

СТАНОВИЩЕ

от доцент д-р Анастас Димитров Пашов, Департамент по имунология, Институт по микробиология „Акад. Стефан Ангелов“, БАН

Относно: Защита на дисертационен труд и придобиване на образователната и научна степен „Доктор“, по Професионално направление 7.1 Медицина, по научна специалност: 03.01.39 "Хематология и преливане на кръв"

Тема на дисертационния труд: „ИМУНОГЕНЕТИЧНИ АСПЕКТИ В ПАТОГЕНЕЗАТА НА JAK2 V617F-ПОЛОЖИТЕЛНИТЕ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗИИ“

Автор на дисертационния труд: Доц. Д-р Велизар Стефанов Шиваров

Научен ръководител: Доц. Д-р Бисер Борисов, д.м., доц. Д-р Иван Гигов, д.м.

Актуалност и значимост на дисертационния труд

Дисертационният труд на Д-р Велизар Шиваров представлява медицинско имуногенетично изследване с интердисциплинарен характер използващо имуногенетични, биоинформатични и структурно биологични методи. Обект на изследване е имунния надзор над миелопролиферативни неоплазми (МПН) с JAK2 V617F мутация. Неразрешен проблем на онкохематологията са механизмите на преминаването от клонална хемопоеза в клинично значимо МПН и по-специално генетичните и имунологични фактори обуславящи този процес. Точковата соматична мутация V617F в janus kinase 2 кара протеина JAK2 да се активира постоянно, което води до неконтролирана пролиферация и диференциация на кръвни стволови клетки. Тя е най-честата мутация, открита в МПН, с 95% от пациентите с полицетемия вера, 50-60% от пациентите с есенциална тромбоцитемия и първична миелофиброза и 0,2% от общото население. Мутантният протеин е конститутивно активиран, което обуславя още редица клинични характеристики и усложнения на МПН, като повишен риск от тромбоза, кървене, спленомегалия, фиброза на костния мозък и трансформация в остра миелоидна левкемия. Мутацията също влияе върху отговора на лечението и прогнозата на пациентите с МПН. Наличието на широко разпространена конкретна мутация в голяма група злокачествени заболявания позволява да се анализира имуногенетичните аспекти на имунния надзор при тези тумори. Настоящият труд дава отговор на някои от откритите въпроси в този контекст.

Структура на дисертационния труд

Представеният за защита дисертационен труд е на 126 страници. Разделен е на следните секции: заглавна страница, „Съдържание“, „Списък на фигурите“, „Списък на таблиците“, „Използвани съкращения“, „Увод“ - 3 стр., „Състояние на проблема“ на 31 стр., последвано от „Изследователски хипотези цел и задачи“, „Материали и методи“

на 5 страници, „Резултати“ на 23 стр. и „Обсъждане“ на 15 стр. По-нататък дисертацията съдържа „Заключение – основни изводи“, „Приноси“ – 2 стр., „Библиография“ на 21 стр., декларация за оригиналност, и списък на научните публикации, въз основа на които е написана дисертацията. Използвани са впечатляващите 318 литературни източника, като 66% от тях са публикувани в последните 10 години. Дисертацията е богато онагледена с 34 фигури и съдържа 9 таблици плюс 11 допълнителни таблици в края на ръкописа. Приятно впечатление правят цитатите на известни учени изследващи рака в началото на всяка глава, които насочват мисълта на читателя към основните идеи .

Уводът с подзаглавие „Ракът като социално и медицинско предизвикателство“ цитира редица статистически данни илюстриращи мащаба на проблема и, по-конкретно, значението на редките видове рак, които сумарно обхващат една четвърт от всички диагностицирани неоплазми в Европа.

