

---

TEZĂ DE DOCTORAT (Rezumat)

# Rolul mutațiilor genetice în dismegacariopoieza și diseritropoieza din Sindromul Down

---

Doctorand **Valentina Sas**

---

Conducător de doctorat Șef Lucrări Dr. Ciprian Tomuleasa



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

Cluj-Napoca 2021

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	11
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Leucemia acută asociată sindromului Down</b>	15
1.1 Sindromul Down - generalități	15
1.2. Leucemia tranzitorie asociată sindromului Down	16
1.2.1. Aspecte generale	16
1.2.2. Caracteristici clinice și biologice	18
1.2.3. Management și prognostic	19
1.3. Leucemia acută mieloidă asociată sindromului Down	20
1.4. Leucemia acută limfoidă asociată sindromului Down	21
<b>2. Contextul genetic al mielodisplaziei asociate sindromului Down</b>	23
2.1 Cromozomul 21	23
2.2. Mutația GATA1	24
2.3. Cromozomul 21 suplimentar, mutații genetice și epigenetice responsabile de fenotipul din SD	26
2.4. Modificări de expresie a mi-ARN-urilor în patogeneza SD	30
<b>3. Tehnici de detectare a mutațiilor genetice și implicații practice</b>	33
3.1. Secvențiere de noua generație	33
3.2. Surface-enhanced Raman spectroscopy	34
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	38
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	39
<b>2. Metodologie generală</b>	39
<b>3. Studiul 1 - Leucemia acută asociată Sindromului Down - descrierea cazuisticii întâlnite în trei centre de Oncologie și Hematologie Pediatrică din România</b>	43
3.1. Introducere	43
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	44
3.3. Material și metodă	44
3.4. Rezultate	44
3.5. Discuții	49
3.6. Concluzii	55
<b>4. Studiul 2 - Rolul micro-ARN-155 în patogeneza leucemiei acute asociate sindromului Down</b>	53
4.1. Introducere	53

---

4.2. Ipoteza de lucru/obiectiv	54
4.3. Material și metodă	54
4.4. Rezultate	57
4.5. Discuții	75
4.6. Concluzii	76
<b>5. Studiul 3 - Evaluarea gradului de metilare al ADN-ului prin tehnica SERS în cadrul leucemogenezei din Sindromului Down</b>	77
5.1. Introducere	77
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	77
5.3. Material și metodă	78
5.4. Rezultate	79
5.5. Discuții	83
5.6. Concluzii	84
<b>6. Discuții generale</b>	85
<b>7. Concluzii generale</b>	89
<b>8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	91
<b>REFERINȚE</b>	93

Cuvinte cheie: sindrom Down, leucemie acută, leucemia acută tranzitorie, epigenetică, micro-ARN-155, metilare ADN

## 1. Introducere

Sindromul Down (SD) sau trisomia 21 se caracterizează printr-o variabilitate a fenotipurilor exprimate. Astfel, retardul mintal, simptomul central al tabloului clinic din SD, are grade diferite de severitate. De asemenea anomaliile asociate precum malformațiile cardiace, tulburările neurologice sau modificările hematologice apar în procente diferite în rândul subiecțiilor cu SD. Luând în considerare aceste observații, cercetările din domeniu au ajuns la concluzia că trisomia 21 nu este suficientă pentru a explica pe deplin manifestările ce conturează SD.

Cromozomul 21 suplimentar este prima anomalie care apare în patogeneza SD și se află în centrul acestui mecanism, dar cercetările au arătat că trisomia 21 prin efectul de „supradozare genică”, destabilizează întreg genomul, orchestrând modificări în activitatea altor gene dinafara cromozomului 21. Astfel, contextul genetic în care apar manifestările din SD este unul complex, un puzzle imens, care nu presupune doar modificări structurale la nivelul ADN-ului, ci și modificări în felul în care genele interacționează între ele, cunoscute ca modificări epigenetice.

Pornind de la aceste observații, lucrarea de față își propune studiul acestor modificări epigenetice, cu scopul de a identifica mici piese din imensul puzzle al geneticii sindromului Down. Pentru aceasta am ales să studiem modificările hematologice care însoțesc SD, acestea reprezentând un exemplu prețios în patologie prin particularitățile unice pe care le prezintă, dar și datorită modelului de transformare malignă pas cu pas pe care îl oferă leucemia asociată SD (LA-SD), care ar putea aduce informații importante despre procesul leucemogenezei în general.

Particularitățile unice ale modificărilor hematologice asociate SD se regăsesc în descrierea leucemiei acute pentru care subiecții cu SD au un risc crescut față de populația generală. Leucemia acută asociată SD este precedată de leucemia tranzitorie a nou-născutului cu SD (TL-DS) ce apare la un procent mic din cazuri, cu observația că majoritatea se manifestă asimptomatic făcând dificilă identificarea lor în absența unui screening. Majoritatea au o evoluție spre remisie spontană până la vârsta de 3 luni, dar o parte din aceștia vor dezvolta leucemie acută de tip megacarioblastic în primii 3 ani de viață. În plus, această formă de leucemie are un răspuns favorabil la tratament, cu o rată crescută de vindecare, dar cu o toxicitate crescută la tratament.

