

Az onkohematológiai betegségek kezelésében használt tirozinkináz-gátló imatinib és nilotinib csonthatásainak irodalmi áttekintése és a saját kutatási eredmények bemutatása

Kirschner Gyöngyi^{1*} ■ Balla Bernadett dr.^{1*} ■ Kósa János Pál dr.¹
 Horváth Péter dr.¹ ■ Kövesdi Andrea¹
 Lakatos Gergely dr.² ■ Takács István dr.¹ ■ Nagy Zsolt dr.¹
 Tóbiás Bálint dr.¹ ■ Árvai Kristóf¹ ■ Lakatos Péter dr.¹

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, ¹I. Belgyógyászati Klinika,
²II. Belgyógyászati Klinika, Budapest

A tirozinkináz-gátlók bizonyos onkohematológiai betegségek kezelésében elterjedten használt gyógyszerek. Több klinikai tanulmány igazolta, hogy a BCR-ABL specifikus tirozinkináz-gátlók alkalmazása komplex és még nem egyértelműen azonosított módon változtatja meg a csontszövet élettani folyamatait. Mivel a kezelések egyre több beteget érintenek, illetve hosszú évtizedekig vagy akár élethosszig is tarthatnak, indokolt ezen mechanizmusok molekuláris hátterének részletesebb megismerése. A szerzők összefoglalják az imatinibbel és a nilotinibbel végzett, csontanyagcseréhez kapcsolódó alapkutatási eredményeket, humán klinikai megfigyeléseket, kiegészítve *in vitro* osteoblast-sejtkultúrákon végzett saját kísérleteik eredményeivel. Az összefoglalt kutatási eredmények alapján az imatinib és a nilotinib csontsejtekre gyakorolt hatása függ az alkalmazott hatóanyag-koncentrációtól, a sejtek érettségi állapotától, illetve az általuk kötött receptor-tirozinkináz útvonalak megoszlási arányától. Jelen közleményben elsőként készítették a hazai szakirodalomban hiánypótló, átfogó irodalmi áttekintést a tirozinkináz-gátlók csontanyagcserét befolyásoló hatásaival kapcsolatban és végeztek teljes transzkriptom-analízist osteoblastokon a sejtszintű hatásmechanizmus jobb megértését szolgálva. *Orv. Hetil.*, 2016, 157(36), 1429–1437.

Kulcsszavak: imatinib, nilotinib, osteoblast, osteoclast

Literature review and presentation of our own research results regarding the effects on bone of tyrosine kinase inhibitors imatinib and nilotinib used in the treatment of oncohematological diseases

Tyrosine kinase inhibitors are widely used for treatment of certain oncohematological diseases. Several clinical studies have confirmed that specific BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors alter the physiological process of bone tissue in a complex and unclearly identified manner. Since these treatments are being given to more and more patients, and the therapy takes decades or lasts even lifelong, it is justifiable to obtain more detailed knowledge of the molecular background of these mechanisms. In this article the authors summarize preliminary research results and human clinical observations on imatinib and nilotinib which are related to bone metabolism, and present the results of their own experiments in *in vitro* osteoblast cultures. Based on the presented results, the effects of imatinib and nilotinib on bone cells depend on the concentration of imatinib and nilotinib, the maturation stage of the cells and the distribution ratio of receptor tyrosine kinase signaling pathways. In this study the authors firstly prepared a stop-gap, com-

*A szerzők egyenlő arányban vettek részt a kézirat megírásában.

prehensive review in the Hungarian literature, regarding the effects of tyrosine kinase inhibitors on bone metabolism. In addition they firstly performed whole transcriptome analysis on osteoblasts in order to obtain a better understanding of the cellular molecular mechanisms.

Keywords: imatinib, nilotinib, osteoblast, osteoclast

Kirschner, Gy., Balla, B., Kósa, J. P., Horváth, P., Kövesdi, A., Lakatos, G., Takács, I., Nagy, Zs., Tóbiás, B., Árvai, K., Lakatos, P. [Literature review and presentation of our own research results regarding the effects on bone of tyrosine kinase inhibitors imatinib and nilotinib used in the treatment of oncohematological diseases]. *Orv. Hetil.*, 2016, 157(36), 1429–1437.

(Beérkezett: 2016. május 23.; elfogadva: 2016. június 23.)

Rövidítések

BCR-ABL = breakpoint cluster region protein-Abelson murine leukemia viral onkogene homolog 1; BMD = csontásványianyag-tartalom; c-fms = kolóniastimuláló faktor-1 receptor; c-kit = őssejtfaktor-receptor; CML = krónikus myeloid leukaemia; CSF1R = kolóniastimulálófaktor-receptor; CTX-1 = C-terminális kollagén keresztkötő 1; DDR1/DDR2 = diszko-idin domén receptor 1/2; GABA = gamma-aminovajsav; GIST = gastrointestinalis stromatumor; M-CSF = makrofágkolónias-timuláló-faktor; OPG = oszteoprotegerin; PDGFR = thrombocytæredetű növekedési faktor receptor; PDGFRA = thrombocytæredetű növekedési faktor receptor alfa; PDGFRB = thrombocytæredetű növekedési faktor receptor béta; RANKL = receptoraktivátor nukleáris faktor κ ligand; RT-PCR = reverz transzkripció mediálta PCR-meghatározás; SCF = őssejtfaktor

A tirozinkináz-gátlók bizonyos onkohematológiai betegségek kezelésében elterjedten használt gyógyszerek. Az első tirozinkináz-gátló gyógyszerhatóanyag az imatinib volt, amelyet 2001-ben engedélyezett az Amerikai Gyógyszerügyi Hatóság (U.S. Food and Drug Administration – FDA) a krónikus myeloid leukaemiás (CML) betegek számára [1]. Azóta a világ egyre több országában egyre több beteg részesül imatinibterápiában. A CML-betegekben kimutatható BCR-ABL fúziós fehérje gátlására használt tirozinkináz-gátlók közül, a hazai és nemzetközi szakmai irányelvek alapján, a kezelések során először imatinibet (Glivec, 2001) alkalmaznak. Ha az imatinibkezeléssel nem érik el a beteg állapotának javulását (nincs remisszió, rezisztencia alakul ki vagy imatinibintolerancia lép fel), akkor a hatályban lévő eljárásrend alapján alkalmazható a nilotinib (Tasigna, 2007) vagy a dasatinib (Sprycel, 2006). Azoknál a betegeknél, akiknél sem az imatinibkezelés nem javasolt, és nilotinibre, valamint dasatinibre sem reagálnak megfelelően, alkalmazható a ponatinib (Iclusig, 2013) és a bozutinib (Bosulif, 2013) is.

