

Доц. Д-р Велизар Стефанов Шиваров

**ИМУНОГЕНЕТИЧНИ АСПЕКТИ
В ПАТОГЕНЕЗАТА НА
JAK2 V617F-ПОЛОЖИТЕЛНИТЕ
МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗИИ**

Автореферат на дисертационен труд за присъждане на

образователна и научна степен «Доктор»

Професионално направление: 7.1 Медицина

Научна специалност: 03.01.39 «Хематология и преливане на кръв»

Научни ръководители:

Доц. Д-р Иван Гигов, д.м.

Доц. Д-р Бисер Борисов, д.м.

2023

Плевен

Дисертационният труд е написан на 135 страници. Съдържа 34 фигури и 20 таблици. Библиографията включва 318 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на разширен катедрен съвет на Катедра „Нефрология, хематология и гастроентерология“ на Факултет „Медицина“ на МУ – Плевен.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на от часа в зала

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в Библиотеката на МУ – Плевен.

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	Увод.....	1
II.	Изследователски хипотеза, цел и задачи.....	2
	Неразрешени въпроси, налагащи допълнителни изследвания.....	2
	Изследователски хипотеза, цел и задачи.....	2
III.	Материали и методи	5
	Използвани биологични данни	5
	Биостатистически и биоинформатични анализи	5
IV.	Резултати	6
	HLA клас I генотипът не повлиява наличието на JAK2 V617F мутация.....	6
	Специфични HLA клас I алели са асоциирани с понижен риск от JAK2 V617F+ МПН	11
	Неоепитопът LVLNYGVCF покрива критериите за ефективно предсатвяне от HLA-B*35:01	18
	JAK2 V617F+ CD34+ стволови клетки са с понижена експресия на молекули от HLA клас I.....	23
	Резистентността към руксолитиниб може да е свързана с понижена експресия на HLA-I молекули и повишена експресия на PD-L1	27
	Ефекти на IFN- α върху MHC-I молкулите и Pdl1 гена в миши клетки	27
V.	Обсъждане	29
VI.	Заклучение – основни изводи	37
VII.	Приноси	38
	Оригинални научни приноси.....	38
	Научни приноси с потвърдителен характер.....	38
VIII.	Декларация за оригиналност.....	39
IX.	Публикации	40
	Журнални статии	40
	Глави от книги	40
	Участия в научни срещи	40

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АПК	Антиген-представяща клетка
ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
ЕТ	Есенциална тромбоцитемия
КМ	Костен мозък
ЛПК	Лимфоидна прогениторна клетка
МПК	Миелоидна прогениторна клетка
МПН	Миелопролиферативни неоплазии
МПН-СК	Стволова клетка за миелопролиферативни неоплазии
ОЛЛ	Остра лимфобластна (лимфоидна) левкемия
ОМЛ	Остра миелогенна (миелоидна) левкемия
ПВ	Полицитемия вера
ПК	Периферна кръв
ПМФ	Първична миелофиброза
ПСК	Прогениторна стволова клетка
РНК	Рибонуклеинова киселина
СМД	Симулации на молекулната динамика
СЗО	Световна здравна организация
ХЛЛ	Хронична лимфоцитна левкемия
ХМЛ	Хронична миелогенна (миелоидна) левкемия
ХСК	Хемопоеична стволова клетка
aUPD	Acquired uniparental disomy
BR	Best rank
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EPO	Erythropoietin
ES	Enrichment score
FWER	Family-wise error rate
GLM	Generalized linear model
GSEA	Gene set enrichment analysis

GWAS	Genome wise association study
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
HED	HLA evolutionary divergence
HLA	Human leukocyte antigen
ICIs	Immune check-point inhibitors
IFN	Interferon
ILCs	Innate lymphoid cells
IPD-IMGT/HLA	Immune polymorphism database – Immunogenetics/HLA
KIR	Killer Immunoglobulin-like receptor
LT-HSC	Long term hematopoietic stem cell
MHC	Major histocompatibility complex
NGS	Next Generation Sequencing
NK	Natural killer
PHBR	Patient harmonic mean best rank
RMSD	Root mean squared deviation
(sc)RNA Seq	Single cell RNA sequencing
SNP	Single nucleotide polymorphism
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TILs	Tumor infiltrating lymphocytes
TPO	Thrombopoietin
Tregs	Regulatory T cells

I. Увод

В третото десетилетие на XXI век неопластичните заболявания остават глобален медицински и социален проблем. Особено предизвикателство представлява групата на редките видове рак, които колективно обхващат поне 24% от всички случаи на рак в Европа, което означава, че поне 5.1 милиона души в Европа живеят с диагноза на някакъв вид рядък рак (<https://www.rarecancerseurope.org/>). За разлика от дефиницията за рядко заболяване, която се основава на болестността в дадена популация, то определението за рядък вид рак се основава на заболеваемостта. За прагова заболеваемост за редки видове рак се приема такава под 6 нови случаи от съответния вид рак на година на 100 000 души население. В групата на редките видове рак особено място заемат редките хематологични неоплазии с кумулативна заболеваемост в Европа от 27.73 случаи/100 000 души.

Разгледани поотделно в групата на редките хематологични неоплазии попадат и миелопролиферативните неоплазии (МПН) с обща годишна заболеваемост от 3.31 случаи/100 000. В основополагащото издание на Европейската хематологична асоциация на Европейската пътна карта за изследвания в хематологията, както и нейната актуализация по отношение на миелоидните неоплазии, се отделя специално внимание на МПН и необходимостта „да се характеризират клетъчните и молекулярните механизми, участващи в развитието на заболяването, прогресията и резистентността към терапията, включително вродената генетична предразположеност, хроничното възпаление, имунологичните нарушения и нарушенията на микросредата, както и избягването на имунологичния надзор след стволовоклетъчна трансплантация“. Очевидно е, че детайлното познаване на механизмите на имунологичния надзор и неговото избягване позволяват рационалния дизайн на нови имунотерапевтични подходи.

II. Изследователски хипотеза, цел и задачи

Неразрешени въпроси, налагащи допълнителни изследвания

По наше мнение въз основа на изложените по-горе факти основни неразрешени въпроси в патогенезата на МПН остават следните:

Какви са механизмите, които направляват преминаването от клоналната хемопоеза в клинично значимо МПН?

Каква е ролята на вродените генетични фактори, които предразполагат към клонална хемопоеза и евентуалната еволюция в МПН?

Какво е участието на имунната система като преципитиращ фактор както за инициацирането и поддържането на клоналната хемопоеза и евентуалната еволюция до МПН?

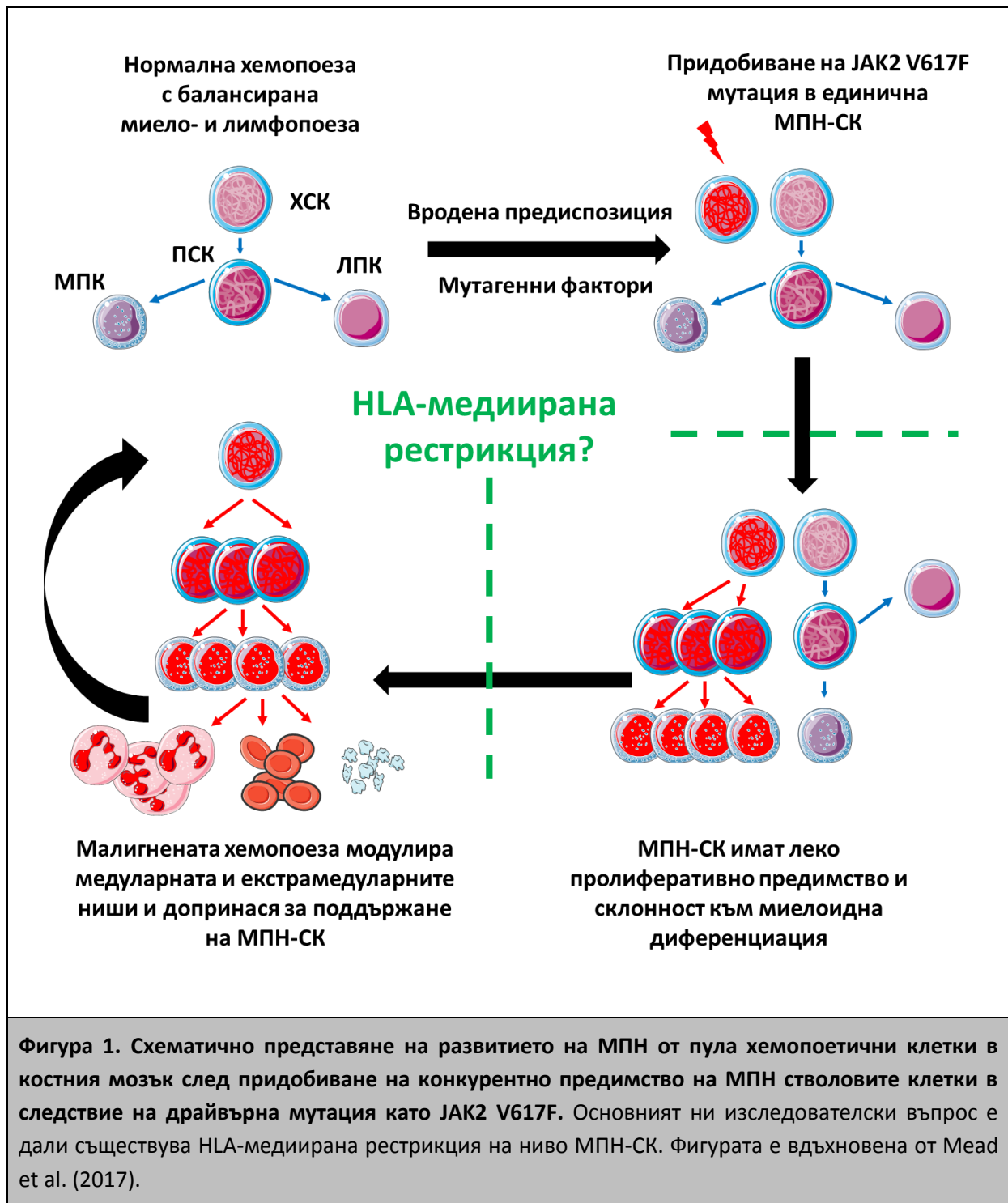
Как настоящите терапевтични подходи повлияват еволюцията на МПН и евентуално избягването на имунологичния надзор?

Предполагат ли механизмите на избягване на имунологичния надзор при МПН възможност за терапевтично повлияване, така че да се таргетират трункусните мутации (напр. JAK2 V617F и мутациите на CALR)?

Изследователски хипотеза, цел и задачи

Като изходихме от формулираните по-горе неразрешени въпроси и въз основа на нашите познания в областта на имунологията, генетиката и патогенезата на МПН предположихме, че е възможно HLA генотипът да допринесе за развитието JAK2 V617F+ МПН. Това може да предполага HLA–медирана рестрикция на развитието на тази подгрупа МПН и избягване на имунологичния надзор в тяхната патогенеза чрез модулиране на експресията на ключови

компоненти от пътя на антигенна обработка и представяне в JAK2 V617F+ трансформираните МПН-СК. Работната хипотеза на този труд е обобщена графично на Фиг 1. по-долу.



За проверка и намиране на доказателства в подкрепа на нашата хипотеза или нейното отхвърляне си поставихме следната основна цел:

1. Да се изследва ролята на класическите имуногенетични фактори, а именно *HLA-I* генотипа за развитието на JAK2 V67F+ МПН.

За постигането на тази цел беше определено като нужно и възможно изпълнението на следните изследователски задачи:

1. Да се събере голяма кохорта от JAK2 V617F+ пациенти с МПН и здрави контроли от една и съща популация (Българската) с налични данни за индивидуалния *HLA-I* генотип, определен чрез съвременни методи за HLA типизиране с висока резолюция;

2. Да се сравнят нивата на хетерозиготност по *HLA-I* локуси и нивата на HLA еволюционна дивергентност при пациентите с МПН спрямо тези при здравите контроли;

3. Да се определят теоретичната способност на всеки индивидуален алел и генотип за представяне на получени от JAK2 V617F неоантигени при пациентите с МПН спрямо тези при здравите контроли;

4. Да се определят честотите на отделните *HLA-I* алели по отделни локуси и като би- и трилокусни хаплотипи и да се извършат асоциативни анализи при пациентите с МПН и здравите контроли;

5. Да се извършат симулации на молекулната динамика с потенциално протективни *HLA-I* алели и теоретично свързващите се неоантигени от JAK2 V617F белтъка;

6. Да се проверят допълнително свойствата на JAK2 V617F-получени неоантигени за ефективна обработка в пътя на антигенно представяне от *HLA-I*;

7. Да се изследва профила на гена експресия на гени от пътя за антигенна обработка и представяне от *HLA-I* в CD34+ клетки и гранулоцити от пациенти с JAK2 V617F+ ПВ, ЕТ и ПМФ;

8. Да се изследва профила на гена експресия на гени от пътя за антигенна обработка и представяне от *HLA-I* в CD34+ клетки преди и след лечение с интерферон-алфа и руксолитиниб.

III. Материали и методи

Използвани биологични данни

- Данни за наличие на JAK2 V617F мутация при пациенти с МПН (n=139).
- Данни за HLA-I генотип на пациентите с МПН (n=139) и за здрави донори от Българската популация (n=622).
- За целите на проучването са използвани данни от генна експресия, които са публично достъпни от платформата Gene Expression Omnibus с номера за достъп както следва: GSE53482, GSE103176, GSE54646, GSE47018, GSE69827, GSE120363, GSE44961.

Биостатистически и биоинформатични анализи

- Изчисляване на HLA еволюционната дивергентност (HED) на всеки индивид
- Изчисляване на най-добрия ранг на свързване (BR) и хармоничната средна от най-добрите рангове за индивида (PHBR)
- Асоциативни анализи за HLA алели и хаплотипи
- Оценка на неоепитопи
- Симулации на молекулна динамика
- Анализи на генната експресия

Всички анализи са извършени в условия на заслепяване на извършилия всички използвани биоинформатични и статистически анализи стриктно принципите на Декларацията от Хелзинки (ВШ).

