

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL VI – CARDIOLOGIE

LIGHEZAN DIANA LUISA



TEZĂ DE DOCTORAT

CORELAȚII CLINICO-GENETICE ȘI BIOLOGICE
ÎN PATOGENEZA MIELOPROLIFERĂRILOR CRONICE

REZUMAT

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. PETRESCU LUCIAN

Timișoara
2021

CUPRINS

Lista lucrărilor publicate	VII
Lista abrevierilor.....	VIII
Indexul figurilor.....	IX
Indexul tabelelor.....	X
Dedicatie	XII
Mulțumiri	XIII
INTRODUCERE.....	XV
PARTEA GENERALĂ – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	1
1. Neoplasmele mieloidे.....	1
2. Neoplasmele mieloproliferative	5
2.1. Generalități.....	5
2.2. Leucemia mieloidă cronică	5
2.2.1. Definiție și generalități	5
2.2.2. Caracteristici clinice.....	6
2.2.3. Caracteristici paraclinice.....	7
2.2.3.1. Faza cronică	7
2.2.3.2. Faza accelerată	8
2.2.3.3. Faza blastică	8
2.2.4. Tratament și prognostic	8
2.3. Policitemia vera.....	9
2.3.1. Definiție și generalități	9
2.3.2. Caracteristici clinice.....	10
2.3.3. Caracteristici paraclinice.....	11
2.3.4. Tratament și prognostic	11
2.4. Mielofibroza primară.....	12
2.4.1. Definiție și generalități	12
2.4.2. Caracteristici clinice.....	13
2.4.3. Caracteristici paraclinice.....	14
2.4.4. Tratament și prognostic	15
2.5. Trombocitemia esențială	16
2.5.1. Definiție și generalități	16
2.5.2. Caracteristici clinice.....	16
2.5.3. Caracteristici paraclinice.....	17

2.5.4. Tratament și prognostic	18
3. Genetica neoplasmelor mieloproliferative.....	20
3.1. Mutații somatice	21
3.1.1. Mutațiile <i>BCR-ABL</i> , <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> și <i>CALR</i>	21
3.1.1.1. Mutațiile <i>BCR-ABL</i>	21
3.1.1.2. Mutațiile <i>JAK2</i>	22
3.1.1.3. Mutațiile <i>MPL</i>	24
3.1.1.4. Mutațiile <i>CALR</i>	25
3.1.2. Alte mutații somatice	27
3.2. Variante genetice constituționale.....	29
3.2.1. Haplotipul <i>JAK2</i>	30
3.2.2. Alte variante genetice constituționale	31
PARTEA SPECIALĂ – CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	32
1. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	32
2. Studiul 1 - Analiza polimorfismului <i>SH2B3</i> rs3184504 ca factor de risc în neoplasmele mieloproliferative.....	35
2.1. Ipoteza de lucru/obiective.....	35
2.2. Material și metodă.....	36
2.2.1. Pacienți și lotul control.....	36
2.2.1.1. Criterii de includere.....	36
2.2.1.2. Criterii de excludere.....	36
2.2.2. Metode de genotipare a mutațiilor	39
2.2.2.1. Extracția ADN-ului genomic.....	39
2.2.2.2. Genotiparea pentru mutația somatică <i>JAK2</i> V617F	39
2.2.2.2.1. Metoda calitativă: Tehnica PCR tetra-primer.....	40
2.2.2.2.2. Metoda cantitativă: Tehnica Real time PCR cantitativ (qPCR)	42
2.2.2.3. Mutația somatică <i>CALR</i>	45
2.2.2.4. Mutația somatică <i>BCR-ABL</i>	46
2.2.2.4.1. Metoda calitativă de diagnostic: Tehnica nested PCR pentru detecția mutației somatice <i>BCR-ABL</i>	47
2.2.2.4.2. Metoda cantitativă: Tehnica real-time PCR pentru detecția și cuantificarea mutației somatice <i>BCR-ABL</i>	49
2.2.2.5. Genotiparea pentru polimorfismul <i>SH2B3</i> rs3184504	50
2.2.3. Analiza statistică.....	52
2.3. Rezultate.....	53
2.3.1. Corelații între genotipurile și alelele <i>SH2B3</i> rs3184504 și fenotipurile NMP.....	53
2.3.2. Corelații între genotipurile și alelele <i>SH2B3</i> rs3184504 și subtipurile moleculare NMP	55