Până în prezent cercetările au evidențiat un proces pas cu pas al apariției LA-SD. Prima anomalie este bineînțeles trisomia 21 care are loc în perioada fetală generând o dismegacariopoieză și diseritropoieză. Al doilea pas în acest proces îl constituie apariția mutației GATA1, tot în perioada fetală. Aceasta împreună cu trisomia 21 sunt patognomonice pentru apariția TL-DS. Deși considerată benignă datorită evoluției spontane spre remisie, această entitate stă la baza progresei spre LA-SD. Aceasta din urmă rezultă dintr-o clona a TL-DS, fapt demonstrat de prezența mutației GATA1 în

aceste celule, dar care au dobândit și alte mutații genetice suplimentare ce stau la baza apariției caracterelor de malignitate ce vor declanșa tabloul LA-SD.

Deși etapele acestui proces au fost în mare parte identificate, există multe piese ale acestui puzzle care lipsesc, de exemplu nu se cunoaște mecanismul remisiei spontane al TL-DS, iar modificările genetice suplimentare ale celulelor din LA-SD identificate până în prezent nu explică pe deplin mecanismul progresiei TL-DS spre LA-SD.

În lucrarea de față ne-am propus să contribuim cu o cercetare care să ofere mici indicii legate de procesul complex al leucemogenezei din SD. Într-o primă fază am realizat un studiu retrospectiv pentru a constitui un eșantion de pacienți cu LA-SD, prin care s-au obținut probele de aspirat medular necesare experimentelor ulterioare.

În continuare am realizat o analiză funcțională îmbogățită a interacțiunilor dintre genele cromozomului 21, genele identificate anterior cu rol în LA-SD, micro-ARN-uri de la nivelul cromozomului 21 și căi de semnalizare moleculară cu rol în procesele maligne. Rezultatele arată o influență semnificativă a micro-ARN-155 asupra genelor de la nivelul cromozomului 21. Într-o etapă următoare s-a realizat secvențiere de noua generație (NGS) pentru probele de ADN obținute, utilizând un panel prestabilit de gene implicate în patogeneza cancerului. Datele obținute au evidențiat prezența mutației genelor care codifică receptorii TNF cu rol important în apoptoza celulară. Ulterior datele obținute au fost validate prin analiza funcțională *in vitro* utilizând o linie celulară CMK-86 oferită prin amabilitatea Departamentului de Pediatrie al Universității de Medicină Nagoya din Japonia. Într-o ultimă etapă am analizat prin tehnica SERS gradul de metilare al ADN-ului, considerat parte din modificările epigenetice și cunoscând faptul că celulele maligne se caracterizează printr-un grad de hipometilare ADN. Rezultatele au evidențiat diferențe semnificative între gradul de metilare ADN din TL-DS comparativ cu LA-SD, acestea apărând pe parcursul procesului de progresie din faza de leucemie tranzitorie spre leucemie acută.

Rezultatele lucrării de față sunt în concordanță cu cercetările anterioare privind tabloul complex al modificărilor genetice ce însoțesc SD, în care nu este vorba doar de trisomia 21, ci și de o serie de modificări genetice și epigenetice, influențate și orchestrate de cromozomul 21 și care în final au implicații în procesele moleculare de la nivel celular. Ele vor constitui obiectul cercetărilor viitoare cu scopul înțelegerii procesului leucemogenezei în general dar și identificării unor metode inovative de tratament.

## **2. Contribuția personală.**

Lucrarea de față s-a realizat cu acordul Consiliului de Etică al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca, al șefilor de secție ai centrelor de Hematologie și Oncologie Pediatrică din cadrul Institutului Clinic Fundeni din București, Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Louis Țurcanu din Timișoara și respectiv Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii din Cluj-Napoca, pentru culegerea

datelor despre pacienți și acordul Comisiei pentru Studii Clinice a Institutului Oncologic “Prof. Dr. Ion Chiricuță”, Cluj-Napoca, România.

## **2.1 Studiul 1: Leucemia acută asociată Sindromului Down - descrierea cazuisticii întâlnite în trei centre de Oncologie și Hematologie Pediatrică din România**

**Ipoteza și obiective.** Leucemia acută mieloidă apărută la pacienții cu SD se caracterizează printr-o fază preleucemică cu debut în perioada neonatală, rareori simptomatică dar cu prezența blastilor în periferie și aparent cu o remisie spontană. Profilul tumoral particular din SD subliniază importanța cromozomului 21 în hematopoieză și poate oferi un indiciu pentru înțelegerea patogenezei leucemiei în general. Studiul de față își propune o centralizare a cazurilor de SD asociat cu leucemia tranzitorie și/sau leucemia acută din trei centre de Hematologie și Oncologie Pediatrică din România, cu scopul de a sublinia importanța identificării tulburărilor hematologice din cadrul SD mai ales la nou-născuți, chiar și în condiții asimptomatice.

**Metodologie.** S-a realizat un prim studiu, retrospectiv privind datele clinice și paraclinice ale pacienților cu SD și leucemie acută mieloblastică (LAM) sau limfoblastică (LAL) și/sau TL-DS aflați în evidența secțiilor de Hematologie și Oncologie Pediatrică din cadrul Institutului Clinic Fundeni din București, Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Louis Țurcanu din Timișoara și Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii din Cluj-Napoca. S-au obținut date clinice și paraclinice și probe de aspirat medular.

