

7. marec
Deň výskumu
rakoviny



SÚŤAŽ MLADÝCH ONKOLÓGOV 2022

ZBORNÍK PREDNÁŠOK

Nadácia Výskum Rakoviny

Ústav experimentálnej onkológie,
Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v.v.i.

7. - 8. MAREC 2022

Zborník tvoria rozšírené abstrakty a abstrakty prác prezentovaných na Súťaži mladých onkológov 2022. Súťaž organizovala Nadácia Výskum Rakoviny v spolupráci s Ústavom experimentálnej onkológie BMC SAV, v.v.i. pri príležitosti Dňa výskumu rakoviny, konaného šestnásťkrát a po prvýkrát, z dôvodu protipandemických opatrení, vo formáte online.

Názov: Zborník prednášok zo Súťaže mladých onkológov

Autori:

Altaner Čestmír, Andrea Leškaničová, Angelioudaki Ioanna, Babál Pavel, Babinčák Marián, Bánová Radivojka, Barreto Emma, Bella Vladimír, Belyaev Igor, Benetinová Zuzana, Bérešová Katarína, Bilá Dominika, Bizík Jozef, Blažíčková Michaela, Blichárová Alžbeta, Boháč Martin, Bul'ková Viktória, Buociková Verona, Buríková Monika, Caniego-Casas Tamara, Carrato Alfredo, Cihová Marína, Cortés Alfonso, Cortés Javier, Curigliano Giuseppe, Čierna Zuzana, Čierniková Sona, Danišovič Ľuboš, Demková Lucia, Dolinská Zuzana, Durdík Matúš, Earl Julie, Fedoročko Peter, Fekete Marta, Fridrichová Ivana, Frutos Díaz-Alejo Jesús, Furdová Alena, Gergely Lajos, Gión María, Goliaš Tereza, González-Martínez Silvia, Grossmannová Katarína, Gulati Sachin, Horvathová Kajabová Viera, Chovanec Michal, Jakl Lukáš, Jakubechová Jana, Jendželovská Zuzana, Jendželovský Rastislav, Kajo Karol, Kaľavská Katarína, Kalinková Lenka, Katakí Agapi, Kisková Terézia, Klepanec Andrej, Klimová Daniela, Kocianová Eva, Kochanová Dominika, Koniaris Eythimios, Konstadoulakis MM, Kosnacová Helena, Košík Pavol, Košúth Ján, Kozics Katarína, Kučerová Lucia, Leškaničová Andrea, Luis Rodríguez-Peralto José, Majerník Martin, Marková Eva, Martin Kertys, Mego Michal, Migoyo Candela, Miklíková Svetlana, Minarik Gabriel, Mitrousias Alexandros, Mochnacký Filip, Mosná Kristína, Natália Agyagosová, Nikolaieva Nataliia, Palacios José, Panigaj Martin, Patrik Šimko, Pérez-Mies Belén, Pizarro David, Plavá Jana, Pobjaková Margita, Priščáková Petra, Radenkovic Silvia, Repiská Vanda, Režuchová Ingeborg, Rojíková Lucia, Roudnický Pavel, Smolková Božena, Stoupis Loukas, Šalát Dušan, Šimko Patrik, Šišovský Vladimír, Škorvaga Milan, Šofranková Lucia, Švastová Eliška, Terézia Kisková, Trnková Lenka, Tzingounis Alexandros-George, Udvorková Natália, Urbanová Mária, Vargová Jana, Verbóová Ľudmila, Vigašová Katarína, Závacká Ingrid, Zdráhal Zbyněk,

Vydavateľ: Nadácia Výskum Rakoviny
Karloveská 6C
841 04 Bratislava

www.nvr.sk

Zostavili: RNDr. Ján Sedlák, DrSc., RNDr. Soňa Čierniková, PhD., RNDr.
Margita Klobušická, CSc.

Recenzenti: RNDr. Soňa Čierniková, PhD., RNDr. Margita Klobušická, CSc., RNDr.
Ján Sedlák, DrSc., Ing. Jela Brozmanová, DrSc.

Fotografie: Mgr. Gabriela Pavlíková, PhD.

Tlač:

© Nadácia Výskum Rakoviny,
Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v.v.i.
Bratislava 2022

ISBN 978-80-971621-3-9

OBSAH

<i>Candela Migoyo, Emma Barreto, Julie Earl, Alfredo Carrato</i> USING VARSOME CLINICAL AS A TOOL FOR NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) STUDIES OF FAMILIAL PANCREATIC CANCER PATIENTS	1
<i>Ioanna Angelioudaki, Eythimios Koniaris, Agapi Kataki, Loukas Stoupis, Alexandros Mitrousias, Alexandros-George Tzingounis, MM Konstadoulakis</i> AUTOPHAGY-RELATED LC3B PROTEIN IS HIGHLY EXPRESSED IN PANNENS	6
<i>Emma Barreto, Julie Earl, Alfredo Carrato</i> FAMILIAL PANCREATIC CANCER CASES HAVE A DIFFERENT MUTATION PROFILE COMPARED TO SPORADIC CASES WITH POTENTIALLY TARGETABLE MUTATIONS	11
<i>Dominika Bilá, Martin Panigaj, Zuzana Jendželovská, Peter Fedoročko</i> HYBRIDNÉ RNA-DNA NANOČASTICE AKO ONKOTERAPEUTICKÝ NÁSTROJ	16
<i>Michaela Blažíčková, Katarína Kozics</i> CITLIVOSŤ NÁDOROVÝCH BUNIEK KOLOREKTÁLNEHO KARCINÓMU VOČI NOVOSYNTETIZOVANÝM DERIVÁTOM TYMOLU	21
<i>Viktória Buľková, Jana Vargová, Rastislav Jendželovský, Marián Babinčák, Pavel Roudnický, Zbyněk Zdráhal, Peter Fedoročko</i> NOVÉ POZNATKY O ÚLOHE NEFOTOAKTIVOVANÉHO HYPERICÍNU, SEKUNDÁRNEHO METABOLITU ĽUBOVNÍKA BODKOVANÉHO, V MODULÁCII REZISTENTNÉHO FENOTYPU BOČNEJ POPULÁCIE ZA HYPOXICKÝCH PODMIENOK	26
<i>Jesús Frutos Díaz-Alejo, Julie Earl</i> ESTABLISHING IN VITRO TUMOR MODELS FROM PRIMARY TISSUE FOR TRANSLATIONAL RESEARCH IN ONCOLOGY	31
<i>Silvia González-Martínez, David Pizarro, Belén Pérez-Mies, Tamara Caniego-Casas, José Luis Rodríguez-Peralto, Giuseppe Curigliano, Alfonso Cortés, María Gión, Javier Cortés, José Palacios</i> DIFFERENCES IN THE MOLECULAR PROFILE BETWEEN PRIMARY BREAST CARCINOMAS AND THEIR CUTANEOUS METASTASES	33
<i>Jana Jakubechová, Lucia Demková, Božena Smolková, Alena Furdová, Čestmír Altaner</i> ŠTÚDIUM VYUŽITIA EXOZÓMOV VYLUČOVANÝCH BUNKAMI UVEÁLNEHO MELANÓMU NA CIELENÚ INHIBÍCIU RASTU ICH METASTÁZ CESTOU GÉNOVEJ TERAPIE	40
<i>Daniela Klimová, Čestmír Altaner, Vanda Repiská</i> INKORPORÁCIA CHEMOTERAPEUTÍK DO EXTRACELULÁRNYCH VEZIKÚL MEZENCHYMÁLNYCH KMEŇOVÝCH/STROMÁLNYCH BUNIEK	45
<i>Eva Kocianová, Radivojka Bánová, Silvia Radenkovic, Katarína Grossmannová, Ingeborg Režuchová, Katarína Kaľavská, Tereza Goliaš</i> METABOLIZMUS NÁDOROVÝCH BUNIEK NTERA-2 MÔŽE SÚVISIEŤ S ICH REZISTENCIOU NA CISPLATINU	50

<i>Dominika Kochanová, Sachin Gulati, Pavol Košík, Matúš Durdík, Lukáš Jakl, Milan Škorvaga, Katarína Bérešová, Eva Marková, Dušan Šalát, Andrej Klepanec, Igor Belyaev</i> SLEDOVANIE VPLYVU NÍZKYCH DÁVOK IONIZUJÚCEHO ŽIARENIA NA GÉNOVÚ NESTABILITU U INTERVENČNÝCH RÁDIOLOGOV NA SLOVENSKU	55
<i>Leškaničová Andrea, Šimko Patrik, Agyagosová Natália, Kertys Martin, Kisková Terézia</i> METABOLOMIKA: SĽUBNÝ NÁSTROJ VČASNEJ DIAGNOSTIKY NÁDOROVÝCH OCHORENÍ MOZGU	61
<i>Loukas Stoupis, Eythimios Koniaris, Agapi Katakí, Ioanna Angelioudaki, Alexandros Mitrousias, Alexandros-George Tzingounis, MM Konstadoulakis</i> DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CAVEOLIN-1 IN PANCREATIC LESIONS	66
<i>Patrik Šimko, Andrea Leškaničová, Filip Mochňacký, Zuzana Jendželovská, Ľudmila Verbóová, Zuzana Benetinová, Rastislav Jendželovský, Alžbeta Blichárová, Terézia Kisková</i> ÚČINKY KYSELINY GYROFOROVEJ NA NÁDORY MOZGU	71
<i>Lucia Šofranková</i> HETEROCYKLICKÉ ZLÚČENINY SYNTETICKÉHO PÔVODU AKO NÁSTROJ PRI LIEČBE NÁDOROVÝCH OCHORENÍ	76
<i>Lenka Trnková, Svetlana Miklíková, Jana Plavá, Lucia Rojíková, Marína Cihová</i> ORGANOIDY KARCINÓMU PRSNÍKA A ICH POTENCIÁL V PERSONALIZOVANEJ MEDICÍNE	81
<i>Natália Udovorková, Silvia Schmidtová, Michal Mego, Michal Chovanec, Katarína Kaľavská</i> ANALÝZA EXPRESIE KARBONICKEJ ANHYDRÁZY CA IX V BUNKOVÝCH MODELOCH EMBRYONÁLNEHO KARCINÓMU	85
<i>Mária Urbanová, Verona Buociková, Eliška Švastová, Jozef Bizík, Soňa Čierniková, Božena Smolková</i> EPIGENETICKÉ LIEČIVO DECITABÍN EFEKTÍVNE REAKTIVUJE METYLAČNE-UTLMENÉ GÉNY U BUNKOVÝCH LÍNIÍ DUKTÁLNEHO ADENOKARCINÓMU PANKREASU	90
<i>Katarína Vigašová, Matúš Durdík, Sachin Gulati, Pavol Košík, Lukáš Jakl, Katarína Bérešová, Marta Fekete, Ingrid Závacká, Margita Pobijaková, Zuzana Dolinská, Eva Marková, Igor Belyaev</i> VALIDÁCIA MARKEROV DNA POŠKODENIA V IDENTIFIKÁCII RÁDIOSENZITÍVNYCH PACIENTIEK S RAKOVINOU PRSNÍKA	95
<i>Lenka, Nataliia Nikolaieva, Božena Smolková, Sona Čierniková, Karol Kajo, Vladimír Bella, Viera Horvathová Kajabová, Helena Kosnacová, Gabriel Minarik, Ivana Fridrichová</i> DOWNREGULÁCIA MIR-205-5P A UPREGULÁCIA ZEB1 AKO CHARAKTERISTIKA DISEMINÁCIE NÁDOROVÝCH BUNIEK U PACIENTOV S INVAZÍVNÝM DUKTÁLNYM KARCINÓMOM PRSNÍKA	100

<i>Lajos Gergely, Vanda Repiská, Vladimír Šišovský, Kristína Mosná, Petra Priščáková</i> PTEN GENE MUTATIONS IN UTERINE SEROUS CARCINOMA AND THEIR RELEVANCE IN PERSONALISED CANCER TREATMENT	107
<i>Marián BABINČÁK, Rastislav JENDŽELOVSKÝ, Ján KOŠUTH, Martin MAJERNÍK, Jana VARGOVÁ, Peter FEDOROČKO</i> SKYRÍN – OD MALEJ BIOMOLEKULY PO ZVRÁTENIE REZISTENCIE NA TRAIL V HYPOXII	109
<i>Jana Plavá, Monika Buríková, Marína Cihová, Lenka Trnková, Pavel Babál, Martin , Ľuboš Danišovič, Lucia Kučerová, Svetlana Miklíková</i> CHEMOTERAPIOU VYVOLANÉ ZMENY V NÁDOROVOM MIKROPROSTREDÍ ZVYŠUJÚ IVAZIVITU A METASTÁZOVANIE BUNIEK KARCINÓMU PRSNÍKA	110
<i>Silvia Schmidtová, Katarína Kaľavská, Natália Udvorková, Zuzana Čierna, Michal Chovanec, Lucia Kučerová, Michal Mego</i> IDENTIFIKÁCIA POTENCIÁLNYCH PROGNOTICKÝCH A TERAPEUTICKÝCH CIEĽOV U REFRAKTÉRNYCH TESTIKULÁRNYCH NÁDOROV Z GERMINATÍVNYCH BUNIEK	112

Členovia hodnotiacej komisie

RNDr. Soňa Čierniková, PhD., Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i.; členka Správnej rady Nadácie Výskum Rakoviny – predsedníčka hodnotiacej komisie

RNDr. Alena Gábelová, CSc., Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i.; koordinátorka projektu VISION

prof. RNDr. Erika Halašová, PhD., riaditeľka Martinského centra pre biomedicínu, JLF UK v Martine

doc. MUDr. Michal Chovanec, PhD., II. onkologická klinika LF UK a NOÚ, Národný onkologický ústav v Bratislave

Mgr. Miroslav Chovanec, PhD., riaditeľ Ústavu experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i.

doc. RNDr. Rastislav Jendželovský, PhD., Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach

doc. RNDr. Monika Kassayová, CSc., Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach

Mgr. Gabriela Pavlíková, PhD., Laboratórium klinickej a molekulovej genetiky, Detská klinika LFUK a NÚDCH v Bratislave; členka Správnej rady Nadácie Výskum Rakoviny

MUDr. Mária Rečková, PhD., riaditeľka Národného onkologického inštitútu

prof. RNDr. Ivan Varga, PhD., prodekan pre vedu, výskum, grantovú problematiku, doktorandské štúdium, ŠVOČ a pre zahraničné vzťahy, LF UK v Bratislave

Vítazi jednotlivých kategórií

Kategória Študent vysokej školy

1. miesto: Lajos Gergely

Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LFUK a UN, Bratislava

2. miesto: Candela Migoyo

Molecular Epidemiology and Predictive Tumor Markers Group, Ramón y Cajal Health Research Institute (IRYCIS), Madrid, Spain.

Kategória Študent vysokej školy - doktorand

1. miesto: Mgr. Mária Urbanová

Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v.v.i., Bratislava

2. miesto: Mgr. Eva Kocianová

Virologický ústav, BMC SAV, v.v.i., Bratislava

2. miesto: Mgr. Lenka Trnková

Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v.v.i., Bratislava

3. miesto: Mgr. Natália Udovorková

Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v.v.i., Bratislava

Kategória Mladý výskumník do 35 rokov s ukončeným PhD. štúdiom

1. miesto: Mgr. Jana Plavá, PhD.

Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v.v.i., Bratislava

2. miesto: Ing. Silvia Schmidtová, PhD.

Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v.v.i., Bratislava
Jednotka translačného výskumu LFUK a NOÚ, Bratislava

3. miesto: RNDr. Marián Babinčák, PhD.

Katedra bunkovej biológie
Prírodovedecká fakulta Univerzity P. J. Šafárika, Košice

3. miesto: Mgr. Nataliia Nikolaieva, PhD.

Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v.v.i., Bratislava

Vyhlasenie **vít'azov** Súťaže mladých onkológov 2022 sa uskutočnilo v stredu 20.apríla 2022 v priestoroch Vedeckého parku Univerzity Komenského v Bratislave.

Using Varsome Clinical as a tool for Next Generation Sequencing (NGS) studies of familial pancreatic cancer patients



Candela Migoyo¹, Emma Barreto^{1,2}, Julie Earl^{1,2}, Alfredo Carrato^{2,3}

¹*Molecular Epidemiology and Predictive Tumor Markers Group, Ramón y Cajal Health Research Institute (IRYCIS), Carretera Colmenar Km 9,100. 28034. Madrid, Spain*

²*Biomedical Research Network in Cancer (CIBERONC), C/ Monforte de Lemos 3-5. Pabellón 11, 28029 Madrid, Spain*

³*Alcalá University, Madrid, Spain*

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common form of pancreatic cancer, it has a bad prognosis, a high capacity for dissemination and resistance to many antineoplastic therapies. According to GLOBOCAN data, in 2020, 495,773 new cases were diagnosed worldwide, and 466,003 deaths from the disease were recorded, demonstrating that the incidence and mortality rates are almost similar [1].

In addition, it is a type of cancer with an overall 5-year survival of around 7.2% [2]. The only possibility of total cure for patients is surgery [3], but the absence of symptoms leads to late diagnosis, which means that most patients cannot take advantage of this option. When the disease is detected, it is at advanced stages. For that reason, research into new treatments, prevention and early detection is essential for a good prognosis of these patients [4].

Family history is also an important risk factor and approximately 10% of PDAC cases have a hereditary or familial basis. Familial pancreatic cancer (FPC) is a hereditary syndrome that affects families with higher incidence of pancreatic cancer among the relatives, with an unknown genetic cause for the majority of these families [4].

Hereditary pancreatic cancer is associated with other hereditary syndromes that present alterations in genes related to the ones involved in pancreatic cancer. Such as hereditary breast–ovarian cancer (HBOC), Peutz–Jeghers (PJ), Hereditary Pancreatitis (HP), Familial Atypical Multiple Mole Melanoma (FAMMM), and Lynch syndrome [4]. Some of these genes involved in the disease have been studied, but not all the families fit in these criteria, so they could benefit from specific screening programs for this disease. Further research is needed in this area, as some healthy relatives of FPC families carry unknown inherited germline mutations that enhance their risk of developing pancreatic lesions [5].

The Spanish national registry of families with pancreatic cancer called PanGenFam, was created to collect these families, as their members have higher risk of developing pancreatic cancer than the general population, and this registry allows us to study their phenotype and genotype in order to look for the cause of the disease [5].

PanGenFam collects patients with at least two prior histories of pancreatic cancer or with a history of pancreatic cancer and another type of cancer, including those mentioned above (FAMMM, HBOC, Lynch syndrome and Peutz-Jeghers syndrome) [4].

Therefore, our objective was to identify potentially pathogenic genetic variants using NGS technologies carried by FPC patients that could be associated with the disease.

Material and methods

Using leukocytes from FPC, sporadic PDAC and high-risk patients, we isolated genomic DNA and looked for variants that could be related to the disease using panel sequencing. We selected a cohort of 16 patients, of whom 9 met the criteria of FPC syndrome, 1 had HBOC and 6 were classified as sporadic PDAC cases.

Panel sequencing was performed using the Sureselect technology (Agilent), and the panel used was composed of 66 genes involved in carcinogenesis and familial cancer (Table 1).

Table 1. Panel of 66 genes involved in carcinogenesis and familial cancer used in 16 patients selected to identify germline variants.

APC	ATM	BMPRI1A	BRCA1	BRCA2	CDH1	CDKN2A	CHEK2	EPCAM	MLH1
MSH2	MSH6	MUTYH	PALB2	PMS2	PTEN	SMAD4	STK11	TP53	VHL
PRSS1	TERT	CFTR	TET2 9	DNMT3A	POLN 6	POLQ 6	ASXL1 5	FANCM3	FAM175A
FANCG4	BUB1B3	ESCO2 3	FANCC3	MSH4 3	RAD54L	BARD1	BRIP1	CDK4	FH
KIF1B	MET	MLH3	MSH3	NBN	PIK3CA	POLE	POT1	RAD51D	RB1
MAX	MEN1	MRE11A	NF1	NTHL1	POLD1	RAD50	RAD51C	RET	SDHA
SDHAF2	XRCC2	SDHB	SDHC	SDHD	TMEM127				

This panel provides information of the 66 genes selected for each patient, and then this data was filtered to obtain only the variants of interested.

The tertiary analysis of data was performed using the Varsome clinical platform, and the variants were filtered according to our criteria: variants with a predicted pathogenic, likely pathogenic or uncertain significance effect, heterozygote variants with a frequency less than 0.01, variants that affect coding and splicing regions and with a frameshift, missense, nonsense, stoploss, exon deletion, start lose or splice junction loss coding impact. Variants of interest were validated by Sanger sequencing.

Results

Among the 16 patients, we found interesting variants according to our criteria in 7 of them (43,75%). 9 FPC cases (56,25%) were negative for the panel, as variants that met our criteria were not found. Among the 7 patients positives for panel, 88,89% were variants of unknown significance (VUS) and only 11,11% had a likely pathogenic predicted effect (Figure 1).

FPC patients carried variants in genes such as *MLH1*, *MUTYH* or *MSH2*. As for the sporadic cases the affected genes were *TERT*, *CDKN2A*, *ATM* and *POT1*. Currently, we are carrying out the validation of variants by Sanger sequencing.

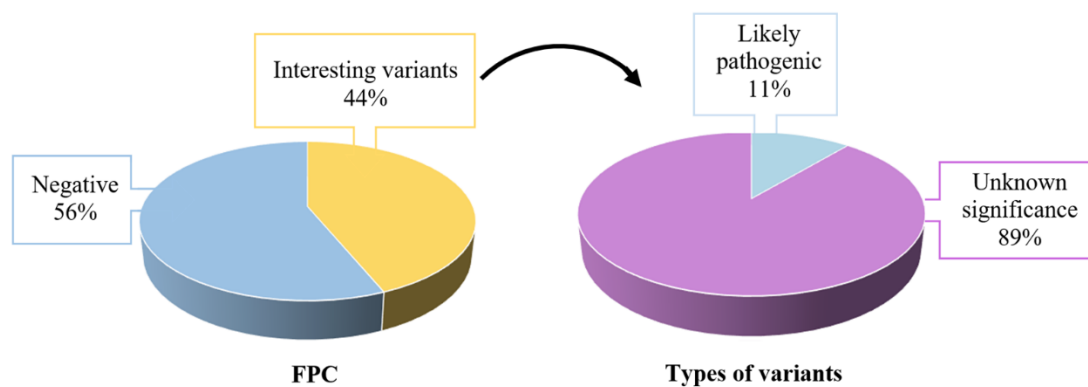


Figure 1. Distribution of variants found in the 16 patients.

Discussion

As expected, most of the FPC patients were negative for the panel, Takai et al.(2016) suggested that this could be because there are different variants in other genes than the ones involved in the sporadic cases, which allows FPC to form a subgroup of patients [6]. In particular, FPC patients carried variants in genes such as *MLH1*, *MUTYH* or *MSH2*, which are genes involved in the DNA error repair process [7].

FPC patients that were negative for the panel sequencing are candidates for exome sequencing. Réda et al. (2020) indicated that whole exome sequencing is feasible in order to search for uncommon variants in other genes that have not been selected for the panel as suggest [8].

Regarding Varsome Clinical as the tool that was used for our analysis, Herreros-Villanueva et al. (2022) corroborated that this platform allows a fast and accurate variant discovery, annotation, and interpretation of NGS data for whole genomes, exomes, and gene panels, and it has already been used in other projects to search for pathogenic and unknown clinical significance variants in cancer patients [9]. This platform also offers the possibility to view many relevant information about variants of interest, such as variant frequency, associated diseases, clinical trials, therapeutic targets, transcript

information and information about the affected gene. That is why we consider Varsome Clinical as a very powerful source of information for NGS analysis.

Conclusions

Varsome Clinical is an easy-to-use platform for NGS data analysis with multiple possibilities and a powerful source of information about the variants of interest for the researcher. Using specific criteria and filters, this software allows us to filter the data efficiently and obtain very complete results.

The genetic basis of FPC can be explained in some cases by previously described genes such as mismatch repair (MMR) genes, but there are many cases that are still undetermined. Thus, further research in larger cohorts of patients is needed to determine the effect of VUS found in this study.

References

- [1] World Health Organization. Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) 2020. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/13-Pancreas-fact-sheet.pdf>. (Accessed: 20th April 2022).
- [2] Hidalgo M, Álvarez R, Gallego J, Guillén-Ponce C, Laquente B et al. Consensus guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of patients with pancreatic cancer in Spain. *Clinical and Translational Oncology* 2017; 19(6): 667-681.
- [3] Carmicheal J, Patel A, Dalal V, Atri P, Dhaliwal AS et al. Elevating pancreatic cystic lesion stratification: Current and future pancreatic cancer biomarker(s). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 2020; 1873(1): 188318.
- [4] Earl J, Barreto E, Castillo ME, Fuentes R, Rodríguez-Garrote M et al. Somatic Mutation Profiling in the Liquid Biopsy and Clinical Analysis of Hereditary and Familial Pancreatic Cancer Cases Reveals KRAS Negativity and a Longer Overall Survival. *Cancers* (2021); 13 (7): 1612.
- [5] Mocci E, Guillén-Ponce C, Earl J, Márquez M, Solera J et al. PanGen-Fam: Spanish registry of hereditary pancreatic cancer. *European Journal of Cancer* 2015; 51 (14): 1911-1917.
- [6] Takai E, Yachida S, Shimizu K, Furuse J, Kubo E et al. Germline mutations in Japanese familial pancreatic cancer patients. *Oncotarget* 2016; 7(45): 74227.
- [7] Perkhof L, Golan T, Cuyle PJ, Matysiak-Budnik T, Van Laethem JL et al. Targeting DNA Damage Repair Mechanisms in Pancreas Cancer. *Cancers* 2021; 13(17): 4259.
- [8] Réda M, Richard C, Bertaut A, Niogret J, Collot T et al. Implementation and use of whole exome sequencing for metastatic solid cancer. *EBioMedicine* 2020; 51: 102624.

- [9] Herreros-Villanueva M, Bujanda L, Ruiz-Rebollo L, Torremocha R, Ramos R et al. Circulating Tumor DNA Tracking In Patients With Pancreatic Cancer Using Next-Generation Sequencing. *Gastroenterología y Hepatología* 2022.

Acknowledgements

I would like to thank my tutor Emma Barreto and Dr. Julie Earl for trusting me and giving me the opportunity to participate in this project, and also to my team for the support.

As well, thanks to our collaborators in this project, the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), the European Development Regional Fund (ERDF), the Biomedical Research Network in Cancer (CIBERONC), La Asociación Española contra el Cáncer (AECC), the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme, and VISION for giving us the opportunity to participate in such important experience for young researchers.

Autophagy-related LC3B protein is highly expressed in panNENs



Ioanna Angelioudaki¹, Eythimios Koniaris²,
Agapi Kataki³, Loukas Stoupis¹, Alexandros
Mitrousias¹, Alexandros-George Tzingounis¹,
MM Konstadoulakis¹

¹*Second Department of Surgery, Aretaieion Hospital,
Medical School, NKUA, Greece*

²*Department of Pathology-Anatomy, Hippocraton General
Hospital of Athens, Greece*

³*First Department of Propaedeutic Surgery, "Hippokratio"
General Hospital, Athens, Greece*

Introduction

Different cell populations in the pancreas can give rise to different pancreatic neoplasms. The most common form of pancreatic cancer is pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) with an incidence rate over 90%, whereas pancreatic neuroendocrine neoplasms (panNENs) are far less common accounting for less than 5% [1]. PanNENs represent a heterogeneous group of tumors consisting primarily of Pancreatic Neuroendocrine Tumors (pNETs) and pancreatic Neuroendocrine Carcinomas (pNECs). These distinct pancreatic neoplasms are classified, based on their differentiation, grade, mitotic rate, and Ki-67 index status and according to the latest 2019 WHO definitions pNETs are well differentiated, pNECs are poorly differentiated whereas, PDAC can be either well-, moderately, or poorly differentiated [2].

Contrary to pNETs which are mostly benign with a 5-year overall survival rates of 85.4%, the more aggressive pNECs and PDAC display a median overall survival of just 7.5 months which is mainly due to the absence of specific symptoms, late diagnosis, rapid progression of the disease and resistance to conventional chemotherapeutic regimens [1]. Accumulating evidence suggests that the tumor microenvironment represents a critical factor in the progression of panNENs and understanding the apparently complex interactions taking place among the cellular components of the microenvironment of these tumors, is a crucial to improve therapy [3].

Autophagy flux in cancer has attracted a lot of interest in recent years and has been described as a double-edged sword, displaying both tumor progressive and tumor suppressive functions depending on tissue and the cancer type. Current data support activation of the autophagy flux in pancreatic cancer cells and although molecular pathways upstream of autophagy have been found dysregulated in pNETs, its role is still under investigation [4]. Various molecular targets participating in the initiation,

nucleation, elongation, or fusion of the autophagosome with the lysosome can be used to study autophagy. LC3B protein being part of the elongation of the dynamic membrane structure of the autophagosome, is the most characteristic and widely utilized autophagy marker [5]. In the herein presented study LC3B expression profile was investigated in pancreatic neuroendocrine neoplasms (panNENs) in comparison with pancreatic adenocarcinoma lesions (PDAC).

Materials and Methods

Patients and tissues. Study was approved by the scientific committee of General Hospital of Athens ‘Hippocraton’. Patients were initially enrolled based on their pathological report following surgical excision but for data analysis, panNEN cases were reevaluated according to the latest 2019 WHO definition. Finally, the cohort of patients consisted of 10 patients with pNEC, 16 patients with pNET and 41 patients with PDAC. Demographic and clinical data were collected from the patients' medical files and are presented in Table 1.

Table 1. Patients’ demographic and clinical characteristics.

Type of Pancreatic Cancer	Number of samples	Mean Age	Sex		Grade			Adipose infiltration	Necrosis	Lymph node metastasis	Inflammation
			male	female	I	II	III				
PDAC	41	65.85± 1.7	29	12	1	16	24	40	14	26	39
PNECs	10	62.7 ± 3.1	6	4	0	0	10	9	3	4	6
PNETs	16	57.13± 3.8	12	4	10	6	0	10	3	5	5

Immunohistochemical detection of LC3B. Immunohistochemistry was performed using 5µm sections of formalin fixed paraffin embedded tissues. Briefly, sections were deparaffinized in xylol, rehydrated in a graded ethanol series, and then subjected to microwave antigen retrieval [2x10 min, 800 w, 10 mM citrate buffer, pH 6.0] Endogenous peroxidase activity was blocked using 0.3% hydrogen peroxide. Sections were incubated at 4°C overnight with LC3B primary antibody (1/400, NB-100–2220, Novus Biologicals, USA). The detection was performed according to the ChemMateEnVision system (DAKO EnVision Detection Systems, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse) protocol. Sections were then counterstained with Mayer hematoxylin, dehydrated, cleared mounted using toluene-free mounting medium (Dako CS705) and observed by means of light Microscopy.

Pancreatic lesions and normal adjacent (NA) tissue were evaluated separately, and staining intensity scores were calculated by multiplying intensity (negative to high: 0-3) with the immunoreactive score: 0-10%=1, 11-50%=2, 51-80%=3, 81-100%=4). Data were statistically analyzed using SPSS 26 software.

Results

Non-parametric tests were applied for the statistical analysis of the staining intensity scores for LC3B protein expression to compare the expression profile both in pancreatic

NA epithelium and lesions' epithelium as well in the corresponding stroma. PanNENs patients expressed significant higher levels of LC3-B protein expression in their malignant epithelium compared to those patients diagnosed with PDAC ($p<0.001$). Within panNEN, expression of LC3B protein was more prominent in pNEC compared to pNET lesions although this difference did not reach to a statistically significant difference (7.9 ± 1.15 vs 4.056 ± 1.09 $p=0.058$) (Figure 1) and pNEC lesions presented increased expression compared to PDAC (7.90 ± 1.1 vs 1.24 ± 0.4 $p<0.001$).

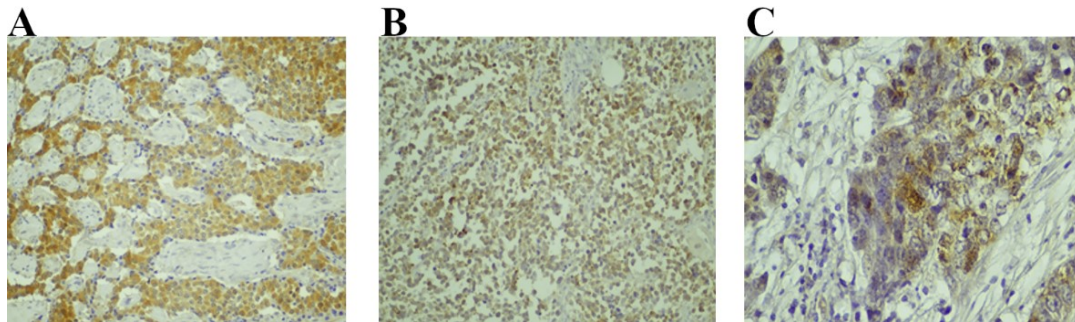


Figure 1. Immunohistochemical expression of LC3B protein in (A) pNETs (B) pNECs and (C) PDAC lesions' epithelium. Expression was increased in pNETs and pNECs lesions' epithelium compared to PDAC ($p<0.001$).

Furthermore, pNECs presented significantly higher expression of LC3B protein in their metastatic lymph node epithelium in comparison to the corresponding in patients with PDAC (6 vs 2.1 ± 0.7 , $p=0.048$, Figure 2).

