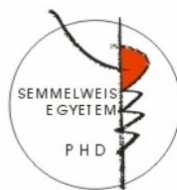


Az onkohematológiai betegségek kezelésében  
alkalmazott tirozin-kináz gátló imatinib és  
nilotinib oszteoblaszt sejtek génkifejeződéseire  
gyakorolt hatásának vizsgálata

Doktori tézisek

**Kirschner Gyöngyi**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lakatos Péter D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy György D.Sc., egyetemi  
docens

Dr. Kiss Csaba Ph.D., reumatológus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szalai Csaba D.Sc.,  
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gál Anikó Ph.D.,  
tudományos munkatárs

Dr. Gomez Izabella Ph.D., reumatológus

Budapest  
2017

# 1. Bevezetés

Jelen tanulmány létrejöttét, a nemzetközi szakirodalomban ismertetett, tirozin-kináz gátlókkal végzett tanulmányok megfigyelései motiválták. Számos klinikai vizsgálat igazolta, hogy egyes onkohematológiai betegségek kezelésében elterjedten használt Breakpoint Cluster Region-Abelson fúziós onkofehérje (BCR-ABL) specifikus tirozin-kináz gátlók, mint például az imatinib, alkalmazása komplex és még nem egyértelműen azonosított módon változtatja meg a csontszövet élettani folyamatait (például a csontsejtek működését, a csontátépülés egyensúlyát, a csont ásványanyag tartalmát és denzitását). A kezdeti kutatások során, több tudományos munka számolt be arról, hogy hatásukra jelentős csonttömeg növekedést figyeltek meg. De a folyamatok pontos hatásmechanizmusairól és a jelátviteli utak működésének változásairól kevés ismeret állt rendelkezésre.

Mivel a tirozin-kináz gátló kezelések egyre több beteget érintenek, illetve hosszú évtizedekig, vagy akár élethosszig is tarthatnak, indokolt ezen mechanizmusok molekuláris hátterének részletesebb megismerése.

## 2. Célkitűzés

A tirozin-kináz gátlók szakirodalomban ismertetett, csont-anyagcserére gyakorolt jelentős hatásai miatt, jelen dolgozatban, két ismert, az onkohematológiai betegségek kezelésében széles körben alkalmazott, tirozin-kináz gátló hatóanyag példáján keresztül vizsgáljuk meg az oszteoblaszt sejtek jelátviteli útvonalaiban valamint a génexpresszióiban végbemenő változásokat.

Kutatásunk célja, hogy megvizsgáljuk az imatinib és a BCR-ABL gátlásra szelektívebb nilotinib egér oszteoblaszt sejtek génkifejeződéseire kifejtett hatásait a teljes transzkriptom szintjén in vitro rendszerben.

### **Kitűzött feladatok:**

- A csontbetegségekkel kapcsolatba hozható ismert jelátviteli útvonalak tanulmányozása, mélyebb megismerése. Mivel a Wnt útvonal csontanyagcserében betöltött fontos szerepét, Horváth Péterrel közös munkánk eredményeként mi is megerősítettük már korábban, ezért ennek az útvonalnak a tirozin-kináz gátlók csontthatásában betöltött szerepének vizsgálatára kiemelt figyelmet fordítunk.

- A megfelelő koncentráció és inkubálási idő megválasztását követően, az imatinib és a nilotinib MC3T3-E1 egér oszteoblaszt sejtek génexpressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata, új generációs szekvenáláson alapuló teljes transzkriptóma analízis segítségével.
- Mindkét hatóanyag esetében, a szekvenálással azonosított gének statisztikai elemzését követően, jelátviteli útvonal analízissel feltérképezzük, a tirozin-kináz gátló kezelések hatására legjelentősebben változott jelátviteli útvonalakat, top upstream regulatorokat és top molekulákat.
- Megvizsgálni, hogy az azonosított változások, miként támaszthatják alá a korábbi klinikai megfigyeléseket.
- Az eredmények tükrében megvizsgálni, hogy az imatinib és a nilotinib oszteoblaszt génexpresszióra gyakorolt hatása megegyezik-e?

### **3. Módszerek**

A vizsgálatokat MC3T3-E1 egér oszteoblaszt sejt kultúrákon végeztük el. Az in vitro vizsgálatokhoz

három csoportot alakítottunk ki: imatinibbel kezelt csoportot, nilotinibbel kezelt csoportot és egy kezeletlen kontroll csoportot. Minden esetben 3 párhuzamos mérést végeztünk, és a végén az azonos mintákat pooloztuk.