A CML a fehérvérsejtek egy részét létrehozó csontvelő myeloid őssejtvonalát érinti. A betegséget a BCR-ABL génfúziót hordozó úgynevezett *Philadelphia* kromoszóma jellemzi, amelynek következtében túlzott mennyiségű kóros fehérvérsejt termelődik. A CML-betegségre

jellemző *Philadelphia* kromoszóma a 22-es és a 9-es kromoszóma reciprok transzlokációjával jön létre t(9;22)(q34;q11). A 22-es kromoszóma hosszú karján kialakul a BCR-ABL onkogén, amiről egy hibás BCR-ABL fúziós fehérje íródik át. Ez a konstitutívan aktív tirozinkináz-ként működő fehérje folyamatosan foszforilálja szubsztátjait, amelyek sejtproliferációs, differenciációs kaskádokat indítanak el. Ez a kontrollálatlan sejtosztódás az, ami a CML-sejtek folyamatos termelődését eredményezi.

Az imatinib a leukaemiás sejtek intracelluláris terébe speciális transzporterek segítségével jut, ezzel szemben a nilotinib esetén nem azonosították a pontos transzportmechanizmust, feltételezik, hogy a sejtbe jutás főként passzív folyamatok révén valósul meg. A tirozinkináz-inhibitorok a CML-sejtekben – ATP kompetitív vegyületként – a BCR-ABL fehérje inaktív konformációjához kötődnek és gátolják annak aktivitását. Ezzel megakadályozzák a tumorsejtek proliferációját és azokban apoptózist indukálnak. Számos klinikai vizsgálat tanulmányozta a BCR-ABL specifikus tirozinkináz-gátlók biológiai hatásait, mint a farmakokinetikai és farmakodinamikai tulajdonságok, mellékhatásspektrum, különböző receptorkhoz való viszonyaik, illetve sejten belüli viselkedésük. A tanulmányok közül néhány igazolta, hogy ezek a hatóanyagok komplex módon befolyásolják többek között a csontanyagcsere-folyamatokat is (1. táblázat).

Az imatinib és nilotinib csontsejtekre gyakorolt hatását vizsgáló *in vitro* kísérleti eredmények irodalmi áttekintése

Az imatinib és nilotinib csonthatása valószínűleg a csontsejtek fiziológiás receptorain keresztül valósul meg. Mindkét hatóanyag esetén ismertek a farmakológiai célponttól eltérő egyéb targetek, amelyekhez különböző affinitással képesek kapcsolódni. Ezek a PDGFRA, PDGFRB, c-kit, c-fms, M-CSF, DDR1, DDR2, CSF1R és SCF, amelyek közvetítésével a direkt csonthatás érvényesülhet. A tapasztalt hatás függ az alkalmazott hatóanyag-koncentrációtól, a sejtek érettségi állapotától, illetve az általa kötött receptor-tirozinkináz útvonalak megoszlási arányától [2–4].

1. táblázat | A vizsgált két tirozinkináz-gátló főbb tulajdonságainak és a csontanyagcserére való hatásainak összefoglalása

A nyílak a változások irányát jelölik. ↑: Az adott tulajdonság vagy folyamat fokozódása, aktiválódása. ↓: Az adott tulajdonság vagy folyamat csökkenése, gátlása.

	Hatóanyag neve	
	Imatinib	Nilotinib
Gyógyszer (gyártó)	Glivec/Gleevec (Novartis)	Tasigna (Novartis)
Terápiás javallat	Gyermek és felnőtt CML-betegek, valamint felnőtt GIST-betegek és PDGFR génátrendeződéssel járó betegségek kezelésére	Felnőtt, krónikus fázisú CML-betegek kezelésére
Alkalmazott dózis felnőttknél	400 mg/nap, 600 mg/nap vagy 2 × 400 mg/nap	2 × 300 mg/nap vagy 1 × 400 mg/nap
Hatóanyag, célpont	BCR-ABL onkoprotein, tirozinkináz aktivitásának gátlása	BCR-ABL onkoprotein, tirozinkináz aktivitásának gátlása
A célzott farmakológiai célponttól eltérő, egyéb szubsztrátok	KIT, SCF, DDR1, DDR2, CSF1R, PDGFR, c-fms, karbonikus anhidráz II	PDGFR, KIT, Efrin-receptor
Osteoblastsejtekre gyakorolt hatás	Proliferáció ↓, differenciáció ↑, sejtaktivitás ↑, osteoblast-specifikus génexpresszió ↑	Proliferáció ↓, differenciáció ↓, OPG-expresszió és -szekréció ↑, RANKL-expresszió ↓
Osteoclastsejtekre gyakorolt hatás	Csontreszorpciós sejtaktivitás ↓, osteoclast-prekurzorok és érett osteoclastok túlélése ↓, differenciáció ↓, aktivitás ↓, osteoclastogenesis ↓, sejtszám ↓	Képződés ↓, aktivitás ↓, differenciáció ↓, apoptózis ↑, sejtszám ↓
Klinikai megfigyelések a csontanyagcsere vonatkozásában	Hypophosphataemia, hypokalcaemia, hyperparathyreosis, csontspecifikus szérumbiomarkerek változása, megnövekedett csontmineralizáció, szivacsos csontállomány növekedése, a csont ásványianyag-tartalmának növekedése	

Az imatinib és nilotinib csontképző osteoblast- és csontbontó osteoclastsejtekre gyakorolt hatását immortalizált sejtvonalakon és rágcsálómódellen tesztelték. Az *in vitro* kísérletek megfigyelései alapján az imatinib támogatja az osteoblastsejtek differenciációját [2, 5, 6], azonban gátolja proliferációjukat és túlélésüket [5–10]. Emellett csökkenti az osteoclastogenesis és a csontreszorpció mértékét, valamint az osteoclast-prekurzorok és az érett osteoclastok túlélését [2, 6–9]. További tanulmányokban az imatinib hatására megnövekedett osteo-

blast-specifikus génexpressziót, sejtaktivitást és mineralizációt tapasztaltak [2, 5–10].

Az imatinib dózisfüggő módon (0,05–1 μM) indukálta a csontszövet képződését patkány-egér (MC3T3-E1) osteoblast-sejtvonalakon. Mindezeket alkalikusfoszfátáz (ALPL-), csontszialoprotein- (BSP-) és osteocalcin- (BGLAP-) specifikus kvantitatív génexpressziós vizsgálatokkal is megerősítették. Az imatinib osteoblast-proliferációt gátló hatását több modellben, így humán osteosarcoma-sejtvonalon (SaOS-2), valamint egér ST2 csontvelői stromasejt-kultúráján is leírták. Az imatinib közvetve vagy a csontbontósejt-előalakokra hatva közvetlenül is képes gátolni az osteoclastogenesisist.

