

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A perifériás vér génextpressziós vizsgálata autoimmun betegségek
farmakogenomikájában**

Dr. Meskó Bertalan

Témavezető: Prof. Dr. Nagy László



**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2012

A perifériás vér génexpressziós vizsgálata autoimmun betegségek farmakogenomikájában

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Meskó Bertalan okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Nagy László

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora
Dr. Széll Márta, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2012. november 19.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora
Dr. Joel Dudley, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Ádány Róza, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora
Dr. Joel Dudley, PhD
Prof. Dr. Bodolay Edit, az MTA doktora
Dr. Széll Márta, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2012 november 19.

1 Bevezetés

A jövő orvoslását a személyre szabott orvoslás fogja meghatározni, mely lehetővé teszi, hogy mindenki a saját genomikai hátterének megfelelő kezelést, betegségmegelőzési tanácsokat és diagnosztikát kapjon. A Humán Genom Projekt 2001-2001-es első bejelentése új lehetőségeket nyitott meg, egyben fontos etikai és a privát szférával kapcsolatos kérdéseket is felvetett. Új kihívást jelent ezt a hatalmas információmennyiséget feldolgozni és releváns orvosi válaszokká formálni. A kulcstényező pedig a tudományos eredmények átfordítása a gyógyszer genomika nyelvére.

1.1 Autoimmunitás

A komplex betegségek számára rejt igazán nagy lehetőségeket a személyre szabott medicina, kiváltképp az autoimmune kórképek terén. Vizsgálatainkban ez utóbbi kórképeket vettük górcső alá.

Az autoimmune betegségekben patológiás válasz alakul ki a szervezet saját sejtjei, szövetei vagy szervei ellen betegséghez vezetve, azaz az egészséges immuntolerancia szenved zavart.

1.2 Az autoimmunitás molekuláris háttere

Normális körülmények között, azok a T és B sejtek, melyek saját antigénnel lépnek kapcsolatba, lebontódnak. Ahogy a limfocitákból B sejt lesz a csontvelőben és T sejt a csecsemőmirigyben, ha ezek már találkoztak saját antigénnel, apoptózison mennek keresztül (centrális tolerancia).

Amikor már az érett limfociták találkoznak saját antigénnel anergián vagy deléción mennek keresztül a másodlagos limfoid szervekben (perifériás tolerancia).

Hiba vagy zavar ezek közül bármelyikben vezethet autoimmune reakcióhoz és akár betegséghez.

1.3 Példák autoimmun betegségekre

1.3.1 Rheumatoid arthritis

Az RA egy krónikus, szisztémás autoimmune betegség, mely gyulladást és szövetkárosodást okoz az ízületekben. A biológiai terápiák nagyban javíthatják a tüneteket, ezek általában TNFa gátló kezelések (pl. etanercept, infliximab, adalimumab), de más célpontú antitestek is használatban vannak (pl. az IL6 receptor gátló tocilizumab). Viszont a betegek közel harmada nem válaszol ezekre a terápiákra.

1.3.2 Psoriasis

A psoriasis egy krónikus bőr- és ízületi gyulladás, mely plakkok formájában is megjelenhet a gyulladással területeken. Emellett a könyökön, térdeken, fejbőrön és a genitáliák környékén is.

1.3.4 Gyulladásos bélbetegségek

Az IBD magába foglalja a Crohn betegséget (CD) és ulcerative colitis-t (UC) is, melyek együttesen kb. 1,4 millió embert érintenek az USA-ban és 2,2 milliót Európában. Az emésztőrendszer gyulladását okozzák autoimmune eredettel, a bél minden rétege érintett lehet CD-ben, de UC-ben a mucosa szokott érintve lenni.

1.4 Génexpressziós profilozás

A génexpressziós profilozást egyre gyakrabban alkalmazzák klinikai vizsgálatokban is, ami történhet perifériás vér mononukleáris sejtjeiből (PBMC), teljes vérből, biopsziás mintákból, vagy más mRNS forrásból.

A PBMC kevésbé invazív mintaszervi lehetőséget biztosít a biopsziákhoz képest, de csak a perifériás lenyomatát mutatják egy betegségnek. A PBMC-k CD4+ és CD8+ T-limfocitákból (70% az összes sejtnek), B-limfocitákból (15%), natural killer sejtekből (10%), monocitákból (5%) és dendritikus sejtekből ($\approx 1\%$) állnak.

