
Rezumatul tezei de doctorat

Epigenetica in leucemii

Doctorand

Cristina Bagacean

Conducator de doctorat

Prof. Victor Cristea

Conducator de doctorat

Prof. Yves Renaudineau

(co-tutela)



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Cuprins

Cuvinte cheie	2
Introducere si stadiul actual al cunosterii	2
Contributii personale	3
Studiul 1. Disregularea intermediarilor de metilare/demetilare a ADN-ului prezice prognosticul in leucemia limfatica cronica	4
Studiul 2. Asocierea factorilor genetici si epigenetici creste acuratetea prognostica in leucemia limfatica cronica pentru pacientii cu deletie 13q izolata	5
Discutii si perspective	6

Cuvinte cheie: leucemia limfatica cronica, metilarea ADN, hidroximetilarea ADN, TET, DNMT

Introducere si stadiul actual al cunosterii

Leucemia limfatica cronică (CLL) este cea mai frecventă leucemie cu celule B în țările occidentale și se caracterizează prin acumularea celulelor B CD5 + mature în sângele periferic, măduva osoasă, ganglionii limfatici și organele limfoide secundare. CLL este caracterizată printr-o heterogenitate clinică importantă, supraviețuirea pacienților variind de la luni până la zeci de ani. Aproximativ o treime dintre pacienți nu necesită tratament și au o durată de viață normală, în timp ce alții vor progresa și vor avea complicații sau o boală mai agresivă. În încercarea de a evalua prognosticul acestei boli, mai multe sisteme de stadializare clinică au fost propuse, bazate pe examinarea fizică și diferite teste de laborator. Aceste sisteme de stadializare prezintă însă slăbiciuni, și acest aspect este valabil mai ales pentru pacienții în stadiu incipient de boală. Pentru aceștia, prezicerea evoluției bolii este

dificila. In consecință, au fost identificați mai mulți markeri pentru a prezice supraviețuirea fără tratament (TFS), cum ar fi anomaliile citogenetice (del 11q22.3 / ATM, del 17p13.1 / TP53 și cariotipul complex), regiunea variabilă a lanțului greu de imunoglobulină (IGHV), precum și determinarea unor markeri cheie, cum ar fi CD38, ZAP-70 și lipoprotein lipaza (LPL). În plus față de modificările genetice care sunt actori-cheie în CLL, dovezi mai recente sugerează că anomaliile epigenetice acționează ca driveri în patogeneză și / sau evoluția bolii. Acest lucru a fost demonstrat elegant prin combinarea analizei ADN metilomului și a profilului transcriptomic. Aceste studii au prezentat o nouă dimensiune în înțelegerea noastră a biologiei CLL și a răspunsului terapeutic. Într-adevăr, defectul de metilare a ADN-ului și hipometilarea globală a ADN-ului în CLL sunt procese implicate în promovarea instabilității genomice și a activării proto-oncogenelor. Procesul de metilare a ADN-ului este bine stabilit și implică ADN metil transferaza (DNMT) 1, DNMT3A și DNMT3B care au fost identificate și bine caracterizate. Mai recent, oxidarea 5-metilcitosinei (5-mCyt) în 5-hidroximetilcitozină (5-hmCyt) și în continuare în 5-formilcitozină (5-fCyt) și 5-carboxilcitozină (5-caCyt), mediată de proteinele ten-eleven-translocation (TET) a fost descrisă ca un proces de demetilare activa a ADN-ului. Deoarece procesul de metilare / demetilare activa a ADN-ului în CLL este suspectat ca având o importanță majoră și timpurie în evoluția bolii și întrucât markerii prognostici sunt în mod special necesari într-o etapă incipientă a bolii, este esențial să se evalueze impactul disregulării metilării / demetilării ADN-ului la pacienții CLL. Acesta reprezintă obiectivul principal al prezentei lucrări. Spre deosebire de mutațiile genetice, este important de precizat că modificările epigenetice care apar la începutul cursului bolii, sunt reversibile și, prin urmare, reprezintă o țintă interesantă pentru terapie.