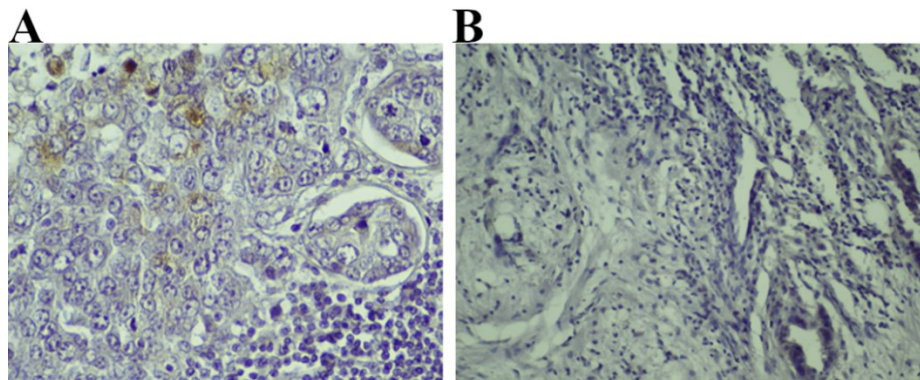


Figure 2. Immunohistochemical detection of LC3B in metastatic lymph nodes in pNEC patients (A) and in PDAC patients (B). Only in pNEC patients LC3B protein expression was significantly increased ($p=0.048$).

LC3B protein expression in panNEN was prominent in the lesion cells both in pNET and pNEC compared to their paired stroma ($p=0.006$ and $p=0.005$ respectively). In contrast in patients with pancreatic cancer, LC3B was significantly increased in the supporting neoplastic stroma cells, compared to the corresponding stromal areas of

pancreatic intraepithelial neoplasia (1.22 ± 0.3 vs 0.17 ± 0.16 , $p=0.007$) and normal adjacent tissue (0.9 ± 0.3 , $p=0.056$).

No difference in LC3B expression profile was detected in the present cohort of patients in relation to grade, presence of adipose infiltration, necrosis, metastatic lymph node, or inflammation.

Discussion

Several studies have reported autophagy to be upregulated in PDAC patients and they have shown that is implicated in resistance to both cytotoxic chemotherapy and targeted therapy. Still, research data covering the topic of autophagy in endocrine pancreatic cancer is limited probably due to their low incidence. Nevertheless, dysregulation of major pathways upstream of autophagy (i.e., PTEN, AKT) was reported in neuroendocrine tumors such as pancreatic neuroendocrine tumors that could support the increased levels of LC3B expression found both in the lesion's at primary site and in the metastatic lymph nodes in our panNEN patients' cohort [6]. It is well known that autophagy can represent a protective mechanism against malignant development initially, but also can be exploited by the malignant cells to satisfy their metabolic requirements, to adapt to stressful conditions and to preserve their stemness [7]. Such behavior may explain the induction of LC3B expression in cells within the lesion of panNEN patients observed in the present study. In our cohort, only pNEC patients retained even higher autophagy scores in the lesion's epithelium in the presence of lymph node metastasis and this might be associated with their aggressiveness, since no such observation was evident in the mostly benign pNETs. Interestingly, tumor cell-released autophagosomes (TRAPs) have been described to induce immunosuppression through their interaction with $CD4^+$ T cells in the tumor tissue and the tumor-draining lymph nodes [8]. Furthermore, the present study detected higher levels of expression of autophagy in the tumors supporting stroma of PDAC patients in comparison with the corresponding stromal areas of pancreatic intraepithelial neoplasia and in normal adjacent tissue, further supporting the crucial role of tumor's microenvironment in the case of pancreatic cancer [9]. Increased autophagy in the surrounding stromal cells should provide the necessary nutrients and support to the lesion. It is well known that the extremely aggressive behavior of PDAC is partially attributed to its stroma that presents increased desmoplasia and poorly immunogenic conditions.

Thus, the herein presented study support that autophagy can represent a key target to further understanding of the behavior of malignant lesions in the pancreas as well as developing more effective context- and tissue type-dependent anticancer treatments.

Acknowledgments

This project is part of NExT project which has received funding from the GSRT (Greece) within the Transcan-2 program ERA-NET' Translational research on rare cancers".

References

- [1] Gao H-L, Wang W-Q, Yu X-J, Liu L. Molecular drivers and cells of origin in pancreatic ductal adenocarcinoma and pancreatic neuroendocrine carcinoma. *Exp Hematol Oncol*. 2020;9(1):28.
- [2] Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182–188.
- [3] Cives M, Pelle' E, Quaresmini D, Rizzo FM, Tucci M, et al. The Tumor Microenvironment in Neuroendocrine Tumors: Biology and Therapeutic Implications. *Neuroendocrinology*. 2019;109(2):83–99.
- [4] Piffoux M, Eriau E, Cassier PA. Autophagy as a therapeutic target in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2021;124(2):333–344.
- [5] Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug;18(9).
- [6] Weckman A, Rotondo F, Ieva A Di, Syro L V, Butz H, Cusimano MD, et al. Autophagy in endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(4):R205–18.
- [7] Edwards P, Kang BW, Chau I. Targeting the Stroma in the Management of Pancreatic Cancer. *Front Oncol*. 2021;11.
- [8] Chen Y-Q, Li P-C, Pan N, Gao R, Wen Z-F, et al. Tumor-released autophagosomes induces CD4⁺ T cell-mediated immunosuppression via a TLR2 IL-6 cascade. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1).
- [9] Gore J, Korc M. Pancreatic cancer stroma: friend or foe? *Cancer Cell*. 2014 Jun;25(6):711–712.

Familial pancreatic cancer cases have a different mutation profile compared to sporadic cases with potentially targetable mutations



Emma Barreto^{1,2}, Julie Earl^{1,2}, Alfredo Carrato^{2,3}

¹*Molecular Epidemiology and Predictive Tumor Markers Group, Ramón y Cajal Health Research Institute (IRYCIS), Carretera Colmenar Km 9,100. 28034. Madrid, Spain.*

²*Biomedical Research Network in Cancer (CIBERONC), C/ Monforte de Lemos 3-5, Pabellón 11, 28029 Madrid, Spain*

³*Alcalá University, Madrid, Spain*

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common form of pancreatic cancer, and it has a very poor prognosis [1]. The relative survival at 5 years is around 11.5%, and there have been estimated 62,210 new cases and 49,830 deaths in 2022 [2]. Due to a lack of clear symptoms the majority of cases are diagnosed with an advanced or metastatic disease, that is why early detection is the best chance for cure for these patients.

Familial pancreatic cancer (FPC) represents around 10-15% of total pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cases and these families have an increased risk of developing the disease [3]. FPC is defined as families with 2 or more first-degree relatives affected by PDAC. Currently, only 20% of FPC cases have germline mutations in previously described germline mutations, but for the rest the origin of genetic disease is still unknown [2].

PanGenFam is a Spanish national registry of families with FPC established in 2009 by the collaboration of Ramón y Cajal University Hospital and the Spanish National Cancer Research Center [4]. The main objective of this registry is studying the phenotype and genotype of these families, to have a more comprehensive knowledge about the genetic origin of disease. There is a screening program offered to the healthy but at risk relatives of these families, as they could carry germline variants inherited by their affected family members and develop pancreatic lesions that could be early detected before they turn into malignant.

Thus, our objective was to study the genetic background of FPC cases identifying genetic pathogenic variants that distinguish them from the sporadic cases (SPC).

Material and methods

Germline panel sequencing was performed using the Sureselect technology for 85 PDAC cases: 53 FPC and 32 SPC. This panel was customized and included 60 genes involved in carcinogenesis and familial cancer (*APC*, *ATM*, *BMPRI1A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *SMAD4*, *STK11*, *TP53*, *VHL*, *PRSS1*, *TERT*, *CFTR*, *TET2* 9, *DNMT3A*, *POLN* 6, *POLQ* 6, *ASXL1* 5, *FANCG* 4, *BUB1B* 3, *ESCO2* 3, *FANCC* 3, *FANCM* 3, *MSH4* 3, *RAD54L*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDK4*, *FAM175A*, *FH*, *KIF1B*, *MAX*, *MEN1*, *MET*, *MLH3*, *MRE11A*, *MSH3*, *NBN*, *NF1*, *NTHL1*, *PIK3CA*, *POLD1*, *POLE*, *POT1*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RB1*, *RET*, *SDHA*, *SDHAF2*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127* and *XRCC2*).

Whole exome sequencing was performed for the patients that were negative for the panel, using the SureSelect SSXTV6 8-10Gb WES technology (11 PDAC cases and 8 healthy high-risk individuals from FPC families). Tertiary analysis was performed using the Ingenuity Variant Analysis tool. Variants were filtered and selected according to our following criteria: the allele frequency was lower than 0.01; they should be in heterozygosity; pathogenic, likely pathogenic and variants of unknown significance, variants placed in coding and splicing regions, and with a frameshift, missense, nonsense, or stop loss impact. Then, variants were validated by Sanger sequencing.

Circulating free DNA (cfDNA) was isolated from 1 ml plasma aliquots using the Maxwell RSC ccfDNA kit and *KRAS* somatic mutations were studied by BEAMing in 31 FPC and 23 SPC cases.

Results

After the analysis of panel sequencing, we found 7.5% of FPC patients carried pathogenic variants in genes involved in DNA repair processes, such as *MLH1* and *CDKN2A*, but none of the SPC carried this type of variants. 5.7% of FPC carried potentially pathogenic variants in genes such as *POLQ*, *CHEK2* or *FANCM*. Only 9.4% of SPC patients had potentially pathogenic variants in *MUTYH*, *TET2* and *ATM* (Figure 1).

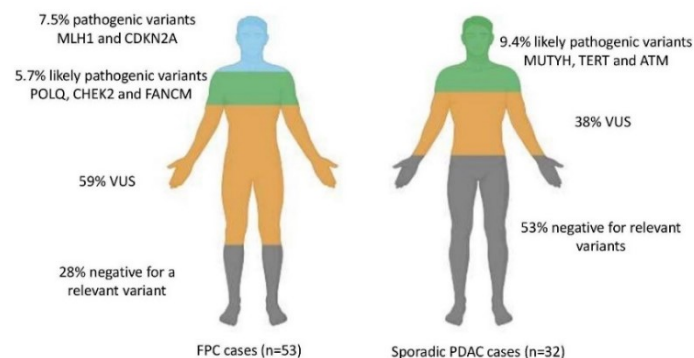


Figure 1. Summary of germline variants detected in FPC and SPC patients and their distribution between both groups.

In the exome sequencing analysis, we found missense variants with a damaging effect in all the individuals, but only 14 (66.67%) had stop gain, stop loss or frameshift variants, which were selected as candidate causal genes. Variants were validated in 5 FPC cases (45.45%), affecting *WWOX*, *C2orf83*, *SSPO*, *CYP3A5* and *TANGO2* and 4 high-risk individuals (50%) in *WWOX*, *ADD1*, *ARL11*, *NBPF1*, *CSNK1A1*, *ZNF880*, *ASXL1* genes.

Regarding the somatic mutations, we found that 70% of SPC and only 16% of FPC cases had a *KRAS* somatic mutation (Figure 2).

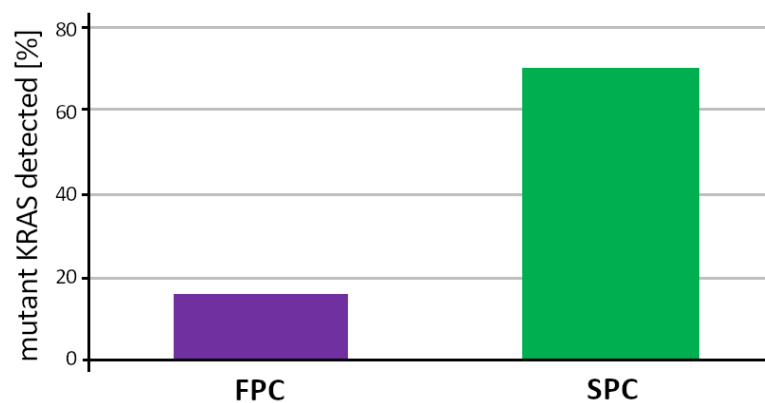


Figure 2. Distribution of mutant *KRAS* patients found in FPC and SPC cases by BEAMing.

Discussion

Data shows only a small percentage of patients carry interesting variants in traditionally described genes with a clear association to FPC syndrome, such as MMRs genes, *CDKN2A* or Fanconi anemia genes. This has been seen in other FPC families genetic studies, as Slater et al. (2021) found that it was more frequent the absence of mutations in predisposing genes than deleterious variants in their cohort [5].

Panel and exome sequencing revealed a high diversity of genes affected by several types of variants, 59% of FPC patients and 38% of SPC cases carried unknown significance variants, which supports the high heterogeneity that underlies this syndrome. Other research groups have also concluded in their analysis that this syndrome is a highly heterogeneous disease, with numerous low-frequency variants [5].

FPC patients showed a different somatic mutation profile, as the percentage of mutant *KRAS* patients was much lower compared to sporadic patients. It is well known that sporadic PDAC has activating *KRAS* mutations in around 95% of cases [6], but FPC patients seem to form a different subgroup of patients, and this could be associated with a higher overall survival [7], and they could have a better response to therapy as they are more sensitive to cisplatin-based therapies or PARP inhibitors [8, 9].

Conclusions

There is a wide heterogeneity in the germline mutation profile in FPC cases that affects DNA repair genes, and these multiple variants with low penetrance could underlie FPC phenotype diversity. The presence of germline mutations in DNA repair genes and the absence of *KRAS* somatic mutations in FPC patients could be an opportunity for targeted therapies that are not currently being used in the clinic in these patients.

Acknowledgements

This study was funded by the Instituto de Salud Carlos III (Plan Estatal de I+D+i 2013- 2016): ISCIII (PI09/02221, PI12/01635 and PI15/02101) and co-financed by the European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” (ERDF), the Biomedical Research Network in Cancer: CIBERONC (CB16/12/00446), La Asociación Española contra el Cáncer: AECC (Grupos Coordinados Estables 2016) and the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 857381, project VISION (Strategies to strengthen scientific excellence and innovation capacity for early diagnosis of gastrointestinal cancers).

References

- [1] Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res.* 2014; 74: 2913–2921.
- [2] Surveillance, Epidemiology, and E. R. (SEER). Cancer Stat Facts: Pancreatic Cancer. Available at: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html> (Accessed: 22th April 2020)
- [3] Llach J, Carballal S & Moreira L. Familial pancreatic cancer: Current perspectives. *Cancer Management and Research* 2020; 12: 743–758.
- [4] Mocci E, Guillen-Ponce C, Earl J, Marquez M, Solera J et al. PanGen-Fam: Spanish registry of hereditary pancreatic cancer. *Eur J Cancer.* 2015; 51: 1911-7.
- [5] Slater EP, Wilke LM, Böhm LB, Strauch K, Lutz M et al. Combinations of Low-Frequency Genetic Variants Might Predispose to Familial Pancreatic Cancer. *J Pers Med.* 2021; 11: 631.
- [6] Jones S, Zhang X, Parsons DW, Cheng-Ho J, Leary RJ, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.* 2008; 80: 1801–1806.
- [7] Earl J, Barreto E, Castillo ME, Fuentes R, Rodríguez-Garrote M et al. Correction: Earl et al. Somatic Mutation Profiling in the Liquid Biopsy and Clinical Analysis of Hereditary and Familial Pancreatic Cancer Cases Reveals *KRAS* Negativity and a Longer Overall Survival. *Cancers (Basel).* 2021; 15: 3687.

- [8] Park W, Chen J, Chou JF, Varghese AM, Yu KH et al. Genomic Methods Identify Homologous Recombination Deficiency in Pancreas Adenocarcinoma and Optimize Treatment Selection. Clin Cancer Res. 2020; 26: 3239–3247.
- [9] Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA -Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. N. Engl. J. Med. 2019; 381: 317–327.

Hybridné RNA-DNA nanočastice ako onkoterapeutický nástroj



Dominika Bilá, Martin Panigaj, Zuzana Jendželovská, Peter Fedoročko

*Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach,
Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických
vied, Šrobárova 2, 041 54 Košice, Slovensko*

Úvod

Vďaka pokroku v oblasti biomedicínskeho výskumu neustále dochádza k zvyšovaniu kvality diagnostiky a liečby nádorových ochorení. Aj napriek tomu jedným z hlavných terapeutických problémov naďalej zostáva vysoká miera heterogenity nádorov. Z tohto dôvodu sa súčasný výskum snaží o personalizáciu terapeutických postupov [1]. Jedným z možných riešení by mohlo byť použitie terapeutických prístupov využívajúci nukleové kyseliny. Výhodou nukleových kyselín je ich vysoká úroveň biokompatibility, programovateľnosti a modularity. Vďaka týmto unikátnym vlastnostiam je možné produkovať nanočastice vhodné pre priamu, selektívnu a kombinovanú terapiu [2]. Výhodou nanočastíc, ktorých základ tvoria nukleové kyseliny je možnosť regulácie ich aktivity.

Súčasný model regulácie aktivity nanočastíc je založený na rozdelení funkčných molekúl medzi dve funkčne závislé štruktúry. Pre funkčnú aktiváciu nanočastíc je potrebná iba vzájomná prítomnosť oboch štruktúr [3]. Tento model funkčnej aktivácie je však nešpecifický a často vedie k nežiadúcim vedľajším účinkom. Validnejším a vyšším stupňom regulácie je regulácia pomocou molekulového spúšťača [4]. Predmetom nášho výskumu je práve testovanie takéhoto modelu regulácie aktivity nanočastíc.

Naša nanočastica pozostáva z dvoch funkčne na sebe závislých RNA-DNA hybridov (Hybrid 1 a Hybrid 2). Hybrid 1 pozostáva z jednovláknovej DNA (ssDNA), jednovláknovej RNA (ssRNA), imunostimulačnej RNA a chrániaceho vlákna, ktorým je DNA oligonukleotid. Hybrid 2 je tvorený ssDNA, ktorá je komplementárna k ssDNA Hybridu 1 a ssRNA komplementárnou k ssRNA Hybridu 1. DNA oligonukleotid bráni akejkol'vek interakcii medzi hybridnými pármami. K uvoľneniu DNA oligonukleotidu by malo dochádzať iba v prítomnosti spúšťačieho vlákna, ktorým je špecifická komplementárna sekvencia. Táto sekvencia je súčasťou mRNA asociovanej s

nádorovým ochorením. Po uvoľnení DNA oligonukleotidu by malo dôjsť k reasociácii nanočastice a tým k uvoľneniu hybridizovaných funkčných RNA, ktorými sú siRNA a imunostimulačná RNA. Funkčné RNA sa zamerajú na odlišné terapeutické ciele s cieľom dosiahnuť synergický účinok. Za terapeutické ciele sme si pre náš experiment zvolili gény asociované s rastom a prežívaním nádorov a cytozolický receptor RIG-I, ktorý rozpoznáva krátku dvojvláknovú RNA s tupými koncami a ssRNA s trifosfátom na 5'-konci [5]. Viaceré štúdie poukazujú na vysoký potenciál RIG-I receptora ako vhodného terapeutického cieľa. Bola pozorovaná zvýšená úroveň apoptózy u nádorových buniek spôsobená aktiváciou RIG-I receptora [6]. Okrem toho, RIG-I signalizácia podporuje aktiváciu imunitných buniek zodpovedných za imunogénnu smrť nádorových buniek [7].

Cieľom predkladanej práce bola syntéza imunostimulačných RNA, testovanie ich schopnosti aktivovať RIG-I receptor a testovanie schopnosti DNA oligonukleotidov viazať sa na vybrané mRNA (Axl, Bcl-2, c-myc, SMG1, survivín a STAT3).

Materiál a metódy

Syntéza imunostimulačných RNA. Pre prípravu imunostimulačných RNA boli použité DNA templáty, ktoré boli amplifikované pomocou Taq 2X Master Mix (New England BioLabs) s využitím primerov obsahujúcich špecifický promótor pre T7 RNA polymerázu. PCR produkty boli vizualizované na 2% agarózovom gély. Po prečistení PCR produktov pomocou NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Mini kit (Macherey-Nagel) bola prevedená *in vitro* transkripcia za použitia T7 RNA polymerázy. Produkty *in vitro* transkripcie boli nanesené na 8 % denaturačný gél a po elektroforéze (200 V/35 min) s vyžitím UV shadowingu vyrezané z gélu. Po extrakcii a následnej precipitácii bola kvantita a kvalita imunostimulačných RNA overená pomocou denaturačnej elektroforézy (200 V/30 min).

Kultivácia buniek. Reportérova bunková línia HEK-Lucia™ RIG-I (InvivoGen) a kontrolná bunková línia HEK-Lucia™ Null (InvivoGen) boli kultivované v médiu DMEM (Sigma-Aldrich) doplnenom o 10% FBS a selektívne antibiotiká (HEK-Lucia™ RIG-I 30 µg/ml blasticidín a 100 µg/ml zeocín; HEK-Lucia™ Null 100 µg/ml zeocín) pri 37 °C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti. Bunková línia A549 (adenokarcinóm pľúc) bola kultivovaná pri rovnakých kultivačných podmienkach bez prítomnosti selektívnych antibiotík.

Testovanie imunomodulačných vlastností. Imunomodulačné vlastnosti vybraných RNA boli testované v reportérovej bunkovej línii HEK-Lucia™ RIG-I a kontrolnej bunkovej línii HEK-Lucia™ Null. Bunky boli transfekované vybranými imunostimulačnými RNA (3p10LG9, SRL14, BC-RIG-I, aptamér C19 a 3phpRNA) pomocou transfekčného činidla LyoVec™ (InvivoGen) a následne inkubované pri 37°C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti. 24 h po transfekcii bolo 20 µl zo supernatantu každej vzorky prenesených do novej nepriehľadnej 96-jamkovej kultivačnej platničky. Do každej jamky obsahujúcej bunkový supernatant bolo pridaných 50 µl testovacieho

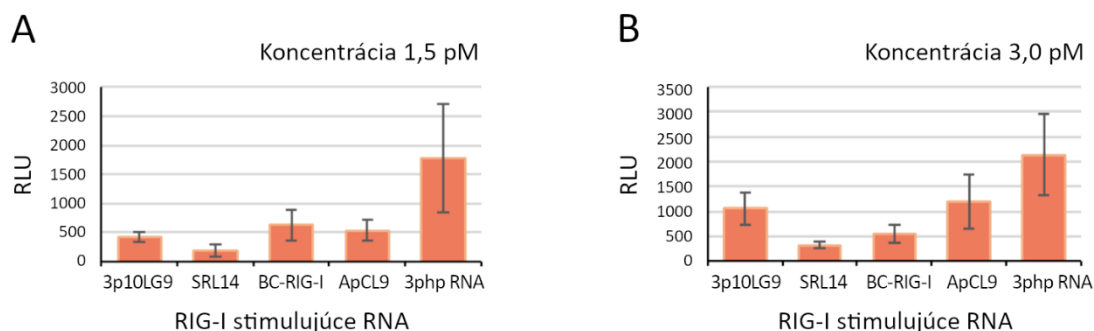
roztoku QUANTI-Luc™ (InvivoGen). Hneď po pridaní roztoku bolo prevedené kvantitatívne meranie aktivity vyprodukovanej luciferázy s využitím spektrofluoroluminometra FluoStar Optima (BMG LABTECH, Ortenberg, Nemecko).

Izolácia celkovej RNA a testovanie DNA oligonukleotidov. Celková RNA bola izolovaná z bunkových lyzátov (A549) použitím TRIzol™ reagentu (Invitrogen), podľa protokolu odporúčaného výrobcom. Vzorka obsahujúca celkovú RNA bola rozdelená do dvoch mikroskúmaviek. K obom vzorkám bola pridaná zmes vybraných DNA oligonukleotidov (Axl, Bcl-2, c-myc, SMG1, survivín a STAT3) (Sigma-Aldrich). Vzorky boli inkubované 30 min pri 37°C. Po inkubácii bol k sledovanej vzorke pridaný 1 µl RNázy H. Následne bola prevedená reverzná transkripcia s použitím 1 µg celkovej RNA inkubovanej s DNA oligonukleotidmi. V prvom kroku bola RNA spolu s 1 µl 10 mM dNTP Mix a zmesou primerov (1 µl Random Primer Mix; 1 µl Oligo d(T)23 VN) (New England BioLabs) inkubovaná 5 min pri 65 °C. Po denaturácii boli vzorky premiestnené na ľad. V ďalšom kroku bola po pridaní zvyšných zložiek reakcie (4 µl 5X ProtoScript II buffer, 2 µl 0.1 M Dithiothreitol (DTT), 0.2 µl RNase Inhibitor, 1 µl ProtoScript II RT) (New England BioLabs) celá reakčná zmes inkubovaná 5 min pri 25°C a následne 1 h pri 42°C. Po reverznej transkripcii bola prevedená klasická PCR, ktorej produkty boli vizualizované pomocou agarózovej elektroforézy (100 V/30 min).

Výsledky a diskusia

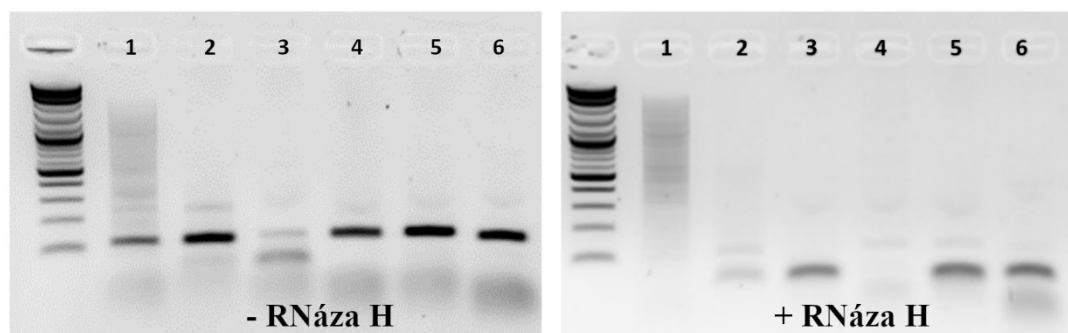
Imunostimulačné RNA (3p10LG9, SRL14, BC-RIG-I, aptamér C19 a 3phpRNA) boli syntetizované pomocou *in vitro* transkripcie využitím T7 RNA polymerázy, ktorá je charakteristická svojou špecificitou pre promótor a vysokou transkripčnou aktivitou [8]. Kvalita a kvantita syntetizovaných RNA bola hodnotená na základe výsledkov z denaturačnej elektroforézy. Po optimalizácii procesu syntézy sa nám podarilo syntetizovať všetky vybrané imunostimulačné RNA v dostatočnej kvalite a kvantite. Naším ďalším cieľom bolo testovanie imunomodulačných vlastností syntetizovaných RNA. Imunomodulačné vlastnosti RNA sme testovali v reportérovej bunkovej línii HEK-Lucia™ RIG-I, ktorá stabilne exprimuje vysoké hladiny RIG-I receptora. Bunková línia HEK-Lucia™ RIG-I stabilne exprimuje aj luciferázový reportérový gén, ktorý je pod kontrolou interferón indukovateľného promótoru. V prípade väzby a následnej aktivácii RIG-I receptora imunostimulačnou RNA dôjde k spusteniu kaskády biochemických reakcií, ktorých výsledkom je indukcia transkripcie génov kódujúcich interferóny typu I, čo následne vedie k indukcii expresie luciferázového reportérového proteínu. Pre samotnú analýzu bola ako negatívna kontrola aktivácie RIG-I receptora použitá bunková línia HEK-Lucia™ Null, ako pozitívnu kontrolu sme použili 3php RNA. 24 hodín po transfekcii buniek vybranými RNA boli bunkové supernatanty prenesené do 96 jamkovej platničky a kvantifikované. Imunomodulačné vlastnosti vybraných RNA boli kvantifikované vo forme relatívnej luminiscencie (RLU), na základe meraní luciferázovej aktivity použitím testovacie roztoku QUANTI-Luc™. Všetky testované RNA boli schopné aktivovať RIG-I receptor, pričom najlepšie imunomodulačné vlastnosti boli detegované u aptaméra C19, 3p10LG9 RNA (Obrázok

1). Schopnosť týchto RNA aktivovať RIG-I receptor bola potvrdená aj ďalšími štúdiami [9,10].



Obrázok 1. Testovanie imunostimulačných RNA v reportérovej bunkovej línii HEK-Lucia™ RIG-I.

Pre testovanie väzobných schopností DNA oligonukleotidov bolo vybraných niekoľko mRNA asociovaných s rastom a prežívaním nádorov (Axl, Bcl-2, c-myc, SMG1, survivín a STAT3). Jednotlivé DNA oligonukleotidy boli zmiešané v rovnakom pomere a inkubované s celkovou RNA izolovanou z komerčnej bunkovej línie (A549). Po inkubácii bola k jednej z dvoch sledovaných skupín pridaná RNáza H, ktorá štiepy RNA v RNA-DNA hybridných pároch. Po reverznej transkripcii bola prevedená klasická PCR, ktorej produkty boli vizualizované pomocou agarózovej elektroforézy (Obrázok 2). Keďže DNA oligonukleotidy boli cielené na stred mRNA sekvencie, v prítomnosti RNázy H došlo k rozštiepeniu cieľovej mRNA v DNA-mRNA hybride, čím nemohlo dôjsť k jej amplifikácii. Doterajšie výsledky naznačujú, že všetky testované DNA oligonukleotidy sú schopné naviazať sa na cieľovú mRNA. Najvýraznejšie rozdiely boli zaznamenané v prípade DNA oligonukleotidov pre Axl, c-myc a survivín.



Obrázok 2. Testovanie schopnosti DNA oligonukleotidov viazať sa na vybranú mRNA. 1- Survivín; 2- AXL; 3- BCL-2; 4- c-myc; 5-STAT-3; 6- SMG-1.

Naším najbližším cieľom bude overiť tieto výsledky pomocou ďalších molekulárnych metód, napr. real-time PCR a ELISA. Funkčné nukleové kyseliny s najlepšimi funkčnými vlastnosťami budú použité pre zostavenie hybridnej RNA-DNA nanočastice.

Pod'akovanie: Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0869/21.

Zoznam použitej literatúry

- [1] El-Sayes N, Vito A, Mossman K. Tumor Heterogeneity: A Great Barrier in the Age of Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13, 4:806.
- [2] Harrison EB, Azam SH, Pecot CV. Targeting Accessories to the Crime: Nanoparticle Nucleic Acid Delivery to the Tumor Microenvironment. *Front Pharmacol*. 2018; 9:307.
- [3] Chandler M, Afonin KA. Smart-Responsive Nucleic Acid Nanoparticles (NANPs) with the Potential to Modulate Immune Behavior. *Nanomaterials (Basel)*. 2019; 9, 4:611.
- [4] Zakrevsky P, Parlea L, Viard M, Bindewald E, Afonin KA, Shapiro BA. Preparation of a Conditional RNA Switch. *Methods Mol Biol*. 2017;1632:303-324.
- [5] Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*. 2004;5 7:730-7
- [6] Wu Y, Wu X, Wu L, Wang X, Liu Z. The anticancer functions of RIG-I-like receptors, RIG-I and MDA5, and their applications in cancer therapy. *Transl Res*. 2017;190:51-60.
- [7] Ellermeier J, Wei J, Duewell P, Hoves S, Stieg M.R et al. Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2013; 73, 1709-1720.
- [8] Gholamalipour, Y. et al. 3' end additions by T7 RNA polymerase are RNA self-templated, distributive and diverse in character-RNA-Seq analyses. *Nucleic acids research*. 2018; 46(18), 9253–9263.
- [9] Ho V, Yong HY, Chevrier M, Narang V, Lum J et al. RIG-I Activation by a Designer Short RNA Ligand Protects Human Immune Cells against Dengue Virus Infection without Causing Cytotoxicity. *J Virol*. 2019; 93(14)
- [10] Hwang SY, Sun HY et al. 5'-Triphosphate-RNA-independent activation of RIG-I via RNA aptamer with enhanced antiviral activity. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(6):2724-33.

Citlivosť nádorových buniek kolorektálneho karcinómu voči novosyntetizovaným derivátom tymolu

Michaela Blažíčková, Katarína Kozics



*Oddelenie nanobiológie, Ústav experimentálnej onkológie,
Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v.v.i.*

Úvod

Kolorektálny karcinóm, postihujúci oblasť hrubého čreva a konečníka, predstavuje jedno z najrozšírenejších nádorových ochorení vo svete. Na Slovensku je zaznamenaná tretia najvyššia miera incidencie. Liečba je momentálne postavená na invazívnych chirurgických zákrokoch a chemoterapii, pričom sú častokrát prítomné aj vážne nežiaduce účinky. V súčasnosti sa výskum zameriava na prírodné látky. V rastlinách čeľade *Lamiaceae* sa vo väčšej či menšej miere vyskytuje tymol - fenolový derivát cyménu. Má široké spektrum pozitívnych účinkov, vrátane antiseptických, antimikrobiálnych, antibakteriálnych či antiepileptických [1]. Na výskumoch *in vitro* a *in vivo* sa preukázala schopnosť inhibovať rast a metastázovanie nádorových buniek kolorektálneho karcinómu [2]. Značnou nevýhodou je jeho hydrofóbnosť, čo ovplyvňuje jeho efektívne prenikanie cez cytoplazmatickú membránu buniek. Preto boli syntetizované nové, hydrofilné deriváty tymolu. Stanovili sme ich cytotoxický a genotoxický účinok na nádorových bunkových líniiach kolorektálneho karcinómu HT-29 a HCT-116. Pre stanovenie reaktívnych foriem kyslíka (ROS) sme využili kit ROS-Glo H₂O₂ assay. Všetky analýzy boli uskutočnené aj na tymole, ktorý bol použitý ako štandard.

Materiál a metódy

Tymol bol komerčne zakúpený od firmy Sigma Aldrich. Nové deriváty: tymol ester kyseliny octovej (DT1) a tymol α -D-glukozid (DT2) boli syntetizované na chemickom ústave PriFUK v Bratislave. U oboch látok sa uskutočnili analýzy na nádorovej bunkovej línii kolorektálneho karcinómu HT-29 a HCT-116, zakúpené od firmy ATCC [3].

