

”GATA3 jako marker stratyfikacji ryzyka niepowodzenia terapii u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL).”

### STRESZCZENIE

---

Najczęstszą przyczyną niepowodzeń terapeutycznych u dzieci leczonych z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej wywodzącej się z komórek prekursorowych limfocytów B (BCP-ALL - *B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*) jest wznowa choroby, która występuje u około 15-20% pacjentów. Wysokie ryzyko wznowy i gorsze całkowite przeżycie jest charakterystyczne dla nowo wyodrębnionego, agresywnego podtypu BCP-ALL, jakim jest Ph-like ALL. Jest to heterogenna grupa białaczek, charakteryzująca się sygnaturą ekspresji genów zbliżoną do ALL z chromosomem Philadelphia oraz nadaktywnością szlaków sygnałowych promujących proliferację komórek nowotworowych.

W badaniu GWAS z 2013 roku zidentyfikowano *locus* podatności na Ph-like ALL w miejscu polimorficznym rs3824662 genu *GATA3*. Kodowany przez niego czynnik transkrypcyjny integruje wiele sygnałów i reguluje ekspresję genów docelowych modulując rozwój limfocytów. Na podstawie literatury można przypuszczać, że genotyp AA we wspomnianym *locus* jest związany z podwyższonym poziomem ekspresji genu *GATA3*, co sugeruje biologiczną rolę tego polimorfizmu.

Głównym celem pracy była ocena związku zmienności *GATA3* z profilem genetycznym oraz fenotypem białaczki u dzieci leczonych z powodu BCP-ALL oraz ocena skutków nadaktywności kodowanego przez ten gen czynnika transkrypcyjnego w linii komórek limfoidalnych.

Do badania włączono 861 dzieci, spośród których 645 było leczonych według protokołu ALL IC-BFM 2009 a 216 według protokołu ALL IC-BFM 2002. Szpik kostny był pobierany od pacjentów w 3 punktach czasowych: w chwili rozpoznania białaczki, w 15 oraz 33 dobie leczenia, w celu oceny liczby komórek nowotworowych metodą cytometrii przepływownej. Szpik pobrany w momencie rozpoznania choroby został wykorzystany do oceny obecności mikrodelecji metodą MLPA, poziomu ekspresji genów *GATA3* i *CRLF2* metodą qPCR oraz poziomu ekspresji białka TSLPR (*CRLF2*) przy użyciu cytometrii przepływownej. DNA

izolowane z krwi obwodowej w okresie remisji choroby posłużyło do genotypowania polimorfizmu rs3824662 genu *GATA3* z wykorzystaniem sond TaqMan. Przez cały okres obserwacji pacjentów zbierano dane kliniczne.

Oznaczenie genotypu rs3824662 wyłoniło 44 nosicieli wariantu AA, co stanowi 5,11% badanej grupy. Analiza ekspresji genu *GATA3* wykazała wyższy poziom u nosicieli allelu ryzyka A w stosunku do osób z genotypem CC. Pacjenci z genotypem AA w *locus* rs3824662 byli starsi w chwili diagnozy, gorzej odpowiadali na leczenie i w konsekwencji mieli wyższe ryzyko zgonu. W zakresie somatycznych zaburzeń genetycznych obserwowanych w ALL, tacy chorzy częściej mieli delecje w genie *IKZF1*, delecję *IL3R-P2RY8* oraz wyższe poziomy ekspresji *CRLF2* i *TSLPR*. Efekt wariantu ryzyka AA na obecność choroby resztkowej oraz przeżycie pacjentów okazał się niezależnym od klinicznych markerów złej prognozy oraz występowania charakterystycznych dla Ph-like ALL defektów somatycznych.

Druga część projektu miała na celu ocenę skutków nadekspresji czynnika transkrypcyjnego *GATA3* w linii komórek limfoidalnych. Mysie komórki pro-B Ba/F3 zostały transfekowane wektorem retrowirusowym pMIG-GFP wyprodukowanym przez komórki pakujące HEK-293T. Konstrukt zawierał kodujące cDNA dla genu *GATA3*. Komórki, które przyjęły wektor zostały wysortowane na podstawie ekspresji markera GFP przy użyciu sortera FACSJazz Aria. Profilowanie ekspresji genów wyindukowanej nadaktywnością *GATA3* zostało przeprowadzone macierzami ThermoFisher Mouse GeneChip™ 2.1 ST Array. Dane ekspresyjne zostały poddane analizie w Applied Biosystem Software - Transcriptome Analysis Console (TAC) oraz Broad Institute Platform - Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).

Na podstawie wyników profilowania ekspresji zidentyfikowano geny kodujące białka zaangażowane w regulację aktywności kinaz białkowych, różnicowanie komórek hematopoetycznych oraz produkcję cytokin biorących udział w odpowiedzi immunologicznej. Regulacja *CRLF2* przez czynnik *GATA3* nie została potwierdzona w modelu komórkowym, jednak zaobserwowano związek z ekspresją genu *MPL*, który koduje receptor dla trombopoetyny (TPOR).

Podsumowując, wariant AA linii germinacyjnej w *locus* rs3824662 genu *GATA3* jest związany z charakterystycznymi cechami Ph-like ALL, takimi jak ekspresja *TSLPR* (*CRLF2*), delecje w genie *IKZF1* i starszy wiek pacjenta w chwili diagnozy. Niezależnie od zmian somatycznych, polimorfizm genu *GATA3* może wiązać się ze złym rokowaniem pacjentów, prawdopodobnie jest to efekt wpływu allelu ryzyka na transkrypcję genu. Profil komórek pro-B z nadekspresją *GATA3* można scharakteryzować jako zaangażowany w hematopoezę oraz wzmożone

przebieg sygnału wewnątrzkomórkowego związane z proliferacją komórek nowotworowych.