A sejttenyésztést követően, először különböző imatinib (Glivec®/ Gleevec®, STI571, CGP 57148B ; Novartis, Basel, Svájc) és nilotinib (Tasigna, Novartis) koncentráció (30nM-20µM) mellett, különböző inkubációs időket alkalmazva vizsgáltuk a sejtek túlélését 96 lyukú sejttenyésztő lemezeken. Mivel a tirozin-kináz gátlókkal végzett terápia általában évtizedekig vagy akár élethosszig is tarthat, ezért a kísérletek során igyekeztünk az *in vitro* kultúrák esetén elérhető leghosszabb kezelést alkalmazni. Így a bemutatott eredmények elsősorban nem a gyors, hanem a lassabban kialakuló másodlagos génaktivitásokban bekövetkező változásokat tükrözik.

A sejtleletképesség mérésekkel párhuzamosan a különböző hatóanyag-koncentrációk és inkubálási idők oszteoblaszt sejtekre gyakorolt csont specifikus génexpressziós hatásait relatív kvantifikációs valós idejű polimeráz-láncreakciós (RT-PCR) módszerrel is megvizsgáltuk.

Az eredmények alapján meghatároztuk a megfelelő inkubálási időt és hatóanyag-koncentrációt. A kísérletek során igyekeztünk az *in vitro* kultúrák esetén elérhető leghosszabb kezelést alkalmazni, hogy az imatinib és nilotinib kezelések hosszabb távú hatását tudjuk vizsgálni. A bemutatott eredmények így elsősorban nem a gyors, hanem a lassabban kialakuló másodlagos génaktivitásokban bekövetkező változásokat tükrözik. Ezt azért tartottuk fontosnak, mert a vizsgált két tirozinkináz gátló hatóanyag terápia alkalmazása évtizedekig vagy akár élethosszig is tarthat.

Az optimális hatóanyag-koncentráció és expozíciós idő meghatározását követően, a kezelt és kezeletlen oszteoblaszt sejtekből RNS-t izoláltunk, az RNS szekvenáláson alapuló, teljes transzkriptóma analízishez. Teljes transzkriptóma analízissel viszonylag olcsón és gyorsan meghatározhatóak egy adott minta transzkriptómájában lévő kódoló és nem kódoló RNS-ek. Ezáltal a WTA alkalmas a genomszintű génexpressziós változások kvantitatív detektálására. A teljes transzkriptóma analízis, SOLiD™ V4 új generációs szekvenátor rendszerrel, a fragmensek mindkét végét is leolvasó paired end könyvtár típusúval, 50\*25bp olvasási

hosszal történt. Az így kinyerhető óriási adathalmazok precíz kiértékelését korszerű bioinformatikai szoftverek teszik lehetővé.

A teljes transzkriptóma analízis során a sejten kifejeződő összes mRNS szintjét kvantitatív módon meghatározva kialakítható az a géncsoport, mely a használt tirozin-kináz gátlók hatására a csontsejtekben eltérő módon expresszálódik. A statisztikailag szignifikáns változást mutató gének meghatározását követően jelátviteli útvonal analízis végezhető.

Az útvonal-analízissel azonosított jelátviteli útvonalak, top upstream regulátorok és top molekulák hozzájárulnak az általunk vizsgált két tirozin-kináz gátló hatóanyag oszteoblaszt sejtek génkifejeződéseire gyakorolt hatásainak mélyebb megértéséhez. A kiértékelés során, kiemelt figyelmet fordítottunk a hatóanyagok feltételezett csontanyagcsere modifikáló hatásainak értelmezésére és magyarázatára.

## **4. Eredmények**

### **Az imatinibbel és a nilotinibbel végzett in vitro hatóanyag-koncentrációt és kezelési időt optimalizáló kísérletek eredményei**

A sejtéletképesség mérések, valamint a relatív kvantifikációs RT-PCR vizsgálatok eredményei alapján, optimális beállításként 1  $\mu$ M hatóanyag-koncentrációt és 6 napos inkubálási időt határoztunk meg a további in vitro vizsgálatokhoz. A teljes transzkriptóma analízishez, az azonos minták poolozása után RNS-t izoláltunk a kezelt (imatinibbel kezelt csoport, nilotinibbel kezelt csoport) és a kezeletlen (kontroll csoport) oszteoblaszt sejtekből.

### **Az oszteoblaszt sejtekben teljes transzkriptóma analízissel azonosított RNS-ek:**

Az imatinibbel kezelt oszteoblaszt sejtekben 16.383, a nilotinibbel kezelt csoportban 16.951, a kezeletlen kontroll sejtekben pedig 17.290 féle annotált RNS-t azonosítottunk. Ezt követően mindkét hatóanyag esetében meghatároztuk a statisztikailag szignifikáns expressziós változást mutató géneket.