Contributii personale

Studiul 1. Disregularea intermediarilor de metilare/demetilare a ADN-ului prezice prognosticul in leucenia limfatica cronica

În primul nostru studiu au fost testate nivelurile globale de 5-mCyt, 5-hmCyt, 5-CaCyt și 5-hidroximetiluracil (5-hmU) în celulele B purificate de la pacienții cu CLL (n = 55). "Sintetizatorii" de metilare ai ADN-ului (DNMT1/3A/3B), "cititorii" (domeniile de legare a metil-CpG [MBD2/4]), "editorii" (TET1/2/3) și "modulatorul" (SAT1) au fost, de asemenea, evaluați. În consecință, pacienții au fost stratificați în trei subgrupuri. În primul rând, a fost identificat un subgrup cu un deficit global în derivații de citozină caracterizat prin hiperlifocitoză, supraviețuirea mediană fara progresia bolii scazuta (PFS = 52 luni) și TFS mai scurtă (112 luni). În acest subgrup au fost evidențiate modificări epigenetice majore, incluzând o reducere a reglajului 5-mCyt, 5-hmCyt, 5-CaCyt asociata cu o expresie transcriptionala diminuata a DNMT3A, MBD2/4 și TET1/2. În al doilea rând, analiza derivatilor de citozină a identificat un subgrup cu un deficit parțial (PFS = 84, TFS = 120 luni), care afectează în principal demetilarea activa a ADN-ului (reducerea 5 hmCyt, inducția SAT1). În al treilea rând, a fost identificat un subgrup epigenetic similar cu cel control (PFS și TFS > 120 luni). Impactul prognostic al stratificarii pacienților CLL în cadrul a trei subgrupuri epigenetice a fost confirmat într-o cohortă independenta de validare (n = 56). În concluzie, rezultatele noastre sugerează că disregulările enzimelor implicate in metilare/demetilare activa, precum si ale derivatilor de citozină reprezintă evenimente majore dobândite în timpul progresiei CLL și sunt independente de statusul mutațional al IGHV.

Studiul 2. Asocierea factorilor genetici si epigenetici creste acuratetea prognostica in leucemia limfatica cronica pentru pacientii cu deletie 13q izolata

În cel de-al doilea studiu, scopul nostru a fost de a evalua asociațiile dintre markerii epigenetici și cele mai frecvente anomalii cromozomiale detectate în CLL. În consecință, am analizat retrospectiv 127 de cazuri de CLL, clasificate într-un grup de boli cu risc scăzut (deleție 13q izolată, n = 64), un grup de risc intermediar (cariotip normal sau trisomie 12, n = 19) (> 120, 72 și, respectiv, 40 de luni), iar pentru TFS (> 120, 77) a fost stabilită o analiză Kaplan-Meier și, respectiv, 72 de luni). Cele două semne epigenetice, 5-mCyt și 5-hmCyt au fost testate prin ELISA, în timp ce PCR cantitativ în timp real (RTq-PCR) a fost utilizat pentru a cuantifica DNMT și TET. Spre deosebire de grupul cu risc scăzut al bolii, grupurile cu risc intermediar și cu risc ridicat prezintă atât un proces de metilare a ADN-ului defect (reducerea nivelurilor 5-mCyt și DNMT3A), cât și un proces de demetilare activa a ADN-ului modificat (reducerea nivelurilor 5-hmCyt și TET2). Mai mult, în grupul cu risc scăzut, nivelul de metilare identifică două subgrupe cu o evoluție clinică diferită (TFS median > 120 față de 45 luni, p = 0,0008). Acest al doilea studiu demonstrează că evaluarea disregulărilor epigenetice în CLL oferă o semnificație prognostică suplimentară pentru studiile citogenetice și combinarea studiilor citogenetice cu evaluarea 5-mCyt îmbunătățește acuratețea prognosticului, în special la cei cu deleție 13q ca o singură anomalie citogenetică.