**Rezultate.** Au fost incluși în studiu 20 de pacienți cu diagnostic de SD și LAM sau LAL și/sau TL-DS. Dintre pacienții diagnosticați cu leucemie acută, 5 dintre ei au fost diagnosticați cu LAM, 11 cu LAL, iar pentru unul din pacienți nu au existat date suficiente. TL-DS a fost diagnosticat în perioada postnatală la 2 dintre pacienții cu LAM, dar au fost incluși în studiu încă 3 pacienți diagnosticați cu TL-DS, dar care în momentul efectuării studiului se aflau în evidență fără modificări hematologice. Vârsta medie de debut pentru LAM a fost de 2,2 ani iar pentru LAL de 4,84 ani. Vârsta medie la diagnostic a pacienților cu TL-DS a fost de 17 zile. Patru pacienții cu TL-DS au avut o remisie spontană până la vârsta de 3 luni, iar un pacient, care a asociat tablou clinic de insuficiență cardiacă a necesitat intervenție terapeutică cu evoluție favorabilă. Doi dintre pacienții diagnosticați cu TL-DS au dezvoltat LAM la vârsta de un an și trei luni respectiv trei ani și patru luni. De menționat că acești doi pacienți au prezentat cea mai mică vârstă gestațională și greutate la naștere, procentul cel mai crescut de blasti în periferie și perioada de timp cea mai lungă până la remisie. Comparând cazurile de LAM cu cele de LAL, s-a evidențiat că vârsta de debut este mai mare pentru LAL ( $p=0,0083$ ). Aceasta nu s-a corelat cu tipul de LAL ( $p=0,904$ ).

## 2.2 Studiul 2: Rolul micro-ARN-155 în patogeneza leucemiei acute asociate SD.

**Ipoteza și obiective.** Procesul leucemogenezei prezent la subiecții cu SD are un substrat genetic complex în centrul căruia se află cromozomul 21 suplimentar, dar care nu este suficient pentru a explica fenotipurile asociate SD, existând astfel influențe în expresia altor gene din afara cromozomului 21 cu modificări semnificative la nivel molecular. Ne propunem astfel testarea acestei ipoteze prin identificarea unor mutații genetice implicate în leucemia acută asociată SD utilizând inițial baze de date și software-uri menite să identifice interacțiuni între genele de la nivelul cromozomului 21, alte gene implicate în procese de la nivelul măduvei osoase și micro-ARN-uri, ulterior secvențiere de nouă generație a ADN-ului obținut de la pacienții cu SD și leucemie acută utilizând un panel prestabilit conținând gene cu implicații dovedite în procesele maligne și în final, validarea rezultatelor prin analiza funcțională *in vitro*, pe culturi celulare.

**Metodologie și rezultate.** S-a efectuat analiza interacțiunii dintre genele localizate la nivelul cromozomului 21, care au fost deja identificate ca având un rol cheie în leucemia asociată SD, micro-ARN-urile și căile de semnalizare implicate în procesele celulare de apariție a cancerului. Genele prezente la nivelul cromozomului 21 au fost identificate prin baza de date Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology ([http://atlasgeneticsoncology.org/Indexbychrom/idxg\\_21.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Indexbychrom/idxg_21.html)). S-a aplicat software-ul STRING și s-a efectuat analiza funcțională de îmbogățire utilizând R 3.5.3 și baza de date GO. Ulterior s-au introdus micro-ARN-urile de la nivelul cromozomului 21 în miRNet (<https://www.mirnet.ca/faces/upload/MirUploadView.xhtml>), și s-a analizat care dintre acestea sunt implicate în procesele ce au loc la nivelul măduvei osoase.

Rezultatele au evidențiat că majoritatea genelor de la nivelul cromozomului 21 sunt țintă pentru micro-ARN-155. Apoi, utilizând baza de date KEGG au fost alese căile de semnalizare considerate de interes: căile implicate în cancer, în leucemia mieloidă, în ciclul celular și calea p53, stabilindu-se valoarea  $p$  semnificativă sub 0,05. Deoarece numărul genelor de pe cromozomul 21 care sunt ținta micro-ARN-155 și sunt implicate în patogeneza cancerului este foarte mare, am ales doar genele a căror expresie poate influența căile de semnalizare selectate. Pentru aceste gene s-a aplicat analiza funcțională îmbogățită utilizând R 3.5.3 și baza de date GO. Rezultatele obținute au ghidat experimentele ulterioare, contribuind la selectarea panelului de gene țintă pentru NGS.

În următoarea etapă s-a realizat extracția ADN din probele de aspirat medular ale pacienților cu LA-SD, după un protocol prestabilit și s-a efectuat NGS. Deși am utilizat un număr redus de pacienți, analiza NGS a arătat prezența a 43 de mutații ale genei TNFRSF10A, 39 pentru TNFRSF10B, 13 pentru TNFRSF10C și 23 pentru TNFRSF10D. Astfel, am ales ipoteza conform căreia mutații la nivelul genelor TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D care codifică proteine ce fac parte

din superfamilia de receptori TNF, având ca și ligand TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cu rol important în apoptoză, pot activa calea NFkB, influențând transcripția micro-ARN-155 și activând calea moleculară SHIP1/PI3K/AKT, promovând supraviețuirea celulară.

