

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL MEDICINĂ**

***BIOMARKERI ÎN NEOPLASMELE  
MIELOPROLIFERATIVE***

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. ȘTEFAN N. CONSTANTINESCU**

**Membru al Academiei Române**

**Student-doctorand:**

**MAMBET CRISTINA**

**2018**

## Cuprins

<b>Lista lucrărilor științifice publicate.....</b>	<b>5</b>
<b>Lista de abrevieri și simboluri.....</b>	<b>8</b>
<b>Introducere.....</b>	<b>11</b>
<b>I. Partea generală – stadiul actual al cunoașterii.....</b>	<b>17</b>
<b>1. Considerații privind bazele celulare și moleculare ale hematopoiezei.</b>	
<b>Implicații asupra dezvoltării neoplasmelor mieloproliferative (NMP).....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Celulele stem hematopoietice (CSH) - origine și proprietăți.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Modele ale hematopoiezei.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Citokinele cu rol în hematopoieză și receptorii acestora.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Căile de semnalizare intracelulară induse de citokinele hematopoietice - calea JAK-STAT.....</b>	<b>25</b>
<b>1.5 Micromediul din măduva osoasă - conceptul de nișă a CSH.....</b>	<b>28</b>
<b>2. Mecanisme patogenice în NMP.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Factorii determinanți ai patogenezii NMP.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Mutațiile somatice și consecințele biologice ale acestora.....</b>	<b>33</b>
2.2.1 Mutații driver fenotipice.....	34
2.2.2 NMP triplu negative.....	44
2.2.3 Mutații „non-NMP driver”.....	46
<b>2.3 Predispoziția familială și rolul variantelor liniei germinale.....</b>	<b>51</b>
<b>2.4 Inflamația cronică și alterările micromediului medular.....</b>	<b>53</b>
<b>3. Abordarea diagnostică, evaluarea factorilor de prognostic și strategii terapeutice în NMP.....</b>	<b>58</b>
<b>3.1 Heterogenitatea manifestărilor clinice în NMP.....</b>	<b>58</b>
<b>3.2 Diagnosticul NMP.....</b>	<b>59</b>
3.2.1 Diagnosticul TE.....	59
3.2.2 Diagnosticul PV.....	60
3.2.3 Diagnosticul MFP.....	61
<b>3.3 Evaluarea factorilor de prognostic în NMP.....</b>	<b>62</b>
3.3.1 Prognosticul general și complicațiile majore ale pacienților cu NMP.....	62

3.3.2 Factorii predictivi pentru complicații vasculare.....	62
3.3.3 Factorii ce influențează progresia către MF secundară.....	63
3.3.4 Factorii ce influențează rata de supraviețuire și transformarea leucemică.....	64
<b>3.4 Tratatamentul NMP.....</b>	<b>65</b>
3.4.1 Opțiuni terapeutice actuale. Terapia adaptată în funcție de categoria de risc.....	65
3.4.2 Noi perspective terapeutice.....	69
<b>II. Contribuții personale.....</b>	<b>70</b>
<b>4. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....</b>	<b>70</b>
<b>5. Metodologia cercetării.....</b>	<b>71</b>
<b>6. Studiul corelațiilor markerilor moleculari cu fenotipul și evoluția bolii în NMP debutate cu trombocitoză.....</b>	<b>72</b>
<b>6.1 Introducere.....</b>	<b>72</b>
<b>6.2 Material și metode.....</b>	<b>73</b>
6.2.1 Pacienți și probe.....	73
6.2.2 Screening-ul mutației <i>JAK2</i> V617F prin tehnica PCR cu specificitate alelică.....	74
6.2.3 Cuantificarea alelei <i>JAK2</i> V617F prin tehnica Real-Time PCR cantitativ (qPCR).....	74
6.2.4 Determinarea mutațiilor exonului 9 <i>CALR</i> prin secvențiere bidirecțională Sanger.....	75
6.2.5 Determinarea mutațiilor <i>MPL</i> W515L/K prin tehnica Real-Time PCR.....	77
6.2.6 Determinarea mutațiilor exonului 10 <i>MPL</i> prin secvențiere bidirecțională Sanger.....	77
6.2.7 Secvențierea NGS țintită pentru detectarea mutațiilor somatice....	78
6.2.8 Prelucrarea statistică a datelor.....	80
<b>6.3 Rezultate.....</b>	<b>80</b>
6.3.1 Caracterizarea fenotipică a lotului de pacienți analizat.....	80
6.3.2 Stabilirea profilului de mutații driver.....	83
6.3.3 Impactul mutațiilor driver asupra evoluției clinice și a parametrilor de laborator în TE.....	89

6.3.4 Impactul mutațiilor driver asupra evoluției clinice și a parametrilor de laborator în MFP.....	94
6.3.5 Relevanța clinică a V617F% la pacienții cu NMP debutate cu trombocitoză .....	96
6.3.6 Secvențierea NGS țintită în cazuri particulare de NMP.....	96
<b>6.4 Discuții.....</b>	<b>99</b>
<b>7. Analiza relevanței clinice și funcționale a variantei <i>JAK2</i> R1063H în NMP cu mutație <i>JAK2</i> V617F.....</b>	<b>104</b>
<b>7.1 Introducere.....</b>	<b>104</b>
<b>7.2 Material și metode.....</b>	<b>105</b>
7.2.1 Pacienți și probe.....	105
7.2.2 Genotiparea mutației <i>JAK2</i> R1063H prin tehnica de genotipare TaqMan PCR.....	105
7.2.3 Secvențierea NGS țintită pentru detectarea a mutațiilor somatice ..	107
7.2.4 Cuantificarea alelelor <i>JAK2</i> R1063H și V617F prin tehnica Droplet Digital PCR (ddPCR).....	107
7.2.5 Analiza configurației <i>cis/trans</i> a mutațiilor <i>JAK2</i> V617F și R1063H.....	108
7.2.6 Mutageneza și obținerea vectorilor retrovirali ce exprimă mutații <i>JAK2</i> .....	110
7.2.7 Transfecția celulelor $\gamma$ 2A și testul raportor luciferazic dual.....	112
7.2.8 Tehnica de Western blotting pentru studiile de semnalizare.....	114
7.2.9 Prelucrarea statistică a datelor.....	115
<b>7.3 Rezultate.....</b>	<b>119</b>
7.3.1 Caracteristicile clinice, hematologice și moleculare ale pacienților purtători ai ambelor mutații <i>JAK2</i> V617F și R1063H.....	119
7.3.2 Stabilirea genotipului <i>JAK2</i> R1063H, a încărcării mutaționale R1063H precum și a configurației <i>cis/trans</i> a mutațiilor <i>JAK2</i> V617F și R1063H.....	123
7.3.3 Mutația <i>JAK2</i> R1063H din domeniul kinazic induce creșterea activității constitutive a oncoproteinei <i>JAK2</i> V617F.....	129
<b>7.4 Discuții.....</b>	<b>135</b>
<b>8. Screening-ul proteomic multianalit pentru identificarea unor posibili</b>	<b>138</b>

<b>biomarkeri plasmatici cu expresie diferențiată în subtipurile NMP.....</b>	
<b>8.1 Introducere.....</b>	<b>138</b>
<b>8.2 Material și metode.....</b>	<b>139</b>
8.2.1 Pacienți și metode.....	139
8.2.2 Screening-ul proteomic multianalit prin metoda dot-blot.....	139
8.2.3 Tehnica ELISA cantitativă pentru determinarea nivelurilor plasmatiche ale proteinei Dkk-1 (Dickkopf-related protein 1).....	142
8.2.4 Prelucrarea statistică a datelor.....	142
<b>8.3 Rezultate.....</b>	<b>143</b>
8.3.1 Caracterizarea lotului de pacienți și a pool-urilor de plasmă analizate.....	143
8.3.2 Setul de proteine plasmatiche relevante detectate la pacienții cu NMP în urma screening-ului cu kitul multianalit de tip dot-blot.....	143
8.3.3 Nivelurile plasmatiche Dkk-1 în subtipurile NMP.....	147
8.3.4 Distribuția V617F% între subtipurile NMP și analiza corelației dintre nivelurile plasmatiche Dkk-1 și V617F%.....	150
<b>8.4 Discuții .....</b>	<b>150</b>
<b>9. Concluzii și contribuții personale.....</b>	<b>153</b>
<b>Bibliografie.....</b>	<b>160</b>
<b>Anexe.....</b>	<b>184</b>

## Introducere

Tema proiectului de cercetare științifică care a stat la baza acestei teze de doctorat se referă la neoplasmele mieloproliferative (NMP) fără cromozom Philadelphia sau *BCR-ABL1* negative – o categorie de afecțiuni clonale ale celulei stem hematopoietice (CSH), caracterizate printr-o producție excesivă de celule sangvine mieloidă diferențiate terminal, ce își păstrează integritatea funcțională [1].