În concluzie, studiile noastre arată că modificările epigenetice reprezintă biomarkeri importanți pentru detectarea precoce a progresiei bolii și propune obiective importante pentru terapie. Ambele studii au fost efectuate în cadrul Departamentului de Imunologie și Imunoterapie, INSERM U1227, Universitatea din Brest, Franța, sub supravegherea directă a profesorului Yves Renaudineau. Această teză a fost coordonată și de profesorul Victor Cristea (profesor de imunologie la Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hatieganu").

Discutii si perspective

Actualmente, metilarea ADN-ului este recunoscuta ca influențând căi de semnalizare importante în CLL. Cu toate acestea, până în prezent, majoritatea studiilor au utilizat tehnici care nu disting 5-mCyt de 5-hmCyt. Acesta este un aspect important în studiile viitoare privind reprogramarea epigenetică, deoarece s-a demonstrat recent prin utilizarea tehnicilor specifice pentru cei doi derivati epigenetici, 5-mCyt și 5-hmCyt, că distribuția 5-mCyt corelează doar slab cu activarea genei, în timp ce 5-hmCyt este puternic asociată cu expresia transcripțională. Prin urmare, este esențial ca cercetările viitoare să includă tehnici adaptate pentru fiecare derivat de citozină.

Mai mult, credem că identificarea leziunilor epigenetice cheie care acționează ca "driveri" în progresia bolii timpuriu în patogeneza CLL este esențială pentru a înțelege mai bine peisajul epigenetic complex din CLL și pentru a găsi terapii epigenetice adaptate. În acest sens, tehnicile utilizate ar trebui să aibă o rezoluție mai mare pentru a aprecia markerii epigenetici la nivelul de nucleotide, trebuie să fie asociate cu analiza genetică și ar trebui efectuate în studii longitudinale pe populații celulare cu o puritate înaltă. Asadar, în viitor, ne vom concentra pe trei întrebări principale:

- În primul rând, explorarea și compararea modificărilor genetice (RNA-Seq) și a modificărilor epigenetice (RRBS și RRHP) în celule stem hematopoietice de la pacienții cu CLL la 2 momente de timp în timpul progresiei bolii, pacienți MBL și subiecți normali pentru a obține o imagine asupra ordinii evenimentelor și pentru a identifica driverii epigenetici disregulați în progresia bolii. Pentru validarea ulterioară a acestor modificări epigenetice va fi necesară efectuarea experimentelor Ch-IP, RTq-PCR și Western blot pentru a le putea propune pentru dezvoltarea epi-drogurilor.
- În al doilea rând, explorarea evenimentului epigenetic primar și în special interconexiunea dintre reglarea SAT1, catabolismul de poliamină (consumul SAM), stresul oxidativ și activitatea enzimelor de metilare și demetilare în celulele B CLL.

- În al treilea rând, explorarea consecințelor disregularii genetice și epigenetice târzii prin efectuarea unui studiu longitudinal asupra probelor secvențiale ale celulelor B CLL din sângele periferic de la pacienți cu boală progresivă, prin efectuarea tehnicilor de RRBS, RRHP și RNA-seq. Validarea ulterioară a acestor epi-modificări va fi necesară prin Ch-IP, RTq-PCR și Western blot pentru a le propune pentru dezvoltarea epi-drogurilor specifice. Acest studiu este în curs de desfășurare.

Summary of the PhD thesis

Epigenetics in leukemia

Ph.D. student	Cristina Bagacean, M.D.
Ph.D. coordinator	Prof. Victor Cristea, M.D.
Ph.D. coordinator (joint supervision)	Prof. Yves Renaudineau



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table of contents

Keywords	2
Introduction and current knowledge	2
Personal contributions	3
Study 1. Alterations in DNA methylation/demethylation intermediates predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia	4
Study 2. Combining cytogenetic and epigenetic approaches in chronic lymphocytic leukemia improves prognosis prediction for patients with isolated 13q deletion	5
Discussion and perspectives	6

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, DNA methylation, DNA hydroxymethylation, TET, DNMT

