

Tisztelt Professzor Asszony!

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

1. kérdés: Mi az elsődleges oka az FL pathogenezisében meghatározó transzlokációnak, amely a V(D)J rekombináció hibás működése során jön létre (Bevezetés 15. oldal)? Mi a hibás működés lényege? DNS-ben kódolt vagy epigenetikai okra vezethető vissza?

Válasz: Az FL patogenezisében kulcsszerepet játszó t(14;18) transzlokáció következtében kialakuló IGH-BCL2 fúzió patogén szerepének tisztázására számos próbálkozás történt. Jelenlegi megértésünk szerint az Immunglobulin gének szomatikus rekombinációja egy genetikai instabilitással járó folyamat melynek során különböző rekombinázonok aktív közreműködésével zajlik a V-D-J génszakaszok átrendeződése/rekombinációja. A hibás működés lényege az átrendeződés céltévesztése, amely során a törések egyéb, nem Ig gének (jelen esetben a BCL2 gén) esetében is kialakulnak, és végsősoron aberráns génátrendeződés alakul ki. Ennek következménye a jelentős enhancer/promoter aktivitással bíró IGH lókuszt szabályozása alá került antiapoptotikus BCL2 fehérje overexpressziója, ami FL-szerű sejtek megjelenéséhez vezet és „megágyaz” a további genetikai eltérések, majd a manifeszt FL megbetegedés megjelenésének. A rekombinációs gépezet céltévesztéséért felelőssé tehető genetikai eltérések FL-ben egyelőre nem ismertek. A jelenség hátterében feltehetően a fokozott sejtosztódás és rekombinációs aktivitás okozta genetikai instabilitás állhat.

2. kérdés: Mi lehet a magyarázat arra, hogy az EZH2 génben kizárólag az úgynevezett SET doménben (Eredmények 74. oldal) figyelhetők meg mutációk és a doménen belül is az 5' régióban?

Válasz: FL-ben valóban kizárólag az EZH2 fehérje SET doménjében figyelhetők meg szomatikus mutációk. Ennek hátterében feltehetően az áll, hogy a katalitikus aktivitással bíró SET doménben megjelenő mutációk funkcionyeréssel jellemezhetőek és minden bizonnyal túlélési előnnyel bírnak bármilyen egyéb spontán módon megjelenő variánssal szemben a klonális evolúció/szelekció során. Érdekes jelenség, hogy a myeloid kórképekben nem jellemzőek az EZH2 SET domén mutációk, de a gén egyéb részeiben elszórtan funkcióvesztéssel jellemezhető mutációk jelennek meg az esetek egy részében.

3. kérdés: A Jelölt meglátása szerint – eddigi kutatómunkájára és irodalmi ismereteire hagyatkozva – milyen rezisztencia mechanizmusok fognak kialakulni EZH2 specifikus gátló szerek alkalmazása során, milyen útvonalaknak az aktiválását látja a legvalószínűbbnek a rezisztencia kialakulása folyamán?

Válasz: Valamennyi célzott terápia kapcsán releváns kérdés a kezelésre idővel kialakuló rezisztencia és annak hátterében álló aktiválódott menekülőútvonalak jellemzése. A szelektív EZH2 gátlószerek kapcsán EZH2 mutáns diffúz nagy B-sejtes lymphoma sejtekkel kapcsolatban állnak rendelkezésre leginkább adatok. Ebben a kontextusban az inzulin-szerű növekedési faktor 1 receptor (IGF-1R), MEK, és phosphoinositide-3-kináz (PI3K) útvonalak aktiválódásán kívül, hosszabb gyógyszerexpozíció hatására kialakuló EZH2 rezisztencia mutációk (Y111L, Y661D, C663Y és Y726F) kialakulását figyelték meg. Az EZH2 gátlás elterjedésével a mindennapi klinikai gyakorlatban minden bizonnyal a szekunder EZH2 rezisztencia mutációk kimutatása bírhat majd gyakorlati jelentőséggel. Ugyanakkor kiemelő, hogy jelen tudásunk szerint ilyen rezisztencia mutációk megjelenéséről EZH2 gátlószerekkel beteg esetében még nem számoltak be.

4. kérdés: Ezt a viszonylag magas gyakoriságot összefüggésbe tudták-e már hozni valamilyen fertőző betegséggel/betegségekkel a korai életévekben?

Válasz: A dolgozat releváns részében egy tanulmányra hivatkoztunk, amely 608 egészséges (40 év feletti) donor 12%-ában mutatott ki monoklonális B-sejtes lymphocytosist nagy érzékenységgű áramlási citometriai vizsgálat alkalmazásával. Az MBL rizikófaktorai között bizonyos infekciókról beszámolták már (többek között hepatitis C, pneumonia, influenza, cellulitis, felső légúti infekciók és herpes zoster fertőzés; *Strati és Shanafelt összefoglalója alapján, Blood 2015*), ám ezek az összefüggések nem bizonyultak túl meggyőzőnek. Az infekciókon túl az életkor, a CLL családi halmozódása és bizonyos genetikai polimorfozmusokról számolnak be az MBL rizikófaktoraként.

5. kérdés: A Jelölt meglátása szerint ezeknek a mutációknak a detektálása a tényleges relapsus bekövetkezte nélkül is elegendő indikációt jelent, vagy majd jelenthet a jövőben terápia váltásra?