Analizând co-expresia ARN-ului utilizând PCA și heatmap reprezentând coeficientul de corelație rho, s-a observat corelație negativă între TNFRSF10C și micro-ARN-155, sugerând rolul de receptor decoy al TNFRSF10C, inhibând astfel transcripția micro-ARN-155 prin NFkB. În plus, s-a observat ca PIK3CA se corelează pozitiv cu componente ale NFkB, sugerând că activarea NFkB poate duce la activarea PI3K.

Datele obținute au fost ulterior validate prin analiza funcțională *in vitro*, pe o linie celulară CMK-86, provenită din sângele periferic al unui pacient de 10 luni cu SD diagnosticat cu leucemie acută megacarioblastică care ne-a fost oferită prin amabilitatea profesorului Yoshiyuki Takahashi, afiliat Departamentului de Pediatrie al Universității de Medicină Nagoya din Japonia. Celulele au fost cultivate în mediul RPMI-1640, suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS) și 1% piruvat de sodiu. Celulele au fost ulterior transfectate cu micro-ARN-155 fie mimic, fie inhibitor. Pentru a investiga dacă micro-ARN-155 mimic și inhibitor influențează semnificativ viabilitatea liniei celulare CMK-86 s-a efectuat MTS assay. S-a observat apariția unor modificări minime la 24 și 48 ore, iar la 72 ore există o inhibare semnificativă a viabilității celulare.

Profilul micro-ARN-155 a fost evaluat utilizând tehnica qRT-PCR pentru linia celulară CMK-86. Rezultatele au evidențiat că profilul expresiei micro-ARN-155 nu a fost scăzut semnificativ când s-a comparat inhibitor cu control, dar a fost semnificativ modificat când s-a comparat mimic cu control ( $p=0,0312$ ). După analiza funcțională s-a folosit protein array bazat pe Western Blot pentru a investiga dacă micro-ARN-155 acționează prin căi moleculare implicate în apoptoză. În acest caz, micro-ARN-155 inhibitor are un impact mai mare asupra expresiei proteinelor față de control, mai ales în privința receptorilor aparținând superfamiliei TRAIL.

### **2.3 Studiul 3: Evaluarea gradului de metilare al ADN-ului prin tehnica SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) în cadrul leucemogenezei din SD.**

**Ipoteza și obiective.** Acest studiu a plecat de la ipoteza conform căreia există un grad de hipometilare a ADN-ului în afecțiunile maligne. Prin tehnica de analiză SERS am studiat gradul de metilare al ADN-ului provenit din celulele aparținând probelor de aspirat medular ale pacienților cu leucemie acută asociată SD și cu leucemie tranzitorie asociată SD și am evaluat dacă există diferențe semnificative între acestea cu scopul de a identifica modificări ce stau la baza progresiei pas cu pas din faza de leucemie tranzitorie spre leucemie acută din cadrul SD.

**Metodologie.** Pentru analiza SERS a ADN-ului, s-au folosit nanoparticule de argint sintetizate prin reducere cu clorhidrat de hidroxilamină, precum a fost descris în prealabil. Toate măsurătorile SERS au fost făcute sub forma de picături lichide utilizând același lot de nanoparticule. Pentru achiziția spectrului SERS al ADN-ului a



fost folosit un spectrometru InVia Raman(Renishaw). S-a folosit un laser Nd:YAG cu dublă frecvență și emisie la 532 nm și care a fost focalizat la picăturile lichide printr-un obiectiv 5X(Leica, NA 0.12), puterea laserului la nivelul probei fiind de aprox. 25 mW. Pentru fiecare măsurătoare s-a efectuat o analiză de 40sec și s-a calculat media. S-a calculat PCA utilizând The Unscrambler X (Camo Software). Pentru analiza univariată, zona aflată sub benzile SERS la  $1005\text{ cm}^{-1}$  a fost determinată folosind software-ul MATLAB R2019. D'Agostino & Pearson a fost utilizat pentru efectuarea testului de normalitate a datelor. Diferența între medii a fost analizată prin testul t student (pentru distribuția parametrică) și Mann-Whitney U test (pentru distribuția non-parametrică), urmat de analiza ROC- receiver operating characteristic.

**Rezultate.** În urma acestui studiu s-a evidențiat un grad redus de metilare al ADN-ului celulelor din aspiratul medular aparținând pacienților cu LA-SD față de cei cu TL-DS, sugerând existența unui proces de reducere a gradului de metilare al ADN-ului pe măsură ce celulele progresează dintr-o fază preleucemică spre leucemie acută. Acest aspect a fost observat și în cazul pacienților cu leucemie acută mieloidă și neoplazie mieloproliferativă, considerată o fază preleucemică și care nu asociază SD.

### 3. Concluzii generale

Leucemia asociată SD are câteva particularități unice: este precedată de o fază preleucemică, TL-DS cu remisie spontană prin mecanism necunoscut, progresie spre LAM-SD în primii 4 ani de viață, răspuns favorabil la tratament, dar toxicitate crescută, necesitând protocoale terapeutice diferite

Diagnosticul TL-DS în perioada neonatală printr-un test screening care să conțină procentul de blaști din sângele periferic și mutația GATA1, este important datorită riscului de progresie spre LAM-SD și necesitatea urmării atente a acestor pacienți. Studiile viitoare sunt necesare pentru stabilirea unui management adecvat cu scopul prevenirii apariției LAM-SD.

