA, explorando seus possíveis mecanismos na resposta ao ATRA e ATO. Avaliamos os níveis de expressão de *TAp73*, $\Delta Np73$, *TP73 α* e *TP73 β* em bases de dados públicas contendo informações sobre o transcriptoma de pacientes com LPA, e também quantificamos os respectivos transcritos em amostras ao diagnóstico de pacientes que fizeram parte do estudo IC-APL. Em comparação com células saudáveis da medula óssea, detectamos menor expressão de *TAp73* e maior de $\Delta Np73$ e *TP73 β* nas amostras de LPA. A alta expressão de $\Delta Np73$ foi associada a menores taxas de sobrevida global (SG) (Log rank, $p = 0,023$), mas não de sobrevida livre de doença. Aos 5 anos de acompanhamento, os pacientes com alta expressão de $\Delta Np73$ tiveram taxa de SG de 77,8% (IC, 68,5%-88,4%) versus 96,6% (IC, 90%-100%). Através da expressão ectópica dos genes de interesse em células NB4 e NB4-R2 (linhagens de LPA sensível e resistente ao ATRA, respectivamente) demonstramos que $\Delta Np73\alpha$ e *TAp73 α* não são moduladores importantes da apoptose induzida pelo ATO. Ao contrário, detectamos que a expressão da $\Delta Np73\alpha$ bloqueou o aumento da expressão dos marcadores de diferenciação granulocítica CD11b e CD15 em células NB4 tratadas com ATRA. Usando um modelo murino, observamos que a expressão ectópica de $\Delta Np73\alpha$ foi associada a maior massa de células leucêmicas após o tratamento com ATRA. Nossas análises em linhagens celulares mostraram que $\Delta Np73\alpha$ não impediu a degradação da oncoproteína PML-RAR α e não afetou a reorganização dos corpúsculos nucleares induzida pelo

ATRA, mas regulou positivamente a expressão do gene *NANOG*, um fator de transcrição de pluripotência associado à indução do fenótipo de células-tronco cancerígenas. Avaliamos o proteoma total de nossas células NB4 em condições tratadas e não tratadas com ATRA. A análise diferencial de abundância de proteínas mostrou um número maior de proteínas moduladas por $\Delta Np73\alpha$ do que TAp73 α em células NB4 não tratadas. Encontramos uma regulação positiva de proteínas envolvidas no processo de splicing de RNA em células NB4 com expressão ectópica de $\Delta Np73\alpha$, a qual foi revertida pelo tratamento com ATRA independentemente da presença das isoformas p73, sugerindo que essas vias não colaboram com a resistência ao ATRA. Em conjunto, esses resultados sugerem que a isoforma $\Delta Np73\alpha$ reduz a diferenciação mielóide induzida pelo ATRA usando outras vias além da degradação de PML-RAR α , e que o eixo BMP4- $\Delta Np73\alpha$ -*NANOG* poderia estar envolvido na regulação desse fenômeno.

Palavras-chave: Isoformas do p73, Resultados clínicos, Resistência à terapia.

ABSTRACT

Ortiz, C. **Quantification of *TP73* gene transcripts in acute promyelocytic leukemia and their impact on prognosis and therapeutics response**. 2022. 80 p. Ph.D. Thesis – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Currently, acute promyelocytic leukemia (APL) is treated with all-trans retinoic acid (ATRA) associated with anthracyclines or arsenic trioxide (ATO). Unfortunately, some patients relapse or are refractory to treatment. Lucena-Araújo et al. (2015) demonstrated that high values of the ratio between the number of transcripts of the Δ Np73 and TAp73 isoforms of the TP73 gene are associated with a worse treatment outcome in patients with APL. Here we expand the knowledge about the association of p73 isoforms and prognosis in APL, exploring possible mechanisms in the response to ATRA and ATO. We evaluated the expression levels of TAp73, Δ Np73, TP73 α and TP73 β in public databases containing information on the transcriptome of patients with APL, and we also quantified the respective transcripts in samples at diagnosis of patients who were part of the IC-APL study. Compared with healthy bone marrow cells, we detected lower expression of TAp73 and higher expression of Δ Np73 and TP73 β in APL samples. High Δ Np73 expression was associated with lower overall survival (OS) rates (Log rank, $p = 0.023$), but not disease-free survival. At 5 years of follow-up, patients with high expression of Δ Np73 had an OS rate of 77.8% (CI, 68.5%-88.4%) versus 96.6% (CI, 90%-100%). Through the ectopic expression of the genes of interest in NB4 and NB4-R2 cells (ATRA-sensitive and ATRA-resistant APL cell lines, respectively) we demonstrated that Δ Np73 α and TAp73 α are not important modulators of ATO-induced apoptosis. On the contrary, we detected that the expression of Δ Np73 α blocked the increase in the expression of granulocytic differentiation markers CD11b and CD15 in NB4 cells treated with ATRA. Using a murine model, we observed that ectopic expression of Δ Np73 α was associated with increased leukemic cell mass after ATRA treatment. Our analyzes on cell lines showed that Δ Np73 α did not prevent the degradation of the PML-RAR α oncoprotein and did not affect ATRA-induced nuclear body reorganization, but up-regulated the expression of the NANOG gene, a pluripotency transcription factor

associated with cancer stem cell phenotype. We evaluated the proteome of our modified NB4 cells under ATRA-treated and untreated conditions. Differential analysis of protein abundance showed a greater number of proteins modulated by Δ Np73 α than TAp73 α in untreated NB4 cells. We found an upregulation of proteins involved in the RNA splicing process in NB4 cells with ectopic expression of Δ Np73 α . ATRA treatment reversed regardless of the presence of p73 isoforms, suggesting that these pathways do not collaborate with ATRA resistance. Taken together, these results suggest that the Δ Np73 α isoform reduces ATRA-induced myeloid differentiation using pathways other than PML-RAR α degradation, and that the BMP4- Δ Np73 α -NANOG axis could be involved in the regulation of this phenomenon.

Keywords: p73 isoforms, Clinical outcomes, Therapy resistance.