Az imatinibhez hasonlóan a nilotinib (0,01–1 μM koncentrációban) is gátolta az osteoblast-proliferációt. Azonban az osteoblast-differenciációt csökkentette vagy nem volt rá hatással. Az osteoblastsejtek nilotinibkezelése növelte az oszteoprotegerin (OPG) expresszióját és szekrécióját, valamint csökkentette a RANKL mRNS-ének átíródását [5]. Az osteoclastogenesisist szintén hatékonyan gátolta.

A két tirozinkináz-gátló csontanyagcserét érintő, humán klinikai megfigyeléseinek irodalmi összegzése

Krónikus fázisú CML-betegek aspirációs csontvelőmintáin végzett microarray-vizsgálatok alapján az imatinib (400 mg/nap) a kezelés kezdeti időszakában nagymértékben befolyásolta a csontvelői haematopoieticus sejtek génexpressziós profilját. A bekövetkező transzkripciós változások szignifikánsan módosították a sejtciklust, a sejtnövekedést, a proliferációt, a DNS-replikációt és -rekombinációt, valamint a DNS-javító mechanizmusokat [3].

Magas dózisú imatinibterápia (600 mg/nap) során a betegek csontbiopszia-mintáinak mikrokomputer-tomográfiás feltárásánál igazolták, hogy osteopeniás CML-betegeknél megnövekedett a csípőcsont szivacsos állománya [11]. Szivacsos csontállomány-növekedést 50 év feletti, osteoporotikus kezelték esetén is tapasztaltak [9]. Ezzel szemben több, terápia alatt álló betegnél mérték a csontásványanyag-tartalom csökkenését a combnyak területén. A csontmarkerek szérumszintjének vizsgálatai alapján a csontbontó osteoclastsejtek számának és aktivitásának csökkenését figyelték meg. Jelentős csökkenést figyeltek meg például a szérum-CTX-1 mennyiségében, ami csökkent osteoclast-aktivitásra utal [5, 11]. De ezt a csökkenést a csontépítő osteoblastsejtek aktivitása nem követte és az erre vonatkozó klinikai megfigyelések egymásnak ellentmondóak voltak [11–14]. A tirozinkináz-gátlókkal kezelt betegeknél hypophosphataemia [5, 9, 12, 13, 15, 16], hypocalcaemia [12, 13, 15, 16], valamint hyperparathyreosis [12, 13, 15, 16] lépett fel.

Kezdetben számos kutatócsoport jutott olyan eredményre, hogy az onkohematológiai betegségek kezelé-

sében használt tirozinkináz-gátlók, mint például az imatinib és a nilotinib, pozitív csontanyagcsere-változásokat idézhetnek elő. A későbbi kiterjedtebb vizsgálatok azonban már nem minden esetben erősítették meg ezeket a megfigyeléseket. Sőt arról is beszámoltak, hogy imatinib hatására az osteoblastok aktivitását jelző szérumsztoeokalcin-szint [11–13, 17], valamint a BMD egyaránt csökken.

Napjainkban már elmondható, hogy a tirozinkináz-gátlóknak nincs egyértelmű pozitív hatása a csontanyagcsere-re. Azonban az osteoblast- és osteoclastsejtek működésének befolyásolásán keresztül komplex módon változtatják meg a csontszövet élettani folyamatait. Mivel a kezelések egyre több beteget érintenek, illetve hosszú évtizedekig vagy akár élethosszig is tarthatnak, indokolt ezen mechanizmusok molekuláris hátterének jobb megismerése. Ezért a saját kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk az imatinib és nilotinib osteoblastsejtekre kifejtett hatásait a teljes transzkriptom szintjén, valamint, hogy feltérképezzük a kezelés hatására a sejten belül megváltozott számos jelátviteli és szabályozó útvonalat.

Saját kutatási eredmények bemutatása

Anyagok és módszerek

In vitro sejt kultúra

Tanulmányunk során *in vitro* vizsgálatokat végeztünk imatinibbel és nilotinibbel kezelt egérpraeosteoblast-sejtkultúrán. Az MC3T3-E1 sejteket az ATCC-től (American Type Culture Collection) (Rockville, MD, Amerikai Egyesült Államok) vásároltuk. A sejteket Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (α -MEM; Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) sejtenyészítő médiumban tartottuk, kiegészítve 0,292 g/L L-glutaminnal (Sigma), 5% magzatiborjú-szérummal (FCS; Sigma), valamint 1% antibiotikummal (penicillin, streptomycin-szulfát és amphotericin B; Sigma). A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ és 78% páratartalom mellett tenyésztettük. A sejtek áttöltése 70%-os konfluencia esetén történt. Az áttöltések során 0,25% Trypsin EDTA-oldatot (Sigma) használtunk. A kísérleteket a sejtkultúrákkal 8–15 áttöltés között végeztük el.

In vitro kezelés imatinibbel és nilotinibbel – sejtéletképesség-mérés

A vizsgálatokhoz három csoportot alakítottunk ki: imatinibbel kezelt csoportot, nilotinibbel kezelt csoportot és egy kezeletlen kontrollcsoportot. A megfelelő kezelési idő és dózis megválasztása érdekében először különböző imatinib (Glivec/Gleevec, STI571, CGP 57148B; Novartis, Svájc) és nilotinib (Tasigna; Novartis, Svájc) koncentrációt (30 nM–20 μ M) alkalmazva vizsgáltuk a sejtek túlélését. A kísérletek során igyekeztünk az *in vitro* kultúrák esetén elérhető leghosszabb kezelést alkalmazni (1–6 nap). A sejtéletképesség méréséhez a tápoldat eltávolítása után 100 μ l/lyuk triklór-ecetsavval

(Sigma) fixáltuk a sejteket, majd 100 μ l 4%-os Sulforhodamine-B (SRB, Sigma) oldattal megfestettük 1%-os ecetsavas közegben. A felesleges festékdoldat eltávolítása után a sejtenyészítő lemezeket négyszer átöblítettük 1%-os ecetsavoldattal, ezt követően szobahőmérsékleten hagytuk megszáradni. A kötött SRB-t 100 μ l 10 mM-os Tris-oldatban (Sigma) feloldottuk és a sejtenyészítő lemezeket 5 percig ráztuk. A méréseket Multiskan Spectrum VI.2 1500-636 készülékkel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) 520 nm-en, 96 lyukú Thermo Cliniplateken (Thermo Fisher Scientific Inc.) végeztük. Az eredmények alapján meghatároztuk a megfelelő inkubálási időt és hatóanyag-koncentrációt. A tirozinkináz-gátlókkal kezelt sejteket 24 lyukú sejtenyészítő lemezen 1 μ M-os hatóanyag-koncentráció mellett 6 napig inkubáltuk. Minden esetben 3 párhuzamos mérést végeztünk.

