

Válasz Prof. Dr. Timár József, az MTA Doktora, opponensi véleményére

Nagyon köszönöm Professzor Úr értékes bírálati véleményét. A bevezetésre, a disszertáció tagolására – szerkesztésére és a referenciákra vonatkozó észrevételeire a következőket válaszolom.

A. A klonális homogenitás vs heterogenitás és klonális fejlődés kérdéseit azért foglaltam össze viszonylag röviden a bevezető 1. Témakör fejezetben, mert legalább 5 nagy és független haematooncológiai területet vizsgáltunk. Úgy véltem, hogy a klonális evolúció kérdéskörét ezen elkülönülő területek tematikus fejezeteiben és saját kontextusukban szerencsésebb bemutatni és – saját eredményeink tükrében diszkutálni.

B. A disszertáció szerkesztési elvei és gyakorlata már egy másik opponensi véleményben is napirendre került. Az volt a szándék és az alapelv, hogy konzekutív numerikus jelöléssel adjuk meg a fő-, és alcsoportokat. Az előbbieket a következők voltak: 1. Témakör megjelölés, 2. Módszertan, 3. Tematikus fejezet - Saját kutatások (Bevezetés - Eredmények – Diskusszió bontásban), 4. Főbb következtetések - Új eredmények, 5. Irodalomjegyzék. Ennek alapján pl. a tartalomjegyzékben bemutatott és alkalmazott módon:

- A 3.3.1. tematikus alfejezet módszertanát a 2.3.1. fejezet, főbb következtéseit – új eredményeket a 4.3.1., míg irodalomjegyzékét az 5.3.1. alfejezet tartalmazza. Ez a számozási besorolás minden oldal jobb felső sarkában feltüntetésre került.

- A Módszertan fejezet azért 4 tagú és nem 5 tagú, mint az Eredmények / Diskusszió illetve az Irodalomjegyzék, mert a 3.5. fejezet – 6 saját eredeti közleményünk tapasztalatait is figyelembe véve - áttekintés / review az iFISH automatizációjának kérdéseiről, eredményeiről és perspektíváiról. Ebben a tárgyalási módban tehát nincs módszertana. Ezért nincs 2.5. fejezet, de van 3.5., 4.5. és 5.3.5. fejezet.

- A dolgozat 5 tematikus fejezetből (ebből a 3.3. fejezet 3 alfejezetből), tehát lényegében 7 teljesen, vagy nagyrészt elkülönülő problémakör vizsgálatából áll. Ezeket közösen 'bevezetni', a független eredményeket egymás mellé rakni és közösen diszkutálni, nem tartottam megvalósítható és ésszerű lehetőségnek. Az nyilvánvaló ugyanakkor, hogy a sokféle vizsgálati terület nehezíti az áttekinthetőséget.

C. A hivatkozások évjárat szerinti eloszlásának kérdése már ugyancsak előkerült egy másik opponensi véleményben. Ezzel kapcsolatban tehát csak ismételni tudom a következőket. A disszertáció 2015-ben került benyújtásra, tehát legfiatalabbként legfőljebb csak 2014-es közlések voltak figyelembe vehetőek a hivatkozási listában. A tematikus vizsgálati fejezetek 5.3.1., 5.3.2., 5.3.3., 5.3.4. és 5.3.5. alatti hivatkozási listáiban az utolsó 5 évben (2010 - 2014) publikált hivatkozások száma $11 + 5 + 9 + 5 + 18 = 48$ -nak, tehát átlagosan ~ 10-nek adódik. Úgy véltem /vélem, hogy egy – egy szűk, nagyon speciális területen kb. 10 meghatározó közlés / 5 év jellemzi a nemzetközi ismeretanyagot ill. adott esetben nem volt több, releváns közlés. A Módszertan referenciák szempontjából külön kategória.

Professzor Úr egyes tematikus vizsgálati területekkel kapcsolatban feltett kérdéseire a következőket válaszolom.

1. A t(12;21) (ETV6-RUNX1) transzlokáció pozitív gyermek leukémia esetek követésénél kombinált in situ fenó- és genotipizálással azonosított, gén fúziót mutató sejteket azért

neveztem leukaemia prekursor sejteknek, mert a transzlokáció monoallelikus volt. Emellett sem a normál allél vesztese (LOH), sem a kiméra gén amplifikációja nem volt azonosítható (szemben a kezeletlen leukaemia sejtekkel).

