

---

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Hematopoieza clonală și mecanismele  
moleculare ale rezistenței la terapia cu  
agenți hipometilanți în hemopatiile  
liniei mieloide la pacientul vârstnic

---

Doctorand: **Iluta Sabina Ioana Doinita**

---

Conducător de doctorat: **Sef. Lucr. Dr. Tomuleasa Ciprian  
Ionut**

---



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



# CUPRINS

<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>11</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....</b>	<b>13</b>
<b>1. Hematopoieza.....</b>	<b>15</b>
1.1. Generalități.....	15
1.2. Hematopoieza clonală și extramedulară.....	16
<b>2. Hemopatiile maligne.....</b>	<b>21</b>
2.1. Leuceimia acută mieloidă.....	21
2.1.1. Aspecte generale.....	21
2.1.2. Caracteristici clinice și biologice.....	23
2.1.3. Management și prognostic.....	24
2.2. Sindromul Mielodisplazic.....	26
2.2.1. Aspecte generale.....	26
2.2.2. Caracteristici clinice și biologice	28
2.2.3. Management și prognostic	31
<b>3. Agenții hipometilanți și căi de semnalizare în patologia neoplazică</b>	<b>34</b>
3.1. Generalități și mecanisme de acțiune.....	34
3.2. Tratamentul pacienților cu hemopatii maligne și ineligibili pentru chimioterapie intensivă.....	35
3.3 Rolul metilării ADN și ARN în tratamentul neoplaziilor liniei mieloide.....	36
3.4 Căi de semnalizare în patologia neoplazică.....	37
<b>4. Noi direcții de tratament în neoplaziile liniei mieloide.....</b>	<b>41</b>
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....</b>	<b>45</b>
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective.....</b>	<b>46</b>
<b>2. Metodologie generală.....</b>	<b>46</b>

### **3. Studiul 1 - Modele de tratament din lumea reală și rezultate clinice la pacienții unfit cu LAM: rezultatele studiului retrospectiv actual în România**

3.1. Introducere.....	48
3.2. Ipoteza de lucru/obiective.....	49
3.3. Material și metodă.....	49
3.4. Rezultate.....	50
3.5. Discuții.....	59
3.6. Concluzii .....	60

### **4. Studiul 2 - Rolul metilării ARN în tratamentul cu azacitidină la pacienții cu sindrom mielodisplazic de grad înalt**

4.1. Introducere.....	62
4.2. Ipoteza de lucru/obiective.....	63
4.3. Material și metodă.....	63
4.4. Rezultate.....	67
4.5. Discuții.....	73
4.6. Concluzii .....	75

### **5. Studiul 3- Rolul ADN-ului circular extracromozomial în leucemia acută mieloidă**

5.1. Introducere.....	76
5.2. Material și metodă.....	77
5.3. Rezultate.....	78
5.4. Discuții.....	82
5.5 Concluzii.....	83

### **6. Studiul 4- Testarea in vitro a combinației de azacitidină și olaparib în leucemia acută mieloidă refractară la tratament**

6.1. Introducere.....	84
6.2. Ipoteza de lucru/obiective/scenariu clinic.....	85
6.3. Material și metodă.....	87
6.4. Rezultate.....	91
6.5. Discuții.....	98
6.6. Concluzii.....	99

### **7. Discuții generale.....**

### **8. Concluzii generale.....**

### **9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei.....**

### **REFERINȚE .....**

**Cuvinte cheie: leucemie, cancer, hematopoieza, ARN**

## **LISTA DE PUBLICAȚII**

### **Articole publicate ca și prim autor:**

1. **Iluta S**, Pasca S, Gafencu G, Jurj A, Terec A, Teodorescu P, Selicean C, Jitaru C, Preda A, Cenariu D, Constantinescu C, Iordache M, Tigu B, Munteanu R, Feder R, Dima D, Zdrenghea M, Gulei D, Ciuleanu TE, Tomuleasa C. Azacytidine plus olaparib for relapsed acute myeloid leukaemia, ineligible for intensive chemotherapy, diagnosed with a synchronous malignancy. *J Cell Mol Med.* 2021 Jul;25(13):6094-6102. **Articol ISI, factor de impact: 5.31 (studiu inclus în capitolul 6 – Contribuția personală). Articol ISI, factor de impact: 5.31 (studiu inclus în capitolul 6 – Contribuția personală).**
2. **Sabina Iluta**, Madalina Nistor, Sanda Buruiana and Delia Dima. Notch and Hedgehog Signaling Unveiled: Crosstalk, Roles, and Breakthroughs in Cancer Stem Cell Research. *Life (Basel).* 2025 Feb 4;15(2):228. **Articol ISI, factor de impact: 3.1 (studiu inclus în capitolul 1 – Stadiul Actual al cunoașterii).**
3. **Sabina Iluta**, Madalina Nistor, Sanda Buruiana and Delia Dima. Wnt Signaling Pathway in Tumor Biology. *Genes (Basel).* 2024 Dec 13;15(12):1597. **Articol ISI, factor de impact: 3.286 (studiu inclus în capitolul 1 – Stadiul Actual al cunoașterii).**

### **Articole publicate ca și autor cu contribuția egală cu prim autorul:**

1. Cenariu D, **Iluta S**, Zimta AA, Petrushev B, Qian L, Dirzu N, Tomuleasa C, Bumbea H, Zaharie F. Extramedullary Hematopoiesis of the Liver and Spleen. *J Clin Med.* 2021 Dec 13;10(24):5831. **Articol ISI, factor de impact: 3.0 (studiu inclus în capitolul 1 – Stadiul actual al cunoașterii).**
2. Drula R, **Iluta S**, Gulei D, Iuga C, Dima D, Ghiaur G, Buzoianu AD, Ciechanover A, Tomuleasa C. Exploiting the ubiquitin system in myeloid malignancies. From basic research to drug discovery in MDS and AML. *Blood Rev.* 2022 Nov;56:100971. **Articol ISI, factor de impact: 6.9 (studiu inclus în capitolul 4 – Stadiul actual al cunoașterii).**