RNS-izolálás

A kezelt és kezeletlen osteoblastsejtekből az RNS-izolálást High Pure Total RNA Isolation System (Roche, Indianapolis, IN, Amerikai Egyesült Államok) segítségével hajtottuk végre, a gyártó előírása szerint. Az izolált RNS

2. táblázat | Az imatinibkezelt sejtekben azonosított top kanonikus útvonalak

Kanonikus útvonalak	$-\log(p\text{-érték})^a$	Arány ^b	Génszimbólumok (logFC-érték) ^c
Reelin jelátviteli útvonal	2,61E00	7,59E-02	<i>MAP3K9</i> (3,41), <i>MAPK8IP2</i> (2,10), <i>ITGA2</i> (2,35), <i>DABI</i> (2,24), <i>RELN</i> (3,71), <i>DCX</i> (1,86)
Zsírsvaktiváló jelátviteli útvonal	1,69E00	1,54E-01	<i>ACSL6</i> (3,39), <i>ACSBG2</i> (2,42)
GABA-receptor jelátviteli útvonal	1,63E00	6,35E-02	<i>GABRQ</i> (2,69), <i>GABRG3</i> (1,95), <i>GABBR2</i> (2,74), <i>ADCY1</i> (3,16)
Szertoli–szertoli sejtiinterakciós jelátviteli útvonal	1,52E00	4,07E-02	<i>CLDN10</i> (1,94), <i>MAP3K9</i> (3,41), <i>EPB41</i> (2,51), <i>CTNNA2</i> (2,76), <i>CLDN4</i> (2,21), <i>ITGA2</i> (2,35), <i>Gucy1b2</i> (2,86)
γ -linolén-sav-bioszintézis	1,52E00	1,25E-01	<i>ACSL6</i> (3,39), <i>ACSBG2</i> (2,42)
Szerotoninreceptor jelátviteli útvonal	1,5E00	7,5E-02	<i>HTR5A</i> (2,06), <i>ADCY1</i> (1,45), <i>HTR1A</i> (2,88)

^aA $-\log(p\text{-érték})$ számításához Fisher egzakt tesztet használtunk.

^bAz arány kiszámításakor a saját kísérleti eredményeink alapján az adott útvonalhoz hozzárendelhető gének számát elosztottuk az IPA adatbázisa alapján az útvonalhoz tartozó összes génnel.

^cAz adott útvonalakhoz rendelt, a kezelés hatására szignifikáns expressziós eltérést mutató gének és azok logFC-értékei.

minőségét Bioanalyzeren (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Amerikai Egyesült Államok), mennyiségét Qubit fluorométeren (Life Technologies, Carlsbad, CA, Amerikai Egyesült Államok) ellenőriztük. Ezt követően a párhuzamos biológiai minták poolozása után a teljes transzkriptómaanalízis kivitelezését Applied Biosystems SOLiD™ V4 készüléken (Life Technologies) végeztük el.

SOLiD új generációs RNS-szekvenálás

A tisztított, DNS-mentesített totál RNS-molekulák (>5 mg/minta, RIN>8,0, cc>400 ng/ml) teljes transzkriptómaanalízisét új generációs 50 + 20 bp reads paired-end technológiával a SeqOmics Biotechnológiai Kft. (SeqOmics Biotechnológiai Kft., Szeged, Magyarország; <http://www.seqomics.hu/>) végezte.

Statisztikai analízis

Mindkét hatóanyag esetében az expresszáldott gének logFC (fold-change: az expressziós változás mértéke a kezelt csoportban a kontrollcsoportéhoz viszonyítva) értékei alapján meghatároztuk a szignifikáns változást mutató géneket Benjamini and Hochberg False Discovery Rate számítás segítségével. A szignifikanciaszint 0,05 volt. A kiválasztott szignifikáns géneket Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (QIAGEN, Redwood City, CA, Amerikai Egyesült Államok; www.ingenuity.com) szoftver segítségével értékeltük ki. Kiemelt figyelmet fordítottunk a kísérletbe bevont hatóanyagok csontanyagcsereére gyakorolt hatásának vizsgálatára.

Eredmények

Szignifikáns gének azonosítása

Az imatinibbel kezelt osteoblastsejtekben 16,383, a nilotinibbel kezelt csoportban 16,951, a kezeletlen, kontrollsejtekben pedig 17,290-féle annotált RNS-t azonosítottunk.

Az imatinib esetén 358, míg a nilotinibkezelést követően 21 szignifikánsan eltérő expressziós mintázatot mutató gént találtunk a kontrollsejtekhez képest. A két kezelt csoport között három gén (*AI593442*, *Gm11225*, *ZFP184*) egyezett meg, közel azonos expressziós aktivitással. Az azonosított szignifikáns gének imatinib esetén mind upregulálódtak, nilotinib esetén egy kivételével szintén mind overexpresszáldottak a logFC-értékek alapján.

Azonosított jelátviteli útvonalak

Mindkét hatóanyag esetén a szignifikáns expressziós különbséget mutató géneket jelátviteli útvonalakba rendeztük Ingenuity Pathway Analysis segítségével. Az azonosított top jelátviteli útvonalak többsége különbözik a két hatóanyagnál. Az imatinibbel végzett kísérletek alapján 6, a nilotinib esetén pedig 5 top jelátviteli útvonalat azonosítottunk (2. és 3. táblázat). A GABA- (*gamma*-aminovajsav-) receptor jelátviteli útvonal volt az egyedüli,

3. táblázat | A nilotinibkezelt sejtekben azonosított top kanonikus útvonalak

Kanonikus útvonalak	-log(p-érték) ^a	Arány ^b	Génszimbólumok (logFC-érték) ^c
EIF2 jelátviteli útvonal	5,27E00	2,37E-02	<i>RPL17</i> (2,41), <i>RPL39</i> (1,99), <i>RPS23</i> (3,45)
Embrionális összejt-differenciáció szívsejtvonal irányba	2,14E00	1E-01	<i>NANOG</i> (2,06)
Az embrionális összejt transzkripció szabályozó hálózata	1,56E00	2,63E-02	<i>NANOG</i> (2,06)
Oct4 szerepe az emlős embrionális összejt pluripotenciában	1,49E00	2,22E-02	<i>NANOG</i> (2,06)
GABA-receptor jelátviteli útvonal	1,34E00	1,59E-02	<i>GABRB1</i> (2,83)

^aA -log(p-érték) számításához Fisher egzakt tesztet használtunk.

^bAz arány kiszámításakor a saját kísérleti eredményeink alapján az adott útvonalhoz hozzárendelhető gének számát elosztottuk az IPA adatbázisa alapján az útvonalhoz tartozó összes génnel.

^cAz adott útvonalakhoz rendelt, a kezelés hatására szignifikáns expressziós eltérést mutató gének és azok logFC-értékei.

amely mindkét hatóanyag esetén a top kanonikus útvonalak között szerepelt. Eredményeinkben három ioncsatorna (*GABRQ*, *GABRB1* és *GABRG3*), egy G-proteinkapcsolt receptor B (*GABBR2*) és az 1-es típusú adenilát-cikláz kódoló gén (*ADCY1*) kapcsolódott ehhez az útvonalhoz.