Leucemia asociată SD oferă un model de leucemogeneză a cărei caracterizare în detaliu poate oferi rezultate despre leucemogeneză și răspuns la tratament în general.

Contextul de apariție al LA-SD este unul complex, centrat de trisomia 21 care orchestrează modificări în întreg genomul, inclusiv modificări epigenetice.

Micro-ARN-155 are drept ținte majoritatea genelor de la nivelul cromozomului 21 și dobândind o activitate anormală ca urmare a efectului de doză conferit de trisomia 21, poate explica modificările hematologice ce însoțesc SD.

Analiza NGS a ADN-ului obținut de la pacienții cu LA-SD a evidențiat mutații la nivelul genelor care codifică receptorii ce aparțin superfamiliei TNF (TNFSFR10A, TNFSFR10B, TNFSFR10C, TNFSFR10D). Acești receptori au TRAIL ca și ligand, responsabil pentru declanșarea mecanismului de apoptoză, în special în celulele maligne, constituind și baza unor terapii terapeutice, dar în unele cazuri celulele maligne sunt rezistente la apoptoza indusă de TRAIL prin activarea unor căi de supraviețuire celulară (NFkB, MAPK, PI3K/AKT).

Validarea *in vitro* a modificărilor obținute a evidențiat că micro-ARN-155 mimic și inhibitor produc modificări în viabilitatea celulelor CMK-86 la 72 ore.

Analiza Western-Blotting a evidențiat legătura dintre micro-ARN-155 și apoptoza indusă de TRAIL, evidențiind că micro-ARN-155 inhibitor are un impact mai intens asupra expresiei proteice comparativ cu controlul mai ales asupra receptorilor TNF implicați în apoptoza indusă de TRAIL.

Datele obținute confirmă existența unor modificări epigenetice complexe în patogeneza leucemiei asociate SD. Evidențierea mutațiilor la nivelul genelor care codifică receptorii TNF, conexiunea cu micro-ARN-155 și căile de supraviețuire celulară sugerează că particularitățile leucemiei asociate SD se datorează într-un anumit procent modificărilor ce apar în procesul de apoptoză celulară.

SERS este o metodă în măsură să detecteze modificările de metilare ale ADN-ului care se produc în cadrul progresiei treptate dintr-o fază preleucemică spre leucemie acută.

Progresele viitoare în domeniul tehnologiei vor face tehnica SERS accesibilă în practica medicală.

---

ABSTRACT OF THE PhD THESIS

# The role of genetic disorders in dysmegakaryopoiesis and dyserythroipoiesis from Down Syndrome

---

---

PhD student **Valentina Sas**

---

PhD supervisor **Ciprian Tomuleasa**

Cluj-Napoca 2021



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## Table of contents

<b>INTRODUCTION</b>	11
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Down syndrome associated leukemia</b>	15
1.1 Down syndrome - generalities	15
1.2. Transient leukemia of Down syndrome	16
1.2.1. General aspects	16
1.2.2. Clinical and biological characteristics	18
1.2.3. Management and prognosis	19
1.3. Down syndrome associated acute myeloblastic leukemia	20
1.4. Down syndrome associated acute lymphoblastic leukemia	21
<b>2. The genetic background of Down syndrome associated myelodisplasia</b>	23
2.1 The 21 chromosome	23
2.2. The GATA1 mutation	24
2.3. The supranumerary 21 chromosome, genetic and epigenetic disorders responsible for the phenotypes of Down syndrome	26
2.4. Disorders of mi-RNA expression influencing Down syndrome pathogenesis.	30
<b>3. Genetic disorders detection techniques and their clinical applications</b>	33
3.1. Next generation sequencing	33
3.2. Surface-enhanced Raman spectroscopy	34
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	38
<b>1. Study hypothesis/objectives</b>	39
<b>2. Methods</b>	39
<b>3. Study1 - Down syndrome associated leukemia: clinical cases from three Pediatric and Oncology departments from Romania</b>	43
3.1. Introduction	43
3.2. Study hypothesis and objectives	44
3.3. Method	44
3.4. Results	44
3.5. Discussions	49
3.6. Conclusions	55
<b>4. Study 2 - The role of micro-RNA-155 in the pathogenesis of Down syndrome associated leukemia</b>	53
4.1. Introduction	53

---

4.2. Study hypothesis and objectives	54
4.3. Method	54
4.4. Results	57
4.5. Discussions	75
4.6. Conclusions	76
<b>5. Study 3 - DNA methylation analysis by SERS for Down syndrome associated leukemia</b>	77
5.1. Introduction	77
5.2. Study hypothesis and objectives	77
5.3. Method	78
5.4. Results	79
5.5. Discussions	83
5.6. Conclusions	84
<b>6. General discussions</b>	85
<b>7. General conclusions</b>	89
<b>8. Originality and innovative contributions</b>	91
<b>Bibliography</b>	93

Key words: Down syndrome, acute leukemia, transient leukemia of Down syndrome, epigenetics, m-RNA, DNA methylation

## **1. Introduction**

Down syndrome (DS) or 21 trisomy is characterized by a large variability of the phenotypes. Thus, mental retardation, which is the most frequent symptom of Down syndrome, has different grades of severity. Other disorders, like heart malformations, neurologic or hematologic disorders appear with different frequency amongst people with DS. Considering these observations, the studies in the field came to the conclusion that the extra 21 chromosome is not sufficient to justify the amount of disorders found in DS patients.