**Articole publicate ca și co-autor:**

1. Qian L, Xia X, Liu J, Chen X, Liu Y, Wang X, **Iluta S**, Pasca S, Gulei D, Tomuleasa C. Characterization of extrachromosomal circular DNA in patients with acute myeloid leukemia: proof-of-concept report using cohorts from Beijing and Shanghai. *Ann Transl Med.* 2022 Aug;10(15):843. **Articol ISI, factor de impact: 3.932 (studiu inclus în capitolul 5 – Contribuția personală)**
2. Diana Gulei, Vlad Moisoiu, David Kegyes, Rares Drula, **Sabina Iluta**, Adrian Bogdan Tigu, Madalina Nistor, Ciprian Jitaru, Anamaria Bancos, Petra Rotariu, Corina Popovici, Delia Dima, Radu Tomai, Ioana Rus, Catalin Constantinescu, Raluca Munteanu, Diana Cenariu, Ugur Sezerman, Mihnea Zdrenghea, Jaroslav Cermak, Hermann Einsele, Gabriel Ghiaur, Ciprian Tomuleasa. RNA methylation sequencing shows different gene expression signatures for response to azacytidine therapy in high-grade myelodysplastic syndromes. *J Cell Mol Med.* 2024 Sep;28(18):e70078. **(studiu inclus în capitolul 4 – Contribuția personală)**

## INTRODUCERE

Hematopoieza este procesul de formare al componentelor celulare sangvine, proces care are loc încă din timpul dezvoltării embrionare și continuă pe parcursul vieții adulte. Există situații în care organele hematopoietice inițiale își reiau funcția de hematopoieză, situație în care vorbim de hematopoieză extramedulară. De-a lungul vieții, pot apărea mutații somatice în cadrul hematopoiezei normale de la nivel medular, astfel rezultând o expansiune clonală a celulelor hematopoietice stem și progenitoare. Acest proces poartă numele de hematopoieză clonală. Expansiunea clonei mutate duce în timp la apariția diferitelor hemopatii maligne printre care leucemia acută mieloidă sau sindromul mielodisplazic.

Tratamentul acestor hemopatii maligne este variat, iar dintre agenții folosiți în tratarea acestora sunt agenții hipometilanți. Epigenomul are ca și componentă relativ stabilă, metilarea ADN-ului. Aceasta stabilește și de asemenea stabilizează fenotipurile celulare prin menținerea stărilor de expresie a genelor. Agenții hipometilanți sunt medicamente care inhibă metilarea ADN-ului. Acest lucru se realizează prin adăugarea unei grupări metil. Metilarea ADN-ului afectează funcția celulară prin generații succesive de celule, dar nu modifică secvența de ADN subiacentă. Agenții hipometilanți utilizați în prezent blochează activitatea ADN-metiltransferazei. Când are loc metilarea genelor supresoare tumorale în anumite tipuri de cancer, aceasta are ca și consecință creșterea și supraviețuirea celulelor canceroase. Agenții hipometilanți scad cantitatea de metilare a ADN-ului celular și permit genelor supresoare tumorale să își îndeplinească funcția.

Pornind de la această idee, lucrarea de față își propune studiul metilării ARN și alte modificări moleculare care ar putea duce la rezistența la tratament cu agenți hipometilanți la pacientul diagnosticat cu una dintre cele două hemopatii maligne ale liniei mieloide (LAM și SMD). Metilarea ARN m<sup>6</sup>A este o modificare post-transcripțională care are loc în poziția de azot-6 a adeninei. Această modificare a fost găsită în majoritatea ARNm, eucariote, ARNt, ARNr și alte ARN necodificatoare. M<sup>6</sup>A este prezent în 0,1-0,4% din toate adenozinele ARN-urilor celulare și reprezintă aproximativ 50% din toate ribonucleotidele metilate.

Prezenta lucrare își propune studiul retrospectiv al pacienților vârstnici, neeligibili pentru chimioterapia intensiva diagnosticați cu LAM pe modele de tratament din lumea reală. De asemenea s-a studiat rolul metilării ARN-ului în tratamentul cu azacitidină la pacienții cu SMD grad înalt și rolul ADN-ului circular extracromozomial în LAM. Actuala lucrare a studiat și testarea in vitro a combinației de azacitidină și olaparib în LAM refractară la tratament. Rezultatele sunt descrise în partea de contribuție personală a prezentei lucrări.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Studiile recente au scos la iveală noi posibilități terapeutice în ceea ce privește malignitățile mieloidă. Unul dintre aceste studii care a câștigat teren în ultimii ani este investigarea sistemului ubiquitin-proteazom mai ales în ceea ce privește bolile hematologice maligne. Investigațiile actuale se concentrează pe manipularea degradării proteinelor prin reglarea fină a procesului de ubiquitinare. Reglarea ubiquitinării se realizează prin inhibarea enzimelor de deubiquitinare sau prin dezvoltarea sistemelor PROTAC pentru stimularea ubiquitinării și degradării proteinelor. S-a studiat eficiența Lenalidomidei în tratamentul pacienților cu SMD, aceste noi molecule prezentând o eficiență ridicată în ceea ce privește boala refractară.

Una din provocările importante din prezent sunt recidiva și metastazele care pun piedici în vindecarea cancerului și supraviețuirii, atribuite mai ales celulelor stem canceroase. Există căi de semnalizare precum cascada Wnt/ $\beta$ -catenină prin care acestea funcționează. Pe lângă aceasta mai există și calea de semnalizare Notch și Hedgehog (Hh) asociată de asemenea cu păstrarea celulei stem canceroase și apariția metastazelor. Acestea sunt doar două dintre căile de semnalizare implicate în rezistența și metastazarea neoplaziilor care vor fi abordate în prezenta lucrare.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

**Studiul 1: Modele de tratament din lumea reală și rezultate clinice la pacienții unfit cu LAM: rezultatele studiului retrospectiv actual în România**

**Scop / Obiective:** Studiul actual are ca obiectiv principal înțelegerea modelelor terapeutice din viața reală și rezultatele clinice la pacienți unfit, diagnosticați cu LAM care au urmat tratament de primă linie sau cea mai bună terapie de susținere în diferite zone geografice din România.

