

Teză de Doctorat (Rezumat)

Importanța modificatorilor epigenetici în hematologie

Doctorand **Sergiu Pașca**

Co conducător de doctorat Prof.dr. **Mihnea Zdrengea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. <i>Alterări care pot fi considerate echivalente mutațiilor de la nivelul TET2</i>	19
1.1 Mutațiile genetice clasice care imită pierderea TET2	20
1.2 Interacțiuni în celulele mutante pentru TET2/IDH1/2/WT1	22
1.3 Alți echivalenți ai mutațiilor TET2	23
1.4 Perspective	27
2. <i>Modificatorii epigenetici în imunologie</i>	29
2.1 Introducere	29
2.2 Efectele mutațiilor genei TET2 asupra limfocitelor T	31
2.3 Rolul alterărilor de la nivelul genei TET2 considerând efectul macrofagelor asupra limfocitelor T	33
2.4 Funcțiile TET2 la nivelul celulelor non-imune	34
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	37
1. <i>Ipoteza de lucru</i>	39
2. <i>Metodologie generală</i>	41
3. <i>Studiu 1: Descrierea mutațiilor de la nivelul genei TET2</i>	43
3.1. Introducere	43
3.2. Ipoteză de lucru	43
3.3. Material și Metodă	43
3.4. Rezultate	44
3.5. Discuții	51
3.6. Concluzii	52
4. <i>Studiu 2. Mutațiile de la nivelul genelor TET2/IDH1/2/WT1 și NPM1 influențează corelațiile dintre expresia RUNX1 și profilul transcriptomic în leucemia mieloidă acută</i>	53
4.1. Introducere	53
4.2. Ipoteză de lucru	54
4.3. Material și Metodă	54
4.4. Rezultate	54
4.5. Discuții	65
4.6. Concluzii	67
5. <i>Studiu 3. Starea de diferențiere a blastilor în leucemia acută mieloidă este afectată de mutațiile DNMT3A R882 și TET2/IDH1/2, dar nu are impact asupra răspunsului la agenții hipometilanți</i>	69
5.1. Introducere	69
5.2. Ipoteză de lucru	70
5.3. Material și Metodă	70
5.4. Rezultate	71
5.5. Discuții	79
5.6. Concluzii	81
6. <i>Studiu 4: Impactul modificatorilor epigenetici în progresia și răspunsul la terapie a leucemiei limfatice cronice</i>	83
6.1. Introducere	83
6.2. Ipoteză de lucru	84
6.3. Material și Metodă	84

6.4. Rezultate	85
6.5. Discuții	92
6.6. Concluzii	93
7. Discuții generale	95
8. Concluzii generale	97
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	99
REFERINȚE	101

Cuvinte cheie: modificatori epigenetici, malignități hematologice, leucemie acută mieloidă, leucemie limfocitară cronică, mutații

INTRODUCERE

Importanța modificatorilor epigenetici a fost observată prin numeroase studii în domeniul hematologiei și domenii conexe. Astfel, mutațiile la nivelul *TET2/IDH1/2/WT1* au fost studiate extensiv, în special în cazul leucemiei acute mieloidă. A fost demonstrat că, în cazul LAM, aceste mutații sunt prezente într-o manieră mutual exclusivă între ele. Cel mai probabil acest fapt este datorat efectului similar pe care mutațiile patogene în aceste gene le induc în cazul LAM. În mod specific, efectul principal al acestor mutații are în vedere diminuarea funcției *TET2*. Această diminuare are un rol important în transformarea metil-citozinei în hidroximetil-citozină la nivelul ADN-ului, astfel începând procesul demetilării cu formarea intermediarilor de formil-citozină și carboxi-citozină. Astfel, mutațiile la nivelul genei *TET2* care determină generarea unor forme trunchiate, modificarea conformației sau care afectează centrul activ al enzimei, vor duce la o reducere a procesului de demetilare cu generarea unei hipermetilări globale și afectarea transcripției diferitelor gene implicate în LAM. Mutațiile de la nivelul *IDH1* (R132) și *IDH2* (R140 și R172) au un efect similar între ele, și anume, formarea unui oncometabolit reprezentat de 2-hidroxi-glutarat. Acesta intră în competiție cu α -ceto-glutaratul, care, în mod normal, ocupă situsul activ al enzimei *TET2*, ducând astfel la o inhibiție competitivă și reducerea activității *TET2*. O altă genă care a fost demonstrat ca având un efect asupra activității enzimei *TET2*, este reprezentată de *WT1*. Datorită faptului că, în mod normal, *WT1* mediază interacțiunea dintre *TET2* și ADN, mutațiile la nivelul *WT1* determină o reducere a acestei interacțiuni, cu reducerea efectului enzimei *TET2*. Mutațiile de la nivelul genei *WT1* sunt, ca și în cazul lui *TET2*, heterogene și, în general, duc la o diminuare a funcției *WT1* fie direct prin generarea de forme inactive ale *WT1* sau indirect prin degradarea mRNA-ului *WT1*.

