

Válasz Prof. Dr. Méhes Gábor bírálataira

Tisztelt Professzor Úr!

Szeretném megköszönni doktori értekezésem alapos áttekintését és pozitív véleményét. Az alábbiakban válaszolok az értekezéshez kapcsolódó kérdésekre.

1. kérdés: A follikuláris lymphoma várható túlélése a legújabb terápiás kombinációk, különösen az anti-CD20 terápia elérhetősége óta jelentősen javult. A transzformáció kapcsán kiszelektálódott klónok genetikai-epigenetikai eltérései a bemutatott módszerekkel vizsgálhatók, sokszor magyarázatot adnak a progresszióra. Ugyanakkor jelentkezhet terápia rezisztencia, ill. korai relapsus, ami teljesen más biológiai összefüggések eredménye. Az FL elsővonalas terápiája jelen irányelvek szerint viszonylag egységes. Mennyire ismertek egyes genetikai tényezők terápiás hatást moduláló sajátosságai? Lehet-e FL esetén bizonyos korai eltéréseket jelenleg prediktív jellegűnek tekinteni? Szóba jön-e rutinszerűen az FL betegek terápiás célú molekuláris profilozása?

Válasz: Az FL-ben azonosított genetikai eltérések közül számos jelátviteli út (epigenetikai szabályozás, B-sejt receptor jelátvitel, mTOR útvonal, TNFRSF14 útvonal) komponenseit érintő mutációk prediktív értékét vizsgálják napjainkban. Az eddigi vizsgálatok alapján mindenképp kiemelendők az EZH2 hiszton-metiltranszferáz aktiváló pontmutációi, amelyek prediktív biomarkerei a Tazemetostat-nak (az első szelektív EZH2 gátlószer). Ez a biomarker „irányított” terápia 2020 nyarán engedélyezésre is került az FDA által EZH2 mutációt hordozó, relabált/refrakter follicularis lymphomában szenvedő betegek többedvonalbeli kezelésében. Hazánkban ez a gyógyszer klinikai tanulmány formájában érhető el. Nagyon fontos kérdés a Bíráló által felvetett rutinszerű molekuláris profilozás szükségessége FL-ben. Jelen pillanatban az EZH2 mutáció meghatározásának kivételével egyéb genetikai eltérés meghatározásának nincs jelentősége a mindennapi gyakorlatban. Ugyanakkor kiemelendő, hogy nagyon intenzív kutatások zajlanak az elsővonalbeli terápiát követően korán (24 hónapon belül) relabáló betegek molekuláris profiljának azonosítására. Számos, ún. kliniko-genetikai modell áll tesztelés alatt, amelyek több lókuszt mutációs státuszának meghatározásával járulhatnak hozzá a korai relapszus és progresszió magas rizikójával jellemezhető betegcsoport azonosításához. Sikeres fejlesztések esetén az ilyen rizikó-becslő (és végsősoron akár a terápia intenzitását befolyásoló) molekuláris profilozás elterjedése várható a jövőben.

2. kérdés: Az FL és CLL genetikai tanulmányok egyaránt felhívják a figyelmet a közös őssejtből kialakuló, de jelentősen eltérő módon fejlődő szubklónok klinikai jelentőségére. Lehet-e a párhuzamosan fennálló, de már különböző biológiai hajtóerővel rendelkező szubklónokat akár a kezdetektől osztályozni, rizikó kategóriákba sorolni? Mindezt annak az ismeretében, hogy a fő klón várható eliminációja mellett a progresszív, minor másodlagos klónok nagyobb valószínűséggel maradhatnak fenn, relapsus esetén pedig elszaporodhatnak.