IV. Резултати

HLA клас I генотипът не повлиява наличието на JAK2 V617F мутация

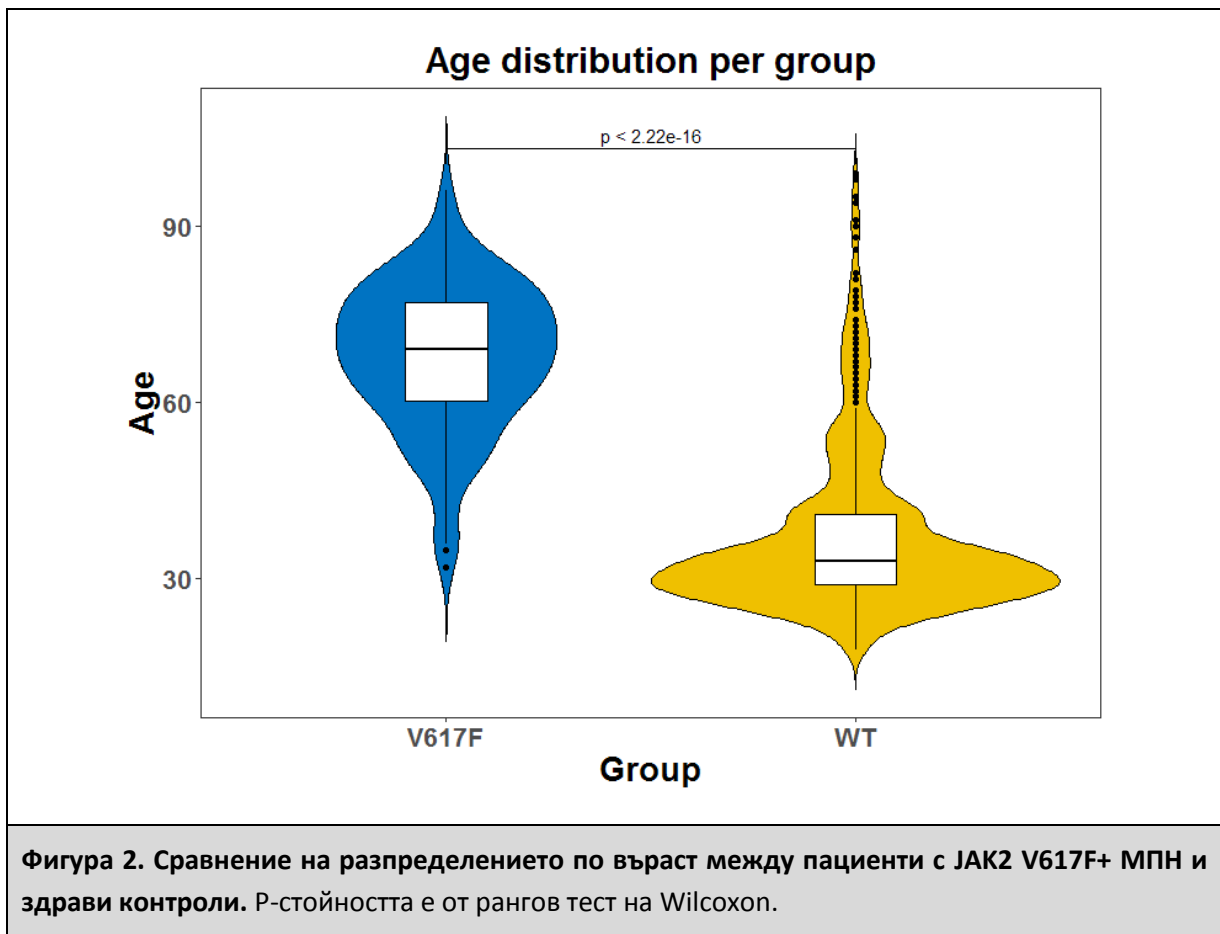
Въз основа на хипотезата, че ГКТС генотипът участва в патогенезата на JAK2 V617F+ МПН може да се очакват разлики в разпределението на HLA-I алелите и техните антиген-представящи свойства между пациентите, които имат тази мутация и здрави хора. В идеалния случай за целите на такъв анализ пациентите и контролите трябва да са от една и съща популация. С тази цел бяха генотипизирани по трите класически HLA-I локуса 139 пациенти и 622 здрави български индивиди от Кавказката раса (Табл. 1).

Таблица 1. Демографски и клинични характеристики на JAK2 V617F+ пациенти с МПН и здравите контроли, включени в проучването. P-стойностите са от двустранен Хи-квадрат тест. Съкращения: "NA"- неприложимо.

Параметър	JAK2 V617F+ МПН пациенти	Здрави контроли	P-стойност
Възраст (n)			<0.0001
≤50 години	13	529	
>50 години	126	93	
Общо	139	622	
Пол (n)			0.4647
Мъже	59	288	
Жени	80	334	
Общо	139	622	
Диагноза (n)			NA
ЕТ	51	0	
ПВ	51	0	
ПМФ (пост-ПВ/ЕТ МФ)	25 (3)	0	
МПН, неуточнена	12	0	

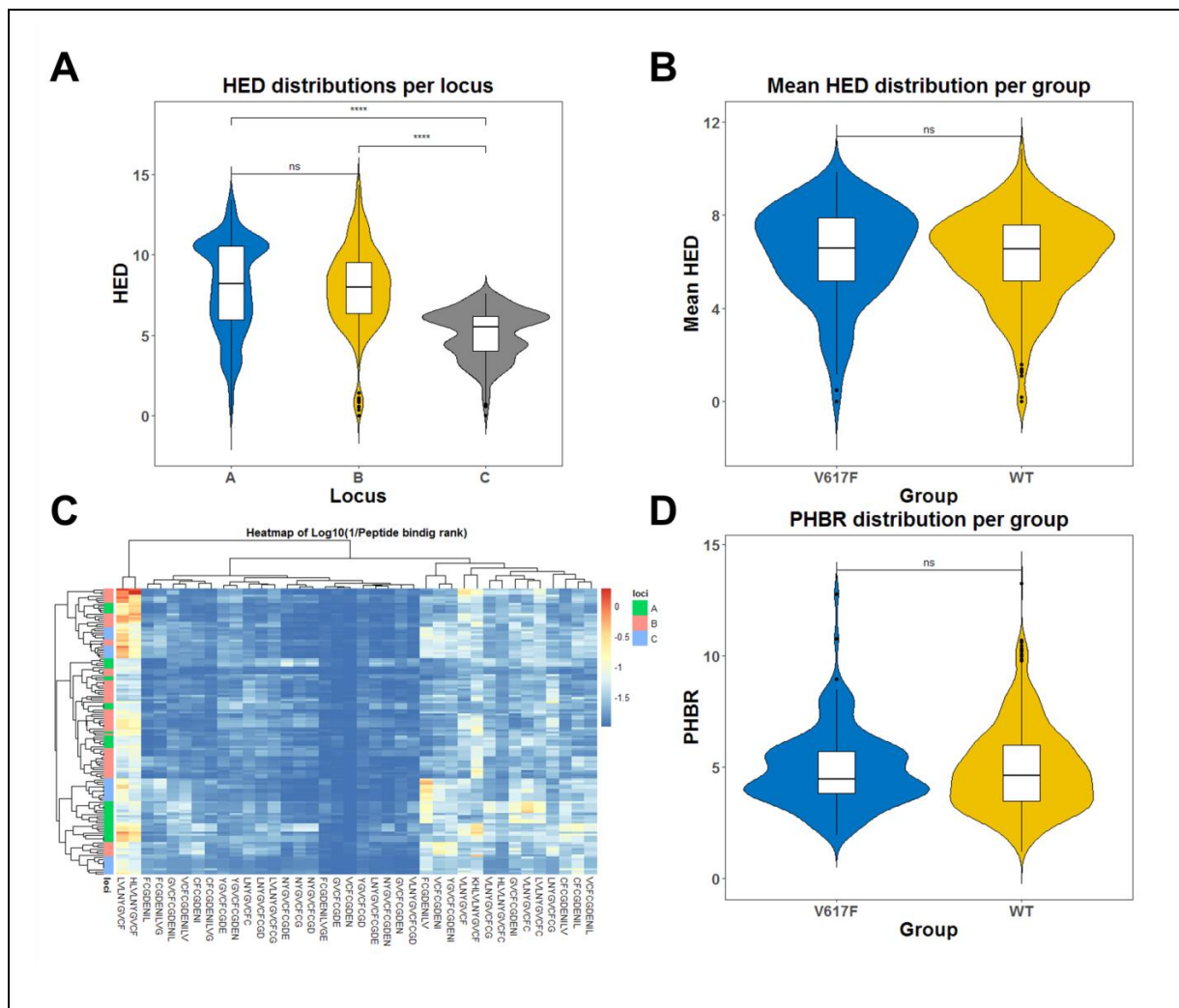
Типизирането беше извършено чрез NGS за постигане на разграничаване на HLA-I алелите на ниво 2 полета (4 знака). Кохортите от пациентите и здравите индивиди не бяха балансирани по отношение на разпределението по възраст (Табл. 1 и Фиг. 2.). Това беше

отчетено при статистическото моделиране на HLA алелните и хаплотипни асоциации, както е описано по-долу.



Фигура 2. Сравнение на разпределението по възраст между пациенти с JAK2 V617F+ МПН и здрави контроли. P-стойността е от рангов тест на Wilcoxon.

Вече е доказано, че JAK2 V617F мутацията е основният направляващ фактор на онкогенезата при МПН, но изглежда е необходимо натрупването на допълнителни мутации, за да се поддържа разрастването на клоналната хемопоеза. В действителност вече е демонстрирано от големи проучвания, че някои допълнителни гени са мутирали при JAK2 V617F+ МПН.



Фигура 3. Оценка на разнообразието на HLA генотипа и на теоретичната способност да се представят неоепитопи, получени от JAK2 V617F белтъка. (A) Разпределение на стойностите на HED за всички включени индивиди по locus. **(B)** Сравнение на разпределението на средната HED между пациенти с JAK2 V617F+ МПН и здрави контроли. **(C)** Обобщение на резултатите от предикциите от NetMHCpan 4.0, представени като heatmap от log10 от инвертираните ранкове на свързване за JAK2 V617F получените пептиди за всеки идентифициран HLA-I алел при МПН пациенти и здрави контроли. Всяка редица представя отделен HLA-I алел, а всяка колона представя един от 38-те изследвани получени от JAK2 V617F пептиди. Колкото стойността е по-близо до 0, толкова по-добро е свързването с определен HLA-I алел (вж. легендата за цветното кодиране). **(D)** Разпределение на стойностите на PHBR между пациентите с JAK2 V617F+ МПН и здравите контроли. P-стойностите са от двустранни тестове на Wilcoxon. Съкращения: “HED”- HLA еволюционна дивергентност; “PHBR” – patient harmonic mean best rank; “WT” – див тип. Означения на p-стойностите: ns – $p > 0.05$, * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$, *** – $p \leq 0.001$, **** – $p \leq 0.0001$.

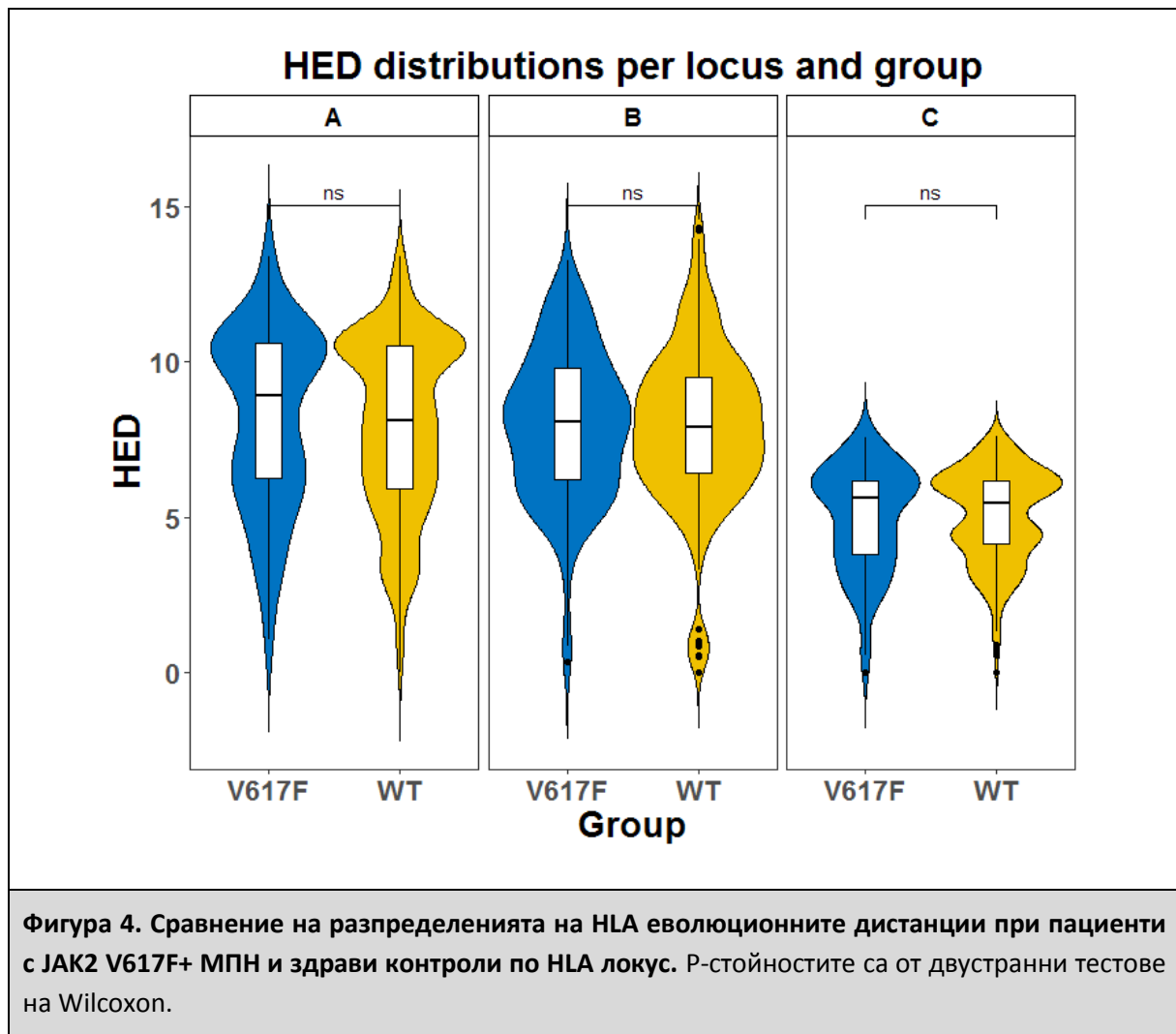
Тъй като всички кодиращи мутации в тези гени теоретично могат да са източник на неоепитопи, които след това да се подлагат на имунологична редакция, първо поставихме въпроса дали нивото на глобално HLA-I разнообразие е свързано с наличието на JAK2 V617F

мутация. Не се откри никаква асоциация между нивото на хомозиготност и наличието на мутацията (Табл. 2.). Тъй като зиготността се оценява въз основа на алелното означение, то хетерозиготността в даден локус не отразява непременно значима разлика в структурата на пептид-свързващата цепка и в пептиди-свързващите свойства на двата алела в хетерозиготно състояние. Глобалният метричен показател за еволюционна дивергентност между два пептида е дистанцията по Grantham, която отчита разликите в аминокиселинното съдържание на две подравнени пептидни секвенции. Затова беше определена HLA еволюционната дивергентност (HED) въз основа на дистанцията по Grantham за всеки локус, както и средната HED за трите локуса за всеки пациенти и за всеки индивид от контролната група. В реда на очакваното *HLA-A* и *-B* локусите имаха значително по-висока HED отколкото *-C* локуса (Фиг. 3.). Следва да се отбележи, че наличието на JAK2 V617F мутация не беше асоциирано с каквато и да е разлика в нивото на HED за който и да е локус, както и със средната HED (Фиг. 4).