Литературният обзор на дисертацията озаглавен „Състояние на проблема“ представя актуалността на проблемите и необходимостта от това изследване. Първите 6 глави имат самостоятелно значение като изключително задълбочено и пълно, богато илюстрирано, но същевременно изненадващо компактно обобщение на принципите на туморната имунология. Поставено е ударение на ролята на антигенното представяне и HLA разнообразието, от което логично е изведена съществуващата имуногенетична парадигма по отношение на туморния надзор. Интересни са разсъжденията върху ролята на някои генетични особености, които, заедно с усилващата функция на подбора, превръщат тъканната хомеостаза в нестабилно равновесие. В следващите глави е обобщено известното за МПН като модел на онкогенеза. Обоснован е фокусът върху конкретната точкова мутация в гена на JAK2 в контекста на другите наблюдавани мутации, както и на клоналността и стволовоклетъчния характер на тези неоплазми. Така естествено са изведени и формулирани нерешените проблеми в тази област, а от тях – и целите и задачите на дисертацията: да се изследва ролята на класическите имуногенетични фактори, а именно HLA-I генотипа за развитието на JAK2 V617F⁺ МПН. За изпълнение на целта са набелязани 8 конкретни задачи обхващащи събирането генетични данни от кохорта от пациенти с JAK2 V617F⁺ МПН, сравняването на HLA-I хетерозиготността и еволюционна дивергентност, предсказване на клас I неопитопи породени от мутацията, асоциативни анализи на HLA-I локусите, симулация с молекулна динамика за доказване на стабилно свързване на неопитопите с молекулите на HLA-I и анализ на генната експресия на компонентите на механизма осигуряващ антигенно представяне.

Оценка на използваните методи на изследване

По същество, това изследване е имуногенетично с биоинформатична и биостатистическа методология и с приложение на структурно биологични подходи. Основният корпус от данни е от секвениране на ДНК проби от пациенти на

Александровска болница, МУ, София във връзка с предишни разработки на дисертанта, които не са част от настоящата дисертация. Останалите данни са ползвани от свободно достъпни репозитории в интернет. Прави впечатление професионалното ползване на биоинформатични и биостатистически методи, включително статистическия език R и специфичните пакети към него. Изчислена е еволюционната дивергентност на HLA за всеки локус и за всеки индивид, а в следствие и хармоничната средна от най-добрите рангове на свързване за всеки индивид. Приложени са и молекулно-динамични симулации постигнати с помощта на онлайн ресурси (QwikMD) и софтуер със свободен достъп (VMD, UCSF Chimera). Дисертантът ползва компетентно налични в интернет ресурси за анализ на генната експресия на определени функционални подсистеми (пътеки), например тази, отговорна за обработката и представянето на антигени от антиген представящи клетки на цитотоксични или хелперни Т лимфоцити. Умението на дисертанта да интегрира богат арсенал от имуногенетични, биоинформатични и структурно биологични методи в един рационален и продуктивен анализ на едно конкретно онкологично заболяване показва, че той не само е един от най-осведомените туморни имунолози у нас, но и владее най-съвременна омикс методология за дестилиране на данни от геномно секвениране до практически приложими знания.

Оценка на получените резултати

Всяка една от задачите е изпълнена и получените резултати са с високо качество. Авторът показва убедително, че клиничната изява на JAK2 V617F⁺ мутацията не корелира с еволюционната дивергентност на HLA-I. Това означава, че еволюцията на заболяването не зависи от разнообразието на HLA фенотипа. Това може да се дължи на факта, че се изследва единствена мутация. Резултатът не изключва асоциация с малко на брой алели или на съпътстващи дефекти на антигенното представяне. Наистина, в последващите експерименти авторът открива значима асоциация: негативна при три алела (HLA-A*02:01, HLA-B*35:01, HLA-C*15:02) и позитивна – при 4 (HLA-B*44:03, HLAB*41:01, HLA-C*12:03 и HLA-C*17:01). Анализът е методично издържан като мултивариационния генерализиран линеен модел включва пол и възраст като ковариати. Намерени са и би- и трилокусни хаплотипи, които корелират с JAK2 V617F⁺ МПН. Така, детайлният анализ на HLA асоциациите показва следи от имуно-редактиране и подсказва потенциални HLA класификатори на този тип неоплазми. Наличието на пациенти с протективния HLA фенотип подсказва евентуални дефекти на антигенното представяне. Действително, използвайки анализ на генната експресия, авторът наблюдава непроменена експресия на HLA-I гените при пациенти с JAK2 V617F⁺ МПН, но открива дефекти в експресията на тапазин участващ в представянето на антигени в контекста на HLA-I. По отношение на конкретния неопитоп обуславящ надзора, а респективно и имуно-редактирането, авторът използва два алгоритъм за предсказване на HLA лиганди. Известно е, че ефективността на тези алгоритми не е висока и съвсем адекватно дисертантът проверява

потенциалното свързване на най-вероятния неопитоп със съответен HLA алел използвайки молекулна динамика. Така, оставайки в полето на *in silico* анализа, авторът успява да докаже наличието на прицелен неопитоп при тази мутация, компенсирайки недостатъците на теоретичните модели на свързване на пептиди с HLA с широта на познанията и уменията си. Научните резултати на изследванията на дисертанта му позволяват да формулира хипотези за евентуално медикаментозно повлияване на тези неоплазми във връзка с имунологичните предпоставки и да ги провери анализирайки достъпни данни от гена експресия при пациенти и миши модели.