Clasic, NMP sunt divizate în trei entități clinico-patologice: policitemia vera (PV), trombocitemia esențială (TE) și mielofibroza primară (MFP). În timp ce TE se caracterizează prin trombocitoză, PV are ca element definitoriu creșterea masei eritrocitare însoțită adesea de proliferarea liniilor granulocitară și megakariocitară [2]. La rândul său, MFP este o afecțiune mult mai heterogenă, fiind caracterizată prin mieloproliferare clonală, expresie anormală de citokine, fibroză a măduvei osoase, anemie, splenomegalie, hematopoieză extramedulară, simptome constituționale și o durată de supraviețuire mai mică comparativ cu TE și PV. Pe de altă parte, în cursul evoluției naturale a bolii, PV și TE se pot transforma în mielofibroza (MF) secundară [2, 3]. În plus, definirea unor entități precum MFP în stadiu „prefibrotic” (pre-MFP) și PV „mascată” (PV-m) indică faptul că, în practică, delimitarea celor trei afecțiuni poate fi uneori dificilă [3, 4].

NMP prezintă o serie de particularități, unele dintre acestea fiind încă în curs de caracterizare, constituind o temă interesantă pentru direcții noi de cercetare. Astfel, deși sunt boli cu evoluție cronică, adesea indolentă, NMP prezintă un risc crescut de complicații trombotice, mai rar hemoragice, de progresie către MF, precum și de transformare în leucemie acută mieloidă secundară (LAMs), în majoritatea cazurilor rezistentă la chimioterapie. Cu toate că s-a înregistrat un progres remarcabil în caracterizarea mecanismelor moleculare ce intervin în patogenia NMP, agenții terapeutici actuali nu au potențial curativ și nu pot modifica evoluția naturală a bolii. De asemenea, succesiunea evenimentelor moleculare cu rol direct în progresia NMP către MF și mecanismul molecular al LAMs sunt insuficient precizate [5]. Nu în ultimul rând, evoluția bolii la nivel individual este adesea dificil de anticipat la momentul stabilirii diagnosticului [6].

Din punct de vedere patogenetic, NMP sunt caracterizate prin prezența de mutații driver somatice ce afectează exoni specifici ai genelor Janus kinazei 2 (*JAK2*), receptorului pentru trombopoietină (*MPL/TPOR*) și calreticulinei (*CALR*). Aceste alterări genetice conduc la activarea constitutivă a semnalizării JAK/STAT (engl; Janus kinase /signal transducer and activator of transcription) în prezența receptorilor citokinici de tip mieloid,

cu inițierea mieloproliferării clonale și determinarea fenotipului bolii [1]. Deși profilul de mutații driver specifice NMP este limitat la genele menționate, diversitatea fenotipică întâlnită în practica hematologică indică faptul că patogenia acestor afecțiuni este mult mai complexă, alături de mutațiile driver fiind implicate mutații somatice adiționale, predispoziția genetică, inflamația cronică, precum și alți factori [7]. În special influența unor variante ale liniei germinale, cum ar fi cele ale genei *JAK2*, ce coexistă cu mutațiile driver, asupra fenotipului și riscului de complicații în NMP, este mai puțin studiată.

Deși NMP sunt considerate boli rare ce afectează persoanele vârstnice, în ultimii ani s-a constatat o creștere a prevalenței acestora și un debut al bolii la o vârstă mai tânără, această tendință fiind parțial explicată de disponibilitatea mai mare a testelor moleculare, ce permit un diagnostic precoce în prezența unor anomalii izolate ale parametrilor hematologici.

Pentru un management mai adecvat al pacienților cu NMP este necesară îmbunătățirea modelelor prognostice actuale prin identificarea și utilizarea unor noi *biomarkeri* genomici sau proteomici – anumiți parametri măsurabili care să se coreleze cu progresia bolii sau cu susceptibilitatea de a răspunde la un anumit tratament. Spre exemplu, prin includerea profilului de mutații somatice, evaluarea prognostică a fiecărei entități nosologice de NMP ar fi îmbunătățită considerabil și ar putea fi delimitate noi subgrupuri de boală cu impact asupra evoluției clinice [8]. Din perspectiva proteomicii, anumite citokine circulante sau alte proteine solubile ar putea reprezenta biomarkeri informativi cu privire la fenotipurile clinice de NMP și durata de supraviețuire a pacienților [9].

Toate aceste date au contribuit la alegerea temei prezentei lucrări și a proiectului de cercetare științifică care s-a desfășurat pe trei direcții principale de studiu, prin participarea activă în echipe multidisciplinare din România, Belgia și Cehia.

În **Partea generală** a acestei lucrări s-a urmărit evidențierea unor aspecte relevante legate de mecanismele patogenice implicate în dezvoltarea NMP, diagnosticul și strategiile terapeutice actuale, ce au rezultat în urma studierii amănunțite a publicațiilor apărute în ultimii ani.

Având în vedere faptul că NMP își au originea în compartimentul CSH prin achiziția de mutații somatice ce inițiază hematopoieza clonală și fenotipul mieloproliferativ, cu remodelarea progresivă a nișei măduvei osoase, **Capitolul 1** introduce noțiuni fundamentale legate de originea și proprietățile CSH, prezintă comparativ modele clasice și revizuite ale hematopoiezei, descrie rolul citokinelor hematopoietice și al receptorilor

pentru citokine în semnalizarea celulară și ilustrează modul în care componentele celulare și moleculare ale nișei medulare asigură homeostazia hematopoietică pe tot parcursul vieții.

CSH constituie o populație celulară rară ce prezintă atât capacitatea de autoreînnoire, menținându-și astfel numărul, cât și capacitatea de diferențiere în toate liniile celulare sangvine [10]. CSH se caracterizează printr-o mare heterogenitate în ceea ce privește gradul de auto-reînnoire, modul de diferențiere, durata de viață și cinetica reconstituirii populației medulare după transplant [11]. De asemenea, au fost identificate subseturi celulare distincte în compartimentul CSH ce contribuie în mod diferit la generarea de celule sangvine mature [12].

