

Łódź, 12.12.2023

Prof. dr hab. n. med. Joanna Góra-Tybor

Klinika Hematologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kancelarz
Kolegium Nauk Medycznych
Prof. dr hab. Marek Ruchała

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Kanduły „Wybrane warianty genetyczne a manifestacja laboratoryjna zdefiniowanych molekularnie nowotworów mieloproliferacyjnych Filadelfia ujemnych”

Trzy najczęstsze nowotwory mieloproliferacyjne (MPN) BCR-ABL ujemne to czerwienica prawdziwa (PV), nadpłytkowość samoistna (ET) i mielofibroza pierwotna (PMF). Za czynnik bezpośrednio odpowiedzialny za rozwój MPN i klonalną proliferację krwiotwórczych komórek macierzystych uważa się występowanie określonych mutacji somatycznych tzw. mutacji „wiodących” (driver mutations). Prawidłowa hematopoeza zależy od aktywacji szlaku JAK/STAT5 przez hemopoetyczne cytokiny i ich receptory. Kinaza JAK2 należy do cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych i jest elementem szlaku sygnałowego zależnego od receptorów cytokinowych, prowadzącego do aktywacji czynników transkrypcyjnych STAT (signal transducers and activators of transcription). Fizjologicznie do hiperaktywacji tego szlaku prowadzą takie stany jak: krwawienie, hipoksja, zapalenie. W przypadku MPN za konstytutywną aktywację szlaku JAK/STAT5 odpowiadają mutacje w jednym z trzech genów: JAK2 (Janus kinase 2; 9p24), MPL (myeloproliferative leukemia virus oncogene; 1p34) W515L/K w receptorze dla trombopoetyny (TPO) i CALR (białko kalretikulina). U większości pacjentów z PV obecna jest mutacja somatyczna genu kinazy tyrozynowej JAK2, u 96% dotyczy ona eksonu 14 (mutacja V617F) i u 3% eksonu 12. W przypadku ET i PMF mutację JAK2 V617F stwierdza się u około 50–60% pacjentów, u 30% mutację genu kodującego białko CALR, 5–10% chorych charakteryzuje się mutacją genu MPL W515L/K, a kilka procent chorych to tzw. pacjenci potrójnie ujemni, u których nie stwierdza się żadnej z wymienionych mutacji. Mutacje CALR i MPL, podobnie jak mutacje JAK2 powodują konstytutywną aktywację szlaku JAK-STAT5. Poza wymienionymi mutacjami „wiodącymi” (driver mutations) istotną rolę, zwłaszcza w

J. Góra-Tybor

patogenezie PMF, odgrywają również mutacje genów zaangażowanych w mechanizmy epigenetyczne. Należą do nich mutacje genów biorących udział w procesach potranslacyjnej modyfikacji histonów (ASXL1, EZH2), metylacji DNA (TET2, DNMT3A, IDH1/2), splicingu mRNA (SRFS2, SRF3B1) oraz procesach naprawy DNA (TP53).

Zgodnie z aktualną wiedzą rozwój MPN jest wypadkową wpływu mutacji „inicjujących”, dodatkowych mutacji epigenetycznych i działania czynników związanych z przewlekłym procesem zapalnym. Zapalenie jest wynikiem zarówno działania cytokin zależnych od profilu mutacji charakterystycznego dla danego pacjenta jak i czynników zewnętrznych takich jak palenie tytoniu, dieta bogatotłuszczowa, współwystępowanie chorób autoimmunologicznych.

Nadal nie jest jasne, dlaczego przy obecności tej samej mutacji inicjującej (np. JAK2) obserwujemy różne fenotypy MPN (PV, ET, PMF). Co więcej poszczególne MPN mogą zmieniać swój fenotyp, i tak ET może transformować w PV lub PMF, a PV w PMF, co ma bardzo istotne implikacje kliniczne. Dodatkowo dla wszystkich wymienionych nowotworów, ale przede wszystkim PMF istnieje ryzyko transformacji do ostrej białaczki szpikowej (AML). Wydaje się, że na fenotyp MPN mają wpływ dodatkowe mutacje epigenetyczne, ładunek zmutowanego allele mutacji wiodącej, a także kolejność pojawiania się mutacji. Powstały już liczne indeksy prognostyczne mające na celu oszacowanie prawdopodobieństwa przeżycia pacjentów z MPN, ale wciąż wiele pytań pozostaje otwartych.

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy zatem bardzo aktualnego tematu.

Rozprawa doktorska powstała w oparciu o monotematyczny cykl pięciu artykułów:

1. Kanduła Zuzanna, Lewandowski Krzysztof: Calreticulin – a multifaced protein. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 2021; 75: 328–336.
2. Kanduła Zuzanna, Kroll-Balcerzak Renata, Lewandowski Krzysztof : *Rapid progression of myelofibrosis in polycythemia vera patient carrying c.284C>A p.(Pro95His) and unique ASXL1 splice site c.1720-2A>G variant.* Journal of Clinical Laboratory Analysis 2022;36:e24388.
3. Kanduła Zuzanna, Janowski Michał, Więckowska Barbara, Paczkowska Edyta, Lewandowski Krzysztof: *JAK2V617F variant allele frequency, non-driver mutations, single-nucleotide variants and polycythemia vera outcome* Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2022.