Таблица 2. Сравнение на хомозиготността на HLA локусите при пациенти с JAK2 V617F+ МПН и здрави контроли. P-стойностите са от двустранни Хи-квадрат тестове.				
Локус	Група	Хетерозиготни индивиди (n)	Хомозиготни индивиди (n)	P-стойност
HLA-A	V617F+	119	20	1
	Контроли	530	92	
HLA-B	V617F+	129	8	1
	Контроли	584	37	
HLA-C	V617F+	122	11	0.42
	Контроли	544	68	
Който и да е локус	V617F+	100	32	0.724
	Контроли	451	160	
Които и да е два	V617F+	136	3	0.27
	Контроли	593	20	
Всички	V617F+	131	1	1
	Контроли	605	6	

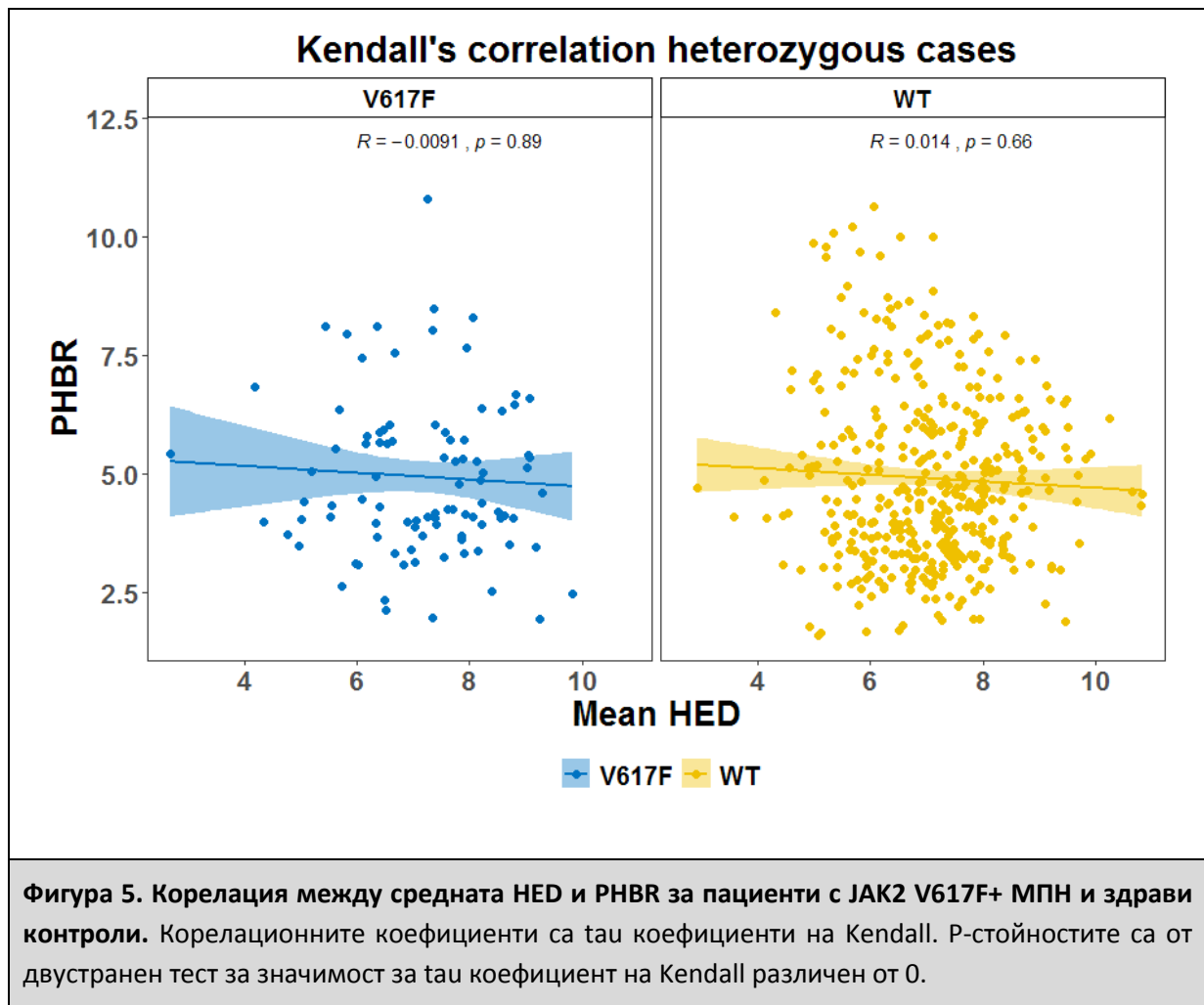
Допълнително изследвахме теоретичната способност на HLA-I молекулите да представят пептиди, получени от JAK2 V617F-мутиралия белтък. За целта беше следвана процедурата, разработена от Marty et al. (2017) за определяне на теоретичния най-добър ранг на свързване

(BR) за всеки локус, както и т. нар. PHBR за всеки пациент и здрав индивид, включен в проучването (Фиг. 3C,D).



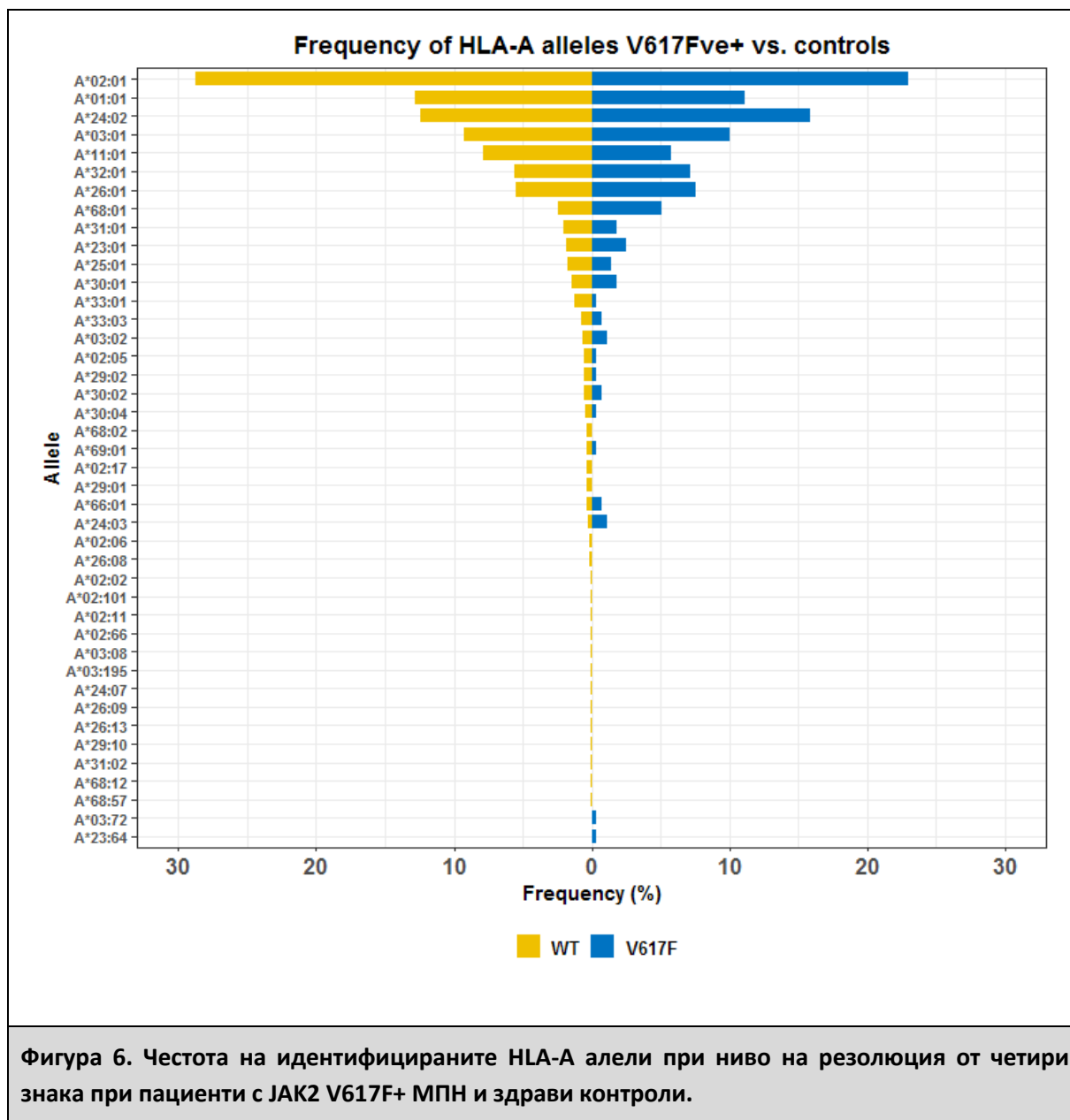
По-високият BR е показател за по-лоши свързващи свойства на алела от даден локус, докато по-високият PHBR насочва към по-добри антиген свързващи свойства на целия *HLA-I* генотип на даден индивид. Оказа се, че някои алели биха могли теоретично да свързват ограничен набор от 9-и и 10-мерни мутантни пептиди (Фиг. 3C). Стойностите на PHBR обаче не се различават значимо между пациентите и здравите контроли (Фиг. 3D). Освен това средните HED и PHBR не корелират помежду си нито за пациентите с МПН, нито за контролните индивиди (Фиг. 5.). Като цяло тези резултати предполагат, че цялостното разнообразие и теоретичните антиген-свързващи свойства на *HLA-I* генотипа не повлияват наличието на JAK2

V617F мутация. Тези данни обаче не изключват наличието на специфични HLA алели, които биха могли да повлияят наличието на JAK2 V617F мутация.



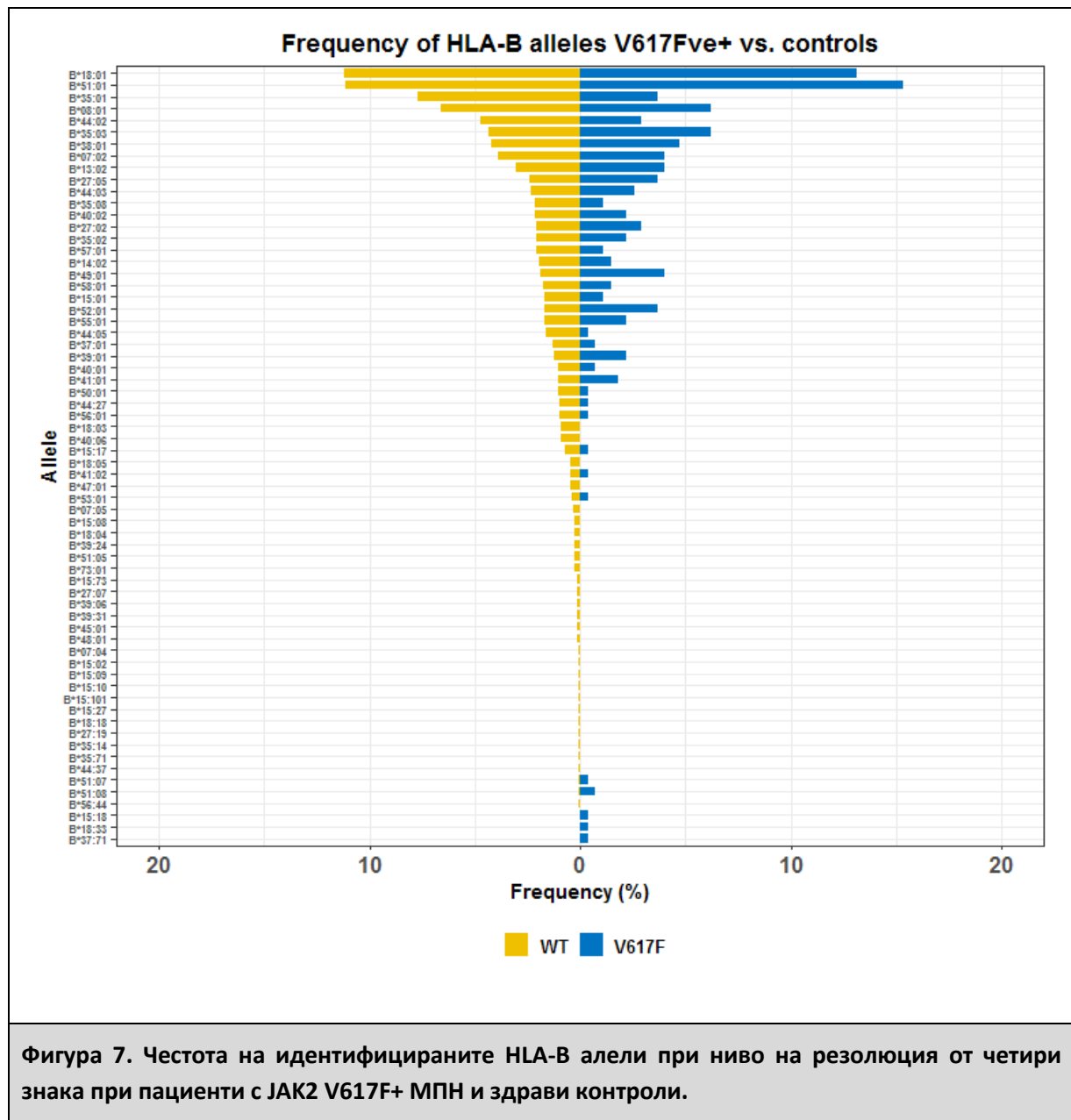
Специфични HLA клас I алели са асоциирани с понижен риск от JAK2 V617F+ МПН

За да се идентифицират предполагаеми HLA-I алели, които биха могли да са протективни за развитие на JAK2 V617F+ МПН, беше извършен сравнителен анализ на алелните честоти за HLA-A, -B, и -C loci. Както се очаква най-голям брой уникални алели се установи са B локуса, докато C локуст беше с най-малко алелно разнообразие (Фиг. 6-8).

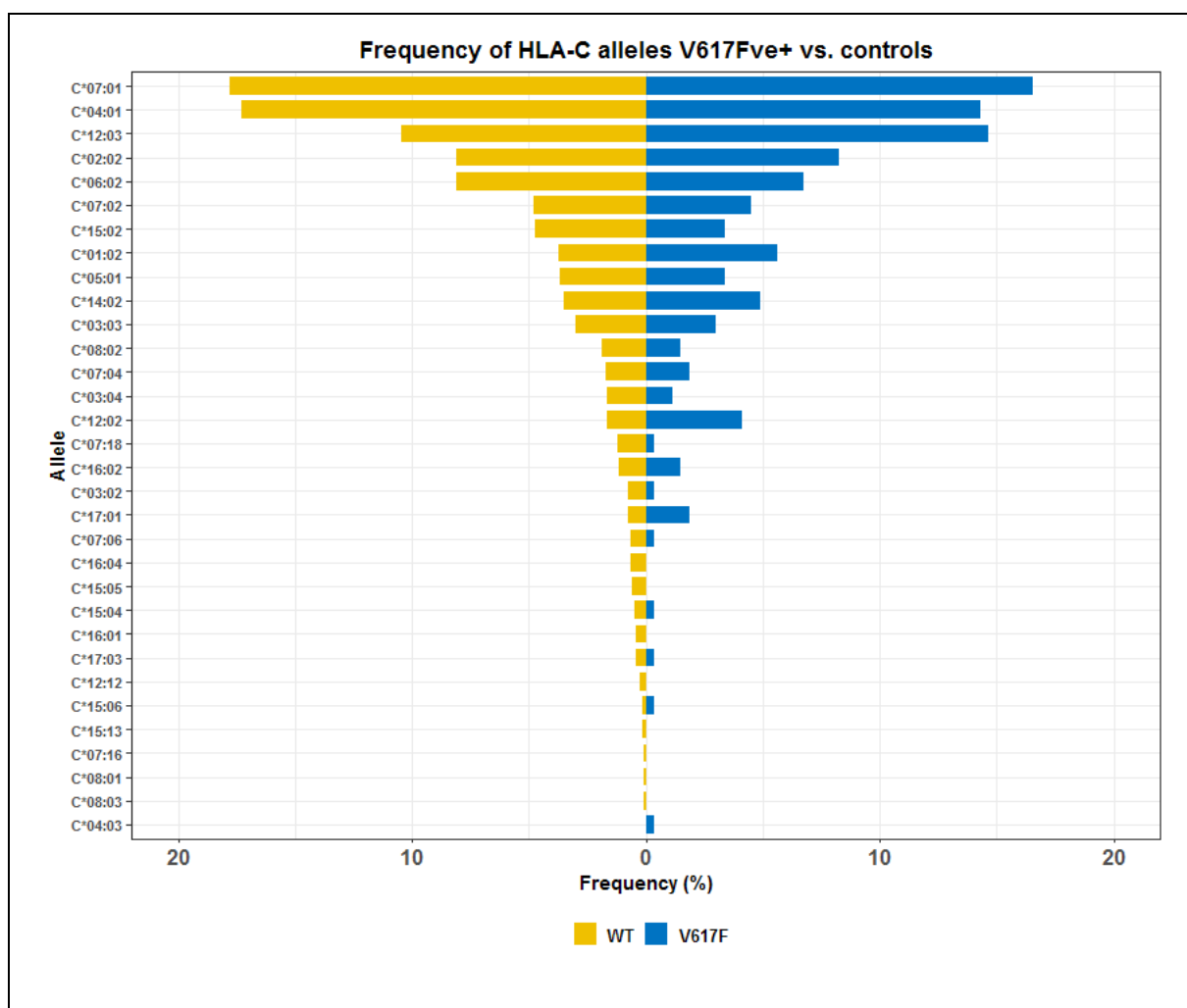


За да се изгради рационална хипотеза за асоциацията на специфични алели с JAK2 V617F мутацията бяха приложени мултивариационни генерализирани модели с пол и възраст над 50 години като ковариабилни променливи. Три алела се оказаха значително по-редки при наличие на JAK2 V617F мутация: *HLA-A*02:01* ($p=0.036$), *HLA-B*35:01* ($p=0.017$), *HLA-C*15:02* ($p=0.033$) (Фиг. 23A и Табл. S10-S12). От друга страна четири други алела бяха статистически значимо асоциирани с наличието на JAK2 V617F мутация, а именно: *HLA-B*44:03* ($p=0.044$), *HLA-B*41:01* ($p<0.001$), *HLA-C*12:03* ($p=0.040$) и *HLA-C*17:01* ($p<0.0001$) (Фиг. 9A). Тъй като тези асоциации могат да са значително повлияни от относителната честота на алелите беше

потърсено допълнително доказателство, че някои алели показват обратна корелация с JAK2 V617F+ МПН.

