

**Az imidazo-pirazol származékok, mint originális
gyógyszerjelölt molekulák, akut mieloid leukémia
sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata áramlási
citometriával**

Kotogány Edit

Doktori értekezés tézisei

Témavezető:

Dr. Szabeni Gábor János

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Tudományos főmunkatárs

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont



**HUN
REN**



Szeged

2024

Bevezetés

A mieloproliferatív neopláziák (MPN) és a mielodiszpláziás szindrómák (MDS) a csontvelőben (BM) található vérképző őssejtek betegségei. A betegség során az éretlen sejtek feleslegben termelődnek a szervezetben, amelyek gyakran különböző mieloid leukémiákká fejlődnek. Az akut mieloid leukémiák a mieloid rosszindulatú daganatok heterogén formáinak csoportját képviselik, változatos genetikai eltéréseket mutatnak és a mieloid differenciáció különböző stádiumai jellemzik. Az AML-ek a mieloid őssejtekből vagy a mieloid blasztokból jönnek létre, amelyek a vérképzés során éretlen állapotban maradnak, a csontvelőben a blasztok több mint 20%-ban mutathatóak ki, így gátolják a normál vérsjtek termelődését. Az akut mieloid leukémia a leggyakrabban előforduló leukémia a felnőttek körében és a legrosszabb túlélési aránnyal rendelkezik. Munkám során az akut mieloid leukémia lehetséges terápiás kezelésével foglalkoztunk. Imidazo[1,2-b]pirazol-7-karboxamid vegyületek hatását vizsgáltuk különböző leukémiás sejtvonalakon.

Célkitűzés

1. Ph.D. dolgozatom fő célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk imidazo[1,2-b]pirazol-7-karboxamid származékok citotoxikus és differenciáló hatását különböző leukémiás sejtvonalakon.
2. Munkánk során célul tűztük ki az imidazo[1,2-b]pirazol-7-karboxamid származékok hatásának vizsgálatát a leukémiás sejtek életképességére, IC_{50} -érték meghatározásával különböző sejtvonalakon.
3. További célunk volt megvizsgálni áramlási citometriai mérésekkel, hogy az imidazo[1,2-b]pirazol-7-karboxamidok leukémia ellenes hatása apoptózison vagy nekrozison alapul.
4. Megfigyeltük a leukémiás sejtek homeosztázisának zavarában bekövetkező változásokat.
5. Kísérleteink során célunk volt a vegyület hatására kiváltott differenciáció megfigyelése és annak meghatározása, hogy a differenciáció granulocita vagy monocita irányba vezet-e.

Alkalmazott anyagok és módszerek

- Kísérletünk során az imidazo[1,2-b]pirazol-7-karboxamid vegyületek citotoxikus hatását vizsgáltuk HL-60, THP-1, MOLT-4, MV-4-11, K-562 sejtvonalakon. A sejtek életképességét resazurin életképesség vizsgálattal határoztuk meg.
- Kvantitatív valós-idejű polimer láncreakcióval meghatároztuk a CD33 marker expressziós szintjét és az AP-1 transzkripció faktor komplex tagjainak: JUN, FOS, JUNB, JUND expresszióját.
- Fluoreszcens áramlási citometriai mérésekkel megvizsgáltuk a mitokondriális membránpotenciál változását, a foszfátidil-szerin expozíciót, a sejtciklus-fázisainak eloszlását és a sub-G1 populáció arányát.
- Humán primer AML sejteknél áramlási citometriával vizsgáltuk a vegyület által kiváltott differenciációt és apoptózist.
- Humán primer AML sejteken egysejtes felbontálú tömegcitometriai elemzést (CyTOF) végeztünk, a multiparametrikus immunfenotipizálást 15 fémjelölt antitest keverékével hajtottuk végre.