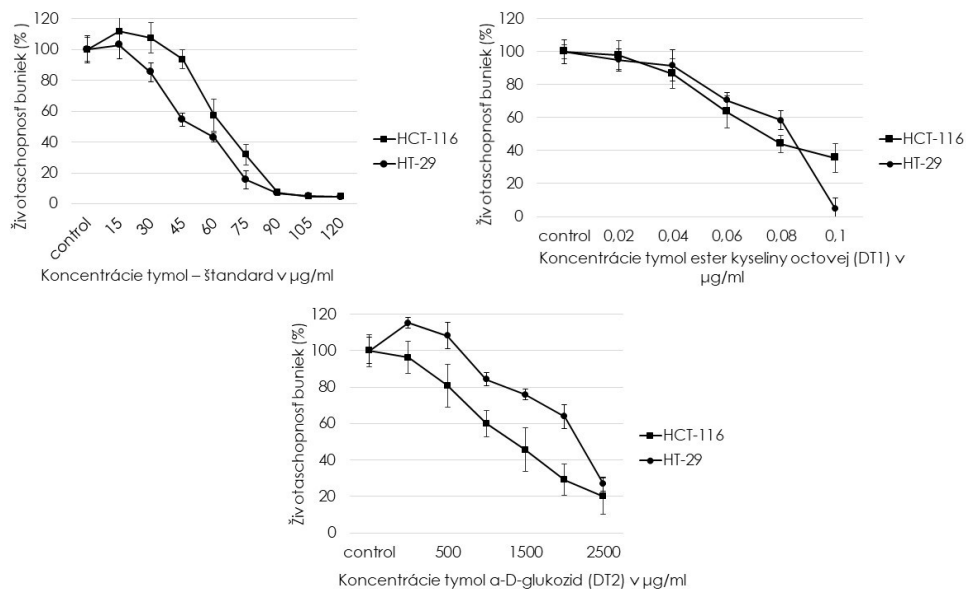
Cytotoxicita novosyntetizovaných derivátov sa stanovila metódou MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5 difenyltetrazólium bromid) [4]. Bunky ovplyvňované po dobu 24 hodín koncentračnou škálou skúmanej látky a následne sa aplikovala farbička MTT v koncentrácii 1 mg/ml po dobu 3 hodín pri 37 °C. Princípom metódy je redukcia žltej MTT farbičky v aktívnych bunkách za vzniku nerozpustného fialového formazánu. Táto chemická premena závisí od produkcie špeciálnych enzýmov a od mitochondriálnej aktivity ktorá prebieha len v životaschopných bunkách. Spektrofotometricky sa stanovili hodnoty absorbancie, merané pri vlnových dĺžkach 540 a 690 nm. Následne sa pre skúmané látky stanovili hodnoty IC₅₀ (inhibičná koncentrácia rastu 50 % v porovnaní s kontrolou).

Pre stanovenie genotoxicity bola použitá SCGE metóda (jednobunková gélová elektroforéza), prostredníctvom ktorej je možné stanoviť zlomy v DNA pre jednotlivé bunky. Postup SCGE metódy bol navrhnutý a modifikovaný Dušinskou a Collinsom [5]. Bunky sa fixovali v 0,75 % LMP agaróze (low melting point) a ich lýza prebiehala v lyzujúcom roztoku 1 hodinu pri 4 °C. Odvíjanie DNA sa uskutočnilo v elektroforetickom roztoku po dobu 30 minút v tme pri 4 °C. Nasledovala elektroforéza (19V, 300mA) po dobu 20 minút, kedy dochádza k migrácii DNA ku kladne nabitému pólu. Po neutralizácii a farbení etídiom bromidom sa vzorky hodnotili pod fluorescenčným mikroskopom. Ako parameter poškodenia (jednovláknové zlomy DNA) sa zvolilo percento DNA v chvoste kométy. V každej vzorke sa vyhodnotilo 100 buniek v troch paralelných vzorkách z troch nezávislých experimentov.

Stanovenie voľných radikálov, konkrétne peroxidu vodíka sa uskutočnilo pomocou testu ROS-Glo H₂O₂ (Promega, USA). Je založený na bioluminiscenčnej reakcii, pričom intenzita svetelného signálu je priamo úmerná koncentraciou peroxidu vodíka vo vzorke. Po ovplyvnení buniek testovanými látkami sa pridáva substrát peroxidu vodíka. Dochádza tak k vzniku prekursora luciferínu. Pridaním detekčného roztoku je prekursor konvertovaný na luciferín a pridaním luciferázy sa generuje merateľný svetelný signál.

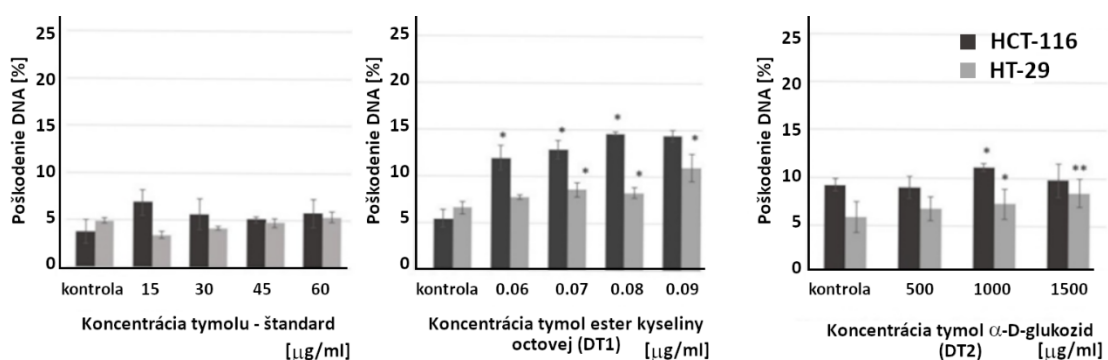
Výsledky a diskusia

Metódou MTT sme stanovili cytotoxicitu nových derivátov a hodnoty IC₅₀ pre obe bunkové línie (Graf 1). V prípade derivátu DT1 bola stanovená hodnota IC₅₀ zhodná pre líniu HT-29 aj HCT-116 a to 0,08 µg/ml. Rádovo vyššie koncentrácie boli použité pre derivát DT2. V tomto prípade sa línia HCT-116 prejavila citlivejšie, IC₅₀ sme stanovili na 1300 µg/ml. Pre líniu HT-29 bola hodnota 2100 µg/ml. Výrazné rozdiely medzi cytotoxickými koncentráciami novosyntetizovaných derivátov boli pravdepodobne spôsobené rozdielnou chemickou štruktúrou. Štandardná látka - tymol pôsobila v prípade buniek HCT-116 cytotoxicky pri koncentrácii 65 µg/ml. Naše výsledky sú v súlade s uskutočnenou štúdiou Zenga a kol. (2020) [6], v ktorej bola hodnota IC₅₀ pre líniu HCT-116 stanovená na 47 µg/ml. Pre líniu HT-29 nebola obdobná štúdia uverejnená.



Graf 1. Výsledky metódy MTT pre stanovenie cytotoxického poškodenia nových derivátov na línii HT-29 a HCT-116.

Pre stanovenie genotoxických účinkov sa vychádzalo zo získaných údajov o cytotoxicite. Maximálne koncentrácie sa pohybovali na úrovni hodnôt IC_{50} a taktiež vykazovali signifikantné zvýšenie poškodenia DNA (Graf 2). Bunková línia HCT-116 vo všeobecnosti dosahovala vyššie hodnoty ako HT-29. Derivát DT1 postupne zvýšil poškodenia v závislosti od aplikovanej koncentrácie v prípade oboch línii a DT2 sa prejavil zvýšením vo vyšších koncentráciách (od 1000 μg/ml). V prípade tymolu – štandardu nebol zaznamenaný žiadny genotoxický účinok, čo je v zhode s publikovanou štúdiou na bunkách HT-29 [3]. Tymol neindukoval zlomy v DNA ani v prípade nádorových buniek Caco-2 a HepG2 [7].



Graf 2. Výsledky jednobunkovej gélovej elektroforézy pre stanovenie genotoxického poškodenia nových derivátov na línii HT-29 a HCT-116.

Bioluminiscenčný test ROS-Glo pre stanovenie ROS preukázal zvýšenie hodnôt pre peroxid vodíka u testovaných derivátov (Tabuľka 1). Štatisticky významný nárast sa

sledoval najmä u najvyšších testovaných koncentrácií (0,08 µg/ml pri DT1 a 1500 µg/ml v prípade DT2). Podobný účinok zvýšenia reaktívnych foriem kyslíka bol pozorovaný pre nádorové bunky karcinómu žalúdka AGS [8], pľúc A549 [9] alebo B16 [10].

Tabuľka 1. Výsledky produkcie reaktívnych kyslíkových častíc metódou ROS-Glo.

Látka	Koncentrácie	HT-29	HCT-116
Negatívna kontrola	X	$1,52 \times 10^4 \pm 3845,1$	$4,1 \times 10^4 \pm 4619,5$
Pozitívna kontrola	X	$2,9 \times 10^5 \pm 17975,3^{***}$	$1,5 \times 10^6 \pm 1935,1^{***}$
DT1	0,02	$1,5 \times 10^4 \pm 1162,2$	$5,2 \times 10^4 \pm 478,0$
	0,04	$2,3 \times 10^4 \pm 6162,2$	$4,9 \times 10^4 \pm 4555,1$
	0,08	$5,8 \times 10^4 \pm 7748,5^{**}$	$6,2 \times 10^4 \pm 7018,2^*$
DT2	500	$1,2 \times 10^4 \pm 2164,7$	$3,9 \times 10^4 \pm 1952,8$
	1000	$1,6 \times 10^4 \pm 1037,7$	$7,3 \times 10^4 \pm 6570,4^{**}$
	1500	$3,2 \times 10^4 \pm 5494,4^*$	$9,4 \times 10^4 \pm 4602,8^{***}$

Záver

Ako ukázali výsledky, novosyntetizované deriváty tymolu majú potenciál pôsobiť na nádorové bunky kolorektálneho karcinómu. Tymol ester kyseliny octovej pôsobí efektívnejšie a pri nižších koncentráciách ako pôvodná látka. V prípade liečby, prevencie či výskumu kolorektálneho karcinómu by mohla mať aplikácia novosyntetizovaných derivátov tymolu veľký potenciál a prispieť k lepšiemu pochopeniu mechanizmov účinku prírodných látok na nádorové ochorenia.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla za podpory grantu SAV VEGA 2/0055/20 a projektu H2020 VISION GA No 857381.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Nagoor M, Mohamed F, et al. Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. *Frontiers in pharmacology* 2017; 8: 380.
- [2] Zeng Q, et al. Thymol isolated from thymus vulgaris L. Inhibits colorectal cancer cell growth and metastasis by suppressing the wnt/ β -catenin pathway. *Drug Design, Development and Therapy* 2020;14: 2535.
- [3] Internerové zdroje: <https://www.atcc.org/products/htb-38>,
<https://www.atcc.org/products/ccl-247>
- [4] Meerloo JV, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture*. Humana Press 2011; 237-245.
- [5] Dušinská M, Collins A. Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *Alternatives to Laboratory Animals* 1996;24.3: 405-411.
- [6] Thapa D, et al. Genoprotective effects of essential oil compounds against oxidative and methylated DNA damage in human colon cancer cells. *Journal of food science* 2019; 84.7: 1979-1985.
- [7] Horváthová E, et al. Study of cytotoxic, genotoxic and DNA-protective effects of selected plant essential oils on human cells cultured in vitro. *Neuro endocrinology letters* 2006; 27: 44-47.
- [8] Kang SH, et al. Anticancer effect of thymol on AGS human gastric carcinoma cells. *Journal of microbiology and biotechnology* 2016; 26.1: 28-37.
- [9] Balan DJ, et al. Thymol induces mitochondrial pathway-mediated apoptosis via ROS generation, macromolecular damage and SOD diminution in A549 cells. *Pharmacological Reports* 2021; 73.1: 240-254.
- [10] Li Ch, et al. Over-expression of Thioredoxin-1 mediates growth, survival, and chemoresistance and is a druggable target in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 2012; 3.3: 314.

NOVÉ POZNATKY O ÚLOHE NEFOTOAKTIVOVANÉHO HYPERICÍNU, SEKUNDÁRNEHO METABOLITU ĽUBOVNÍKA BODKOVANÉHO, V MODULÁCII REZISTENTNÉHO FENOTYPU BOČNEJ POPULÁCIE ZA HYPOXICKÝCH PODMIENOK



Viktória Buľková¹, Jana Vargová¹,
Rastislav Jendželovský¹, Marián
Babinčák¹, Pavel Roudnický², Zbyněk
Zdráhal², Peter Fedoročko¹

¹Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach,
Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a
ekologických vied, Šrobárova 2, 041 54 Košice,
Slovensko

²Stredoeurópsky technologický inštitút, Masarykova
univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká
republika

Úvod

Zásadnou prekážkou pri dosahovaní čo najvyššej efektivity chemoterapie je vznik rezistencie, potenciálne vedúcej k recidíve nádorového ochorenia. Chemorezistentné bunky nádoru môžu byť detegované metódou prietokovej cytometrie zvanou “side-population” (SP), ktorá je založená na zvýšenej efluxnej aktivite ABC transportných proteínov, a to hlavne BCRP a P-gp [1]. Expresia týchto efluxných púmp je riadená hypoxiou-indukovanými transkripčnými faktormi HIF-1 α a HIF-2 α , ktoré sú asociované so zlou prognózou pacientov s rôznymi typmi nádorov [2]. Hypoxia sa skrz podporu rezistentnejšieho a agresívnejšieho fenotypu nádorových buniek stala jedným z terapeutických cieľov v onkológii a objav potenciálnych prírodných inhibítorov jej kľúčových regulátorov, HIF-1 α a HIF-2 α , by mohol napomôcť pri liečbe mnohých nádorových ochorení.

Hypericín, prírodná látka syntetizovaná viacerými rastlinami rodu *Hypericum*, môže zohrávať úlohu v modulácii rezistencie nádorových buniek voči terapii. Aplikácia hypericínu si našla svoje uplatnenie vo fotodynamickej terapii a diagnostike, kde hypericín vystupuje ako fotosenzibilizátor [3]. Hypericín však môže vykazovať rôzne protinádorové účinky aj v nefotoaktivovanej forme. Hypericín je substrátom [4] a potenciálnym kompetitívnym inhibítorom BCRP, čo bolo dokázané na *in vitro* modeli nádorových bunkových línií za normoxických podmienok (20% O₂), kedy nefotoaktivovaný hypericín dokázal reverzibilne potlačiť výskyt SP buniek [5]. Okrem toho bola potvrdená schopnosť hypericínu degradovať už spomínaný kľúčový regulátor hypoxie, HIF-1 α [6]. Cieľom tejto práce bolo zistiť, či hypericín dokáže znížiť veľkosť,

príp. modulovať ďalšie vlastnosti SP populácie aj za hypoxických podmienok (1% O₂), čím by mohol pozitívne ovplyvniť senzitivitu nádoru k simultánne aplikovanej terapii, alebo naopak, či vplyvom hypoxie dôjde k zvýšenému efluxu hypericínu prostredníctvom zvýšenej expresie ABC transportných proteínov.

Materiál a metódy

Kultivácia buniek. V experimentoch boli použité nádorové bunkové línie A549 (adenokarcinóm pľúc), HT-29 (kolorektálny adenokarcinóm) a A2780 (ovariálny karcinóm). Bunky boli štandardne kultivované v inkubátore pri 37 °C, 5 % CO₂ a 95% vlhkosti v médiu RPMI-1640 doplnenom o 10% fetálne hovädzie sérum (FBS) a antibiotiká. Bunky boli po nasadení kultivované 24 hodín v zariadení s presne riadenou atmosférou (Coy Laboratory Products), a to buď v hypoxickej komore pri 1 % O₂, 5 % CO₂ a 37 °C alebo v normoxickej komore pri 20 % O₂, 5 % CO₂ a 37 °C. K bunkám bol následne pridaný hypericín (0,1 μM, 0,5 μM, 1 μM a 5 μM), s ktorým boli bunky inkubované v tme po dobu ďalších 16 hodín.

Intracelulárny obsah hypericínu. Bunky boli zozbierané trypsínom, prepláchnuté ľadovým PBS a centrifugované. Intracelulárny obsah hypericínu bol analyzovaný prietokovým cytometrom BD FACSCalibur a vyhodnotený softvérom FlowJo (TreeStar Inc.) ako medián fluorescence hypericínu v FL-2 kanáli (585/42 nm BP filter) po excitácii modrým laserom (488 nm) normalizovaný k autofluorescencii príslušnej kontroly.

Western blot analýza. Bunky boli zozbierané zoškrabaním na ľade, prepláchnuté PBS a lyzované v lyzačnom roztoku (100 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1% SDS; 10% glycerol) doplnenom o proteázový a fosfatázový inhibítor. Bunkové lyzáty boli sonikované a koncentrácia proteínov bola stanovená Lowryho metódou. Vzorky (každá po 30 μg proteínov) boli separované na 8% SDS-polyakrylamidovom géli a prenesené na PVDF membránu. Membrány boli po vyblokovaní inkubované cez noc pri 4 °C s primárnymi protilátkami: BCRP, HIF-1α, HIF-2α a β-aktínom. Následne boli k membránam pridané príslušné sekundárne protilátky s naviazanou chrenovou peroxidázou. Po premytí membrán bola reaktivita protilátok vizualizovaná prostredníctvom chemiluminiscenčného kitu. Denzitometria proteínov bola vyhodnotená softvérom ImageLab (Bio-Rad).

Analýza externalizácie fosfatidylserínu. K bunkám A549 bol pridaný hypericín podľa vyššie popísaného postupu a po 16 hodinách bol k bunkám na ďalších 24 alebo 48 hodín pridaný mitoxantrón (MTX; použité koncentrácie „IC₅₀“, ktoré boli stanovené MTT testom a programom OriginPro 8.5.0 SR1 (OriginLab)). Bunky (2 x 10⁵ buniek) boli zozbierané trypsínom, centrifugované a farbené anexínom V-FITC (BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I) 15 min v tme pri izbovej teplote. Pred analýzou pomocou BD FACSCalibur boli bunky zafarbené propídium jodidom (PI) (1 ug.ml⁻¹). Fluorescencia anexínu V-FITC bola detegovaná v kanáli FL-1 (530/30 nm BP

filter) a fluorescencia PI v kanáli FL-3 (670 nm LP filter), obe pri excitácii argónovým laserom (488 nm). Na vyhodnotenie výsledkov bol použitý softvér FlowJo.

Side population analýza a fluorescenciou aktivované triedenie buniek (FACS). Bunky boli zozbierané trypsínom, centrifugované a resuspendované v SP pufri (HBS, 2% FBS, 2 mM HEPES). Bunky (1×10^6 /ml) boli 90 minút za občasného miešania inkubované s farbivom Hoechst33342 (5 µg/ml). Ako negatívna kontrola bol použitý inhibítor BCRP, Ko143 (50 µM). Pred samotným meraním, prípadne FACS triedením prístrojom BD FACSAriaII SORP, bol ku každej vzorke pridaný PI (1 µg/ml) pre oddelenie mŕtvych buniek.

Migrácia. Po FACS triedení SP/nonSP buniek do 96-jamkovej platničky (8000 buniek/jamku) boli bunky inkubované niekoľko dní kvôli adherencii. „Rana“ (scratch) bola vytvorená v konfluentnej vrstve buniek v médiu s 1% FBS zariadením WoundMaker™ a zatváranie „rany“ bolo vyhodnocované automatizovaným softvérom prístroja IncuCyte®.

Proteomická analýza SP a nonSP buniek. SP a nonSP bunky kultivované v normoxii alebo hypoxii boli triedené pomocou FACS (minimálne 200 000 buniek z každej skupiny), prepláchnuté a lyzované v SDT pufri (4% SDS, 0.1% DTT v Tris/HCl, pH 7,6) a homogenizované 2 hod pri 95 °C. Vzorky boli následne analyzované v spolupráci s Centrálnym laboratóriom Proteomiky, CEITEC MU, Brno, ČR. Peptidy boli analyzované pomocou hmotnostného spektrometra Q Exactive HF-X s Ultimate 3000 RSLCnano systémom (Thermo Scientific). Dáta boli vyhodnotené pomocou softvéra MaxQuant a zoznam proteínov bol spracovaný v analytickom rozhraní KNIME.

Výsledky a diskusia

Zmeny vo fenotype nádorových buniek navodené hypoxiou predstavujú z klinického hľadiska závažný problém. Nádorová hypoxia sa na chemorezistencii nádorových buniek podieľa širokou škálou molekulárnych mechanizmov, čiastočne aj indukciou expresie ABC transportných proteínov [2]. Tieto proteíny zabezpečujú nádorovým bunkám ochrannú funkciu spočívajúcu v znižovaní intracelulárnej akumulácie chemoterapeutických liečiv. Okrem chemoterapeutík však môže týmto mechanizmom dochádzať aj ku znižovaniu akumulácie iných, potenciálnych terapeutických látok, v našom prípade hypericínu, a tým k zoslabeniu ich liečebného efektu. Naše výsledky preukázali, že hypoxia neovplyvňuje intracelulárny obsah hypericínu a tým nezoslabuje jeho účinok. Práve naopak, preukázali sme, že hypericín je schopný degradovať kľúčový regulátor hypoxie, HIF-1 α , čo súhlasí s výsledkami Barliya a kol. [6]. Hypericín rovnako znížil hladinu HIF-2 α , čo dosiaľ nebolo publikované v žiadnej vedeckej práci. Naše ďalšie výsledky preukázali, že hypericín za hypoxických podmienok znížil veľkosť rezistentnej SP populácie, čo bolo v súlade s poklesom hladiny BCRP. Preto sme sa rozhodli overiť úlohu hypericínu v kompetitívnej inhibícii BCRP v hypoxických podmienkach, vďaka čomu by malo dochádzať k zvýšenej intracelulárnej akumulácii chemoterapeutík. Kombinovaná liečba hypericínom a MTX v porovnaní so samotným

MTX stimulovala bunkovú smrť len v normoxických podmienkach, čo je v súlade s výsledkami výskumnej skupiny Vargová a kol. [4], no v hypoxii inkubácia buniek s hypericínom a MTX viedla skôr k ich adaptácii, nakoľko došlo k nárastu živých buniek v porovnaní s liečbou samotným MTX.

Prekvapivo, redukcia veľkosti SP populácie bola pozorovaná aj vplyvom samotnej hypoxie, čo rovnako korelovalo so zníženou hladinou BCRP v hypoxii. Možným vysvetlením je regulácia BCRP iným transkripčným aktivátorom ako HIF-1 α , napríklad receptorom pre aromatické uhl'ovodíky, AhR. Z literatúry je známe, že v hypoxii môže dochádzať k inhibícii transkripčnej aktivity AhR v dôsledku kompetície s HIF-1 α o ich spoločného väzbového partnera ARNT (HIF-1 β) a následne k poklesu expresie cieľových génov AhR [7]. Avšak v tom prípade by sa preukázalo, že expresia BCRP nie je v hypoxických podmienkach regulovaná HIF-1 α alebo HIF-2 α , čo bude predmetom nášho ďalšieho výskumu.

Proteomická analýza sledujúca odlišnosti v celých proteómoch SP a nonSP buniek v normoxii a hypoxii poukázala na ich možné rozdiely v metastatickom potenciáli. Na rozdiel od všeobecne očakávaného predpokladu bola väčšina proteínov spojených s metastázovaním identifikovaná v nonSP bunkách, a nie v SP bunkách. Výsledky získané proteomickou analýzou boli následne overené sledovaním zmien v migračnej schopnosti buniek. Naše výsledky preukázali, že SP bunky migrujú pomalšie ako nonSP bunky, a to v normoxických aj hypoxických podmienkach. Viacerými štúdiami bolo demonštrované, že SP bunky vykazujú zvýšenú expresiu mezenchýmových markerov (vimentín, N-kadherín), čo je fenotyp typicky spájaný s invazívnymi bunkami, no zároveň existuje domnienka, že SP bunky môžu slúžiť aj ako rezervoár pre produkciu buniek schopných mezenchýmálneho procesu [8], v našom prípade pre nonSP bunky. Z našich výsledkov vyplýva, že SP bunky majú skôr epitelový charakter, čomu nasvedčuje aj signifikantne znížená proteínová hladina N-kadherínu. Hypericín v hypoxii signifikantne stimuloval migráciu SP populácie, ktorej veľkosť bola vplyvom hypoxie a hypericínu redukovaná. Vplyv hypericínu na motilitu nádorových buniek bol popísaný vo viacerých štúdiách, avšak, na rozdiel od našich výsledkov, dané štúdie neboli upriamené na určitú subpopuláciu nádorových buniek, ktorá môže predstavovať len malé percento z celkovej masy nádoru.

Záver

Zistili sme, že prírodná látka hypericín je schopná znížiť rezistenciu nádorových buniek, či už cestou samotnej redukcie veľkosti SP frakcie alebo degradáciou kľúčových mediátorov hypoxickej odpovede buniek, HIF-1 α a HIF-2 α . Na druhej strane však hypericín v hypoxických podmienkach môže vyselektovať malú subpopuláciu nádorových buniek disponujúcu zvýšenou schopnosťou migrácie. Naše výsledky tak poukazujú na pleiotropné pôsobenie hypericínu v hypoxii, ako je to pri väčšine prírodných látok.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0022/19, Vnútorným vedeckým grantovým systémom Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach VVGS-2020-1650 a EPIC-XS (č. p. 823839) financovaným programom Európskej Únie Horizon 2020.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Goodell MA, McKinney-Freeman S, Camargo FD. Isolation and characterization of side population cells. *Methods in Molecular Biology* 2005; 290: 343-52.
- [2] Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010; 29(5): 625-634.
- [3] Jendželovská Z, Jendželovský R, Kuchárová B, Fedoročko P. Hypericin in the light and in the dark: Two sides of the same coin. *Front Plant Sci* 2016; 6;7:560.
- [4] Jendželovský R, Jendželovská Z, Kuchárová B, Fedoročko P. Breast cancer resistance protein is the enemy of hypericin accumulation and toxicity of hypericin-mediated photodynamic therapy. *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 2173-2181.
- [5] Vargová J, Mikeš J, Jendželovský R, Mikešová L, Kuchárová B, et al. Hypericin affects cancer side populations via competitive inhibition of BCRP. *Biomed Pharmacother* 2018; 99: 511-522.
- [6] Barliya T, Mandel M, Livnat T, Weinberger D, Lavie G. Degradation of HIF-1alpha under hypoxia combined with induction of Hsp90 polyubiquitination in cancer cells by hypericin: a unique cancer therapy. *PLoS One*. 2011; 6(9):e22849.
- [7] Francois LN, Gorczyca L, Du J, Bircsak KM, Yen E, et al. Down-regulation of the placental BCRP/ABCG2 transporter in response to hypoxia signaling. *Placenta* 2017; 51: 57–63.
- [8] Jiang H, Lin X, Liu Y, Gong W, Ma X, et al. Transformation of epithelial ovarian cancer stem like cells into mesenchymal lineage via EMT results in cellular heterogeneity and supports tumor engraftment. *Molecular Medicine* 2012; 18: 1197-1208.

ESTABLISHING *IN VITRO* TUMOR MODELS FROM PRIMARY TISSUE FOR TRANSLATIONAL RESEARCH IN ONCOLOGY



Jesús Frutos Díaz-Alejo^{1,2,3}, Julie Earl^{1,2}

¹*Molecular Epidemiology and Predictive tumor markers group, Ramón y Cajal Health Research Institute (IRYCIS), Carretera Colmenar Km 9,100. 28034. Madrid, Spain*

²*Biomedical Research Network in Cancer (CIBERONC), C/ Monforte de Lemos 3-5. Pabellón 11, 28029 Madrid, Spain*

³*Student in the PhD Program in Health Sciences of the University of Alcalá de Henares (UAH).*

Introduction

In vitro and *in vivo* tumor models that effectively recapitulate the primary tumor have revolutionized translational research in the last few years. In this work, we will focus in two of them that we develop at our lab: the 3D Organoids (of both PDAC and PNET) and the 2D models of Glioblastoma.

Organoids are miniature *ex vivo* 3D versions of the primary tumor that are more physiologically representative of the origin tumor from which they are derived. The development and characterization of these primary *in vitro* cultures is important so that they can be used as models in translational research. In the last decades, oncological research had been hindered due to the lack of new tumor models that represents more precisely the pathophysiological characteristics of the disease. This is an important unmet need for both translational research and the pharmaceutical industry for the development of more effective and personalized treatment strategies.

This is particularly true for rare tumors (known by some authors as “orphans” because of their poor survival rates, absence of new treatments and no significant advances in both research and clinic for these tumor types in the last decades). In addition, one of the most important problems of this diseases is the limited range of therapeutic options, and the low efficacy of them. As an example of them we can name Glioblastoma (GB), Pancreatic Neuroendocrine Tumors (PNET) and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC).

Materials and methods

Fresh tumor tissue was collected from resected tumor specimens or biopsy samples from PDAC, PNET and GB for the establishment of *in vitro* tumor organoids and *in vivo*

tumor PDX (Patient Derived Xenograph). We used a modified protocol based on expert publications in the field for the establishment of organoids. These models are characterized (IHC markers, somatic mutations, gene expression profiling, etc.) in parallel with the primary tumor, in order to determine their ability to faithfully recapitulate the characteristics of the original tumor.

Results

Both PDX and organoid cultures have been successfully established and maintained from PNET and PDAC primary tumors. Furthermore, other relevant cells within the tumor, such as fibroblasts, were also isolated and maintained for experiments related with the microenvironment, which could be used for tumor-stroma co-culture experiments. Primary 2D monolayer cultures of GB have also been successfully established. A biobank of these tumor models has been created for the storage of different passages in liquid nitrogen.

Discussion and conclusions

Organoids have an enormous potential both in the clinical research and pharmaceutical industry. They will allow us to refine personalized medicine in many tumor types (selecting the best option for the first treatment line for the patient) and perform high efficiency compound testing and experimental drug screening. The development of preclinical models that faithfully mimic the primary tumor to study biological characteristics, test novel therapies and characterize drug resistance mechanisms is an important goal that we must achieve in the next decade to improve survival rates in these tumor types.

Acknowledgements

This study was possible by the Platform Biobanks and Biomodels of the Carlos III Health Institute (ISCIII), the Biomedical Research Network in Cancer (CIBERONC, CB16/12/00446), NANO4Glio (EuroNanoMed III) and Project VISION (Strategies to strengthen scientific excellence and innovation capacity for early diagnosis of gastrointestinal cancers).

Differences in the molecular profile between primary breast carcinomas and their cutaneous metastases



Silvia González-Martínez^{1,2}, David Pizarro¹, Belén Pérez-Mies^{1,3,4}, Tamara Caniego-Casas¹, José Luis Rodríguez-Peralto^{3,5,6}, Giuseppe Curigliano^{7,8}, Alfonso Cortés¹, María Gión¹, Javier Cortés^{3,9,10,11*}, José Palacios^{1,3,4*}

¹Ramón y Cajal University Hospital, 28034 Madrid, Spain

²“Contigo contra el Cáncer de la Mujer” Foundation, 28010 Madrid, Spain

³CIBER-ONC, Carlos III Health Institute, 28029 Madrid, Spain

⁴Faculty of Medicine, University of Alcalá, Alcalá de Henares, 28801 Madrid, Spain

⁵I+D Institute, 12 de Octubre University Hospital, Madrid, Spain

⁶Department of Pathology, Medical School, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

⁷European Institute of Oncology, IRCCS, Milan, Italy

⁸Department of Oncology and Hematology, University of Milan, Milan, Italy

⁹European University of Madrid, Faculty of Biomedical and Health Sciences, Department of Medicine, 28670 Madrid, Spain

¹⁰International Breast Cancer Center (IBCC), Quironsalud Group, 08017 Barcelona, Spain

¹¹Medica Scientia Innovation Research, 08007 Barcelona, Spain and Ridgewood, NJ 07450, USA

*Correspondence

The characterization of molecular alterations of primary breast carcinomas (BC) and their cutaneous metastases (CM) is important to understand the mechanisms involved in their development. Thirty-three BC and 33 CM samples were analyzed by immunohistochemical and massive parallel sequencing analyses. The clinicopathological characteristics of patients and tumors were analyzed. Triple negative (TN) BCs were overrepresented among tumors that developed CM. A change of tumor surrogate molecular type in metastases was found in 15% of patients and 48.5% of the CM presented some additional molecular alteration with respect to the primary tumor. Survival was related to molecular type in the multivariate analysis. The TN molecular type has a greater risk to develop skin metastasis. There are phenotypic changes and additional molecular alterations in skin metastases compared to the corresponding primary breast tumors in 48.5% of the patients. Although, these changes varied from patient to patient, they could impact the treatment. More studies with larger patient and sample cohorts are needed.

Introduction

Breast cancer (BC) is the most prevalent malignancy in females and is the leading cause of cancer death in women [1]. We can apply a surrogate molecular classification that distinguishes four types of BC: luminal A-like, luminal B-like (HER2- and HER2+), HER2+ (non-luminal) and triple negative (TN) [2].

BC is the tumor most prone to develop skin metastasis in females [3]. Breast cutaneous metastases (CM) tend to develop in the vicinity of the primary tumor in the skin of the breast and chest wall, although they can also develop in the abdomen, extremities, head or neck [3]. In addition, BC CM can manifest in a wide variety of ways, but nodules are the most common presentation (80%) [4]. CM, usually occur in the later stages of the disease course [5] and this confers a poor prognosis.

Since there are few series evaluating the molecular alterations of CM and most do not include the analysis of both the primary tumor and CM, the objective of this study was to compare the molecular alterations of matched primary BC and their CM in a series of 33 patients to better understand the genes implicated in BC progression and to identify potential therapeutic targets.

Materials and Methods

All 33 primary tumors and 33 metastases underwent an immunohistochemical study for the expression of estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), HER2 and Ki67, as detailed in the article by González-Martínez et al. [6].

For the mutation analysis were used massive parallel sequencing. Tumor areas with >30% of tumor cells were selected. The paraffin blocks were punched, and the DNA were extracted. Then, quantitative and qualitative analysis were performed. For sequencing, a panel with 61 genes was designed and the libraries were constructed with a modified protocol for Agilent SureSelectXT FFPE. For the bioinformatics analysis a specific Pipeline was used. Additionally, some mutations were verified by Sanger. Detailed information can be found in the article by González-Martínez et al. [6].