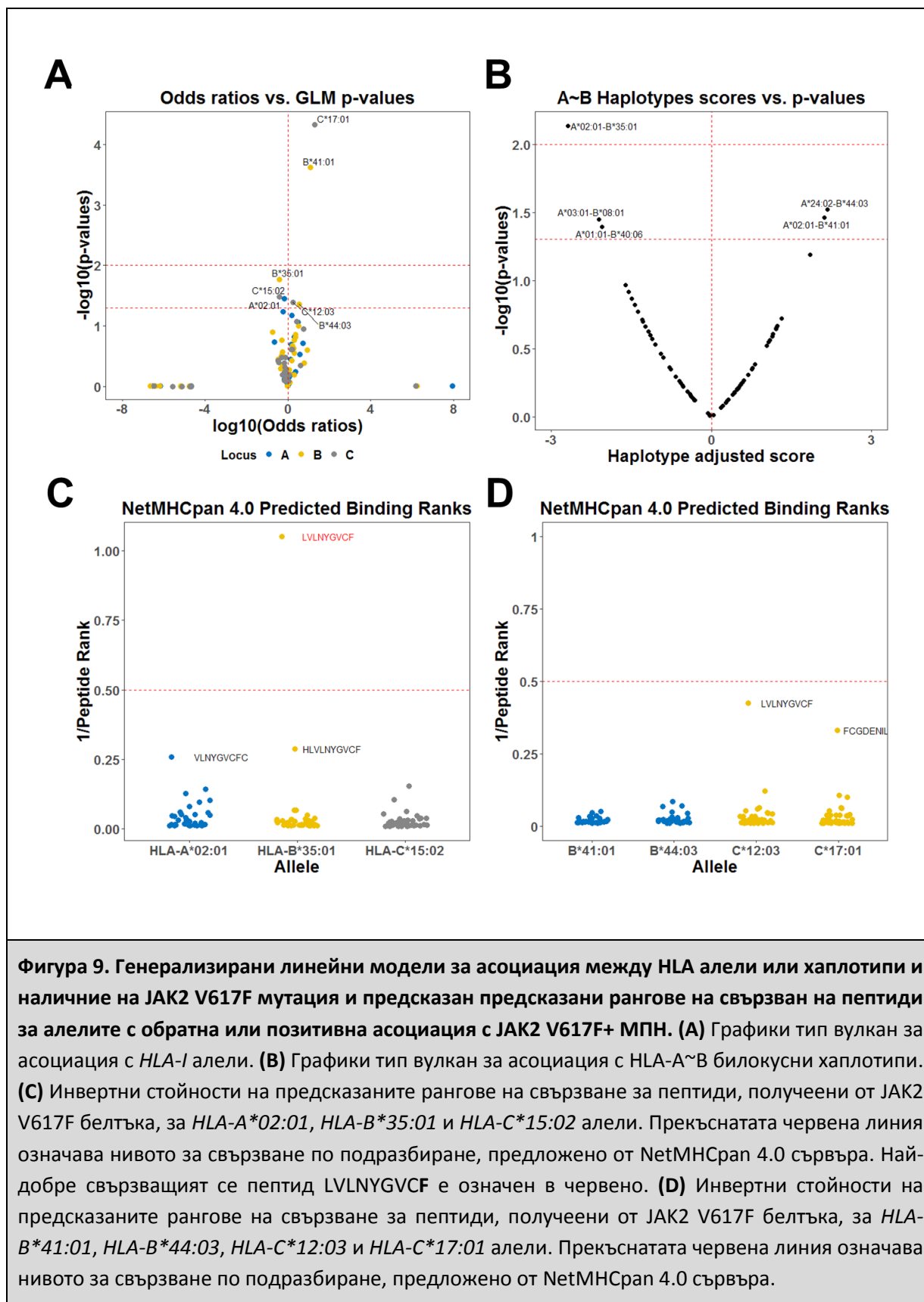


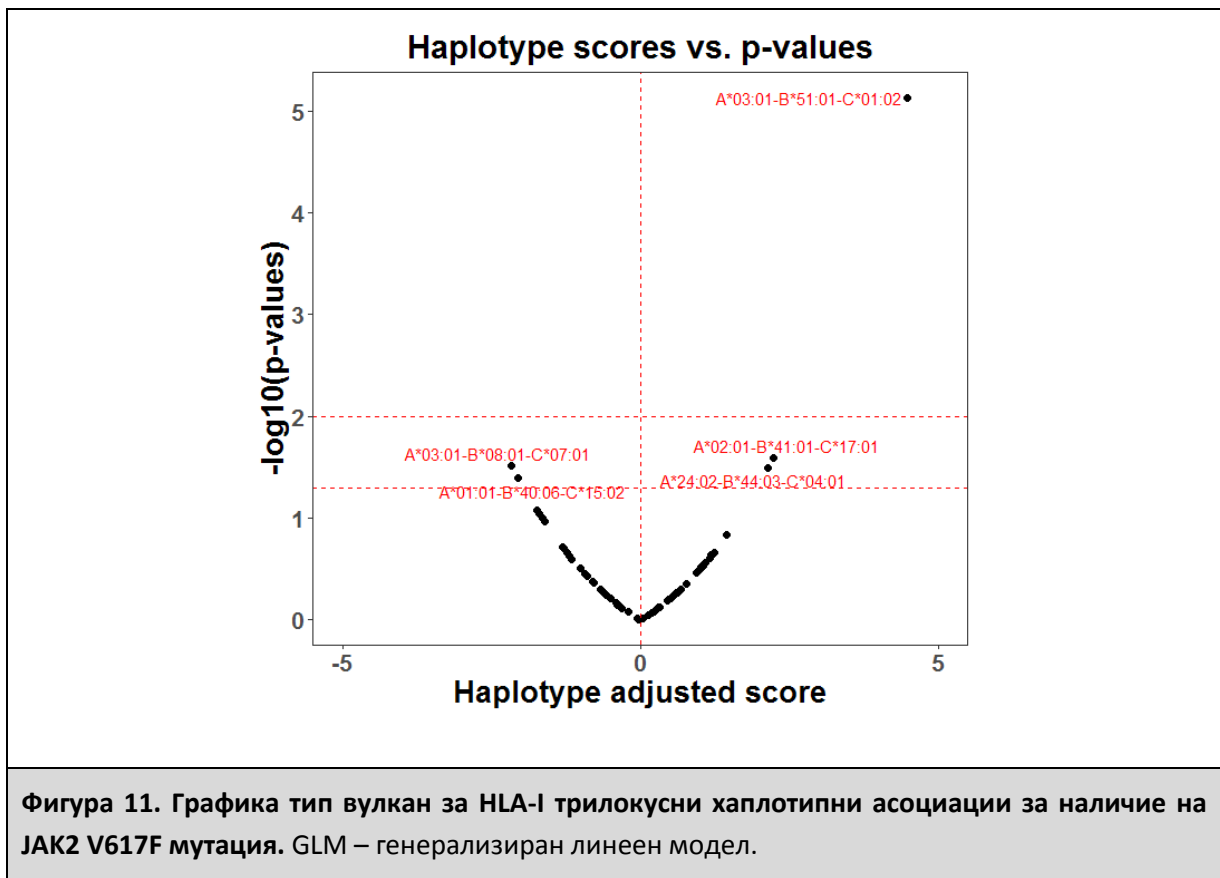
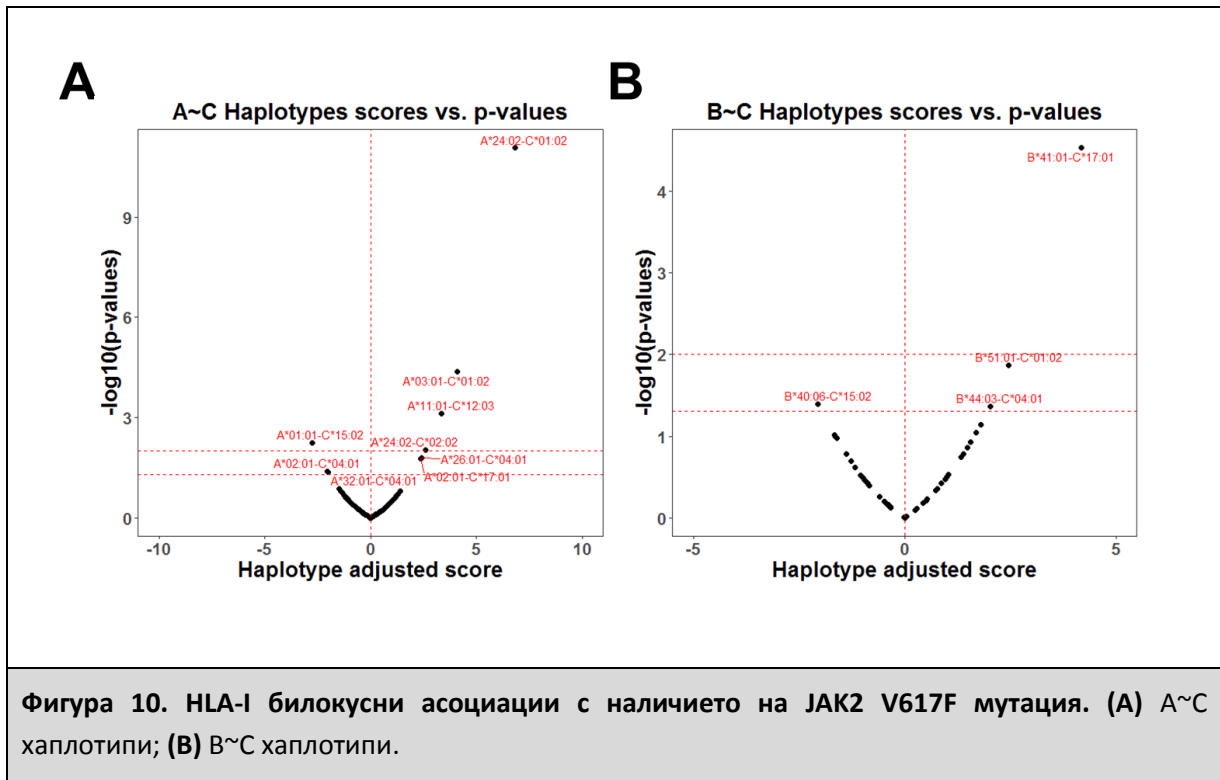
Фигура 7. Честота на идентифицираните HLA-B алели при ниво на резолюция от четири знака при пациенти с JAK2 V617F+ МПН и здрави контроли.

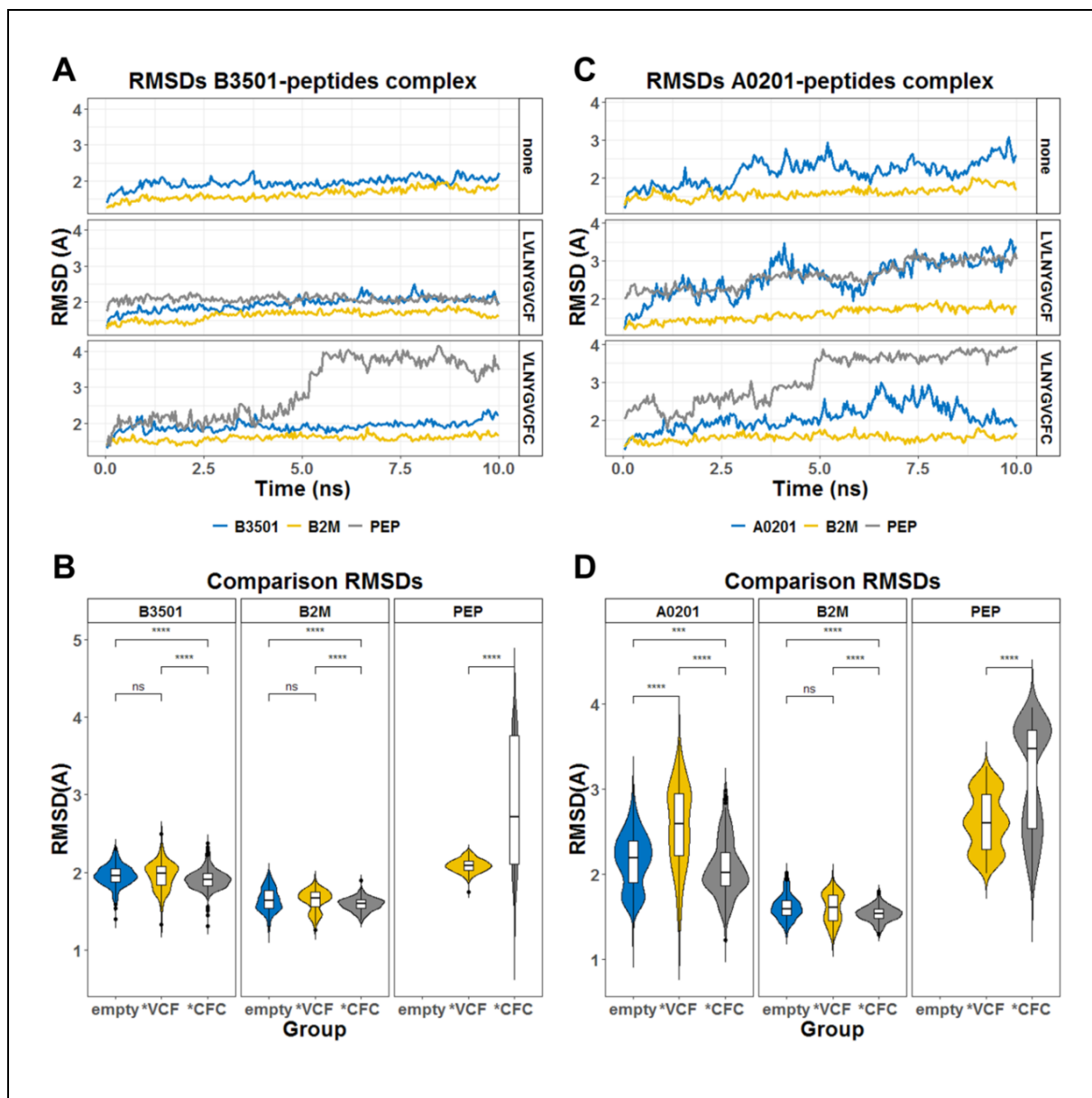


Фигура 8. Честота на идентифицираните HLA-C аели при ниво на резолюция от четири знака при пациенти с JAK2 V617F+ МПН и здрави контроли.

В това отношение анализът на билokusните хаплотипи показва, че хаплотипът *HLA-A*02:01~HLA-B*35:01* е най-значимо рядък при JAK2 V617F+ МПН ($p=0.006$) (Фиг. 9B). Асоциациите с други билokusни и трилокусни хаплотипи са представени на Фиг. 10-12.