The supernumerary 21 chromosome is the first genetic anomaly that appears in the pathogenesis of DS. The extra genetic material of the 21 chromosome produces a genome destabilization, influencing the activity of other genes that are not localized on the 21 chromosome. Thus, the genetic background of DS is very complex and includes not only structural anomalies of the DNA but also disorders of the ways genes interact between them, known as epigenetic changes.

Considering these observations, the main objective of this paper is to evaluate the epigenetic changes and to identify some important steps in the pathogenesis of DS. For this reason, we chose to study the hematologic disorders associated with DS. These hematologic disorders are a precious example in the pathology, having some unique particularities, like the predisposition to acute leukemia. The pathogenesis of this type of leukemia is a very good example for understanding the leukemogenesis process in general.

The hematologic disorders associated with DS have some particularities specifically regarding the predisposition to acute leukemia (AL-DS). This acute leukemia associated with DS is preceded by transient leukemia (TL-DS) during neonatal life. Patients with TL-DS are in most cases asymptomatic and the diagnosis of this disorder is difficult in the absence of a screening test. In most cases, the outcome is with spontaneous resolution in the first 3 months of life but some cases will develop acute megakaryoblastic leukemia in the first 3 years of life. This type of leukemia has a good response to treatment, a high cure rate but high toxicity related to the treatment.

The pathogenesis of Down syndrome-associated leukemia is a step by step process. The first anomaly is the presence of an extra 21 chromosome, this appears

during the fetal life causing a dyserythropoietic and a dysmegakariopoiesis. The second step of this process is the appearance of GATA1 mutation also during fetal life. These two disorders are pathognomonic for TL-DS. Although TL-DS is considered a benign disorder because of its spontaneous remission, studies in the field have shown that it might be the cause of AL-DS appearance. The malignant cells present in AL-DS result from a clone of TL-DS cells, they have the same GATA1 mutation and AL-DS cells have additional genetic mutations responsible for the appearance of AL-DS.

Although many of the steps of the leukemogenesis process have been discovered, there are some questions without answers remaining. For example, there is no clear explanation for the spontaneous remission of TL-DS and the additional genetic mutations present in AL-DS cells do not explain the mechanism of progression of TL-DS to AL-DS.

In this paper, we propose a study regarding the genetic disorders that can explain some important steps in the leukemogenesis process associated with DS. The first objective was to collect data, including bone marrow aspirate samples, from patients with AL-DS.

Next, we performed functional analysis on a set of genes localized on the 21 chromosome and their interactions with other genes found previously to be implicated in AL-DS process, mRNA expression, and molecular signaling pathways that can influence the malignant process. The result showed that mRNA-155 is influencing the expression of most of the genes localized on 21 chromosome. The next step was to perform NGS on DNA samples from patients with AL=DS, using a gene panel significant for cancer pathogenesis. The results showed mutations of genes that encodes TNF receptors, with a role in cellular apoptosis process. These data were next validated with in vitro functional analysis using a CMK-86 cell line obtained with the amiability of the Pediatric Department of Nagoya University of Medicine, Japan.

In the last study of this paper, we applied Surfaced Enhanced Raman Spectroscopy for evaluating the DNA methylation status of AL-DS cells, knowing from previous studies that malignant cells are characterized by a DNA hypomethylation status considered part of the epigenetic changes. The results showed significant differences between DNA methylation status of TL-DS cells compared with AL-DS cells,

these changes appear during the progression process from transient leukemia to acute leukemia.

The results of this paper are consistent with previous research regarding the complex picture of genetic changes that accompany SD, which involves not only trisomy 21, but also a series of genetic and epigenetic changes influenced and orchestrated by chromosome 21 and which in finally have implications for molecular processes at the cellular level. They will be the subject of future research in order to understand the process of leukemogenesis in general but also to identify innovative methods of treatment.

## **2. Personal contribution.**

This paper was made with the consent of the Ethics Council of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" from Cluj-Napoca, of the department heads of Pediatric Oncology and Hematology Departments of Fundeni Clinical Institute in Bucharest, Emergency Clinical Hospital for Children Louis Țurcanu from Timișoara and the Emergency Clinical Hospital for Children from Cluj-Napoca, respectively, for collecting patient data and the agreement of the Commission for Clinical Studies of the Oncological Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuță", Cluj-Napoca, Romania.

### **2.4 First study: Acute leukemia associated with Down Syndrome- patients data from a multicentric study**

**Hypothesis and objectives.** Acute myeloid leukemia of DS has a preleukemic state with the onset in the neonatal period, rarely symptomatic but with the presence of blasts in peripheral blood smear and apparently, a spontaneous remission. The unique tumor profile of DS underlines the importance of chromosome 21 in hematopoiesis and it can help understanding leukemogenesis in general. The aim of this paper is to summarize the cases with DS and transient leukemia and/or acute leukemia that were found in three centers of Pediatric Hematology and Oncology from Romania. We address this manuscript to pediatricians and neonatologists in order to emphasize the importance of diagnosing hematological disorders in children with DS, especially neonates, even if they are asymptomatic.