Analysis of CNVs in CCND1, MYC, FGFR1 and MDM4 genes was performed by Fluorescent In-Situ Hybridization (FISH) on tissue microarrays (TMA). Only 20 matched primary tumors and metastases (40 samples) were included in the TMA due to sample limitation after the initial immunohistochemical/molecular study. The criteria are detailed in the article by González-Martínez et al. [6].

The Kaplan–Meier method was used to calculate overall survival according to clinicopathological characteristics and mutations in *TP53* and *PIK3CA* genes. Cox proportional hazards models were used to investigate the association between mortality and clinicopathological and molecular features.

Results

Case selection and clinicopathological features. A total of 33 patients diagnosed with BC and CM between 2005 and 2020 were selected.

Referring to clinicopathological features of all 33 primary samples the median age of the patients at diagnosis was 63.5 years old. According to the immunohistochemical profile, 48.5% were luminal HER2-, 9% were luminal HER2+, 6% were HER2+ (non-luminal) and 36.4% were TN.

Examining the distribution of histological types, 72.7% corresponded to invasive breast carcinomas of non-special type (BCNST), the rest were special histological types. The largest group (21.2%) corresponded to invasive lobular carcinoma (ILC), one case was a matrix-producing (chondroid) metaplastic carcinoma, and one case was an apocrine carcinoma.

Surrogate molecular types. The surrogate molecular type of the tumors and metastases was confirmed by IHC and FISH. The most frequent type of primary tumor was luminal HER2- followed by TN. The molecular type changed between the primary tumor and its CM in 5 patients (15%), the most common being from luminal to TN.

Table 1. Additional molecular alteration in cutaneous metastases not found in primary tumors of paired cases.

Location	Surrogated molecular type	Genes with additional alterations per case
Distant cutaneous metastasis <i>n</i> =17	TN	<i>PIK3CA</i>
		<i>RBI</i>
		<i>FGFR2+MYC</i> (amplification)
		<i>CTNNB1</i>
		<i>MDM4</i> (amplification)
	Luminal HER2-	<i>FGFR1+NF1</i>
		<i>BRCA2+MKI67+SF3B1</i>
		<i>CASP8+ERBB2</i>
		<i>MDM4</i> (amplification)
	HER2+	<i>KRAS+CCND1</i> (amplification)+ <i>MDM4</i> (amplification)
		<i>BRCA1+FGFR1</i> (polysomy)
Local cutaneous metastasis <i>n</i> =15	TN	<i>TP53+PIK3CA+COL1A1</i>
		<i>PIK3CA</i>
		<i>MYC</i> (amplification)
	Luminal HER2-	<i>ERBB2</i> (polysomy)
	HER2+	<i>MYC</i> (amplification)

Molecular characterization. The following molecular analysis is based on 66 samples (33 primary tumor and 33 CM) for mutation analysis and 40 samples (20 primary tumor and 20 CM) for CNV analysis.

Additional molecular alterations were observed in the CM, either mutations or CNVs, in 16 patients (48.5%). Table 1 shows the distribution of these alterations by surrogate molecular types and the Fig. 1 shows some additional amplifications in the CM.

There were some differences in the frequency of additional mutations depending on the local or distant nature of the CM. When not specified as an amplification, the alteration detected was a mutation.

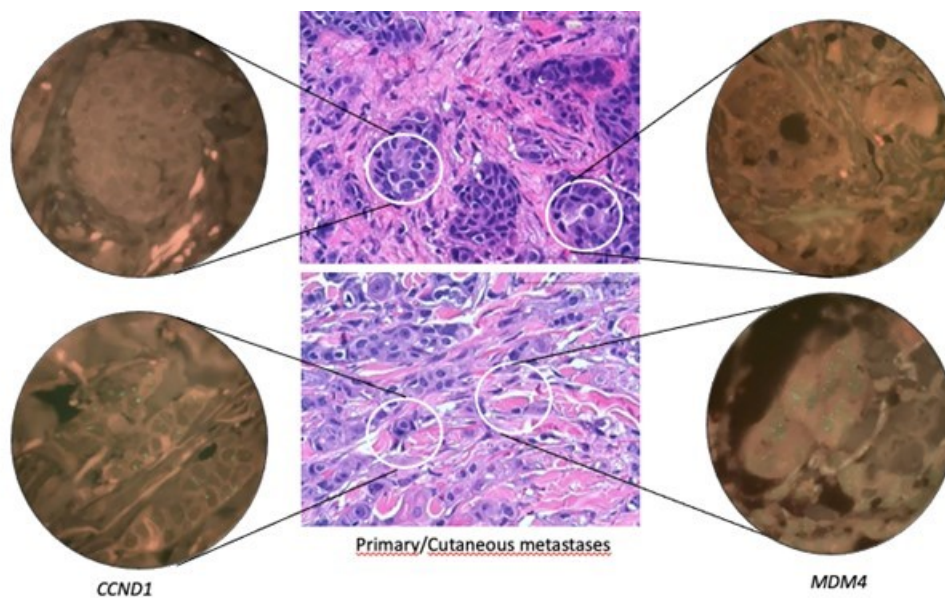


Figure 1. Additional CCND1 and MDM4 amplification in cutaneous metastases but not in primary tumors.

Survival analysis. In our series, the median survival since the diagnosis of the disease was 53 months and the median survival since the diagnosis of the CM was 19.6 months. Of the patients who developed distant CM, the median survival was 14.5 months. In contrast, when CM was local, the median survival was 34.6 months. But this difference was not statistically significant.

The association between overall survival since the diagnosis of the primary tumor and several variables were assessed. Histological grade, surrogate molecular type and TP53 mutations significantly affect overall survival. By multivariate analysis with the 3 significant variables, the only independent variable in the CoxPh analysis was surrogate molecular type, where HER2- luminal was the best prognostic type.

Discussion

Clinicopathologic features of breast carcinomas that develop cutaneous relapses

In this study, the observation that 46.9% of CM developed locally on the skin of the breast/thorax is in accordance with other studies [7]. Also, in agreement with other authors we observed a low frequency of patient that debuted with skin involvement.

The median age of women with BC who developed CM varies among series. These differences may be related with the different number of patients included in each series or due to ethic/geographic differences.

Comparing the distribution of surrogate molecular types in our series with other published series [5,8,9], a finding common to all of them was the relative overrepresentation of TNBC, suggesting that this surrogate molecular type could be associated with a greater potential to metastasize to the skin.

Molecular alterations involved in the development of cutaneous metastasis in breast cancer. Analyzing primary tumors and their respective metastasis, we found that 48.5% of CM exhibited additional pathogenic molecular alterations. However, we did not observe a specific mutational pattern related to tumor progression, indicating that CM is a very individual process. These results add to the observations of previous series (Table 2). In general, studies analyzing molecular alterations in BC CM, but without comparison with their primary tumors also confirmed that there is no specific pattern of mutations predisposing to CM [9].

Table 2. Additional molecular alterations in cutaneous metastases reported in different series.

Authors	Paired cases of cutaneous metastases/ with additional mutation (n)	Additional molecular alterations in cutaneous metastases	
Schrijver et al. [10]	8.6	33 mutations (<i>ATR</i> , <i>BRCA1</i> , <i>SMAD4</i> , <i>CDH1</i> , <i>ARID1A</i> , <i>ERBB2</i> , etc) and <i>FGF3</i> amplification	
Yates et al.[8]	6.6	14 molecular alterations (<i>JAK2</i> , <i>NF1</i> , 2 <i>TP53</i> , <i>AKT1</i> , <i>ARID1A</i> , <i>ARID1A</i> and 2 <i>RB1</i> mutations and <i>TERC</i> , <i>MYC</i> and 2 <i>FGFR1</i> amplification)	
Present series	33/17	TN	6 mutations (<i>TP53</i> + <i>PIK3CA</i> + <i>COL1A1</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>RB1</i> , <i>FGFR2</i> , <i>CTNNB1</i>) and 3 CNV (2 <i>MYC</i> and <i>MDM4</i>)
		RH+ HER2-	7 mutations (<i>FGFR1</i> + <i>NF1</i> , <i>BRCA2</i> + <i>MKI67</i> + <i>SF3B1</i> , <i>CASP8</i> + <i>ERBB2</i>) and 2 CNV (<i>ERBB2</i> and <i>MDM4</i>)
		HER2+	2 mutations (<i>KRAS</i> , <i>BRCA1</i>), 4 CNV (<i>CCND1</i> , <i>MYC</i> , <i>FGFR1</i> and <i>MDM4</i>)

Therapeutic implications and prognosis. An important point is whether the molecular characteristics of metastatic samples modify patient treatment. In the 15.1% of the patients, there was a conversion of the surrogate molecular type between the primary tumor and its CM. All these changes would have impacted on the treatment decision regarding the use of hormone therapy or anti-HER2 therapy.

Regarding specific mutations, three CM developed additional *PIK3CA* mutations, which is a target for treatment with alpelisib in HR+ metastatic BC. However, the three primary and metastases were TN.

An interesting case in this series was an ILC and their CM, the primary tumor carried the pathogenic L755S mutation. This mutation was absent in the CM, which carried the pathogenic mutation S310F. Response to different anti-HER2 therapies differed among mutations.

Patients with CM have a very poor prognosis. In our series, in multivariate analysis, survival was significantly related to surrogate molecular type and HER2- luminal surrogate molecular type had a better prognosis. The differences in our series compared to others may be related to clinical differences between the series.

The immunohistochemical and molecular analysis of BC CM is essential for a proper treatment of the patients.

Acknowledgments

“Contigo Contra el Cáncer de la Mujer“ foundation and the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 857381, project VISION.

References

- [1] Torre, L.A.; Islami, F.; Siegel, R.L.; Ward, E.M.; Jemal, A. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017, 26, 444–457, doi:10.1158/1055-9965.EPI-16-0858.
- [2] WHO Classification of Tumours Editorial Board; International Agency for Research on Cancer; World Health Organization WHO Classification of Tumours. Breast Tumours; International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2019; ISBN 978-92-832-4500-1.
- [3] Guanziroli, E.; Coggi, A.; Venegoni, L.; Fanoni, D.; Ercoli, G.; et al. Cutaneous Metastases of Internal Malignancies: An Experience from a Single Institution. *European Journal of Dermatology* 2017, 27, 609–614, doi:10.1684/ejd.2017.3142.
- [4] Tan, A.R. Cutaneous Manifestations of Breast Cancer. *Seminars in Oncology* 2016, 43, 331–334, doi:10.1053/j.seminoncol.2016.02.030.

- [5] Kong, J.H.; Park, Y.H.; Kim, J.A.; Kim, J.H.; Yun, J.; et al. Patterns of Skin and Soft Tissue Metastases from Breast Cancer According to Subtypes: Relationship between EGFR Overexpression and Skin Manifestations. *Oncology* 2011, 81, 55–62, doi:10.1159/000331417.
- [6] González-Martínez, S.; Pizarro, D.; Pérez-Mies, B.; Caniego-Casas, T.; Rodríguez-Peralto, J.L.; et al. Differences in the Molecular Profile between Primary Breast Carcinomas and Their Cutaneous Metastases. *Cancers* 2022, 14, 1151, doi:10.3390/cancers14051151.
- [7] Johnson, C. Cutaneous Manifestation as Initial Presentation of Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review. *Cutis* 2021, doi:10.12788/cutis.0223.
- [8] Yates, L.R.; Knappskog, S.; Wedge, D.; Farmery, J.H.R.; Gonzalez, S.; et al. Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse. *Cancer Cell* 2017, 32, 169-184.e7, doi:10.1016/j.ccell.2017.07.005.
- [9] González-Martínez, S.; Pizarro, D.; Pérez-Mies, B.; Caniego-Casas, T.; Curigliano, G.; et al. Clinical, Pathological, and Molecular Features of Breast Carcinoma Cutaneous Metastasis. *Cancers* 2021, 13, 5416, doi:10.3390/cancers13215416.
- [10] Schrijver, W.A.; Selenica, P.; Lee, J.Y.; Ng, C.K.Y.; Burke, K.; et al. Mutation Profiling of Key Cancer Genes in Primary Breast Cancers and Their Distant Metastases. *Cancer Res* 2018, canres.2310.2017, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2310.

ŠTÚDIUM VYUŽITIA EXOZÓMOV VYLUČOVANÝCH BUNKAMI UVEÁLNEHO MELANÓMU NA CIELENÚ INHIBÍCIU RASTU ICH METASTÁZ CESTOU GÉNOVEJ TERAPIE



Jana Jakubchová¹, Lucia Demková¹, Božena Smolková¹, Alena Furdová², Čestmír Altaner¹

¹*Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Bratislava*

²*Klinika oftalmológie LF UK a UNB, Nemocnica Ružinov Bratislava²*

Úvod

Melanóm uvey (UM), je vzácne maligne ochorenie oka, vyskytujúce sa väčšinou u dospelých osôb. Napriek jeho nízkej incidencii má vysoké riziko tvorby metastáz. U viac ako 50% pacientov dochádza v priebehu dvoch rokov k tvorbe prognosticky nepriaznivého metastatického procesu [1]. Extrabunkové nanočastice – exozómy sú vylučované zo všetkých buniek, a dokonca vo vyššej miere z buniek nádorových. Z hľadiska štruktúry sa jedná o membránové vezikuly o veľkosti 30-150nm, ktoré vo svojom vnútri nesú rôzne proteíny, lipidy, nukleové kyseliny ako aj iné bunkové komponenty. Obsah exozómu sa líši v závislosti od druhu buniek a ich fyziologického, či patofyziologického stavu. Exozómy predstavujú mechanizmus komunikácie, pri ktorom sprostredkovávajú dôležité informácie medzi blízkymi i vzdialenými bunkami, udržiavajú bunkovú homeostázu, informujú napríklad o progresivite nádoru, schopnosti metastázovať alebo o rezistencii na terapiu. Okrem toho plnia funkciu odstraňovania pre bunku nepotrebných či škodlivých produktov [2].

Čoraz viac vedeckých prác dokazuje, že nádorové exozómy pomáhajú vytvárať tzv. pre-metastatickú nikú, z ktorej sa vyvinú metastázy [3, 4]. Práve túto skutočnosť sa usilujeme využiť v našej štúdii tak, že geneticky modifikujeme bunky UM samovražedným génom v retrovírusovom vektore, ktorým je fúzny gén kvasinkového pôvodu cytozín-deamináza:fosforiboziltransferáza (γ CD::UPRT). Tento gén exprimuje v bunke enzým, ktorý je zodpovedný za konverziu netoxického 5-fluorocytosínu (5-FC) na cytotoxický 5-fluorouracil (5-FU). Z predchádzajúcich prác vieme, že mRNA tohto génu je zabudovaná v exozómoch [5, 6]. Z tohto dôvodu sa snažíme kultivovať bunky primárneho melanómu uvey a geneticky ich pozmeniť infekciou replikatívne defektívneho retrovírusu obsahujúcim γ CD::UPRT gén. Takto modifikovaná bunková

kultúra malígneho melanómu uvey vylučuje exozómy nesúce vo svojom obsahu génovú informáciu samovražedného fúzneho génu. Naše výsledky ukazujú, že v sekretóme geneticky pozmenených primárnych buniek uveálneho melanómu sa nachádzajú exozómy, ktoré inhibujú rast buniek uveálneho melanómu v dávkovej závislosti.

Ďalšie naše experimentálne smerovanie chceme upriamiť na špecifickosť samovražedných exozómov z jednotlivých nádorov a overiť, či budú nasmerované na metastatické bunky. Snažíme sa zakladať xenografty derivované z patientskych UM (PDX-UM), ktoré dobre prezentujú heterogénnosť ľudských nádorov na modeli imunokomprimovaných myší. Tieto PDX sú vhodným modelom na testovanie špecificity terapeutických *yCD::UPRT*-exozómov za prítomnosti predliečiva 5-FC.

Štúdiu exozómov z najrôznejších buniek sa venuje vo svete veľká pozornosť. V prípade nádorových exozómov predstavujú dôležitý zdroj informácií o vlastnom nádore, o jeho progresivite a schopnosti vytvárať metastázy. Keďže odrážajú vlastnosti primárnych nádorov, sú po ich modifikácii prostriedkom na cielenú terapiu. V našich štúdiách sa snažíme využiť ich nasmerovanosť na vývoj potencionalnej terapie, ktorá by mohla pomôcť pri liečbe ťažko liečiteľných nádorových diagnóz.

Materiál a metódy

Založenie a kultivácia bunkových kultúr z nádorového tkaniva ľudského uveálneho melanómu. Nádorové tkanivá uveálneho melanómu boli získané od darcov (n=59), ktorí podstúpili enukleáciu na Klinike oftalmológie LF UK a UN Bratislava. Každé nádorové tkanivo bolo spracované do dvoch hodín od odberu mechanickou dezintegráciou a enzymatickým natrávením pomocou 0,25% trypsínu (Sigma Aldrich) po dobu 15 minút pri teplote 37°C. Uvoľnené bunky z tkaniva boli následne vysievané na Petriho misky (Costar, Corning) do kultivačného média MEM α (Gibco, Thermofisher Scientific) obohateného 10% fetálnym bovinným sérom (FBS) (Biosera) a kultivované v termostate pri 95% vlhkosti a 5% CO₂. Konfluentná kultúra buniek bola pasážovaná a vysievaná na nové misky s hustotou 5x10⁴ buniek/cm². Výmena nového média prebiehala každý 2-3 deň.

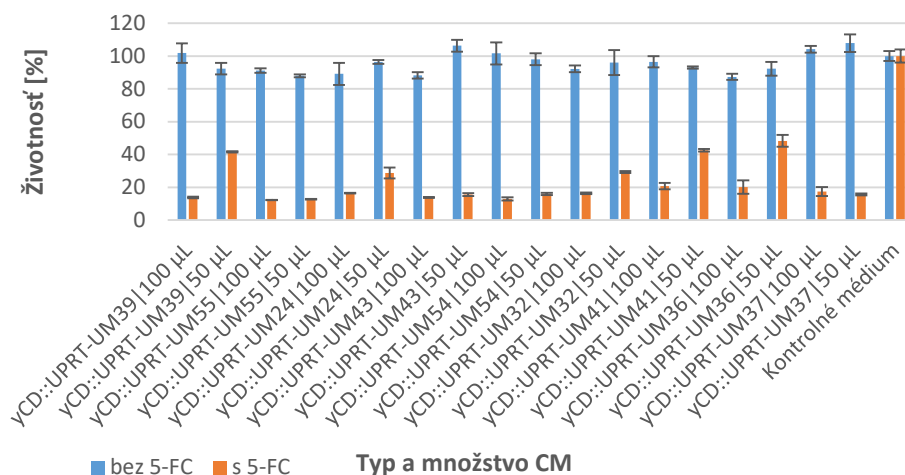
*Transdukcia primárnych buniek uveálneho melanómu pomocou retrovírusového vektora obsahujúcim gén *yCD::UPRT*.* Semikonfluentné kultúry UM boli infikované *yCD::UPRT* médiom produkujúcim vírus s pridaním protamínsulfátu o koncentracii 100 µg/mL. Infekcia buniek UM bola prevádzaná trikrát s následnou kultiváciou s obsahom antibiotík G418 za účelom zisku homogénnej *yCD::UPRT* kultúry UM. Kondicionované médium (CM) bolo zbierané z *yCD::UPRT* semikonfluentných bunkových kultúr UM bez pridania FBS.

Kultivácia nádorových línií. Nádorové línie MP38 (ľudský uveálny melanóm) a Hep G2 (ľudský karcinóm pečene) boli kultivované vo vysoko glukózovom DMEM médiu spolu s 10% FBS a udržiavané v termostate pri 95% vlhkosti a 5% CO₂. Nádorové línie boli použité na testovanie inhibície ich rastu vplyvom CM z rôznych *yCD::UPRT*-UM. Za týmto účelom boli nádorové bunky vysievané do 96 jamkovej platničky o hustote

3×10^3 , na ktorých bolo následne testovaných $100 \mu\text{L}$ $yCD::UPRT-UM$ CM s obsahom $3-10 \times 10^{10}$ extracelulárnych vezikúl/ exozómov za pridania a bez pridania predliečiva 5-FC. Vyhodnotenie životnosti nádorových línií bolo prevádzané za pomoci MTT testu za 6 až 8 dní od pridania $yCD::UPRT-UM$ CM k nádorovým bunkám, alebo taktiež pomocou prístroja Incucyte® ZOOM.

Výsledky a diskusia

Z celkového počtu 59 vzoriek nádorových tkanív UM sa nám podarilo do bunkovej kultúry založiť 52 vzoriek. 38 bunkových kultúr UM bolo modifikovaných tak, aby exprimovali $yCD::UPRT$ gén. Účinok expresie tohto génu znázorňuje Obrázok 1, ktorý bližšie charakterizuje životnosť nádorových buniek derivovaných z primárneho UM 59 vplyvom jednotlivých $yCD::UPRT-UM$ CM za pridania a bez pridania predliečiva 5-FC v dávkovej závislosti $50 \mu\text{L}$ a $100 \mu\text{L}$. Modré stĺpce predstavujú jamky s primárnymi nádorovými bunkami UM, do ktorých bolo pridané $yCD::UPRT-UM$ CM a nebol pridatý 5-FC. Oranžové stĺpce zas reprezentujú jamky s nádorovými bunkami, do ktorých bol pridatý 5-FC spolu s $yCD::UPRT-UM$ CM. V jamkách kde sa nachádzalo iba čisté $yCD::UPRT-UM$ CM nedochádzalo k inhibičnému ani k stimulujúcemu efektu nádorových buniek.

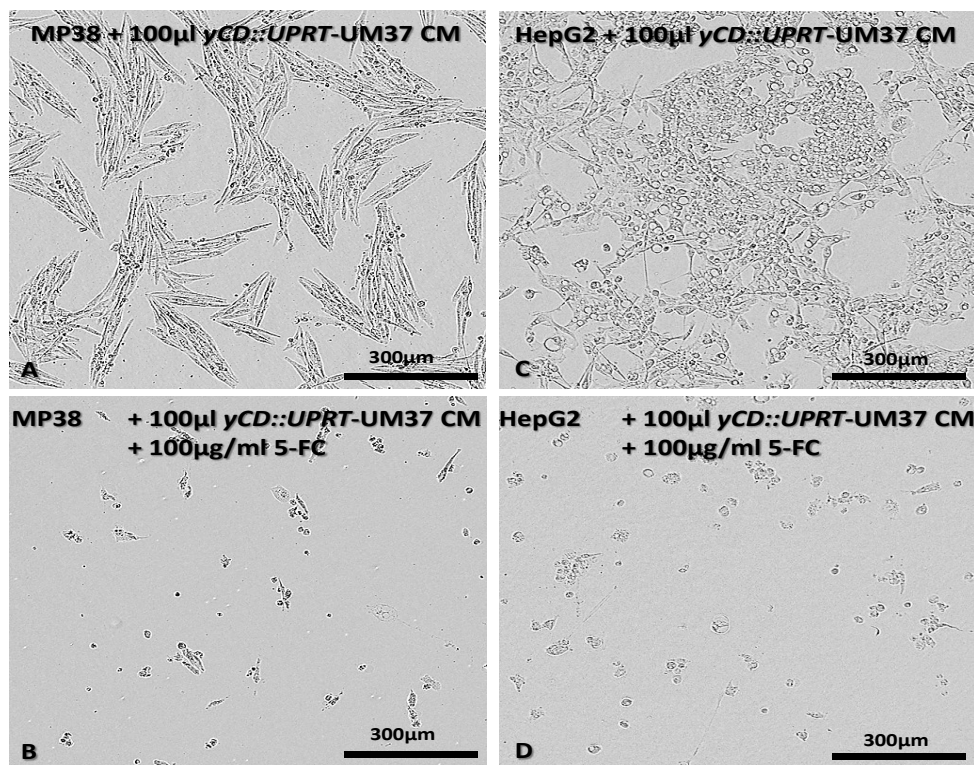


Obrázok 1. Inhibičný účinok rôznych CM z $yCD::UPRT-UM$ v dávkovej závislosti na bunkách primárneho UM59.

Naopak, do jamiek kde bolo aplikované $yCD::UPRT-UM$ CM spolu s 5-FC dochádzalo približne k 60-80% inhibícii rastu nádorových buniek v dávkovej závislosti. Tieto výsledky súhlasia s našimi predošlými prácami, kde uvádzame, že mezenchymálne stromálne/kmeňové [5] a aj nádorové bunky [6] môžu byť modifikované tak, aby vylučovali exozómy s obsahom mRNA samovražedného génu.

Kedže naša štúdia je zameraná na uveálny melanóm a jeho metastázy, ktoré sa najčastejšie vyskytujú v pečeni, ako modelový systém na deštrukciu nádorových buniek sme zvolili líniu uveálneho melanómu MP38 a líniu karcinómu pečene Hep G2. Nádorové línie len za pridania *yCD::UPRT*-UM CM bez aplikovaného predliečiva proliferovali a dosahovali vysokú konfluenciu (Obrázok 2A, C). Gén *yCD::UPRT* kóduje enzým, ktorý konvertuje netoxický 5-FC na toxický 5-FU. Konverzia nastáva vo vnútri nádorovej bunky, vyvoláva apoptické procesy, čo sa prejavuje autodeštrukciou nádorovej bunky a jej minimálnou proliferáciou (Obrázok 2 B, D).

Predpokladáme, že takto modifikované terapeutické exozómy derivované z nádorového tkaniva UM by mohli byť aj vďaka svojim špecifickým integrínom vhodným nástrojom ako cielene dopraviť liečbu priamo do nádoru/metastázy bez nežiaducich vedľajších účinkov, ktoré sú spájané s konvenčnou chemoterapiou.



Obrázok 2. MP38 bunková línia pod vplyvom CM z *yCD::UPRT*-UM37 bez pridania predliečiva 5-FC (A) za pridania predliečiva 5-FC po 6 dňovej kultivácii (B). HepG2 bunková línia pod vplyvom CM z *yCD::UPRT*-UM37 bez pridania predliečiva 5-FC (C) za pridania predliečiva 5-FC po 6 dňovej kultivácii (D).

Pod'akovanie

Chceli by sme poďakovať všetkým, ktorí akokoľvek podporili výskum v tejto práci. Za finančné prostriedky od Nadácie SPP, Ligy proti rakovine. Nadácii Výskum Rakoviny za zakúpenie prístroja Incucyte® ZOOM a grantovej agentúre APVV za financovanie projektu “Metylácia DNA ako cieľ epigenetického editovania a jej využitie pri personalizácii diagnostiky a terapie u melanómu uvey”.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Furdová Alena, et al. Melanómy oka a očných adnexov. - : 1. vyd. ISBN 978-80-224-1833-1. – Bratislava, Veda, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, 2020. - S. 149-158
- [2] Dai, J., Su, Y., Zhong, S., Cong, L., Liu, B., et al. (2020). Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 145.
- [3] Tsering, T., Laskaris, A., Abdouh, M., Bustamante, P., Parent, S., et al. (2020). Uveal Melanoma-Derived Extracellular Vesicles Display Transforming Potential and Carry Protein Cargo Involved in Metastatic Niche Preparation. *Cancers*, 12(10), 2923.
- [4] Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, et al. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 527(7578), 329–335.
- [5] Altanerova, U., Jakubecova, J., Benejova, K., Priscakova, P., Pesta, et al. (2019). Prodrug suicide gene therapy for cancer targeted intracellular by mesenchymal stem cell exosomes. *International journal of cancer*, 144(4), 897–908.
- [6] Altanerova, U., Jakubecova, J., Benejova, K., Priscakova, P., Repiska, V., et al. (2021). Intracellular prodrug gene therapy for cancer mediated by tumor cell suicide gene exosomes. *International journal of cancer*, 148(1), 128–139.

Inkorporácia chemoterapeutík do extracelulárnych vezikúl mezenchymálnych kmeňových/stromálnych buniek



Daniela Klimová¹, Čestmír Altaner², Vanda Repiská¹

¹*Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava*

²*Oddelenie prípravy kmeňových buniek, Onkologický Ústav sv. Alžbety, Bratislava*

Úvod

Hlavným cieľom chemoterapie je dosiahnuť maximálny účinok pri inhibícii rastu nádorov a súčasne zabrániť nežiaducim účinkom na zdravé bunky. Liečba rakoviny iba chemoterapeutikami je v mnohých prípadoch nedostatočná kvôli širokospektrálnym vedľajším účinkom, preto sa súčasný výskum zameriava na šetrnejšie spôsoby podávania protinádorových liečiv, napríklad prostredníctvom nanočastíc a/alebo imunokonjugátov.

V poslednej dobe sa mezenchymálne kmeňové/stromálne bunky (MSC) stávajú vhodnou a účinnou možnosťou spôsobu dodávania protirakovinových liečiv. Jednou z mnohých benefičných vlastností MSC je ich schopnosť migrácie k poškodenému tkanivu, kde pomocou vylučovania protizápalových a imunosupresívnych faktorov dané tkanivo liečia. Ich výhodou medzi ostatnými typmi buniek je ich nízka imunogenita, zabezpečená nízkou expresiou hlavného histokompatibilného komplexu triedy II a CD40 [1]. Tento typ kmeňových buniek sa nazýva aj „dospelé“ kmeňové bunky, pretože sa v tele nachádzajú aj počas dospelého života a dajú sa izolovať z takmer každého vaskularizovaného tkaniva [2].

Inkorporácia protinádorových liečiv do kmeňových buniek zabezpečuje cielené podanie liečiv do nádorových buniek a metastáz, pričom sa spotrebuje menšie množstvo podávaného liečiva a predĺži sa jeho zotrvanie v organizme. Niektoré z týchto spôsobov dodania sú založené iba na zavedení a prenose liečiva prostredníctvom extracelulárnych vezikúl MSC, niektoré zase na ich genetickej manipulácii. Extracelulárne vezikuly (EVs) vylučované MSC sú vhodnejším nástrojom na transport liečiva, pre ich prirodzenú prítomnosť v organizme, a schopnosť prechádzať cez biologické membrány (hemoencefalickú bariéru) a pre ich zníženú nešpecifickú interakciu s proteínmi

v krvnom obehu [3]. EVs sú bunkami využívané ako komunikačný nástroj, cez ktorý odosielajú a prijímajú rôzne druhy proteínov, nukleových kyselín či signálnych molekúl. Práve tieto bunkám a organizmu biologicky prirodzené vezikuly využívame vo svojej práci na prepravu mRNA tzv. „samovražedného génu“ na elimináciu nádorových buniek. Vložený génový konštrukt fúzny kvasinkový gén cytozindeamináza::fosforibosyltransferáza ($yCD::UPRT$) je navrhnutý tak, aby sa gén v cieľovej bunke nadmerne expimoval a dával tak vznik enzýmu, ktorý je schopný konvertovať netoxické predliečivo 5-fluorocytozin (5-FC) na cytostatikum 5-fluorouracil (5-FU) priamo v nádorovej bunke [4]. Cieľom je zamedziť usmrcovaniu zdravých buniek s využitím nasmerovanej liečby.

Naša práca sa taktiež zameriava na inkorporáciu troch chemoterapeutík (paclitaxelu, 5-fluorouracilu a gemcitabínu) do MSC izolovaných z rôznych zdrojov.

Materiál a metódy

Pre naše pokusy využívame MSC transdukované $yCD::UPRT$ pripravené v laboratóriu tak, že bunky sa infikovali replikatívne defektným retrovírusom s génom $yCD::UPRT$. Tento vírus sa integruje do hostiteľskej DNA MSC buniek a gén pod silným retrovírusovým promótorom sa v bunkách exprimuje, čím sa vytvorí m-RNA génu. V predchádzajúcich prácach sme zistili, že mRNA tohto génu sa vkladá do extracelulárnych vezikúl – exozómov [4]. Konštrukcia retrovírusového vektora dovoľuje selektovať úspešne transdukované bunky pomocou antibiotika G418 (0,4 – 1,2 mg/ml). Takto sa získava homogénna populácia buniek a tým aj homogénna populácia exkretovaných exozómov. Tieto $yCD::UPRT$ -MSC sme používali v pokusoch, kde sme sa pokúšali vkladať chemoterapeutiká a zisťovať, či sa taktiež vkladajú do exozómov. Exozómy z MSC sa vylučujú do média, v ktorom nie sú rastové faktory. Takéto médium sa nazýva kondicionované médium.

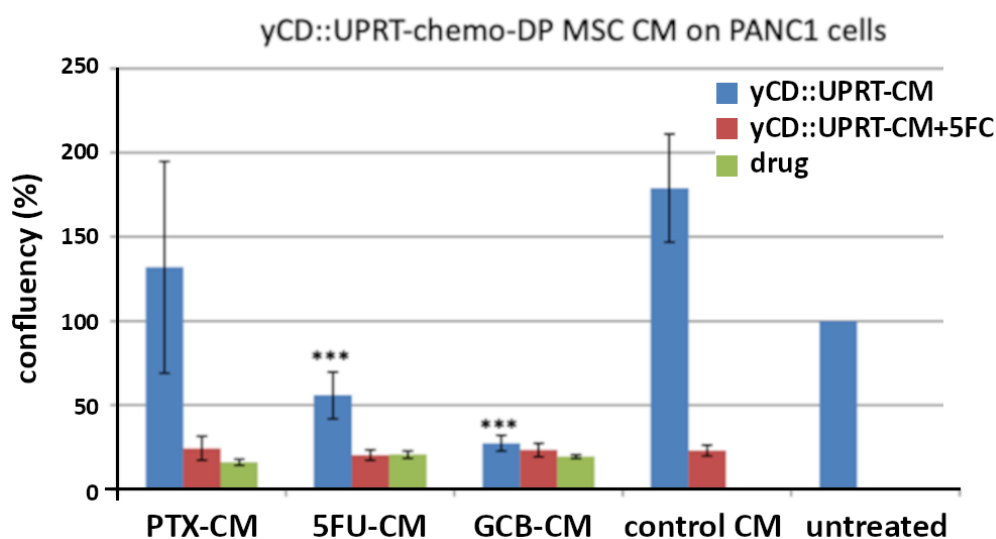
V práci sme používali nasledovné zásobné roztoky chemoterapeutík: paklitaxel (6 mg/ml, Sandoz), 5-fluorouracil (50 mg/ml, Accord) a gemcitabín (100 mg/ml, Accord), ktoré sme riedili pomocou PBS a použili sme v kultivačnom médiu s požadovanou koncentráciou. Sub-konfluentné transdukované MSC ($\sim 5 \times 10^5$ buniek) boli vystavené konkrétnej koncentrácii cytotoxického liečiva (PTX = 8,5 μ g/ml; 5-FU = 1 μ g/ml a GCB = 2 μ g/ml). Po 24 hodinách sme kultivačné médium odstránili, bunky sme trikrát premyli PBS, aby sme odstránili voľné liečivo, a kultivovali ich 24 hodín v médiu bez séra. Zozbierané kondicionované médiá, ktoré obsahuje exozómy sme použili v ďalších experimentoch.