Alapvetően három módszer áll rendelkezésünkre génexpressziós adatok kinyerésére, az érzékeny real-time kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-QPCR), a globális génexpressziós analízis, mely akár 28 000 probe set elemzését is lehetővé teszi (microarray) és az egyszerre több gént érzékeny módszerrel vizsgáló TaqMan Low Density Array (TLDA) kártyák.

1.5 Autoimmun kórképek génexpressziós elemzése

Nagy számú tanulmányok foglalkoznak autoimmune kórképekkel génexpressziós szemszögből, de ezek nagy része biopsziás mintákat használt (belsőszövetet IBD-ben, bőrmintát psoriasisban, vagy ízületi szövetet RA-ban)

Az már bizonyításra került, hogy a betegségek molekuláris mintázatai mintákon keresztül prominensebbek, mint a szöveti molekuláris mintázatok betegségek között. Azaz van lehetőség a betegség perifériás szignatúráját elemezni PBMC használatával.

2. Célok

Génpanelek meghatározása, melyek autoimmune betegségeket választanak el egészségesektől, vagy biológiai terápiák válaszkészségét prediktálják.

- PBMC génexpressziós mintázatainak azonosítása autoimmune betegségek (RA, psoriasis és IBD) és egészségesek között. (CID vizsgálat)
- Autoimmun betegségek mintázatainak összehasonlítása
- Tocilizumab válaszkészség meghatározása RA-ban PBMC-ből
- Infliximab válaszkészség meghatározása RA-ban és CD-ben PBMC-ből
- Az RA-s és CD-s génpanelek összehasonlítása

3. Módszerek

3.1 Betegcsoportok

A Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának engedélyével folytak a vizsgálatok. Írásbeli nyilatkozatot tett minden mintát adó beteg.

A vérmintákat a klinikusok vették le kaukázusi betegektől reggel 8 és 9 óra között 12 órányi éhezés után, a terápiát vizsgáló tanulmányokban az első és a második kezelés előtt. A beválogatási kritériumokat a klinikusok határozták meg. 13 beteg (9 nő és 4 férfi) került beválogatásra a tocilizumabos vizsgálatban. 40 CD (16 nő és 24 férfi, illetve 34

RA (28 nő és 6 férfi) került beválogatásra az infliximabos tanulmány teszt kohortjában, és további 20 CD és 19 RA beteg a validációs kohortokban.

3.2 PBMC szeparáció

10 ml perifériás vénás vért vettek le a klinikusok EDTA-t tartalmazó csövekbe és másik 10ml-t a szérum kinyerése végett. Ficoll gradiens centrifugálással PBMC-ket szeparáltunk és Trizol segítségével vontuk ki az RNS-t.

3.3 Microarray kísérlet

Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST array-t használtunk a 28869 gén elemzésére. Ambion WT Expression Kit (Life Technologies) és GeneChip WT Terminal Labeling and Control Kit (Affymetrix) került felhasználásra a 250 ng RNS minták sokszorosítására és megjelölésére.

3.4 TaqMan mRNS elemzés RT-QPCR-rel

A CID vizsgálatban 96 előre kiválasztott gén került fel a TLDA kártyákra és relative génexpressziós szinteket számoltunk a komperatív Ct módszerrel GAPDH-ra normalizálva.

A statisztikai elemzést a Graphpad Prism nevű szoftverével végeztük. Mivel mintáink nem követték a normal eloszlást, Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk, 0,05 érték alatt tekintettük a p értéket szignifikánsnak.

3.5 Univariáns adatelemzés

Az infliximabos és tocilizumabos vizsgálatokban a microarray adatokat Genespring GX10 segítségével elemeztük. A szűrési folyamatok között szerepelt az expressziós szint, fold change és statisztikai tesztek szerinti szűrés.

3.6 Multivariáns adatelemzés

3.6.2 Canonical Variates Analysis (CVA)

A CVA mutatja meg legjobban két mintacsoport közötti legnagyobb elválásokat egy változókból álló lista alapján, ez esetben génpanelek alapján..