Modelul tradițional al hematopoiezei, bazat în principal pe sistemul de definire a tipului celular cu ajutorul markerilor de suprafață, presupune existența unei ierarhii celulare în vârful căreia sunt plasate CSH din care iau naștere progresiv, asemenea ramurilor unui arbore, o serie de progenitori multipotenți, oligopotenți și unipotenți ce se vor diferenția în celule sangvine mature [13, 14]. Deși modelul ierarhic al hematopoiezei este în continuare utilizat pentru investigarea mecanismelor moleculare ce stau la baza diferențierii CSH, devine din ce în ce mai evident că acesta nu poate susține complexitatea etapelor inițiale ale hematopoiezei, iar informațiile obținute prin aplicarea noilor tehnologii în cercetarea fundamentală indică necesitatea revizuirii radicale a conceptului de structură stabilă, înalt compartimentalizată a sistemului hematopoietic [12, 13]. Aceste revizuri survenite în modelul hematopoiezei pot avea implicații majore asupra diagnosticului, prognosticului și tratamentului neoplaziilor hematologice, inclusiv a NMP ce își au originea în compartimentul CSH. Având în vedere fluiditatea stărilor celulare ce caracterizează acest compartiment este puțin probabil ca aceeași mutație somatică cauzatoare de boală la pacienți diferiți să se producă în stări celulare identice, contribuind astfel la varietatea fenotipică a NMP observată în practica clinică curentă [12].

Citokinele implicate în hematopoieză pot fi secretate de celulele stromale din măduva osoasă, limfocite, monocite, precum și de organe non-hematopoietice (rinichi, ficat) [15]. Prin legarea și activarea unor receptori proprii [16] citokinele hematopoietice controlează producția de elemente figurate ale sângelui, atât în condiții bazale cât și ca răspuns la factori de stres (infecții, sângerări, hipoxie) [17].

Receptorii de tip mieloid (implicați în generarea liniilor mieloide) – receptorul pentru eritropoietină (EPOR), receptorul pentru trombopoietină (TPOR) și receptorul pentru factorul de creștere al coloniilor pentru granulocite (G-CSFR) – fac parte din



categoria receptorilor citokinici de tip 1 homodimerici, ce nu au activitate kinazică intrinsecă, fiind asociați cu tirozinkinaze citoplasmice – membrii ai familiei de Janus kinaze (JAK) – pentru a asigura propagarea semnalului [18]. Receptorii pentru citokinele hematopietice declanșează în mod caracteristic cascade de semnalizare ce includ atât calea JAK-STAT cât și căile fosfatidilinozitol-3-kinazei (engl., phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) și protein-kinazei activate de mitogeni (engl., mitogen-activated protein kinase, MAPK) ce sunt dependente, de asemenea, de activarea kinazelor JAK. Fiziologic, citokinele hematopietice induc doar o activare tranzitorie a semnalizării JAK2-STAT, intervenind mecanisme care stopează semnalizarea [19].

Micromediul din măduva osoasă care asigură starea de echilibru între latență, proliferare și diferențiere a CSH a fost denumit nișă a CSH [20]. Nișa CSH a fost delimitată în 2 compartimente, nișa endosteală (osteoblastică) și nișa vasculară. Conform unor studii anterioare, nișa vasculară a fost asociată doar cu susținerea proliferării și diferențierii CSH, dar recent a fost evidențiat și rolul acesteia în menținerea CSH [21]. Tipurile de celule asociate cu nișa CSH includ atât celule non-hematopietice aparținând stromei medulare - celule mezenchimale, endoteliale și neurale - cât și celule hematopietice cum ar fi megakariocitele, monocitele și macrofagele. Factorii de creștere cu rol direct în menținerea CSH la nivelul nișelor în condiții bazale sunt: factorul celulelor stem (SCF), ligandul 12 al chemokinei cu motiv CXC (CXCL12) și trombopoietina (TPO) [22]. Alterările produse la nivelul nișei medulare ca urmare a producției anormale de citokine au fost asociate cu progresia bolii în NMP, fiind reprezentate de: reducerea numărului de fibre nervoase simpatice, angiogeneză, afectarea capacității de diferențiere a celulelor mezenchimale cu expansiunea osteoblastelor și fibroza reticulică [23].

**Capitolul 2** al tezei are ca temă centrală prezentarea factorilor dobândiți și constituționali cu rol determinant în patogeneza NMP: tipul mutației driver fenotipice și încărcarea alelei mutante, heterogenitatea CSH ce achiziționează mutația driver, prezența unor mutații somatice adiționale, arhitectura clonală și ordinea achiziției mutațiilor, predispoziția familială și variante ale liniei germinale, interacțiunea clonei neoplazice cu micromediul medular și inflamația cronică [7, 24].

Profilul mutațional al NMP este în mare parte elucidat, fiind identificate mutații somatice la nivelul unor exoni specifici ai genelor *JAK2*, *MPL (TPOR)* și *CALR*, ce sunt responsabile de inițierea mieloproliferării clonale și de dezvoltarea unui fenotip NMP. Aceste mutații asociate cu NMP, denumite **mutații driver fenotipice** sau **mutații „NMP-driver”**, activează direct sau indirect semnalizarea JAK2/STAT prin receptorii pentru

citokine de tip mieloid [4, 25, 26] și sunt capabile să inducă un fenotip mieloproliferativ pe diferite modele murine [1, 8].

Principala mutație asociată cu NMP este mutația activatoare *JAK2* V617F, localizată în exonul 14, care este întâlnită în toate cele 3 fenotipuri de boală (>95% din PV și 50 - 60% din TE și MFP). La nivelul exonului 12 genei *JAK2* sunt descrise anumite deleții/insertii mici în exonul 12, ce sunt asociate cu majoritatea cazurilor de PV *JAK2* V617F negative. Mutațiile în gena *MPL/TPOR* sunt tot mutații de tip activator ce sunt întâlnite exclusiv în TE (2-3% din cazuri) și MFP (3-5% din cazuri). Mutațiile *CALR*, localizate la nivelul ultimului exon al genei, sunt responsabile de cele mai multe cazuri de TE și MFP negative pentru mutațiile *JAK2* și *MPL*. Acestea conferă o funcție neomorfică proteinei *CALR* mutante ce are ca rezultat activarea receptorului *MPL* [1, 8, 24]. În aproximativ 5-10% din cazurile MFP și până la 20% din cazurile de TE nu este identificată niciuna din mutațiile driver fenotipice menționate, aceste NMP fiind denumite „triplu-negative” (NMP-TN) [8, 27]. Prin aplicarea unor metode bazate pe tehnologii noi, ca secvențierea de ultimă generație (engl. next-generation sequencing, NGS) țintită sau secvențierea întregului exom (engl. whole-exome sequencing, WES), s-a arătat că NMP-TN prezintă un profil molecular complex care include atât mutații *MPL/TPOR* și *JAK2* non-canonice (localizate în afara exonului 10, respectiv a exonilor 12 și 14, ce nu sunt detectate la testarea moleculară convențională), mutații *JAK2* și *MPL* canonice cu încărcare alelică foarte scăzută în granulocite sau prezente numai la nivelul ARN-ului izolat din trombocite, precum și mutații care nu sunt specifice NMP, fiind întâlnite și în alte neoplazii mieloides [28-30]. Pe lângă faptul că NMP-TN nu reprezintă o entitate omogenă, s-a arătat că unele cazuri sunt asociate cu hematopoieză policlonală, sugerând faptul că acestea reprezintă mai degrabă afecțiuni benigne ale trombocitelor, ca trombocitoza ereditară, decât NMP veritabile [1, 8]. Prin urmare, evaluarea diagnostică a NMP-TN este dificilă în practica hematologică curentă, astfel că se impune definirea și implementarea unor noi strategii de diagnostic molecular pentru a pune în evidență anomaliile asociate cu fenotipul bolii, ce nu sunt evidente la „prima vedere” [31].

La pacienții cu NMP, alături de mutațiile driver fenotipice au fost identificate mutații somatice inactivatoare sau neomorifice care nu acționează în principal asupra mieloproliferării, dar care pot accentua sau modifica efectele mutațiilor driver fenotipice. Aceste mutații, denumite **mutații „non-NMP driver”** sau mutații cu rol în modificarea evoluției bolii, se produc în principal în gene implicate în controlul epigenetic și nu sunt

specifice NMP, fiind întâlnite și în alte neoplazii mieloid: LAM și sindromul mielodisplazic (SMD) [8, 25].