Na frakcionáciu kondicionovaného média (2ml) sme použili kolónu (35 nm qEV Izon Science), ktorá separuje častice na základe veľkosti. Po zozbieraní voľného objemu (14 ml) sme odobrali 33 frakcií s objemom 1,5 ml a následne sme testovali ich inhibičný účinok rastu rôznych nádorových bunkových línii (adenokarcinóm prsníka MDA-MB-231, karcinóm vaječníkov SKOV-3, línia z kostnej metastázy rakoviny prostaty PC3 a bunky línie karcinómu pankreasu PANC-1). Životnosť nádorových buniek bola

stanovená pomocou MTT testu (Sigma Aldrich, Nemecko). Absorbancia bola meraná spektrofotometrom pri vlnovej dĺžke 490 nm (Bio-Rad, Life Science). Rast buniek bol taktiež stanovovaný v reálnom čase v systéme IncuCyte na monitorovanie živých buniek (EssenInstruments, Ann Arbor, MI). Tento systém umožňuje sledovať rast buniek alebo morfológické zmeny v hodinových intervaloch stanovením konfluencie buniek v jamkách.

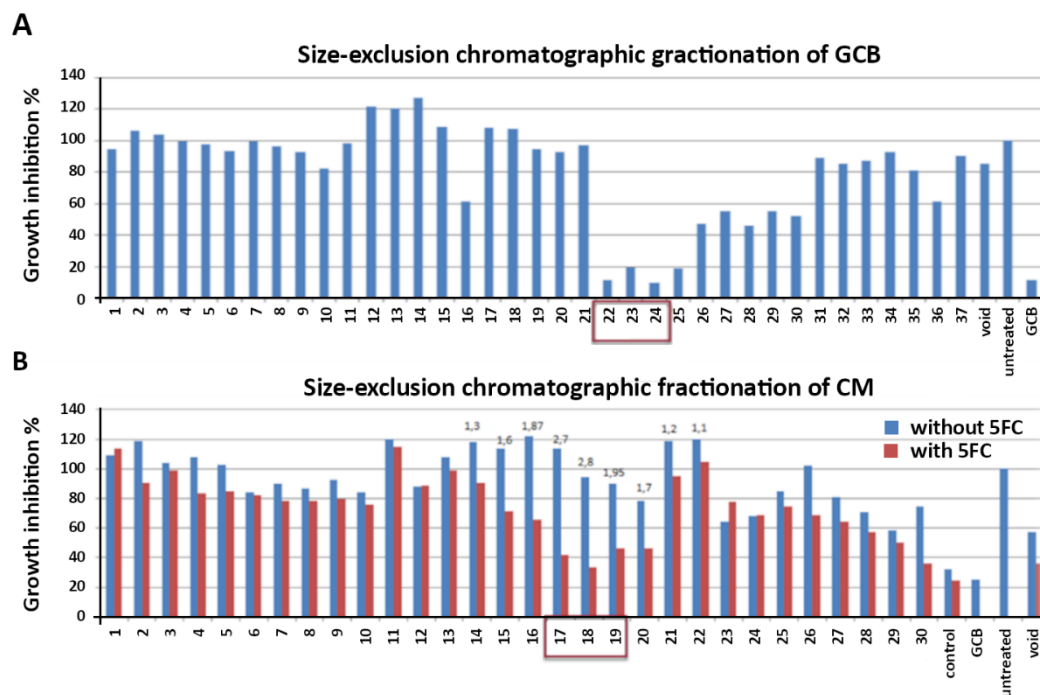
Výsledky a diskusia

Pri analýze inhibičného účinku rastu nádorovej línie PANC1 extracelulárnych vezikúl s vloženým chemoterapeutikom sme pozorovali, že MSC izolované z ľudskej dentálnej pulpy sú schopné do svojich EVs zabaliť 5-FU aj GCB a ich inhibičný efekt bol signifikantne vyšší v porovnaní s kontrolnými neovplyvnenými EVs. Účinok *yCD::UPRT* systému v kombinácii s 5FC mal účinnosť porovnateľnú s čistým chemoterapeutikom (Obrázok 1). Vylúčiť inhibičný účinok voľného cytostatika v médiu v tomto prípade môžeme tak, že účinok kondiciovaného média bol pozorovateľný aj po niekoľkonásobnom obmytí buniek a následným pasážovaním buniek.



Obrázok 1. Účinná inhibícia rastu PANC1 buniek kondiciovaným médiom z DP-MSC buniek. Bunky boli ovplyvnené 1 µg/ml 5-FU a 2 µg/ml GCB ($p=0.0005$, $p=0.0009$). Fúzny gén *yCD::UPRT*, ktorý sa exprimuje v prítomnosti 5-FC v nádorovej bunke, mal porovnateľný účinok s čistým liečivom s pridanou hodnotou jeho špecificity.

Exozómy v kondiciovanom médiu z DP-MSC a čisté liečivo boli samostatne frakcionované na kolóne (35 nm qEV Izon Science). Kolóna oddeľuje nanočastice na základe ich veľkosti. Testovaním inhibičného účinku danej frakcie na PANC1 bunkách sme dokázali, že čisté liečivo tečie v inej frakcii ako *yCD::UPRT*-exozómy, v ktorých bolo chemoterapeutikum (Obrázok 2).



Obrázok 2. Chromatografia na základe veľkosti častíc. Frakcionácia čistého liečiva (2 $\mu\text{g/ml}$ GCB), (A) a frakcionácia kondicionovaného média s exozómami (B).

Diskusia

Podobné výsledky publikovali Bonomi a kol. (2015), keď ovplyvnili MSC izolované z kostnej drene GCB (2 000 ng/ml). Kondicionované médium z ovplyvnených buniek *in vitro* inhibovalo rast bunkovej línie ľudského adenokarcinómu [5]. V dobe publikovania ich práce nebolo známe, že bunky vylučujú exozómy, ale uvedené výsledky na základe súčasných znalostí jasne ukazujú, že išlo o GCB v exozómoch.

Biológia exozómov sa stáva čoraz lepšie pochopenou a pribúdajú štúdie, ktoré optimalizujú ich terapeutické inžinierstvo a dizajn ako nástroje na dodávanie liekov na zacielenie a zabitie primárnych nádorov a ich metastáz. Glioblastóm, adenokarcinóm pankreasu, nádor prostaty a metastatické karcinómy prsníka sú smrteľné ochorenia, ktoré si vyžadujú presnejšie zacielenú liečbu. Vďaka schopnosti komunikovať s nádorovými bunkami prostredníctvom špecifických biomarkerov, zníženému zotrvávaniu v organizme, nano veľkosti a vynikajúcej kompatibilite, sa exozómy javia ako veľmi účinný nosič protinádorových liekov.

Referencie

- [1] Schu, Sabine, et al. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 16.9 (2012): 2094-2103.

- [2] Carmeliet, Peter. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438.7070 (2005): 932-936.
- [3] Liao, Wen, et al. Exosomes: the next generation of endogenous nanomaterials for advanced drug delivery and therapy. *Acta Biomaterialia* 86 (2019): 1-14.
- [4] Altanerova, Ursula, et al. Prodrug suicide gene therapy for cancer targeted intracellular by mesenchymal stem cell exosomes. *Int J Cancer* 144.4 (2019): 897-908.
- [5] Bonomi, Arianna, et al. Gemcitabine-releasing mesenchymal stromal cells inhibit in vitro proliferation of human pancreatic carcinoma cells. *Cytotherapy*, 2015, 17.12: 1687-1695

Metabolizmus nádorových buniek NTERA-2 môže súvisieť s ich rezistenciou na cisplatinu



Eva Kocianová¹, Radivojka Bánová²,
Silvia Radenkovic³, Katarína
Grossmannová¹, Ingeborg Režuchová¹,
Katarína Kaľavská⁴, Tereza Golias¹

¹Oddelenie nádorovej biológie, ²Oddelenie rickettsiológie, Virologický ústav, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied

³Metabolomics Expertise Center, VIB-KU Leuven, 3000

⁴Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied a Jednotka translačného výskumu, LFUK, NOÚ

Úvod

Hoci väčšina zdravého tkaniva preferuje oxidatívny metabolizmus, zdravé tkanivo semenníkov je závislé na produkcii ATP v glykolytickom metabolizme, čím je zabezpečená pohyblivosť, hyperaktivácia a kapacitácia spermií [1]. Takýto metabolizmus je typický pre hypoxické nádorové tkanivo, ktoré sa vyznačuje agresívnym fenotypom a je asociovaný so zlou prognózou pacientov.

Už v 20. rokoch minulého storočia Warburg zistil, že nádorové bunky prijímali vo zvýšenej miere glukózu v porovnaní so zdravými bunkami a bez ohľadu na prítomnosť kyslíka ju preferenčne konvertovali na laktát [2]. Táto adaptácia nádorovým bunkám šetrí kyslík a poskytuje metabolické substráty potrebné pre proliferáciu buniek [3]. Zaujímavé je, že metabolické stratégie nádorových buniek semenníkov neboli dosiaľ popísané. V súčasnosti sa vďaka cisplatine podarí vyliečiť až 90% pacientov s nádorovým ochorením semenníkov. Bohužiaľ, pacienti rezistentní na cisplatinu majú spravidla zlú prognózu [4]. V našej práci sa snažíme objasniť potenciálnu súvislosť medzi metabolizmom testikulárnych buniek a ich rezistenciou na cisplatinu.

Materiál a metódy

Práca s bunkovými líniami. Popísané experimenty boli robené na nádorových bunkách semenníkov NTERA-2 vnímavých, ale aj rezistentných na cisplatinu [5] a bunkovej línii HEK 293T. Tieto bunky sme kultivovali v Eaglovom médiu, modifikovanom podľa Dulbecca, ktoré obsahovalo 10% inaktivované fetálne teľacie sérum a 0,1% gentamicín. Bunky sme kultivovali v termostate pri teplote 37 °C, 5% CO₂ a 21% O₂, alebo v hypoxickej stanici s 1% O₂, 5% CO₂ a 37 °C.

Western blot. Na Petriho miskú s priemerom 6 cm sme nasadili 400 000 buniek NTERA-2 S (senzitívne) a R (rezistentné) na cisplatinu. Bunky sme 24 hodín inkubovali v normoxických (NO), alebo v hypoxických (HY) podmienkach a následne sme ich zlyzovali pomocou RIPA lyzačného roztoku (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholát sodný, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 7.5). Po elektroforetickej separácii proteínov na 10 % SDS PAGE a ich transfere na PVDF membránu (Millipore), sme membránu vysýtili v 5 % odtučnenom mlieku. Použité primárne protilátky LDHA 1:10 000 (Cell Signaling), LDHB 1:5000 (Thermo Fisher), LDHC 1:1000 (Thermo Fisher), BACT 1:10 000 (Cell Signaling) boli nariedené v roztoku *Intercept™ Blocking Buffer* (Li-Cor Biosciences). Ako sekundárne protilátky sme použili fluorescenčne značené protilátky IRDye 800 CW (green), IRDye 680 RD (red), nariedené v roztoku *Intercept™ Blocking Buffer* (Li-Cor Biosciences) 1:10 000. Na detekciu expresie proteínov sme využili *Odysey CLx Imaging System* (Li-Cor Biosciences).

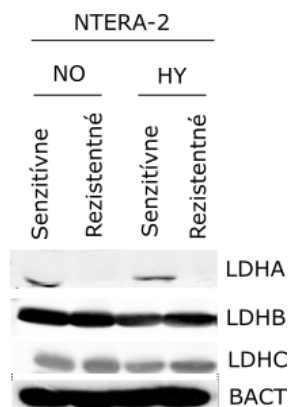
Stanovenie hladiny extracelulárneho laktátu. Zo senzitívnych a rezistentných testikulárnych buniek vyrastených v monovrstve na Petriho miske s priemerom 6cm sme odsali médium, v ktorom sme detegovali množstvo laktátu. Na stanovenie hladiny extracelulárneho laktátu sme použili luciferázový kit *Lactate-Glo™ Assay* (Promega), pričom sme postupovali podľa priloženého návodu. Hladinu laktátu vo vzorkách sme merali na *SYNERGY H4 microplate reader* (BioTek).

Vyradenie génu ldha v senzitívnych bunkách NTERA-2. LDHA knockauty sme vytvorili pomocou metódy CRISPR-Cas9, pričom sme použili vektor Lenti CRISPR V2 (Addgene) a príslušné guide RNA (5'CACCGAGCCCGATTCCGTTACCTAA3' a 5'AAACTTAGGTAACGGAATCGGGCTC3') (Microsynth), ktoré sme nadizajnovali použitím online programu DNA2.0 gRNA Design Tool. Anelované a fosforylované oligonukleotidy (guide RNA + štiepne miesta) sme zligovali s linearizovaným vektorom pLentiCrisprV2. Následne sme ligačnou zmesou otransformovali kompetentné bunky JM109. Transformované kolónie sme inokulovali do LB média, ktoré obsahovalo 100µg/ml ampicilínu a nechali sme ich rásť cez noc. Plazmidy sme izolovali použitím MiniPrepu (Promega). Bunkovú líniu HEK293T sme za pomoci CaCl₂ otransfekovali osekvenovaným naklonovaným konštruktom pLentiCRISPR V2 LDHA, spolu s plazmidmi psPAX2 a pMD2. G. Po 48h sme z otransfekovaných buniek pozbierali médium s vírusom a následne sme ním transdukovali senzitívne bunky NTERA. Transdukované bunky sme týždeň selektovali s 1µg/ml puromycínom (Sigma-Aldrich) a následne sme u vyrastených klonov overili expresiu LDHA pomocou Western blotu.

Zvyšovanie citlivosti rezistentných buniek NTERA-2 cieľným ovplyvňovaním ich metabolizmu. Na 96-jamkovú platničku sme založili senzitívne a rezistentné bunky NTERA-2 v počte 1000 buniek na jamku. Na ďalší deň sme na bunky pridali látky: 50µM cisplatinu a 25 mM oxamát (inhibitor LDH). Po 7 dňovej inkubácii v termostate sme sledovali viabilitu buniek pomocou fluorescenčného kitu *Cell Titer Blue Kit* (Promega), pričom sme postupovali podľa priloženého protokolu. Fluorescenčný signál zo živých vzoriek sme detegovali pri vlnových dĺžkach: excitácia 530 a emisia 590, pomocou *SYNERGY H4 microplate reader* (BioTek).

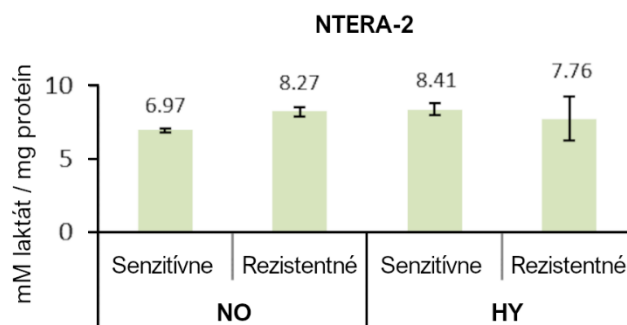
Výsledky a diskusia

Pomocou Western blotu sme najväčšie rozdiely detegovali v expresii izoforiem laktát dehydrogenázy (LDH). Senzitívne bunky exprimovali všetky tri izoformy (LDHA, LDHB, LDHC), kdežto u rezistentných absentovala expresia LDHA.



Obrázok 1. *Expresia izoforiem LDH u bunkovej línie NTERA-2. Senzitívne bunky exprimujú všetky tri izoformy LDH, na rozdiel od rezistentných buniek u ktorých absentuje expresia izoformy A.*

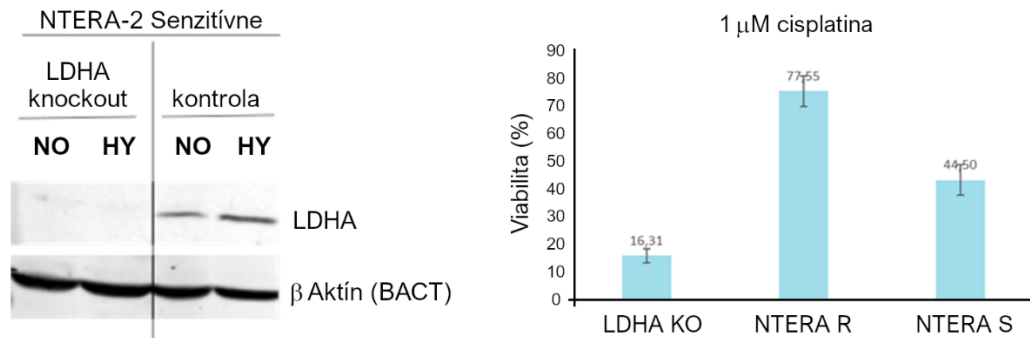
Napriek tomu, že sme nedetegovali expresiu LDHA v rezistentných bunkách, v normoxických podmienkach bola hladina extracelulárneho laktátu zvýšená u rezistentných buniek v porovnaní so senzitívnymi bunkami. V hypoxických podmienkach bola hladina extracelulárneho laktátu porovnateľná u senzitívnych aj rezistentných buniek. Preto predpokladáme, že na produkcii laktátu v rezistentných bunkách NTERA-2 sa budú v hypoxických podmienkach podieľať aj iné izoformy LDH.



Obrázok 2. *Hladina extracelulárneho laktátu u buniek NTERA-2. V normoxii mali rezistentné bunky NTERA-2 mierne zvýšenú hladinu extracelulárneho laktátu v porovnaní so senzitívnymi bunkami. V hypoxii bola hladina extracelulárneho laktátu porovnateľná u senzitívnych a rezistentných buniek.*

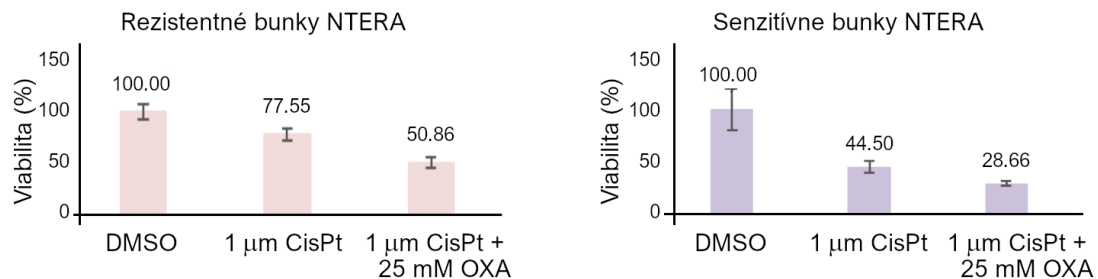
Na základe predošlých výsledkov sme predpokladali, že absencia LDHA môže zohrávať dôležitú úlohu v rezistencii na cisplatínu. Význam absencie LDHA pre rezistenciu buniek sme overili vyradením génu pre LDHA v senzitívnych bunkách

pomocou metódy CRISPR a následným sledovaním ich viability po opracovaní cisplatinou. Ukázalo sa, že vyradenie LDHA u senzitívnych buniek NTERA nezvýšilo ich rezistenciu na cisplatinu.



Obrázok 3. Vyradenie génu *ldha* v senzitívnych bunkách NTERA-2 nezvýšilo ich rezistenciu na cisplatinu. Senzitívne bunky NTERA s vyradenou LDHA boli citlivejšie na cisplatinu ako kontrolné senzitívne bunky.

Cielená modulácia metabolizmu nádorových buniek sa javí ako úspešná stratégia v liečbe malígnych ochorení. Aj to bol jeden z dôvodov, prečo sme sa rozhodli cieľným ovplyvňovaním metabolizmu rezistentných buniek NTERA-2 zvýšiť ich citlivosť na cisplatinu. V našich experimentoch sme kombináciou 1 μM cisplatinu (CisPt) s 25 mM oxamátom (OXA) navodili u buniek NTERA-2 vyššiu na cisplatinu.



Obrázok 4. Ovplyvňovanie metabolizmu buniek NTERA-2 s cieľom zvýšiť ich citlivosť na cisplatinu. Znížená viabilita rezistentných buniek NTERA-2 poukazuje na fakt, že kombinácia 1 μM cisplatinu a 25 mM oxamátu zvýšila citlivosť týchto buniek na cisplatinu.

Záver

Z našich experimentov sa javí, že senzitívne a rezistentné bunky NTERA majú odlišné metabolické nároky, ktoré môžeme zhrnúť v nasledujúcich bodoch: senzitívne a rezistentné bunky NTERA-2 sa líšia expresiou LDHA; na produkcii laktátu sa v bunkovej línii NTERA-2 podieľajú pravdepodobne B a C izoformy LDH; knockout *LDHA* je citlivejší na cisplatinu ako NTERA S a NTERA R; zdá sa, že sa nám podarilo zvýšiť citlivosť rezistentných buniek na cisplatinu kombináciou oxamátu a cisplatinu.

Predpokladáme, že objasnenie metabolických stratégií nádorových buniek semenníkov môže pomôcť vyriešiť problém s rezistenciou na cisplatinu, čo prispeje k zvýšenému prežívaniu pacientov s týmto onkologickým ochorením.

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol za podpory grantov: VEGA 2/0078/19, VEGA 2/0061/21, VEGA 1/0349/21, APP0318

Použitá literatúra

- [1] ALVES, M. G., MARTINS, A. D., RATO, L., MOREIRA, P. I., SOCORRO, S., OLIVEIRA, P. F. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2013, 1832(5), 626-635.
- [2] WARBURG, O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956, 123(3191), 309-314.
- [3] DENKO, N. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer*. 2008, 8, 705-713.
- [4] CHENG, L., ALBERS, P., BERNEY, D.M., et al. Testicular Cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018, 4(29) 1-24 .
- [5] SCHMIDTOVA, S., KALAVSKA, K., GERCAKOVA, K., et al. Disulfiram overcomes cisplatin resistance in human embryonal carcinoma cells. *Cancers*. 2019, 11, 1224-1246.

SLEDOVANIE VPLYVU NÍZKYCH DÁVOK IONIZUJÚCEHO ŽIARENIA NA GÉNOVÚ NESTABILITU U INTERVENČNÝCH RÁDIOLÓGOV NA SLOVENSKU



Dominika Kochanová¹, Sachin Gulati¹, Pavol Košík¹, Matúš Durdík¹, Lukáš Jakl¹, Milan Škorvaga¹, Katarína Bérešová¹, Eva Marková¹, Dušan Šalát^{2,3}, Andrej Klepanec², Igor Belyaev¹

¹*Oddelenie Radiobiológie, Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied v.v.i., Bratislava, Slovenská republika*

²*Fakulta zdravotníckych vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Trnava, Slovenská republika*

³*Ústav radiačnej ochrany s.r.o., Trenčín, Slovenská republika*

Úvod

Vysoké dávky ionizujúceho žiarenia (IR) sú častým exogénnym karcinogénom, ktorý sa podieľa na vzniku dvojvláknových zlomov DNA (DSB) [1]. Ak oprava DSB neprebehne správne mnohokrát dochádza k tvorbe rôznych chromozómových aberácií (CA) a mikrojadier (MN) [2]. Práve vznik translokácií, jedného z typov CA, a s tým spojená tvorba preleukemických fúzných génov (PFG) sa považuje za primárnu udalosť vedúcu k leukémii [3]. Rôzne epidemiologické štúdie spájajú leukémiu nielen vysokými dávkami IR, ale aj s dlhotrvajúcimi nízkymi dávkami IR (do 100 mSv), o ktorých nemáme doposiaľ dostatok informácií [4]. Ohrozenými sa stávajú najmä intervenční rádiológovia, ktorí sú vo svojich povolaniach každodenne vystavení pôsobeniu takéhoto typu IR. Hoci sa jedná iba o malé dávky problémom však ostáva ich akumulácia pri opakovanej expozícii.

Doposiaľ však existuje len málo experimentálnych prác, ktoré sa zaoberajú analýzou vplyvu dlhotrvajúcich nízkych dávok IR. Napriek niekoľkým rozdielom medzi štúdiami značný počet publikácií uvádza zvýšenú úroveň poškodenia DNA a genómovú nestabilitu po expozícii nízkym dávkam IR [5-7]. Tieto štúdie obsahujú mnohokrát obmedzenú metodiku, analýzu iba jedného biomarkeru alebo vplyv rôznych zmätočných premenných. V našej práci sme sa rozhodli sledovať poškodenie DNA pomocou reziduálnych 53BP1 DNA opravných fokusov čiže fluorescenčne značených proteínov zapojených do opravy DNA. Takéto reziduálne fokusy pretrvávajú v bunkách aj dlho po ožiarení a predstavujú neopravené alebo nesprávne opravené DSB [8]. Naším ďalším cieľom bolo sledovanie genómovej nestability prostredníctvom analýzy chromozómových aberácií, mikrojadier u intervenčných rádiológov. Taktiež sme skúmali aj prítomnosť translokácií v MLL géne (*Histone-lysine N-methyltransferase 2A*) ako jedného z najčastejšie mutovaných génov pri adultných leukémiách.

Materiál a metódy

Probandi. Na naše experimenty sme využili periférnu krv od 12 intervenčných rádiológov pracujúcich v slovenských nemocniciach, ktorí vo svojom povolání denne primajú nízke dávky IR. Ako kontrolná skupina nám slúžilo 14 probandov bez pracovnej záťaže IR. Pred experimentom všetci zo zúčastnených vyplnili dotazníky o ich zdravotnom stave a životnom štýle. Aby sme predišli nechcenému vplyvu zmätočných premenných obe skupiny boli rovnomerne rozdelené vzhľadom na vek a pohlavie. Zo štúdie boli vylúčení jedinci s históriou chemoterapie, rádioterapie alebo rakoviny.

Izolácia mononukleárných buniek a IFC. Mononukleárne bunky sme izolovali z periférnej krvi probandov gradientovou centrifugáciou s použitím média na separáciu lymfocytov. Adherentné monocyty sme odstránili 2 hodinovou inkubáciou vzoriek (5% CO₂ a 37 °C) a množstvo zostávajúcich buniek sa spočítalo v Burkerovej komore s použitím 0,4 % trypanovej modrej.

Zobrazovacia prietoková cytometria. 53 BP1 DNA opravné fokusy sme analyzovali pomocou zobrazovacej prietokovej cytometrie prostredníctvom ImageStreamX-100 (Amnis, Seattle, Washington, Spojené štáty americké). Ako primárna protilátka nám slúžila monoklonálna myšia protilátka 53BP1 v koncentrácii 1:20 (dar z laboratória prof. Halazonetisa) v kombinácii so sekundárnou anti-myššiou osliou protilátkou Alexa fluor 488 (1:25) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Spojené štáty americké). Na vizualizáciu DNA sme použili 3 µl 3 µM DAPI (Sigma Aldrich). Analyzovali sme minimálne 10 000 buniek na vzorku pomocou objektívu so 63-násobným zväčšením a štyrmi laserami (405, 488, 656, 785 nm). Na vyhodnotenie našich výsledkov sme použili softvér IDEAS.

Analýza chromozomových aberácií a mikrojadier. Periférnu krv sme kultivovali pri 37°C a 5% CO₂ počas 72 hodín v médiu RPMI-1640 obohateného o fytohemaglutinínom M (Gibco/Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, United States) na iniciáciu bunkového delenia. Za účelom analýzy MN sme na zastavenie bunkového delenia po 44 hodinách pridali cytochalazín-B (Sigma Aldrich) v konečnej koncentrácii 6 µg/ml. V prípade analýzy CA bol do kultúry pridaný kolchicín (Sigma Aldrich) v koncentrácii 0,2 µg/ml po 71 hodinách 15 minútach inkubácie. Následne sme k bunkám pridali hypotonický roztok (0,075 M KCl) a fixovali ich pomocou metanolu a kyseliny octovej (3:1). Po nanesení lymfocytov na sklíčka sme ich farbili a sušili 4% Giemsovým roztokom. Tisíc metafáz sa automaticky analyzovalo dvojito zaslepeným spôsobom pomocou fluorescenčného mikroskopu Axio Imager a softvéru Metafer 3.6 (MetaSystems, Altlußheim, Nemecko). Dicentrické a *ring* chromozómy boli manuálne analyzované vyškolenými odborníkmi. Na stanovenie frekvencie dvojjadrových buniek s MN sa u každého subjektu zaznamenalo celkovo 1000 dvojjadrových buniek.

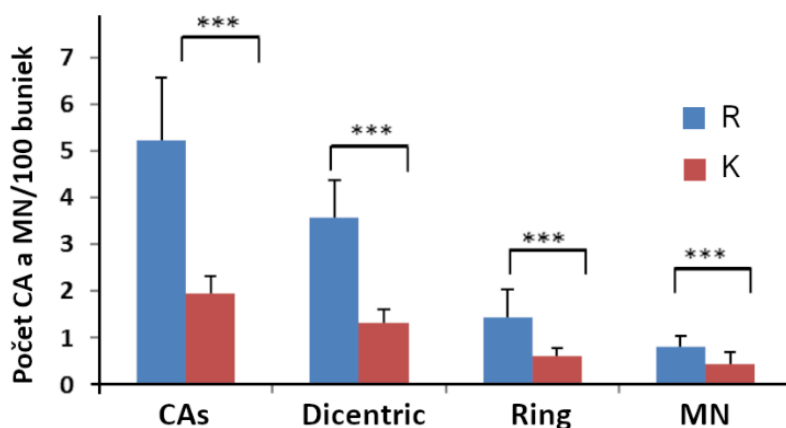
Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH). Mononukleárne bunky boli fixované na polyzínovom podložnom sklíčku a hybridizované s priamo značenou MLL BreakApart sondou (CytoCell Aquarius, Cambridge, Spojené kráľovstvo). Táto sonda nám umožňuje okrem translokácií *MLL* génu sledovať aj jeho amplifikácie alebo delécie.

Intaktný *MLL* gén je vizualizovaný žltým signálom, ktorý vznikol kolokalizáciu 2 signálov (červené a zelené spektrum). Zatiaľ čo červený signál predstavuje *MLL* segment medzi bodom zlomu a génom *PHLDB1* (*Pleckstrin homology like domain family B member 1*) – bližšie k teloméru, zelený signál odráža *MLL* segment medzi génom *UBE4A* (*Ubiquitination factor E4A*) a bodom zlomu – bližšie k centroméru. Translokácia *MLL* génu v bunke je charakterizovaná rozpadom žltého fluorescenčného signálu na 1 červený a 1 zelený signál. Amplifikácia sa prejavuje prítomnosťou jedného zeleného/červeného nadbytočného signálu. Naopak delícia sa deteguje stratou zeleného signálu, červeného signálu alebo celého génu *MLL*. Najmenej 100 buniek z každej vzorky sa manuálne analyzovalo fluorescenčnou mikroskopiou (Olympus BX51, Shinjuku, Japonsko) pri 100-násobnom zväčšení v červenom, zelenom a modrom spektre.

Štatistická analýza. Dáta sme štatisticky spracovali pomocou programov STATISTICA a Microsoft Excel s použitím analýzy variancie (ANOVA) s Fisher LSD. Výsledky kde $p > 0,05$ sme považovali za štatisticky významné. P-hodnota nižšia ako 1×10^{-5} bola zobrazená ako $p < 0,00001$

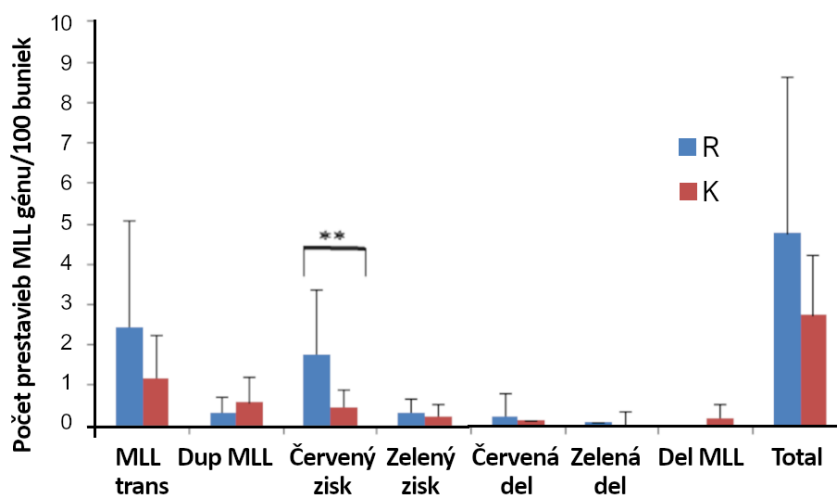
Výsledky a diskusia

V tejto práci sme ukázali, že chronické nízke dávky IR môžu mať pravdepodobne vplyv na vznik genómovej nestability u rádiológov. Naše zistenia z analýzy CA, ktoré dokázali signifikantne zvýšenú tvorbu celkového počtu skúmaných CA/dicentrických/ring chromozómov ($p > 0,00001$), potvrdili aj výsledky z analýzy MN (Obrázok 1).



Obrázok 1. Počet mikrojadier a chromozomových aberácií na 100 buniek u rádiológov (R) v porovnaní s kontrolami (K). Analyzovali sme frekvenciu celkových aberácií (CAs), dicentrických chromozómov (dicentric) a ring chromozómov. Štatisticky signifikantné rozdiely sú zobrazené ako $p < 0,001$ (***) . Údaje sú prezentované priemerom $\pm$ SD.