Din aceste motive, mutațiile la de nivelul *TET2/IDH1/2/WT1* și modificatorii epigenetici în general necesită studii suplimentare pentru a oferi o mai bună cunoaștere a acestora atât din punct de vedere biologic cât și clinic.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

TET2 este o dioxigenază dependentă de Fe^{2+} și α -ceto glutarat. Aceasta oxidează 5meC la 5hmeC. Mai departe, 5hmeC poate fi oxidată producând formarea de 5fC și apoi de 5caC. Ca mecanism de regenerare a citozinei demetilate, 5caC poate fi excizată și înlocuită cu o citozină demetilată. Acest mecanism oferă nu numai o cale pentru modularea metilării, ci și un mecanism de generare a 5hmeC. A fost demonstrat că acestea din urmă joacă nu numai un rol de intermediar pe calea demetilării, dar și un rol de semnalizare fiind recunoscută de cititori epigenetici, ducând la modificări ulterioare ale profilului de expresie. Această marcă (5hmeC) a fost observată ca fiind modificată în mai multe procese, incluzând îmbătrânirea, oncogeneza și diferențierea celulară. De asemenea, pe lângă efectul pe care TET2 îl are asupra 5meC de la nivelul ADN-ului, a fost observat faptul că această enzimă este implicată și în oxidarea 5meC de la nivelul ARN-ului, oferind un mecanism adițional prin care TET2 afectează profilul de expresiei.

A fost demonstrat faptul că TET2 este implicat și în dezvoltarea anumitor boli. În această direcție, a fost arătat faptul că, un model murin în care activitatea TET2 a fost inhibată dezvoltă frecvent malignități de linie mieloidă. Mai mult, diferite neoplazii (cancerle pulmonare, de prostată, pancreatice, hepatice și de sân) sunt asociate cu o reducere a activității TET2 și a prezenței mărcii 5hmC la nivelul ADN-ului. Adăugat la aceasta, TET2 este, de asemenea, important în dezvoltarea AITL, fiind una dintre primele mutații care apar în această boală. Interesant este faptul că modificările la nivelul TET2 conduc, de asemenea, la o instabilitate a FOXP3, ducând la o tendință importantă de autoimunitate în cazul modelelor murine. Ceea ce trebuie menționat este faptul că AITL este în general asociat cu evenimente autoimune, în special anemie hemolitică autoimună. Asocierea AITL cu evenimentele autoimune este, de asemenea, în concordanță cu faptul că celula din care se dezvoltă AITL este reprezentată de celula T helper foliculară, care este implicată în activități stimulative în cadrul sistemului imunitar, incluzând producția de anticorpi. Chiar dacă malignitățile hematologice au prezentat cel mai mult interes în ceea ce privește mutațiile TET2, literatura conține și date privind prezența mutațiilor TET2 la nivelul altor malignități. Câteva exemple sunt în domeniul sarcoamelor, în special al condrosarcomului și în domeniul neurooncologiei, gliomul prezentând mutații la nivelul *TET2* în cazuri negative pentru mutațiile la nivelul *IDH1/2*, astfel considerându-se că mutațiile de la nivelul genei *TET2* pot genera efecte similare cu mutațiile de la nivelul *IDH1/2* și în cazul gliomului.