- A leggyakoribb gyermek leukaemia genetikai csoportok esetén a köldök- illetve neonatális vér (Guthrie kártya) vizsgálatok azt mutatták, hogy a leukaemia specifikus klonotipikus aberráció monoallelikusan, 50 – 100 % arányban már ezen mintákban is kimutatható.
- Leukaemiás gyermek egészséges egypetéjű ikertestvére keringésében is kimutatható a klonotipikus, de monoallelikus aberráció. Genetikai típustól függően 10 - 100 % közötti leukaemia karkondancia is dokumentált egypetéjű ikerpárokban. Eközben familiaritás nem mutatható ki. A jelenség elfogadott magyarázata az egypetéjű ikrek monochorionális, kiméra keringésén alapszik, azaz, az ikerpár egyik tagjában kialakuló monoallelikus aberrációt hordozó prekursor sejtpopuláció kvázi „metasztatizál” (valójában inkább átterjed) a pár másik tagjába.
- Ugyanolyan aberrációt hordozó felnőtt akut leukaemiákban a monozigóta ikerpár konkordáns leukaemiája nem ismert vagy elhanyagolható jelenség.
- Ezen tények eredője az az álláspont, hogy a gyermek leukaemiák (ETV6-RUNX1 – t/12;21/; MLL-11q23, ETO-AML1 – t/8;21/; HHD-ALL) kialakulásához vezető LOH első lépését képező monoallelikus aberráció nem transzgenikus, hanem *in utero* szerzett genetikai károsodás.
- A monoallelikus aberrációt hordozó prekursor sejtek reprodukciós képességgel rendelkeznek (xenograftolható), apoptózis rezisztencia fokozódást mutatnak, de kiméra transzkriptumot nem expresszálnak (Ref. 71, 72, 75, 76, 111; 5.3.2.fejezet).

2. A Ph⁺ acut lymphoblastos leukaemia (ALL) képében jelentkező betegség vizsgálatánál az volt a kérdés, hogy 2 formáját, a *de novo* (primér) Ph⁺ ALL-t illetve a fel nem ismert (Ph⁺) CML lymphoblastos crisis-t (CML-LBC) el tudjuk-e különíteni gyorsan és hatásosan a kezeletlen betegség fázisában. Amennyiben igen, a két csoport bcr-abl expressziót illetve elkötelezett lymphoid őssejt (CLSC) vs el nem kötelezett őssejt (UCSC) eredetet illetően homogén vagy heterogén?

- A morfológia és a transzlokáció iFISH jelölődésének konzekutív és korrelált vizsgálatával, a Ph⁺ blast / PH⁺ egyéb sejt arányának meghatározásával a vizsgált kohorsz 18 %-ban igazoltuk, hogy CML-LBC-ről van szó, melyet a klinikai kép, remissiót követően a krónikus fázis kialakulása bizonyított. Ez egyben azt is jelenti, hogy ezekben az esetekben a betegség UCSC eredetű.
- Az összes többi esetben a betegség CLSC eredetű volt, ezt a CML krónikus fázis kialakulásának hiánya is alátámasztotta. Ez a csoport tehát *de novo* Ph⁺ ALL-nek felelt meg. Ezek alapján következtetéseink:
 - a. A *de novo* Ph⁺ ALL CLSC eredetű, UCSC eredetűre nem találtunk bizonyítékot.
 - b. Az UCSC eredetű PH⁺ CML-LBC valamint a CLSC eredetű Ph⁺ *de novo* ALL egyaránt heterogén a m-bcr-abl vs M-bcr-abl expresszió vonatkozásában.
 - c. A fenti módszerrel történő elkülönítés azért lehet értékes, mert ezt modern molekuláris platformokkal (aCGH) sem lehet megtenni.

3. A bcr⁺ ET illetve Ph⁺ ET vizsgálatok során arra kívántunk rámutatni, hogy van szürke zóna a legújabb WHO osztályozás szerint is bcr-/Ph- ET és a Ph⁺ CML között. Erre utaló közlések ismétlődően voltak, de a myeloproliferatív neoplasiák (MPN) WHO klasszifikációja

nyilván homogén betegség entitásokat kívánt azonosítani (szemben, pl. a WHO Lymphoma klasszifikációval).