Deși majoritatea cazurilor de NMP se produc sporadic, studiile epidemiologice au arătat că aproximativ 7-8% din pacienții afectați aparțin unor familii în care au fost raportate mai multe cazuri de NMP, de obicei cu același fenotip. În plus, rudele de gradul întâi ale pacienților cu NMP prezintă un risc de 5-7 ori mai mare de a dezvolta boala [32]. Analiza pedigree-ului familiilor cu NMP a indicat o mare heterogenitate a modului de transmitere a bolii, sugerând că există mai mulți factori de susceptibilitate aparținând liniei germinale [33]. Au fost descrise două categorii de factori ai liniei germinale ce influențează dezvoltarea NMP: pe de o parte, mutații rare ale liniei germinale (*ATG2B*, *GSKIP*, *RBBP6*, *SH2B3*) care explică o parte din cazurile de NMP familiale [32], iar pe de altă parte, variante genetice comune în populația generală, cum ar fi haplotipul *JAK2* 46/1 (GGCC), considerat în prezent factorul de predispoziție cel mai puternic pentru cazurile sporadice de NMP *JAK2* V617F (+) [33]. Variantele liniei germinale, pe lângă rolul predispozant, ar putea exercita o influență și asupra fenotipului și evoluției bolii în NMP, însă datele sunt puțin numeroase în acest sens [32].

NMP și în special MFP se asociază cu un răspuns inflamator important, așa cum o demonstrează existența nivelurilor plasmatice crescute de citokine inflamatorii la pacienții cu aceste afecțiuni, incidența crescută a unor comorbidități reprezentate de boli autoimune și mediate de inflamație, precum și prezența simptomelor constituționale ameliorate de terapiile anti-inflamatorii [1]. Se consideră că inflamația cronică ar putea contribui la apariția complicațiilor majore din NMP: tromboembolismul [34], evoluția clonală în NMP și progresia bolii către transformare mielofibrotică sau leucemică [35]. Alterările micromediului medular, aflate în relație strânsă cu inflamația cronică, culminează cu dezvoltarea fibrozei medulare, acompaniată de neoangiogeneză, osteoscleroză, mobilizarea CSH în sângele periferic și splină, și instalarea hematopoiezei extramedulare [36].

**Capitolul 3** al tezei se referă la diagnosticul, evaluarea factorilor de prognostic (factorii predictivi pentru complicațiile vasculare, factori ce influențează progresia către MF secundară, rata de supraviețuire și transformarea leucemică) și strategiile terapeutice în cele 3 entități nosologice NMP: TE, PV și MFP. Diagnosticul fiecărui subtip NMP se bazează pe o combinație de date clinice, morfologice și de genetică moleculară, utilizând criteriile revizuite recent (2016) de OMS [37]. Stratificarea corectă a pacienților cu ajutorul scorurilor de prognostic permite instituirea unei terapii adaptate în funcție de categoria de risc [5].

Partea de **Contribuții personale** începe cu **Capitolul 4** în care sunt prezentate ipoteza de lucru și obiectivele generale.

Caracterizarea recentă a spectrului de mutații somatice driver în genele *JAK2*, *MPL* și *CALR* și includerea celor trei markeri moleculari în noile criterii OMS din 2016 a deschis posibilitatea diagnosticului precoce al NMP *BCR-ABL1* negative. Deși cunoașterea statusului mutațiilor driver oferă informații cu relevanță prognostică importantă, heterogenitatea fenotipică a NMP și dificultatea anticipării modului de evoluție al acestor afecțiuni, mai ales în cazul unui diagnostic în stadiile asimptomatice ale bolii, continuă să reprezinte provocări în practica hematologică actuală. Identificarea unor factori genetici de predispoziție pentru dezvoltarea NMP, atât sub forma unor polimorfisme comune în populație, cât și de mutații rare în anumite cazuri familiale de NMP, a evidențiat contribuția acestora la patogenia bolii. Cu toate acestea, impactul unor variante ale liniei germinale, spre exemplu în gena *JAK2*, asupra fenotipului și progresiei bolii în NMP sunt insuficient precizate. Nu în ultimul rând, având în vedere faptul că examenul histopatologic al măduvei osoase reprezintă în continuare elementul central în delimitarea unor subtipuri NMP cu semnificație prognostică, este necesar să fie identificați biomarkeri de diagnostic și prognostic *neinvazivi*, în produse biologice ca serul sau plasma, pentru obținerea cărora există o acceptare mai largă din partea pacienților.

Având ca punct de plecare aceste considerații teoretice și practice, cercetarea științifică din cadrul acestei teze de doctorat și-a propus următoarele obiective generale:

**1. Studiul corelațiilor markerilor moleculari cu fenotipul și evoluția bolii în NMP debutate cu trombocitoză.**

**2. Analiza relevanței clinice și funcționale a variantei *JAK2* R1063H în NMP cu mutație *JAK2* V617F.**

**3. Screening-ul proteomic multianalit pentru identificarea unor posibili biomarkeri plasmatici cu expresie diferențiată în subtipurile NMP.**

**Capitolul 5** include o descriere succintă a metodologiei cercetării. Pentru îndeplinirea celor 3 obiective generale au fost selectate mai multe loturi de subiecți dintr-o cohortă mare de pacienți cu NMP din România și Belgia, fiind utilizate tehnici de genetică moleculară (reacție de polimerizare în lanț - PCR, secvențiere clasică Sanger și NGS) pentru analiza biomarkerilor genomici, tehnici de mutageneză, clonare, transfecție celulară

și Western blotting pentru studiile funcționale *in vitro*, precum și tehnici de proteomică de tip multianalit și ELISA pentru studiul de biomarkeri proteomici.

Sursa probelor biologice a fost reprezentată în principal de biobanca existentă în Institutul de Virusologie „Ștefan S Nicolau” (IVN) încă din anul 2006, ce conține probe de ADN, plasmă și celule sanguine provenite de la pacienți cu NMP. Pe măsura ce alți pacienți s-au adresat institutului în vederea testării mutației *JAK2 V617F* biobanca a fost completată cu probe noi, fiind urmată o procedură standard de recoltare a probelor de sânge periferic.

**Capitolul 6** conține ipoteza de lucru, metodele utilizate și rezultatele obținute pentru primul studiu al proiectului de cercetare care a avut ca obiectiv general analiza impactului clinic și hematologic al mutațiilor driver majore în cazurile de NMP care au prezentat la debut o anomalie a hemogramei frecvent întâlnită în practică: trombocitoza. În acest scop, a fost selectat un lot de 372 pacienți, cu o mediană a vârstei la diagnostic de 55 ani, aflați în evidența Clinicilor de Hematologie ale Spitalului Colțea și Institutului Clinic Fundeni, pacienți având trombocitoză persistentă și diagnostic confirmat de NMP. Mediana perioadei de monitorizare a pacienților din momentul stabilirii diagnosticului a fost de 7 ani. Au fost utilizate probe biologice stocate în biobanca IVN, iar datele clinice la debutul și pe parcursul evoluției bolii au fost obținute prin colaborarea strânsă cu medicii din clinicile menționate, fiind formulate următoarele obiective specifice:

- Stabilirea profilului de mutații driver în lotul de pacienți selectat pentru studiu, prin aplicarea unor tehnici PCR și de secvențiere Sanger.
- Analiza impactului exercitat de fiecare mutație driver asupra caracteristicilor clinice, parametrilor de laborator, supraviețuirii globale și a ratei de apariție a complicațiilor în subtipurile NMP (evenimente trombotice majore sau episoade de hemoragie severă, progresia către mielofibroză, transformarea în LAMs).
- Evidențierea rolului detectării de mutații somatice adiționale, prin tehnologia de secvențiere NGS, în caracterizarea unor cazuri particulare de NMP.