2.3.3. Corelații între polimorfismul <i>SH2B3</i> rs3184504 și diverse caracteristici hematologice și clinice ale pacienților cu NMP	55
2.4. Discuții și concluzii	57
3. Studiul 2 - Analiza polimorfismului <i>TET2</i> rs1548483 ca factor de risc în neoplasmele mieloproliferative. Relația dintre polimorfismul <i>TET2</i> rs1548483 și variante genetice constituționale respectiv somatice	61
3.1. Ipoteza de lucru/obiective	61
3.2. Material și metodă	63
3.2.1. Pacienți și lotul control	63
3.2.2. Metode de genotipare a mutațiilor	64
3.2.2.1. Extracția ADN-ului genomic	64
3.2.2.2. Genotiparea pentru mutația somatică <i>JAK2</i> V617F	65
3.2.2.3. Mutația somatică <i>CALR</i>	65
3.2.2.4. Mutația somatică <i>BCR-ABL</i>	65
3.2.2.5. Genotiparea pentru polimorfismul <i>TET2</i> rs1548483	66
3.2.3. Analiza statistică	67
3.3. Rezultate	68
3.3.1. Descrierea subtipurilor de NMP studiate	68
3.3.2. Asocierea între SNP <i>TET2</i> rs1548483 și fenotipurile NMP — Modelul alelic	69
3.3.3. Asocierea între <i>TET2</i> rs1548483 și fenotipurile NMP — Modele genotipice	71
3.3.4. Asocierea între <i>TET2</i> rs1548483 SNP și subtipurile moleculare NMP — Modele genotipice	73
3.3.4.1. Mutația <i>JAK2</i> V617F	73
3.3.4.2. Mutațiile <i>CALR</i>	75
3.3.5. Interacțiunile epistatice ale SNPs-urilor evaluate, stratificate după subtipuri de NMP	77
3.4. Discuții și concluzii	82
4. DISCUȚII GENERALE	87
CONCLUZII	91
BIBLIOGRAFIE	95
ANEXE	I

PARTEA GENERALĂ

Conform clasificării OMS (Organizația mondială a sănătății), termenul de *neoplasm mieloid* acoperă modificările clonale ale tuturor liniilor celulare mieloid, cuprinzând astfel 8 entități mieloid distincte în ultima clasificare, revizuită din 2016. Din subcategoria neoplasmelor mieloid cronice, fac parte NMP, care includ cele trei subcategorii majore ("clasice") de neoplasme *BCR-ABL* negative - policitemia vera (PV), trombocitemia esențială (TE), mielofibroza primară (MFP), alături de leucemia mieloidă cronică (LMC) și alte 3 subcategorii mieloid (leucemia cronică cu neutrofile, leucemia cronică cu eozinofilie, nespecificată și neoplasmele mieloproliferative, nespecificate).

În cazul neoplasmelor *BCR-ABL* negative, noua clasificare OMS a stipulat prezența uneia dintre cele 3 mutații-driver cunoscute, ca un criteriu major de diagnostic pentru PV (*JAK2* V617F și exon 12), TE și MFP (*JAK2* V617F, *CALR*, *MPL*).

Pe lângă dezvoltarea acestor mutații somatice, tehnicile moderne de secvențiere a genomului uman au permis analiza detaliată a variantelor genetice constituționale, în special celor de "tip single nucleotide polymorphisms" (SNP), care conferă un risc moștenit de dezvoltare a unui NMP.

PARTEA SPECIALĂ

1. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE

În esență, NMP sunt patologii provocate de proliferarea clonală a progenitorilor mieloidi iar promotoarele acestei supraproducții de celule mieloid sunt mutațiile somatice dobândite și anume mutațiile *JAK2*, *CALR* și *MPL*. Acestea însă, nu pot explica îndeajuns diversitatea fenotipică a acestor afecțiuni.

Astfel, descrierea extensivă a mutațiilor driver din ultimii ani nu a putut identifica concret factorii care duc la expresia fenotipică atât de heterogenă a NMP. Până în momentul actual, nu se cunoaște explicația la întrebarea de ce o parte din pacienții cu mutația somatică *JAK2* V617F dezvoltă un NMP de tip PV, pe când alții dezvoltă TE. Această observație subliniază posibilitatea unei variații genetice constituționale a acestor indivizi, care ar putea explica diversitatea expresiei fenotipice.

Prin partea experimentală a acestei teze de doctorat am încercat să evaluez rolul unor factori genetici constituționali, moșteniți, asupra NMP.

Obiectivele cercetării au fost următoarele:

1. Caracterizarea mutațiilor somatice de tip driver (*JAK2*, *CALR* și *MPL*) la nivelul unei cohorte reprezentative de pacienți cu NMP
2. Definirea contribuției polimorfismului genei *SH2B3* (studiul 1), respectiv al polimorfismului genei *TET2* (studiul 2) la apariția diferitelor fenotipuri ale NMP.
3. Definirea contribuției polimorfismului genei *SH2B3* (studiul 1), respectiv al polimorfismului genei *TET2* (studiul 2) la apariția diverselor mutații somatice driver specifice NMP.
4. Evaluarea interacțiunilor dintre polimorfismul *SH2B3* și alte variante genetice constituționale precum *JAK2* rs10974944, *TERT* rs2736100, *MECOM* rs2201862, *HBS1L-MYB* rs9376092 și *THRB-RARB* rs4858647 în apariția diverselor fenotipuri ale pacienților cu NMP.
5. Stabilirea unei corelații între statusul genetic constituțional și tabloul biologic și clinic la un subgrup de pacienți incluși în studiu.

2. Studiul 1. ANALIZA POLIMORFISMULUI *SH2B3* rs3184504 CA FACTOR DE RISC ÎN NEOPLASMELE MIELOPROLIFERATIVE.

2.1. IPOTEZA DE LUCRU/OBIECTIVE

Gena *SH2B3* codifică proteina LNK, care provoacă o dereglare a căii JAK-STAT și produce o proliferare a elementelor mieloide, caracteristică NMP-urilor (84, 85).