Фигура 12. Симулации на молекулната динамика на свързването на LVLNYGVCF и VLNYGVCFC пептиди с HLA-B*35:01 и HLA-A*02:01. **(A)** Динамика на стойностите на RMSD на алфа-въглеродните атоми в продължение на 10 ns за празните HLA-B*35:01 конформери (“empty”) в комплекс с предсказания свързващ се пептид (“LVLNYGVCFC”) и несвързващия се пептид (“VLNYGVCFC”). **(B)** Сравнение на разпределението на стойностите на RMSD за всеки комплекс в симулацията **(A)**. **(C)** Динамика на стойностите на RMSD на алфа-въглеродните атоми в продължение на 10 ns за празните HLA-A*02:01 конформери (“empty”) и в комплекс с несвързващите се пептиди (“LVLNYGVCFC” and “VLNYGVCFC”). **(D)** Сравнение на разпределението на RMSD стойностите за всеки комплекс при трите симулации в **(C)**. Всички p-стойности са от двустранни тестове на Wilcoxon. Съкращения: “RMSD” – root mean squared deviation; “PEP”-пептид; “A”-Ангщрьом; “ns”-наносекунди. Означаване на p-стойностите: ns – $p > 0.05$, * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$, *** – $p \leq 0.001$, **** – $p \leq 0.0001$.

Неоепитопът LVLNYGVCF покрива критериите за ефективно представяне от HLA-B*35:01

За да се предложи механистично обяснение за наличието на протективни HLA-I алели ние проверихме отново ранговете на свързване за всички 38 8-, 9-, 10- и 11-мерни пептиди, които могат да се получат от JAK2 V617F мутиралия белтък. Измежду тези пептиди един 9-мерен (LVLNYGVCF) се оказва с предикция за слабо свързване с HLA-B*35:01 според предефинираните критерии на NetMHCpan 4.0 сървъра (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCstab/>), т.е. ранг на свързване между 0.5 и 2.0% (Фиг. 9C). Освен това NetMHCstab 1.0 сървъра предсказва, че измежду тези пептиди именно LVLNYGVCF е най-стабилно свързващият се с HLA-B*35:01 (Табл. 3.).

Таблица 3. Резултати от анализа за стабилност на свързването с използване на NetMHCstab 1.0 сървъра за 9-мерни пептиди и HLA-B35:01.						
Пептид	Предсказан	T 1/2 (часа)	1-log50k	Афинитет (nM)	Комбиниран	Средно
LVLNYGVCF	0.1764	0.7989	0.418	540.07	0.3818	0.3818
VLNYGVCF	0.0114	0.3097	0.046	30396.07	0.0408	0.0408
LNyGVCF	0.0216	0.3615	0.067	24349.41	0.0602	0.0602
NYGVCF	0.0071	0.2799	0.028	36931.66	0.0249	0.0249
YGVCF	0.111	0.6308	0.068	23957.42	0.0745	0.0745
GVCF	0.0134	0.3215	0.041	32259.8	0.0369	0.0369
VCF	0.0484	0.4577	0.076	21970.92	0.0719	0.0719
CF	0.0175	0.3425	0.095	17888.25	0.0834	0.0834
FC	0.0434	0.442	0.06	25982.58	0.0575	0.0575

Същото наблюдение се потвърждава и от SYFPEITHI сървъра (www.syfpeithi.de), както е показано на Табл. 4.

Таблица 4. Предсказани рангове на свързване на получени от JAK2 V617F неонапептиди с HLA-B*35:01 чрез използване на SYFPEITHI сървъра.	
Пептид	Скор
LVLNYGVCF	11
CF	11
VCF	7
FC	4

LNYGVCFCG	1
YGVCFCGDE	1
VLNYGVCFC	0
NYGVCFCGD	0
GVCFCGDEN	0

Аналогичният анализ за свързването на 9-мерните пептиди с HLA-A*02:01 показва, че VLNYGVCFC е най-добре представящият се пептид според NetMHCpan 4.0 сървъра (въпреки че не достига арбитражното ниво за слабо свързващ се пептид от 2.0%) (Фиг. 9C). Същите са заключенията и от NetMHCstab 1.0 (Табл. 5) и SYFPEITHI (Табл. 6.) сървърите.

Таблица 5. Резултати от анализа за стабилност на свързването с използване на NetMHCstab 1.0 сървъра за 9-мерни пептиди и HLA-A*02:01.

<i>Пептид</i>	<i>Предсказан</i>	<i>T 1/2 (часа)</i>	<i>1-log50k</i>	<i>Афинитет (nM)</i>	<i>Комбиниран</i>	<i>Средно</i>
VLNYGVCFC	0.5645	2.4243	0.368	932.72	0.3975	0.3975
FCGDENILV	0.4358	1.6689	0.252	3272.12	0.2796	0.2796
LVLNYGVCF	0.043	0.4406	0.139	11172.82	0.1246	0.1246
VCFCGDENI	0.0851	0.5625	0.102	16673.41	0.0995	0.0995
CFCGDENIL	0.0078	0.2854	0.054	27725.29	0.0471	0.0471
LNYGVCFCG	0.1034	0.6109	0.052	28485.48	0.0597	0.0597
GVCFCGDEN	0.0077	0.2845	0.034	34610.27	0.03	0.03
NYGVCFCGD	0.0051	0.2626	0.027	37333.42	0.0237	0.0237
YGVCFCGDE	0.0051	0.2629	0.021	39622.53	0.0186	0.0186
FCGDENILV	0.0434	0.442	0.06	25982.58	0.0575	0.0575

Таблица 6. Предсказани рангове на свързване на получени от JAK2 V617F нонапептиди с HLA-A*02:01 чрез използване на SYFPEITHI сървъра.

<i>Пептид</i>	<i>Скор</i>
VLNYGVCFC	17
CFCGDENIL	13
VCFCGDENI	12
FCGDENILV	12
LVLNYGVCF	11
GVCFCGDEN	6
LNYGVCFCG	5
YGVCFCGDE	3
NYGVCFCGD	1

От друга страна нито един от мутантните пептиди, позитивно асоциирани с JAK2 V617F мутация, не достига дефинирания от NetMHCpan4.0 прагов ранг за свързване за HLA алелите (Фиг. 9D). Представянето на HLA-I антигени *in vivo* изисква ефективно протеазомно разцепване и ефективен TAP-медиран транспорт до ендоплазмения ретикулум (ER). Беше използван NetMHCshop 3.1 сървърът (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>), за да се покаже, че пептидът LVLNYGVCF може да се получи при протеазомното разграждане на JAK2 V617F-мутиралия белтък (Табл. 7.). Освен това инструментът TAPPred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/tappred/>) показва, че LVLNYGVCF е най-добре свързващият се с TAP транспортерите пептид измежду всички възможни 9-мерни пептиди, съдържащи V617F мутация (Табл. 8.).

Таблица 7. Предсказване на протеазомното разцепване с използване на NetMHC shop 3.1 сървъра с метод 20S 3.0. Въведена е 29-мерна пептидна секвенция: KLSHKHLVLNYGVCF CGDENILVGEFVKF. Знакът "S" в колоната „Разцепване“ означава предсказано място на разцепване след маркираната аминокиселинна позиция.			
Позиция	Аминокиселина	Разцепване	Скор
1	K	.	0.052129
2	L	S	0.814683
3	S	.	0.108973
4	H	S	0.963449
5	K	.	0.114662
6	H	S	0.578722
7	L	S	0.575888
8	V	S	0.853866
9	L	S	0.948302
10	N	S	0.548877
11	Y	S	0.920869
12	G	.	0.207565
13	V	S	0.918516
14	C	.	0.289169
15	F	S	0.970047
16	C	.	0.451041
17	G	.	0.107042
18	D	S	0.932481
19	E	.	0.345346
20	N	.	0.214343
21	I	.	0.291945

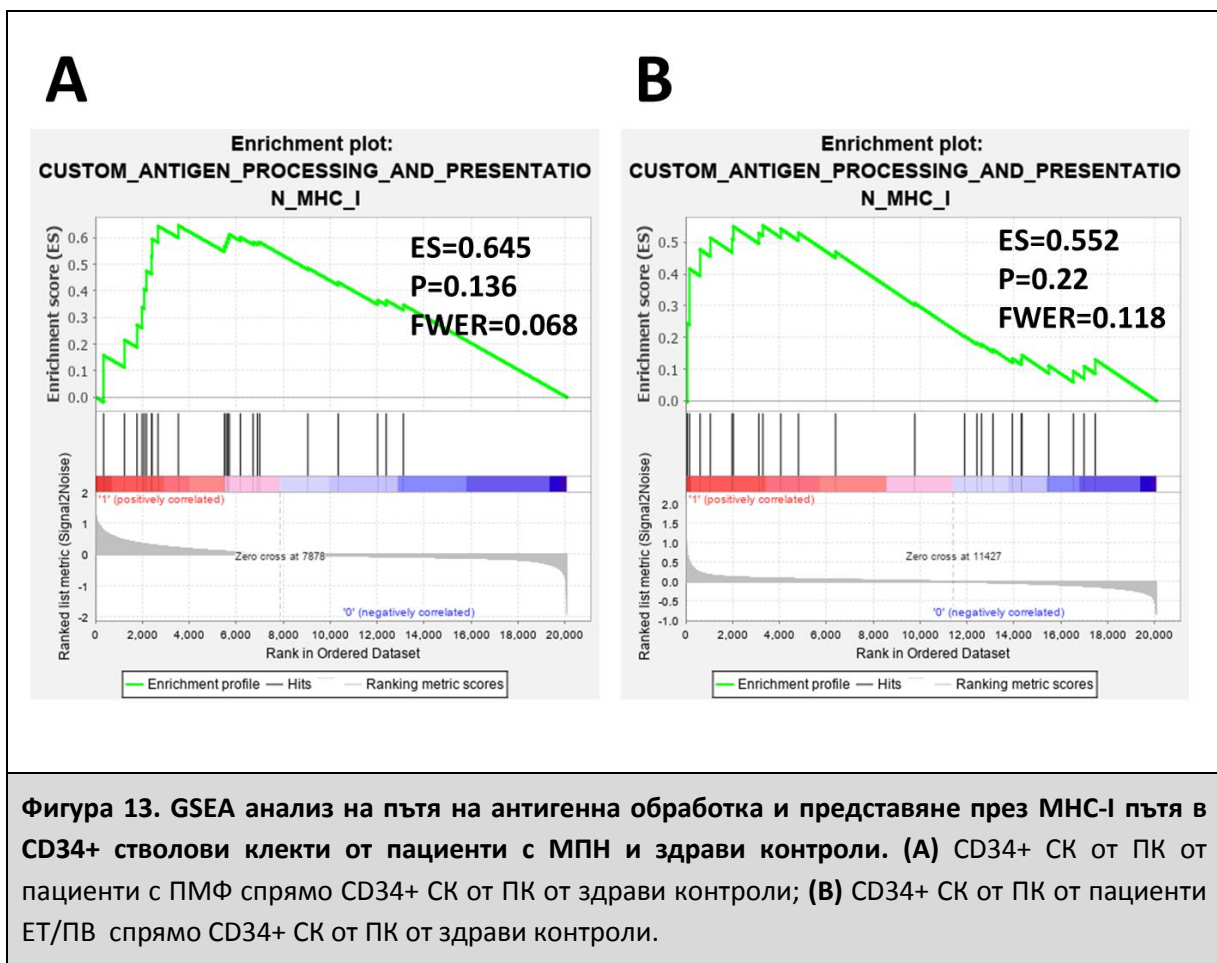
22	L	.	0.479267
23	V	.	0.412147
24	G	S	0.834033
25	E	.	0.423634
26	F	.	0.104392
27	V	S	0.907699
28	K	.	0.161427
29	F	S	0.741238

Таблица 8. Предсказване на свързването на получени от JAK2 V617F белтък 9-мерни пептиди чрез използване на TAPPred сървър. Въведената секвенция е 17-мерният пептид: LVLNYGVCFCGDENILV.

<i>Ранг</i>	<i>Начална позиция</i>	<i>Секвенция</i>	<i>Скор</i>	<i>Предсказан афинитет</i>
1	1	LVLNYGVCF	7.368	Висок
2	3	LVNYGVCF	3.476	Междинен
3	8	CFCGDENIL	2.4	Нисък или неоткриваем
4	4	NYGVCF	1.173	Нисък или неоткриваем
5	7	VCFCGDENI	0.908	Нисък или неоткриваем
6	2	VLNYGVCF	0.673	Нисък или неоткриваем
7	9	FCGDENILV	0.296	Нисък или неоткриваем
8	6	GVCFCGDEN	-1.908	Нисък или неоткриваем
9	5	YGVCF	-6.656	Нисък или неоткриваем

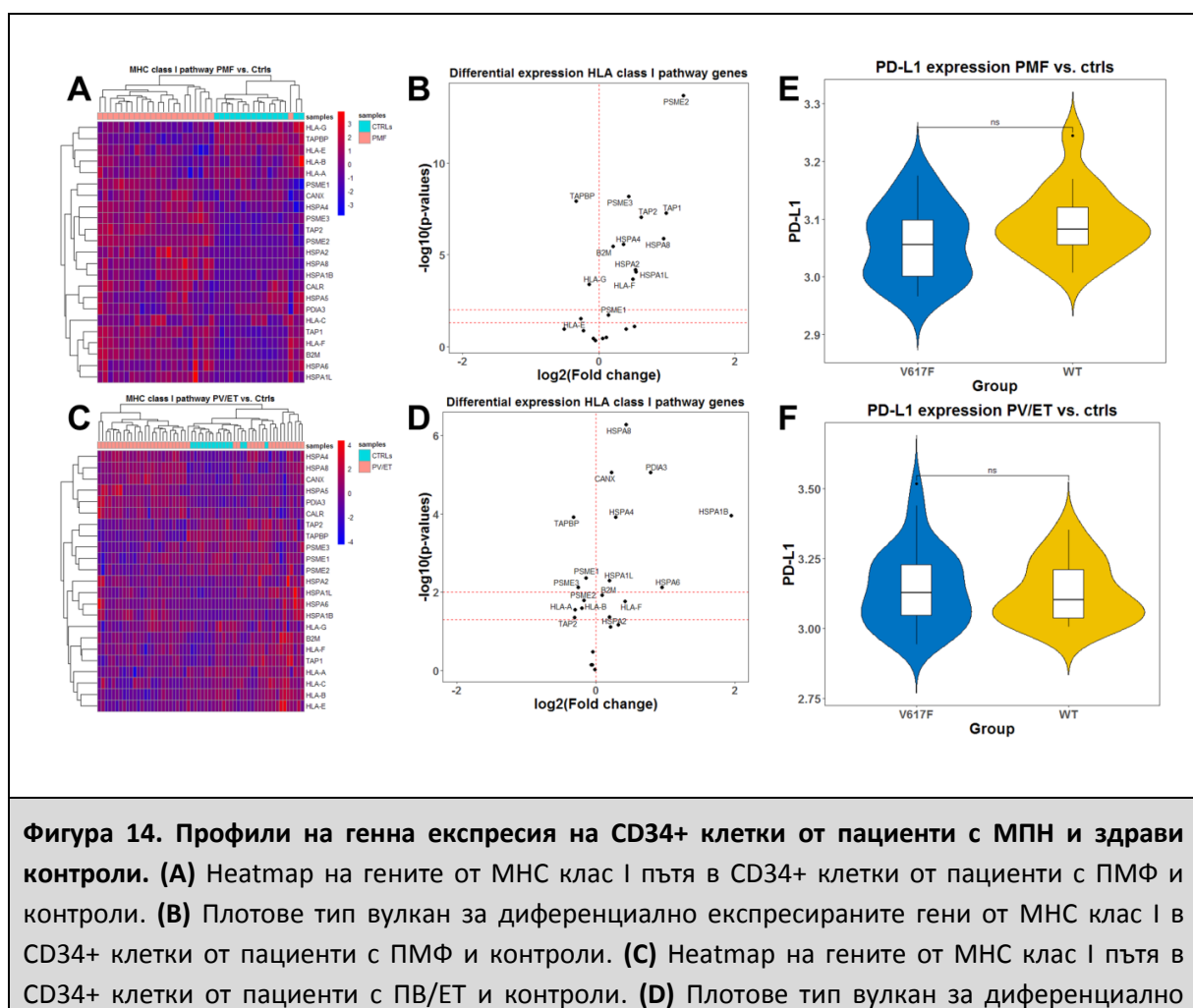
Допълнително, за да се определи динамиката на свързването на LVLNYGVCF с HLA-B*35:01, бяха направено симулации на молекулната динамика на свързването с продължителност от по 10 ns (Фиг. 27.). Следва да се отбележи, че по време на симулациите стойностите на RMSD за алфа въглеродните атоми на тежката верига на HLA-B*35:01 комплекса, бета-2-микроглобулина (B2M) и LVLNYGVCF остават стабилни около стойността от 2 Ångströms (Å) (Фиг. 12A). За сравнителна симулация беше използван друг получен от V617F нономер, VLNYGVCF, за който е предсказано, че не се свързва с HLA-B*35:01. При тази симулация стойностите на RMSD за HLA-B*35:01 и B2M остават стабилни около 2 Å, но стойностите на RMSD на пептида достигат почти 4 Å около 5 ns след началото на симулацията и остават около тази стойност по време на цялата симулация (Фиг. 12A). Това води до значимо по-високи стойности на RMSD в сравнение със свързващия се пептид LVLNYGVCF (Фиг. 12B).