Rezultatele acestui prim studiu au fost:

1. Aderarea strictă la criteriile OMS 2016 a permis diferențierea a trei fenotipuri de boală în lotul de 372 pacienți cu NMP și trombocitoză la debut: TE (fenotipul predominant, 76.8%), PV (9.2%, majoritatea cazurilor fiind PV-m) și MFP (14%, predominant cazuri de pre-MFP). Întrucât pacienții cu PV au înregistrat o frecvență mai mare a evenimentelor trombotice majore, atât la debut cât și pe parcursul evoluției bolii, comparativ cu cei încadrați în fenotipul TE (17.6 vs 5.2%,  $P=0.015$ ), iar pacienții cu MFP

au avut o rată semnificativ mai mare de transformare în SMD/LAMs (7.7 vs 1.4%,  $P=0.022$ ) față de cei cu TE, a fost confirmată valoarea prognostică a discriminării TE de celelalte fenotipuri NMP (secțiunea 6.3.1).

2. La pacienții purtători de mutație *JAK2* V617F, valorile V617F% nu au permis diferențierea TE de PV ( $P=0.235$ ), în schimb au fost semnificativ mai mari în PMF comparativ cu TE ( $P=0.003$ ).

3. La pacienții cu TE ( $n=286$ ) a fost obținut următorul profil al mutațiilor driver: *JAK2* V617F 66.5%, *CALR* 19.5% (55.3% mutații *CALR* de tip 1 sau „tip 1-like” și 44.7% mutații *CALR* de tip 2 sau „tip 2-like”) și *MPL* W515L/K 1.8%, cazurile de TE-TN ocupând o pondere de 12.2% (secțiunea 6.3.3). Profilul obținut fost asemănător cu cel raportat în studiile din Europa și SUA, cu excepția unei frecvențe mai scăzute a mutațiilor *MPL*.

4. În TE, pacienții purtători de mutații *CALR* au prezentat modificări semnificative ale parametrilor hemogramei comparativ cu cei purtători de mutație *JAK2* V617F, respectiv valori mai scăzute ale hemoglobinei și hematocritului ( $P<0.0001$ , respectiv  $P=0.0004$ ) și un număr mai mare de trombocite ( $P=0.0005$ ), modificările fiind mai pregnante în cazul tipului 2 de mutații *CALR* (secțiunea 6.3.3).

5. Pacienții cu TE *CALR* (+) nu au prezentat episoade de tromboză arterială sau venoasă în perioada de monitorizare a bolii. Valoarea semnificativ scăzută a scorului fosfatazei alcaline leucocitare (FAL, indicator al activării granulocitelor) la acești pacienți, comparativ cu celelalte subgrupuri moleculare, ar putea fi asociată cu un risc trombotic redus (secțiunea 6.3.3).

6. Pe de altă parte, frecvența cazurilor de progresie către MF secundară a fost semnificativ mai mare în subgrupul TE *CALR* (+), iar intervalul de timp de la diagnostic la dezvoltarea complicației a fost mai scurt, comparativ cu subgrupul TE *JAK2* V617F (+) (10.7 vs 1.6%, respectiv 7 vs 10 ani - valori mediane,  $P=0.005$ ). Mutațiile *CALR* de tip 1 au fost majoritare (83.3%) la acești pacienți (secțiunea 6.3.3).

7. Subgrupul TE „triplu negativ” (TE-TN) a fost caracterizat printr-o vârstă la debutul bolii mult mai tânără, afectarea aproape exclusivă a sexului feminin, o incidență mai scăzută a splenomegaliei, a nivelului seric LDH crescut și a tratamentului citoreductiv, precum și prin absența cazurilor de transformare mielofibrotică sau leucemică. În schimb, s-a înregistrat o frecvență crescută a evenimentelor trombotice la debutul bolii (secțiunea 6.3.3).

8. Grupul pacienților cu MFP (n=52) a prezentat următoarele frecvențe ale mutațiilor driver: *JAK2* V617F 67.3%, *CALR* 30.8% și *MPL* W515L 1.9%. La pacienții cu MFP *CALR* (+) tipul 1 de mutație a fost majoritar (81.2%). Alături de o frecvență mai redusă a mutațiilor *MPL* în comparație cu datele din literatură, nu au fost înregistrate cazuri „triplu-negative”, cunoscute ca fiind asociate cu o vârstă mai înaintată la diagnostic, un număr mai scăzut de trombocite, evoluție nefavorabilă și reducerea importantă a duratei de supraviețuire. Această constatare este cel mai probabil legată de caracteristicile lotului studiat, fiind incluși majoritar pacienți cu MFP având o vârstă mai tânără la debut și aflați în stadii inițiale de boală, manifestând trombocitoză semnificativă (secțiunea 6.3.4).

9. Subgrupul MFP *JAK2*-mutant a prezentat un număr semnificativ mai mare de leucocite totale și granulocite neutrofile comparativ cu subgrupul *CALR* (+) (P=0.049, respectiv P=0.045) (secțiunea 6.3.4).

10. Progresia bolii de la stadiul prefibrotic la cel fibrotic a fost confirmată prin examenul BMO la 14.4% din pacienții cu pre-PMF, aparținând exclusiv subgrupului *JAK2* V617F (+) (secțiunea 6.3.4). Cu toate acestea, numărul redus de pacienți cu MFP nu a permis evidențierea unor diferențe semnificative privind prognosticul între subtipurile moleculare identificate.

11. Deși frecvența mutațiilor *MPL* în întreg lotul analizat a fost scăzută (n=6, 1.6%) datele clinice sugerează o evoluție nefavorabilă: pacientul cu MFP a suferit transformare leucemică după 3 ani de la diagnostic, iar dintre cei 5 pacienți cu TE, unul a prezentat progresie către MF secundară după 4 ani de la debut, iar celălalt AVC ischemic la o vârstă tânără. Toți cei 3 pacienți au fost purtători de mutație *MPL* W515L (secțiunile 6.3.3 și 6.3.4).

12. Secvențierea NGS țintită a permis identificarea unor mutații somatice suplimentare la 3 pacienți cu NMP ce au suferit transformare blastică (secțiunea 6.3.5).

Având în vedere faptul că NMP sunt afecțiuni cu evoluție cronică, iar complicațiile bolii se pot dezvolta uneori după perioade îndelungate de timp, este necesară continuarea acestui studiu pentru a obține date suplimentare legate de impactul mutațiilor *MPL* cu frecvență redusă în lotul studiat și al tipurilor distincte de mutații *CALR*, asupra duratei de supraviețuire și dezvoltării de complicații, pe un număr mai mare de pacienți cu NMP, proveniți de la clinici de referință din România. De asemenea, este important să fie caracterizate molecular cazurile de NMP-TN, ce pun probleme de stabilire a atitudinii terapeutice.

**Capitolul 7** include modul în care a fost îndeplinit cel de-al doilea obiectiv al cercetării și rezultatele obținute. Premisa studiului a fost faptul că există puține date referitoare la impactul asupra fenotipului și evoluției bolii a variantelor *JAK2* ce coexistă împreună cu mutațiile driver majore. Varianta missens a liniei germinale *JAK2* R1063H a fost descrisă anterior într-un caz pediatric de eritrocitoză ereditară [38], precum și la 3 din 93 pacienți cu PV *JAK2* V617F (+) [39].