Az imatinibkezelés hatására az osteoblastsejtekben a legmarkánsabb változást a *reelin* jelátviteli útvonal érte el, amely a kaszkádhöz rendelhető összesen 6 génnel képviseli magát. A lipidmetabolizmusban szerepet játszó két útvonal (*zsírsav-aktivációs hálózat* és *γ-linolénsav-bioszintézis*) is jelentős különbséget mutatott. A *szertoli-szertoli sejtinterakció jelátviteli útvonal* szerepét elsősorban a here sejtjeinek növekedésében, proliferációjában és fejlődésében írták le. Kísérleteinkben az útvonalhoz 7 szignifikánsan upregulálódott gén csoportosítható. A *szertolinreceptor jelátviteli útvonalról* igazolták, hogy erős pozitív hatása van a csonttömegre. A vizsgálatunkban ez az útvonal 3 génnel képviselteti magát. Annak ellenére, hogy az azonosított kanonikus útvonalakhoz tartozó p-értékek jelentősen meghaladják a szignifikancia küszöbértékét (p<0,05), a szoftver nem tudta megjósolni az útvonalak aktivitási mintázatát.

A nilotinibbel kezelt sejtek teljes transzkriptómaanalízise során azonosított öt top kanonikus útvonal közül az *EIF2 jelátviteli útvonal* volt a legszignifikánsabb, 3 hozzá kapcsolható génnel. Az EIF2 (eukaryotainiciációs faktor 2) -komplexnek fontos szerepe van a transláció folyamatának elindításában. A további szabályozási útvonalakat egy kritikus homeobox gén képviseli, a *NANOG*,

amely a sejtek önmegújulási és dedifferenciálódási folyamataiban szerepet játszó transzkripció faktor kódol.

Azonosított top upstream regulátorok

Öt-öt úgynevezett top upstream regulátort azonosítottunk, mind az imatinibbel, mind a nilotinibbel kezelt osteoblastok teljes mRNS-szekvenálása során. Az elemzésben statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,01$ értéket tekintettük, Fisher egzakt tesztet alkalmazva. Ezek a felsőbb szintű transzkripció szabályozóelemek magyarázatot adhatnak a megfigyelt génexpressziós változásokra. Az imatinib esetén ezek a következők voltak: *GLDN*, *FREM2*, *NRCAM*, *GRIP1* és *VLDLR*. A nilotinibcsoportban: *FAAH*, *MARCH7*, *ACVR1B*, *RAD23B* és *ACVR1C*. Az azonosított upstream regulátorok közül több esetében is ismertek adatok a csontanyagcserével összefüggésben. A megtalált upstream szabályozóelemeket kódoló gének összefoglalása és azok csontanyagcseréhez köthető biológiai funkcióinak áttekintése megtalálható a 4. és 5. táblázatban [18–25].

Megbeszélés

Munkánkban megvizsgáltuk az onkohematológiai betegségek terápiájában használt tirozinkináz-gátló imatinib és a nilotinib vegyületek hatását a teljes transzkriptom szintjén *in vitro* egéroseblast-sejtkultúrában. Ez volt az első olyan vizsgálat, ahol a csontképzésben szerepet játszó osteoblastok teljes mRNS-készletét és annak a kezelés hatására bekövetkezett expressziós változását vizsgálták. Korábbi tanulmányokban már megjelentek adatok tirozinkináz-inhibitorok alkalmazását követően, a csontszövet legjellemzőbb markereinek génkifejeződésére fókuszálva. Azonban komplex, sejtszintű transzkripció mintázatbeli elemzés a csontanyagcserére vonatkozásában ez idáig nem történt. Mindkét hatóanyag esetében meghatároztuk a szignifikáns expressziós különbségeket mutató géneket, azonosítottuk a top jelátviteli rendszereket és az upstream regulátor géneket, útvonalanalízisek segítségével. Kiemelt figyelmet fordítottunk a hatóanyagok feltételezett csontanyagcseremodifikáló hatásainak értelmezésére és magyarázatára. Mivel a tirozinkináz-gátlókkal végzett terápia általában évtizedekig vagy akár élethosszig is tarthat, ezért az imatinib- és nilotinibkezelések (6 napos inkubációs idő) hosszabb távú hatását igyekeztünk vizsgálni *in vitro* sejtes rendszerben. Így a bemutatott eredmények elsősorban nem a gyors, hanem a lassabban kialakuló másodlagos génaktivitásokban bekövetkező változásokat tükrözik.

Több klinikai tanulmány is igazolta, hogy ezek a tirozinkináz-gátló vegyületek alkalmazásuk során komplex módon változtatják meg a csont homeosztatikus folyamatait. A publikált eredmények sokszor egymásnak ellentmondóak, amit magyarázhat a vizsgált sejtek eltérő érettségi állapota [2], az alkalmazott hatóanyagok koncentrációja [2, 5], azok kémiai tulajdonságai, illetve kináztarget-spektruma. Saját eredményeink is bizonyítják,

4. táblázat | Az imatinibkezelt sejtekben azonosított upstream regulátorok

Génszimbólum és -név	Általános biológiai funkció és a csontanyagcseré szabályozásában betöltött szerep
<i>FREM2</i> FRAS1-related extracellular matrix protein 2	Extracelluláris mátrixprotein, szükséges a hám integritásának fenntartásához és az epidermalis adhézióhoz. Közvetett módon részt vehet a csont élettani folyamatainak regulálásában. Mivel kapcsolatban áll olyan molekulákkal, amelyek például az oszteokalcin-génexpresszió szabályozásában vesznek részt (<i>MDM2</i>) [18], a csonttörés gyógyulását támogatják (<i>EGFL6</i>) [19], az osteoblast-differenciációt serkentik (<i>NPNT</i>) [20].
<i>GLDN</i> Gliomedin	Ranvier-befűződések kialakulásában vesz részt a myelinhüvelyes axon mentén.
<i>GRIP1</i> Glutamate receptor interacting protein 1	Az általa kódolt protein elsősorban az idegsejtekben transzportfolyamatokban vesz részt. Jelet közvetít a citoskeletális és membránfehérjék között. Interakcióba lép számos, a csonttömeg növekedését befolyásoló molekulával (<i>NRII3</i> , <i>MEF2C</i> , <i>ESR1</i>) [21–23], valamint az osteoblastok differenciációját befolyásoló ösztrogénreceptor-alfával is (<i>ESRRA</i> , estrogen related receptor alpha).
<i>NRCAM</i> Neuronal cell adhesion molecule	Az immunoglobulin-szupercsalád tagja. A gén által kódolt Ankyrin-kötő fehérje részt vesz a neuron-neuron sejtadhézióban, továbbá a Ranvier-befűződések kialakulásának molekuláris folyamataiban.
<i>VLDLR</i> Very low density lipoprotein receptor	Lipoproteinreceptor, amelynek szubsztrátja a nagyon alacsony denzitású lipoproteinmolekula. Hozzákapcsolódva, endocitózissal a sejt belsejébe juttatja azt. Szerepet játszik a VLDL-triglicerid metabolizmusban és a reelin jelátviteli útvonalban is. A koleszterinszint szabályozásán keresztül hathat a BMD-re és a csontok megfelelő mechanikai tulajdonságainak megtartására. Az osteoblast-proliferációt serkenti.