Introduction and current knowledge

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common B cell leukemia in Western countries and is characterized by the accumulation of long-lived mature CD5⁺ B cells in peripheral blood, bone marrow, lymph nodes and secondary lymphoid organs. Clinical heterogeneity characterizes CLL with a survival ranging from months to decades. About one-third of the patients do not require treatment and have a normal life span, but some patients will progress and experience complications or a more aggressive disease. In an attempt to evaluate prognosis, clinical staging systems based on physical examination and several laboratory tests were proposed. These staging systems however, present weaknesses and this is particularly true for patients at early stage to predict outcome. As a consequence, several markers have been identified in order to predict treatment

free survival (TFS) such as cytogenetic abnormalities (del 11q22.3/ATM, del 17p13.1/TP53, and complex karyotype), immunoglobulin heavy chain variable region (IGHV) mutational status, and key marker determination such as CD38, ZAP-70 and lipoprotein lipase (LPL).

In addition to genetic alterations that are key players in CLL, more recent evidence suggests that epigenetic abnormalities act as drivers in the pathogenesis and/or evolution of the disease. This was elegantly demonstrated by combining DNA methylome analysis and gene expression profiling, showing a new dimension into our understanding of CLL biology and therapeutic response. Indeed, a defective DNA methylation process and global DNA hypomethylation in CLL is implicated in promoting genomic instability and proto-oncogene activation. The DNA methylation process is well established and involves DNA methyl transferase (DNMT) 1, DNMT3A and DNMT3B that have been identified and well characterized. More recently, the oxidation of 5-methylcytosine (5-mCyt) into 5-hydroxymethylcytosine (5-hmCyt) and further to 5-formylcytosine (5-fCyt) and 5-carboxylcytosine (5-CaCyt) using as cofactors Fe^{2+} and α -ketoglutarate (α -KG) and mediated by ten-eleven translocation (TET) proteins has been described as an active DNA demethylation process. Due to the suspected importance of DNA methylation/demethylation process in CLL and as prognostic markers are particularly necessary at an early stage of the disease, it is critical to evaluate the impact of DNA methylation/demethylation deregulation in the outcome of CLL patients. This represents the main objective of the present work. In addition to and unlike genetic mutations, it's important to note that epigenetic changes that occur early during the CLL disease course are reversible and therefore represent an interesting target for therapy.

Personal contributions

Study 1. Alterations in DNA methylation/demethylation intermediates predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia

Hence, in our first study, global levels of 5-mCyt, 5-hmCyt, 5-CaCyt and 5-hydroxymethyluracil (5-hmU) were tested in purified B cells from CLL patients (n=55) and controls (n=17). The DNA methylation ‘writers’ (*DNMT1/3A/3B*), ‘readers’ (methyl-CpG-binding domain [*MBD2/4*]), ‘editors’ (*TET1/2/3*) and ‘modulators’ (*SAT1*) were also evaluated. Accordingly, patients were stratified into three subgroups. First, a subgroup with a global deficit in cytosine derivatives characterized by hyperlymphocytosis, reduced median progression free survival (PFS=52 months) and shorter TFS (112 months) was identified. In this subgroup, major epigenetic modifications were highlighted including a reduction of 5-mCyt, 5-hmCyt, 5-CaCyt associated with *DNMT3A*, *MBD2/4* and *TET1/2* downregulation. Second, the cytosine derivative analysis revealed a subgroup with a partial deficit (PFS=84, TFS=120 months), mainly affecting DNA demethylation (5-hmCyt reduction, *SAT1* induction). Third, a subgroup epigenetically similar to controls was identified (PFS and TFS >120 months). The prognostic impact of stratifying CLL patients within three epigenetic subgroups was confirmed in a validation cohort (n=56). In conclusion, our results suggest that dysregulations of cytosine derivative regulators represent major events acquired during CLL progression and are independent from *IGHV* mutational status.