Powyższe wyniki kształtują obraz czynnika transkrypcyjnego GATA3 jako istotnego modulatora limfopojezy, którego niefizjologiczne zmiany mogą rozregulować przebieg sygnału wewnątrzkomórkowego. Nadaktywność receptorów takich jak TSLPR czy TPOR, prowadzi do konstytutywnej aktywności szlaku JAK/STAT, co promuje proliferację i przeżycie komórek nowotworowych. Można zatem przypuszczać, że chorzy na BCP-ALL z nadaktywnością GATA3, mogą odnieść korzyści kliniczne z leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej, jednak ta hipoteza wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach. Oznaczenie genotypu *locus* rs3824662 może ułatwić identyfikację źle rokujących pacjentów już na wczesnym etapie diagnozy białaczki, co w rezultacie może realnie poprawić wyniki leczenia chorych na BCP-ALL.

## Abstract

---

---

The most common cause of treatment failure in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is a disease relapse, which occurs in approximately 15-20% of patients. Newly identified, aggressive Ph-like ALL subtype is characterized by very high rate of disease relapse and poor overall survival. It encompasses genetically heterogeneous leukemias characterized by the hyperactivity of signaling pathways that promotes the proliferation of leukemic cells.

In 2013, GWAS identified a Ph-like ALL susceptibility *locus* at the polymorphic site rs3824662 in the *GATA3* gene. The encoded transcription factor modulates lineage-specific lymphocyte differentiation through the integration of signal transduction pathways. Based on literature, the AA genotype at rs3824662 *locus* is associated with increased *GATA3* expression level, indicating a biological role of this polymorphism.

The aim of the study was to evaluate an association between *GATA3* polymorphism with genetic profile and the clinical course of leukemia as well as to elucidate the effect of *GATA3* transcription factor overexpression in lymphoid cell line.

The study group comprised 861 children - 645 treated according to ALL IC-BFM 2009 protocol and 216 treated with ALL IC-BFM 2002 protocol. Bone marrow was collected at three time points: at the time of BCP-ALL diagnosis, at day 15 and day 33, in order to assess the number of leukemic cells with flow cytometry. Bone marrow collected at the diagnosis was used to evaluate the presence of microdeletions (with MLPA kit), the level of *GATA3* and *CRLF2* expression (with qPCR) as well as the level of TSLPR (*CRLF2*) protein (with flow cytometry). The DNA from peripheral blood samples collected during disease remission was used for rs3824662 genotyping with TaqMan probes. The data describing clinical course of ALL was collected during whole study.

Genotyping of rs3824662 locus has identified 44 carriers of the AA variant, which accounts for 5.11% of the studied group. The *GATA3* gene expression level analysis showed its higher level in the A risk allele carriers in comparison to patients with the CC genotype. Patients with AA genotype were older at the time of diagnosis, had worse treatment response and higher risk of death. Carriers of AA variant were more likely to develop somatic microdeletions in *IKZF1*, *IL3R-P2RY8* deletion and higher *CRLF2* expression at both protein and mRNA levels. The AA genotype was also an independent factor associated with an increased risk of death regardless

of the known clinical markers of poor prognosis and the presence of somatic defects characteristic for Ph-like ALL

The second part of the project aimed to assess the effect of GATA3 transcription factor overexpression in lymphoid cell line. Mouse pro-B Ba/F3 cell line was transfected with retroviral vector pMIG-GFP, produced by HEK-293T packing cell line. The viral construct contained *GATA3* coding cDNA. The positive cells containing vector were sorted according to GFP expression using the FACSJazz sorter. Gene expression profiling was performed using ThermoFisher Mouse GeneChip™ 2.1 ST Array strip. Expression data was processed using Applied Biosystem Software - Transcriptome Analysis Console (TAC) as well as Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).

Genes encoding proteins involved in protein kinase activity regulation, hematopoietic cells differentiation and production of cytokines involved in the immune response were identified based on the results of microarray experiments. In the designed cellular model, the regulation of *CRLF2* by the GATA3 factor has not been confirmed, however, the association with the expression of the *MPL* gene encoding the thrombopoietin receptor (TPOR) has been observed.

In summary, the germline rs3824662 AA variant in the *GATA3* gene is associated with Ph-like ALL characteristic features, such as TSLPR (*CRLF2*) expression, *IKZF1* deletions, and older age of the patient at the time of diagnosis. The evaluated variant remained associated with a poor prognosis of patients regardless of the presence of somatic defects in leukemic cells, which may be explained by the influence of the risk A allele on gene transcription. The pro-B cell line with GATA3 overexpression profile can be characterized as involved in hematopoiesis regulation and increased intracellular signaling resulted in leukemic cell proliferation.

The presented results indicate that GATA3 transcription factor is an important lymphopoietic modulator and non-physiological GATA3 changes deregulate the intracellular signal transduction. Overactivity of receptors, such as TSLPR or TPOR, leads to the JAK/STAT pathway constitutive activity, promoting the proliferation and survival of leukemic cells. Therefore, it can be assumed that BCP-ALL patients with GATA3 hyperactivity may benefit from tyrosine kinase inhibitors treatment, but this hypothesis needs to be validated in a separate study. The rs3824662 genotype determination can facilitate the identification of high-risk patients at an early stage of the leukemia diagnosis, which may improve the outcome of patients with BCP-ALL.