4. Lewandowski Krzysztof*, Kanduła Zuzanna*, Gniot Michał, Paczkowska Edyta, Nawrocka Paulina Maria, Wojtaszewska Marzena, Janowski Michał, Mariak Magdalena, Handschuh Luiza, Kozłowski Piotr (* – równorzędne pierwsze autorstwo): Essential thrombocythaemia progression to the fibrotic phase is associated with a decrease in JAK2 and PDL1 levels. *Annals of Hematology* (2022) 101:2665–2677.
DOI: 10.1007/s00277-022-05001-8
5. Kanduła Zuzanna, Janowski Michał, Więckowska Barbara, Paczkowska Edyta, Mroczkowska-Bękarciak Aleksandra, Sobas Marta, Lewandowski Krzysztof
High molecular risk variants, severe thrombocytopenia and large unstained cells count affect the outcome in primary myelofibrosis. *Journal of Applied Genetics*

Dla wymienionego cyklu publikacji łączna punktacja MNiSW wynosi 390, łączna wartość wskaźnika oddziaływania (IF): 12,557

W swojej pracy badawczej doktorantka starała się zidentyfikować wpływ profilu molekularnego na obraz kliniczny nowotworów mieloproliferacyjnych.

Postawione cele pracy to:

1. Określenie częstości i rodzaju występowania patogennych wariantów sekwencji genów JAK2 (w tym zawartości allele wariantowego (ang. variant allele frequency, VAF) JAK2V617F), CALR, MPL, SRSF2, ASXL1, U2AF1.
2. Określenie związku pomiędzy typem wariantu driver, obecnością wariantów non-driver a manifestacją laboratoryjną (zmiany w morfologii krwi) choroby.
3. Określenie częstości występowania i związku obecności wariantów pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide variant, SNV) rs2736100 TERT, rs9420907 OBCF1 oraz haplotypu 46/1 w zdefiniowanych molekularnie podtypach MPN Ph-.
4. Ocena zmian liczby kopii oraz ekspresji genów zlokalizowanych w obrębie chromosomu 9p24 (JAK2, PD-L1 i PD-L2) w zdefiniowanych molekularnie podtypach MPN Ph-.

W trakcie realizacji badań zmodyfikowano pierwotne cele pracy, w oparciu o uzyskiwane wyniki oraz pojawiające się nowe dane naukowe, i poszerzono spektrum prowadzonych analiz

(ocena SNV miR-146a rs2431697, ocena obecności wariantów IDH1/2). Realizacja celów pracy umożliwiła publikację wyników badań w czasopismach z Impact Factor.

Pierwsza z prac składających się na cykl publikacji ma charakter poglądowy. Szczegółowo przedstawia aktualny stan wiedzy na temat roli i funkcji białka CALR, którego mutacje zidentyfikowano w 2015 r jako kolejne mutacje typu „driver” w MPN.

W pracy „Rapid progression of myelofibrosis in polycythemia vera patient carrying SRSF2 c.284C>A p.(Pro95His) and unique ASXL1 splice site c.1720-2A>G variant” opisano profil molekularny pacjentki z rozpoznaniem PV i szybką transformacją do fazy zwłóknieniowej. U chorej poza mutacją wiodącą JAK2V617F zidentyfikowano mutacje dodatkowe SRSF2 c.284C>A p.(Pro95His) oraz ASXL1 c.1720-2A>G (intron 12, splice site). Ponadto w okresie progresji stwierdzono istotny wzrost VAF mutacji JAK2V617F (odpowiednio 59% i 93%), nieznaczny wzrost SRSF2 i stabilizację VAF mutacji ASXL1. Opublikowany przypadek potwierdza znaczenie obecności wariantu SRSF2 jako czynnika ryzyka w PV i zasadność uwzględnienia go w skali oceny ryzyka MIPSS-PV.

W kolejnej pracy “JAK2V617F variant allele frequency, non-driver mutations, single-nucleotide variants and polycythemia vera outcome” autorzy ocenili związek pomiędzy charakterystyką laboratoryjno-molekularną PV w chwili rozpoznania choroby, a ryzykiem wystąpienia powikłań zakrzepowych, transformacji zwłóknieniowej, transformacji blastycznej oraz zgonu u 151 chorych z potwierdzonym rozpoznaniem PV. Stwierdzono, że ryzyko powikłań zakrzepowych nie zależało od SNV JAK2 rs12343867, TERT rs2736100, OBFC1 rs9420907, JAK2V617F VAF ani obecności wariantów typu non-driver. Zaobserwowano natomiast nieopisaną dotąd, silną tendencję do istotności statystycznej pomiędzy genotypem CC miR-146a rs2431697 a zakrzepicą ($p=0,0510$). Jako czynniki zwiększające ryzyko transformacji zwłóknieniowej zidentyfikowano JAK2V617F VAF (mediana: 74% vs. 24%, $p=0,0002$), JAK2 rs12343867 genotyp CC ($p=0,0005$) oraz obecność współistniejącego wariantu typu non-driver ($p=0,0029$). Progresja do BP wystąpiła u trzech (2%) chorych, a jej ryzyko było dziesięciokrotnie wyższe u pacjentów ze współistniejącymi wariantami typu non-driver. Parametrami, które w momencie diagnozy wiązały się ze zwiększonym ryzykiem zgonu były JAK2V617F VAF oraz podwyższona liczba WBC.