Scopul acestui studiu a fost acela de a determina dacă există o asocieră între polimorfismul *SH2B3* rs3184504 și potențialul sporit de dobândire a mutațiilor somatice driver asociate NMP și respectiv dezvoltarea/expresia fenotipică a unuia dintre cele patru NMP majore - PV, TE, MFP și LMC.

2.2. MATERIAL ȘI METODĂ

2.2.1. PACIENȚI ȘI LOTUL CONTROL

Prezentul studiu a inclus un grup de 1901 de pacienți cu diverse NMP și un grup control, alcătuit din 359 de persoane fără neoplazii hematologice. Dintre cei 1901 pacienți ai grupului, un număr de 575 de pacienți au prezentat PV, 798 pacienți au prezentat TE, 251 de pacienți MFP și 277 de pacienți LMC. De menționat faptul că au fost incluși în studiu numai pacienții care au prezentat o mutație driver care a putut fi dovedită molecular (mutație *JAK2* V617F, *CALR* sau *BCR-ABL1*). Pacienții cu TE și MFP care prezentau mutații MPL nu au fost incluși în prezentul studiu, din cauza numărului lor foarte redus.

2.2.2. METODE DE GENOTIPARE A MUTAȚIILOR

În cazul tuturor participanților la studiu, ADN-ul genomic a fost extras din leucocite din sângele periferic, utilizând diverse kit-uri comerciale (Wizard Genomic DNA Purification kit, Promega, Madison, WI, USA; Quick gDNA MiniPrep kit, Zymo Research, Irvine, CA, USA; PureLink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), conform instrucțiunilor producătorului.

Pentru genotiparea mutației somatice *JAK2* V617F a fost folosită metoda PCR tetra-primer, respectiv o metodă real-time PCR; pentru mutațiile somatice *CALR* (mutațiile de tip 1 și tip 2, care reprezintă peste 90% din mutațiile *CALR*, dar și altele mai rare), am folosit un test simplex PCR.

Pentru mutația somatică *BCR-ABL* au fost utilizate două tehnici distincte: metoda calitativă, prin tehnica de nested PCR, folosită pentru depistarea mutației și metoda cantitativă, prin tehnica de real-time PCR, utilizată atât pentru detecția cât și pentru cuantificarea mutației somatice de *BCR-ABL1*.

Pentru genotiparea polimorfismului *SH2B3* rs3184504 a fost utilizat un kit (TaqMan SNP assay) care conține atât sonda Taqman (C__2981072_10), cât și primerii necesari pentru reacție (Applied Biosystems, Thermo Fisher, SUA). Pentru genotipare, probele au fost analizate cu ajutorul unor sisteme real-time PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher, SUA).

2.3. REZULTATE

2.3.1. CORELAȚII ÎNTRE GENOTIPURILE ȘI ALELELE *SH2B3* rs3184504 ȘI FENOTIPURILE NMP

Am început prin a analiza relația dintre genotipurile și alelele *SH2B3* rs3184504 și cele patru fenotipuri clasice de NMP incluse în studiu, și anume PV, TE, MFP și LMC.

În ceea ce privește genotipurile polimorfismului rs3184504 au fost analizate atât modelele genetice dominante, cât și cele recesive, însă numai modelul recesiv a atins rezultate semnificative statistice. Genotipul homozigot TT (TT versus genotipurile CT+ CC) a fost asociat semnificativ cu PV (OR = 1,54; 95% CI = 1,14-2,06; valoarea brută p = 0,004; valoarea p ajustată = 0,024) și cu MFP (OR = 1,50; 95% CI = 1,04-2,12; valoarea

brută = 0,02; valoarea p ajustată = 0,04). De asemenea, genotipul homozigot TT a atins semnificație statistică și la analiza întregii cohorte de NMP-uri *BCR-ABL1*-negative (OR = 1,34; 95% CI = 1,03-1,74; valoare brută p = 0,02; valoare p ajustată = 0,04).

În ceea ce privește fenotipurile TE și LMC, nu a existat nicio corelație. La analiza modelului alelic și fenotipurile NMP, alela T a arătat o asociere aproape semnificativă, depășind ușor pragul impus, doar în cazul PV (OR = 1,19; 95% CI = 1-1,44; valoarea brută p = 0,06; valoarea p ajustată = 0,24), în timp ce pentru toate celelalte comparații nu am atins pragul de semnificație statistică.

De asemenea, am analizat și modelul dominant (CT + TT versus genotipul CC), dar în acest caz niciuna dintre comparațiile efectuate nu a prezentat rezultate semnificative din punct de vedere statistic.