3.6.3 Linear discriminant analysis (LDA)

Az LDA és CVA azonos vizsgálati módszerek, melyeket abból a célból használtunk, hogy automatikusan azonosíthassuk a válaszadókat és nem-válaszókat elválasztó legerősebb génpaneleket.

3.7 ELISA

Az IL-6, IL-8, IL-12, és IFN γ szérumban lévő szintjeit enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) módszerrel mértük az infliximabos tanulmányban. A tocilizumabos vizsgálat IL-6, IL-1b és IL-8 szintjeit a e-as számú Belklinika laboratóriuma mérte (DEOEC).

3.8 IgG N-glikánok elemzése

Az IgG glikánok elemzését a tocilizumabos vizsgálatban a Horváth Laboratory of Bioseparation Sciences (DEOEC) végezte.

4. Eredmények

4.1 RA, psoriasis és IBD génexpressziós profiljai

Olyan génpaneleket azonosítottunk, melyek elválasztják a 3 kórkép bármelyikét az egészséges kohorttól, egyszerre több betegséget a kohorttól; betegség altípusokat mutatnak ki (arthritis pozitív és negative forma psoriasisban, CD és UC IBD-ben) vagy prognózist határoznak meg (csonterózió RA-ban

4.1.2 A krónikus gyulladás markerei

5 gént találtunk, ADM, AQP9, CXCL2, IL10 és NAMPT, melyek szignifikáns különbséget mutattak mindhárom kórkép génexpressziós profiljai és az egészségesek között.

4.2 Tocilizumab válaszkészség meghatározása perifériás vérből

4.2.1 Globális génexpressziós elemzés és validálás RT-QPCR-rel

13 beteg kezelés előtti és második kezelés előtti mintáinak elemzésével 59 gént határoztunk meg, melyek a kezelés hatását jelezték. Míg 13 beteg kezelés előtti mintáinak elemzése 787 olyan gént eredményezett, melyek a válaszkészséget határozták meg. Ezekből a nemek közötti genetikai különbségek levonásával 686 gén maradt, melyek statisztikai továbbbszűrése 4 gént eredményezett (CCDC32, DHFR, EPHA4 és TRAV8-3). A technikai validálás 3-at ezek közül sikeresen megerősített (CCDC32, EPHA4 és TRAV8-3)

4.2.2 A CVA a legerősebb génpaneleket mutatja ki

9 génpanelt vizsgáltunk meg (köztük a legerősebb génekből álló panel, vagy az IL6 útvonal génjeinek listája), melyek elválasztották a responder és non-responder beteget, ezekből 3 lista mutatott teljes elválást.

4.3 Infliximab válaszkészség meghatározása RA-ban és CD-ben, és az eredmények validálása RT-QPCR-rel

4.3.1 Globális génexpressziós elemzés

A CD minták esetén 48 gén azonosítottunk, melyek a responder státuszt határozták meg, de voltak gének, melyek a második heti kezeléskor is elválást mutattak, mint ABCC4, BMP6 és THEM5. RA-ban 30 gént találtunk ugyanilyen összevetésben.

Az eredményeket független mintaszettben is validáltuk, 4-4 gént találva CD-ben (TMEM176A, TMEM176B, UBE2H és WARS); és RA-ban (CYP4F3, DHRS9, PF4 és MGAM).

4.3.4 Biostatistikai elemzés

A génpanelek manuális kiválasztása és tesztelése helyett egy algoritmust készítettünk, mely automatikusan elemzi és teszteli a legereősebb génpaneleket. Ehhez 40 előszűrt gént használtunk fel CD-ben és 41-et RA-ban. Több ezer génpanelt lehet azonosítani, melyek 100%-os elválást mutatnak a válaszadó és nem válaszadó betegek között, melyek között szignifikancia szerint lehet különbséget tenni. A két kórképben a legjobb 3-3 génpanelt ábráztuk CVA segítségével.

5. Megbeszélés

A génexpressziós profilozás perifériás vérből széleskörűen használt módszer komplex kórképek elemzésére. A módszer egyik korlátját adja, hogy a perifériás vér elemzésével a betegség perifériás mintázatait vizsgáljuk, így elméletileg a betegség eredeti szövetének és a perifériás vér mintázatainak együttes elemzése hozhatná meg a legmegbízhatóbb eredményeket.