Eredmények

- A nyolc vizsgált vegyületből hét gátolta mind az öt leukémiás sejtvonal életképességét különböző potenciállal. Kiváló hatékonysággal rendelkezett a DU325 és DU385 vegyület.
- Az Annexin V/propidium-jodidos áramlási citometriai mérések során az apoptótikus populációk arányának növekedését tapasztaltuk, a mérés megerősítette a nekrozis hiányát.
- A DU325 vegyület korai túlélési szignálokat indukált, amelyet igazolt a pERK+, Bcl-xl+, pAkt+ sejtek százalékos arányának növekedése.
- A DU325 a HL-60 sejtek differenciációját indukálta. A mieloid defferenciáció egyik fő szabályozójának a Vav1 fehérjének a felhalmozódását detektáltuk a teljes sejtlizátumban és a sejtmagokban. Az AP-1 TF komplex tagjainak (FOS, JUN, JUNB, JUND) expressziós szintje fokozatosan növekedett a kezelés hatására. A HL-60 sejtek differenciációja során a CD33 korai hematopoetikus őssejt marker expressziója csökkent, a CD11b érett mieloid marker szintje

növekedett. A neutrofil granulocita irányú differenciálódás funkcionális markereként a mieloperoxidáz enzim aktivitásának növekedését mértük.

- A HL-60 sejtek differenciációját apoptotikus sejthalál követte, amit igazolt a mitokondriális membrárpotenciál csökkenése, a hasított kaszpáz-3 aktivációja és a sub-G1-es populáció megjelenése.

- A DU325 vegyület a humán elsődleges AML-sejtek differenciációját és apoptózist indukálta. Az áramlási citometriai mérések során a CD33 pozitív sejtek aránya csökkent, a CD11b pozitív sejtek aránya növekedett. A humán AML-sejtek életképességét akadályozta a vegyület 80,6 nM IC₅₀ értékkel. Az Annexin V/popidium jodidos áramlási citometriai mérés során az apoptotikus sejtek arányának növekedését mértük.

- A humán primer AML sejtek egysejtes felbontású tömegcitometriai (CyTOF) elemzése azt mutatta, hogy a CD7+, CD33+, CD206+ és CD38+ sejtek voltak a legérzékenyebbek a DU325 kezelésre.

- Megállapítottuk, hogy a DU325 a nanomoláris tartományban indukálta az éretlen myeloid HL-60 sejtek differenciálódását és apoptózist, így alkalmas jelölt

gyógyszerfejlesztéshez klinikai mintákban történő további vizsgálatához, annak pontos céljának és hatásmechanizmusának meghatározásához, és preklinikai vizsgálatok kezdeményezésére.

Summary

Myeloproliferative neoplasias (MPN) and myelodysplastic syndromes (MDS) are diseases of hematopoietic stem cells in the bone marrow (BM). During the disease, immature cells are produced in excess in the body, which often develop into various myeloid leukemias. Acute myeloid leukemias represent a group of heterogeneous forms of myeloid malignancies, exhibit diverse genetic variations and are characterized by different stages of myeloid differentiation. AMLs arise from myeloid stem cells or myeloid blasts, which remain in an immature state during hematopoiesis, blasts can be detected in more than 20% of the bone marrow, thus inhibiting the production of normal blood cells. Acute myeloid leukemia is the most common leukemia in adults and has the worst survival rate. During my work, we dealt with the possible therapeutic treatment of acute myeloid leukemia.

During our experiment, we investigated the cytotoxic effect of imidazo[1,2-b]pyrazole-7-carboxamide compounds on HL-60, THP-1, MOLT-4, MV-4-11, K-562 cell lines. Seven of the eight tested compounds inhibited

the viability of all five leukemic cell lines with different potencies. The compounds DU325 and DU385 had excellent efficiency.

During the Annexin V/propidium iodide flow cytometric measurements, we observed an increase in the proportion of apoptotic populations, the measurement confirmed the absence of necrosis.

The compound DU325 induced early survival signals, which was confirmed by the increase in the percentage of pERK+, Bcl-xl+, pAkt+ cells.

DU325 induced the differentiation of HL-60 cells. The accumulation of the Vav1 protein, one of the main regulators of myeloid differentiation, was detected in the whole cell lysate and in the cell nuclei. The expression level of the members of the AP-1 TF complex (FOS, JUN, JUNB, JUND) gradually increased as a result of the treatment. During the differentiation of HL-60 cells, the expression of the early hematopoietic stem cell marker CD33 decreased, and the level of the mature myeloid marker CD11b increased. The increase in myeloperoxidase enzyme activity was measured as a

functional marker of neutrophil granulocytic differentiation.