Studiu 1: Descrierea mutațiilor de la nivelul genei TET2

1. Introducere

TET2 este o dioxigenază dependentă de 2-oxoglutarat care transformă 5-metilcitozina (5mC) în 5-hidroxi-metil-citozină (5hmC) pornind procesul de demetilare. S-a

demonstrat că mutațiile din această genă induc imaturitatea liniei mieloide și cresc frecvența evenimentelor autoimune în modelele murine. Mai mult, mutațiile TET2 au fost observate cel mai frecvent în afecțiunile maligne mieloide și limfoamele cu celule T, dar pot fi prezente și în alte afecțiuni maligne. Datorită eterogenității pe care o prezintă mutațiile în TET2, în studiul curent, ne-am propus să descriem mai bine ce variante pot apărea în TET2 cu importanță în ceea ce privește înțelegerea mai bună a efectelor pe care aceste variante le au asupra activității TET2.

2. Metode

Am căutat datele disponibile privind mutațiile de la nivelul TET2 utilizând cBioPortal și evaluând mai multe afecțiuni maligne.

3. Rezultate

În studiul de față am observat că mutațiile missens și trunciante sunt cele mai frecvente tipuri de mutații de la nivelul TET2. În ceea ce privește mutațiile missens, am observat că aminoacizii de referință TET2 sunt mai frecvent acizi în partea inițială a enzimei și bazici în apropierea sfârșitului enzimei. Mai mult, variantele din TET2 au avut tendința de a fi mai frecvent bazice în partea din față a enzimei și acide în apropierea sfârșitului enzimei, astfel încât aceste mutații inducând o schimbare în localizarea sarcinii în enzimă. În plus, în cazul mutațiilor trunciante, am observat că există un vârf important în mutațiile nonsens între aminoacizii 500 și 1000, arătând că aminoacizii de legare ai TET2 sunt în general aboliți.

4. Concluzii

Astfel, în studiul curent am realizat o prezentare descriptivă a mutațiilor care pot apărea la nivelul TET2, aceasta reprezentând o bază pentru studii ulterioare necesare pentru a evalua impactul diferitelor mutații asupra activității TET2.

Studiu 2. Mutațiile de la nivelul genelor *TET2/IDH1/2/WT1* și *NPM1* influențează corelațiile dintre expresia *RUNX1* și profilul transcriptomic în leucemia acută mieloidă

1. Introducere

Analiza mutațională a condus la o mai bună înțelegere a biologiei leucemiei acute mieloide (LAM) și la o îmbunătățire a managementului clinic. Unele dintre cele

mai importante mutații care afectează biologia LAM sunt reprezentate de mutații ale genelor legate de metilare, mai precis: TET2, IDH1, IDH2 și WT1. Deoarece s-a demonstrat în numeroase studii că mutațiile acestor gene conduc la profiluri de expresie și fenotipuri similare în LAM, am decis să evaluăm dacă mutațiile din oricare dintre acele gene interacționează cu alte gene importante pentru LAM.

2. Materiale și metode

Am descărcat datele clinice, profilul mutațional și profilul de expresie din setul de date TCGA LAML prin cBioPortal. Datele au fost analizate folosind metode statistice clasice și software de analiză a căilor de semnalizare reprezentat utilizând STRING și Gorilla.

3. Rezultate

Primul pas pe care l-am făcut a fost să evaluăm cele 196 de cazuri de LAM care aveau un profil mutațional disponibil și să observăm mutațiile care s-au suprapus cu mutațiile TET2/IDH1/2/WT1. Am observat că mutațiile RUNX1 se suprapun semnificativ cu mutațiile TET2/IDH1/2/WT1. Din acest motiv, am decis să investigăm în continuare rolul mutațiilor RUNX1 în modularea nivelului de ARNm RUNX1 și am observat că cazurile mutante RUNX1 au prezentat niveluri mai mari de ARNm RUNX1. Deoarece au existat doar 16 cazuri de probe mutante RUNX1 și că mutațiile din această genă au determinat o schimbare a expresiei ARNm, am observat în continuare corelația dintre RUNX1 și alte ARNm în subgrupuri în ceea ce privește prezența mutațiilor hipermetilante și NPM1. Aici am observat că atât mutațiile TET2/IDH1/2/WT1, cât și NPM1 cresc numărul de gene corelate negativ cu RUNX1 și că aceste gene au fost legate semnificativ de activarea mieloidă.