Изчерпателния и качествен анализ на данните логично води до значими резултати, които се обобщени в 7 оригинални приноса и 2 приноса с потвърдителен характер.

Дискусия (Обсъждане)

Частта озаглавена „Обсъждане“ продължава теоретичното обобщение започнато в обзора. То е в контекста на биологията на рака и туморната имунология и оформя окончателно контекстуалната рамка както на целите така и на изводите от научните резултати от дисертационния труд. Подчертана е ролята на адаптивната вариабилност на раковите клетки като централната характеристика, която се явява организиращ елемент в мрежата от взаимозависимости между характеристиките на рака по Уайнбърг. Подчертано е, че в теоретичен план резултатите от работата подкрепят терапевтична стратегия целяща потискане на диверсификацията и еволюцията в туморите. Посочена е връзката на имонотерапевтичните стратегии с тази концепция.

Въз основа на резултатите от работата се стига до заключението, че ефективността на имуно-редакцията при JAK2 V617F-свързаната онкогенеза не зависи от генотипното разнообразие на HLA-I комплекса. Въпреки предишни заключения базирани на целогеномно изследване на генетичните асоциации, получените резултати в настоящото проучване показват недвусмислено асоциация с конкретни HLA клас I алели, а и конкретната секвенция на прицелния неопитоп. Посочени са литературни данни в подкрепа на достигнатите заключения относно съществената роля на алела HLA-B*35:01 особено при стволовите клетки с ниска експресия на HLA-I. В заключение е предложен модел за HLA-медирана имуно-редакция при JAK2 V617F+ МПН подходящо илюстрирана със схема. Формулирани са конкретните изводи и са поставени и нови въпроси, възникващи като резултат получените резултати, от които особено съществен ми изглежда: Как биха могли разкритите механизми за избягване на имунологичния надзор да се използват за дизайн на имунотерапевтични подходи при МПН? Сигурен съм, че дисертантът вече има хипотези в тази насока.

Критики и въпроси

Значителния опит на д-р Шиваров и високата му ерудиция са в основата на един много съдържателен и стилизиран труд с много малко недостатъци

Имам и следния въпрос:

- Какъв е еволюционния контекст в нормална физиология на описаната реакция на хипоксия в туморите ?

Публикации.

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 3 статии с импакт фактор 2.39, 3.25 и 5.1, една глава от книга два международни и един национален конгрес.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертацията, по съдържание и актуалност, отговаря на изискванията на Закона за развитие на Академичния състав в РБ. Оценявам дисертацията положително и убедено препоръчвам на останалите членове на научното жури да подкрепят присъждането на научно-образователната степен „доктор“ на д-р Велизар Шиваров. Аз категорично гласувам ЗА присъждането на степента и пожелавам на дисертанта нови големи успехи в областта на хематологията.

Анастас Пашов На основание чл. 59 от ЗЗЛД

14.06.2023, София

STATEMENT

by Associate Professor Dr. Anastas Dimitrov Pashov, Department of Immunology, Institute of Microbiology "Acad. Stefan Angelov", BAS

Regarding: Defense of dissertation work and acquisition of the educational and scientific degree "Doctor", in Professional direction 7.1 Medicine, in scientific specialty: 03.01.39 "Hematology and blood transfusion"

Dissertation topic: "IMMUNOGENETIC ASPECTS IN THE PATHOGENESIS OF JAK2 V617F-POSITIVE MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASIAS"

Author of the dissertation: Assoc. Dr. Velizar Stefanov Shivarov

Research supervisor: Associate Professor Dr. Biser Borisov, MD, Associate Professor Dr. Ivan Gigov, MD

Examination of the Dissertation's Importance and Pertinence

Dr. Velizar Shivarov's dissertation embodies an interdisciplinary exploration that successfully integrates the disciplines of medical immunogenetics, bioinformatics, and structural biology. The research centers on the immune surveillance of myeloproliferative neoplasms (MPNs) that carry the JAK2 V617F mutation, an area of oncohematology that remains relatively unexplored.