A gének neveit és általános biológiai szerepük leírását a GeneCards (<http://www.genecards.org>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) és az IPA (<https://reports.ingenuity.com>) adatbázisból gyűjtöttük. Az upstream regulátorok által szabályozott elemek listáját az IPA-elemzés eredményei adták. A csontanyagcseréhez köthető biológiai szerepüket a felsorolt adatbázisokból és a szakirodalomból gyűjtöttük.

hogy a két inhibitor eltérő módon hat az osteoblastsejtek génkifejeződési mintázatára. Ismert, hogy az imatinib a BCR-ABL célmolekulája mellett több sejtfelszíni tirozinkináz-receptorhoz is képes kapcsolódni, míg a nilotinib jóval specifikusabb, a tirozinkináz-receptorok többségével nem kötődik. A statisztikailag szignifikáns különbséget mutató gének között csak 3 közös volt (*ZFP184*, *Gm11225*, *AI593442*) a két kezelt csoportban. A *ZFP184* (Zinc finger protein 184), amely transzkripciót szabályozó folyamatokban vesz részt, és a *CLIC1* (chloride intracellular channel 1) kapcsolatán keresztül

5. táblázat | A nilotinibkezelt sejtekben azonosított upstream regulátorok

Génszimbólum és -név	Általános biológiai funkció és a csontanyagcsere szabályozásában betöltött szerep
<i>ACVR1B</i> Aktivin receptor type-1B	Transzmembránreceptor. Az 1-es típusú aktivinreceptor komplexet képez a 2-es típusúval, és az így kialakuló komplex szabályozza például az idegsejt-differenciációt és -túlélést, szórtüszőfejlődést, FSH-termelést, sérülésgyógyulást, extracelluláris mátrix termelődését, immunszuppressziót és karcinogenezist. Az <i>ACVR1B</i> az aktivinútvonala részeként szerepet játszik a csontvázrendszer fejlődésében. Aktivinrendszer szabályozza a csontsejt-differenciációt és -proliferációt [24].
<i>ACVR1C</i> Aktivin receptor type-1C	Az aktivin AB, aktivin B és a NODAL receptora. Részt vesz a sejtdifferenciációban, növekedésgátlásban és az apoptózisban. A csontfejlődésben és a remodeling során fontos molekulákat szabályoz (például: <i>ephrinB2</i> , <i>CASP3</i> , <i>SMAD3</i>).
<i>FAAH</i> Fatty acid amide hydrolase	Az általa kódolt integrális membránfehérje a zsírsavamidok hidrolíziséért felelős. A működése során keletkező zsírsavamidok hatással vannak az osteoblastokra és az osteoclastokra, stimulálják a csontépítést és gátolják a reszorpciót [25].
<i>MARCH7</i> Membrane-associated ring finger (C3HC4) 7, E3 ubiquitin protein ligase	E3 ubiquitinligázok ring finger típusa. Ideiglenesen megkötö a célfehérjét és ubiquitint kapcsol hozzá. Az ubiquitinnel jelölt fehérje ezután lebontásra kerül. Ez a folyamat biztosítja a fehérjék dinamikus egyensúlyát a sejten belül.
<i>RAD23B</i> RAD23 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	Az ubiquitinfüggő fehérje degradációja során, a poliubiquitínált fehérjék proteasómához történő szállításában vesznek részt. A különböző proteasómákon (<i>PSMC2</i> és <i>PSMC1</i>) keresztül közvetett hatása lehet az osteoblast-differenciációra és a kanonikus Wnt jelátvitelre.

A gének neveit és általános biológiai szerepük leírását a GeneCards (<http://www.genecards.org>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) és az IPA (<https://reports.ingenuity.com>) adatbázisaiból gyűjtöttük. Az upstream regulátorok által szabályozott elemek listáját az IPA-clemzés eredményei adták. A csontanyagcserehez köthető biológiai szerepüket a felsorolt adatbázisokból és a szakirodalomból gyűjtöttük.

[26] szerepe lehet az osteoblast-differenciációban. A *Gm11225* (3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase pseudogene) és *AI593442* (C11orf87, chromosome 11 open reading frame 87) biológiai szerepe a csontanyagcsereben nem ismert.

A top kanonikus útvonalak között a két szer esetén közös volt a *GABA-receptor jelátviteli útvonal*. A vizsgálatok során a receptorcsalád 4 tagjának (*GABRG*, *GABRB1*, *GABRG3* és *GABBR2*) megnövekedett gén-

expresszióját detektáltuk. Funkcionális GABA-receptorok konstitutívan jelen vannak az osteoblastokon és a mesenchymalis sejteken, amelyeknek szerepük lehet a remodeling során a sejtproliferációban és -differenciációban [27–29]. A GABA-receptorok közvetítésével az osteoblastok kulcsfontosságú differenciációs markerei, mint a csont morfogenetikus protein 2 (BMP2) és az oszteokalcin, egyaránt *fokozott aktivitást mutat*. Azonban az azonosított *GABBR2* gátolja az alkalikusfoszfátáz-aktivitást és a kalciumakkumulációt stromasejtekben [30]. A *GABRB1* pedig pozitívan szabályozza a kondrogenezist. A bemutatott eredmények alapján is látszik, hogy a *GABA-jelátvitel* milyen sok kapcsolódási ponton érinti a csontsejtek működését, amely útvonalat mindkét szer szignifikánsan befolyásolta.

Az imatinibbel kezelt sejtekben a legjelentősebben (-log_p = 2,61E00) a *reelin jelátviteli útvonal* elemeinek génexpressziója változott meg. Ez elsősorban a szinapszisok képződésében és a neurodegenerációban vesz részt. Genomszintű asszociációs vizsgálatok során (GWAS) igazolták, hogy a reelin kódoló *RELN* gén variánsa összefügg egy csontbetegség, az otosclerosis kialakulásával [31]. A Reelin képes a nagyon kis denzitású lipoprotein receptorához kapcsolódni (VLDLR), amely kísérletünkben a top upstream regulátorok között szerepel. Így létrehoz egy szignalizációs komplexet (Reelin/VLDLR/ApoER2/Dab1), amelynek funkciója a csontanyagcsere vonatkozásában még nem tisztázott. Azonban az egyes molekulakomponenseit kódoló gének szignifikánsan megnövekedett kifejeződését tapasztaltuk imatinibkezelést követően.