4. Concluzii

În studiul actual am arătat că mutațiile NPM1 și TET2/IDH1/2/WT1 cresc numărul de corelații negative ale RUNX1 cu alți transcripți implicați în diferențierea mieloidă.

Studiu 3. Starea de diferențiere a blaștilor în leucemia acută mieloidă este afectată de mutațiile *DNMT3A R882* și *TET2/IDH1/2*, dar nu are impact asupra răspunsului la agenții hipometilanți

1. Introducere

Leucemia acută mieloidă (LAM) este o malignitate hematologică caracterizată prin proliferare clonală și diferențiere mieloidă alterată cu diferite puncte de oprire în maturarea mieloidă. Această boală a cunoscut o multitudine de încercări de clasificare, majoritatea centrelor mari din zilele noastre aplicând abordări bazate pe mutații specifice. Cu toate acestea, majoritatea mutațiilor care influențează metilarea ADN-ului nu sunt incluse în clasificarea OMS. Astfel, scopul prezentului studiu a fost de a determina dacă există o grupare neredundantă pe care LAM cu cariotip normal o poate lua în funcție de profilul transcriptomic, dacă aceste clusterse se asociază cu caracteristici mutaționale sau clinice și care ar fi impactul celor privind răspuns la agenții de hipometilanți (HMA).

2. Pacienți și metode

În studiul curent am inclus pacienți cu LAM din cohorta TCGA LAML și din centrul nostru – Ion Chiricuță Cluj Napoca (IOCN). Am evaluat caracteristicile transcriptomice, clinice și mutaționale ale cohortei TCGA LAML și am validat ipoteza pe cohorta IOCN.

3. Rezultate

În studiul actual am inclus 65 de pacienți din cohorta TCGA LAML care prezentau cariotip normal și aveau date transcriptomice și clinice disponibile. Pe acești pacienți am efectuat o grupare ierarhică bazată pe transcriptom, care a condus la formarea a două clusterse distinse. S-a demonstrat că genele dereglate între aceste grupuri sunt legate de maturarea mieloidă și diferențierea monocitelor. Mai mult, am observat o asociere între clustersele identificate și subtipurile franco-america-britanice (FAB). Pentru o mai bună evaluare a asocierii dintre FAB și profilul mutațional am reanalizat cohorta TCGA LAML, incluzând pacienți cu cariotip normal și FAB M1/2/4/5 care a avut și un profil mutațional disponibil, rezultând în includerea a 77 de pacienți. La acești pacienți am observat o asociere semnificativă între DNMT3A R882 și FAB M4/5 și între TET2/IDH1/2 și M1/2. În plus, am încercat să folosim o a doua cohortă locală pentru a genera o utilizare clinică pentru aceste rezultate. În cohorta IOCN am inclus un total de 32 de pacienți. Am observat că, în analiza univariată, a existat o tendință ca pacienții cu M4/5 FAB să prezinte o supraviețuire globală mai proastă în comparație cu pacienții care prezentau M1/2 FAB. Cu toate acestea, la ajustarea în funcție de vârstă, această tendință a fost pierdută.

4. Concluzii

Studiul actual arată că există o asociere între maturitatea LAM și mutațiile DNMT3A R882, TET2 și IDH1/2. Cu toate acestea, nu sa demonstrat că maturitatea LAM influențează supraviețuirea globală la pacienții cărora li s-a administrat HMA.

Studiu 4: Impactul modificatorilor epigenetici în progresia și răspunsul la terapie a leucemiei limfatiche cronice

1. Introducere

Unii din factorii care au un impact asupra metilării și asupra modificărilor posttranslaționale ale histonelor sunt reprezentați de modificatorii epigenetici. Alterările acestora atât la nivel de transcriptom, cât și la nivel de proteom pot duce la modificări ale metilării globale, ale modificărilor posttranslaționale ale histonelor și asupra conformației cromatinei. În această direcție, modificatorii epigenetici au fost arătați ca având un efect în alte malignități atât în ceea ce privește oncogeneza cât și progresia bolii. Mai mult, modificatorii epigenetici au fost arătați ca fiind potențiale ținte pentru diferiți agenți terapeutici, astfel având importanță nu numai în precizarea progresiei bolii, dar și pentru a stabili baza pentru viitoare abordări terapeutice.