**Method.** A retrospective study was performed and we collected the clinical and laboratory data of patients with TL-DS and/or acute myeloblastic leukemia, AML-DS or acute lymphoblastic leukemia, ALL-DS who were admitted in one of the Pediatric Hematology and Oncology Departments from Clinical Institute Fundeni- Bucharest, Clinical Hospital for Pediatric Emergencies “Louis Turcanu” Timisoara or Clinical Hospital for Pediatric Emergencies- Cluj-Napoca. The study was performed after the written approval was obtained from the head of each department.

**Results.** We included 20 patients with the diagnosis of DS and acute myeloid or lymphoid leukemia and/or TL-DS. Five patients were diagnosed with AML-DS, 11 with ALL-DS and one patient for which data regarding the type of leukemia were missing because parents refused the bone marrow aspirate and the patient was lost to follow. Two of the patient with AML-DS were diagnosed with TL-DS in the neonatal period. We also included in the study 3 patients diagnosed at birth with TL-DS but without developing acute leukemia so far. The mean age for the onset of AML-DS was 2.4 years and for ALL-DS was 4 years. The mean age for the diagnosis of patients with TL-DS was 17 days. Four patients had spontaneous remission until the age of 3 months and for the fifth patient who presented with heart failure, treatment was required and remission was obtained at the age of 3 months. Two of the patients with TL-DS developed AML at the age of 1 year and 3 months and 3 years and 4 months, respectively. These two patients had the lowest gestational age and birth weight, had the highest level of blasts in the peripheral blood, and a longer period for obtaining spontaneous remission. Comparing the ALL-DS cases with the ones with AML-DS we observed an older age for the onset of ALL-DS ( $p=0,0083$ ). This was not correlated with the type of ALL-DS ( $p=0,904$ ).

## 2.5 Second study: The role of micro-ARN-155 in the pathogenesis of Down Syndrome associated leukemia.

**Hypothesis and objectives.** The process of leukemogenesis present in subjects with DS has a complex genetic background in the center of which is the additional chromosome 21, but which is not sufficient to explain the associated phenotypes of SD, thus influencing the expression of other genes outside chromosome 21 with significant changes at the molecular level. We aim to test this hypothesis by identifying genetic

mutations involved in acute DS-associated leukemia using, initially databases and software designed to identify interactions between genes on chromosome 21, other genes involved in the processes in the bone marrow and micro-RNAs, subsequently, we applied next-generation on DNA samples obtained from patients with DS and acute leukemia using a predetermined genes panel containing genes with proven implications in malignant processes and finally, validation of results by in vitro functional analysis on cell cultures.

**Method and results.** We evaluated the interactions between genes localized on chromosome 21, genes already identified as having a key role in AML-DS, miRNAs and signaling pathways implicated in cancer and cell development. Genes present on chromosome 21 from: [http://atlasgeneticsoncology.org/Indexbychrom/idxg\\_21.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Indexbychrom/idxg_21.html). On these we applied STRING software and did functional enrichment analysis using R 3.5.3 and the GO database. After this, we introduced all microRNAs from chromosome 21 in miRNet (<https://www.mirnet.ca/faces/upload/MirUploadView.xhtml>) and analyzed which of them are implicated in processes in the bone marrow. Most genes were targeted by hsa-miR-155-5p.

Afterward, the pathways considered of interest were selected, all with a  $p < 0.05$  using KEGG as the database: pathways in cancer, acute myeloid leukemia, p53 signaling pathway, and cell cycle. Because of the high number of genes targeted by hsa-miR-155-5p and its known implications in cancer in general, we continued using only the genes that were targeted by hsa-miR-155-5p and that were deregulated in the pathways selected. On these genes, we also applied functional enrichment analysis using R 3.5.3 and the GO database. These results have guided the next steps of the study.

Next, we performed NGS on the DNA samples from patients with AL-DS using a default protocol. Although we had a reduced number of patients we found 43 mutations for TNFRSF10A, 39 for TNFRSF10B, 13 for TNFRSF10C and 23 for TNFRSF10D. Thus, we hypothesize that mutation of TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, which encode proteins that are part of the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily and have an important role in apoptosis, might activate NF- $\kappa$ B pathway, influence the transcription of miR-155-5p and activate SHIP1/PI3K/AKT pathway, providing cell survival.

We assessed the co-expression of RNAs using PCA and a heatmap representing the rho correlation coefficient. What can be observed is the negative correlation between TNFRSF10C, and MIR155, which might show the role of TNFRSF10C as a decoy receptor, thus, inhibiting the transcription of MIR155 through NFkB pathway. Moreover, it can be observed that PIK3CA is positively correlated with components of NFkB, showing that NFkB activation could lead to PI3K activation.