### **Azonosított top kanonikus útvonalak:**

Mindkét hatóanyag estén a statisztikailag szignifikáns expressziós változást mutató géneket egy útvonal elemző szoftverrel értékeltük ki. Az imatinibbel kezelt oszteoblaszt sejteknél 6 top kanonikus útvonalat (Reelin jelátviteli útvonal, zsírsav aktivációs jelátviteli útvonal, gamma-amino-vajsav (GABA) receptor jelátviteli útvonal, szertoli-szertoli sejt interakciós jelátviteli útvonal,  $\gamma$ -linolénsav bioszintézis útvonal, Szerotonin receptor jelátviteli útvonal) míg a nilotinibbel kezelt oszteoblaszt sejtek transzkriptómájában öt top kanonikus jelátviteli útvonalat (eukarióta iniciációs faktor 2 (EIF2) jelátviteli útvonal, embrionális őssejt differenciáció szív sejt vonal irányba, az embrionális őssejt transzkripció szabályozó hálózata, Oct4 szerepe az emlős embrionális őssejt pluripotenciában útvonal, GABA receptor jelátviteli útvonal) azonosítottunk.

A két hatóanyagnál azonosított top jelátviteli útvonalak egy útvonal kivételével (Gamma-amino-vajsav (GABA) receptor jelátviteli útvonal) különböznek, és a várt Wnt jelátviteli útvonal szerepe egyik csoportban sem volt igazolható.

### **Azonosított top upstream regulátorok:**

Az imatinibbel kezelt oszteoblaszt sejtek csoportjához a következő, öt upstream regulatort rendelte a szoftver: **FREM2, GLDN, GRIP1, NRCAM és VLDLR**. Ezek közül a **FREM2, GRIP1 és a VLDLR** közvetett módon részt vehet a csont élettani folyamataiban.

A nilotinibbel kezelt oszteoblaszt sejt kultúrákból származó minták kiértékelése során szintén, öt top upstream regulatort azonosított a szoftver: **ACVR1B, ACVR1C, FAAH, MARCH7 és RAD23B**. A nilotinibnél azonosított öt top upstream regulator mindegyikéről ismertek adatok a csontanyagcserével összefüggésben.

### **Azonosított top molekulák:**

Az útvonalelemzések során az expressziós változások mértéke alapján imatinib kezelés hatására, az **STXBP5L, GDF10, HYDIN, NYAP2, AQP9, CSMD1, MYO3B, RELN, Eda, SLITRK5** géneket értékelte a szoftver leginkább érzékenyek a kezelés hatására, vagyis ezek expressziós változása volt a legnagyobb. Az expressziós változások mértéke alapján a nilotinib kezelés hatására leginkább érzékeny gének a következők: **RPS23,**

ZFP184, EDNRB, DKK4, GABRB1, RPL17, KLHL41, NANOG, RPL39.

## **5. Következtetések**

Több klinikai tanulmány igazolta, hogy a tirozin-kináz gátlók alkalmazása során, komplex módon változik a csontszövet élettana. Az oszteoblaszt sejtekre gyakorolt hatásukat saját kísérleti eredményeink is bizonyítják.

Munkánk során, a SOLiD új generációs RNS szekvenálási technikán alapuló teljes transzkriptóma analízis segítségével, elsőként vizsgáltuk, a két széles körben alkalmazott tirozin-kináz gátló hatóanyag, az imatinib és a nilotinib oszteoblaszt sejtek génexpressziójára gyakorolt hatását a mintákban jelen lévő összes mRNS azonosításával. Korábbi tanulmányokban már megjelentek adatok tirozin-kináz inhibitorok alkalmazását követően, a csontszövet legjellemzőbb markereinek génkifejeződésére fókuszálva. Azonban komplex, sejtszintű transzkripciós mintázatbeli elemzés a csontanyagcsere vonatkozásában ez idáig nem történt.

Mindkét hatóanyag esetében meghatároztuk a szignifikáns expressziós különbségeket mutató géneket, a

legjelentősebb útvonalakat, upstream regulátorokat és top molekulákat. Eredményeink alapján, a két vizsgált tirozin-kináz gátló hatására bekövetkező csontanyagcserét érintő változásokban, nem a korábban általunk is azonosított, és a csontanyagcseréhez szorosan köthető ismert jelátviteli útvonalak (mint például a Wnt jelátviteli útvonal) játszanak szerepet. Adataink számos gén és jelátviteli kaszkád potenciális szerepét jelezték, melyek talán szabályozzák az oszteoblaszt sejtek működését. A munkánk által megszerzett tudás a két hatóanyag hatásmechanizmusának mélyebb megértését segíti, amely a jövőben esetleg új terápiás targeteket is kijelölhet. Az újabb kutatási eredményeket (beleértve a saját eredményeinket is) figyelembe véve elmondható, hogy az onkohematológiai betegségek kezelése során alkalmazott tirozin-kináz gátlóknak nincs egyértelmű pozitív hatása a csontanyagcserére, és csonthatásaikban a csontanyagcseréhez szorosan köthető ismert jelátviteli útvonalak, mint például az általunk is feltételezett Wnt jelátviteli útvonal, nem játszanak szerepet. Továbbá az imatinib és a nilotinib csontsejtekre gyakorolt hatása függ az alkalmazott hatóanyag-koncentrációtól, a sejtek