**Material și metode:** În studiu au fost incluși pacienți adulți cu vârsta peste 18 ani care au fost diagnosticați cu LAM de novo sau secundară și care nu au fost eligibili pentru chimioterapia agresivă conform evaluării medicului curant, tratați în primă linie cu terapie sistemică (TSPL) de tip chimioterapie mai puțin agresivă, terapie țintă sau cel mai bun tratament suportiv (CMBTS). De asemenea este necesar ca pacienții să aibă 2 sau mai multe vizite, în plus față de vizita la care s-a inițiat terapia. Au fost excluși pacienții care nu au avut confirmat diagnosticul de leucemie acută mieloidă, cei cu leucemie acută promielocitară sau cei care au urmat tratament de primă linie în cadrul unui alt studiu.

**Rezultate:** Analiza actuală oferă o perspectivă în detaliu din lumea reală a modelelor terapeutice și rezultatelor clinice incluzând supraviețuirea, caracterele clinico-patologice, precum și utilizarea resurselor medicale la pacienții diagnosticați cu LAM și ineligibili pentru chimioterapie agresivă din România. Din datele adunate, rezultatele clinice ale pacienților sunt nesatisfăcătoare, cu o supraviețuire generală de 8.6 luni pentru întreaga populație de studiu, indiferent de opțiunile terapeutice. Tratamentul cu agenți hipometilanți (azacitidină sau decitabină) ca primă linie terapeutică sistemică a fost mai frecvent utilizat și a fost asociat cu o îmbunătățire semnificativă a supraviețuirii, comparativ cu cea mai bună terapie suportivă (10.0 vs 3.4 luni).

**Concluzii:** Supraviețuirea și rezultatele pacienților unfit diagnosticați cu leucemie acută mieloidă, rămân sărace, evidențiind nevoia nesatisfăcută de opțiuni terapeutice eficiente în această categorie populațională. Centrele participante în cadrul acestui studiu sunt institute naționale și regionale implicate în managementul pacienților hemato-oncologici, care deservește principalelor regiuni geografice, fiind cele mai reprezentative.

## **Studiu 2. Rolul metilării ARN în tratamentul cu azacitidină la pacienții cu sindrom mielodisplazic de grad înalt**

**Scop / Obiective:** Ipoteza noastră este că un prognostic mai precis s-ar putea baza pe analiza metilomului, astfel am utilizat secvențierea de metilare pentru a împărți diferențial pacienții cu SMD de grad înalt cu caractere demografice și citogenetice identice, între cei care au răspuns și cei care nu au răspuns la tratamentul cu azacitidină.

**Material și metode:** Inițial au fost înrolați 6 pacienți (n=6) în studiul curent după ce au semnat formularele de consimțământ. Caracteristicile clinico-demografice ale pacienților au fost similare, toți având același interval de vârstă (60-65ani), diagnosticul de SMD, IPSS grad intermediar 2 și cariotip normal. Am comparat pacienți care au avut un răspuns hematologic la terapia cu azacitidină (n=3) și au primit cel puțin 6 cicluri de terapie, pierzând ulterior răspunsul la tratament evoluând spre leucemie acută mieloidă cu pacienții care au obținut un răspuns hematologic menținut pe termen lung (n=3). Validarea cohortei de pacienți cu SMD s-a realizat prin recoltarea de măduvă osoasă de la 58 de pacienți diagnosticați cu SMD (n=58). Aspiratul medular a fost colectat pe tuburi acoperite cu KSEDTA și procesat imediat pentru a evita denaturarea probei.

**Rezultate:** A fost identificată o genă cu potențial impact clinic în metilarea ARN după terapia cu azacitidină în SMD ar putea fi ENSG0000000938 sau SRC2, o proto-oncogenă FGR, care nu a mai fost raportată anterior ca având rol în metilarea ARN-ului în leukemogeneză.

**Concluzii:** Rezistența la tratament în neoplazii este încă o provocare și la fel cum este și cazul SMD, acest lucru duce la un prognostic nefavorabil și ulterior la moartea pacientului. Rezistența la tratament, incluzând chimioterapia sau terapia țintită, poate să fie influențată de epigenetica ARN-ului și de structura cromatinei. Cheng et al. au arătat faptul că în celulele maligne ARN5-metilcitozina și ARNm5C metiltransferazele mediază structurile cromatinei, iar acest lucru duce la apariția rezistenței la tratamentul epigenetic. Studiul nostru vine în sprijinul acestor date, dar în ceea ce privește o patologie mai puțin agresivă cum este SMD-ul.

### **Studiul 3. Rolul ADN-ului circular extracromozomial în leucemia acută mieloidă**

**Scop / Obiective:** În studiul actual, s-a propus evaluarea diferențelor legate de ADN circular extracromozomial (eccADN) între pacienții cu LAM și controlul sănătos, pentru ca studiile ulterioare să poată fi utilizate pentru determinarea impactului acestor molecule în tratamentul și progresia LAM.

**Material și metode:** Actualul studiu a fost un studiu transversal, caz-control, analitic și observațional.

S-a efectuat aspirat medular de la 5 pacienți diagnosticați cu LAM și 5 martori sănătoși, în perioada 20 iunie 2020 și 8 octombrie 2020, perioada în care a fost în curs de desfășurare grantul de colaborare bilaterală între România și Republica Populară Chineză, doctoranda fiind membră a echipei de implementare. Studiul a fost realizat în conformitate cu Declarația de la Helsinki și cu aprobarea comitetului de etică al Centrului Sixth Medical, Spitalul General Chinez, PLA.

**Rezultate:** Un grup de gene a prezentat un p cu valoarea 0 (luată în considerare de software) și un log fold change de 1.74. Totalitatea genelor a fost derivată din genomul mitocondrial. S-au evaluat eccADN-urile codificatoare de proteine suprareglate. La evaluare s-a observat că acestea au fost îmbogățite cu gene care sunt implicate în diferențierea celulelor mieloidă și anume: JUNB, DNASE2, KLF1. De asemenea s-au observat și gene implicate în diferențierea celulară în general: JUNB, DNASE2, KLF1, CALR, IER2, LYL1.