Válasz: Rendkívül fontos kérdés, amelynek teljeskörű megválaszolásához további vizsgálatok kivitelezésére és talán a technológiák további fejlődésére és akár egysejt-szintű vizsgálatok elvégzésére is szükség lehet. Mindazonáltal néhány lókuszt (TP53, NOTCH1, SF3B1, ATM, BIRC3) érintő mutációk esetében már ma is rendelkezésre állnak eredmények, különös tekintettel a krónikus lymphocytás leukémiára, amelyet nagyfokú szubklonális heterogenitás jellemez. Kiemelendők a TP53 gént érintő szubklonális mutációk, amelyek a progresszív betegség magas rizikóját jelentik és retrospektív tanulmányok alapján a klonális (a tumorsejtek döntő részében jelenlévő és nagy érzékenységgel eljárások alkalmazása nélkül is kimutatható) mutációkhoz hasonló kedvezőtlen kórlefutást vetítenek előre az alkalmazott terápia szelekciós nyomásának eredményeképpen. Ennek megfelelően a „rátermett”, hagyományos terápiákkal szemben rezisztenciát mutató szubklónok korai azonosítása a közeljövőben egyre fontosabb klinikai jelentőséggel bírhat majd. Érdemes megemlíteni a venetoclax kezelés során megjelenő BCL2 rezisztencia mutációkat, ahol jelenlegi tudásunk alapján a szubklonális mutációk (jelentős klonális expansió nélkül) is képesek klinikai relapszust okozni, aminek mechanizmusa ma még nem tisztázott. A minden bizonnyal jelenlévő kooperáló mechanizmusok azonosításának céljából kutatócsoportunk egysejt-szintű genomikai és transzkriptomikai vizsgálatokat végez.

3. kérdés: A CALR mutáns fehérje immunhisztokémiai kimutatása egyszerű és elegáns módja a mutáns CMPN esetek kiszűrésének. Ugyanakkor óvatosságra int a szerző által is észlelt expressziós heterogenitás jelensége, azaz, hogy a megakaryocyták nem teljes tömege mutatja a mutáns fehérjét. Ez a heterogenitás jelezheti-e azt, hogy a mutáns őssejt klón mellett vad típusú neoplastikus klónok is proliferálnak, ill., hogy a vad típusú – sem IHC pozitivitást, sem mutáns allélt nem mutató - compartment nem része a folyamatnak? Ez a kérdés különösen kezelés, vagy esetleges HSC transzplantáció eredményességének megítélése kapcsán lehet klinikailag is érdekes.

Válasz: Érdekes jelenség, hogy a klasszikus patológia vizsgálómódszerét alkalmazva a csontvelői minták vizsgálatával a perifériás vérből rutinszerűen elvégzett DNS alapú CALR vizsgálatokhoz képest a folyamat komplexitására sikerült rátapintani a megakaryocyták szintjén. Kiemelendő, hogy még az esetek túlnyomó többségében klonális driver mutációkkal jellemezhető MPN-ek esetében is számolni lehet a klonális heterogenitással, amelynek sejtszintű feltérképezésére a csontvelőben ezidáig kevés próbálkozás történt. A Bírálóval egyetértésben mindkét forgatókönyv elképzelhető a mutációt hordozó és vad típusú neoplastikus klónok proliferációja, illetve a malignus folyamatból való kimaradásának tekintetében. Ugyanakkor kiemelendő, hogy az elvégzett IHC vizsgálatok

alapján csak a CALR gén mutációs státuszára tudunk következtetni. Elképzelhető, hogy a mutáns CALR expressziót nem mutató sejtekben egyéb driver vagy szubklonális mutációk is jelen lehetnek (tanulmányunkban egy CALR/JAK2 dupla mutáns páciens esete ezt szemléleti).

4. kérdés: A myeloproliferatív kórképekre hajlamosító genetikai eltérések családon belül megegyeznek, a folyamat egyéni progressziója kapcsán azonban a leukémiához vezető másodlagos mutációk a felderített esetek alapján is eltérnek. Saját, vagy irodalmi adatok alapján léteznek-e a csíravonalbeli genetikai eltérésekhez rendelhető mutációs szekvenciák, mechanizmusok?

Válasz: Saját adataink alapján a dolgozatban bemutatott szekvenciát emelném ki a JAK-STAT jelátvitel komponenseinek kópiaszámeltéréseit, valamint pontmutációt a csíravonalbeli RUNX1 mutáció talaján kialakuló FPD-AML esetében, valamint a mások által is megerősített 7-es monoszómia, ASXL1 mutáció kooperáló konstellációt a csíravonalbeli GATA2 mutáció talaján kialakuló AML/MDS esetében. Irodalmi adatok alapján ismert továbbá például a csíravonalbeli CEBPA mutáció esetében ún. második találatként („second hit”) kialakuló C-terminális CEBPA mutáció.