Celem pracy "Essential thrombocythaemia progression to the fibrotic phase is associated with a decrease in JAK2 and PDL1 levels" była ocena związku ekspresji mRNA PD-L1 (białka liganda programowanej śmierci) z progresją do fazy zwłóknieniowej u 162 pacjentów z ET, w tym u 30 z potwierdzonym rozpoznaniem post-ET-MF. Stwierdzono, że całkowity poziom JAK2 i PD-L1 był niższy w grupie chorych post-ET-MF w porównaniu z pacjentami z ET i zależał od stopnia zwłóknienia szpiku. Autorzy sugerują, że obserwowany spadek może odzwierciedlać zmiany potencjału proliferacyjnego klonu JAK2V617F-dodatniego w trakcie trwania choroby i transformacji do fazy zwłóknieniowej.

Celem ostatniej cytowanej pracy „High molecular risk variants, severe thrombocytopenia and large unstained cells count affect the outcome in primary myelofibrosis” było zbadanie wpływu obecności określonych zmian laboratoryjnych (parametrów morfologii krwi, liczby blastów w PB/BM) i molekularnych – wariantów HMR (ASXL1 ekson 13, SRSF2 ekson 1, U2AF1 ekson 2 i 6, IDH1 ekson 4, IDH2 ekson 4) w momencie rozpoznania PMF na przebieg choroby, tj. progresję do fazy bardziej zaawansowanej i zgon. Wyniki analizy potwierdziły wcześniejsze obserwacje, wskazujące na negatywny wpływ obecności i liczby wariantów HMR na OS. Dodatkowo autorzy wykazali dotychczas nie opisany związek pomiędzy liczbą LUC (large unstained cells) we krwi obwodowej pacjentów z PMF przy rozpoznaniu, a ryzykiem transformacji do akceleracji/kryzy blastycznej i czasem przeżycia.

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań doktorantka sformułowała następujące wnioski:

1. Analiza wyników morfologii krwi u chorych na MPN Ph- umożliwia nie tylko ustalenie rozpoznania, ale także przewidzenie niekorzystnego przebiegu choroby.
2. U chorych z rozpoznaniem czerwienicy prawdziwej stwierdzenie w chwili rozpoznania obecności wariantów non-driver niekorzystnie modyfikuje ryzyko transformacji zwłóknieniowej i blastycznej.
3. U chorych z rozpoznaniem pierwotnego zwłóknienia szpiku stwierdzenie w chwili rozpoznania obecności wariantów non-driver niekorzystnie modyfikuje ryzyko transformacji blastycznej.

4. W trakcie transformacji zwłóknieniowej u chorych na nadpłytkowość samoistną JAK2V617F-dodatnią dochodzi do spadku ekspresji genów JAK2 i PDL-1, co może odzwierciedlać zmniejszenie potencjału proliferacyjnego klonu nowotworowego.

Po wnikliwej analizie rozprawy doktorskiej mam następujące uwagi:

Wybór tematu rozprawy doktorskiej jest bardzo aktualny, Doktorantka zrealizowała założone cele pracy. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują na kluczową rolę szczegółowej oceny profilu molekularnego pacjenta z MPN w prognozowaniu i co się z tym wiąże - wyborze najważniejszej terapii. W mojej opinii najbardziej wartościowe wyniki dotyczą pacjentów z czerwienicą prawdziwą i nadpłytkowością samoistną. Obserwacje mogące mieć istotne praktyczne znaczenie to znalezienie zależności pomiędzy genotypem CC miR-146a rs2431697 a zakrzepicą, a także zidentyfikowanie takich czynników zwiększających ryzyko transformacji zwłóknieniowej jak JAK2V617F VAF, genotyp CC, obecność współlistniejącego wariantu typu non-driver. Parametrami, które w momencie diagnozy wiązały się ze zwiększonym ryzykiem zgonu były JAK2V617F VAF oraz podwyższona liczba WBC. Bardzo ciekawą obserwacją, wymagającą potwierdzenia w większej grupie chorych, jest związek pomiędzy liczbą LUC we krwi obwodowej pacjentów z PMF przy rozpoznaniu, a ryzykiem transformacji do akceleracji/kryzy blastycznej i czasem przeżycia.

Podsumowując: uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 5 z późn. zm.).

Mam zaszczyt przedstawić Kolegium Nauk Medycznych UM w Poznaniu recenzję pracy i prosić o dopuszczenie mgr Zuzanny Kandyty do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje również o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. med. Joanna Góra-Tybor