Study 2. Combining cytogenetic and epigenetic approaches in chronic lymphocytic leukemia improves prognosis prediction for patients with isolated 13q deletion

In the second study our aim was to evaluate associations between epigenetic markers and the most frequent chromosomal abnormalities detected in CLL. Accordingly, we retrospectively analyzed 127 cases of CLL, classified into a low risk disease group (isolated 13q deletion, n=64), an intermediate risk disease group (normal karyotype or trisomy 12, n=19), and a high risk disease group (11q deletion, 17p deletion, or complex karyotype [≥ 3 breakpoints], n=30) as confirmed by conducting a Kaplan-Meier analysis for PFS (>120, 72 and 40 months, respectively) and for TFS (>120, 77 and 72 months, respectively). The two epigenetic marks, 5-mCyt and 5-hmCyt were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), while real time quantitative PCR (RTq-PCR) was used to quantify *DNMTs* and *TETs*. In contrast to the low risk disease group, the intermediate and high risk groups exhibit both a defective DNA methylation process (reduction in 5-mCyt and *DNMT3A* levels) and an altered DNA demethylation process (reduction in 5-hmCyt and *TET2* levels). Moreover, in the low risk group, the methylation level identifies two subgroups with significantly different clinical outcome (median TFS >120 *versus* 45 months, $p=0.0008$). This second study shows that the evaluation of epigenetic dysregulations in CLL provides additional prognostic significance to cytogenetic studies and combining cytogenetic studies with 5-mCyt assessment improves the accuracy of prognosis particularly in those with 13q deletion as a sole cytogenetic abnormality.

In conclusion, our research shows that epigenetic modifications represent important biomarkers for early detection of disease progression and proposes important targets for therapy.

Both studies were carried out in the Department of Immunology and Immunotherapy, INSERM U1227, University of Brest, France under the direct supervision of Professor Yves Renaudineau (Professor of Immunology at the University Bretagne Occidentale). This thesis was also coordinated by Professor Victor Cristea (Professor of Immunology at the 'Iuliu Hatieganu' University of Medicine and Pharmacy).

Discussion and perspectives

Today, we recognize DNA methylation to influence important signaling pathways in CLL. However, so far, the majority of studies used techniques that do not distinguish 5-mCyt from 5-hmCyt marks. This is an important aspect in future studies on epigenetic reprogramming since it has been recently shown by using specific techniques for the 2 epigenetic marks, 5-mCyt and 5-hmCyt, that 5-mCyt distribution correlates only poorly with gene activation, while 5-hmCyt displays a pattern highly associated with gene expression. Therefore, future research should include techniques adapted for each cytosine derivative.

Moreover, we believe that identifying key epigenetic lesions that act as progressive disease “drivers” early in CLL pathogenesis is essential in order to better understand the complex epigenetic landscape in CLL and to find tailored epigenetic therapies. To this effect, the techniques used should also have a greater resolution in order to appreciate the epigenetic marks at single nucleotide level, should be associated with genetic analysis, and should be performed in longitudinal studies on cells with high purity.

In future studies, we intend to focus on three main questions:

- First, exploring and comparing genetic (RNA-Seq quantitative measurement of expression) and epigenetic modifications (RRBS and RRHP analysis) in HSCs from CLL patients at 2 time points during disease

progression, MBL patients and normal subjects in order to gain insight into the order of events and to identify early epigenetically dysregulated disease progression drivers. Further validation of these epi-modifications will be necessary by conducting Ch-IP, RTq-PCR and western blot experiments in order to propose them for targeted epi-drugs development.

- Second, exploring the primary epigenetic event and in particular the interconnection between SAT1 upregulation, polyamine catabolism (SAM consumption), oxidative stress and methylation and demethylation enzymes activity in CLL B cells.
- Third, exploring the consequences of late genetic and epigenetic dysregulation by conducting a longitudinal study on sequential samples of peripheral blood CLL B cells from patients with progressive disease, by performing the techniques of RRBS, RRHP and RNA-seq. Further validation of these epi-modifications will be necessary by Ch-IP, RTq-PCR and western blot in order to propose them for targeted epi-drugs development. This study is in process.