The differentiation of HL-60 cells was followed by apoptotic cell death, which was confirmed by the reduction of the mitochondrial membrane potential, the activation of cleaved caspase-3 and the appearance of the sub-G1 population.

DU325 induced differentiation and apoptosis of human primary AML cells. During the flow cytometric measurements, the proportion of CD33 positive cells decreased, and the proportion of CD11b positive cells increased. Viability of human AML cells was inhibited by the compound with an IC_{50} value of 80.6 nM. During the Annexin V/popidium iodide flow cytometric measurement, the increase in the proportion of apoptotic cells was measured.

Single-cell resolution mass cytometry (CyTOF) analysis of human primary AML cells showed that CD7+, CD33+, CD206+, and CD38+ cells were the most sensitive to DU325 treatment.

We found that DU325 induced the differentiation and apoptosis of immature myeloid HL-60 cells in the

nanomolar range, making it a suitable candidate for drug development for further testing in clinical samples, for determining its exact target and mechanism of action, and for initiating preclinical studies.

Publikációs lista

MTMT azonosító: **10025075**

Kumulatív impakt faktor: **27,915**

1. A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények:

- 1. Kotogány Edit**, Balog József Á., Nagy Lajos I., Alföldi Róbert, Bertagnolo Valeria, Brugnoli Federica, Demjén András, Kovács Anita K., Batár Péter, Mezei Gabriella, Szabó Renáta, Kanizsai Iván, Varga Csaba, Puskás László G., Szebeni Gábor J.: *Imidazo[1,2-b]pyrazole-7-Carboxamide Derivative Induces Differentiation-Coupled Apoptosis of Immature Myeloid Cells Such as Acute Myeloid Leukemia and Myeloid-Derived Suppressor Cells*, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 21: (14) 5135, **IF (2020): 5.924**
- Gábor J. Szebeni, József A. Balog, András Demjén, Róbert Alföldi, Vanessza L. Végi, Liliána Z. Fehér, Imola Mán, **Edit Kotogány**, Barbara Gubán, Péter Batár, László Hackler Jr., Iván Kanizsai and László G. Puskás *Imidazo[1,2-b]pyrazole-7-carboxamides Induce Apoptosis in Human Leukemia Cells at Nanomolar Concentrations*, Special Issue: "Pyrazole Derivatives" *Molecules* 2018, 23(11), 2845, **Scimago:Q1 (Pharmaceutical Science), IF (2018): 3.06**

2. Egyéb közlemények listája

1. Kiss A. Sándor, Galbács Zoltán Mihály és **Kotogány Edit** (2007). *A különböző deutériumtartalmú közeg (víz) hatása a sejtosztódásra, sejtciklusra, a növekedésre*. Biokémia, XXXI. ÉVF. 2. SZÁM pp. 33-34
2. **Kotogány, E.**, Dudits, D., Horváth, V.G. and Ayaydin F. (2010). *A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine*. 2010;6(1):5. Published 2010 Jan 28. doi:10.1186/1746-4811-6-5, **Scimago:Q1, IF (2010): 2.833**
3. Ábraham E, Miskolczi P, Ayaydin F, Yu P, **Kotogány E**, Bakó L, Ötvös K, Horváth GV, Dudits D *Immunodetection of retinoblastoma-related protein and its phosphorylated form in interphase and mitotic alfalfa cells*. J Exp Bot. 2011;62(6):2155–2168. doi:10.1093/jxb/erq413, **Scimago:Q1, IF (2011):5.242**
4. Alföldi R, Balog JÁ, Faragó N, Halmai M, **Kotogány E**, Neuperger P, Nagy LI, Fehér LZ, Szebeni GJ*, Puskás LG*. *Single Cell Mass Cytometry of Non-Small Cell Lung Cancer Cells Reveals Complexity of In vivo And Three-Dimensional Models over the Petri-dish*. Cells. 2019 Sep 16;8(9). pii: E1093. doi: 10.3390/cells8091093. Special Issue: “Single cell Analysis”, **Scimago:Q1, IF (2018): 5,656**
5. Neuperger Patrícia, Balog József Á., Tiszlavicz László, Furák József, Gémes Nikolett, **Kotogány Edit**, Szalontai