Pri štúdiu MN sme pozorovali vyššiu frekvenciu MN v skupine rádiológov v porovnaní s kontrolami ($p = 0,000542$). Naše poznatky sú v súlade s viacerými predchádzajúcimi štúdiami, kde taktiež objavili zvýšenú genómovej nestabilitu prostredníctvom analýzy CA a MN u pracovníkov na rádiologických oddeleniach [6, 7]. Pokiaľ je nám známe, ako prví sme sa rozhodli študovať prestavby *MLL* génu, ktorý je často mutovaný pri adultných leukémiách. Vo vzorkách rádiológov sme pomocou *breakapart* próby objavili zvýšené percento buniek s amplifikáciou červeného telomerického segmentu *MLL* génu, nachádzajúceho sa medzi bodom zlomu a génom *PHLDB1* ($p = 0,010356$) (Obrázok 2).



Obrázok 2. Počet prestavieb *MLL* génu na 100 buniek v skupine rádiológov (R) a kontrolnej skupine (K). Graf predstavuje *MLL* translokácie (*MLL* trans), duplikácie *MLL* génu (*dup MLL*), amplifikácie červeného/zeleného segmentu (červený/zelený zisk), delécie červenej/zelenej časti génu *MLL* (červená/zelená del), delécie celého génu *MLL* (*del MLL*) a celkové prestavby génu *MLL* (*total*) u rádiológov v porovnaní s kontrolami. Údaje sú prezentované ako priemer $\pm$ SD. ** $p < 0,01$.

Dĺžka amplifikovaných sekvencií, na ktorú nasadá naša próba však nie je jasne definovaná a preto môže zahŕňať aj sekvenciu obsahujúcu tento gén.

Mutácie v *PHLDB1* géne boli pozorované u rôznych typov rakoviny, najmä u gliómov [9]. Keďže poškodenie DNA je predpokladom vzniku CA a MN, rozhodli sme sa skúmať prítomnosť DSB pomocou reziduálnych 53BP1 DNA opravných fokusov. Pri tejto analýze sme však nezistili žiadny signifikantný rozdiel vo výskyte fokusov medzi skupinou rádiológov a kontrolami ($p > 0,05$). Naše zistenie podporuje aj Barsi a kol., ktorí vo svojich experimentoch taktiež nepreukázali zvýšený počet 53BP1 opravných fokusov u pracovníkov v rádiológii [5]. Jedným z vysvetlení, prečo sme nedokázali vyššiu hladinu opravných fokusov v periférnej krvi rádiológov, môže byť ich krátka životnosť *in vivo* (< 4 týždne) a neschopnosť hromadiť sa tak dobre ako CA a MN [10]. Pre lepšie objasnenie vplyvu nízkych dávok IR však plánujeme ďalšie experimenty s vyšším počtom probandov a rozšírenou metodikou o štúdium viacerých typov aberácií

ako sú chromozomálne gapy, fragmenty alebo acentrické chromozómy. Naše zistenia by mohli pomôcť k zavedeniu častejších preventívnych prehliadok, či sprísňovaní expozičných limitov u zdravotníckych pracovníkov vystavených IR v nemocniciach.

Pod'akovanie

Tento projekt bol financovaný z grantu IAEA Research Contract No: 24714

Použitá literatúra

- [1] CANNAN WJ, PEDERSON DS. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *Journal of Cellular Physiology* 2016; 231: 3-14.
- [2] NICKOLOFF JA, DE HARO LP, WRAY J, HROMAS R. Mechanisms of leukemia translocations. *Current Opinion in Hematology* 2008; 15: 338-345.
- [3] GREAVES MF, WIEMELS J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 639-649.
- [4] BERRINGTON DE GONZALEZ A, DANIELS RD, CARDIS E, CULLINGS HM, GILBERT E et al. Epidemiological Studies of Low-Dose Ionizing Radiation and Cancer: Rationale and Framework for the Monograph and Overview of Eligible Studies. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2020; 2020: 97-113.
- [5] BASRI I. K. H.; LUSIYANTI Y.; RAHAJENG N.; RAHARDJO T.; YUSUF D.; SOETOPO. S. Preliminary Study of Expression of γ -H2AX and 53BP1 in Medical Radiation Workers. *Radiation Environment and Medicine* 2019; 8: 70-76.
- [6] SAKLY A, AYED Y, CHAARI N, AKROUT M, BACHA H et al. Assessment of chromosomal aberrations and micronuclei in peripheral lymphocytes from tunisian hospital workers exposed to ionizing radiation. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013; 17: 650-655.
- [7] VELLINGIRI B, SHANMUGAM S, SUBRAMANIAM MD, BALASUBRAMANIAN B, MEYYAZHAGAN A et al. Cytogenetic endpoints and Xenobiotic gene polymorphism in lymphocytes of hospital workers chronically exposed to ionizing radiation in Cardiology, Radiology and Orthopedic Laboratories. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2014; 100: 266-274.
- [8] BELYAEV IY. Radiation-induced DNA repair foci: Spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 2010; 704: 132-141.

- [9] GAO X, MI Y, YAN A, SHA B, GUO N et al. The PHLDB1 rs498872 (11q23.3) polymorphism and glioma risk: A meta-analysis. *Asia Pac J Clin Oncol* 2015; 11: e13-21.
- [10] MARKOVA E, TORUDD J, BELYAEV I. Long time persistence of residual 53BP1/gamma-H2AX foci in human lymphocytes in relationship to apoptosis, chromatin condensation and biological dosimetry. *International Journal of Radiation Biology* 2011; 87: 736-745.

Metabolomika: Sľubný nástroj včasnej diagnostiky nádorových ochorení mozgu



Leškaničová Andrea¹, Šimko Patrik¹,
Agyagosová Natália¹, Kertys Martin², Kisková
Terézia¹

¹Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach,
Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických
vied, Šrobárova 2, 040 01 Košice, Slovenská republika

²Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska
fakulta v Martine, Malá Hora 4C, 036 01 Martin, Slovenská
republika

Úvod

Nádorové ochorenia mozgu a centrálnej nervovej sústavy predstavujú najfatálnejšiu skupinu nádorov a prispievajú k neustálej morbidite [1]. Za rok 2020 bolo v celom svete zaznamenaných 308 102 nových prípadov rakoviny mozgu a centrálnej nervovej sústavy, z čoho 168 346 boli muži a 139 756 prípadov pripadalo na ženy [2]. V rámci Slovenska za minulý rok pribudlo 550 nových prípadov, z čoho je evidovaných 420 úmrtí [3]. Patofyziologické zmeny, spojené s poškodením tkanív, sa začínajú desiatky rokov pred nástupom klinických prejavov [4]. Pochopenie skorých mechanizmov nádorových zmien mozgu je preto obzvlášť dôležité pre včasnú diagnostiku ochorenia a identifikáciu terapeutických cieľov, modifikujúcich ochorenie a celkové zlepšenie prognózy pacienta.

Metabolomika predstavuje vhodný a výkonný nástroj, ktorý deteguje poruchy v metabolizme, ktoré odrážajú zmeny v biologickom profile organizmu zdravých aj chorých [5-7]. Využitie metabolomiky by teda mohlo pomôcť pri identifikácii biomarkerov pre včasné diagnostikovanie nádorových zmien mozgu, ktorých diagnostika v neskorom štádiu značne zhoršuje prognózu pacientov. Okrem toho je schopná monitorovať terapeutickú odpoveď organizmu a pomôcť odhaliť progresiu ochorenia. Cieľom nášho experimentu bolo nájsť najvýznamnejšie zmenené lipidové metabolity počas procesu chemicky indukovanej rakoviny mozgu.

Materiál a metódy

Kvôli vytvoreniu nádorov sme v experimente pracovali s parentálnou generáciou a následne s ich potomstvom. Trom samiciam bol v posledný týždeň gravidity jednorazovo aplikovaný chemokarcinogén etylnitrozourea (ENU), pričom potomstvu

týchto samíc sa počas života vytvárali spontánne nádory na mozgu. Karcinogén bol podaný intraperitoneálne s koncentráciou 50 ml/kg telesnej hmotnosti jedinca rozpustený vo fyziologickom roztoku. Trom gravidným samiciam karcinogén aplikovaný nebol a teda potomstvu sa nádory netvorili. Mláďatá ostali s matkou po dobu jedného mesiaca a následne boli oddelené do osobitných plexitovaných vaníc podľa pohlavia. V samotnom experimente bolo použitých 40 laboratórnych potkanov kmeňa Sprague Dawley (Velaz, Praha 6, Česká republika). Vo veku štyroch mesiacov sme zvieratám odobrali krv na metabolomickú analýzu za použitia kitu AbsoluteIDQ® p180 (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Rakúsko). Pre extrakciu jednotlivých metabolitov bola použitá 96-jamková platňa a vzorky boli spracované podľa inštrukcii výrobcu. Na vzorkách krvného séra potkanov bolo uskutočnené meranie vybraných tried lipidov prostredníctvom ultra výkonnej kvapalinovej chromatografie s tandemovým hmotnostným spektrometrom (UHPLC-MS/MS). Hodnoty boli transformované log₂, aby sa získali distribuovateľné údaje a stabilizoval sa rozptyl. Analýza údajov a výpočet koncentrácií jednotlivých metabolitov boli uskutočnené prostredníctvom softvérového balíka MetIDQ (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Rakúsko). Výsledky boli ďalej spracované v štatistickom programe GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) s použitím normality a lognormality testu, a dvojitý výberový t-testu, čoho výsledkom bola hodnota P. Údaje boli taktiež štatisticky vyhodnotené prostredníctvom online nástroja na spracovanie metabolomických dát MetaboAnalyst 5.0.

Výsledky a diskusia

Z troch hodnotených skupín metabolitov – sfingomyelínov (SM), fosfatidylcholínov (PC) a lyzofosfatidylcholínov (lysoPC) vykazovali najkonzistentnejšie výsledky SM, kde u samcov bolo štatisticky významne zmenených 11 zo 14 metabolitov a u samíc 12 zo 14 metabolitov, pričom všetky mali vyššie hladiny u jedincov s nádormi mozgu oproti intaktným jedincom (Tabuľka 1).

*Tabuľka 1. Sfingomyelíny (SM) a hydroxysfingomyelíny (SM (OH)), u ktorých došlo v rámci pohlavia k štatisticky významným zmenám. Signifikancia vs INT * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.*

Metabolit	P hodnota ♂	Sig	↑/↓	P hodnota ♀	Sig	↑/↓
SM (OH) C14:1	0.0002	***	↑	0.0055	**	↑
SM (OH) C16:1	0.1978	NS		0.0377	*	↑
SM (OH) C22:1	<0.0001	***	↑	0.0055	**	↑
SM (OH) C22:2	<0.0001	***	↑	<0.0001	***	↑
SM (OH) C24:1	0.0001	***	↑	0.0055	**	↑
SM C16:0	0.0007	***	↑	0.4950	NS	
SM C16:1	0.0017	**	↑	<0.0001	***	↑

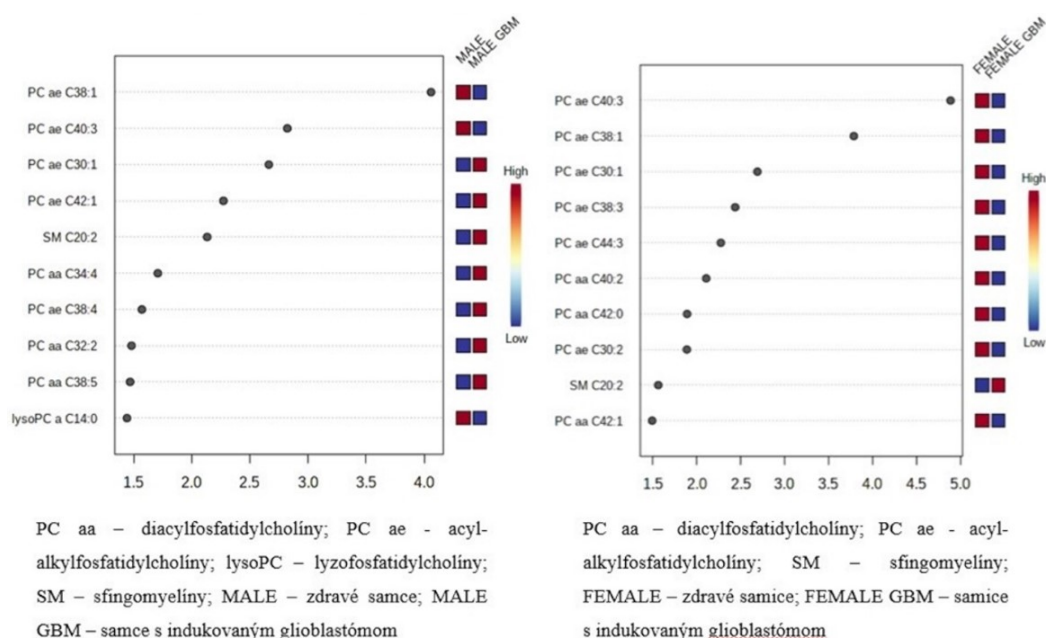
SM C18:0	0.5293	NS		0.1681	NS	
SM C18:1	0.3048	NS		<0.0001	***	↑
SM C20:2	<0.0001	***	↑	<0.0001	***	↑
SM C24:0	<0.0001	***	↑	0.0052	**	↑
SM C24:1	<0.0001	***	↑	<0.0001	***	↑
SM C26:0	<0.0001	***	↑	<0.0001	***	↑
SM C26:1	0.0002	***	↑	0.0055	**	↑

V dôsledku zachovania malignity a schopnosti prežiť a šíriť sa do okolitých tkanív si bunky GBM pravdepodobne vyvinuli rôzne stratégie, vrátane zmien v metabolizme sfingolipidov, čo v konečnom dôsledku vedie k ich zmeneným koncentráciám v nádorových bunkách. Sfingolipidy môžu taktiež slúžiť aj ako dôležité biomarkery, ktoré môžu byť využité pri zisťovaní progresie ochorenia, ako aj pri usmernení liečebných procesov [8].

Tabuľka 2. Lyzofosfatidylcholíny (lysoPC), u ktorých došlo v rámci pohlavia k štatisticky významným zmenám. Signifikancia vs INT * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$.**

Metabolit	P hodnota ♂	Sig	↑/↓	P hodnota ♀	Sig	↑/↓
lysoPC a C14:0	<0.0001	***	↓	0.0055	**	↓
lysoPC a C16:0	0.0096	**	↓	0.4976	NS	
lysoPC a C16:1	0.0025	**	↓	0.0377	*	↓
lysoPC a C17:0	0.0041	**	↑	0.0139	*	↑
lysoPC a C18:0	0.9737	NS		0.0055	**	↑
lysoPC a C18:1	0.0301	*	↓	0.9825	NS	
lysoPC a C18:2	0.1978	NS		0.9825	NS	
lysoPC a C20:3	0.4475	NS		0.4976	NS	
lysoPC a C20:4	0.0042	**	↑	0.9825	NS	
lysoPC a C24:0	<0.0001	***	↑	0.0818	NS	
lysoPC a C26:0	0.0086	**	↑	0.0377	*	↓
lysoPC a C26:1	0.0144	*	↑	0.0377	*	↓
lysoPC a C28:0	0.7093	NS		0.0377	*	↓
lysoPC a C28:1	0.1978	NS		0.0055	**	↓

V skupine lysoPC bolo signifikantne zmenených 9 zo 14 metabolitov u samcov a 8 zo 14 u samíc (Tabuľka 2) a v skupine PC 49 zo 74 u samcov a 36 zo 74 u samíc v porovnaní so zdravými jedincami.



Obrázok 1. VIP (Variable importance in projection) skóre vyjadruje 10 najvýznamnejších metabolitov, identifikovaných počas diskriminačnej analýzy PLS-DA.

Podľa VIP skóre (Obrázok 1) boli z celkového počtu 102 hodnotených metabolitov u samcov najsignifikantnejšie zmenené metabolity PCaeC38:1, PCaeC40:3, PCaeC30:1, a u samíc PCaeC40:3, PCaeC38:1, PCaeC30:1.

Fosfatidylcholíny predstavujú najvýznamnejšiu skupinu, zmenenú počas nádorového ochorenia mozgu. Kelimu a kol. vykonali v roku 2016 experiment s cieľom identifikovať možné biomarkery nádorového metabolizmu. Analyzovali metabolity krvnej plazmy pacientov s gliómom, pričom u pacientov s rakovinou mozgu boli v porovnaní s kontrolnou skupinou nájdené nižšie koncentrácie cholínu [9]. Možným dôvodom znížených koncentrácií tohto metabolitu v krvi je, že nádorové bunky prijímajú cholín vo zvýšenej miere a akumulujú metabolity, ktoré ho obsahujú. Bolo preukázané, že zhromažďovanie fosfolipidov, obsahujúcich cholín, má súvis s agresívnejším fenotypom rakoviny [10].

Metabolomika predstavuje sľubný nástroj na identifikovanie zmenených metabolických dráh. Je potrebné intenzívne pátrať po možnostiach využitia metabolomických analýz v klinickej praxi.

PodĎakovanie. Štúdia vznikla za finančnej podpory grantovej schémy VEGA (1/0658/20), VEGA (1/0081/20) a VVGS-PF-2022-2136.

Použitá literatúra

- [1] Miller, K., et al., Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021. 71.
- [2] WHO. Brain, central nervous system. 2020; Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/31-Brain-central-nervous-system-fact-sheet.pdf>.
- [3] WHO. Slovakia. 2021; Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/703-slovakia-factsheets.pdf>.
- [4] Kiskova, T., et al., Thermography use as a Predictive Tool in Early Diagnosis of Breast Cancer Adv Tech Biol Med 2017. 5.
- [5] Leskanicova, A., et al., Sex-dependent differences in stress-induced depression in Wistar rats are accompanied predominantly by changes in phosphatidylcholines and sphingomyelins. J Physiol Pharmacol, 2021. 72(4).
- [6] Leskanicova, A., et al., Defining sex differences in selected lipid metabolites of blood plasma in Wistar rats. J Physiol Pharmacol, 2019. 70(4).
- [7] Leskanicova, A., et al., Sexual Dimorphism in Energy Metabolism of Wistar Rats Using Data Analysis. Molecules, 2020. 25(10): p. 2353.
- [8] Ryland, L.K., et al., Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. Cancer Biol Ther, 2011. 11(2): p. 138-149.
- [9] Kelimu, A., et al., Metabonomic signature analysis in plasma samples of glioma patients based on (1)H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. Neurol India, 2016. 64(2): p. 246-251.
- [10] Nakagami, K., et al., Increased choline kinase activity and elevated phosphocholine levels in human colon cancer. Jpn J Cancer Res, 1999. 90(4): p. 419-424.

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CAVEOLIN-1 IN PANCREATIC LESIONS



Loukas Stoupis¹, Eythimios Koniaris², Agapi Kataki³, Ioanna Angelioudaki¹, Alexandros Mitrousias¹, Alexandros-George Tzingounis¹, MM Konstadoulakis¹

¹*Second Department of Surgery, Aretaieion Hospital, Medical School, NKUA, Greece*

²*Department of Pathology-Anatomy, Hippocraton General Hospital of Athens, Greece*

³*First Department of Propaedeutic Surgery, "Hippokratio" General Hospital, Athens, Greece*

Introduction

Pancreatic neoplasms are a leading cause of cancer related mortality worldwide. The most common subtype (>90%) is pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), which arises from the pancreatic exocrine cells and has a 5-year survival rate of 11%, regardless of stage. The second most common subtype is pancreatic neuroendocrine neoplasm (pNEN), which arises from the pancreatic endocrine cells [1]. PNENs can be further classified, according to the WHO 2019 classification [2], into pancreatic neuroendocrine tumors (pNETs), which are benign, well differentiated neoplasms with favorable prognosis (85% 5-year survival rate) and pancreatic neuroendocrine carcinomas (pNECs), which are malignant, poorly differentiated tumors and have similar prognosis with the PDAC. Lately, a significant improvement in the understanding of the mechanisms involved in the progression of pancreatic neoplasms and the interplay with their microenvironment has been accomplished and many molecules have been proposed as potential prognostic and therapeutic biomarkers with Caveolin-1 being one of them.

Caveolins are predominantly membrane proteins and are constitutional parts of caveolae, which are small cave-like invaginations of the cell membrane which are implicated in cell communication, signaling cascades and transport. Caveolin-1 is the main representative of the caveolin protein family and is expressed in various cell types, most predominantly in adipocytes, pneumocytes and fibroblasts.

The differential expression of Caveolin-1 has been shown to correlate with pathophysiological processes and clinical outcomes in neoplastic disease. Its role in tumor formation and progression has been proven to be stage- and cell type-dependent [3]. In early stages of the disease, Caveolin-1 is a well-established tumor suppressor, as evidenced by studies in lung, breast and colon cancer. Intracellular actions of Caveolin-

1, beyond its function in caveolae formation, have been implicated in the regulation of cancer through alternative signaling outputs [4]. In later stages though, high expression of Caveolin-1 has been associated with aggressive phenotypes, such as poorly differentiated tumors, metastatic disease and resistance to chemotherapy [5]. Furthermore, the levels of Caveolin-1 expression in the tumor microenvironment, especially in stromal cell populations supporting cancer (cancer-associated fibroblasts), have been proved to affect disease prognosis [6].

In pancreatic cancer, the role of Caveolin-1 has not been fully elucidated and often contradictory results are published. Therefore, the current research revolves around pancreatic malignancies including pancreatic ductal adenocarcinoma and pNENs where the relative data are limited. In the herein presented study, Caveolin-1 expression was explored in epithelium and stroma cell populations of pancreatic adenocarcinomas and NENs and their metastatic lymph nodes, in association with the degree of differentiation.

Materials and Methods

Patients and tissues Sixty-eight patients with histopathological confirmed pancreatic lesions were included in the present study, approved by 'Hippokration' Hospital's ethical committee. Patients were initially enrolled based on their pathological report following surgical excision but for data analysis, pNEN cases were reevaluated according to the latest 2019 WHO definition. Eventually, 11 patients were diagnosed with Pancreatic Neuroendocrine Carcinomas (pNECs), 14 with Pancreatic Neuroendocrine Tumors (pNETs) and 36 with Pancreatic Adenocarcinoma (PDAC) Demographic and clinical data were collected from the patients' medical files and are presented in Table 1.

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed using 5µm sections of formalin fixed paraffin embedded tissues. Briefly, slides were deparaffinized in xylene (10 minutes) and then rehydrated through graduated alcohols (100%, 90%, and 70%), followed by a wash in 1x Phosphate Buffered Saline (PBS), for 10 minutes each. The slides were subjected to two cycles of antigen retrieval for 6 minutes in pH 6.0 citrate buffer in a microwave, cooled and washed in 1x PBS. Endogenous peroxidase activity was blocked using 0.3% hydrogen peroxide for 10 minutes. After rinsing in PBS, slides were incubated with a primary antibody for Caveolin-1 (Cell Signaling, 1:800, Cat# 3267) at 1:800 overnight at 4°C. The detection was performed according to the ChemMateEnVision system (DAKO EnVision Detection Systems, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse) protocol. Sections were then counterstained with Mayer hematoxylin, dehydrated, cleared mounted using toluene-free mounting medium (Dako CS705) and observed by means of light Microscopy.

Pancreatic lesions and normal adjacent (NA) tissue were evaluated separately, and staining intensity scores were calculated using the immunoreactive score (IRS) by multiplying intensity (negative to high: 0-3) with the percentage of stained cells, grouped in 4 categories (0-10%=1, 11-50%=2, 51-80%=3, 81-100%=4). Data were statistically analyzed using SPSS 26 software.

Results

Staining intensity scores for Caveolin-1 were analyzed using the non-parametric tests to compare the expression profile in pancreatic NA epithelium and lesions' epithelium as well in the corresponding stroma respectively.

Table 1: Patients' demographic and clinical data.

Type of Pancreatic Cancer	Number of samples	Mean Age	SEX		Grade			Lymph node metastasis
			male	female	I	II	III	
PDAC	43	65.53±1.64	29	14	0	17	26	28
PNECs	11	61.18±3.2	6	5	0	0	11	5
PNETs	14	60.57±3.07	10	4	9	5	0	4

PDAC: In epithelial cell population staining for caveolin-1 was positive in 33% of the PDAC lesions and this result was statistically significant compared to NA epithelium (IRS:1.43±0.4 vs 0, $p=0.001$). Caveolin-1 protein expression was also significantly elevated in the stroma cells supporting PDAC epithelium compared to those supporting NA epithelium (IRS: 3.65±0.4 vs 2.32±0.3, $p<0.001$). This expression profile was not retained in the stroma cells in the metastatic lymph nodes as a reduction in caveolin-1 expression was observed (IRS:1.6±0.4, $p=0.02$) (*Figure 1*). Furthermore, although not reaching a statistical significance Caveolin-1 expression was induced in the cancer epithelium in patients with histological grade III disease compared to grade II and in patients with lymph node metastasis compared to non-metastatic disease ($p=0,1$ and $p=0,08$ respectively).

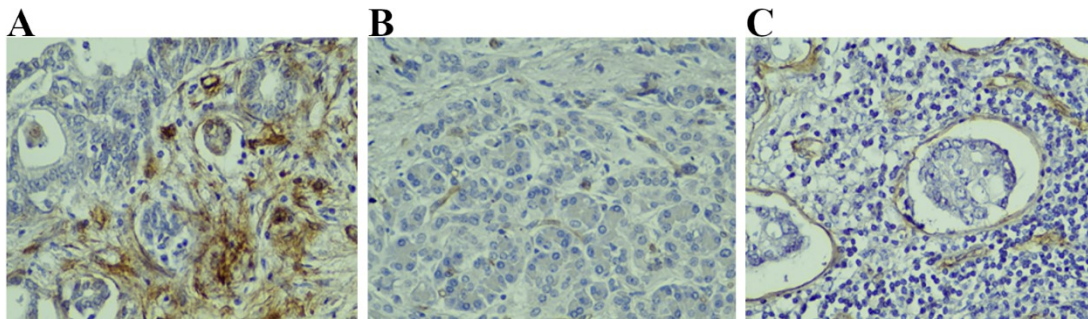


Figure 1. Immunohistochemical analysis of Caveolin-1 expression in PDAC (A) normal stroma (B) and lymph node stroma (C). Protein expression was increased in stromal cell populations supporting PDAC compared to both normal stroma ($p<0.001$) and lymph node stroma ($p=0.02$).

NENs: Caveolin-1 expression was only detected in PNECs epithelium (IRS:1±0.5, $p=0.02$). Still, caveolin expression was absent in the epithelium of those PNEC patients

presenting infiltrated LNs whereas, in the absence of infiltrated LN caveolin expression was rather increased (1.83 ± 0.9 , $p=0.034$).

Discussion

This study investigates the expression profile of caveolin-1 in some of the most abundant types of pancreatic neoplasms. In our PDAC cohort, epithelial Caveolin-1 was elevated in cancer cells compared to those present in the normal adjacent epithelium and it was also associated with more advanced disease as represented by the presence of lymph node invasion and high histological grade (although statistical significance was not reached). Thus, the herein presented results are in accordance with the pre-existing literature, since many studies have also inclined towards caveolin-1 as a negative prognostic biomarker in pancreatic adenocarcinoma [5, 7, 8]. Still, its role within tumor's microenvironment seems to be rather complex. In the present study, although Caveolin-1 was found upregulated in cancer stroma compared to normal stroma, that was not related to advanced disease and furthermore it was reduced in the microenvironment sustaining an infiltrated lymph node. Recent data from a study using a human pancreatic cancer model showed that the downregulation of caveolin-1 offered growth advantage in cancer-associated fibroblasts and was associated with unfavorable outcomes [6]. Caveolin-1 expression was also associated with poor differentiation in our NEN cohort as evidenced by the difference between the benign NETs and the malignant NECs. Interestingly, lower levels of epithelial Caveolin-1 were found in metastatic disease, indicating a different pathway of progress in NEC patients compared to PDAC. To our knowledge, this is the first study to investigate the role of Caveolin-1 in neuroendocrine tumors further supporting a key and complex role for Caveolin-1 in the progress of pancreatic lesions besides the limited number of patients included. Thus, further research is required to elucidate the mechanisms behind this correlation and therapeutic intervention against caveolin-1 in pancreatic cancer could be developed.

Acknowledgments

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 857381, project VISION

References

- [1] Gao H-L, Wang W-Q, Yu X-J, Liu L. Molecular drivers and cells of origin in pancreatic ductal adenocarcinoma and pancreatic neuroendocrine carcinoma. *Exp Hematol Oncol*. 2020;9(1):28.
- [2] Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182–8.

- [3] Campos A, Burgos-Ravanal R, González MF, Huilcaman R, Lobos González L, et al. Cell Intrinsic and Extrinsic Mechanisms of Caveolin-1-Enhanced Metastasis. *Biomolecules*. 2019 Jul;9(8).
- [4] Díaz MI, Díaz P, Bennett JC, Urra H, Ortiz R, et al. Caveolin-1 suppresses tumor formation through the inhibition of the unfolded protein response. *Cell Death Dis*. 2020 Aug;11(8):648.
- [5] Chatterjee M, Ben-Josef E, Thomas DG, Morgan MA, Zalupski MM, et al. Caveolin-1 is Associated with Tumor Progression and Confers a Multi-Modality Resistance Phenotype in Pancreatic Cancer. *Sci Rep*. 2015 Jun; 5:10867.
- [6] Suzuoki M, Miyamoto M, Kato K, Hiraoka K, Oshikiri T, et al. Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2002 Nov;87(10):1140–4.
- [7] Kamposioras K, Tsimplouli C, Verbeke C, Anthoney A, Daoukopoulou A, et al. Silencing of caveolin-1 in fibroblasts as opposed to epithelial tumor cells results in increased tumor growth rate and chemoresistance in a human pancreatic cancer model. *Int J Oncol*. 2019 Feb;54(2):537–49.
- [8] Bittoni A, Giampieri R, Pecci F, Pinterpe G, Mandolesi A, et al. Retrospective Cohort Study of Caveolin-1 Expression as Prognostic Factor in Unresectable Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Cancer Patients. *Curr Oncol*. 2021 Sep;28(5):3525–36.

ÚČINKY KYSELINY GYROFOROVEJ NA NÁDORY MOZGU



Patrik Šimko¹, Andrea Leškaničová¹,
Filip Mochnacký¹, Zuzana Jendželovská¹,
Ľudmila Verbóová², Zuzana Benetinová²,
Rastislav Jendželovský¹, Alžbeta
Blichárová², Terézia Kisková¹

¹Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach,
Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických
a ekologických vied, Šrobárova 2, Košice

²Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach,
Lekárska fakulta, Ústav patológie, Rastislavova 43,
Košice

Úvod

Nádorové ochorenia patria medzi hlavné príčiny chorobnosti a úmrtnosti na svete. Nádor na mozgu je jedným z najimpozantnejších nádorov vôbec [1]. Glioblastóm, ako najbežnejší a najagresívnejší typ primárneho maligného nádoru centrálného nervového systému, je stále dôležitou výzvou z hľadiska diagnostiky a liečby. Chemoterapeutická liečba temozolomidom prináša neuspokojivé výsledky a prognózu a kvalitu života pacientov výraznejšie nezlepšuje. Taktiež doposiaľ neexistujú žiadne schválené diagnostické a prognostické biomarkery a ani nové terapie, akými sú napríklad inhibítory imunitného kontrolného bodu pre glioblastóm [2].

Kyselina gyroforová (GA) je typ aromatického polyfenolu patriaceho k skupine sekundárnych metabolitov produkovaných lišajníkmi. Tieto látky chránia rastlinu pred stresom vyvolaným nepriaznivými vplyvmi okolia. GA sa radí medzi depsidy s popísanými antimykotickými, antiinflamačnými, antiproliferatívnymi, UV protektívnymi, protinádorovými, či cytostatickými vlastnosťami [3]. Jej účinky na nádory mozgu *in vivo* však doteraz popísané neboli.

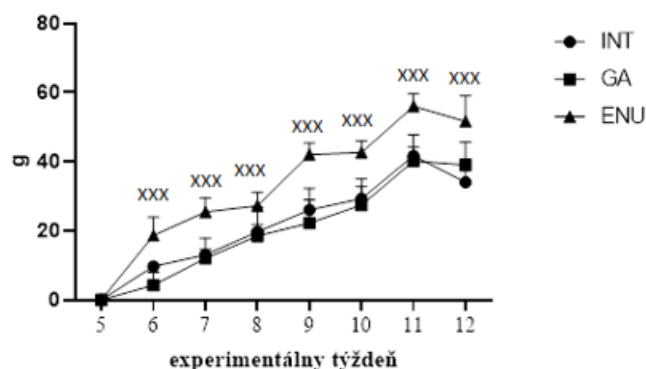
Materiál a metódy

V experimente sme pracovali s rodičovskou generáciou samíc (n=3) a samcov (n=3) laboratórnych potkanov kmeňa Fischer F344. Samce a samice sme k sebe následne pripustili. Po potvrdení gravidity u samíc sme vybraným samiciam na 15. deň podali jednorazovú intraperitoneálnu dávku N-etyl-N-nitrozourey (ENU) v koncentrácii 100 mg/kg hmotnosti. Intaktné samice ovplyvnené neboli. Po 30 dňoch sme potomstvo od rodičov odstavili a rozdelili podľa pohlavia. V experimente sme pracovali s tromi experimentálnymi skupinami tvorenými výlučne samicami. Prvá skupina samíc bola intaktná (INT) (n=6), druhú skupinu tvorilo šesť samíc, ktorým bola podávaná kyselina

gyroforová (GA) a tretiu skupinu samíc (n=11) tvorili nádorové neliečené samice (ENU). Liečeným samiciam bola GA podávaná v dávke 10 mg/kg hmotnosti v roztoku 10% etanolu po dobu 2 mesiacov *per os*. V posledný deň experimentu sme laboratórne potkany usmrtili rýchlou dekapitáciou. Po usmrtení sme zvieratám vyexcidovali mozgy, ktoré sme následne podrobili histologickej analýze, o. i. sme sledovali hmotnosť a histologickú stavbu pečene s cieľom odpozorovať možné zmeny, ktoré by mohla GA na pečeni spôsobiť. Krv sme potkanom odoberali okamžite po dekapitácii. Krvné vzorky sme analyzovali pomocou veterinárneho hematologického analyzátora EXIGO H400. Výsledky sme vyhodnocovali v štatistickom programe GraphPad Prism 8.0.1. a to na základe normálneho rozdelenia dát príslušným testom a posttestom. Hodnoty sú uvedené ako priemer $\pm$ smerodajná odchýlka (SD - standard deviation).