2. Material și metodă

În studiul de față au fost incluși 11 pacienți care prezentau leucemie limfatică cronică (LLC) evaluați la 5 ani distanță (5 care au rămas staționari conform stadializării Binet (acești pacienți au rămas la stadiul Binet A) și 6 care au progresat de la stadiul Binet A la stadiul Binet B/C). Celulele maligne provenite de la acești pacienți au fost analizate utilizând spectrometria de masă pentru a determina diferențele în expresia proteomului. Pentru a valida aceste diferențe, am utilizat cohorta DFCI, descărcată de pe cBioPortal și o cohortă locală de pacienți cu LLC.

3. Rezultate

Analiza a implicat doar proteinele reprezentate de modificatori epigenetici conform dbEM (167 proteine distincte căutate). Proteinele care au prezentat diferențe statistice între condiții și care au prezentat un fold change absolut > 1.5. Considerând că genele implicate în progresie au potențialul de a fi de asemenea prezente la nivelul căilor de semnalizare implicate în răspunsul la terapie, am dorit să validăm rezultatele obținute anterior pe cohorta DFCI (103 subiecți). Astfel, am decelat 3 gene exprimate diferit între pacienții comparați. Dintre acestea, *UCL5* a fost singura genă care a prezentat același trend al modificării expresiei ca și în cazul evaluării proteomice. Cu toate acestea, trebuie menționat faptul că *KDM4B* a prezentat o abundență mai mare în cazul pacienților care au progresat atât în prima probă, cât și în a doua probă în

cazul evaluării proteomice. Cu toate acestea, în evaluarea *KDM4B* în cazul cohorței DFCI, am observat creșterea acestui transcript în cazul pacienților netratați comparativ cu pacienții tratați anterior. În cazul *SMARCA1*, și aceasta a prezentat o expresie mai mare în cazul pacienților netratați comparativ cu pacienții tratați anterior, posibil fiind importantă în cazul LLC a pacienților care nu progresează.

4. Concluzii

În concluzie, *UCL5* ar putea reprezenta un marker important care să arate atât progresia bolii cât și răspunsul la terapie.

Abstract of PhD Thesis

The importance of epigenetic modifiers in hematology

PhD student **Sergiu Pașca**

PhD coordinator Prof.dr. **Mihnea Zdrengea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	17
1. <i>Alterations that can be considered equivalent to TET2 mutations</i>	19
1.1 Genetic mutations that mimic TET2 mutations	20
1.2 Interactions in mutant cells between TET2/IDH1/2/WT1	22
1.3 Other equivalents of TET2	23
1.4 Perspectives	27
2. <i>Epigenetic modifiers in immunology</i>	29
2.1 Introduction	29
2.2 The effects of TET2 mutations on T-lymphocytes	31
2.3 The role of TET2 alterations considering the effect of macrophages on T-lymphocytes	33
2.4 TET2 functions in non-immune cells	34
PERSONAL CONTRIBUTION	37
1. <i>Work hypothesis</i>	39
2. <i>General methods</i>	41
3. <i>Study 1: Description of TET2 mutations</i>	43
3.1. Introduction	43
3.2. Work hypothesis	43
3.3. Material and Method	43
3.4. Results	44
3.5. Discussions	51
3.6. Conclusions	52
4. <i>Study 2. TET2/IDH1/2/WT1 and NPM1 mutations influence the correlation between RUNX1 expression and the transcriptomic profile in acute myeloid leukemia</i>	53
4.1. Introduction	53
4.2. Work hypothesis	54
4.3. Material and Method	54
4.4. Results	54
4.5. Discussions	65
4.6. Conclusions	67
5. <i>Study 3. The state of blast differentiation in acute myeloid leukemia is affected by DNMT3A R882 and TET2/IDH1/2 mutations, but it does not have an impact on hypomethylating agent response</i>	69
5.1. Introduction	69
5.2. Work hypothesis	70
5.3. Material and Method	70
5.4. Results	71
5.5. Discussions	79
5.6. Conclusions	81
6. <i>Study 4: The impact of epigenetic modifiers in the progression and therapy response of chronic lymphocytic leukemia</i>	83
6.1. Introduction	83
6.2. Work hypothesis	84
6.3. Material and Method	84
6.4. Results	85