**Concluzii:** În prezentul studiu am evidențiat faptul că există mai multe diferențe în ceea ce privește eccADN-ul între martorii sănătoși și pacienții cu LAM. Acestea variază de la modificări ale eccADN-urilor derivate din genomul mitocondrial, până la suprareglarea celor implicate în diferențierea mieloidă. Diferențele includ și implicarea genelor din care au fost derivate eccADN-urile suprareglate în legarea ADN-ului. Rezultatele obținute pot constitui noi direcții de studiu în ceea ce privește eccADN-ul în LAM, cu implicații în înțelegerea mai bună a biologiei leucemiei acute mieloidă.

**Studiul 4. Testarea in vitro a combinației de azacitidină și olaparib în leucemia acută mieloidă refractară la tratament**

**Scop / Obiective:** Studiul actual, prezintă scenariul clinic al unei femei de 44 de ani care a fost diagnosticată cu două neoplazii sincrone, recidivate și anume carcinom ovarian și leucemie acută mieloidă. Simulările au fost efectuate atât pentru leucemia acută mieloidă refractară, cât și pentru leucemia acută de novo tratată cu chimioterapie de primă linie.

**Material și metode:** Prima linie celulară, OCI/LAM3 este caracterizată de mutațiile survenite la nivelul genei NPM1, genă implicată în repararea ruperii ADN-ului monocatenar și mutația ADN-metiltransferaza 3 alfa (DNMT3A), Cea de-a doua linie celulară, THP-1, prezintă deleții și mutații în PTEN, MLL-AF9, MLLT3, TP73 și CDKN2A/B. Astfel am simulat toate scenariile clinice posibile în care un inhibitor PARP ar putea fi utilizat în clinică, pentru a putea explica mecanismele de bază ale rezistenței la chimioterapie și progresiei bolii, deoarece THP-1 este mutant PTEN și este susceptibil la tratamentul cu olaparib.

**Material și metode:** Ambele linii celulare au fost cultivate in vitro pentru evaluarea tratamentului. S-a realizat placarea OCI/LAM3 ( DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-Colecția Germană de Microorganisme și Culturi Celulare) și THP1 (ATCC-American Type Culture Collection) în plăci cu 96 de godeuri, la 104 celule/200 μl/godeu în două tipuri de medii astfel: 80% alfa-MEM (invitrogen) cu 20% ser fetal bovin (SFB) (Invitrogen) pentru OCI/LAM3 sau RPMI1640 (Invitrogen) cu 10% SFT, 2 mM L – glutamină pentru THP1. Apoi s-a realizat tratarea lor cu 37.5 μM olaparib timp de 48 de ore , 100 μM citarabină, 1.4 μM daunorubicin și 10 μM azacitidină, în combinație sau singură. Celulele au fost cultivate în incubator la 37 ° Celsius și 5% CO<sub>2</sub> după cum a fost descris anterior. Evaluarea proliferării celulare s-a realizat utilizând testul de proliferare celulară non-radioactivă cu apă CellTiter 96® (Promega) și analizat cu cititorul multimod hibrid BioTek Synergy H1 (BioTek Instruments).

**Rezultate:** În ceea ce privește efectele daunorubicinei în asociere cu olaparib (ODC) și regimului citarabină-daunorubicină (RCD) asupra proliferării celulelor blastice OCI/LAM3 și THP1, ODC s-a dovedit a fi la fel de eficient ca RCD în ceea ce privește scăderea viabilității celulelor tratate care a fost comparată între liniile celulare. În ceea ce privește efectele ODC și RDC asupra etapelor ciclului celular al blastilor din culturile celulare OCI/LAM3 și THP1, asocierea olaparibului cu daunorubicină are capacitatea de a induce efecte similare ca magnitudine cu cele induse de regimul citarabină-daunorubicină, comparând procentul de celule în G1, S, G2-M și etapa celulară, indiferent de linia celulară. În cohorta șoarecilor tratați cu chimioterapia combinată 5-azacitidină plus olaparib, tumora prezintă o scădere în dimensiuni, rezultatele fiind confirmate și de măsurarea automată ROI a intensității semnalului bioluminiscent. Nu s-au înregistrat modificări semnificative în ceea ce privește greutatea corporală a șoarecilor sau alte

efecte adverse secundare chimioterapiei, ceea ce evocă faptul că tratamentul a fost bine tolerat.

**Concluzii:** Leucemia acută mieloidă este o afecțiune malignă cu prognostic nefavorabil și necesită alternative noi de tratament în special la pacienții ineligibili pentru chimioterapia agresivă. Inhibitorii de PARP sunt terapii vizate pentru cancer și au ca acțiune perturbarea răspunsului disfuncțional la deteriorarea ADN-ului. LAM cu un status mutațional special ar putea fi sensibile la asocieri de inhibitori PARP și molecule citotoxice. Mutațiile NPM1 au legătură cu disfuncții ale răspunsului la deteriorarea ADN-ului. Astfel am investigat sensibilitatea celulelor din LAM NPMA1 pozitive la combinații terapeutice de inhibitori PARP cu agenți chimioterapici. Rezultatele noastre au arătat ca probabil LAM cu mutația NPM1-DNMT3A este la fel de sensibilă la combinații de inhibitori PARP plus antracicline, dar nu și la asocierea lor cu agenți hipometilanți, cel puțin într- un cadru preclinic.

## CONCLUZII GENERALE

1. Supraviețuire generală este de 8.6 luni pentru întreaga populație de studiu, indiferent de opțiunile terapeutice.

2. Tratamentul cu agenți hipometilanți (azacitidină sau decitabină) ca primă linie terapeutică sistemică a fost mai frecvent utilizat și a fost asociat cu o îmbunătățire semnificativă a supraviețuirii, comparativ cu cea mai bună terapie suportivă (10.0 vs 3.4 luni).