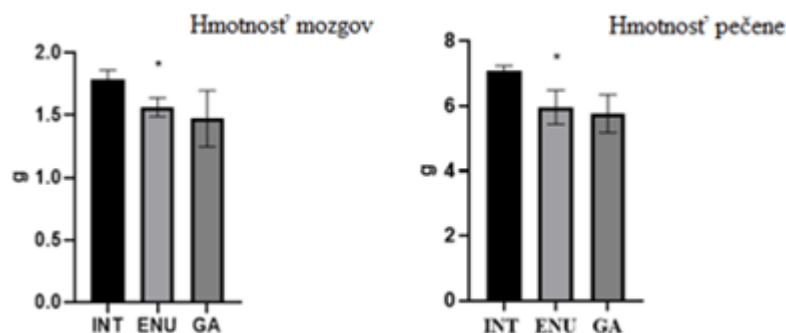
Výsledky

Prírastok hmotnosti. Počas experimentu sme vypočítali prírastok hmotnosti. Nádorové zvieratá ENU skupiny priberali najviac v porovnaní s INT a nádorovou GA skupinou. GA dokázala znížiť prírastok hmotnosti na úroveň INT zvierat ($P < 0,001$).



Graf 1 Priemerný prírastok hmotnosti samíc potkanov Fischer F344. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer $\pm$ SD. Signifikancia vs ENU ^{xxx} $P < 0,001$.

Hmotnosť mozgov a pečene. Hmotnosť mozgov sa u samíc potkanov znížila po indukciu karcinogénom ($P < 0,05$). Pri nádorovej skupine liečenej s GA sa hmotnosť mozgov nezvýšila v porovnaní s INT samicami. V prípade hmotnosti pečene sme zaznamenali v nádorových skupinách samíc ENU a GA signifikantne nižšie hodnoty v porovnaní s INT skupinou ($P < 0,05$). Taktiež sme nezaznamenali histologické zmeny na pečeni experimentálnych zvierat.



Graf 2 Hmotnosť mozgov samíc potkanov kmeňa Fischer F344. Signifikancia vs INT * $P < 0,05$.
Finálna hmotnosť pečene samíc potkanov kmeňa Fischer F344. Signifikancia vs INT * $P < 0,05$.

Krvné parametre. Štatisticky signifikantný nárast trombocytov (PLT) ($P < 0,01$) sme pozorovali v oboch nádorových skupinách počas celého nádorového procesu. Zvyšné zložky krvi ovplyvnené neboli.

Tabuľka 1. Krvné parametre. Údaje sú vyjadrené ako aritmetický priemer $\pm$ SD. vs. INT ** $P < 0,01$.
HGB, hemoglobín; MCV, stredný objem červených krviniek; MPV, stredný objem krvných doštičiek;
HCT, hematokrit; RBC, červené krvinky; RDW, šírka distribúcie červených krviniek.

parameter	jednotky	INT	ENU	GA
WBC	$10^9/l$	$5,3 \pm 1,9$	$5,6 \pm 1,6$	$5,6 \pm 0,8$
LYM	$10^9/l$	$3,6 \pm 1,4$	$3,8 \pm 1,0$	$3,8 \pm 0,5$
LYM	%	$65,6 \pm 2,6$	$65,9 \pm 3,0$	$68,9 \pm 5,1$
MON	$10^9/l$	$0,23 \pm 0,06$	$0,28 \pm 0,05$	$1 \pm 0,10$
MON	%	$5,2 \pm 1,3$	$5,7 \pm 1,4$	$4,5 \pm 1,8$
NEU	$10^9/l$	$1,4 \pm 0,5$	$1 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,3$
NEU	%	$25,4 \pm 3,4$	$24,2 \pm 4,2$	$20,96 \pm 4,7$
EOS	$10^9/l$	$0,2 \pm 0,10$	$0,1 \pm 0,10$	$0,12 \pm 0,04$
HGB	g/l	$150,3 \pm 8,7$	$152,1 \pm 8,8$	$150,6 \pm 4,0$
MCH	pg	$18,8 \pm 0,2$	$19 \pm 0,4$	$19 \pm 0,2$
MCHC	g/l	$388 \pm 3,6$	$394,25 \pm 3,5$	$388,2 \pm 4,0$
RBC	$10^{12}/l$	$8 \pm 0,40$	$8,03 \pm 0,60$	$8 \pm 0,15$
MCV	fl	$48,5 \pm 0,30$	$48,1 \pm 1,04$	$49 \pm 0,50$
HCT	%	$38,7 \pm 2$	$38,6 \pm 2,1$	$39 \pm 0,8$
RDW	%	$12,5 \pm 0,5$	$13,4 \pm 0,4$	$13,02 \pm 0,6$
RDW _a	fl	$31,4 \pm 0,3$	$29,3 \pm 8,4$	$29 \pm 8,3$
PLT	$10^9/l$	$138,7 \pm 13,0$	$290 \pm 21,0$ **	$308,3 \pm 19,1$
MPV	fl	$5,03 \pm 0,4$	$4,9 \pm 1,3$	$4,8 \pm 1,4$

Nádory na mozgu. V skupine ENU lokalizácia nádorov zahŕňala parakochleárnu gliovú hmotu a *corpus callosum*. V skupine GA boli nádory lokalizované v *corpus*

callosum, zvukovej kôre, či *capsula interna*. Skupina ENU zaznamenala incidencia nádorov v 100% prípadoch, zatiaľ čo v skupine GA sa incidencia znížila na 82%.

Reaktívne formy kyslíka. V skupine ENU došlo k miernemu zvýšeniu ($P=0,57$) hladiny ROS v leukocytoch. V skupine GA sme zaznamenali štatisticky signifikantné zníženie hladiny ROS ($P<0,001$) v porovnaní s ENU skupinou, na úroveň INT zvierat.

Diskusia so závermi

Aj napriek pokroku a liečbe zostáva rakovina mozgu stále jednou z najagresívnejších nádorových ochorení vôbec, sprevádzaná vysokou mierou úmrtnosti a zlej prognostickej terapií. Nádorová kachexia je komplexná porucha, ktorá je zapríčinená metabolickou nerovnováhou a zápalom, čo vo výsledku vedie k extrémnemu chudnutiu u onkologických pacientov [4]. Zaznamenali sme zníženie hmotnosti pečene a mozgu pri oboch nádorových skupinách. V prípade krvných parametrov sme sledovali nárast počtu trombocytov nad fyziologickú hodnotu, čo je dôsledok zväčšujúceho sa glioblastómu [5]. Po indukcií nádoru sa hodnoty ROS v leukocytoch zvýšili. Keďže GA má preukázané antioxidačné vlastnosti, vďaka svojej polyfenolovej štruktúre, tak bola schopná svojim antioxidačným mechanizmom znížiť túto hladinu na úroveň INT zvierat. Zvýšené hladiny ROS sú preto spojené s rôznymi patologickými procesmi, a teda i nádormi [6, 7]. Nádorová skupina ENU vykazovala vyšší prírastok hmotnosti oproti GA a INT skupine, čo môže byť dôsledkom patologického vplyvu glioblastómu na os hypotalamus-hypofýza-nadobličky [8]. Avšak, v prípade nádorových zvierat liečených s GA v dávke 10 mg/kg hmotnosti, dokázala znížiť hmotnosť týchto zvierat na úroveň INT skupiny. Nakoľko doteraz nebola publikovaná žiadna štúdia, ktorá by sa zaoberala vplyvom GA na nádory mozgu *in vivo*, nie je možné naše výsledky porovnať s inými štúdiami. Tieto preliminárne výsledky môžu slúžiť ako podklad k ďalším štúdiám, zaoberajúcim sa mechanizmami účinku rôznych dávok GA na nádory mozgu.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla v rámci operačného programu Výskum a inovácie pre projekt Medicínsky univerzitný vedecký park v Košiciach (MediPark, Košice – Fáza II.), kód ITMS2014+: 313011D103, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a vďaka grantovým schémam VEGA (1/0658/20), VVGS PF (VVGS-PF-2019-1040), VVGS VUaVP35 (VVGS-2019-1071) a VVGS PF (VVGS-PF-2022-2136).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Steindl A, Berghoff AS. Brain metastases in metastatic cancer: a review of recent advances in systemic therapies. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2021 Mar;21(3):325-339. doi: 10.1080/14737140.2021.1851200

- [2] Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA*. 2013 Nov 6;310(17):1842-50.
- [3] Mohammadi M, Bagheri L, Badreldin A, Fatehi P, Pakzad L, Suntres Z, van Wijnen AJ. Biological Effects of Gyrophoric Acid and Other Lichen Derived Metabolites, on Cell Proliferation, Apoptosis and Cell Signaling pathways. *Chem Biol Interact*. 2022 Jan 5;351:109768.
- [4] Daas, SI, Rizeq, BR, Nasrallah, GK. Adipose tissue dysfunction in cancer cachexia. *J Cell Physiol*. 2019; 234: 13–22.
- [5] NOLTE, I., et al. (2008). Tumor–platelet interactions: Glioblastoma growth is accompanied by increasing platelet counts. *Clin Neurol Neurosurg* 110(4): 339-342.
- [6] Gill JG, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2016;81:163-175.
- [7] Samoylenko A, Al Hossain J, Mennerich D, Kellokumpu S, Hiltunen JK et al. Nutritional countermeasures targeting reactive oxygen species in cancer: from mechanisms to biomarkers and clinical evidence. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19: 2157-2196.
- [8] van Schaik J, van Roessel IMAA, Schouten-van Meeteren NAYN, van Iersel L, Clement SC et al. High Prevalence of Weight Gain in Childhood Brain Tumor Survivors and Its Association With Hypothalamic-Pituitary Dysfunction. *J Clin Oncol* 2011; 39: 1264-1273.

HETEROCYKLICKÉ ZLÚČENINY SYNTETICKÉHO PÔVODU AKO NÁSTROJ PRI LIEČBE NÁDOROVÝCH OCHORENÍ



Lucia Šofranková

Ústav biochémie a mikrobiológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9,812 37 Bratislava, Slovenská republika

Úvod

Leukémia je špecifický druh rakoviny, ktorá postihuje hematopoézu (krvotvorbu). Predpokladá sa, že k leukémii dochádza v dôsledku genetického poškodenia buniek, kde sú poškodené gény, ktorých produkty riadia bunkový rast, čo umožňuje bunkám nekontrolovane sa deliť. Impulzy poškodzujúce DNA ako je expozícia ionizujúcim žiarením alebo toxickými chemikáliami vrátane látok niekedy používaných na liečbu rôznych typov rakoviny prispievajú k rozvoju leukémie (a iných druhov rakovín). Leukemické bunky, rovnako ako ostatné nádorovo transformované bunky, môžu mať deregulované mechanizmy bunkovej smrti s následným narušením homeostázy, čo môže viesť aj k závažným až fatálnym dôsledkom [1].

Pyrazol je 5-článkový aromatický heterocyklus obsahujúci dva navzájom susedné atómy dusíka a 3 aromatické atómy uhlíka s sp^2 hybridizáciou. Tento štruktúrny motív sa nachádza v množstve malých molekúl s rozsiahlym využitím v priemysle [2].

Zavedením atómu fluóru vznikajú zlúčeniny s atraktívnymi vlastnosťami, ktoré nemožno dosiahnuť s využitím iných prvkov. Napríklad v oblasti medicínskej chémie možno spomenúť zavedenie jedného atómu fluóru do prírodne sa vyskytujúcich zlúčenín ako je uracil za vzniku 5-fluorouracilu či hydrokortizón za vzniku 9 α -fluórhydrokortizón [3]. Toto poznanie značne rozšírilo farmakologické využitie fluóru ako substituenta najčastejšie za vodík pri syntéze nových liečiv. V súčasnosti aspoň jeden atóm fluóru obsahuje približne 1/3 všetkých používaných liečiv. Pri použití fluóru sa využíva jeho blokovací a maskovací efekt. Ďalšou veľmi dôležitou vlastnosťou fluórovaných zlúčenín je ich lipofilita. So zvýšenou lipofilitou sa často zlepšuje priepustnosť cez membrány buniek. Predpokladá sa, že zavedením fluóru resp. fluórovej skupiny salepší

lipofilita organických zlúčenín (hlavne aromatických zlúčenín vďaka silnému +M efektu) [4].

Preto sa v tejto práci zamerali na štúdium vplyvu novosyntetizovaných *N*-perfluórphenyl substituovaných pyrazol-5-yl-amínov na leukemické bunky (L1210, SKM1 a MOLM-13).

Materiály a metódy

Biologický model a podmienky kultivácie. V tejto práci bol použitý model myšacích leukemických buniek L1210, zložený z troch sublinií S,R a T a modely buniek akútnej myeloidnej leukémie označované ako SKM-1 a MOLM-13 a ich varianty získané selekciou na vinkristín- SKM-1/VCR a MOLM-13/VCR, poskytnuté Ústavom molekulárnej fyziológie a genetiky Centra biovied, SAV. Bunky L1210 boli kultivované v RPMI-1640 médiu s obsahom 8 % fetálneho hovädzieho séra, 1 % penicilín-streptomycínu a 0,05 % gentamicínu (1 µg/ml). Bunky SKM-1 a MOLM-13 boli kultivované v RPMI-1640 médiu s obsahom 8 % fetálneho hovädzieho séra, 1 % penicilín-streptomycínu. Kultivácia pre všetky línie prebiehala pri 37 °C a v atmosfére s 5 % CO₂ rovnako ako pri experimentoch.

MTT test. Bunky ($3 \times 10^4/200$ µl) sa kultivovali v 96- jamkovej platničke s príslušnými derivátmi o príslušnej koncentrácii v rozsahu 5-50 µM v časových intervaloch 24 a 48 hodín.

Po inkubácii sa k peletu pridalo 200 µl bezsérového RPMI-1640 média spolu s 10 µl MTT o koncentrácii 5 mg/ml v PBS, vzniknutý formazán sa rozpustil v 150 µl DMSO. Zmerala sa absorbancia pri 540 nm.

Fragmentácia celkovej DNA. Bunky ($5 \times 10^6/5$ ml) sa kultivovali v 6- jamkovej platničke v prítomnosti derivátov s výslednou koncentraciou 25 a 50 µM po dobu 24 hodín. Celkovú DNA sme izolovali pomocou kitu- GIN70. Izolovanú DNA sme následne rozdelili na agarózovom gély.

Calcein-AM. Bunky ($250 \times 10^5/ 500$ µl) sa kultivovali v 24-jamkovej platničke v prítomnosti derivátov s výslednou koncentraciou 25 a 50 µM po dobu 24 hodín. Ku kontrole 1 sa pridal 1 µl tariquidar o výslednej koncentrácii 0,5 µM a Calcein-AM, tak aby výsledná koncentrácia bola 10 nM. Vzorky boli následne analyzované pomocou prietokového cytometra.

Výsledky a diskusia

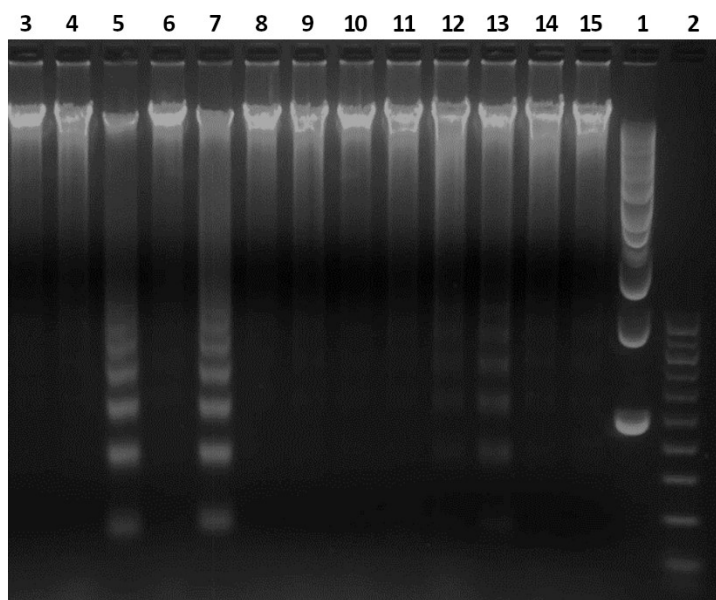
Testované deriváty sme označili A1 – A5. Pre optimalizáciu výberu vhodných koncentrácií a zisteniu potenciálnych účinkov sme sa rozhodli pre MTT metódu, pri ktorej sme testovali 5 koncentrácií z každého derivátu v čase 24 a 48 hodín. Zaznamenali sme klesajúci trend viability buniek s rastúcou koncentraciou derivátov. Najúčinnším sa ukázal derivát A5. Ako jediný už pri koncentrácii 10 µM dosiahol inhibíciu metabolickej aktivity do výšky 50-60 % pri R a T sublinii v oboch časoch.

Línia L1210 reagovala pri všetkých derivátoch citlivejšie ako línie SKM-1 a MOLM-13.

Tabuľka 1 Viabilita testovaných bunkových línií po 24h s derivátmi v koncentrácii 10 μ M

látka	S	R	T	SKM1	SKM1/VCR	MOLM-13	MOLM13/VCR
K	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
DMSO	88,25	81,20	90,20	91,56	96,71	91,91	98,70
A1 10 μ M	75,79	81,25	92,09	77,52	85,66	83,71	82,42
A2 10 μ M	79,75	56,39	67,32	80,04	69,43	65,41	77,47
A3 10 μ M	58,54	59,06	58,43	69,18	84,93	73,70	76,27
A4 10 μ M	88,29	66,89	79,18	80,20	80,63	69,37	76,17
A5 10 μ M	43,39	32,84	37,50	53,89	51,76	46,77	46,84

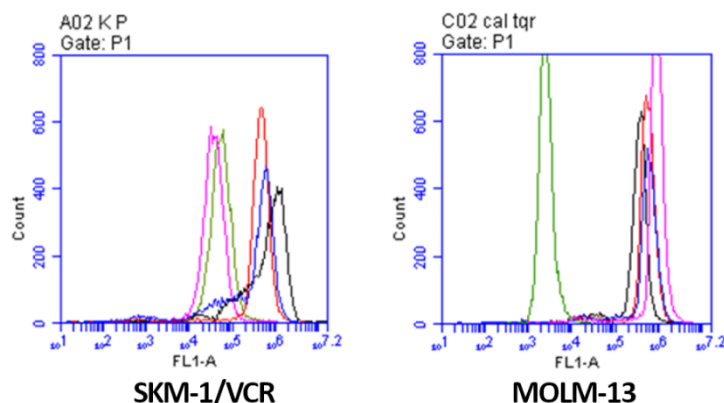
Pre testované deriváty sme sa následne rozhodli využiť viacero metód, medzi ktoré patrí aj dokázanie fragmentácie celkovej DNA, čo sme pre líniu L1210 po ovplyvnení buniek derivátmi A1 a A4 dosiahli. Fragmentácia celkovej DNA je dôležitý znak apoptózy a ako kontrolu sme použili cis-platinu, ktorá je dokázaný spúšťač apoptózy [5].



Obrázok 1. Fragmentácia celkovej DNA T buniek :1.DNA ladder (1kb),2. DNA ladder (100bp), 3.kontrola, 4.DMSO, 5. Cis-Pt, 6.A1 25 μ M, 7. A1 50 μ M, 8. A2 25 μ M, 9. A2 50 μ M, 10. A3 25 μ M, 11. A3 50 μ M, 12. A4 25 μ M, 13. A4 50 μ M, 14. 25 μ M, 15. 50 μ M.

Ďalšou metódou, ktorú sme použili, bolo využitie farbiva prechádzajúceho do bunky Calcein-AM, ktorý sa používa sa ako vitálne farbenie. V našom prípade, však

používame jeho druhú vlastnosť a to, že je substrátom pre P-glykoproteín, transportnú pumpu vyskytujúcu sa v bunkách SKM-1/VCR, MOLM-13/VCR a subliniách R a T línie L1210.



Obrázok 2. Akumulácia calcein-AM v bunkových líniiach SKM-1/VCR a MOLM13. Farby v grafoch zodpovedajú bunkám : zelená -bez ovplyvnenia a bez použitia calcein – AM, ružová – bez ovplyvnenia a bez tariquidar, čierna- bez ovplyvnenia ale s tariquidarom ($c=500$ nM), červená – A2 ($c=25$ μ M) modrá – A2 ($c= 50$ μ M).

Pri líniiach, ktoré neexprimujú P-glykoproteín sme zaznamenali rovnakú metabolickú aktivitu neovplyvnených aj ovplyvnených buniek. Na inhibíciu P-glykoproteínu sme využili tariquidar, ktorý je dobre známy a popísaný inhibítor [6]. Pri použití koncentrácií 25 a 50 μ M sme u derivátov A1 a A2 zaznamenali čiastočnú inhibíciu transportnej pumpy, avšak v porovnaní s tariquidarom je táto inhibícia slabá.

Pyrazol a jeho deriváty vykazujú významné biologické a farmakologické účinky, ako sú: protirakovinové, protizápalové, antioxidačné, antibakteriálne, analgetické, antivírusové, antimikrobiálne, antimykotické, antiglykemické, antiamoebické a antidepresívne. Vzhľadom na obrovské množstvo biologických vlastností je pyrazol jedným z najviac študovaných heterocyklických jadier obsahujúcich dusík.

V práci Swanepoel a kol. testovali 5-aminopyrazolový derivát na bunkových líniiach HeLa, MeWo a HepG2, pričom cytotoxický účinok sa prejavil iba na línii HeLa ($IC_{50} = 65$ μ M) [7].

Naše novosyntetizované deriváty indukujú bunkovú smrť s IC_{50} v rozmedzí 25-30 μ M, bez prítomnosti väzby anexínu V ako markera apoptózy zato však s fragmentovanou DNA. Taktiež sme zaznamenali zvýraznenie objemu lyzozomálneho kompartmentu, ktorý sme dokázali pomocou fluorescenčného farbiva LysoTracker Green na prietokovom cytometri a monodansylkadaverínom na konfokálnej mikroskopii.

Naše výsledky naznačujú, že dané látky majú potenciál vyvolať autofágiu u buniek, avšak tento typ bunkovej smrti ešte musíme potvrdiť.

Zoznam literatúry:

- [1] Sabath, D. E. Leukemia. In : Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition. Elsevier Inc., 2013: 226–227.
- [2] Zhu, Chuanle, Zeng, Hao, Liu, Chi, Cai, Yingying, Fang, Xiaojie and Jiang, Huanfeng. Regioselective Synthesis of 3-Trifluoromethylpyrazole by Coupling of Aldehydes, Sulfonyl Hydrazides, and 2-Bromo-3,3,3-trifluoropropene. *Organic Letters*. 2020; 22, (3): 809–813.
- [3] Heidelberger, Charles, Chaudhuri, N. K., Danneberg, Peter, Mooren, Dorothy, Griesbach, Lois, Duschinsky, Robert, Schnitzer, R. J., Plevin, E. and Scheiner, J. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature* 1957 179:4561. 1957. Vol. 179, (4561), 663–666.
- [4] David R. Lide, CRC Handbook of Chemistry and Physics, 87th ed . CRC Press/Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL. *Journal of the American Chemical Society*. 2006; 129, (3): 24–724.
- [5] Siddik, Zahid H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22 (47): 7265–7279.
- [6] Elefantova, Katarina, Lakatos, Boris, Kubickova, Jana, Sulova, Zdena and Breier, Albert. Detection of the Mitochondrial Membrane Potential by the Cationic Dye JC-1 in L1210 Cells with Massive Overexpression of the Plasma Membrane ABCB1 Drug Transporter. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19:1985
- [7] Swanepoel, Bresler, Nitulescu, George Mihai, Olaru, et al. Anti-Cancer Activity of a 5-Aminopyrazole Derivative Lead Compound (BC-7) and Potential Synergistic Cytotoxicity with Cisplatin against Human Cervical Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20, (22): 5559 .

Organoidy karcinómu prsníka a ich potenciál v personalizovanej medicíne



Lenka Trnková^{1,2}, Svetlana Miklíková¹,
Jana Plavá¹, Lucia Rojíková¹, Marína
Cihová¹

¹*Oddelenie molekulárnej onkológie, Ústav
experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum
Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Bratislava,
Slovensko*

²*Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava,
Slovensko*

Úvod

Experimentálny model nádorových organoidov je relatívne nový spôsob kultivácie nádorových buniek. V súčasnosti je tomuto modelu venovaná zvýšená pozornosť najmä z dôvodu, že v porovnaní s klasickými bunkovými líniami disponuje viacerými špecifickými vlastnosťami vrátane schopnosti zachovať si individuálnu charakteristiku nádoru pacienta. Medzi výhody nádorových organoidov patrí zachovanie si genetického a histologického profilu nádoru, nádorovej heterogenity, a taktiež schopnosť rekapitulovať odpoveď na liečbu. Ďalšou výhodou je možnosť manipulácie v *in vitro* podmienkach. Model nádorových organoidov bol popísaný u viacerých typov nádorov ako nádorov pľúc, pečene, prostaty, močového mechúra, glioblastómov či kolorektálnych karcinómov [1]. Nedávno bola táto metodika prispôbena aj pre založenie organoidov z karcinómu prsníka [2, 3].

Dôležitou vlastnosťou nádorových organoidov je rekapitulácia odpovede nádorových buniek na liečbu. Viacero publikácií popisalo zhodu medzi citlivosťou nádorových organoidov voči liečbe a klinicky pozorovanou odpoveďou pacienta. To vytvára potenciál pre ich klinické využitie a využitie pre potreby personalizovanej medicíny. Nádorové organoidy by mohli byť využité pri výbere vhodnej liečebnej stratégie, napríklad v prípadoch progresívneho ochorenia alebo v prípade zlyhania predošlých spôsobov liečby. Taktiež by mohli pomôcť pri diagnostike a výbere terapie na základe genetických analýz nádoru a analýz génovej expresie. Niekoľko štúdií zaoberajúcich sa problematikou nádorových organoidov a ich využitia v personalizovanej medicíne už bolo publikovaných. Tieto štúdie napríklad popisujú testovanie liečiv na organoidoch odvodených z karcinómov individuálnych pacientov, ale aj rozsiahlejšie skríningy liečiv na skupine viacerých organoidových kultúr [4, 5]. Štúdií, ktoré by sa zaoberali testovaním liečiv na organoidoch odvodených z karcinómu prsníka je však kvôli novosti tohto modelu málo.

Materiál a metódy

Nádorové organoidy boli založené zo vzorky metastázy karcinómu prsníka na základe publikovaných protokolov [2, 3]. Využitiu vzorky nádorového tkaniva predchádzal informovaný súhlas pacienta. Nádorové tkanivo bolo manuálne nakrájané a inkubované v médiu s obsahom kolagenázy z *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich) pri 37°C po dobu 1,5 hod. Prefiltrovaná suspenzia bola následne centrifugovaná 5 min pri 1500 rpm. Bunkový pelet bol premytý v Advanced DME/F12 (Thermo Fisher Scientific) médiu a centrifugovaný 5 min pri 1500 rpm. Bunkový pelet bol rozriedený v BME typu 2 (R&D Systems) a suspenzia bola vysiata vo forme kvapiek do 6-jamkovej platničky (Greiner Bio-One GmbH). Po zatuhnutí kvapiek bolo do jamiek pridané organoidové kultivačné médium pripravené podľa dostupného protokolu [2].

Pre *in vitro* liečbu boli nádorové organoidy vysiate do 96-jamkovej platničky v počte 3000 organoidov/jamku v 5% BME typu 2 (R&D Systems) rozriedeného v kultivačnom médiu. Po 5 dňoch boli organoidy ovplyvnené nasledujúcimi liečivami: everolimus (Sigma-Aldrich), crizotinib (Sigma-Aldrich), exemestán (Sigma-Aldrich) a letrozol (Sigma-Aldrich). Koncentrácie jednotlivých liečiv boli zvolené na základe predchádzajúcich experimentov pričom sa pohybovali v rozmedzí 1 – 16 μM pre everolimus a 0,01 – 100 μM pre crizotinib, exemestán a letrozol. Viabilita nádorových organoidov bola zmeraná pomocou CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega Corporation).

In vivo patientske xenografty boli vytvorené bilaterálnou ortotopickou transplantáciou nádorových buniek trom imunodeficientným NSG (Charles River Laboratories) myšiam. Rast xenograftov bol podporený aplikovaním estrogénovej tabletky subkutánne na chrbát zvieraťa. Myši boli liečené 1 mg/kg everolimom (Sigma-Aldrich) 5-krát týždenne po dobu 4 týždňov. Rozmery nádorov boli pravidelne merané a hmotnosti nádorov boli zmerané na konci experimentu, keď boli zvieratá utratené.

Výsledky a diskusia

Organoidová kultúra bola založená zo vzorky metastázy invazívneho lobulárneho karcinómu prsníka nachádzajúcej sa na vaječníku. Organoidy boli udržiavané v *in vitro* kultúre a taktiež ortotopicky transplantované do imunodeficientných myší kmeňa NSG s cieľom získať *in vivo* patientske xenografty.

Založená organoidová kultúra bola využitá pre *in vitro* testovanie liečiv. Na základe informácií o genetickom profile a molekulárnom type nádoru boli pre testovanie vybraté liečivá everolimus, crizotinib, exemestán a letrozol. Everolimus je inhibítor mTOR (z angl. mammalian target of rapamycin) signálnej dráhy používaný pri liečbe metastatických karcinómov prsníka [6]. Crizotinib je ALK (z angl. anaplastic lymphoma kinase) a ROS1 (z angl. c-ros oncogene 1) inhibítor s popísaným protinádorovým účinkom u E-kadherín mutovaných karcinómov prsníka [7]. Exemestán a letrozol sú inhibítory aromatázy využívané u estrogén-receptor pozitívnych karcinómov prsníka [8]. Znížená viabilita nádorových organoidov bola pozorovaná po

pôsobení everolimu, crizotinibu a exemestánu. Po pôsobení letrozolu nedošlo k zmene percenta viability nádorových organoidov, čo bolo v súlade s klinickým pozorovaním u pacientky.

Xenografty získané ortotopickou transplantáciou nádorových organoidov boli využité pre *in vivo* testovanie efektivity everolimu. Pred transplantáciou bola myšiam subkutánne aplikovaná estrogénová tabletká pre podporu rastu nádorov. Liečba everolimom začala 45 dní po transplantácii nádorových buniek. Myši liečené everolimom vykazovali nižšiu hmotnosť nádorov v porovnaní s nádormi z kontrolnej myši. Tieto výsledky sú v súlade s *in vitro* testovaním na nádorových organoidoch.

Nádorové organoidy predstavujú *in vitro* kultúru buniek odvodených z nádorového tkaniva pacienta. Viacero štúdií popísalo potenciál ich využitia pre účely personalizovanej medicíny. Príkladom môže byť štúdia Sachs *et al.* (2018), v ktorej boli nádorové organoidy ovplyvnené tamoxifénom. Organoidy vykazovali rozdielnú senzitivitu voči tamoxifénu, pričom tieto výsledky boli v súlade s klinicky pozorovanou odpoveďou pacientov [3]. Ďalšia štúdia s využitím organoidov karcinómu prsníka sa zaoberala skríningom viac ako 40 proti-nádorových liečiv. Vo väčšine prípadov nádorové organoidy rekapitulovali klinicky pozorovanú odpoveď u pacientov [5]. V tejto práci boli organoidy odvodené z metastázy invazívneho lobulárneho karcinómu prsníka využité pre *in vitro* testovanie liečiv. Znížená viabilita nádorových organoidov po pôsobení everolimu bola potvrdená aj v *in vivo* podmienkach s využitím patientskych xenograftov. *In vitro* testovanie liečiv na nádorových organoidoch bolo v súlade s klinickým pozorovaním. Tieto výsledky, spolu s ďalšími štúdiami zaoberajúcimi sa modelom organoidov odvodených z karcinómu prsníka, podporujú ich potenciál pre klinické využitie a ich možné uplatnenie pri výbere vhodnej liečebnej stratégie v rámci personalizovanej medicíny.

PodĎakovanie

Túto prácu finančne podporila Vedecká grantová agentúra – projekt VEGA grant č. 2/0138/20, VEGA grant č. 2/0067/22, EraCoSysMed projekt RESCUER, Agentúra na podporu výskumu a vývoja APVV-16-0178 a Liga proti rakovine.

Zoznam použitej literatúry

- [1] LeSavage BL, Suhar RA, Broguiere N, Lutolf MP, Heilshorn SC. Next-generation cancer organoids. *Nat Mater* 2022; 21(2): 143-59.
- [2] Dekkers JF, van Vliet EJ, Sachs N, Rosenbluth JM, Kopper O, et al. Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids. *Nat Protoc* 2021; 16(4): 1936-65.

- [3] Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* 2018; 172(1-2): 373-86.e10.
- [4] Mauri G, Durinikova E, Amatu A, Tosi F, Cassingena A, et al. Empowering Clinical Decision Making in Oligometastatic Colorectal Cancer: The Potential Role of Drug Screening of Patient-Derived Organoids. *JCO Precis Oncol* 2021; 5: 1192-1199.
- [5] Chen P, Zhang X, Ding R, Yang L, Lyu X, et al. Patient-Derived Organoids Can Guide Personalized-Therapies for Patients with Advanced Breast Cancer. *Adv Sci (Weinh)* 2021; 8(22): e2101176.
- [6] O'Shaughnessy J, Thaddeus Beck J, Royce M. Everolimus-based combination therapies for HR+, HER2- metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2018; 69: 204-14.
- [7] Bajrami I, Marlow R, van de Ven M, Brough R, Pemberton HN, et al. E-Cadherin/ROS1 Inhibitor Synthetic Lethality in Breast Cancer. *Cancer Discov* 2018; 8(4): 498-515.
- [8] Johnston SR, Dowsett M. Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(11): 821-831.