5.1 Krónikus gyulladással kórképek génexpressziós elemzése

A betegségek egészséges kohortokkal való összehasonlításakor több olyan gént azonosítottunk, melyek ismertek voltak az irodalomban (PTGS2, CCR1 psoriasisban; ADAM10, PTPN22, IL8 RA-ban; és GZMK, MMP9 és IFNG IBD-ban). A krónikus gyulladás 5 markere fontos része az elemzésünknek, melyek közül az ADM a human bélszövetben is kifejeződik és a sérülések gyógyulásáért is felelős, míg az IL10 ismert psoriasis marker, azaz a gének relevánsak és további vizsgálatuk megalapozott.

5.2 Tocilizumab válaszkészség megítélése

A farmakogenomika felé fordulva, fontos, hogy a kezelésekre nem válaszadó betegek nagy száma miatt, számukra már első választásnál hatékony terápiát válasszunk, mivel a kezelés hatékonysága romlik, ha először sem megfelelő gyógyszert kaptak. Ezért jelentős eredmény a 4 gén azonosítása, melyek már kapcsolatba lettek hozva az RA-val, a DHFR DHFR (dihydrofolate reductase) SNP szinten a methotrexát válaszkészséget határozza meg, a TRAV8-3 pedig T sejt receptor epitóp.

A CVA matematikai módszere bebizonyította, hogy alkalmas génpanelek elemzésére és azok elválasztó erejének bemutatására.

5.3 Infliximab válaszkészség meghatározása CD-ben és RA-ban

Hasonlóan a tocilizumabos vizsgálathoz a klinikai paraméterek önmagukban nem tudták megjósolni a válaszkészséget, így genomikai komponenseket is be kell vonni a predikcióba. Nem volt meglepő, hogy RA-ban az interferonnal kapcsolatban lévő gének lettek szignifikánsak, mint a IFI44, IFI44L, IFIT1, IFIT2 és IRF2, mivel ezek irodalma ismert. A független kohorton való validálás 4-4 olyan gént eredményezett, melyek kevésbé ismertek RA és CD tekintetében, de egyedi gének elválasztó ereje kevés, ezért génpanelek azonosítása érdekében automatikus algoritmust hoztunk létre, mely megtalálta a legnagyobb elválasztó erővel rendelkező listákat.

Az a megfigyelés, hogy ilyen kohortokban több erős génlistát is lehet találni, nem új, Domany tanulmányaiban már volt erre utalás, ezt sikerült most klinikai vizsgálatban bizonyítani. A számos nagy erejű génpanelben játszott szerepük alapján score értékeket rendeltünk minden génhez, melyekből így létrejött a 24 legerősebb gén listája, ezeket érdemes validálni nemzetközi, még nagyobb kohortokon.

6. Következtetés

A génexpressziós elemzés akár microarray, akár RT-QPCR fókuszú, hálózat-központú gondolkodást igényel. A klinikai genomikában az egyedi gének által mutatott statisztikai különbségek kis klinikai alkalmazási erővel bírnak, így olyan génpanelek kutatására érdemes koncentrálni, melyek együttesen eredményezik a legjobb elválasztó beteg és egészséges; válaszadó és nem válaszadó betegek között.

Az új generációs szekvenálás egyértelműen új utakat nyit meg a klinikai genomikában, egyben óriási adatmennyiség elemzését, tárolását is igényelni fogja, emellett az RNAseq jelenthet forradalmi lehetőségeket az autoimmune kórképek elemzésében. Ezek együttesen, egymást kiegészítve teszik majd lehetővé, hogy a lehető legszemélyreszabottabb kezelések, diagnosztikai lehetőségek és ami még fontosabb, a betegségek megelőzését elősegítő megoldásokat alkalmazhassunk a klinikai gyakorlatban.

7. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/296/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Meskó Bertalan

Neptun kód: BOODSE

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Meskó, B.**, Póliska, S., Szamosi, S., Szekanecz, Z., Podani, J., Váradi, C., Guttman, A., Nagy, L.:
Peripheral blood gene expression and IgG glycosylation profiles as markers of tocilizumab
treatment in rheumatoid arthritis.
J. Rheumatol. 39 (5), 916-928, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.110961>
IF:3.695 (2011)
2. **Meskó, B.**, Póliska, S., Nagy, L.: Gene expression profiles in peripheral blood for the diagnosis of
autoimmune diseases.
Trends Mol. Med. 17 (4), 223-233, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2010.12.004>
IF:10.355
3. **Meskó, B.**, Póliska, S., Szegedi, A., Szekanecz, Z., Palatka, K., Papp, M., Nagy, L.: Peripheral blood
gene expression patterns discriminate among chronic inflammatory diseases and healthy
controls and identify novel targets.
BMC Med. Genomics. 3 (1), 15, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1755-8794-3-15>
IF:3.766



4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

7.2 Egyéb közlemények

További Közlemények

4. **Meskó, B.**, Zahuczky, G., Nagy, L.: The triad of success in personalised medicine: Pharmacogenomics, biotechnology and regulatory issues from a Central European perspective. *New Biotechnology*. 29 (6), 741-750, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2012.02.004>
IF:2.756 (2011)
5. Heilman, J.M., Kemmann, E., Bonert, M., Chatterjee, A., Ragar, B., Beards, G.M., Iberri, D.J., Harvey, M., Thomas, B., Stomp, W., Martone, M.F., Lodge, D.J., Vondracek, A., de Wolff, J.F., Liber, C., Grover, S.C., Vickers, T.J., **Meskó, B.**, Laurent, M.R.: Wikipedia as a Key Tool for Global Public Health Promotion. *J. Med. Internet Res.* 13 (1), 1-12, 2011.
IF:4.409
6. Kollár, J., **Meskó, B.**: Revolution in Education: New Possibilities in Education of Medical Students. *Med. Teach.* 33 (8), 685-686, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/0142159X.2011.600102>
7. Pólska, S., Csánky, E., Szántó, A., Szatmári, I., **Meskó, B.**, Széles, L., Dezső, B., Scholtz, B., Podani, J., Kilty, I., Takács, L., Nagy, L.: Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Specific Gene Expression Signatures of Alveolar Macrophages as well as Peripheral Blood Monocytes Overlap and Correlate with Lung Function. *Respiration*. 81 (6), 499-510, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000324297>
IF:2.258
8. Csósz, É., **Meskó, B.**, Fésüs, L.: Transdab wiki: The interactive transglutaminase substrate database on web 2.0 surface. *Amino Acids*. 36 (4), 615-617, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-008-0121-y>
IF:3.877
9. **Meskó B.**, Dubecz A.: Az orvostudomány és a világháló nyújtotta új lehetőségek. *Orv. Hetil.* 148 (44), 2095-2099, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2007.28162>
10. **Meskó B.**: A genetika másfél évszázada. *Orv. Hetil.* 145 (32), 1971-1672, 2004.

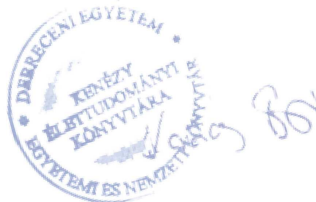


Összesített impakt faktor: 31.116

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 17.816

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.10.10



7.3 Elsőszerzős posztetek

1. Gene expression patterns of chronic inflammatory diseases (European Dermatology Congress, Budapest, 2009)

2. Digital Literacy in Medical Education: An Elective Course (Medicine 2.0 Congress, Maastricht, 2010)

3. Digital Literacy in Medical Education: An Elective Course (Medicine 2.0 Congress, Stanford, 2011)

7.4 Előadások

1) Personalized Genomics; Genomic National Technological Platform Assembly, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary, 2009

2) Personalized Genomics and the Online World, MKBE Pharmacobiochemistry Group, Balatonöszöd, 2010

3) Genomics of Chronic Inflammatory Diseases, MKBE Pharmacobiochemistry Group, Balatonöszöd, 2011

4) Direct-to-Consumer Genomic Tests, Hungarian Congress of Genetics, Siófok, Hungary, 2011

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Prof. Nagy László témavezetőmnek, Prof. Fésüs Lászlónak, és dr. Póliszka Szilárdnak. Emellett Fürtös Ibolyának, a labor munkatársainak és a kollaboráló klinikusoknak.