5. kérdés: Várható-e molekuláris értelemben klonális diverzifikáció (pl. diszplázia – blasztos transzformáció) csírasejtes, hereditár myeloid eltérések kapcsán? Érdemes-e a csíravonal mutációk felismerése után a betegek molekuláris monitorozását gyakrabban elvégezni az esetleges diszplasztikus/agresszív szubklónok korai kimutatása céljából?

Válasz: Mára a myeloid malignitások kialakulására hajlamosító variánsokat hordozó gének száma közel húszra nőtt, amit tükröz az a tény is, hogy a „myeloid malignitások predisponáló genetikai eltéréssel” kategória egy önálló entitáscsoporttá vált a myeloid daganatok legújabb WHO osztályozásában. A különböző predispozíciós szindrómák háttérében álló gének (pl. CEBPA, GATA2, RUNX1, DDX41) variánsai eltérő klinikummal és megelőző hematológiai-immunológiai tünetekkel társulnak és eltérő penetranciával vezetnek manifeszt malignus megbetegedés kialakulásához. A csíravonalbeli mutációk felismerését követően a betegek (hordozók) gyakoribb molekuláris monitorozása helyett a mindennapi gyakorlatban a szorosabb klinikai kontroll javasolt, és klinikai progresszió esetén lehet célszerű akár a terápiát is befolyásoló szomatikus eltérés azonosítása részletesebb molekuláris vizsgálat elvégzésével. Kiemelendő, hogy a csíravonalbeli eltérések azonosítása a myeloid betegségek családi halmozódása esetén nem csak az érintett egyén számára bír jelentőséggel, hanem a potenciális hordozó hozzátartozók azonosítása, és az őssejttranszplantációhoz való donorkeresés szempontjából is jelentős.

6. A nagyszámú és részben rendkívül ritka mutáció felveti a bioinformatikai analízis egységes metodikájának kérdését. A laboratóriumi tesztek kapcsán megkövetelt akkreditáció, minőségi követelmények milyen mértékben alkalmazhatók az in silico diagnosztikai tevékenységre? Hogyan kell elképzelni a jövőben a nagyfelbontású szekvenálási eredmények megbízható és reprodukálható analízisét?

Válasz: Egy rendkívül fontos és jelenleg nem kellőképpen szabályozott kérdést érint a Bíráló. A laboratóriumi tesztek preanalitikai és analitikai fázisaihoz hasonlóan a minőségbiztosítás az in silico analízisekre is kell terjedjen ahhoz, hogy ezeket az eljárásokat rutinszerűen alkalmazhassuk a mindennapi betegellátásban. Az újgenerációs szekvenálási adatok bioinformatikai elemzése ma még egy forrongó terület, ahol számos algoritmus és platform áll rendelkezésre és ezek standardizációja még várat magára. Ugyanakkor ki kell emelni, hogy a megbízható és reprodukálható nagyfelbontású szekvenálási analízisek megvalósításának céljából a közeljövőben a diagnosztikában alkalmazott génpanelek esetében is fontos lesz az alkalmazott illesztési és variáns azonosító algoritmusok és azok paramétereinek pontos ismertetése a molekuláris patológiai leletekben. Mivel számos összehasonlító vizsgálat zajlik napjainkban és a megbízható eljárások köre egyre inkább meghatározható, reális időn belül el lehet jutni rutin diagnosztikában javasolt/alkalmazandó analízisek köréig. Hazánkban kívánatos lenne egy egységes eljárásrend kidolgozása és elfogadása ennek kapcsán.

Végül ismételten köszönöm Méhes Gábor Professzor Úrnak értekezésem bírálatát és rendkívül aktuális kérdéseit. Tisztelettel kérem válaszaim elfogadására.

Tisztelettel:



Dr. Bödör Csaba

Budapest, 2021. május 25.