Pentru a verifica ipoteza potrivit căreia varianta *JAK2* R1063H ar putea avea un impact clinic și funcțional la pacienții cu NMP purtători ai mutației driver *JAK2* V617F, am inițiat acest studiu având următoarele obiective specifice:

- Documentarea prezenței simultane a mutațiilor *JAK2* V617F și R1063H într-o cohortă de pacienți cu NMP din România și Belgia, în cadrul unei colaborări internaționale.
- Caracterizarea fenotipică a pacienților purtători ai ambelor mutații.
- Detectarea unor posibile mutații somatice adiționale la pacienții ce prezintă concomitent *JAK2* V617F și R1063H.
- Identificarea consecințelor funcționale ale coexistenței *JAK2* V617F și R1063H asupra semnalizării *JAK2*.

În urma testării moleculare pentru *JAK2* R1063H a 390 pacienți cu NMP *JAK2* V617F (+) din România și Belgia, ale căror probe de ADN genomic au fost stocate în biobăncile din IVN și respectiv din Clinica Universitară Saint-Luc, Bruxelles, au fost identificați 14 pacienți purtători ai ambelor mutații *JAK2*, ce au fost ulterior caracterizați din punct de vedere fenotipic. Pentru a evalua impactul coexistenței mutațiilor V617F și R1063H, aflate în configurație *cis* sau *trans*, asupra semnalizării *JAK2*, au fost inițiate experimente *in vitro* pe modele celulare, fiind creați prin tehnica de mutagenză *in situ* mutanți h*JAK2* (*JAK2* V617F, *JAK2* R1063H și *JAK2* V617F/R1063H) clonați în vectori retrovirali. Activitatea transcripțională STAT5, atât cea constitutivă cât și cea indusă în urma stimulării cu ciokine, a mutanților h*JAK2* comparativ cu h*JAK2* WT, în prezența receptorilor citokinici dimerici de tip mieloid (EPOR, TPOR și G-CSFR), a fost măsurată în celulele  $\gamma$ 2A, deficitară în kinaza *JAK2*, prin testul raportor luciferazic dual (DLR). De asemenea, a fost evaluată și comparată prezența formelor fosforilate (activate) ale proteinelor *JAK2*, STAT5 și ERK 1/2, induse constitutiv de către variantele mutante h*JAK2* și h*JAK2* WT, co-exprimate împreună cu receptorii citokinici în celulele HEK 293T, prin tehnica de Western blotting. Într-o altă etapă, a fost testat efectul mutației *JAK2* E596R, ce suprimă activitatea constitutivă *JAK2* V617F, asupra mutantului dublu *JAK2* V617F/R1063H. Atât genotiparea *JAK2* R1063H la pacienții cu NMP *JAK2* V617F (+),



cât și studiile de semnalizare au fost realizate în laboratorul Prof. Dr. Ștefan N Constantinescu, Ludwig Cancer Institute, Bruxelles. Ulterior, experimentele au fost continuate în Departamentul de Biologie al Facultății de Medicină din cadrul Universității Palacky, Olomouc condus de Profesorul Vladimir Divoky, precum și la Institutul de Genetică Moleculară al Academiei de Științe a Republicii Cehe, din Praga. A fost stabilită configurația *cis/trans* a celor două mutații *JAK2* la o parte din pacienții cu NMP dublu-positivi, prin secvențierea coloniilor individuale obținute în urma transformării bacteriene a ADNc *JAK2* subclonat, provenit de la pacienți. De asemenea, a fost determinată încărcarea alelică R1063H la cei 14 pacienți purtători ai ambelor mutații *JAK2*, prin tehnica ddPCR. În plus, prin tehnica NGS a fost evaluată ținut prezența de mutații somatice adiționale în gene implicate în neoplaziile mieloid, la pacienții menționați mai sus.

Pentru cel de-al doilea studiu rezultatele obținute pot fi rezumate astfel:

1. Varianta *JAK2* R1063H a fost identificată la 3.6% (14/390) din pacienții cu NMP *JAK2* V617F (+). Deoarece această variantă a fost descrisă ca un polimorfism foarte rar în populația generală (frecvența alelică 0.004377 conform bazei de date ExAc - Exome Aggregation Consortium), frecvența cu care a fost detectată în NMP poate fi considerată crescută (secțiunea 7.3.1).

2. Pacienții dublu pozitivi pentru mutațiile *JAK2* au prezentat un număr semnificativ mai mare de granulocite neutrofile la debutul bolii, comparativ cu pacienții purtători doar de mutație *JAK2* V617F (secțiunea 7.3.1).

3. Încărcarea mutațională adițională detectată la pacienții dublu-positivi prin tehnica NGS ținută a fost similară cu cea descrisă pentru mutația *JAK2* V617F (secțiunea 7.3.1).

4. Semnalizarea constitutivă indusă de *JAK2* V617F a fost amplificată semnificativ de varianta R1063H în *cis*, în prezența tuturor celor 3 receptori citokinici de tip mieloid (EPOR, TPOR, G-CSFR) (secțiunea 7.3.3).

5. Mutația *JAK2* E596R a redus în mod similar activitatea transcripțională STAT5 a mutanților *JAK2* V617F/R1063H și *JAK2* V617F, ceea ce indică că varianta R1063H amplifică semnalizarea prin același circuit de activare a domeniului kinazic *JAK2* ca V617F (secțiunea 7.3.3).

6. În 8 din cele 14 cazuri de NMP *JAK2* V617F/R1063H (+) a fost detectată prin ddPCR o frecvență a alelei R1063H în jur de 50%, sugestivă pentru un status heterozigot, cel mai probabil moștenit. În 3 cazuri valorile R1063H% și V617F% >80% au indicat un status „homozigot-like”, în care o alelă R1063H a fost moștenită și cealaltă dobândită,

probabil printr-un fenomen de disomie uniparentală (UPD) survenit în cursul evoluției clonale a bolii. La restul de 3 pacienți au fost obținute valori R1063H% între 20.7% și 31.5%, fiind sugerată posibilitatea ca în aceste cazuri, mutația să fie somatică (secțiunea 7.3.2).

7. În cazul unui pacient la care s-a detectat o configurație *cis* a mutațiilor, valoarea R1063H% mai mică decât cea V617F% a susținut faptul că mutația R1063H ar fi fost dobândită după achiziționarea mutației V617F (secțiunea 7.3.2).

În concluzie, a fost evidențiată astfel posibilitatea unui nou mecanism oncogenic, în care o variantă *JAK2* de linie germinală sau dobândită amplifică în *cis* semnalizarea indusă de oncoproteina *JAK2* V617F, având ca efect clinic la pacienții dublu purtători de mutații *JAK2* o neutrofilie semnificativ mai mare, comparativ cu pacienții care prezintă doar mutație *JAK2* V617F. Studiul va fi continuat în vederea confirmării sau infirmării ipotezei că varianta *JAK2* R1063H ar putea avea o origine somatică în unele cazuri de NMP.

**Capitolul 8** al acestei teze este dedicat studiului proteomic pentru identificarea unor posibili biomarkeri plasmatici cu expresie diferențiată în subtipurile NMP. Ipoteza de lucru a fost aceea că modificările precoce ale micromediului medular caracteristice diverselor fenotipuri NMP ar putea fi studiate indirect, neinvaziv, prin analiza profilului plasmatic de citokine și alte proteine solubile la debutul clinic al bolii. Obiectivele specifice urmărite au fost:

- Compararea profilului global de citokine al pacienților cu NMP cu cel al lotului de control, utilizând o tehnică proteomică multianalit de tip dot-blot pentru screening-ul a 105 proteine în pool-uri de plasmă și probe de plasmă individuale provenite de la 30 pacienți cu NMP debutate la o vârstă <35 ani, având diferite fenotipuri de boală (10 TE, 10 PV și 10 pre-MFP) și mutații driver (20 *JAK2* V617F și 10 *CALR*), precum și de la 10 subiecți sănătoși de vârstă similară cu cea a pacienților și cu parametrii normali ai hemoleucogramei.
- Identificarea unui set de proteine a căror expresie diferă semnificativ între cele două grupuri analizate.
- Selectarea unor molecule care prezintă potențialul de a discrimina între subtipurile NMP în vederea testării prin metoda ELISA cantitativă.