6.5. Discussions	92
6.6. Conclusions	93
7. <i>General discussions</i>	95
8. <i>General conclusions</i>	97
9. <i>Originality and inovative contribution of the thesis</i>	99
REFERENCES	101

Key words: epigenetic modifiers, hematologic malignancies, acute myeloid leukemia, chronic lymphocytic leukemia, mutations

Introduction

The importance of epigenetic modifiers has been observed in numerous studies in hematology and related fields. Thus, mutations in TET2 / IDH1 / 2 / WT1 have been studied extensively, especially in acute myeloid leukemia (AML). It has been shown that, in the case of AML, these mutations are present in a mutually exclusive manner between them. This is most likely due to the similar effect that these mutations induce in AML. Specifically, the main effect of these mutations is to reduce TET2 function. This decrease plays an important role in the transformation of methyl-cytosine into hydroxymethyl-cytosine in the DNA, thus starting the demethylation process with the formation of formyl-cytosine and carboxy-cytosine intermediates. Thus, mutations in the TET2 gene that cause the generation of truncated forms, change the conformation or affect the active center of the enzyme, will reduce the demethylation process with the generation of global hypermethylation and affect the transcription of various genes involved in AML. Mutations in IDH1 (R132) and IDH2 (R140 and R172) have a similar effect on each other, namely the formation of an oncometabolite represented by 2-hydroxy-glutarate. It competes with α -keto-glutarate, which normally occupies the active site of the TET2 enzyme, thus leading to competitive inhibition and reduced TET2 activity. Another gene that has been shown to have an effect on TET2 enzyme activity is WT1. Due to the fact that WT1 normally mediates the interaction between TET2 and DNA, mutations in WT1 reduce this interaction, reducing the effect of the TET2 enzyme. Mutations in the WT1 gene are, as in the case of TET2, heterogeneous and generally lead to a decrease in WT1 function either directly by generating inactive forms of WT1 or indirectly by degrading WT1 mRNA.

For these reasons, mutations in TET2 / IDH1 / 2 / WT1 and epigenetic modifiers in general require further study to provide a better understanding of them both biologically and clinically.

Current state of knowledge

TET2 is a Fe²⁺ and α -keto glutarate-dependent dioxygenase. It oxidizes 5mC to 5hmC. Further, 5hmC can be oxidized producing 5fC and then 5caC. As a mechanism for the regeneration of demethylated cytosine, 5caC can be excised and replaced with a demethylated cytosine. This mechanism provides not only a way to modulate methylation, but also a 5hmC generation mechanism. It has been shown that the latter play not only an intermediary role in demethylation, but also a signaling role, being recognized by epigenetic readers, leading to subsequent changes in the transcriptome. This mark (5hmC) has been observed to be altered in several processes, including aging, oncogenesis, and cell differentiation. Also, in addition to the effect that TET2 has on 5mC of DNA, it has been observed that this enzyme is also involved in the oxidation of 5mC of RNA, providing an additional mechanism by which TET2 affects the DNA profile. expression.

It has been shown that TET2 is also involved in the development of certain diseases. In this direction, it has been shown that a murine model in which TET2 activity has been inhibited frequently develops myeloid line malignancies. Moreover, various neoplasms (lung, prostate, pancreatic, liver and breast cancers) are associated with a reduction in TET2 activity and the presence of the 5hmC mark on DNA. Added to this, TET2 is also important in the development of AITL, being one of the first mutations to occur in this disease. Interestingly, changes in TET2 levels also lead to instability of FOXP3, leading to a significant trend of autoimmunity in murine models. It should be noted that AITL is generally associated with autoimmune events, especially autoimmune haemolytic anemia. The association of AITL with autoimmune events is also consistent with the fact that the cell from which AITL develops is the follicular helper T cell, which is involved in stimulating activities in the immune system, including the production of antibodies. Although haematological malignancies have shown the greatest interest in TET2 mutations, the literature also contains data on the presence of TET2 mutations in other malignancies. Some examples are in the field of sarcomas, especially chondrosarcoma and in the field of neurooncology, glioma showing mutations in TET2 in negative cases for mutations in IDH1 / 2, thus considering that mutations in the TET2 gene can have similar effects to mutations from IDH1 / 2 and in the case of glioma. Because TET2 is at the center of a multitude of epigenetic changes, the scientific community has shown great interest in this enzyme.