2.3.2. CORELAȚII ÎNTRE GENOTIPURILE ȘI ALELELE *SH2B3* rs3184504 ȘI SUBTIPURILE MOLECULARE NMP

A fost analizată relația dintre genotipurile și alelele *SH2B3* rs3184504 și subtipurile moleculare ale pacienților cu NMP incluși în studiu. Doar modelul recesiv a avut rezultate semnificative statistic. De menționat că toți pacienții cu PV aveau mutație *JAK2* V617F, astfel au fost obținute valori identice pentru genotipul TT ca și în cazul corelației cu fenotipul PV (OR = 1,54; 95% CI = 1,14-2,06; valoarea p brută = 0,004; valoarea p ajustată = 0,024). Genotipul TT a fost, de asemenea, asociat cu MFP *JAK2* V617F-pozitivă, deși după ajustare nu a mai fost atins pragul semnificativ statistic (OR = 1,57; 95% CI = 1,04-2,33; valoarea p brută = 0,03; valoarea p ajustată = 0,08). Rezultate similare pentru genotipul TT ca și în cazul MFP *JAK2* V617F pozitive au fost obținute și la analiza întregii cohorte de pacienți cu NMP *JAK2* V617F pozitivi (OR = 1,36; CI 95% = 1,04-1,77; valoarea p brută = 0,02; valoarea p ajustată = 0,08). Cu toate acestea, genotipul TT nu a fost asociat cu TE sau MFP *CALR* pozitivă, TE *JAK2* V617F pozitivă sau LMC. Din nou, modelul alelic a generat rezultate nesemnificative, cu excepția PV (unde toți pacienții au fost *JAK2* V617F-pozitivi), în care alela T a prezentat o asociere aproape semnificativă (OR = 1,19; 95% CI = 1-1,44; valoarea p brută = 0,06; valoarea p ajustată = 0,24). De asemenea, am analizat modelul dominant (CT + TT versus genotipul CC), dar în acest caz niciuna dintre comparațiile efectuate nu a generat rezultate semnificative.

2.3.3. CORELAȚII ÎNTRE POLIMORFISMUL *SH2B3* rs3184504 ȘI DIVERSE CARACTERISTICI HEMATOLOGICE ȘI CLINICE ALE PACIENȚILOR CU NMP

Am evaluat corelația dintre *SH2B3* rs3184504 și parametrii hematologici ai pacienților cu NMP (hemoglobină, hematocrit, număr de leucocite, trombocite). Numărul de leucocite a avut valori mai mari la pacienții cu genotip TT homozigot. Totuși, acest lucru a fost observat doar la PV (mediană $12,95 \times 10^6 / L$ la pacienții cu genotip TT versus $11,45 \times 10^6 / L$ la pacienții cu genotipuri CT + CC, valoarea p a testului Mann-Whitney = 0,03). Toate celelalte comparații au generat rezultate nesemnificative statistic (valoarea p > 0,05).

Informațiile clinice complete privind apariția trombozei majore au fost disponibile la 375 de pacienți cu TE și 273 de pacienți cu PV. Au fost 97 de pacienți cu TE (25,9%) și 108 pacienți cu PV (39,5%), care au prezentat tromboză majoră la diagnostic. Am considerat următoarele evenimente drept tromboze majore: accident vascular cerebral / atac ischemic tranzitor, boală coronariană acută, ischemie acută a membrelor, infarct splenic și infarct mezenteric, tromboză venoasă profundă, tromboză splanchnică și tromboză venoasă a sinusului cerebral. Nu a existat nicio corelație între genotipurile și alelele *SH2B3* rs3184504 și apariția trombozei majore.

2.4. DISCUȚII ȘI CONCLUZII

Prezentul studiu a demonstrat o asociere semnificativă statistic între genotipul homozigot TT al *SH2B3* rs3184504 și NMP *JAK2* V617F-pozitive, dar nu și cu NMP *CALR*-pozitive. Astfel, am confirmat, cu ajutorul unei cohorte mari de pacienți NMP, contribuția *SH2B3* rs3184504 la apariția NMP *JAK2* V617F-pozitiv, plasându-l împreună cu alte polimorfisme care definesc predispoziția genetică la NMP, precum haplotipul *JAK2* 46/1, *TERT* rs2736100 sau *MECOM* rs2201862.

3. Studiul 2. ANALIZA POLIMORFISMULUI *TET2* rs1548483 CA FACTOR DE RISC ÎN NEOPLASMELE MIELOPROLIFERATIVE. RELAȚIA DINTRE POLIMORFISMUL *TET2* rs1548483 ȘI VARIANTE GENETICE CONSTITUȚIONALE RESPECTIV SOMATICE.

3.1. IPOTEZA DE LUCRU/OBIECTIVE

Mutațiile somatice *TET2*, sunt evenimente frecvente în NMP și CHIP, iar variația genetică constituțională la locusul *TET2* pare să joace un rol în predispoziția la NMP. Pentru a aborda această problemă, am analizat un lot mare de pacienți cu NMP, cu scopul de a stabili care este contribuția suplimentară a SNP-ului *TET2* rs1548483 recent descris, la apariția NMP, a fenotipurilor acestora și a mutațiilor somatice asociate.