- A molekuláris, citogenetikai és kvantitatív morfológiai adatok korrelált vizsgálata nyomán azt állapítottuk meg, hogy a csontvelői morfológia és az ET illetve CML típusú - nagyon eltérő - betegség lefolyás, a Ph+ klón expansziójának függvénye. Azt is megállapítottuk, hogy a klinikailag / laboratóriumiilag ET típusú betegség 9.3 %-ában Ph+ klónt hordoz a beteg. Ebből 3 %-ban a Ph aberráció nem 'driver', maximum 'co-driver' mutáció (Ph+-ET betegség; lehet mono-klonális vagy bi-klonális is), míg 6.3 %-ban 'passanger' mutációként viselkedik (bcr+-ET betegség, nyilvánvalóan bi-klonális betegség).
- Ezen vizsgálataink a MPN-kat genetikailag stratifikáló, meghatározó aberrációk (JAK2 2005, MPL – 2006, CALR – 2013) felfedezése előtt történtek. Azóta tudjuk metilcellulóz kolónia analízisek nyomán, hogy – bár ez a 3 kölcsönösen kizáró - , de Ph transzlokációval együtt előfordulhatnak (mono-klónként vagy bi-klonális jelleggel).
- Teljes joggal feltételezhető, hogy a bcr+ ET ill. Ph+ ET betegségben Ph mutáció mellett - összességében az ET betegség 90 – 95 %-ban kimutatható - JAK2 / CALR / MPL mutációk valamelyike is jelen van mono- vagy biklonális jelleggel.
- Az ilyen, ET és CML típusú mutációkat is hordozó, hibrid haemopoésisben a Ph+ klón dominanciájának, 'driver' jellegének hiánya, vagy a bcr-abl kiméra transzkripcionális, változatos mértékű szilenciuma vezethet ET klinikopathológiát és lefolyást mutató bcr+-ET kialakulásához.
- Nem világos, hogy mi a Ph transzlokáció 'passenger' jellegének az oka. De az pl. dokumentált, hogy Ph+ CML TKI (Dasatinib) kezelést követően ET típusú betegséggé alakult, mert a jelenlevő, korábbi 'passanger' JAK2+ klónok dominánssá váltak.
- Az ET és a CML nem rendelkezik közös őssel, de az ET típusú betegség 6 -7 %-ban valamelyik ET-re jellegzetes aberráció mellett 'passanger' Ph+ klón is jelen van.
- A MPN-kra jellegzetes Ph kromoszóma, JAK2, MPL, CALR mutációk nem képezik az első somatikus mutációt, hanem – specifikus haematológiai fenotípust nem előidéző, de már - klonális haemopoésis talaján alakulnak ki. A 'first hit' mutációk közül leggyakrabban a TET2 TSG (4q24), érintett, mely 5-hmC képződést katalizál, így differenciálódást indukáló promoter metilációt csökkent. Ezek és a 2. mutációk is szinte kizárólag szerettek, a specifikus okokat nem ismerjük, a betegségek is az idősebb felnőttkorban fordulnak elő. Leirtak, azonban 'germ-line' mutációkat is, ez pl. familiáris (gyermekkori) thrombocythaemiához vezet.

4. Amikor a Ph+ betegségek vizsgálatát elkezdtük, nyilvánvalóvá vált, hogy az iFISH-el meghatározott tumortömeg illetve a kiméra gén expresszióját reprezentáló bcr-abl mennyiség jelentős arányban nem lineárisan változnak.

- Ez valójában nem is volt meglepő, hiszen a CML in vitro kolóniáinak vizsgálata során már 1994-ben megállapították, hogy a Ph+ kolóniák 25 %-a 10^{-6} érzékenységű PCR-rel bcr-abl negatívak voltak. Ha a kolóniákat IFN- α jelenlétében generálták, ez az érték 95 %-ra emelkedett (Ref. 130, 5.3.3. fejezet).
- A betegséget manifesztáló, a TKI célpontját képező kiméra expresszió nyilvánvalóan fontos, de minden onkológiai kezelés alapvonala közé tartozik a tumortömeg meghatározása, csökkentése, lehetőleg eradikálása. Ezért foglalkoztunk a bcr-abl átrendeződést a legmegbízhatóbban kimutató iFISH vizsgálattal vs. qRT-PCR meghatározásokkal, az iFISH eljárás automatizációjával. Ezeket 2006-ban lezártuk.

- Nem mi mondtuk, hanem 2014-ben a terápiás protokollokat meghatározó nemzetközi szervezetek, hogy a CML monitorizálásában a DNS alapú vizsgálatok felértékelődnek.
- Ennek alapja, hogy a 6. és 12. hónapos, negatív perifériás (!) iFISH stabil, komplett citogenetikai választ (CCyR) jelez. Tehát a monitorizálás perifériás iFISH alapján lehetséges.
- Továbbá, a CCyR-ban levő major molekuláris választ (MMR; $< 10^{-3}$ bcr-abl) mutató és az azt el nem érő betegek túlélési adatai nem különböztek (Ref.101, 5.3.3. fejezet). Tehát a bcr-abl expresszió mértéke prognosztikailag nem prediktív.
- Fordítva: MMR-ben levő CML betegek 90 %-ában 2 – 14 % gyakorisággal találtak Ph+ őssejteket (CD34+, CD38-) illetve progenitor sejteket (CD34+, CD38+) (Ref. 100, 5.3.3. fejezet).
- Összességében: CML-ben a betegség állapot meghatározás (és menedzsment) CCyR és MMR mellett még várat magára.

Tisztelettel kérem az opponensi véleményre adott válaszaim elfogadását.

Dr Pajor László
PTE, Pathológiai Intézet
pajor.laszlo@pte.hu

Pécs, 2016.12.07.