Válasz: Jelen pillanatban a BTK/PLCG2 mutációk korai kimutatása nem jelent azonnali indikációt a terápia váltásra. Az aktuális kezelési irányelvek alapján az ibrutinib terápia a klinikai progresszióig folytatandó. Ugyanakkor a mutációk megjelenése egyértelmű figyelmeztető jel és szorosabb monitorozást indokol. Adataink és nemzetközi adatok alapján is a BTK rezisztencia mutációt hordozó betegek többsége idővel klinikailag is progrediál. A kezelési lehetőségek további bővülésével és új kombinációs kezelések megjelenésével elképzelhetőnek tartom, hogy egy bizonyos klonális méret elérését követően akár terápia váltás indikációját is jelentse egy rezisztencia mutáció kimutatása.

Ehhez a rezisztencia mutációk dinamikáját és a klinikai válasz összefüggését vizsgáló további tanulmányok szükségeltetnek.

6. kérdés: A Jelölt látja-e annak a lehetőségét, hogy a betegek ilyen részletességű követése a klinikai gyakorlat minden napos részévé váljon?

Válasz: Az ibrutinib rezisztenciához kapcsolódó munkánk egyik komponense egy olyan molekuláris monitorozási algoritmus kidolgozása, amely a mindennapi diagnosztikus gyakorlat részévé válhat. Az újgenerációs szekvenálás alapú rendszeres monitorozás ilyen célú alkalmazása egyelőre nem életszerű, azonban célzott vizsgálatokkal erre lehetőség nyílhat. A nagy érzékenységű digitális droplet alkalmazásával kidolgoztunk egy eljárást, amellyel a leggyakoribb BTK rezisztencia mutáció (BTK C481S) nyomkövetésére nyílik lehetőség a mindennapi gyakorlatban. Legfrissebb nyomkövetési eredményeink alapján (Bödör, Kotmayer és mtsai, British Journal of Haematology, 2021) az ibrutinib rezisztens betegek háromnegyedét sikerült azonosítani e mutációs forrópont vizsgálatával. Az eljárást rutinszerűen alkalmazzuk laboratóriumunkban.

7. kérdés: A monoklonális antitest melyik CAL mutációra specifikusan került előállításra? Vajon lehet-e magyarázata a 97. oldalon bemutatott festődés intenzitásbeli eltéréseknek az, hogy a CAL fehérje egy bizonyos epitopját érintő mutáns ellen előállított ellenanyag az eltérő mutációkat hordozó fehérjét eltérő intenzitással jelöli és festi meg?

Válasz: A CALR mutációk sajátossága, hogy szinte kivétel nélkül a gén 9-es exonját érintik, és kialakuló inszerciók és deléciók egy C-terminális neoepitóp megjelenésével járnak, amelyek egy konszenzus szekvenciával jellemezhetőek. A CAL2 antitest ezen konszenzus peptidszekvencia (SPARPTSCREACLQGWTEA) ellen készült egy hybridoma rendszerben, így nagyfokú eltérést nem várunk a jelölődés intenzitásában a különböző típusú, ám ugyanazon neopeptidet tartalmazó CALR mutáns esetek között. Természetesen ez a jelenség nem zárható ki.

8. kérdés: Van-e a Jelöltnek tudomása arról, hogy hasonló megközelítéssel már hematoonkológiai kórkép(ek)ben is fejlesztettek ki, vagy fejlesztés alatt van olyan kezelés, amely a szintetikus letalitás elvét követi, és figyelembe veszi a páciens releváns ivarsejtvonalbeli genetikai eltérését?

Válasz: A Jelöltnek nincs tudomása a szintetikus letalitás elvén nyugvó, a páciens csíravonalbeli genetikai eltérését is figyelembe vevő engedélyezett vagy előrehaladott stádiumban lévő kezelési lehetőségről az onkohematológiai kórképek csoportjában. A szintetikus letalitás elvét alkalmazó preklinikai vizsgálatok zajlanak az onkohematológiában. A germline ATM mutációt hordozó CLL esetében felmerülhet a szintetikus letalitás elvén működő PARP vagy ATR gátlás.

9. kérdés: Ismer-e a Jelölt a nemzetközi irodalomban olyan közlést, ahol örökletes hematoonkológiai kórkép esetén preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD) segítségével tudták megelőzni a kóroki ivarsejtvonalbeli mutáció továbbörökítését?

Válasz: A jelölt nem ismer ilyen közlést. A nem malignus hematológia terén hemophilia és thalassemia esetében sikerült ilyen típusú közlést azonosítani. A myeloid kórképek kialakulására hajlamosító variánsok esetében a széles tartományban mozgó penetrancia miatt a PGD lehetősége feltehetően nem élvezne prioritást ebben az esetben az egyéb súlyos, genetikailag meghatározott kórképekkel szemben.

10. kérdés: Van-e példa a szakirodalomban arra, hogy örökletes hematoonkológiai kórképben akár hosszú nem kódoló RNS génben, vagy miRNS génben azonosítottak kóroki mutációt teljes genom analízissel?

Válasz: Az örökletes onkohematológiai kórképek egy részében valóban nem ismert még a kóroki tényező és az elvégzett teljes exom szekvenálási tanulmányok is csak limitált esetben vezettek újabb biomarkerek azonosításához. Ennek megfelelően a miRNS és lncRNS és egyéb nem kódoló régiók vizsgálata intenzív kutatások tárgyát képezi. Ugyanakkor az irodalom áttekintését követően nem találtam ilyen irányú közlést.

Végül ismételten köszönöm Széll Márta Professzor Asszonynak értekezésem bírálatát és rendkívül aktuális kérdéseit, támogató gondolatait. Egyben tisztelettel kérem válaszaim elfogadására.

Tisztelettel:



Dr. Bödör Csaba

Budapest, 2021. május 25.