Personal contribution

Study 1: A description of the mutations occurring in *TET2*

1. Introduction

TET2 is a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase which transforms 5-methylcytosine (5mC) to 5-hydroxy-methyl-cytosine (5hmC) starting the demethylation process. Mutations in this gene has been shown to induce myeloid lineage immaturity and increase the frequency of autoimmune events in murine models. Moreover, mutations of TET2 have been observed most frequently in myeloid malignancies and T-cell lymphomas, but can also be present in other malignancies. Because of the heterogeneity that mutations in TET2 present, in the current study, we have aimed to better describe what variants can appear in TET2 with importance regarding the better understanding of the effects that these variants have on TET2 activity.

2. Methods

We searched the available TET2 mutation data via cBioPortal across multiple malignancies.

3. Results

In the present study we have observed that missense and truncating mutations are the most frequent types of mutations in TET2. Regarding the missense mutations we have observed that reference TET2 amino acids are more frequently acidic in the front of the enzyme and basic near the end of the enzyme. Moreover, the variants in TET2 tended to be more frequently basic in the front of the enzyme and acidic near the end of the enzyme, thus these mutations inducing a change in charge localization across the enzyme. Additionally, in the case of truncating mutations, we have observed that there is an important peak in nonsense mutations between amino acid 500 and 1000, showing that the binding amino acids of TET2 are generally abolished completely.

4. Conclusions

Thus, in the current article we presented a descriptive overview of TET2 mutations, this representing a basis for further studies needed to evaluate the impact of various mutations on TET2 activity.

Study 2. *TET2/IDH1/2/WT1* and *NPM1* mutations influence the *RUNX1* expression correlations in acute myeloid leukemia

1. Introduction

Mutational analysis has led to a better understanding of acute myeloid leukemia (AML) biology and to an improvement in clinical management. Some of the most important mutations that affect AML biology are represented by mutations in genes related to methylation, more specifically: *TET2*, *IDH1*, *IDH2* and *WT1*. Because it has been shown in numerous studies that mutations in these genes lead to similar expression profiles and phenotypes in AML we decided to assess if mutations in any of those genes interact with other genes important for AML.

2. Materials and Methods

We downloaded the clinical data, mutational profile and expression profile from the TCGA LAML dataset via cBioPortal. Data was analyzed using classical statistical methods and functional enrichment analysis software represented by STRING and GOrilla.

3. Results

The first step we took was to assess the 196 AML cases that had mutational profile available and observe the mutations that overlapped with *TET2/IDH1/2/WT1* mutations. We observed that *RUNX1* mutations significantly overlap with *TET2/IDH1/2/WT1* mutations. Because of this we decided to further investigate the role of *RUNX1* mutations in modulating the level of *RUNX1* mRNA and observed that *RUNX1* mutant cases presented higher levels of *RUNX1* mRNA. Because there were only 16 cases of *RUNX1* mutant samples and that mutations in this gene determined a change in mRNA expression we further observed the correlation between *RUNX1* and other mRNAs in subgroups regarding the presence of hypermethylating mutations and *NPM1*. Here we observed that both *TET2/IDH1/2/WT1* and *NPM1* mutations increase the number of genes negatively correlated with *RUNX1* and that these genes were significantly linked to myeloid activation.

4. Conclusions

In the current study we have shown that *NPM1* and *TET2/IDH1/2/WT1* mutations increase the number of negative correlations of *RUNX1* with other transcripts involved in myeloid differentiation.