Az imatinibadagolás szignifikáns változást okozott a *serotoninreceptor jelátviteli útvonalhoz* tartozó gének mRNS-expressziójában. A szerotonin (5-hidroxitriptamin, 5-HT) receptorok számos típusa megtalálható a csontsejtekben, mint az 5-HT1 és 5-HT2 receptorok [32–35]. Vizsgálatunkban azonban a szerotoninreceptorok ettől eltérő, 5-ös csoportjába tartozó 5-HT5A receptort kódoló *HTR5A* gén upregulálódását mértük. Irodalmi adatok alapján a szerotonin szabályozó szerepet tölt be a csontrendszerben. Ha szintézise a periférián történik, akkor hormonnként viselkedik és gátolja a csontépítést. Ezzel szemben, ha a központi idegrendszerben szintetizálódik, akkor neurotranszmitterként viselkedve erős pozitív hatást fejt ki a csonttömegre, elősegíti a csontépítést és visszaszorítja a reszorpciót. A szerotonerg hatás pontos direkt vagy indirekt mechanizmusa a csont metabolikus folyamataiban napjainkig még részleteiben nem felderített.

Nilotinib hatására a legerőteljesebb változást (-log_p = 5,27E00) az *EIF2 jelátviteli útvonal* mutatta. Az EIF2 (eukaryotainiciációs faktor 2) GTP-kötő fehérjeként szabályozza, illetve elindítja a translációt. Nem megfelelő működése megváltoztathatja a sejt fehérjekészletének szintézisét és a sejtek túlélését (<https://reports.ingenuity.com>). Emellett elősegíti az előalakokból történő osteoblast-differenciációt irányító, aktiváló transzkripciós

faktor 4 (AFT4) átíródását [36–38]. A foszforilált eIF2 α és downstream regulátorai részt vesznek az osteoblastok vírusfertőzés vagy tápanyaghiány miatt kialakuló endoplazmás reticulum stresszválaszában, amelyek módosítják a csontátépülés aktivitását [36–38].

A nilotinib hatására megváltozó NANOG homeobox gén az IPA szoftveres analízis alapján több szabályozási útvonal kulcseleme (*Embrionális őssejt-differenciáció szívszejt vonal irányba, Az embrionális őssejtek transzkripciót szabályozó hálózata, Oct4 szerepe az emlős embrionális őssejt pluripotenciában*). A gén a primer csontvelői mesenchymalis őssejtek csontsejt irányú elköteleződését és a csontszöveti regenerációt vezérli. Továbbá összeköttetést biztosít a csont morfogenetikus protein (BMP) kaszkáddal.

Előzetes alapkutatói eredményeink limitációja, hogy csak egy sejt kultúrán végeztük el a tirozinkináz-gátló kezeléseket. További vizsgálatok szükségesek a bemutatott géneexpressziós eredmények és útvonal-analízisek megerősítéséhez, valós idejű RT-PCR alapú validálásához és funkcionális teszteléséhez. A biológiailag is jelentős célmolekulák sejtszintű szabályozómechanizmusainak mélyebb feltérképezéséhez pedig további sejt vonalakon végzett vizsgálatok megvalósítását tervezzük.

Összefoglalásként emondhatjuk, hogy elsőként készítettünk a hazai szakirodalomban hiánypótló, átfogó irodalmi áttekintést a tirozinkináz-gátlók csontanyagcserét befolyásoló hatásaival kapcsolatban, és végeztünk teljes transzkriptomanalízist osteoblast-kultúrán a sejtszintű hatásmechanizmus jobb megértését szolgálva. Az imatinib- és nilotinibkezelések hatására az osteoblast-sejt vonalon tapasztalt géneexpressziós mintázatbeli változások alátámaszthatják a korábbi *in vivo* csontanyagcserét érintő klinikai megfigyeléseket.

Anyagi támogatás: A közlemény megírása, illetve a kutatómunka anyagi támogatásban nem részesült.

Szerzői munkamegosztás: L. P., T. I., K. J. P., N. Zs.: A tanulmány alapjául szolgáló kísérletek megtervezése és koordinálása. L. G., H. P., Á. K., T. B., K. A., K. Gy.: A kísérletekben való részvétel és adatelemzés. K. Gy.: Szakirodalom kutatása, feldolgozása, a kézirat megfogalmazása. L. P., B. B.: A kézirat tartalmának átvizsgálása. A cikk végeleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdeklőségek: A szerzőknek nincsenek érdeklőségeik.