Аналогичният анализ на свързването на двата пептида с HLA-A*02:01 комплекса (Фиг. 12C,D) показва по-високи стойности на RMSD за тежката верига на HLA-A*02:01 комплекса и пептидите в сравнение с комплексите HLA-B*35:01-пептид. Следва да се отбележи, че стойностите на RMSD са по-високи за HLA-A*02:01 молекулата в комплекс с LVLNYGVCF в сравнение с комплекса с VLNYGVCFC (Фиг. 12D). Същото се отнася и за самите пептиди, т.е. LVLNYGVCF е с по-високи RMSD стойности отколкото VLNYGVCFC (Фиг. 12D). Като цяло тези данни предполагат, че неоантигенът LVLNYGVCF покрива всички теоретични изисквания за ефективна антигенна обработка и представяне от специфичната HLA-B*35:01 молекула. Възможно е HLA-A*02:01 да представя VLNYGVCFC, който е не по-малко ефективно получаван при протеазомното разцепване, но се транспортира в малка степен до ER.



JAK2 V617F+ CD34+ стволони клетки са с понижена експресия на молекули от HLA клас I

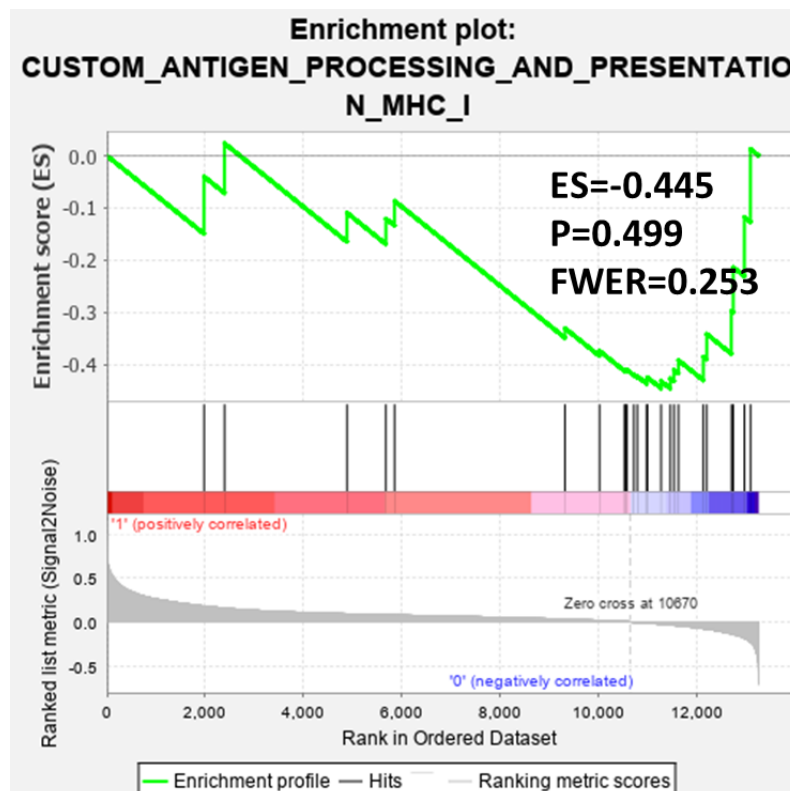
Тъй като най-високо ранкираният протективен алел *HLA-B*35:01* не показва пълна липса при пациенти с *JAK2 V617F+* МПН, беше допуснато, че могат да съществуват няколко механизма, отговорни за избягването на трансформираните *JAK2 V617F+* ХСК от *HLA-B*35:01*-медирана имунна редакция. Най-рационалното обяснение би било, че в много случаи МПН стволоните клетки (МПН-СК) имат понижена експресия на молекулите, участващи в антигенната обработка и представяне през HLA-I пътя. Затова специално беше изследвана експресията на *HLA-I* молекули от *CD34+* клетки при ПМФ, ПВ и ЕТ спрямо здрави контроли. За целта бяха използвани обществено достъпни набори от данни като бяха селектирани гените от пътя за антигенна обработка и представяне от МНС-I (KEGG база-данни).



Фигура 14. Профили на гена експресия на *CD34+* клетки от пациенти с МПН и здрави контроли. (A) Heatmap на гените от МНС клас I пътя в *CD34+* клетки от пациенти с ПМФ и контроли. (B) Плотове тип вулкан за диференциално експресирани гени от МНС клас I в *CD34+* клетки от пациенти с ПМФ и контроли. (C) Heatmap на гените от МНС клас I пътя в *CD34+* клетки от пациенти с ПВ/ЕТ и контроли. (D) Плотове тип вулкан за диференциално

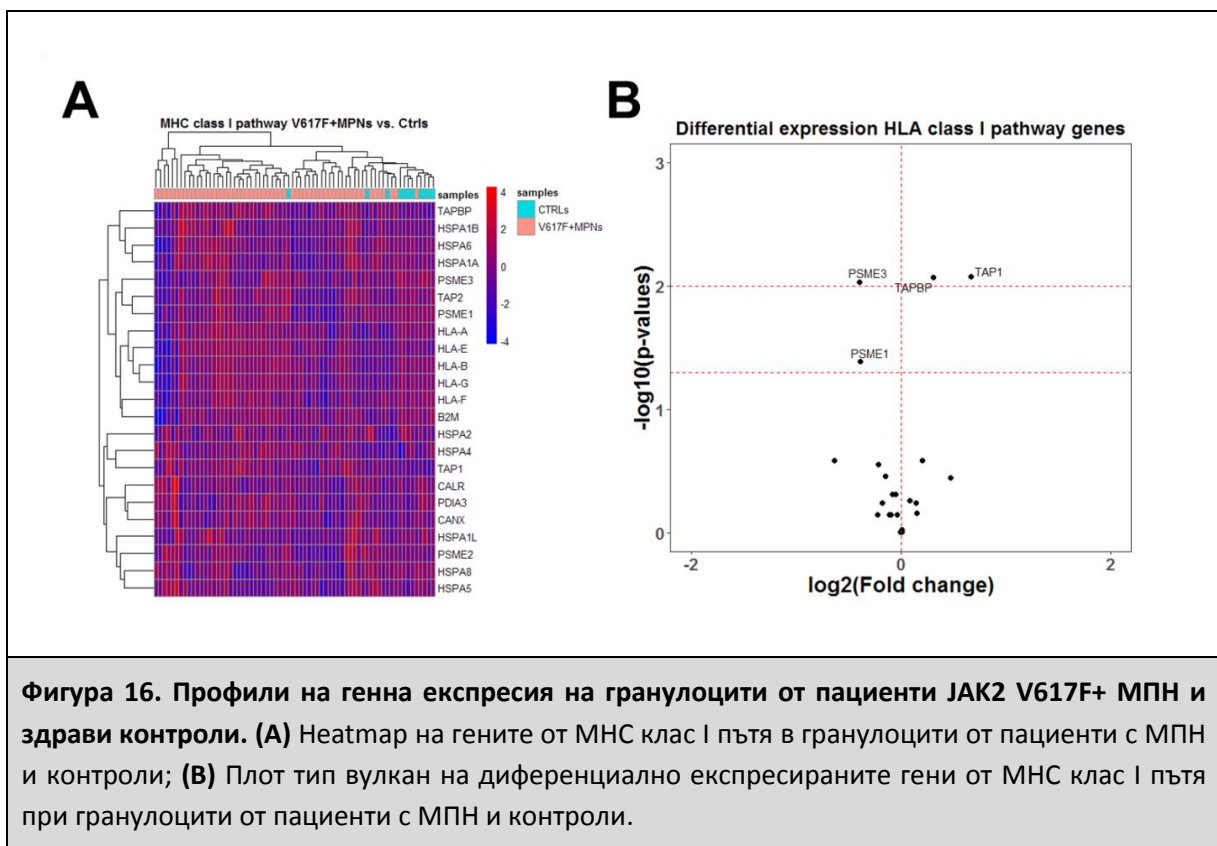
експресираните гени от МНС клас I в CD34+ клетки от пациенти с ПВ/ЕТ и контроли. (E) Сравнение на нивото на експресия на *PD-L1* в CD34+ от пациенти с ПМФ спрямо контроли. P-стойностите са от двустаранен t-тест. (F) Сравнение на нивото на експресия на *PD-L1* в CD34+ от пациенти с ПМФ спрямо контроли. P-стойностите са от двустаранен t-тест. Горизонталните червени прекъснати линии в (B) и (D) отразяват нива на значимост от 0.05 и 0.01. Означаване на P-стойностите в (E) и (F): ns – $p > 0.05$, * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$, *** – $p \leq 0.001$, **** – $p \leq 0.0001$.

GSEA анализът не показва статистически значимо обогатяване на профила на гена експресия на CD34+ клетки от периферна кръв (ПК) от пациенти с ПМФ спрямо този на CD34+ от здрави контроли (Фиг. 13A). Тези наблюдения са потвърдени и по отношение на експресията на отделните *HLA-A*, *-B* и *-C* гените чрез използване на стандартен анализ за диференциална гена експресия с алгоритъма *limma* (Фиг. 14A,B). Същият анализ показва статистически значима понижена експресия на само един ген, участващ директно в антигенното представяне от класическите HLA-I молекули, тапазин (*TAPBP*) (Фиг. 14A,B).

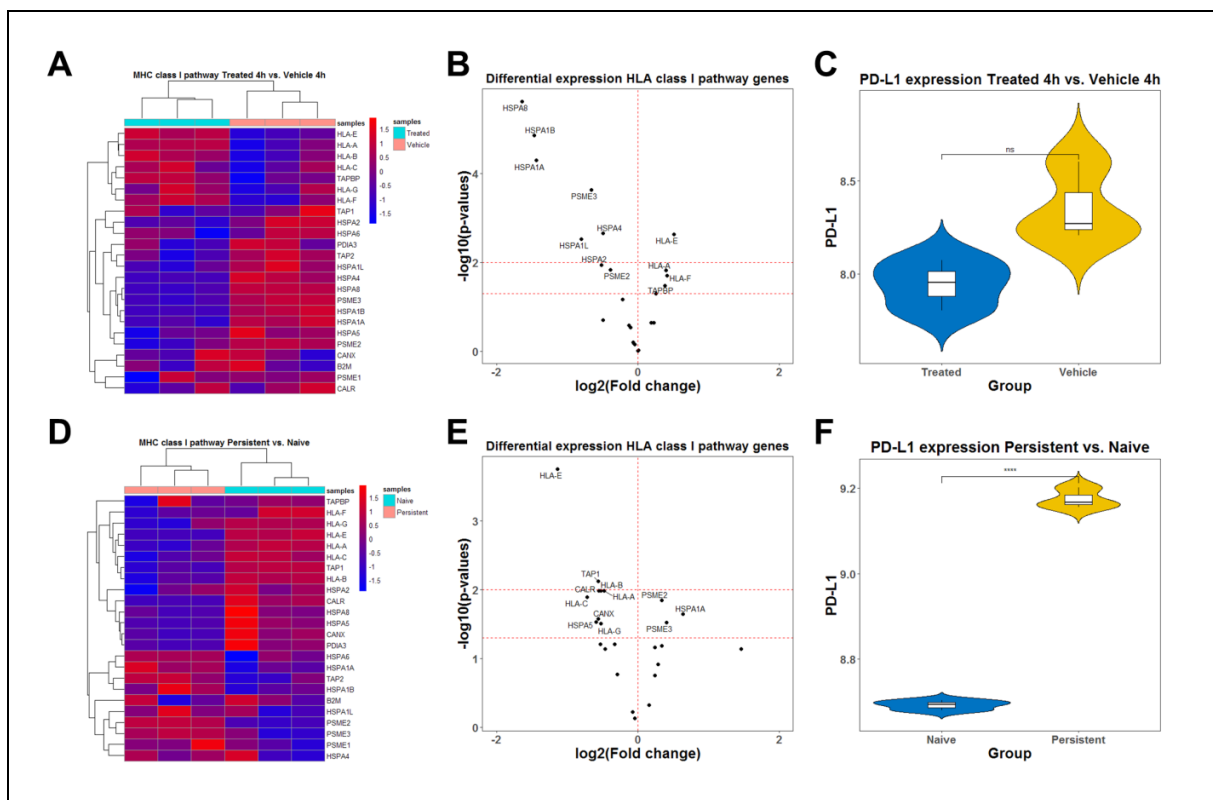


Фигура 15. GSEA анализ на пътя на антигенно представяне през ГКТС клас I в гранулоцити от пациенти с МПН и здрави контроли.

От друга страна CD34+ клетки от КМ от пациенти с ПВ и ЕТ имат понижена експресия на основни компоненти от антигенната обработка, транспорт, натоварване и представяне като *PSME1*, *PSME2*, *PSME3*, *TAP1*, *TAPBP*, *HLA-A* and *HLA-B* (Фиг. 14C,D). Профилът на генна експресия обаче остава статистически значимо необогатен на гени от този път (Фиг. 13B). При анализа на друг набор данни обаче ПК CD34+ от пациенти с ПВ не показват диференциална експресия на никакви гени от *HLA-I* пътя в сравнение с такива от нормален КМ (непоказани данни).



Аналогичният GSEA анализ на гранулоцити от ПК от JAK2 V617F+ МПН пациенти спрямо нормални контроли не показва значимо обогатяване с гени от пътя на антигенна обработка и представяне през *HLA-I* пътя (Фиг. 16.). При анализа на диференциалната генна експресия по *limma* се наблюдава повишена експресия само на два гена от HLA-I пътя (*TAP1* and *TAPBP*) (Фиг. 16.). Prestipino et al. (2018) показаха, че JAK2 V617F+ мегакариоцити, моноцити и тромбоцити могат да избегнат имунната редакция поради повишена експресия на *PD-L1*.



Фигура 17. Ефекти на лечението с руксолитиниб (INC424) върху профилите на генната експресия в SET-2 клетъчна линия. **(A)** Heatmap на експресията на гените от МНС клас I пътя в SET-2 клетки, третирани с руксолитиниб спрямо разтворител за 4 часа. **(B)** Плот тип вулкан на диференциално експресираните гени от МНС клас I пътя в SET-2 клетки, третирани с руксолитиниб спрямо разтворител за 4 часа. **(C)** Сравнение на нивата на експресия на *PD-L1* гена в SET-2 клетки, третирани с руксолитиниб спрямо разтворител за 4 часа. Р-стойностите са от двустранен t-тест. **(D)** Heatmap на експресията на гените от МНС клас I пътя при руксолитиниб-персистиращи спрямо наивни SET-2 клетки. **(E)** Плот тип вулкан на диференциално експресираните гени от МНС клас I пътя в руксолитиниб-персистиращи спрямо наивни SET-2 клетки. **(F)** Сравнение на нивата на експресия на *PD-L1* in руксолитиниб-персистиращи спрямо наивни SET-2 клетки. Р-стойностите са от двустранни t-тестове. Хоризонталните червени прекъснати линии в **(B)** и **(E)** съответсват на нива на значимост от 0.05 и 0.01. Означаване на Р-стойностите в **(C)** и **(F)**: ns – $p > 0.05$, * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$, *** – $p \leq 0.001$, **** – $p \leq 0.0001$.