3. Datele actuale oferă perspective relevante pentru comunitatea noastră medicală și pot servi ca bază pentru cercetări ulterioare la nivel local.

4. Profilul mutational al ADN-ul circular extracromozomial poate reprezenta un factor de prognostic în leucemia acută mieloidă în curs de tratament, cu impact clinic deosebit în practica medicală curentă

5. Metilarea ARN-ului reprezintă un nou mecanism biologic ce explică răspunsul inițial la terapia cu agenți hipometilanți în cazul sindroamelor mielodisplazice, precum și pierderea ulterioară a răspunsului și evoluția clinică spre leucemia acută mieloidă, patologie oncologică cu prognostic nefavorabil comparativ cu LAM *de novo*.

6. Notch este o cale de semnalizare cu rol important în reglarea proceselor celulare, procese precum proliferarea, diferențierea sau apoptoza. Rolul ei în reglarea acestor procese celulare esențiale face ca dereglările apărute să ducă la apariția neoplaziei și poate să afecteze populații celulare cum sunt celulele stem canceroase.

7. Datele actuale sugerează faptul că semnalizarea căii Wnt activate, are un rol cheie în dezvoltarea diferitelor tipuri de cancer, ceea ce duce la proliferarea tumorii, agresivitatea bolii și apariția metastazelor. Complexitatea acestei căi este una dintre provocările descoperirii de noi terapii, cel puțin în studiile clinice.

---

## **ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE CERCETĂRII DOCTORALE**

1. Prezenta teza prezinta datele de tip real-life privind rata de raspuns la terapia conventionala in cazul pacientilor cu leucemie acuta mieloida, ineligibili de tratament intensiv, date cu reprezentare nationala, fiind implicate cele mai mari centre de hematologie din Romania: Institutul Clinic Fundeni Bucuresti, Institutul Regional de Oncologie Iasi si Institutul Oncologic Cluj Napoca

2. Prezenta teza abordeaza o noua optiune terapeutica pentru pacientii cu diagnosticul de leucemie acuta mieloida cu o malignitate ginecologica sincrona – adenocarcinomul ovarian. Acesti pacienti sunt ineligibili de transplant alogen de celule stem hematopoietice iar tratamentul bazat pe agent hipometilant si inhibitori de PARP poate reprezenta o optiune terapeutica viabila.

3. Este prezentat un studiu preliminar prin care este descris rolul prognostic al ADN-ului circular extracromozomial, cu impact clinic in predictia la raspunsul terapeutic.

4. Este descris pentru prima data in literatura un nou mecanism molecular – cel al metilarii ARN-ului si astfel este explicat raspunsul initial pentru pacientii cu sindrom mielodisplazic ce primesc tratament cu agent hipometilant, precum si pierderea ulterioara a raspunsului si evolutia clinica spre leucemie acuta mieloida



---

## SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

Clonal hematopoiesis and molecular mechanisms of resistance to therapy with hypomethylating agents in myeloid lineage hemopathies in elderly patients

---

PhD: **Iluta Sabina Ioana Doinita**

---

PhD supervisor: **Sef. Lucr. Dr. Tomuleasa Ciprian Ionut**

---



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

# CONTENT

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....</b>	<b>13</b>
<b>1.Hematopoiesis.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.General.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2. Clonal and extramedullary hematopoiesis.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Malignant Hematopathies.....</b>	<b>21</b>
2.1. Acute myeloid leukemia.....	21
2.1.1. General Aspects.....	21
2.1.2. Clinical and biological characteristics.....	23
2.1.3. Management și prognosis.....	24
2.2. Myelodysplastic syndrome.....	26
2.2.1. General Aspects.....	26
2.2.2. Clinical and biological characteristics.....	28
2.2.3. Management și prognosis.....	31
<b>3. Hypomethylating agents and signaling pathways in neoplastic pathology.....</b>	<b>34</b>
3.1.Generalities and mechanisms of action.....	34
3.2. Treatment of patients with malignant hemopathies ineligible for intensive chemo	35
3.3 The role of DNA and RNA methylation in the treatment of myeloid neoplams.....	36
3.4 Signaling pathways in neoplastic pathology.....	37
<b>4. New directions in treatment of myeloid neoplasms.....</b>	<b>41</b>
<b>PERSONAL CONTRIBUTION.....</b>	<b>45</b>
<b>1.Working hypothesis/objectives.....</b>	<b>46</b>
<b>2.General methodology.....</b>	<b>46</b>
<b>3. Study 1 – Real world treatment patterns and clinical outcomes in unfit patients with AML: results of the Current retrospective study in Romania</b>	

3.1. Introduction.....	48
3.2. Working hypothesis/objectives.....	49
3.3. Material and method.....	49
3.4. Results.....	50
3.5. Discussion.....	59
3.6. Conclusions .....	60
<b>4. Study 2- Role of RNA methylation in Azacitidine treatment in patients with high-grade myelodysplastic syndrome</b>	
4.1. Introduction.....	62
4.2. Working hypothesis/objectives.....	63
4.3. Material and method.....	63
4.4. Results.....	67
4.5. Discussion.....	73
4.6. Conclusions .....	75
<b>5. Study 3- The role of extrachromosomal circular DNA in acute myeloid leukemia</b>	
5.1. Introduction.....	76
5.2. Material and method.....	77
5.3. Results.....	78
5.4. Discussion.....	82
5.5 Conclusions.....	83
<b>6. Study 4- In vitro testing of the combination of azacitidine and olaparib in treatment-refractory acute myeloid leukemia</b>	
6.1. Introduction.....	84
6.2. Working hypothesis/objectives/clinical scenario.....	85
6.3. Material and method.....	87
6.4. Results.....	91
6.5. Discussion.....	98
6.6. Conclusions.....	99
<b>7. General discussions.....</b>	101
<b>8. General conclusions.....</b>	103
<b>9. Originality and innovative contributions of the thesis.....</b>	104
<b>REFERENCES .....</b>	105