3.2. MATERIAL ȘI METODĂ

3.2.1. PACIENȚI ȘI LOTUL CONTROL

În acest studiu a fost inclus un număr de 1601 de pacienți diagnosticați cu NMP: 431 cu PV, 688 cu TE, 233 cu MFP și 249 cu LMC. În studiu au fost incluși numai pacienți cu o mutație driver dovedită molecular, *JAK2* V617F, *CALR* sau *BCR-ABL1*. Pacienții cu TE sau MFP cu mutații MPL au fost excluși din acest studiu, datorită numărului lor scăzut. Dintre cei 1601 de pacienți incluși, 939 de pacienți (454 de pacienți cu TE, 337 de pacienți cu PV și 148 de pacienți cu MFP) au fost cercetați în studii anterioare și pentru alte variante constituționale (*TERT* rs2736100, *MECOM* rs2201862, *HBS1L-MYB* rs9376092 și *THRB-RARB* rs4858647 și haplotipul *JAK2* 46/1). Un total de 884 de pacienți, și anume 427 cu TE, 316 cu PV și 139 MFP au fost genotipați cu succes pentru toate SNP-urile celor cinci gene menționate mai sus la care s-a adăugat genotiparea pentru *TET2* rs1548483. Studiul a inclus, de asemenea, 197 de persoane fără tumori hematologice asociate, care reprezintă grupul de control.

3.2.2. METODE DE GENOTIPARE A MUTAȚIILOR

Pentru extracția ADN-ului genomic și depistarea mutațiilor somatice *JAK2* V617F, *CALR* și *BCR-ABL1* am folosit aceleași metode ca și în primul studiu, descris mai sus. Pentru a putea analiza polimorfismul *TET2* rs1548483, s-a folosit un kit (TaqMan SNP assay) care conținea atât sonda Taqman (C__7512138_20), cât și primerii necesari pentru reacție (Applied Biosystems, Thermo Fisher, SUA). Probele au fost analizate cu ajutorul unor sisteme real-time PCR - Quant Studio 3 sau 7500 Fast Dx (Applied Biosystems, Thermo Fisher, SUA).

3.3. REZULTATE

3.3.1. DESCRIEREA SUBTIPURILOR DE NMP STUDIATE

Distribuția mutațiilor driver a fost următoarea: toți pacienții cu PV au fost pozitivi pentru *JAK2* V617F ($n_1 = 431$). În ceea ce privește grupul de pacienți cu TE, un număr de 525 (76,3%) au prezentat mutația *JAK2* V617F, iar 163 (23,7%) pacienți au avut mutații *CALR*. În cazul MFP, 151 de pacienți au fost pozitivi pentru mutația *JAK2* V617F (64,8%) și 82 (35,2%) pacienți au fost pozitivi pentru mutația *CALR*.

3.3.2. ASOCIEREA ÎNTRE SNP *TET2* rs1548483 ȘI FENOTIPURILE NMP — MODELUL ALELIC

Distribuția genotipului *TET2* SNP a fost în concordanță cu echilibrul Hardy-Weinberg, în populația de referință analizată (valoarea $p = 0,334$ pentru grupul de control).

Dintre grupurile de pacienți analizați, grupurile cu PV și MFP au arătat o creștere semnificativă a MAF comparativ cu lotul control (OR = 1,70; 95% CI: 1,01-2,91; valoarea $p =$

0,046 și respectiv OR = 2,02; 95% CI: 1,14-3,57; valoarea p = 0,015). Luând în considerare subtipurile moleculare, alela minoră *TET2* a fost asociată cu PV și MFP *JAK2* V617F pozitive (OR = 1,70; 95% CI: 1,01-2,91; valoarea p = 0,046 și respectiv OR = 2,04; 95% CI: 1,10-3,77 ; valoarea p = 0,024). Asocierea dintre alela minoră *TET2* și MFP-*CALR* pozitivă se află la pragul semnificației statistice (OR = 1,95; 95% CI: 0,95-4,02; valoarea p = 0,066), mai ales pe seama mutațiilor *CALR* tip 2 (OR = 2,98; 95% CI: 1,12-7,93; valoarea p = 0,035).

3.3.3. ASOCIEREA ÎNTRE *TET2* rs1548483 ȘI FENOTIPURILE NMP — MODELE GENOTIPICE

Genotipurile variante, care conțin cel puțin o alelă minoră ale SNP *TET2* s-au asociat semnificativ statistic cu un risc crescut de MFP în modelele codominante și supradominante testate (OR = 2,4; CI 95%: 1,3-4,43; valoarea p = 0,005; valoarea p corectată = 0,013 și respectiv OR = 2,41; CI 95%: 1,31-4,45; valoarea p = 0,005, valoarea p corectată = 0,0125). Genotipurile variante *TET2* au rămas ca factor de risc independent și după ajustarea în funcție de vârstă și sex (OR = 1,95, CI 95%: 1,02-3,73; valoarea p = 0,044 și OR = 1,96; CI 95%: 1,03-3,76; valoarea p = 0,041, respectiv). În plus, a existat o asociere pozitivă semnificativă între genotipurile variante SNP *TET2* și riscul de MFP în modelul dominant (OR = 2,26; CI 95%: 1,24-4,12; valoarea p = 0,008; valoarea p corectată = 0,0133) Această asociere se află la pragul semnificației statistice și după ajustarea pentru vârstă și sex (OR = 1,84; CI 95%: 0,97-3,47; valoarea p = 0,062).