A primary concern in this field is understanding the transition from clonal hematopoiesis to clinically significant myelofibrosis (MFN), particularly the immunological and genetic factors at play. The study centers on the V617F somatic point mutation in Janus Kinase 2 (JAK2), a mutation which induces a state of constant activation in the JAK2 protein. This, in turn, leads to unregulated proliferation and differentiation of blood stem cells.

The JAK2 V617F mutation is notably prevalent in MPNs, appearing in 95% of polycythemia vera patients, 50-60% of those with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis, and even 0.2% of the general populace. The persistent activation of the mutant protein elicits various clinical features and complications in MPNs, such as heightened risk of thrombosis, bleeding, splenomegaly, bone marrow fibrosis, and transformation into acute myeloid leukemia. Notably, the mutation also influences treatment response and prognosis in MPN patients.

This study seeks to unravel the immunogenetic aspects of immune surveillance in these tumors, given the widespread presence of this specific mutation in a large group of malignancies. In doing so, it provides critical answers to lingering questions within this field.

Analysis of Dissertation's Structure

The 126-page dissertation presents a well-structured analysis, divided into several sections. These include a title page, contents, list of figures, list of tables, a glossary of abbreviations, an introduction, a thorough exploration of the problem at hand, the research aims and objectives, materials and methods, results, and a discussion. The conclusion then brings together the main findings, contributions, a comprehensive bibliography, a declaration of originality, and a list of the scientific publications that underpin the dissertation.

The study impressively utilizes 318 literature sources, with two-thirds published within the last decade. It is extensively illustrated with 34 figures and includes 9 tables, along with an additional 11 tables attached to the manuscript's end. It is also worth mentioning the thoughtful inclusion of quotations from esteemed cancer researchers at the start of each chapter, guiding the reader to the chapter's main ideas.

Evaluation of Research Methods

The research, at its core, is immunogenetic, integrating bioinformatic and biostatistical methodologies alongside structural biology approaches. Primarily, the data is derived from the DNA sequencing of patient samples from Alexandrovska Hospital, MU, Sofia, supplemented with information from open online repositories. The adept use of bioinformatics and biostatistical methods, particularly the statistical language R and its specific packages, is commendable.

The dissertation includes molecular dynamics simulations, prediction of class I neoepitopes generated by the mutation, association analyses of HLA-I loci, and gene expression analysis of the mechanism providing antigen presentation. Dr. Shivarov's ability to harness a vast array of immunogenetic, bioinformatics, and structural biology methods, distilling genomic sequencing data into actionable knowledge, is truly impressive.

Examination of Results

Each of the tasks set out in the study is completed to a high standard. Dr. Shivarov convincingly demonstrates that the clinical manifestation of the JAK2 V617F mutation does not correlate with the evolutionary divergence of HLA-I, indicating that the disease's evolution is independent of HLA phenotype diversity. The analysis was robust, with gender and age included as covariates in the multivariate generalized linear model.

Dr. Shivarov's results support the formulation of hypotheses regarding possible medical intervention of these neoplasms, in relation to the revealed immunological prerequisites, and verify them by analyzing available data from gene expression in patients and mouse models. The analysis yields significant findings, resulting in 7 original contributions and 2 of a confirmatory nature.

Discussion

The discussion section continues the theoretical summary, framing the objectives and the conclusions of the scientific results of the dissertation work in the context of cancer biology and tumor immunology. The work emphasizes the pivotal role of cancer cells' adaptive variability, as it ties into Weinberg's cancer characteristics, indicating that the results theoretically support a therapeutic strategy aimed at suppressing diversification and evolution in tumors.

Critique and Queries

The strength of Dr. Shivarov's work lies in his profound experience and erudition, which form the bedrock of a comprehensive and elegantly crafted dissertation. I do have a question regarding the evolutionary context of the described hypoxic response in tumors under normal physiological conditions.

Publications

The research has been disseminated through three articles with impressive impact factors, a book chapter, and presentations at two international and one national congress.

Conclusion

The dissertation aptly meets the content and relevance criteria as outlined by the Law on the Development of the Academic Staff in the Republic of Belarus. I wholeheartedly endorse the awarding of the degree "doctor" to Dr. Velizar Shivarov and urge the other members of the scientific jury to do the same. I am confident that Dr. Shivarov will make significant contributions to the field of hematology.

Anastas Pashov **На основание чл. 59 от ЗЗЛД**

14.06.2023