Au fost obținute următoarele rezultate [40]:

1. Screening-ul proteomic multianalit a condus la identificarea unui set de 6 proteine, cu rol predominant în angiogeneză, ce au prezentat niveluri relative de expresie mai mari la pacienții cu NMP versus lotul martor (de cel puțin 1.5 „fold change”): angiopoietina-1,

Dickkopf-related protein 1 (Dkk-1), factorul de creștere epidermal (EGF), ligandul 11 al chemokinei cu motiv CXC (CXCL11, I-TAC), factorul de creștere derivat din plachete AA și AB/BB (PDGF-AA și PDGF-AB/BB) (secțiunea 8.3.2).

2. Proteina Dkk-1, care nu a fost asociată până în prezent cu NMP, a înregistrat cel mai ridicat nivel de expresie plasmatică și de asemenea, a prezentat cel mai mare potențial de discriminare între subtipurile NMP ( $P=0.0031$ ), fiind selectată pentru pentru testarea cantitativă prin metoda ELISA (secțiunea 8.3.3).

3. Rezultatele obținute la determinarea cantitativă prin tehnica ELISA au sugerat faptul că nivelurile plasmatice Dkk-1 ar putea diferenția pe de o parte, TE de pre-MFP, atât la pacienții cu mutație *JAK2* V617F ( $P=0.0079$ ) cât și la cei cu mutații *CALR* ( $P=0.008$ ) și pe altă parte, TE de PV, la pacienții *JAK2* V617F ( $P=0.0451$ ) (+) (secțiunea 8.3.3).

4. Nivelurile plasmatice Dkk-1 nu au fost corelate cu V617F% (coeficientul Spearman de corelație a rangurilor  $r=0.066$ ,  $P=0.800$ ) sugerând faptul că acestea nu depind în mod direct de mărimea clonei neoplazice (secțiunea 8.3.4).

Pentru validarea rezultatelor obținute este necesară studierea unui lot mai mare de pacienți și, de asemenea, se impune o cercetare mai complexă pentru a identifica tipurile celulare implicate în producția crescută de Dkk-1 la pacienții cu NMP.

**Capitolul 9** al acestei lucrări reunește concluziile și contribuțiile personale rezultate din experimentele efectuate în cele trei studii. Astfel, în urma cercetărilor efectuate s-a obținut o caracterizare clinică și moleculară cu implicații prognostice a unui lot semnificativ numeric de pacienți cu NMP și trombocitoză la debut, s-a evidențiat un mecanism oncogenic prin care o variantă *JAK2* moștenită sau dobândită amplifică semnalizarea constitutivă indusă de mutația driver majoră *JAK2* V617F și a fost identificată pentru prima dată proteina Dkk-1 ca un posibil biomarker plasmatic de diferențiere între subtipurile NMP.

## Bibliografie selectivă

1. Vainchenker W and Kralovics R, Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 129(6), 667-679, 2017.
2. Cahu X and Constantinescu SN, Oncogenic Drivers in Myeloproliferative Neoplasms: From JAK2 to Calreticulin Mutations. *Curr Hematol Malig Rep*, 10(4), 335-43, 2015.
3. Tefferi A, Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 89(9), 915-25, 2014.
4. Barbui T, Thiele J, Carobbio A, et al., Masked polycythemia vera diagnosed according to WHO and BCSH classification. *Am J Hematol*, 89(2), 199-202, 2014.
5. Tefferi A, Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am J Hematol*, 91(1), 50-8, 2016.
6. Pahl HL, Many roads lead to MPN. *Blood*, 123(14), 2133-4, 2014.
7. Grinfeld J, Nangalia J, and Green AR, Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, 102(1), 7-17, 2017.
8. Rumi E and Cazzola M, Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 129(6), 680-692, 2017.
9. Mesa R, Miller CB, Thyne M, et al., Myeloproliferative neoplasms (MPNs) have a significant impact on patients' overall health and productivity: the MPN Landmark survey. *Bmc Cancer*, 16, 167, 2016.
10. Julien E, El Omar R, and Tavian M, Origin of the hematopoietic system in the human embryo. *FEBS Lett*, 590(22), 3987-4001, 2016.
11. Ema H, Morita Y, and Suda T, Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, 42(2), 74-82 e2, 2014.
12. Laurenti E and Gottgens B, From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*, 553(7689), 418-426, 2018.
13. Antoniani C, Romano O, and Miccio A, Concise Review: Epigenetic Regulation of Hematopoiesis: Biological Insights and Therapeutic Applications. *Stem Cells Transl Med*, 6(12), 2106-2114, 2017.

14. Athanasiadis EI, Botthof JG, Andres H, et al., Single-cell RNA-sequencing uncovers transcriptional states and fate decisions in haematopoiesis. *Nat Commun*, 8(1), 2045, 2017.
15. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, et al., Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells*, 19(2), 99-107, 2001.
16. Robb L, Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*, 26(47), 6715-23, 2007.
17. Metcalf D, Hematopoietic cytokines. *Blood*, 111(2), 485-91, 2008.
18. Ende M, Etzrodt M, and Schroeder T, Instruction of hematopoietic lineage choice by cytokine signaling. *Exp Cell Res*, 329(2), 207-13, 2014.
19. Vainchenker W and Constantinescu SN, JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*, 32(21), 2601-13, 2013.
20. Sinclair A, Park L, Shah M, et al., CXCR2 and CXCL4 regulate survival and self-renewal of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*, 128(3), 371-83, 2016.
21. Goulard M, Dosquet C, and Bonnet D, Role of the microenvironment in myeloid malignancies. *Cell Mol Life Sci*, 75(8), 1377-1391, 2018.
22. Crane GM, Jeffery E, and Morrison SJ, Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*, 17(9), 573-590, 2017.
23. Yao JC and Link DC, Concise Review: The Malignant Hematopoietic Stem Cell Niche. *Stem Cells*, 35(1), 3-8, 2017.
24. Mead AJ and Mullally A, Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood*, 129(12), 1607-1616, 2017.
25. Skoda RC, Duek A, and Grisouard J, Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol*, 43(8), 599-608, 2015.
26. Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, et al., Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*, 123(22), e123-33, 2014.
27. Tefferi A and Barbui T, Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 92(1), 94-108, 2017.
28. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, et al., Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 127(3), 325-32, 2016.

29. Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, et al., Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*, 127(3), 333-42, 2016.
30. Angona A, Fernandez-Rodriguez C, Alvarez-Larran A, et al., Molecular characterisation of triple negative essential thrombocythaemia patients by platelet analysis and targeted sequencing. *Blood Cancer J*, 6(8), e463, 2016.
31. Diaconu CC, **Mambet C**, Necula LG, et al., Triple Negative Myeloproliferative Neoplasms - Sometimes Driver Mutations Stay Low-Key in Plain Sight. *Romanian Biotechnological Letters*, 2017.
32. Rumi E and Cazzola M, Advances in understanding the pathogenesis of familial myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*, 178(5), 689-698, 2017.
33. Jones AV and Cross NC, Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Ther Adv Hematol*, 4(4), 237-53, 2013.
34. Koschmieder S, Mughal TI, Hasselbalch HC, et al., Myeloproliferative neoplasms and inflammation: whether to target the malignant clone or the inflammatory process or both. *Leukemia*, 30(5), 1018-24, 2016.
35. Hasselbalch HC, Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? *Leuk Res*, 37(2), 214-20, 2013.
36. Desterke C, Martinaud C, Ruzehaji N, et al., Inflammation as a Keystone of Bone Marrow Stroma Alterations in Primary Myelofibrosis. *Mediators Inflamm*, 2015, 415024, 2015.
37. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al., The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391-405, 2016.
38. Kapralova K, Horvathova M, Pecquet C, et al., Cooperation of germ line JAK2 mutations E846D and R1063H in hereditary erythrocytosis with megakaryocytic atypia. *Blood*, 128(10), 1418-23, 2016.
39. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al., Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 7(4), 387-97, 2005.
40. **Mambet C**, Necula L, Mihai S, et al., Increased Dkk-1 plasma levels may discriminate disease subtypes in myeloproliferative neoplasms. *J Cell Mol Med*, 2018.