3.3.4. ASOCIEREA ÎNTRE *TET2* rs1548483 SNP ȘI SUBTIPURILE MOLECULARE NMP — MODELE GENOTIPICE

3.3.4.1. Mutația *JAK2* V617F

Am observat asocierea pozitivă între genotipurile variante SNP *TET2* și MFP *JAK2* V617F-pozitivă în modelele codominante, dominante și supradominante testate (OR = 2,43; CI 95%: 1,26-4,69; valoarea p = 0,008; valoarea p corectată = 0,020; OR = 2,29; 95% CI: 1,2-4,37; valoarea p = 0,012; valoarea p corectată = 0,020 și OR = 2,44; 95% CI: 1,26-4,72; valoarea p = 0,008; valoarea p corectată = 0,020, respectiv). Această asociere a devenit mai slabă după ajustarea în funcție de vârstă și sex, limitând semnificația statistică, în acest caz, pentru toate cele trei modele (OR = 1,99; CI 95%: 0,98-4,07; valoarea p = 0,056; OR = 1,88; CI 95%: 0,94 –3,79; valoarea p = 0,076 și OR = 2,01; CI 95%: 0,99-4,01; valoarea p = 0,053, respectiv). De asemenea, în cazul PV *JAK2* V617F-pozitivă, s-a observat o asociere aproape semnificativă în modelul dominant (OR brut = 1,68; CI 95%: 0,95-2,96; valoarea p = 0,074). Cu toate acestea, această asociere nu a mai fost observată după ajustarea pentru vârstă și sex (valoarea p > 0,05).

3.3.4.2. Mutațiile *CALR*

Dintre modelele genotipice testate, rezultatele au evidențiat o asociere semnificativă pozitivă între genotipul variant al SNP *TET2* și riscul de MFP *CALR*-pozitivă în modele dominante și supradominante (OR = 2,18; CI 95%: 1,02-4,66; valoarea p = 0,045; valoarea p corectată = 0,075 și OR = 2,33; 95% CI: 1,08-5,03; valoarea p = 0,031; valoarea p corectată = 0,075). Totuși, această asociere nu s-a mai menținut semnificativă după ajustarea pentru vârstă și sex (valoarea p > 0,05). Apoi am explorat efectul posibil diferit al SNP *TET2* asupra celor două tipuri majore de mutații *CALR*, cea de tip 1 și respectiv cea de tip 2. În cazul mutațiilor *CALR* de tip 2, asocierea cu SNP *TET2* a fost semnificativă la pacienții cu MFP în modelele codominante, dominante și supradominante (OR = 3,75; CI 95%: 1,30-10,78; valoarea p = 0,014; valoarea p corectată = 0,030; respectiv OR = 3,53; CI 95%: 1,24-10,08; valoarea p = 0,018; valoarea p corectată = 0,030 și OR = 3,77; CI 95%: 1,31-10,84; valoarea p = 0,014; valoarea p corectată = 0,030). Dar și în acest caz, după ajustarea pentru vârstă și sex, asocierile nu mai erau semnificative statistic (valoarea p > 0,05).

3.3.5. INTERACȚIUNILE EPISTATICE ALE SNPs-URILOR EVALUATE, STRATIFICATE DUPĂ SUBTIPURI DE NMP

Pe lângă cele menționate anterior, am testat interacțiunea epistatică între *TET2* rs1548483 și alte SNP-uri genotipate anterior la pacienții cu PV, TE și MFP (*TERT* rs2736100, *MECOM* rs2201862, *HBS1L-MYB* rs9376092 și *THRB-RARB* rs4858647. Pe baza testului log-likelihood ratio (LRT), am identificat interacțiuni epistatice între *TET2* rs1548483 și *HBS1L-MYB* rs9376092 în PV (p interacțiune = 0,012 în modelul supradominant),

De asemenea, am identificat interacțiuni epistatice între *TET2* rs1548483 și *HBS1L-MYB* rs9376092 (p interacțiune = 0,014 și respectiv p interacțiune = 0,049 în modelul codominant și supradominant) și *JAK2* rs10974944, haplotipul *JAK2* 46/1 (p interacțiune = 0,037 în modelul recesiv) în TE.

3.4. DISCUȚII ȘI CONCLUZII

În prezentul studiu am observat o asociere semnificativă între *TET2* rs1548483 și fenotipurile NMP de PV și MFP. Mai mult decât atât, *TET2* rs1548483 se asociază semnificativ cu PV și MFP *JAK2* V617F-pozitivă și MFP *CALR* de tip 2 -pozitivă.

4. DISCUȚII GENERALE

În esență, neoplasmalele mieloide cronice sunt un grup de entități heterogene, de natură clonală care provin din proliferarea progenitorilor mieloizi. Aceste neoplasme au tendința de transformare leucemică sau de transformare fibrotică (119). Proliferarea clonală întâlnită în aceste boli hematologice este promovată de mutații somatice, dobândite de către pacienți, printre care se numără *JAK2* V617F, *CALR* și *MPL* în cazul NMP *BCR-ABL1*-negative. La fel, și mutația *BCR-ABL1*, în cadrul LMC. Aceste mutații sunt inițiatoare, și intervin cu rol de promotor la nivelul proliferării clonale.