Klára, Puskás László G., Szebeni Gábor J.: *Analysis of the Single-Cell Heterogeneity of Adenocarcinoma Cell Lines and the Investigation of Intratumor Heterogeneity Reveals the Expression of Transmembrane Protein 45A (TMEM45A) in Lung Adenocarcinoma Cancer Patients*, *CANCERS* 14: (1) 144, **IF (2022): 5,2/Q1**

Könyvfejezet:

1. Ayaydin, F., **Kotogány E.**, Ábrahám E and Horváth V.G. (2011). *Synchronization of Medicago sativa Cell Suspension Culture*. *Methods and Protocols* (pp. 227-238). (Methods in Molecular Biology; Vol. 761). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-182-6_15
2. Ayaydin F, **Kotogány E.**, Ábrahám E, Horváth GV. *Detection of Changes in the Medicago sativa Retinoblastoma-Related Protein (MsRBR1) Phosphorylation During Cell Cycle Progression in Synchronized Cell Suspension Culture*. *Methods in Molecular Biology* 2017;1524:267–285. doi:10.1007/978-1-4939-6603-5_17

Konferencia Poszter:

Kotogány E., Kari B., Gémes N., Honfi D., Attila Balog A., Szebeni GJ., *Multiplex immunophenotyping of patients with antiphospholipid syndrome using the Cytek Aurora spectral flow cytometer* 34th Annual conference Of the German Society for Cytometry, Berlin, 2024. szeptember 11-13.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Szebeni Gábor János, mint a jelölt, Kotogány Edit témavezetője kijelentem, hogy a „Az imidazo-pirazol származékok, mint originális gyógyszerjelölt molekulák, akut mieloid leukémia sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata áramlási citometriával” című doktori értekezés a jelölt saját munkája, amelyet témavezetésem mellett önállóan készített el. Kijelentem, hogy a disszertáció megfelel az SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola formai és tartalmi követelményeinek.

.....
Dr. Szebeni Gábor János

Szeged, 2024. 11. 18.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Dr. Szebeni Gábor János, mint a fokozatszerzési eljárás alapjául szolgáló:

Kotogány Edit, Balog József Á., Nagy Lajos I., Alföldi Róbert, Bertagnolo Valeria, Brugnoli Federica, Demjén András, Kovács Anita K., Batár Péter, Mezei Gabriella, Szabó Renáta, Kanizsai Iván, Varga Csaba, Puskás László G., Szebeni Gábor J.: *Imidazo[1,2-b]pyrazole-7-Carboxamide Derivative Induces Differentiation-Coupled Apoptosis of Immature Myeloid Cells Such as Acute Myeloid Leukemia and Myeloid-Derived Suppressor Cells*, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 21: (14) 5135

tudományos közlemény felelős szerkesztője nyilatkozom, hogy a publikációhoz kapcsolódó eredmények elérésében a jelölt, Kotogány Edit nélkülözhetetlen szereppel bírt, továbbá nyilatkozom, hogy a publikációt más fokozatszerzési eljárásban nem használtuk fel és a jövőben sem fogjuk.

.....
Dr. Szebeni Gábor János

Szeged, 2024.11.18.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott Dr. Szbeni Gábor János, Dr. Kanizsai Iván és Dr. Puskás László Géza, mint a fokozatszerzési eljárás alapjául szolgáló:

Gábor J. Szbeni, József A. Balog, András Demjén, Róbert Alföldi, Vanessza L. Végi, Liliána Z. Fehér, Imola Mán, **Edit Kotogány**, Barbara Gubán, Péter Batár, László Hackler Jr., Iván Kanizsai and László G. Puskás *Imidazo[1,2-b]pyrazole-7-carboxamides Induce Apoptosis in Human Leukemia Cells at Nanomolar Concentrations*, Special Issue: "Pyrazole Derivatives" *Molecules* 2018, 23(11), 2845

tudományos közlemény felelős szerkesztője nyilatkozom, hogy a publikációhoz kapcsolódó eredmények elérésében a jelölt, Kotogány Edit nélkülözhetetlen szereppel bírt, továbbá nyilatkozom, hogy a publikációt más fokozatszerzési eljárásban nem használtuk fel és a jövőben sem fogjuk.

.....
Dr. Puskás László Géza

.....
Dr. Szbeni Gábor János

.....
Dr. Kanizsai Iván

Szeged, 2024.11.18.