## Lista lucrărilor științifice publicate

### Articole publicate în reviste de specialitate

1. **Mambet C**, Necula L, Mihai S, et al., Increased Dkk-1 plasma levels may discriminate disease subtypes in myeloproliferative neoplasms. *J Cell Mol Med*, 2018. doi: 10.1111/jcmm.13753. [Epub ahead of print]. IF: 4.302.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29975001>.
2. **Mambet C**, Chivu-Economescu M, Matei L, et al., Murine models based on acute myeloid leukemia-initiating stem cells xenografting. *World J Stem Cells*, 10(6), 57-65, 2018. IF: 4.376. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29988882>.
3. Neagu AI, **Mambet C**, Necula LG, et al., Therapeutic Potential of T regulatory Cell Manipulation: Advantages and Limitations. *Romanian Biotechnological Letters*, 2017. IF: 0.404. (DOI 10.26327/RBL2017.91).  
<https://www.rombio.eu/docs/Neagu%20A%20Bleotu%20et%20al.pdf>.
3. Diaconu CC, **Mambet C**, Necula LG, et al., Triple Negative Myeloproliferative Neoplasms - Sometimes Driver Mutations Stay Low-Key in Plain Sight. *Romanian Biotechnological Letters*, 2017. IF: 0.404.  
<https://www.rombio.eu/docs/Diaconu%20et%20al.pdf>.
4. Chiru D, **Mambet C**, Matei L, et al., Delivering the "Blueprints" or "DNA Repairing Kits" Instead of Drugs in the Treatment of Congenital Hemoglobinopathies. *Current Organic Chemistry*, 21(1), 74-85, 2017. IF: 2.193.  
<http://www.ingentaconnect.com/contentone/ben/coc/2017/00000021/00000001/art00011>.
5. **Mambet C**, Chivu-Economescu M, Matei L, et al., Strategies to Overcome Multi-Drug Resistance in Cancer Cells: the Contribution of siRNA and Nanotechnologies. *Current Organic Chemistry*, 20(28), 2971-82, 2016. IF: 2.193.  
<https://www.eurekaselect.com/142023/article>.
6. **Mambet C**, Matei L, Necula LG, et al., A link between the driver mutations and dysregulated apoptosis in BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasms. *J Immunoassay Immunochem*, 37(4), 331-45, 2016.  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15321819.2016.1152276>.

7. **Mambet C**, Necula LG, Neagu AI, et al, A concise review of Hox genes: the molecular bridges between developmental anomalies and cancer. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(3), 10504-11, 2017. IF: 0.404.  
<https://www.rombio.eu/rbl3vol20/16.pdf>.
8. Necula LG, **Mambet C**, Albulescu R, et al, Epigenetics in gastric carcinogenesis: tet genes as important players. *J Immunoassay Immunochem*, 36(5), 445-55, 2015.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714048>.
9. Doroftei B, **Mambet C**, Zlei M, It's Never over until It's over: How Can Age and Ovarian Reserve Be Mathematically Bound through the Measurement of Serum AMH-A Study of 5069 Romanian Women. *PLoS One*, 10(4), 2015, e0125216. IF:2.766.
10. Angelescu S, **Mambet C**, Mut Popescu DI, et al, Eosinophil activation markers in clonal and non-clonal eosinophilia. *Romanian Review of Laboratory Medicine*, 21(3), 311-20, 2013. IF: 0.400.  
<https://content.sciendo.com/view/journals/rrlm/21/3/article-p311.xml>.

#### **Lucrări comunicate la conferințe naționale și internaționale**

1. Popa Codruta, Gheorghe Anca, Dobrete Nicoleta, Serban Catalin , Vasilache Didona, Grigoras Oana, Jardan Cerasela, Diaconu Carmen, **Mambet Cristina**, Tatic Aurelia. Refractory anaemia with excess of blasts associated with marked thrombocythemia – case report. Al XI-lea Congres National de Citometrie, Bucuresti, 19-21 Octombrie 2017, Bucuresti. Poster.
2. **Cristina Mambet**, Laura G. Necula, Coralia Bleotu, Ioana M Aldea-Pitica, Ana I. Neagu, Lilia Matei, Denisa Dragu, Mihaela Chivu-Economescu, Carmen C. Diaconu, Stefan N Constantinescu. Profiluri de fosforilare proteică în neoplasmale mieloproliferative BCR-ABL1 negative, comunicare orală la ediția 11 a Simpozionului Academician Nicolae Căja, București, Martie 2016.
3. **Cristina Mambet**, Ileana Apostolescu, Alina Ionelia Ganta, Carmen Rotaru, Antoanela Curici. Probleme în evaluarea numărului de trombocite în laborator. A 4-a Conferință Națională a Societății Române de Hemostază și Tromboză, 5-7 noiembrie 2015, Hotel Novotel București. Comunicare orală.
4. Delia Mut-Popescu, Silvana Angelescu, **Cristina Mambet**. Lectura unui hematolog despre indicii trombocitari și relația lor cu patologia vasculară și bolile maligne. A 4-a



Conferință Națională a Societății Române de Hemostază și Tromboză, 5-7 noiembrie 2015, Hotel Novotel București. Comunicare orală.

5. **Cristina Mambet**, Coralia Bleotu, Laura G. Necula, Ioana M. Aldea, Ana I. Neagu, Lilia Matei, Denisa Dragu, Mihaela Chivu Economescu, Carmen C. Diaconu. Plasma cytokines in distinct phenotypes of JAK2V617F-mutated essential thrombocythemia. Congresul Universității de Medicină și Farmacie “Carol Davila” București, Ediția a III-a, 28-30 mai 2015, Palatul Parlamentului – București. Poster.

6. Carmen C. Diaconu, Laura G. Necula, Ana I. Neagu, Ioana M. Aldea, **Cristina Mambet**, Lilia Matei, Denisa Dragu, Marius Ataman, Mihael Chivu Economescu, Coralia Bleotu, Maria Grigoriu-Serbanescu, Stefan N. Constantinescu. Therapeutic target validation strategies using viral vectors, lucrare prezentată la cea de-a IX-a ediție a Simpozionului Academician Nicolae Cajal, București 13-14 mai 2014.

7. **Cristina Mambet**, Luiza Burtica. Patologia trombocitului în pediatrie, lucrare prezentată la a III-a Conferință Națională a Societății Române de Hemostază și Tromboză, București 14-16 noiembrie 2013.

8. S. Mihai, E. Rusu, M. Voiculescu, I.D. Popescu, E. Codrici, **C. Mambet**, A. I. Niță, N. Constantin, R. Albuлесcu, C. Tănase. Insuficiența renală cronică - Noi perspective proteomice, lucrare prezentată la al 20-lea Congres Național de Medicină de Laborator, SRML 10-12 octombrie 2013, București.

### **Broșuri cu caracter educațional**

Simona Mihai, Lucian Albuлесcu, Elena Codrici, **Cristina Mambet**, Bogdan Calenic, Cristiana Tanase. Coordonator: Radu Albuлесcu. Evaluarea profilului proteomic în cancer. Tehnologia Multiplex – xMAP array. Ghid procedural. Vif, 2013, ISBN: 978-606-8498-31-7.