Study 3. Blast Cell Differentiation Status in Acute Myeloid Leukemia is Impacted by DNMT3A R882 and

TET2/IDH1/2 Mutations, but Does Not Impact Response to Hypomethylating Agents

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a hematologic malignancy characterized by clonal proliferation and altered myeloid differentiation with varying stop points in myeloid maturation. This disease has seen a myriad of classification attempts, with most large centers nowadays applying an approach based on the mutational landscape. Nonetheless, most mutations that influence DNA methylation are not included in the WHO classification. Thus, the aim of the current study was to determine if there is a non-redundant clustering that normal karyotype AML can take according to the transcriptomic profile, if these clusters associate with mutational or clinical features and what would be the impact of those regarding the response to hypomethylating agents (HMA).

2. Patients and Methods

In the current study we included AML patients from the TCGA LAML cohort and from our center – Ion Chiricuta Cancer Center in Cluj Napoca (IOCN). We assessed the transcriptomic, clinical, and mutational characteristics of the TCGA LAML cohort and validated the hypothesis on the IOCN cohort.

3. Results

In the current study we included 65 patients from the TCGA LAML cohort that presented normal karyotype and had transcriptomic and clinical data available. On these patients we performed a transcriptomic-based hierarchical clustering leading to the formation of two distinguishable clusters. The genes deregulated between these clusters were shown to be linked to myeloid maturation and monocyte differentiation. Moreover, we observed an association between the discerned clusters and French-American-British (FAB) subtypes. For a better assessment of the association between FAB and the mutational profile we reanalyzed the TCGA LAML cohort, including patients with normal karyotype and FAB M1/2/4/5 that also had available mutational profile and that presented FAB M1/2/4/5 resulting in the inclusion of 77 patients. On these patients we observed a significant association between DNMT3A R882 and FAB M4/5 and between TET2/IDH1/2 and M1/2. Additionally, we attempted to use a second local cohort to generate a clinical use for these results. In the IOCN cohort we included a total of 32 patients. We observed that, in the univariate analysis, there was a tendency for patients with M4/5 FAB to present a worse overall survival compared

to patients presenting M1/2 FAB. Nonetheless, when adjusting for age, this tendency was lost.

4. Conclusions

The current study shows that there is an association between AML maturity and DNMT3A R882, TET2 and IDH1/2 mutations and transcriptomics. Nonetheless, AML maturity was not shown to influence overall survival in patients receiving HMA.

Study 4: The impact of epigenetic modifiers in the progression and therapy response of chronic lymphocytic leukemia

1. Introduction

Some of the factors that have an impact on methylation and posttranslational changes in histones are epigenetic modifiers. Alterations in both transcriptome and proteome levels can lead to changes in overall methylation, posttranslational changes in histones, and chromatin conformation. In this direction, epigenetic modifiers have been shown to have an effect on other malignancies in both oncogenesis and disease progression. Moreover, epigenetic modifiers have been shown to be potential targets for various therapeutic agents, thus being important not only in predicting disease progression but also in establishing the basis for future therapeutic approaches.

2. Material and method

The present study included 11 patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) evaluated at 5 years of age (5 who remained stationary according to Binet staging (these patients remained at Binet A stage) and 6 who progressed from Binet stage A at the Binet stage B / C). Malignant cells from these patients were analyzed using mass spectrometry to determine differences in proteome expression. To validate these differences, we used the DFCI cohort, downloaded from cBioPortal and a local cohort of patients with CLL.

3. Results

The analysis involved only proteins represented by epigenetic modifiers according to dbEM (167 distinct proteins found in this study). We retained only proteins that showed statistical differences between conditions and that had an absolute fold change > 1.5. Considering that the genes involved in progression have the potential to also be present in the signaling pathways involved in the response to therapy, we wanted to validate the results obtained previously on the DFCI cohort (103 subjects). Thus, we detected 3 genes expressed differently between the

compared patients. Of these, UCHL5 was the only gene that showed the same trend in expression change as in proteomic evaluation. However, it should be noted that KDM4B was more abundant in patients who progressed in both the first and second trials in the proteomic assessment. However, in the evaluation of KDM4B in the DFCI cohort, we observed an increase in this transcript in untreated patients compared to previously treated patients. In the case of SMARCA1, this also showed a higher expression in the case of untreated patients compared to previously treated patients, possibly being important in the case of CLL in patients who do not progress.

4. Conclusions

In conclusion, UCHL5 could be an important marker that shows both the progression of the disease and the response to therapy.