The data were then validated by *in vitro* functional analysis using the CMK-86 cell line, established from the peripheral blood of a 10-month child with DS and DS-AmkL, was kindly gifted by the Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan. Cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% sodium pyruvate. Cells were later transfected with either the mimic, the inhibitor or the non-specific mimic (NSM) of the microRNA-155-5p. After culture for 72 hours, a protein array and Western blotting was done, in order to assess the protein synthesis of the previously described altered genes by NGS. Cell viability was measured after transfection with microRNA-155-5p using MTS assay at 24, 48, 72 and 96 hours post transfection. According to the obtained results, we observed that the modifications occur at 24 and 48h were slightly modified, meanwhile after 72- and 96-hours statistically significant inhibition of cell viability was observed. Further, we evaluated the profile of microRNA-155 using qRT-PCR technique on CMK-86 cell line. qRT-PCR results showed that microRNA-155 expression profile was not significantly altered when comparing the inhibitor to the control but was highly affected when comparing the mimic to the control ( $p = 0.0312$ ). After the functional assays, we used a western blotting-based protein array to investigate whether microRNA-155 acts by using molecular pathways related to apoptosis. The results are shown in figure 12 and reveal that, in this case, the inhibitor shows a bigger impact on protein expression compared to the control, especially in the case of TRAIL superfamily receptors.

## **2.6 Third study: Surface Enhanced Raman Spectroscopy for detecting the DNA methylation status in acute leukemia associated with DS.**

**Hypothesis and objectives.** This study started from the hypothesis that there is a degree of hypomethylation of DNA in malignancies. Through the SERS analysis

technique, we studied the degree of DNA methylation from cells obtained from bone marrow aspirate samples of patients with acute leukemia associated with DS and DS-associated transient leukemia. We assessed whether there were significant differences between them in order to identify changes underlying the step-by-step progression from the phase of transient leukemia to acute leukemia within DS.

**Method.** Silver nanoparticles (AgNPs) synthesized by reduction of Ag<sup>+</sup> with hydroxylamine hydrochloride were employed as SERS substrate, as previously described. All SERS measurements were performed in liquid drop form by using the same batch of nanoparticles. SERS spectra were collected using an InVia Raman (Renishaw) spectrometer. For excitation, a doubled frequency Nd:YAG laser emitting at 532 nm was focused on the liquid drop through a 5X objective (Leica, NA 0.12), the laser power of on the sample being approx. 25 mW. For each measurement an integration time of 40 s was set and three measurements were averaged. PCA analysis was performed using The Unscrambler X (Camo Software). For the univariate analysis, the area under the 1005 cm<sup>-1</sup> SERS bands was determined using custom built MATLAB R2019. D'Agostino & Pearson omnibus normality test. The differences between the mean of datasets was assessed by student's t test (for parametric distributions) and Mann-Whitney U test (for non-parametric distributions), followed by the receiver operating characteristic (ROC) analysis.

**Results.** This study showed a low degree of DNA methylation of cells obtained from bone marrow aspirate samples of patients with acute leukemia associated with DS compared to those with DS-associated transient leukemia, suggesting the existence of a process of reducing the degree of DNA methylation as cells progress from a preleukemic phase to acute leukemia. This aspect was also observed in patients with acute myeloid leukemia and myeloproliferative neoplasia, considered a preleukemic phase and not associated with DS.

### **3. Conclusions.**

DS-associated leukemia has several unique features: it is preceded by a preleukemic phase, TL-DS with spontaneous remission by unknown mechanism, progression to AML-DS in the first 4 years of life, favorable response to treatment, but increased toxicity, requiring different therapeutic protocols.

The diagnosis of TL-DS in the neonatal period by a screening test containing the percentage of blasts in the peripheral blood and the documentation of GATA1 mutation is important due to the risk of progression to AML-DS and the need to closely monitor these patients. Future studies are needed to establish adequate management in order to prevent the occurrence of AML-DS.

DS-associated leukemia provides a model of leukemogenesis whose detailed characterization may provide results on leukemogenesis and response to treatment in general.

The context of the onset of AL-DS is a complex one, centered on trisomy 21 that orchestrates changes throughout the genome, including epigenetic changes.

Micro-RNA-155 targets most genes on chromosome 21 and acquires abnormal activity due to the dose effect of trisomy 21, which may explain the hematological changes that accompany DS.

Next generation sequencing analysis of DNA obtained from patients with AL-DS revealed mutations in the genes encoding the receptors belonging to the TNF superfamily (TNFSFR10A, TNFSFR10B, TNFSFR10C, TNFSFR10D). These receptors have TRAIL as a ligand, responsible for triggering the mechanism of apoptosis, especially in malignant cells, and are the basis of some therapeutic trials, but in some cases malignant cells are resistant to TRAIL-induced apoptosis by activating cell survival pathways (NF $\kappa$ B, MAPK, PI3K / AKT).

In vitro validation of the obtained changes revealed that mimic and inhibitory micro-RNA-155 produce changes in the viability of CMK-86 cells at 72 hours.

Western-Blotting analysis highlighted the link between micro-RNA-155 and TRAIL-induced apoptosis, showing that inhibitor micro-RNA-155 has a more intense impact on protein expression compared to control especially on TNF receptors involved in TRAIL-induced apoptosis.

The data obtained confirm the existence of complex epigenetic changes in the pathogenesis of DS-associated leukemia. Highlighting mutations in genes encoding TNF receptors, connection to micro-RNA-155, and cell survival pathways suggest that the particularities of DS-associated leukemia are due, in a certain percentage, to changes in cellular apoptosis.

SERS is a method capable of detecting changes in DNA methylation that occurs in the gradual progression from a preleukemic phase to acute leukemia.

Future advances in technology will make the SERS technique accessible in medical practice.