**Keywords: leukemia, cancer, hematopoiesis, RNA**

## LIST OF PUBLICATIONS

### Articles published as first author:

1. **Iluta S**, Pasca S, Gafencu G, Jurj A, Terec A, Teodorescu P, Selicean C, Jitaru C, Preda A, Cenariu D, Constantinescu C, Iordache M, Tigu B, Munteanu R, Feder R, Dima D, Zdrenghea M, Gulei D, Ciuleanu TE, Tomuleasa C. Azacytidine plus olaparib for relapsed acute myeloid leukaemia, ineligible for intensive chemotherapy, diagnosed with a synchronous malignancy. *J Cell Mol Med.* 2021 Jul;25(13):6094-6102. **ISI article, impact factor: 5.31 (study included in chapter 6 – Personal contribution). ISI article, impact factor: 5.31 (study included in chapter 6 – Personal contribution).**
2. **Sabina Iluta**, Madalina Nistor, Sanda Buruiana and Delia Dima. Notch and Hedgehog Signaling Unveiled: Crosstalk, Roles, and Breakthroughs in Cancer Stem Cell Research. *Life (Basel).* 2025 Feb 4;15(2):228. **ISI article, impact factor: 3.1 (study included in chapter 1 – Current State of Knowledge).**
3. **Sabina Iluta**, Madalina Nistor, Sanda Buruiana and Delia Dima. Wnt Signaling Pathway in Tumor Biology. *Genes (Basel).* 2024 Dec 13;15(12):1597. **ISI article, impact factor: 3.286 (study included in chapter 1 – Current State of Knowledge).**

### Articles published as an author with equal contribution to the first author:

1. Cenariu D, **Iluta S**, Zimta AA, Petrushev B, Qian L, Dirzu N, Tomuleasa C, Bumbea H, Zaharie F. Extramedullary Hematopoiesis of the Liver and Spleen. *J Clin Med.* 2021 Dec 13;10(24):5831. **ISI article, impact factor: 3.0 (study included in chapter 1 – Current state of knowledge).**
2. Drula R, **Iluta S**, Gulei D, Iuga C, Dima D, Ghiaur G, Buzoianu AD, Ciechanover A, Tomuleasa C. Exploiting the ubiquitin system in myeloid malignancies. From basic research to drug discovery in MDS and AML. *Blood Rev.* 2022 Nov;56:100971. **ISI article, impact factor: 6.9 (study included in chapter 4 – Current state of knowledge).**

**Articles published as co-author:**

1. Qian L, Xia X, Liu J, Chen X, Liu Y, Wang X, **Iluta S**, Pasca S, Gulei D, Tomuleasa C. Characterization of extrachromosomal circular DNA in patients with acute myeloid leukemia: proof-of-concept report using cohorts from Beijing and Shanghai. *Ann Transl Med.* 2022 Aug;10(15):843. **ISI article, impact factor: 3.932 (study included in chapter 5 – Personal contribution)**
2. Diana Gulei, Vlad Moisoiu, David Kegyes, Rares Drula, **Sabina Iluta**, Adrian Bogdan Tigu, Madalina Nistor, Ciprian Jitaru, Anamaria Bancos, Petra Rotariu, Corina Popovici, Delia Dima, Radu Tomai, Ioana Rus, Catalin Constantinescu, Raluca Munteanu, Diana Cenariu, Ugur Sezerman, Mihnea Zdrenghea, Jaroslav Cermak, Hermann Einsele, Gabriel Ghiaur, Ciprian Tomuleasa. RNA methylation sequencing shows different gene expression signatures for response to azacytidine therapy in high-grade myelodysplastic syndromes. *J Cell Mol Med.* 2024 Sep;28(18):e70078. **(ISI article, study included in chapter 4 – Personal contribution)**

## INTRODUCTION

Hematopoiesis is the process of formation of blood cell components, a process that occurs during embryonic development and continues throughout adult life. There are situations in which the initial hematopoietic organs resume their function of hematopoiesis, a situation in which we speak of extramedullary hematopoiesis. Throughout life, somatic mutations can occur within the framework of normal hematopoiesis at the medullary level, thus resulting in a clonal expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. This process is called clonal hematopoiesis. The expansion of the mutated clone leads over time to the appearance of various malignant hemopathies, including acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome.

The treatment of these malignant hemopathies is varied, and among the agents used in their treatment are hypomethylating agents. The epigenome has as a relatively stable component, DNA methylation. This establishes and also stabilizes cellular phenotypes by maintaining gene expression states. Hypomethylating agents are drugs that inhibit DNA methylation. This is achieved by adding a methyl group. DNA methylation affects cellular function through successive generations of cells, but does not alter the underlying DNA sequence. Currently used hypomethylating agents block the activity of DNA methyltransferase. When methylation of tumor suppressor genes occurs in certain types of cancer, it results in the growth and survival of cancer cells. Hypomethylating agents decrease the amount of methylation in cellular DNA and allow tumor suppressor genes to perform their function.

Starting from this idea, the present work aims to study RNA methylation and other molecular modifications that could lead to resistance to treatment with hypomethylating agents in the patient diagnosed with one of the two malignant hemopathies of the myeloid lineage (LAM and MDS). RNA m<sup>6</sup>A methylation is a post-transcriptional modification that occurs at the nitrogen-6 position of adenine. This modification has been found in most mRNAs, eukaryotes, tRNAs, rRNAs and other non-coding RNAs. M<sup>6</sup>A is present in 0.1-0.4% of all adenosines of cellular RNAs and represents approximately 50% of all methylated ribonucleotides.

This paper aims to retrospectively study elderly patients, ineligible for intensive chemotherapy diagnosed with AML in real-world treatment models. The role of RNA methylation in azacitidine treatment in patients with high-grade MDS and the role of extrachromosomal circular DNA in AML were also studied. The current paper also studied the in vitro testing of the combination of azacitidine and olaparib in treatment-refractory AML. The results are described in the personal contribution section of this paper.

## CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Recent studies have revealed new therapeutic possibilities in myeloid malignancies. One of these studies that has gained ground in recent years is the investigation of the ubiquitin-proteasome system especially in hematological malignancies. Current investigations focus on manipulating protein degradation by fine-tuning the ubiquitination process. Regulation of ubiquitination is achieved by inhibiting deubiquitination enzymes or by developing PROTAC systems to stimulate protein ubiquitination and degradation. Lenalidomide has been studied for its efficacy in the treatment of MDS patients, with these new molecules showing high efficacy in refractory disease.

One of the major challenges today is the recurrence and metastasis that hinders cancer cure and survival, attributed mainly to cancer stem cells. There are signaling pathways such as the Wnt/ $\beta$ -catenin cascade through which they function. In addition to this, there is the Notch and Hedgehog (Hh) signaling pathway also associated with the maintenance of the cancer stem cell and the occurrence of metastasis. These are just two of the signaling pathways involved in cancer resistance and metastasis that will be addressed in this paper.

## PERSONAL CONTRIBUTIONS

### **Study 1: Real-world treatment patterns and clinical outcomes in unfit patients with LAM: results of the current retrospective study in Romania**

**Purpose / Objectives:** The current study has as its main objective the understanding of real-life therapeutic models and clinical outcomes in unfit patients diagnosed with LAM who received first-line treatment or best supportive therapy in different geographical areas of Romania.

**Material and methods:** The study included adult patients over 18 years of age who were diagnosed with de novo or secondary AML and who were not eligible for aggressive chemotherapy according to the assessment of the treating physician, treated in the first line with systemic therapy (TSPL) of the type of less aggressive chemotherapy, targeted therapy or best supportive care (BSC). Patients were also required to have 2 or more visits in addition to the visit at which therapy was initiated. Patients who did not have a confirmed diagnosis of acute myeloid leukemia, those with acute promyelocytic leukemia, or those who had received first-line treatment in another study were excluded.

**Results:** The current analysis provides a detailed real-world perspective on therapeutic patterns and clinical outcomes including survival, clinicopathological characteristics, and medical resource utilization in patients diagnosed with AML and ineligible for aggressive chemotherapy in Romania. From the data collected, the clinical outcomes of patients are unsatisfactory, with an overall survival of 8.6 months for the entire study population, regardless of therapeutic options. Treatment with hypomethylating agents (azacitidine or decitabine) as first-line systemic therapy was more commonly used and was associated with a significant improvement in survival compared with best supportive therapy (10.0 vs 3.4 months).

**Conclusions:** Survival and outcomes of unfit patients diagnosed with acute myeloid leukemia remain poor, highlighting the unmet need for effective therapeutic options in this population category. The participating centers in this study are national and regional institutes involved in the management of hemato-oncological patients, serving the main geographical regions, being the most representative.

## **Study 2. The role of RNA methylation in azacitidine treatment in patients with high-grade myelodysplastic syndrome**

**Aim/Objectives:** Our hypothesis is that a more accurate prognosis could be based on methylome analysis, thus we used methylation sequencing to differentially divide high-grade MDS patients with identical demographic and cytogenetic features into those who responded and those who did not respond to azacitidine treatment.

**Material and methods:** Initially, 6 patients (n=6) were enrolled in the current study after signing informed consent forms. The clinico-demographic characteristics of the patients were similar, all having the same age range (60-65 years), diagnosis of MDS, IPSS intermediate grade 2 and normal karyotype. We compared patients who had a hematological response to azacitidine therapy (n=3) and received at least 6 cycles of therapy, subsequently losing response to treatment and evolving to acute myeloid leukemia with patients who achieved a long-term sustained hematological response (n=3). Validation of the MDS patient cohort was performed by collecting bone marrow from 58 patients diagnosed with MDS (n=58). Bone marrow aspirate was collected on KSEDTA-coated tubes and processed immediately to avoid sample denaturation.

**Results:** A gene with potential clinical impact in RNA methylation after azacitidine therapy in MDS was identified and could be ENSG0000000938 or SRC2, a FGR proto-oncogene, which has not previously been reported to have a role in RNA methylation in leukemogenesis.

**Conclusions:** Treatment resistance in neoplasia is still a challenge and, as is the case with MDS, it leads to a poor prognosis and subsequent patient death. Treatment

resistance, including chemotherapy or targeted therapy, may be influenced by RNA epigenetics and chromatin structure. Cheng et al. have shown that in malignant cells, RNA5-methylcytosine and mRNA5C methyltransferases mediate chromatin structures, which leads to the emergence of resistance to epigenetic treatment. Our study supports these data, but with regard to a less aggressive pathology such as MDS.

### **Study 3. The role of extrachromosomal circular DNA in acute myeloid leukemia**

**Aim/Objectives:** In the current study, it was proposed to evaluate the differences related to extrachromosomal circular DNA (eccDNA) between AML patients and healthy controls, so that further studies can be used to determine the impact of these molecules in the treatment and progression of AML.

**Material and methods:** The current study was a cross-sectional, case-control, analytical and observational study. Bone marrow aspirates were performed from 5 patients diagnosed with LAM and 5 healthy controls, between June 20, 2020 and October 8, 2020, the period during which the bilateral collaboration grant between Romania and the People's Republic of China was ongoing, the doctoral student being a member of the implementation team. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and with the approval of the ethics committee of the Sixth Medical Center, Chinese General Hospital, PLA.

**Results:** A group of genes presented a p value of 0 (considered by the software) and a log fold change of 1.74. All genes were derived from the mitochondrial genome. The eccDNAs encoding upregulated proteins were evaluated. Upon evaluation, it was observed that they were enriched with genes that are involved in myeloid cell differentiation, namely: JUNB, DNASE2, KLF1. Genes involved in cellular differentiation in general were also observed: JUNB, DNASE2, KLF1, CALR, IER2, LYL1.

**Conclusions:** In the present study, we have highlighted that there are several differences in eccDNA between healthy controls and patients with AML. These range from modifications of eccDNAs derived from the mitochondrial genome to the upregulation of those involved in myeloid differentiation. The differences also include the involvement of the genes from which the upregulated eccDNAs were derived in DNA binding. The results obtained may constitute new directions of study regarding eccDNA in AML, with implications for a better understanding of the biology of acute myeloid leukemia.