Irodalom

- [1] Cohen, M. H., Moses, M. L., Pazdur, R.: Gleevec™ for the treatment of chronic myelogenous leukemia: U.S. Food and Drug Administration regulatory mechanisms, accelerated approval, and orphan drug status. *Oncologist*, 2002, 7(5), 390–392.
- [2] Jönsson, S., Hjorth-Hansen, H., Olsson, B., et al.: Imatinib inhibits proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes early but not late osteoblast differentiation in vitro. *J. Bone Miner. Metab.*, 2012, 30(1), 119–123.
- [3] Benito, R., Lumbreras, E., Abáigar, M., et al.: Imatinib therapy of chronic myeloid leukemia restores the expression levels of key genes for DNA damage and cell-cycle progression. *Pharmacogenet. Genomics*, 2012, 22(5), 381–388.
- [4] Vandyke, K., Fitter, S., Dewar, A. L., et al.: Dysregulation of bone remodeling by imatinib mesylate. *Blood*, 2010, 115(4), 766–774.
- [5] O'Sullivan, S., Lin, J. M., Watson, M., et al.: The skeletal effects of the tyrosine kinase inhibitor nilotinib. *Bone*, 2011, 49(2), 281–289.
- [6] O'Sullivan, S., Naot, D., Callon, K., et al.: Imatinib promotes osteoblast differentiation by inhibiting PDGFR signaling and inhibits osteoclastogenesis by both direct and stromal cell-dependent mechanisms. *J. Bone Miner. Res.*, 2007, 22(11), 1679–1689.
- [7] Wihlidal, P., Karlic, H., Pfeilstöcker, M., et al.: Imatinib mesylate (IM)-induced growth inhibition is associated with production of spliced osteocalcin – mRNA in cell lines. *Leuk. Res.*, 2008, 32(3), 437–443.
- [8] Tibullo, D., Giallongo, C., La Cava, P., et al.: Effects of imatinib mesylate in osteoblastogenesis. *Exp. Hematol.*, 2009, 37(4), 461–468.
- [9] Fitter, S., Dewar, A. L., Kostakis, P., et al.: Long-term imatinib therapy promotes bone formation in CML patients. *Blood*, 2008, 111(5), 2538–2547.
- [10] Fierro, F., Illmer, T., Jing, D., et al.: Inhibition of platelet-derived growth factor receptor beta by imatinib mesylate suppresses proliferation and alters differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Prolif.*, 2007, 40(3), 355–366.
- [11] Vandyke, K., Fitter, S., Drew, J., et al.: Prospective histomorphometric and DXA evaluation of bone remodeling in imatinib-treated CML patients: Evidence for site-specific skeletal effects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2013, 98(1), 67–76.
- [12] Berman, E., Girotra, M., Cheng, C., et al.: Effect of long term imatinib on bone in adults with chronic myelogenous leukemia and gastrointestinal stromal tumors. *Leuk. Res.*, 2013, 37(7), 790–794.
- [13] Berman, E., Nicolaides, M., Maki, R. G., et al.: Altered bone and mineral metabolism in patients receiving imatinib mesylate. *N. Engl. J. Med.*, 2006, 354(19), 2006–2013.
- [14] Tibullo, D., Barbagallo, I., Giallongo, C., et al.: Effects of second-generation tyrosine kinase inhibitors towards osteogenic differentiation of human mesenchymal cells of healthy donors. *Hematol. Oncol.*, 2012, 30(1), 27–33.
- [15] Jönsson, S., Olsson, B., Ohlsson, C., et al.: Increased cortical bone mineralization in imatinib treated patients with chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*, 2008, 93(7), 1101–1103.
- [16] O'Sullivan, S., Horne, A., Wattie, D., et al.: Decreased bone turnover despite persistent secondary hyperparathyroidism during prolonged treatment with imatinib. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2009, 94(4), 1131–1136.
- [17] Lawrence, L.: Long-term treatment with imatinib affected bone mineral density. *Cancer Network*, 2013.
- [18] Chen, H., Kolman, K., Lanciloti, N., et al.: P53 and MDM2 are involved in the regulation of osteocalcin gene expression. *Exp. Cell Res.*, 2012, 318(8), 867–876.
- [19] Chim, S. M., Qin, A., Tickner, J., et al.: EGFL6 promotes endothelial cell migration and angiogenesis through the activation of extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286(25), 22035–22046.
- [20] Green, J., Nusse, R., van Amerongen, R.: The role of Ryk and Ror receptor tyrosine kinases in Wnt signal transduction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2014, 6(2), a009175.
- [21] Cho, H. Y., Jung, J. Y., Park, H., et al.: In vivo deletion of CAR resulted in high bone mass phenotypes in male mice. *J. Cell. Physiol.*, 2014, 229(5), 561–571.

- [22] *Li, W. F., Hou, S. X., Yu, B., et al.*: Genetics of osteoporosis: perspectives for personalized medicine. *Per. Med.*, 2010, 7(6), 655–668.
- [23] Deleting *Mef2c* in mice increases bone mass. *Bonekey Rep.*, 2012, 1, 61.
- [24] *Lotinun, S., Pearsall, R. S., Horne, W. C., et al.*: Activin receptor signaling: A potential therapeutic target for osteoporosis. *Curr. Mol. Pharmacol.*, 2012, 5(2), 195–204.
- [25] *Bab, I., Smoum, R., Bradshaw, H., et al.*: Skeletal lipidomics: regulation of bone metabolism by fatty acid amide family. *Br. J. Pharmacol.*, 2011, 163(7), 1441–1446.
- [26] *Yang, J. Y., Jung, J. Y., Cho, S. W., et al.*: Chloride intracellular channel 1 regulates osteoblast differentiation. *Bone*, 2009, 45(6), 1175–1185.
- [27] *Muhammad, S. I., Maznah, I., Mahmud, R., et al.*: Upregulation of genes related to bone formation by gamma-amino butyric acid and gamma-oryzanol in germinated brown rice is via the activation of GABA(B)-receptors and reduction of serum IL-6 in rats. *Clin. Interv. Aging*, 2013, 8, 1259–1271.
- [28] *Fujimori, S., Hinoi, E., Yoneda, Y.*: Functional GABA(B) receptors expressed in cultured calvarial osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 293(5), 1445–1452.
- [29] *Takahata, Y., Takarada, T., Hinoi, E., et al.*: Osteoblastic γ -aminobutyric acid, type B receptors negatively regulate osteoblastogenesis toward disturbance of osteoclastogenesis mediated by receptor activator of nuclear factor κ B ligand in mouse bone. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286(38), 32906–32917.
- [30] *Mentink, A., Hulsmans, M., Groen, N., et al.*: Predicting the therapeutic efficacy of MSC in bone tissue engineering using the molecular marker *CADM1*. *Biomaterials*, 2013, 34(19), 4592–4601.
- [31] *Schrauwen, I., Ealy, M., Huentelman, M. J., et al.*: A Genome-wide analysis identifies genetic variants in the *RELN* gene associated with otosclerosis. *Am. J. Hum. Genet.*, 2009, 84(3), 328–338.
- [32] *Westbroek, I., van der Plas, A., de Rooij, K. E., et al.*: Expression of serotonin receptors in bone. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276(31), 28961–28968.
- [33] *Bliziotis, M. M., Eshleman, A. J., Zhang, X. W., et al.*: Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. *Bone*, 2001, 29(5), 477–486.
- [34] *Dai, S. Q., Yu, L. P., Shi, X., et al.*: Serotonin regulates osteoblast proliferation and function in vitro. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2014, 47(9), 759–765.
- [35] *Yadav, V. K., Ducy, P., Karsenty, G.*: Serotonin: a new player in the regulation of bone remodeling. *Medicographia*, 2010, 32(4), 357–363.
- [36] *Saito, A., Ochiai, K., Kondo, S., et al.*: Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2 α -ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *J. Biol. Chem.*, 2011, 286(6), 4809–4818.
- [37] *Hamamura, K., Yokota, H.*: Stress to endoplasmic reticulum of mouse osteoblasts induces apoptosis and transcriptional activation for bone remodeling. *FEBS Lett.*, 2007, 581(9), 1769–1774.
- [38] *Hirasawa, H., Jiang, C., Zhang, P., et al.*: Mechanical stimulation suppresses phosphorylation of eIF2 α and PERK-mediated responses to stress to the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.*, 2010, 584(4), 745–752.

(Kirschner Gyöngyi,
Budapest, Korányi S. u. 2/A, 1083
e-mail: pontlike@gmail.com)

A rendezvények és kongresszusok híryanagának leadása

a lap megjelenése előtt legalább 40 nappal lehetséges, a 6 hetes nyomdai átfutás miatt.
Kérjük megrendelőink szíves megértését.

A híryanagokat a következő címre kérjük:
Orvosi Hetilap titkársága: Budai.Edit@akkr.hu
Akadémiai Kiadó Zrt.