érettségi állapotától, illetve az általuk kötött receptor tirozin-kináz útvonalak megoszlási arányától.

Eredményeink alapján a két hatóanyag eltérően hat az oszteoblaszt sejtek működésére és az imatinib hatása hangsúlyosabb. A statisztikailag szignifikáns különbséget mutató gének között csak 3 közös volt (*ZFP184*, *Gm11225*, *AI593442*) és többnyire más jelátviteli útvonalakat, más upstream regulátorokat és más top molekulákat azonosítottunk a két kezelt csoportban. Kísérleteink alapján tapasztalt imatinib és nilotinib eltérő hatásának magyarázata valószínűleg az lehet, hogy a vizsgált két hatóanyag eltérő kémiai szerkezettel és eltérő kinázprofilal rendelkezik, és az imatinib több tirozin-kináz receptort képes gátolni, míg az imatinibnél jóval szelektívebb nilotinib a tirozin-kináz receptorok többségére nem vagy csak alig hat.

Vizsgálataink során az oszteoblaszt sejt kultúrákon elvégzett tirozin-kináz gátló kezelések, az onkohematológiai betegségek kezelésében széles körben alkalmazott imatinib és nilotinib hatásmechanizmusainak mélyebb megértését szolgálta, mely tudás esetleg a jövőben új terápiás targeteket is kijelölhet a csontbetegségek célzott kezelésében. Ebben a témában

elsőként végeztünk teljes transzkriptom analízist oszteoblasztokon a sejtszintű hatásmechanizmus jobb megértését szolgálva. Továbbá a tirozin-kináz gátlók csontanyagcserét befolyásoló hatásairól elsőként készítettünk a hazai szakirodalomban hiánypótló, átfogó irodalmi áttekintést.

## **6. Saját publikációk jegyzéke**

### **A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:**

1. **Kirschner Gy**, Balla B, Horváth P, Kövesdi A, Lakatos G, Takács I, Nagy Zs, Tobiás B, Árvai K, Kósa JP, Lakatos P. (2016) Effects of imatinib and nilotinib on the whole transcriptome of cultured murine osteoblasts. *Mol Med Rep*, 14: 2025-2037. IF: 1,692
2. **Kirschner Gy**, Balla B, Kósa JP, Horváth P, Kövesdi A, Lakatos G, Takács I, Nagy Zs, Tóbiás B, Árvai K, Lakatos P. (2016) Az onkohematológiai betegségek kezelésében használt tirozin-kináz gátló imatinib és nilotinib csonthatásainak irodalmi áttekintése és a saját kutatási eredmények

bemutatása. Orv Hetil 157 (36): 1429-1437.

IF: 0,349

3. Horváth P, Balla B, Kósa JP, Tobiás B, Szili B, **Kirschner Gy**, Győri G, Kató K, Lakatos P, Takács I. (2016) Strong effect of SNP rs4988300 of the LRP5 gene on bone phenotype of Caucasian postmenopausal women. J Bone Miner Metab, 34: 79-85.

IF: 2,423

#### **A disszertációtól független publikációk:**

1. Árvai K, Horváth P, Balla B, Tobiás B, Kató K, **Kirschner Gy**, Klujber V, Lakatos P, Kósa JP. (2016) Next-generation sequencing of common osteogenesis imperfecta-related genes in clinical practice. Sci Rep, 6: 28417, 2016. IF: 4,259
2. Lakatos P, Tóbiás B, Kósa JP, Halászlaki Cs, Balla B, Árvai K, **Kirschner Gy**, Putz Zs, Dank M, Takács I. (2016) Differenciál pajzsmirigyarakok molekuláris diagnosztikája: Hol tartunk 2016-ban?. MBA, 69:(2) pp. 98-103.

3. Szili B, Bakos B, Kató K, **Kirschner Gy**, Tóbiás B, Balla B, Horváth P. (2014) A D3-vitamin-kezelés különböző adagolási sémáinak összehasonlítása. LAM KID 4: 163-168, 2014.