#### **Study 4. In vitro testing of the combination of azacitidine and olaparib in treatment-refractory acute myeloid leukemia**

**Purpose/Objectives:** The current study presents the clinical scenario of a 44-year-old woman who was diagnosed with two synchronous, relapsed neoplasias, namely ovarian carcinoma and acute myeloid leukemia. Simulations were performed for both refractory acute myeloid leukemia and de novo acute leukemia treated with first-line chemotherapy.

**Material and methods:** The first cell line, OCI/LAM3, is characterized by mutations in the NPM1 gene, a gene involved in single-strand DNA break repair, and the DNA methyltransferase 3 alpha (DNMT3A) mutation. The second cell line, THP-1, presents deletions and mutations in PTEN, MLL-AF9, MLLT3, TP73, and CDKN2A/B. Thus, we simulated all possible clinical scenarios in which a PARP inhibitor could be used in the clinic, in order to explain the underlying mechanisms of chemotherapy resistance and disease progression, since THP-1 is PTEN mutant and is susceptible to olaparib treatment. Both cell lines were cultured in vitro for treatment evaluation. OCI/LAM3 (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-Collection Germana de Microorganismos y Cultivos Celulares) and THP1 (ATCC-American Type Culture Collection) were plated in 96-well plates at 104 cells/200 µl/well in two types of media as follows: 80% alpha-MEM (Invitrogen) with 20% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen) for OCI/LAM3 or RPMI1640 (Invitrogen) with 10% FBS, 2 mM L-glutamine for THP1. They were then treated with 37.5 µM olaparib for 48 hours, 100 µM cytarabine, 1.4 µM daunorubicin and 10 µM azacitidine, in combination or alone. Cells were cultured in an incubator at 37° Celsius and 5% CO<sub>2</sub> as previously described. Cell proliferation was assessed using the CellTiter 96® non-radioactive water cell proliferation assay (Promega) and analyzed with the BioTek Synergy H1 hybrid multimode reader (BioTek Instruments).

**Results:** Regarding the effects of daunorubicin in combination with olaparib (ODC) and the cytarabine-daunorubicin regimen (RCD) on the proliferation of OCI/LAM3 and THP1 blast cells, ODC was shown to be as effective as RCD in decreasing the viability of treated cells that was compared between cell lines. Regarding the effects of ODC and RCD on the cell cycle stages of blasts in OCI/LAM3 and THP1 cell cultures, the combination of olaparib with daunorubicin has the ability to induce effects similar in magnitude to those induced by the cytarabine-daunorubicin regimen, comparing the percentage of cells in G1, S, G2-M and the cell stage, regardless of the cell line. In the cohort of mice treated with the combination chemotherapy 5-azacytidine plus olaparib, the tumor showed a decrease in size, the results being confirmed by the automated ROI measurement of the bioluminescent signal intensity. There were no significant changes in the body weight of the mice or other adverse side effects of the chemotherapy, which suggests that the treatment was well tolerated.

**Conclusions:** Acute myeloid leukemia is a malignant disease with a poor prognosis and requires new treatment alternatives especially in patients ineligible for aggressive chemotherapy. PARP inhibitors are targeted therapies for cancer and act by disrupting the dysfunctional response to DNA damage. AML with a particular mutational status might be sensitive to combinations of PARP inhibitors and cytotoxic molecules. NPM1 mutations are associated with dysfunctions in the DNA damage response. We therefore investigated the sensitivity of NPMA1-positive AML cells to therapeutic combinations of PARP inhibitors with chemotherapeutic agents. Our results showed that AML with the NPM1-DNMT3A mutation is likely to be as sensitive to combinations of PARP inhibitors plus anthracyclines, but not to their association with hypomethylating agents, at least in a preclinical setting.

## GENERAL CONCLUSIONS

1. Overall survival is 8.6 months for the entire study population, regardless of treatment options.

2. Treatment with hypomethylating agents (azacitidine or decitabine) as first-line systemic therapy was more frequently used and was associated with a significant improvement in survival compared with best supportive care (10.0 vs 3.4 months).

3. The current data provide relevant insights for our medical community and can serve as a basis for further research at the local level.

4. The mutational profile of extrachromosomal circular DNA may represent a prognostic factor in acute myeloid leukemia undergoing treatment, with particular clinical impact in current medical practice

5. RNA methylation represents a new biological mechanism that explains the initial response to therapy with hypomethylating agents in myelodysplastic syndromes, as well as the subsequent loss of response and clinical evolution towards acute myeloid leukemia, an oncological pathology with a poor prognosis compared to de novo AML.

6. Notch is a signaling pathway with an important role in regulating cellular processes, processes such as proliferation, differentiation or apoptosis. Its role in regulating these essential cellular processes makes the resulting disorders lead to the emergence of neoplasia and can affect cell populations such as cancer stem cells.

7. Current data suggest that activated Wnt signaling plays a key role in the development of various types of cancer, leading to tumor proliferation, disease aggressiveness, and metastasis. The complexity of this pathway is one of the challenges in discovering new therapies, at least in clinical trials.

## **ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF DOCTORAL RESEARCH**

1. This thesis presents real-life data on the response rate to conventional therapy in patients with acute myeloid leukemia, ineligible for intensive treatment, data with national representation, involving the largest hematology centers in Romania: Fundeni Clinical Institute Bucharest, Regional Institute of Oncology Iasi and Oncology Institute Cluj Napoca
2. This thesis addresses a new therapeutic option for patients diagnosed with acute myeloid leukemia with a synchronous gynecological malignancy – ovarian adenocarcinoma. These patients are ineligible for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and treatment based on hypomethylating agent and PARP inhibitors may represent a viable therapeutic option.
3. A preliminary study is presented describing the prognostic role of extrachromosomal circular DNA, with clinical impact in predicting therapeutic response.
4. A new molecular mechanism – that of RNA methylation – is described for the first time in the literature, thus explaining the initial response for patients with myelodysplastic syndrome receiving treatment with a hypomethylating agent, as well as the subsequent loss of response and clinical evolution towards acute myeloid leukemia.