Introducerea mutației somatice *JAK2* V617F, alături de *CALR* și *MPL* în algoritmul de diagnostic, a dus la eficientizarea și creșterea acurateții diagnosticului de NMP.

Dacă în sfera mutațiilor somatice în NMP s-au făcut descoperiri importante în ultimile 2 decenii, actual atenția se îndreaptă către analiza unui statut genetic constituțional, individual, care ar putea aduce mai multe răspunsuri.

În aceasta teză am caracterizat două variante genetice constituționale distincte, care predispun la NMP: polimorfismul genei *SH2B3* în studiul 1, respectiv polimorfismul genei *TET2* în studiul 2. Apoi, am analizat contribuția fiecărui polimorfism la apariția fenotipurilor NMP, și anume PV, TE, MFP și LMC. În primul studiu, am putut demonstra o asociere semnificativă a genotipului homozigot TT (modelul recesiv) al polimorfismului *SH2B3* rs3184504 cu PV și cu MFP, dar și cu întreaga cohortă de NMP *BCR-ABL1*-negative (100). Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele publicate de Lesteven et al., care au descris pentru prima dată asocierea dintre polimorfismul *SH2B3* rs3184504 și NMP, raportând asocierea acestuia cu NMP în modelul alelic, alela T fiind alela de risc. De asemenea, în studiul lor, cea mai semnificativă asociere a fost în cazul MFP. Studiul lor nu a inclus însă pacienți cu PV (87). Alte studii precum Olkhovskiy et al., care au urmat au inclus și pacienți cu PV, raportând o corelație semnificativă doar în cazul pacienților cu PV, în timp ce Chen et al. au observat asocierea cu toate cele trei tipuri de NMP *BCR-ABL1*-negative (PV, TE și MFP). În ceea ce privește corelația între *SH2B3* rs3184504 și LMC, nu am observat rezultate semnificative statistic, asemeni datelor obținute de Olkhovskiy et al. și în

disconcordanță cu Chen et al., care au raportat o frecvență remarcabilă a genotipului CC în grupul pacienților cu LMC (88, 89) .

În cel de-al doilea studiu mi-am concentrat atenția asupra corelației dintre polimorfismul genei *TET2* rs1548483 și expresia diferitelor fenotipuri NMP, demonstrând o asociere cu PV (în modelul alelic) și MFP (în modelul alelic și în modelele genotipice dominant, codominant și supradominant) (110). Și echipa de cercetare a lui Hinds et al. au raportat o asociere a acestui SNP cu NMP. În plus, studiul lor a relevat o asociere nominală, mai slabă, și cu LMC și mastocitoza sistemică.

Accesul la scară largă la tehnici moleculare genomice, a permis, de asemenea, o analiză mai detaliată a celor mai comune polimorfisme de tip single nucleotide polymorphism (SNP). Această evaluare genetică a permis identificarea SNP-urilor germinale care au furnizat mai multe dovezi în favoarea unei cauze moștenite a NMP, cum ar fi haplotipul *JAK2* 46/1 și identificarea a multor altor SNP-uri din gene precum *TERT*, *MECOM*, *SH2B3*, *TET2*, *ATM*, *CHEK2*, *THRB-RARB*, *PINT* (54,75-83). Astfel, pe un sublot al cohortei analizate în studiul 2, am studiat interacțiunile epistatice dintre polimorfismul *TET2* rs1548483 și variantele genetice constituționale precum *JAK2* rs10974944, *TERT* rs2736100, *MECOM* rs2201862, *HBS1L-MYB* rs9376092 și *THRB-RARB* rs4858647 în apariția diverselor fenotipuri ale pacienților cu NMP. În urma acestui studiu, am descoperit interacțiuni epistatice între *TET2* rs1548483 și *HBS1L-MYB* rs9376092 în PV în modelul supradominant, între *TET2* rs1548483 și *HBS1L-MYB* rs9376092 în TE în modelul codominant și supradominant și între *TET2* rs1548483 și *JAK2* rs10974944, (haplotipul *JAK2* 46/1) în TE în modelul recesiv (110).

În ceea ce privește analiza altor parametri corelabili cu prezența unei predispoziții genetice, am analizat în primul studiu corelația dintre polimorfismul *SH2B3* rs3184504 și diverși parametri clinici și paraclinici. Printre aceștia se număra parametri hematologici precum hemoglobina, hematocritul, numărul de leucocite și respectiv trombocite. Dintre toți parametri analizați, doar leucocitoza s-a corelat pozitiv cu polimorfismul *SH2B3* rs3184504 (genotipul homozigot TT, model genotipic recesiv).