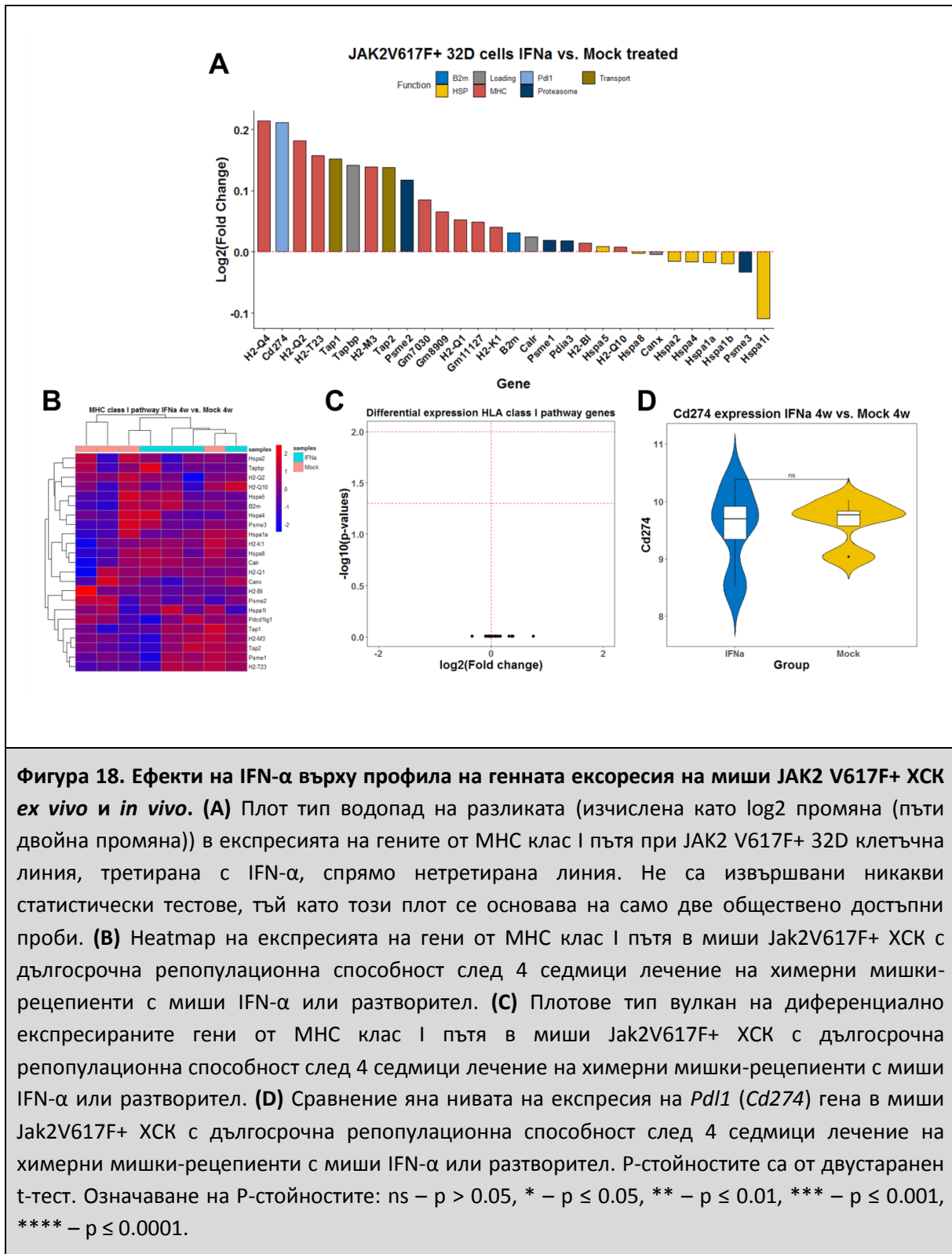
При нашите анализи не се открива значима JAK2 V617F-зависима вариация в експресията на *PD-L1* както при CD34+ клетки в ПК от ПМФ пациенти, така и в CD34+ клетки от КМ от пациенти с ПВ/ЕТ спрямо нормални контроли (Фиг. 14E, F). Тези резултати директно предполагат, че поне отчасти JAK2 V617F+ клонът може да избягва медирана от цитотоксични Т лимфоцити имунна редакция на ниво МПН-СК независимо от техния *HLA-I* генотип поради понижена експресия на компоненти от пътя на антигенна обработка и представяне през *HLA-I*.

Резистентността към руксолитиниб може да е свързана с понижена експресия на HLA-I молекули и повишена експресия на PD-L1

Допълнително бяха анализирани профилите на диференциално експресирани гени при наивни, краткосрочно третирани с руксолитиниб и дългосрочно третирани с руксолитиниб (персистиращи) клетки от човешката CD34+ SET-2 линия, която носи хетерозиготна JAK2 V617F мутация. Следва да се отбележи, че третирането с руксолитиниб е свързано с повишена експресия на някои гени от HLA-I пътя на антигенно преработване и представяне (*HLA-A, HLA-E, HLA-F* and *TAPBP*) (Фиг. 17A, B) и статистически незначимо повишение на експресията на *PD-L1* гена (Фиг. 17C). От друга страна, SET-2 клетките, персистиращи на дългосрочно третиране с руксолитиниб, показват понижена експресия на *HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, CALR, TAP1* и *HSPA5* гените (Фиг. 17D, E) и значимо повишена експресия на *PD-L1* в сравнение с нетретираната клетъчна линия (Фиг. 17F).

Ефекти на IFN- α върху MHC-I молекулите и Pdl1 гена в миши клетки

Допълнително анализирахме публично достъпен набор данни за ефектите на IFN- α върху генната експресия в JAK2 V617F+ миши стволови клетки. Czech et al. (2019) са депозирали данните от 2 проби от мишата линия 32D с артифициална JAK2 V617F експресия, третирани или с IFN- α или с разтворител. Краткосрочно третираните клетки показват повишена експресия на повечето гени от MHC-I пътя, както и на *Cd274 (Pdl1)* гена (Фиг. 18A). Mullaly et al. (2013) са предоставили за обществен достъп данни генната експресия на LT-HSC клетки след продължително третиране с IFN- α или разтворител *in vivo*. Следва да се отбележи, че не се наблюдава никаква значима промяна в експресията на гени от MHC-I пътя, както и на *Cd274 (Pdl1)* гена (Фиг. 18B-D).



V. Обсъждане

Все повече доказателства са в подкрепа на това, че някои тумори могат да бъдат отхвърлени чрез разгръщане на медиранни от Т-лимфоцити отговори срещу неоантигени. Това предполага, че *HLA* генотипът на даден индивид може да оформя раковия геном при някои злокачествени заболявания със специфични мутации. Такъв действащ механизъм на имунна редакция на ниво ранна онкогенеза също предполага наличието на *HLA* алели, които са протективни за развитието на тумори с определени мутации. Впечатляващ пример за протективни *MHC* алели е рестрикцията на вирус-индуцирани тумори при някои видове бозайници. Сходен пример при човека е добре документираната асоциация на *HLA-A*02* с понижен риск за Епщайн-Бар вирус (EBV)-позитивен класически лимфом на Ходжкин. По правило обаче хематологичните неоплазии се характеризират с относително по-нисък мутационен товар и поради това е по-малко вероятно да продуцират имуногенни неоепитопи. Спонтанни имунни отговори от CD8+ Т-лимфоцити са документирани при няколко проучвания за ОМЛ с *NPM1* мутация и при ХМЛ. Няколко проучвания предполагат съществуването на протективни *HLA-I* алели срещу ХМЛ, вероятно поради тяхната способност да представят неоантигени от BCR-ABL1 фузионния белтък. Интересно е, че *HLA-I* генотипът при ХМЛ може да е свързан с отговора към лечение с интерферон- α . Наскоро обаче беше показано, че получени от BCR-ABL1 фузионни пептиди не се откриват в *HLA-I* лигандома на пациенти с изявена ХМЛ, което може да се интерпретира като липса на представяне на получени от BCR-ABL1 пептиди или като доказателство за протичаща имунна редакция.

Интересен въпрос е дали JAK2 V617F-свързаната онкогенеза се подчинява на нашите разбирания за характерните черти на рака. В действителност МПН и CHIP се характеризират с различни нива на фенотипна хетерогенност, за която се приема, че се обуславя от няколко групи фактори включително вида на водещата мутация, наличието и реда на придобиване на

допълнителни водещи мутации, алелния товар (поне по отношение на JAK2 V617F мутацията), хетерогенността на засегнатия пул от ХСК, факторите на средата и вродената генетична предразположеност. Със сигурност установените вродени генетични фактори предразполагат към развитието на JAK2 V617F+ МПН е т. нар. JAK2 46/1 генотип. Неясен остава механизмът по който този генотип допринася за придобиването на JAK2 V617F мутация, но в много случаи това може да стане рано в индивидуалното развитие.

По-нататъшната еволюция на JAK2 V617F+ клетъчен клон до голяма степен следва принципите за диверсификация и селекция на придобитите характерни черти, осигуряващи конкурентно предимство до достигане на способност за дългосрочно самообновяване. Първоначалната генетична диверсификация вероятно е следствие от леко повишения репликативен стрес поради леко повишената пролиферативна сигнализация през JAK2 V617F мутиралата тирозинкиназа. Освен това JAK2 V617F забавяне на ДНК репликационната вилка и потискане на апоптозния отговор към повишения генотоксичен стрес поради негативна регулация на p53. По този начин може да се получи пул от генетично разнообразни миелоидни стволови и прогениторни клетки, които в зависимост от вътрешни или външни стимули могат да диференцират в различни линии и така да обусловят различните клинични фенотипни изяви при МПН. Редица проучвания подкрепят този модел поради демонстрираната клонална генетична диверсификация при еволюцията в миелофиброза. В процеса на клонална еволюция очевидно значение биха могли да имат вродени имуногенетични фактори, като генотипа по класически и некласически гени на тъканната съвместимост.

Затова с този труд си поставихме за цел да получим доказателства за имунна редакция при JAK2 V617F-свързаните МПН, чието наличие може да се очаква въз основа на наблюденията за наличие на имунен отговор срещу JAK2 V617F мутантни пептиди и мутантни пептиди от калретикулин при здрави индивиди. Изходихме от хипотезата, че ако имунната редакция на JAK2 V617F+МПН се случва по време на ранните етапи на онкогенезата, то би

трябвало да съществуват протективни *HLA-I* алели, които могат да представят получени от JAK2 V617F пептиди. За да адресираме този изследователски проблем, анализирахме *HLA-I* генотипа на 139 пациенти с МПН и 622 здрави индивида от кавказата раса от българската популация. Тъй като наскоро беше показано, че целият *HLA-I* генотип би могъл да допринесе за протекцията от различни видове рак с определни мутации, първоначално задълбочено изследвахме разнообразието на HLA генотипите на пациентите с МПН и на контролите. Не се откри различия в честота на хомозиготност по който и да е локус между пациентите и здравите контроли. Освен това беше оценена количествено и еволюционната дивергентност между алелите от всеки локус както и средната HED за трите локуса за всеки индивид. Оказа се, че не се открива никаква значима разлика в локус-специфичните и средната HED между пациенти и контроли. Тези показатели обаче може да не отразяват истинския принос на рестрикцията на туморния растеж от единична мутация. Затова изследвахме предсказаната способност на *HLA-I* генотипа на който и да е индивид от проучването да представя пептиди, получени от мутантния JAK2 V617F белтък, като следвахме точно процедурата, разработена от Marty et al. (2017). Нямаше никаква разлика в изчислените стойности на PHBR при пациенти и здрави контроли. Като цяло тези данни потвърждават, че глобалният *HLA-I* генотип и неговото разнообразие имат малка (ако изобщо такава съществува) протективна роля за развитието на JAK2 V617F-свързани МПН.

Допълнително бяха анализирани честотите на специфични *HLA-I* алели при МПН пациенти и контроли. Неравновесието по отношение на разпределението по възраст между двете групи и по пол бяха контролирани като фактори чрез включването им като ковариабилни при статистическото моделиране с адитивни генерализирани модели. Чрез използване на този подход се идентифицират 3 *HLA-I* алела (*HLA-A*02:01*, *HLA-B*35:01* и *HLA-C*15:02*), които са значимо по-редки при пациентите с МПН в сравнение с контролите. Тези резултати не противоречат на предишния мета-анализ на геномни асоциативни проучвания (GWAS), който не открива протективни SNPs за МПН в рамките на MHC региона, тъй като GWAS проучванията по правило са с ниска чувствителност да откриват асоциации със силно полиморфни локуси

като тези за HLA. Освен това нашите данни са несравними с данните от малки проучвания предимно със серологични техники за изследване на асоциациите между HLA и МПН.

HLA-B*35:01 молекулата е с предсказана свързваща способност за един 9-мерния пептид (LVLNYGVCF), получен от JAK2 V617F мутантния белтък. Идентифицирането на *HLA-A*02:01* като протективен алел за JAK2 V617F-свързани МПН може да не се счита за изненада. Наскоро Holmstrom et al. (2017) демонстрираха индукцията на специфични CD8+ Т лимфоцити от пептида VLNYGVCF peptide в HLA-A2-позитивен здрав индивид. Следва да се отбележи, че друга група, която използва РНК секвениране и *in silico* предсказване на свързващите се пептиди с най-честите HLA алелни варианти не идентифицира получени от JAK2 V617F неоепитопи при кохорта от МПН пациенти със смесен генетичен фон. Тяхната МПН кохорта обаче показва по-ниска честота на носители на HLA-B*35:01 алел, което е в съгласие с нашите данни от HLA генотипизирането. Друго непряко доказателство в подкрепа на протективната роля на *HLA-B*35:01* е липсата на този алел при всички JAK2 V617F+ клетъчни линии от панела на Cancer Cell Line Encyclopedia. След това беше използван подход със симулация на молекуланата динамика, за да се покаже, че HLA-B*35:01 може да свързва LVLNYGVCF, но не и VLNYGVCF, докато HLA-A*02:01 тежката верига изглежда е по-стабилна в комплекс с VLNYGVCF, отколкото с LVLNYGVCF. Предиктивните биоинформатични инструменти показват също, че LVLNYGVCF може да се получи също след протеазомно разцепване на нативния JAK2 V617F белтък и може ефективно да се транспортира от TAP системата, като така изпълнява необходимите предварителни условия за неоантиген. Взети заедно тези анализи предполагат, че *HLA-B*35:01* би могъл да е протективен алел за развитие на JAK2 V617F-свързани МПН чрез представяне на неоантигена LVLNYGVCF. Вероятно HLA-A*02:01 би могъл също да представя получен от JAK2 V617F пептид, но той е по-малко вероятно да се получи от протеазома и да се транспортира до ER. Освен това HLA-B*35:01 би могъл да упражнява протективната си роля поради други свои свойства. Така например Geng et al. (2018) показват, че HLA-B*35:01 може да се експресира на клетъчната повърхност като празен конформер и затова може да подсили