5. CONCLUZIILE GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

În concluzie, în prezenta lucrare de doctorat:

- am caracterizat mutațiile somatice de tip driver *JAK2*, *CALR* și *MPL* și *BCR-ABL1* la nivelul unei cohorte reprezentative de 1901 pacienți cu NMP.
- am caracterizat contribuția polimorfismului genei *SH2B3* (studiul 1) la apariția diferitelor fenotipuri NMP, și anume PV, TE, MFP și LMC. Genotipul homozigot TT (modelul recesiv) al polimorfismului *SH2B3* rs3184504 a fost asociat semnificativ cu PV și cu MFP și a atins semnificație statistică la analiza întreagii cohorte de NMP *BCR-ABL1*-negative.
- am caracterizat contribuția polimorfismului genei *TET2* rs1548483 (studiul 2) la apariția diferitelor fenotipuri ale NMP. Polimorfismul *TET2* rs1548483 s-a corelat cu PV și MFP în modelul alelic. De asemenea, genotipurile variante care conțin cel puțin o alelă minoră *TET2* rs1548483 s-au asociat semnificativ statistic cu un risc crescut de MFP în modelele genotipice dominant, codominant și supradominant.
- am definit contribuția polimorfismului *SH2B3* rs3184504 la apariția diverselor mutații somatice driver specifice NMP. Genotipul homozigot TT (modelul recesiv) al polimorfismului s-a asociat semnificativ statistic cu întreaga cohortă NMP *BCR-ABL1* negative, PV *JAK2* V617F pozitivă, dar și cu MFP *JAK2* V617F-pozitivă.

- am definit contribuția polimorfismului *TET2* rs1548483 la apariția diverselor mutații somatice driver, specifice NMP. Alela minoră a polimorfismului *TET2* rs1548483 s-a asociat cu PV și MFP *JAK2* V617F pozitivă în modelul alelic. De asemenea, genotipurile variante *TET2* rs1548483 s-au asociat pozitiv cu MFP *JAK2* V617F în modelele genotipice dominant, codominant și supradominant. În plus, polimorfismul *TET2* rs1548483 s-a asociat semnificativ cu MFP *CALR*-pozitivă, în special cu cea pozitivă pentru mutații de tip 2, în modelele genotipice dominant, codominant și supradominant.
- am analizat corelația dintre polimorfismul *SH2B3* rs3184504 și diverse caracteristici hematologice (hemoglobină, hematocrit, număr de leucocite, trombocite) și clinice (tromboze majore) ale pacienților cu NMP. Dintre toți parametrii analizați, doar leucocitoza s-a corelat pozitiv cu polimorfismul *SH2B3* rs3184504 (genotipul homozigot TT, model genotipic recesiv).
- am evaluat interacțiuni dintre polimorfismul *TET2* rs1548483 și variante genetice constituționale *JAK2* rs10974944, *TERT* rs2736100, *MECOM* rs2201862, *HBS1L-MYB* rs9376092 și *THRB-RARB* rs4858647 în apariția diverselor fenotipuri ale pacienților cu NMP și am descoperit interacțiuni epistatice între *TET2* rs1548483 și *HBS1L-MYB* rs9376092 în PV în modelul supradominant, între *TET2* rs1548483 și *HBS1L-MYB* rs9376092 în TE în modelul codominant și supradominant și între *TET2* rs1548483 și *JAK2* rs10974944, (haplotipul *JAK2* 46/1) în TE în modelul recesiv.

Astfel, confirmăm cu ajutorul unei cohorte mari de pacienți NMP, contribuția polimorfismelor *SH2B3* rs3184504 și *TET2* rs1548483 la apariția NMP *JAK2* V617F-pozitiv, plasându-le împreună cu alte polimorfisme care definesc predispoziția genetică la NMP, precum haplotipul *JAK2* 46/1, *TERT* rs2736100 sau *MECOM* rs2201862 (100).

5.1 DIRECȚII DE CERCETARE VIITOARE

1. Efectuarea unui studiu de tip GWAS (Genome wide association study) pentru analiza prezența altor variante genetice la pacienții NMP. Aceste date ar putea fi integrate în studii despre interacțiunile epistatice dintre mai multe polimorfisme prezente la acești pacienți.
2. Efectuarea de studii de metilare la nivelul genelor *SH2B3*, *TET2*, și altele, pentru analiza efectelor funcționale ale polimorfimelor din aceste gene.
3. Analiza mutațiilor genetice adiționale, diferite de mutațiile driver precum *JAK2*, *CALR* și *MPL*, și corelarea acestora cu prezența polimorfismelor la pacienții NMP.
4. Corelarea datelor clinice și a parametrilor hematologici cu prezența mutațiilor adiționale și a polimorfismelor constituționale, pentru a evalua mai bine expresia fenotipică și evoluția NMP.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE

1. **Lighezan DL**, Bojan AS, Iancu M, et al. *TET2* rs1548483 SNP Associating with Susceptibility to Molecularly Annotated Polycythemia Vera and Primary Myelofibrosis. *J Pers Med*. 2020;10(4):259.
doi:10.3390/jpm10040259
Factor de impact 4.433 (2019)
Prim autor
2. Trifa AP, **Lighezan DL**, Jucan C. et al. *SH2B3* (LNK) rs3184504 polymorphism is correlated with *JAK2* V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Rev Romana Med Lab*. 2020;28(3):267-77.
DOI:10.2478/rrlm-2020-0025
Factor de impact 0.945 (2019)
Autor cu contribuție egală cu cea a primului autor

Factor de impact cumulat 5,378