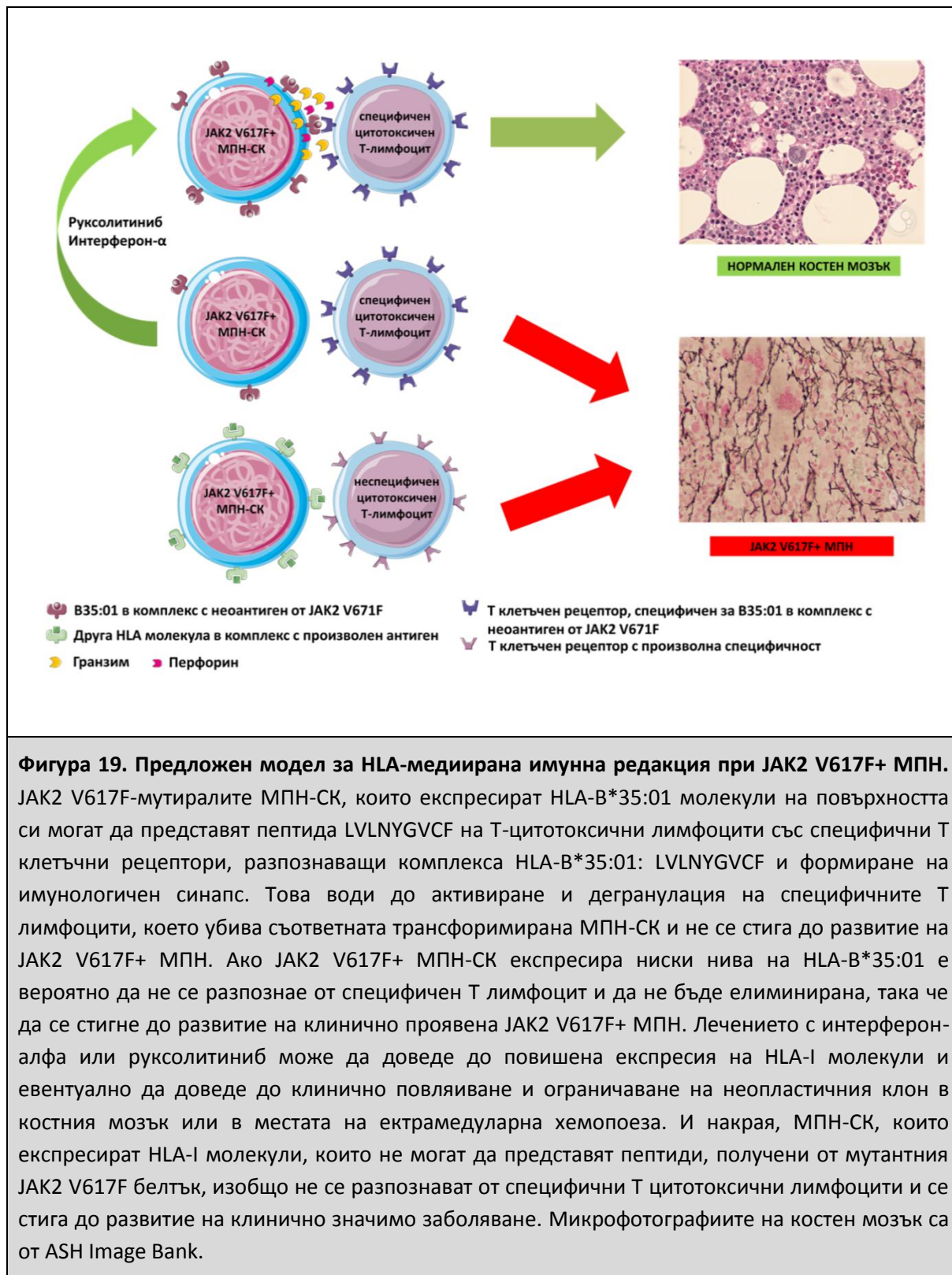
имунологичните синапси между АПК и CD8+ Т лимфоцити. Интересно е, че някои проучвания показват повишена експресия на отворени *HLA-I* конформери на повърхността на лимфоцити и моноцити от пациенти с ПВ. Друга собствена характеристика на *HLA-B*35:01* и *HLA-C*15:02* алелите е тяхната относителна независимост от тапазин-медираното пептидно натоварване, което ги прави по-малко податливи по отношение на антигенното представяне към ниски нива на тапазин. Последното свойство може да е от особено значение, защото много видове рак избягват имунологичния надзор чрез мутации на *MHC-I* молекулите или понижена експресия на различни компоненти от пътя на *MHC-I*-медирана антигенна обработка и представяне. Този ефект може да е дори по-изразен за някои HLA алели, включително *HLA-B*35:01*, които по принцип са с по-ниска експресия на клетъчната повърхност. В съответствие с това едно предишно проучване показва по-честа понижена експресия на HLA-A и HLA-Bw6 (като *HLA-B*35:01* и *HLA-B*41:01*), но не и на HLA-Bw4 (като *HLA-B*44:03*) алоспецифичности в левкемични клетки. Освен това е показано преди, че пациентите с МПН имат ниски нива на HLA-I и -II молекули върху периферни мононуклеарни клетки, но експресията им се повишава след лечение с интерферон-алфа2. Такова повишение на експресията на *HLA-I* и *-II* гени под влияние на интерферон е демонстрирано и при бласти при ОЛЛ и ОМЛ. Както беше дискутирано по-горе предишни проучвания показват, че JAK2 V617F мутацията възниква на нивото на ХСК компартмента. Затова предполагаемият активен имунологичен надзор при JAK2 V617F+ МПН би трябвало да се осъществява на това ниво. Това ни накара специално да оценим нивата на експресия на гените от *MHC-I* пътя в CD34+ клетки от пациенти с ПМФ, ПВ и ЕТ. Трябва да се отбележи, че CD34+ клетки от костен мозък от пациенти с ПВ и ЕТ показват значително понижена експресия на някои гени, включително *HLA-A*, *HLA-B* и *TAPBP*. Това предполага, че наистина в условията на ниска експресия, алелите с допълнителни свойства като *HLA-B*35:01*, биха били с по-голяма вероятност да имат протективна роля. Остава обаче неясно колко HLA молекули се експресират на повърхността на малигнените CD34+ клетки, тъй като последните проучвания показват големи вариации. Освен това е вероятно CD34+ клетки от периферна

кръв, костен мозък и слезка да имат вариабилни нива на експресия на гените от HLA-I пътя, както е показано по-рано и затова да се таргетират диференцирано от цитотоксични лимфоцити. Нови техники като ssRNA Seq анализ могат да покажат също че различни субпопулации JAK2 V617F+ прогениторни и зрели клетки могат да имат вариабилна експресия на различни гени от HLA-I пътя. Също така не е ясно колко на брой HLA молекули трябва да еспресират специфичен неоантиген, за да бъдат разпознати от Т лимфоцит със съответен Т клетъчен рецептор, но някои експериментални данни показват, че този брой може да е наистина минимален. Някои съобщения предполагат, че МПН могат да избягват имунологичния надзор чрез директно повишение на експресията на PD-L1. Prestipino et al. (2018) показаха такова JAK2 V617F-медирано повишение на експресията в мегакариоцити и моноцити, както и деплетиране на JAK2 V617F+ CD34+ клетки при един пациент с МПН, лекуван с ниволумаб след алогенна трансплантация. Ние не наблюдавахме значимо повишение на експресията на *PD-L1* в CD34+ клетки от пациенти с МПН, което обаче не изключва съществуването на такъв механизъм за избягване на имунологичния надзор при МПН.

Позитивните асоциации на наличието на JAK2 V617F мутации с определени HLA алели беше друг резултат от нашите анализи. Възможно обяснение за това наблюдение е фактът, че тези HLA молекули медиират имунна редакция при МПН чрез взаимодействие със съответните им NK клетъчни рецептори като инхибиращи или активиращи имуноглобулин-подобни рецептори (KIR) подобно на описаното при ХМЛ.

Известните наблюдения, че лечението с INF- α може да понижи JAK2 V617F алелния товар носят надежда за успешно разработване на имунотерапевтични подходи при МПН, включително за комбинирана терапия и специфична ваксинация. Така например едно фаза 2 проучване показва, че комбинираната терапия с JAK2 инхибитор (руксолитиниб) и IFN- α води до значима редукция на JAK2 V617F алелния товар вероятно поради неприпокриващите се ефекти върху МПН-СК. Това е в съответствие с нашите анализи, които показват, че

краткосрочното третиране на човешки и миши JAK2 V617F+ клетки било то с руксолитиниб или IFN- α води до повишена експресия на множество гени от MHC-I пътя. Клетките, персистиращи на лечение с руксолитиниб, обаче понижават експресията на HLA гени и повишават експресията на *PD-L1*, както при предишното проучване, споменато по-горе. Не е ясно дали този ефект допринася за резистентността към руксолитиниб *in vivo*, тъй като други сигнални пътища може да са по-важни. Същият принцип важи и за лечението с IFN- α , т.е. краткосрочното лечение може да доведе до повишена експресия на гените от MHC-I пътя и да направи МПН-СК податливи на имунна редакция, докато резистентните МПН-СК не повишават експресията на тези гени и избягват Т лимфоцитната цитотоксичност. Въз основа на нашите наблюдения можем да предложим модел за медирана от специфични HLA-I алели рестрикция на JAK2 V617F-свързаната онкогенеза при МПН (Фиг. 19). И накрая, нашите наблюдения имат приложение при разработването на ваксини при JAK2 V617F+ МПН, базирани на екзогенни белтъци. Ефективното кръстосано представяне на екзогенни пептиди може да е ограничено до подгрупа пациенти със специфични *HLA-I* алели, както беше показано наскоро при клинични проучвания, че мутантни калретикулин пептиди отключват предоминантно CD4+ Т клетъчни отговори. Рационално е да се предложи, че при такива пациенти приложението на IFN- α или дори руксолитиниб би могло първоначално да отключи мощен имунен отговор. Освен това наличието на *HLA-B*35:01* и *HLA-A*02:01* или други протективни алели може да се окаже предиктивен маркер за отговор към имуномодулираща терапия.



VI. Заключение – основни изводи

Като следвахме целта на настоящия труд и изпълнихме всички поставени изследователски задачи можем да заключим следното:

- Някои алелите от HLA клас I (като например HLA-B*35:01) могат да рестрицират развитието на миелопролиферативни неоплазми с драйвърна мутация JAK2 V617F;
- Стволовите клетки при миелопролиферативни неоплазии могат да избягват медираната от HLA системата имунна редакция чрез понижаване на експресията на гени от пътя на антигенна обработка и предсатвяне през HLA клас I;
- Някои лекарствени средства могат да повишават експресията на молекули от пътя на антигенна обработка и предсатвяне през HLA клас I в стволови клетки от МПН и по този начин да засилват първичния терапевтичен отговор.

Нашите резултати поставят и въпроси, които биха могли да са обект на последващи изследвания като например:

- Могат ли да се открият такива асоциации и при други популации?
- Съществуват ли такива протективни HLA алели при други подтипове МПН като такива с мутации на гените *CALR* и *MPL*?
- Каква е ролята на други имуногенетични фактори (напр. HLA-II, KIR гени, NKG2D лиганди и др.) при МПН?
- Имат ли имуногенетичните фактори прогностична или предиктивна стойност при МПН?
- Как биха разкритите механизми за избягване на имунологичния надзор да се използват за дизайн на имунотерапевтични подходи при МПН?

VII. Приноси

Оригинални научни приноси

1. Демонстрирано е, че хетеризоготността и еволюционната дивергентност на индивидуалния HLA генотип не са свързани с развитието на JAK2 V617F-положителни МПН.
2. Демонстрирано е, че теоретичната способност на индивидуалния HLA-I генотип за представяне на неоепитопи, получени от мутантния белтък JAK2 V617F не се различава между пациенти с МПН и здрави хора.
3. Идентифицирани са отделни HLA-I алели и HLA-I хаплотипи, които са по-редки (потенциално протективни) или по-често срещани (потенциално предразполагащи) при пациенти с JAK2 V617F+ МПН отколкото при здрави хора.
4. Представени са редица биоинформатични доказателства за възможното и вероятно представяне на неоепитопа LVLNYGVCF от HLA-B35:01 комплекси.
5. Показано е, че при някои случаи JAK2 V617F+ МПН-СК имат понижена експресия на основни гени от пътя за антигенна обработка и представяне през МНС-I.
6. Показано е, че при резистентни на лечение с руксолитиниб JAK2 V617F+ CD34+ клетъчни линии се наблюдава понижена експресия на основни гени от пътя за антигенна обработка и представяне през МНС-I пътя.
7. Предложен е модел на HLA-I-медирана имунна редакция на ранната онкогенза при JAK2 V617F+ МПН.

Научни приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е, че краткосрочното третиране на JAK2 V617F+ МПН-СК с интерферон-алфа води до повишена експресия на основни гени от пътя за антигенна обработка и представяне през МНС-I.
2. Потвърдено е, че при резистентни на лечение с руксолитиниб JAK2 V617F+ CD34+ клетъчни линии се наблюдава повишена експресия на *PD-L1* гена.

VIII. Декларация за оригиналност

Авторът на настоящия дисертационен труд декларира, че всички описани данни са оригинални и получени в резултат на изследователската му работа като доцент по генетика в Софийски университет по научните проекти:

„Имуногенетични фактори при имунологичния надзор на рака“, МФ на МУ, София, България (национален проект, финансиран от ФНИ), Договор КП-06-Н41/2 от 30.11.2020.

„Имуномодулиране на раковите заболявания от неklasическите HLA молекули – MIC“, МФ на МУ, София, България (национален проект, финансиран от ФНИ), Договор КП-06-Н23/4 от 17.11.2018 г.

“Мултидисциплинарен подход за разработване на нов високопроизводителен, течностен, микросферов, “чип” метод за детекция на мутации, свързани с миелопролиферативни заболявания”, МФ на МУ, София, България (национален проект, финансиран от ФНИ), Договор ДИД 02/5 от 2009 г.

Данните и интерпретацията им са публикувани в приложените научни статии. Всички използвани литературни източници са цитирани в приложената литературна справка.

Декларатор:

Доц. д-р Велизар Стеафнов Шиваров

IX. Публикации

Журнални статии

1. Ivanova M, Shivarov V. HLA genotyping meets response to immune checkpoint inhibitors prediction: A story just started. *Int J Immunogenet.* 2021 Apr;48(2):193-200.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/iji.12517>

2. Ivanova M, Tsvetkova G, Lukanov T, Stoimenov A, Hadjiev E, Shivarov V. Probable HLA-mediated immunoediting of JAK2 V617F-driven oncogenesis. *Exp Hematol.* 2020 Dec;92:75-88.e10.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301472X20305658>

3. Alkhazraji A, Elgamal M, Hui Ang S, Shivarov V, All cancer hallmarks lead to diversity, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2019 Jan; 1 (12):132-157.

<https://e-century.us/files/ijcem/12/1/ijcem0072581.pdf>

Глави от книги

1. Shivarov, V., 2022. Asking Existing Data the Right Questions: Data Mining as a Research Option in Low-and Middle-Income Countries. In *Improving Oncology Worldwide* (pp. 69-74). Springer, Cham.

<https://library.oapen.org/bitstream/handle/20.500.12657/57373/1/978-3-030-96053-7.pdf#page=76>

Участия в научни срещи

1. V. Shivarov, G. Tzvetkova, T. Lukanov, A. Stoimenov, E. Hadjiev, M. Ivanova. HLA CLASS I GENOTYPE SHAPES JAK2 V617F DRIVEN LEUKEMOGENESIS. 25th Congress of the European Hematology Association. Virtual Edition. 2020.

2. Milena Ivanova , Gergana Tzvetkova, Tzvetelin Lukanov, Antoaneta Nedyalkova, Angel Stoimenov, Elissaveta Naumova, Evgueniy Hadjiev, Velizar Shivarov. MHC CLASS I GENOTYPE SHAPES JAK2 V617F DRIVEN LEUKEMOGENESIS Joint 34th European Immunogenetics and Histocompatibility and 31st British Society for Histocompatibility and Immunogenetics Conference Glasgow, Scotland, United Kingdom, April 26-29, 2020

3. Иванова М, Цветкова Г., Луканов Ц., Алхадра Б., Стоименов А., Хаджиев Е., Шиваров В. ОТКРИВАНЕ НА НЛА КЛАС I АЛЕЛИ, ПРОТЕКТИВНИ ЗА РАЗВИТИЕТО НА JAK2 V617F ПОЛОЖИТЕЛНИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗМИ. Единадесети национален конгрес по хематология. 10-13 октомври 2019.