ANALÝZA EXPRESIE KARBONICKEJ ANHYDRÁZY CA IX V BUNKOVÝCH MODELOCH EMBRYONÁLNEHO KARCINÓMU



Natália Udvardová^{1,2}, Silvia Schmidtová^{1,3},
Michal Mego^{1,3,4}, Michal Chovanec⁴, Katarína
Kaľavská^{1,3,4}

¹Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum
SAV, v.v.i., Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava

²Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Špitálska 24, 813
72 Bratislava

³Jednotka translačného výskumu LFUK a NOÚ, Klenova 1,
833 10 Bratislava

⁴II. onkologická klinika LF UK a NOÚ, Klenova 1, 833 10
Bratislava

Úvod

TGCTs (z angl. *Testicular Germ Cell Tumors*) patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce solídne nádory postihujúce mladých mužov vo veku 22 - 40 rokov. Väčšina prípadov je vďaka chemoterapii, založenej na báze cisplatiny, dobre liečiteľná. Existuje však skupina pacientov, približne 20%, ktorá je na tento typ liečby rezistentná [1]. Embryonálny karcinóm (EC) je malígný germinatívny nádor tvorený bunkami pripomínajúcimi embryonálne zárodočné bunky [2]. Je jedným z histologických subtypov TGCTs, ktorý je najčastejšie zastúpený v rámci skupiny zmiešaných ne seminómov (až 77 %) [3].

Mikroprostredie je považované za jeden z kľúčových faktorov ovplyvňujúcich chemorezistenciu solídnych nádorov [4]. TGCTs sa v porovnaní so zdravým testikulárnym tkanivom vyznačujú signifikantne zvýšeným cievny zásobením. Dochádza u nich, podobne ako u väčšiny solídnych nádorov, k vytvoreniu neorganizovanej cievnej siete s obmedzenou funkčnosťou. Tá má za následok nedostatočné zásobenie kyslíkom v určitých oblastiach nádorovej masy a formovanie tzv. hypoxických oblastí [5,6]. Predmetom nášho výskumu bola analýza zníženej koncentrácie kyslíka v prostredí, so zameraním sa na expresiu CA IX v modelových bunkových líniiach embryonálneho karcinómu a z nich odvodených variantov, rezistentných na cisplatinu.

Materiál a metodika

Bunkové línie. V našej práci sme použili 3 bunkové línie pre EC (NTERA-2, 2102Ep a NCCIT) a z nich odvodené varianty rezistentné na cisplatinu. NTERA-2 a 2102Ep boli kultivované v médiu DMEM (Biosera, Nuaille, France), bunková línia NCCIT v médiu

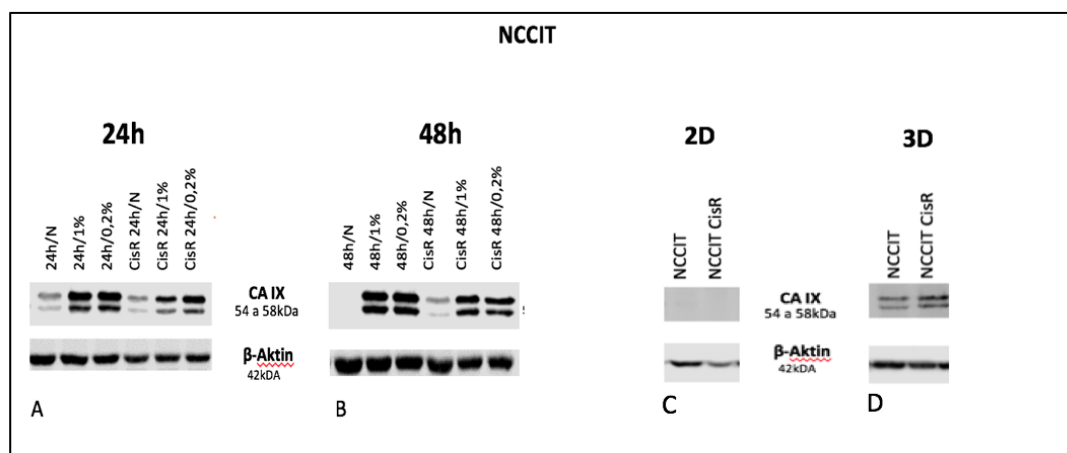
RPMI – 1640 (Biosera). Obe kultivačné média obsahovali 10% fetálne hovädzie sérum (Biosera), antibiotiká – Penicilín/ streptomycín (HyClone™ Penicillin-Streptomycin Solution (100X); HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA), amfotericín B (Sigma – Aldrich; Saint – Louis, MO, USA) a glutamín (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). Bunky boli kultivované v podmienkach 2D alebo 3D (vo forme multicelulárnych sféroidov), v termostate pri 37°C s 5% obsahom CO₂. Bunkové línie v 2D kultivačných podmienkach boli okrem normoxických podmienok inkubované v hypoxických prostrediach s 1% a 0,2% obsahom O₂, v časovom intervale 24h a 48h.

qRT-PCR. RNA bola zo vzoriek vyizolovaná pomocou komerčne dostupného kitu NucleoSpin® (Macherey – Nagel; Düren, Germany) a prepísaná do cDNA s využitím kitu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFischer Scientific; Watham, MA, USA). V oboch prípadoch sme postupovali podľa priloženého manuálu výrobcu. Kvalita a čistota vyizolovanej RNA bola stanovená pomocou NanoDrop spektrofotometra ND – 1000 (ThermoFischer Scientific). Génová expresia vo vzorkách bola sledovaná pomocou real – time PCR s využitím Taq Man primerov (TaqMan™ Gene Expression Assay, FAM; ThermoFischer Scientific). Porovnanie hladiny expresie sledovaných génov bolo počítané s použitím 2– $\Delta\Delta C_t$ metód, pričom expresia génu HPRT bola referenčnou hodnotou. Pre priebeh reakcie bol použitý termocyklér AriaMX Real – time PCR systém (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) a výsledky boli štatisticky spracované v programe REST® (Gene Expression Unit, M. Hentze Group, Germany).

Western blotting. Bunkové lyzáty boli pripravené z bunkových peletov použitím RIPA roztoku (#9806; Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA), spolu s komerčne zakúpenými inhibítormi fosfatáz PhosSTOP (Roche; Mannheim, Germany) a protázovými inhibítormi – Complete (Roche). Takto ošetrené vzorky boli následne centrifugované pri 14 000 g, 10 min., 4°C. Koncentrácia proteínov bola stanovená pomocou kitu Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFischer Scientific). Denaturované proteíny boli následne separované pomocou polyakrylamidovej elektroforézy (SDS – PAGE), preblotované na nitrocelulózovú membránu (Thermo Scientific). Membrána bola blokována v 5% odtučnenom mlieku s TBS, 1h pri RT (*z angl. Room Temperature*). Na detekciu CA IX proteinu bola membrána inkubovaná s primárnou protilátkou M75 (riedenie 1:3; dar z Virologického ústavu, SAV BA) a sekundárnou protilátkou (riedenie 1:2000; #7076S; Cell Signaling Technology). Ako kontrola bola stanovená hladina β -aktínu detegovaného primárnou protilátkou (A1978; Sigma – Aldrich; – 1h; pri RT; riedenie 1:4000; 42 kDa; a sekundárnou protilátkou #7076S; Cell Signaling Technology; – 1h; RT; riedenie 1:2000). Analyzované proteíny boli vizualizované fluorescenčne a ich hladiny boli kvantifikované pomocou voľne dostupného softvéru ImageJ 1.46r. (NIH, Bethesda, MA, USA). Dáta boli štatisticky spracované pomocou softvéru GraphPad Prism® (Graphpad Inc., La Jolla, CA, USA).

Výsledky a diskusia

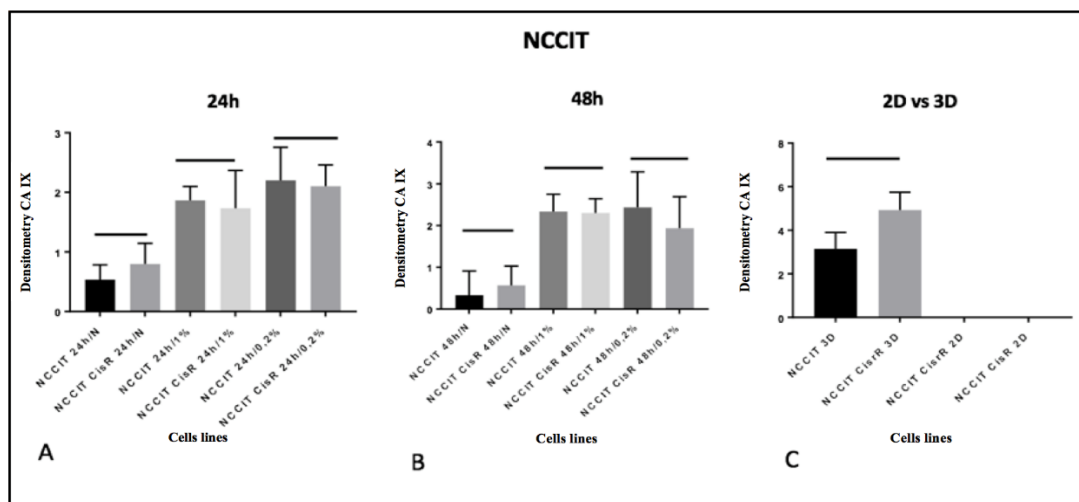
Počas hypoxie v bunke nastáva zmena energetického metabolizmu z oxidatívnej fosforylácie na tzv. aeróbnú glykolýzu. Tento proces je spojený s nadexpresiou viacerých proteínov vrátane karbonickej anhydrázy IX (CA IX) [7]. Jeho zvýšené hladiny boli detegované v primárnom nádorovom tkanive izolovanom od TGCTs pacientov, a bol dokázaný signifikantný vzťah medzi intratumorálnou expresiou CA IX a zhoršeným prežívaním, bez progresie v analyzovanej skupine pacientov. Táto asociácia bola zvýraznená najmä v metastatickej podskupine pacientov [8]. Ukázalo sa tiež, že pacienti s metastatickým ochorením majú signifikantne zvýšenú hladinu CA IX v sére v porovnaní so zdravými kontrolami. Prognostická úloha hladiny CA IX v sére v danej práci detegovaná nebola [9]. Naše experimenty boli zamerané na stanovenie expresie CA IX v bunkových líniiach NTERA-2, 2102Ep a NCCIT a z nich odvodených cisplatina rezistentných variantoch.



Obrázok 1. Western blot analýza expresie CA IX pre NCCIT líniu (parentálny a rezistentný variant) v normoxických a hypoxických podmienkach počas 24h (A) a 48h (B) inkubácie a pre línie NCCIT v 2D (C) a 3D kultivačných podmienkach (D).

Hladiny CA IX sme detegovali na úrovni génovej expresie pomocou qPCR, ako aj na úrovni proteínov Western blot analýzou. Z doterajších výsledkov sme v NCCIT) a NTERA-2 líniiach (parentálnych aj rezistentných variantoch) dokázali, že hypoxické prostredia ako aj doba kultivácie signifikantne zvyšujú expresiu CA IX na úrovni génovej expresie a aj na úrovni proteínov. Najvyššie hladiny CA IX proteínu sme detegovali v línii NCCIT (Obrázok 1 a Graf 1). V línii 2102Ep zatiaľ prebehla analýza len na úrovni proteínov. V parentálnom ani rezistentnom variante tejto línie nebola hladina proteínu CA IX preukázaná. V budúcnosti by však v tejto línii mohla byť zistená expresia iných proteínov, ktoré slúžia ako markery hypoxie. Taktiež sme detegovali zvýšenú hladinu proteínu CA IX línie NCCIT kultivovanej v 3D v senzitivnom i rezistentnom variante na chemoterapiu na báze platiny (Obrázok 1 a Graf 1). Na základe uvedeného sa nazdávame, že v podmienkach 3D kultivácie dochádza

k vytvoreniu tzv. hypoxických jadier v multicelulárnych sferoidoch, pričom výraznejšia expresia CA IX v 3D podmienkach bola pozorovaná v cisplatina-rezistentom variante NCCIT bunkovej línie. Hypoxické jadrá budú vizualizované a expresia CA IX v nich bude následne analyzovaná pomocou imunohistochemického farbenia.



Graf 1. Štatistické vyhodnotenie expresie CA IX pre NCCIT líniu (parentálny a rezistentný variant) v normoxických a hypoxických podmienkach počas 24h (A) a 48h (B), v 2D a 3D kultivačných podmienkach (C).

Na základe dosiaľ získaných výsledkov sa ďalej zameriame na inhibíciu CA IX v analyzovaných bunkových líniách s využitím inhibítorov SLC-0111 a FC531. Rovnako bude testovaná aj kombinácia uvedených inhibítorov s cisplatinou, pričom bude sledovaný efekt danej intervencie na hladinu chemorezistencie. Potencionálny efekt bude overený aj v *in vivo* podmienkach. Doterajšie dáta ukazujú, že CA IX by v budúcnosti mohla predstavovať jeden z možných terapeutických cieľov pre pacientov trpiacich ochorením rezistentným na liečbu cisplatinou.

PodĎakovanie

Práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja – grant APVV-20-0158, Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV – grant VEGA 1/0349/21 a s podporou Nadácie Výskum rakoviny a organizácie Liga proti rakovine.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ondrus M., Ondrusova D., Nádory testis – diagnostika a liečba, Onkologia, 2008, 3 (3): 170–174.
- [2] Ulbright T.M., Tumours of the testis and paratesticular tissue. International Agency for Research on Cancer (IARC), 2016, 185-258.

- [3] Bahrami, A., Ro, J. Y., Ayala, A. G. An overview of testicular germ cell tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, 131(8), 1267-1280.
- [4] Pastorekova, S., Gillies, R. J. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38(1-2), 65-67.
- [5] Takacova M., Pastorekova S. Tumour Hypoxia – Molecular Mechanisms and Clinical Relevance. *Klin Onkol*, 2015; 28(3): 183–190.
- [6] Silván, U., Díez-Torre, A., Jiménez-Rojo, L., Aréchaga, J. Vascularization of testicular germ cell tumours: evidence from experimental teratocarcinomas. *Int J Androl*, 2010, 33(6), 765–774.
- [7] Bonatelli M., Silva, E. C.A., Carcano, F. M., Zaia, M.G. Lopes, L.F et al., The Warburg effect is asociated with tumors agressivenes in testicular germ cell tumors. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, Vol.10, 417.
- [8] Kalavska K., Cierna, Z., Chovanec, M. Takacova, M. Svetlovska, D., et al. Prognostic value of intratumoral carbonic anhydrase IX expression in testicular germ cell tumor. *J Clin Oncol*, 2017, 13: 2177-2185.
- [9] Kalavska K. Chovanec M., Zatovicova, M., Takacova, M., Gronesova, P., et al., Prognostic value of serum carbonic anhydrase IX in testicular germ cell tumor patients. *Oncol Lett*, 2016 12: 2590-2598.

Epigenetické liečivo decitabín efektívne reaktivuje metylačne-utlmené gény u bunkových línií duktálneho adenokarcinómu pankreasu



Mária Urbanová¹, Verona Buociková¹,
Eliška Švastová², Jozef Bizík¹, Soňa
Čierniková¹, Božena Smolková¹

¹*Oddelenie molekulárnej onkológie, Ústav
experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum,
Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05
Bratislava, Slovensko*

²*Oddelenie nádorovej biológie, Virologický ústav,
Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied,
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovensko*

Úvod

Duktálny adenokarcinóm pankreasu (PDAC) predstavuje viac ako 90 % zo všetkých karcinómov pankreasu a odhaduje sa, že do roku 2030 sa stane druhou najčastejšou príčinou úmrtí súvisiacich s rakovinou [1]. Vysoká mortalita PDAC je dôsledkom neskorej diagnostiky a agresívnej povahy ochorenia s včasným metastatickým šírením a rezistenciou na konvenčnú liečbu. Epiteliálno-mezenchymálny prechod (EMT) je dediferenciačný proces vedúci ku vzniku mezenchymálneho fenotypu, zvýšeniu migračnej kapacity, invazívnosti a metastatického potenciálu buniek PDAC [2, 3].

Aberantná metylácia DNA je významným epigenetickým faktorom pri regulácii expresie génov. Spoločným znakom invazívnej formy PDAC je hypometylácia promótorov, spojená s aberantnou expresiou transkripčných faktorov asociovaných s EMT (EMT-TF) a hypermetylácia génu kódujúceho epiteliálny marker E-kadherín [4, 5]. Strata E-kadherínu, kľúčovej adhézne molekuly epitelových buniek, je jedným z charakteristických znakov EMT. Decitabín (DAC) je epigenetické hypometylačné činidlo, ktoré prostredníctvom kovalentnej inhibície DNA metyltransferázy (DNMT) pasívne hypometyluje DNA [6].

Cieľom projektu bolo objasnenie úlohy metylácie DNA pri regulácii expresie vybraných génov podieľajúcich sa na EMT a progresii PDAC. Epigenetické liečivá (vrátane DAC) preukázali potenciál modulovať citlivosť nádorových buniek na iné formy protinádorovej terapie. Preto predpokladáme, že by mohli pomôcť prekonať rezistenciu PDAC na konvenčnú terapiu.

Materiál a metódy

Štyri bunkové línie PDAC (BxPC-3, MIA PaCa-2, PANC-1 a SU.86.86) boli kultivované pri 37 °C vo vysokoglukózovom DMEM médiu s pridaním 10 % FBS, 2

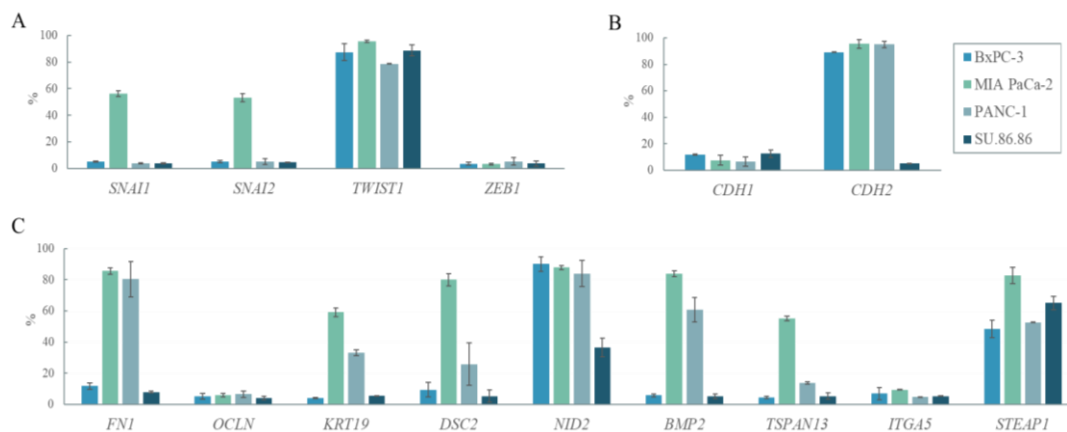
mM glutamínu a 10 µg/ml gentamicínu. Bunky vysadené na Petriho misky v hustote 2.5×10^5 /misku boli počas 72 hodín (DAC pridávaný každých 24 hodín) ovplyvnené subcytotoxickými koncentráciami DAC (6 – 8 µM, približne IC₂₀).

Na analýzu génovej expresie bola celková RNA izolovaná z bunkových peletov pomocou miRNeasy Mini Kit (Qiagen). 4 µg celkovej RNA boli reverzne transkribované pomocou RT² First Strand Kit (Qiagen). Kvantitatívna analýza expresie (qPCR) génu *TWIST1* bola uskutočnená pomocou TaqMan® Assays (Thermo Fisher Scientific) s génom *HPRT1* použitým na normalizáciu. Analýza génov *FNI*, *CDH2*, *NID2*, *BMP2*, *DSC2* a *STEAP1* bola realizovaná s využitím individuálne dizajnovaných primerov a pomocou GoTaq qPCR Master Mix (Promega). Vzorky s hodnotami Ct > 35 boli vylúčené z analýzy relatívnej expresie vypočítanej pomocou metódy $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [7].

Na analýzu metylácie DNA bola genómová DNA zo vzoriek izolovaná pomocou FlexiGene DNA Kit (Qiagen) a deaminovaná bisulfitom sodným pomocou EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen). Profily metylácie DNA génov asociovaných s EMT boli analyzované pyrosekvenovaním na platforme PyroMark Q24 (Qiagen). Všetky pyrosekvenčné protokoly boli navrhnuté pomocou softvéru PyroMark (Qiagen) a pozostávali z analýzy 2-7 CpG miest v promótorovej oblasti génu.

Výsledky

Metylácia DNA v promótorovej oblasti 15-ich vybraných EMT génov, vrátane štyroch TF (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* a *ZEB1*), sa medzi analyzovanými bunkovými líniami líšila (Obrázok 1).

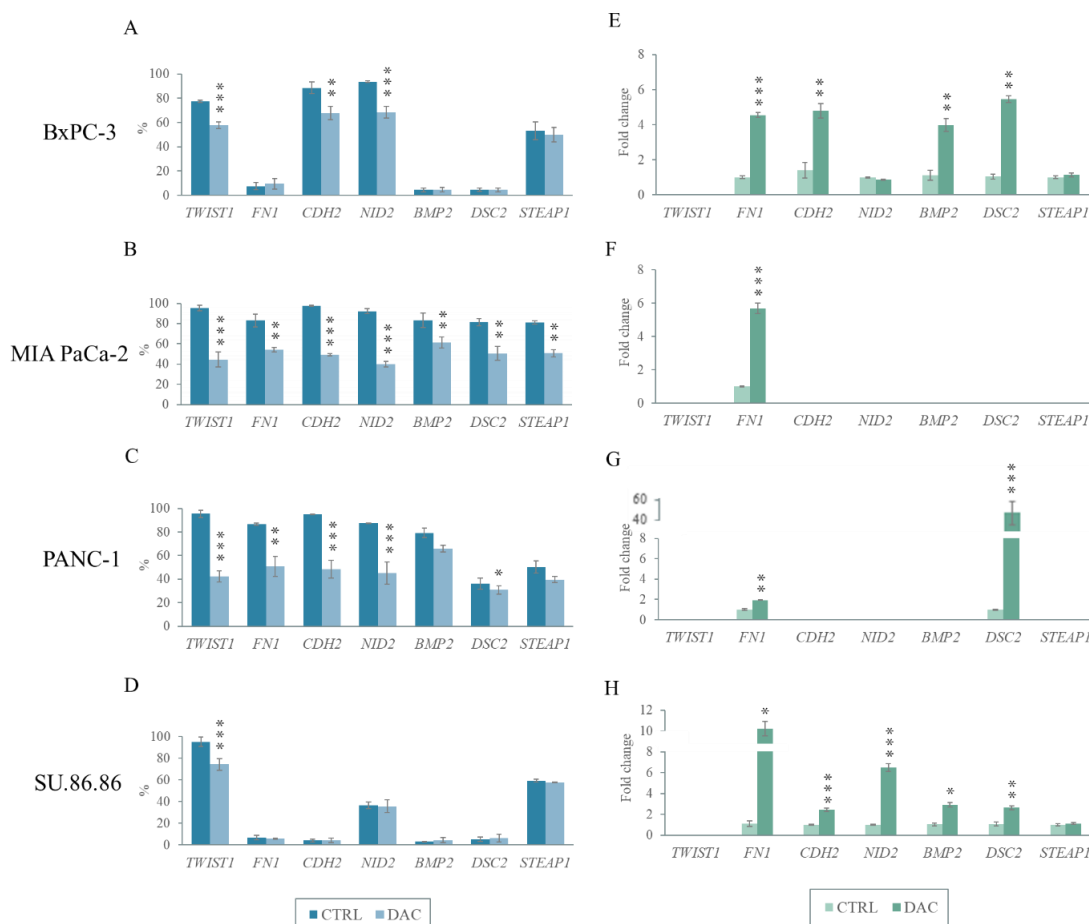


Obrázok 1. Analýza metylácie DNA vybraných EMT génov. Metylácia DNA promótorových oblastí EMT-TF (A), kadherínov (B) a funkčných EMT génov (C). Metylácia génov v jednotlivých bunkových líniiach je uvedená v percentách ± SD.

Vo všeobecnosti boli pre EMT-TF detegované nízke hladiny metylácie DNA s hodnotami pod 10 %. Gén *TWIST1* vo všetkých bunkových líniiach, ako aj gény *SNAI1* a *SNAI2* v bunkách MIA PaCa-2 boli vysoko metylované, podobne ako oblasti promótorov génov *FNI*, *BMP2*, *CDH2*, *NID2* a *DSC2* u bunkových línii MIA PaCa-2 a

PANC-1. Metylácia DNA génov *CDH1*, *OCN* a *ITGA5* bola nízka vo všetkých analyzovaných bunkových líniách.

Hypometylačný účinok DAC bol potvrdený analýzou zmien metylácie DNA u siedmich vysoko metylovaných génov (Obrázok 2). Ovplyvnenie buniek subcytotoxickými koncentráciami DAC viedlo k efektívnemu zníženiu metylácie DNA v študovaných génoch.

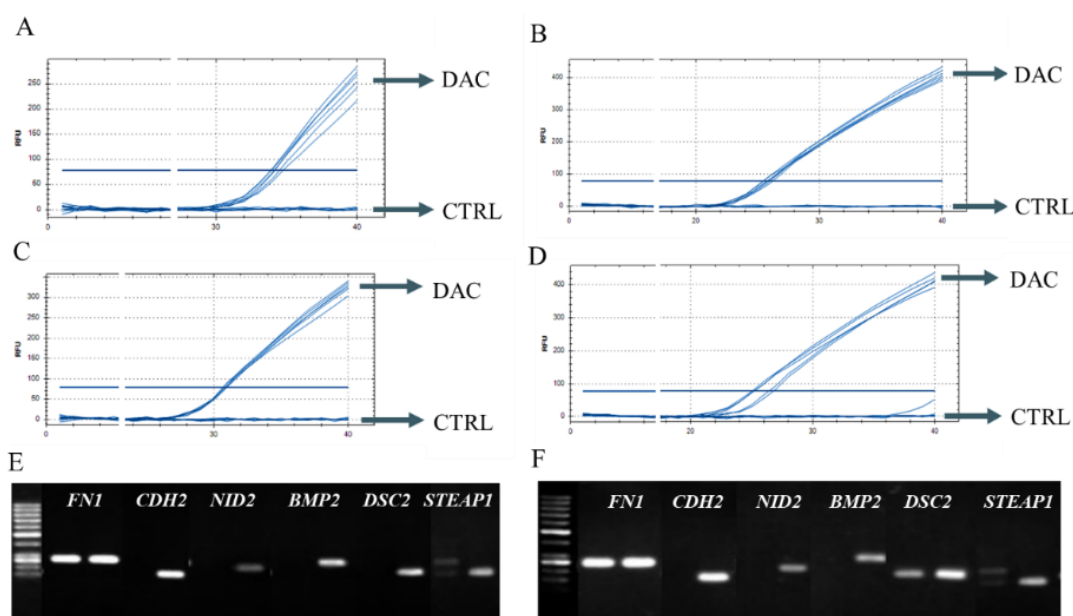


Obrázok 2. Zmeny v metylácii DNA a génovej expresii indukované DAC. Metylácia DNA (A-D) a expresia (E-H) vybraných EMT génov pred a po ovplyvnení DAC pre jednotlivé bunkové línie. Metylácia je znázornená v percentách $\pm$ SD a relatívna expresia ako fold change $\pm$ SD. Gény neexprimované v kontrolnej vzorke nie sú zobrazené. Významnosť rozdielov bola hodnotená Studentovým t-testom a vyjadrená prostredníctvom * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$. Skratky: CTRL – neovplyvnená kontrola; DAC – bunky ovplyvnené DAC.**

Významný pokles vykazovali všetky analyzované gény u bunkovej línie MIA PaCa-2; gény *TWIST1*, *CDH2*, *FN1*, *NID2* a *DSC2* u buniek PANC-1; *TWIST1*, *CDH2* a *NID2* u bunkovej línie BxPC-3 a *TWIST1* u línie SU.86.86. S výnimkou génu *STEAP1*, signifikantný pokles metylácie koreloval so zvýšením expresie všetkých analyzovaných

génov. U bunkových línií BxPC-3 a SU.86.86 došlo k signifikantnému zvýšeniu expresie aj u nízko metylovaných génov *FN1*, *BMP2* a *DSC2*, u ktorých sa hypometylačný účinok DAC neprejavil.

Ďalším dôležitým výsledkom je reaktivácia expresie metylačne utlmených génov v dôsledku DAC-indukovanej hypometylácie (Obrázok 3), vrátane reaktivácie neexprimovaného génu *TWIST1* u všetkých bunkových línií. V bunkovej línií MIA PaCa-2 boli tiež reaktivované gény *STEAP1*, *CDH2*, *BMP2*, *NID2* a *DSC2*. V bunkách PANC-1 bola reaktivácia detegovaná u génov *CDH2*, *STEAP1* a *BMP2*.



Obrázok 3. Reaktivácia metyláciou inaktivovaných génov. Nárast relatívnej fluorescence po každom cykle qPCR zodpovedá množstvu *TWIST1* mRNA prítomnej vo vzorkách buniek BxPC-3 (A), MIA PaCa-2 (B), PANC-1 (C) a SU.86.86 (D) pred a po expozícii DAC. Reaktivácia ostatných génov spojených s EMT u MIA PaCa-2 (E) a PANC-1 (F) je znázornená na gélovej elektroforéze produktov qPCR. Skratky: CTRL – neovplyvnená kontrola; DAC – bunky ovplyvnené DAC.

Diskusia

Epigenetické mechanizmy, vrátane metylácie DNA, sa podieľajú na regulácii dynamických zmien, ktoré podmieňujú získanie mezenchymálneho fenotypu epiteliálnych buniek, zodpovedného za hematogénne šírenie nádorových buniek.

V tejto práci sme sa zamerali na objasnenie úlohy metylácie DNA v regulácii génovej expresie vybraných génov podieľajúcich sa na procese EMT použitím DAC. Tento inhibítor DNMT je deoxycytidínový analóg, používaný na reaktiváciu génovej expresie inaktivovanej metyláciou promótoru [8]. U bunkových línií PDAC sme po použití subcytotoxických koncentrácií DAC zaznamenali reaktiváciu všetkých metylačne umlčaných génov a na ich reaktiváciu bolo dostatočné už 13%-né zníženie metylácie DNA (gén *BMP2* u PANC-1). DAC je schopný indukovať zmeny génovej expresie aj nepriamo prostredníctvom demetylácie regulačných elementov alebo zmien v

modifikáciách histónov [9]. Zvýšenie expresie u viacerých EMT génov s nízkou metyláciou naznačuje jeho nepriamy účinok.

Tieto výsledky potvrdzujú kritickú úlohu metylácie DNA v regulácii expresie génov zapojených do progresie PDAC a odhaľujú tak potenciál pre nové možnosti kombinovanej terapie tohto agresívneho nádorového ochorenia.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená grantmi VEGA 2/0052/18, APVV-20-0143, APVV-20-0480, H2020 GA 857381 a NExT-0711.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Rahib L, Wehner MR, Matrisian LM, Nead KT. Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *JAMA Netw Open* 2021; 4(4): e214708.
- [2] Aiello NM, Maddipati R, Norgard RJ, Balli D, Li J et al. EMT Subtype Influences Epithelial Plasticity and Mode of Cell Migration. *Dev Cell* 2018; 45(6): 681-695.
- [3] Zhang X, Zhang J, Fan H, Liu Y, He Q. Risk factors related to metastasis of para-aortic lymph nodes in pancreatic ductal adenocarcinoma: A retrospective observational study. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(40): e12370.
- [4] Sun L, Fang J. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73(23): 4493-4515.
- [5] Malek R, Wang H, Taparra K, Tran PT. Therapeutic Targeting of Epithelial Plasticity Programs: Focus on the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cells Tissues Organs* 2017; 203(2): 114-127.
- [6] Hackanson B, Daskalakis M. Decitabine. *Recent Results Cancer Res* 2014; 201: 269-297.
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408.
- [8] Bohl SR, Bullinger L, Rücker FG. Epigenetic therapy: azacytidine and decitabine in acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol* 2018; 11(5): 361-371.
- [9] Seelan RS, Mukhopadhyay P, Pisano MM, Greene RM. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on gene expression. *Drug Metab Rev* 2018; 50(2): 193-207.

VALIDÁCIA MARKEROV DNA POŠKODENIA V IDENTIFIKÁCII RÁDIOSENZITÍVNYCH PACIENTIEK S RAKOVINOU PRSNÍKA



Katarína Vigašová¹, Matúš Durdík¹, Sachin Gulati¹, Pavol Košík¹, Lukáš Jakl¹, Katarína Bérešová¹, Marta Fekete², Ingrid Závacká², Margita Pobijaková², Zuzana Dolinská², Eva Marková¹, Igor Belyaev¹

¹*Oddelenie rádiobiológie, Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Bratislava, Slovenská republika*

²*Oddelenie radiačnej onkológie, Rádiologické centrum, Národný onkologický ústav, Bratislava, Slovenská republika*

Úvod

Rakovina prsníka sa v roku 2020 stala najčastejšou onkologickou malignitou na svete [1]. Jej liečba spočíva najčastejšie v chirurgickom odstránení nádoru a ožarovaní postihnutého miesta. Pacientkam s vyšším štádiom rakoviny sa pred rádioterapiou (RT) zvyčajne podáva aj chemoterapia (CHT) [2]. Tá pôsobí rôznymi spôsobmi, najmä ako DNA poškodzujúci agens, teda alkylačné a interkalačné činidlá, no môže tiež inhibovať syntézu DNA alebo polymerizáciu mikrotubulov. Mechanizmus RT využíva ionizujúce žiarenie, ktoré poškodzuje DNA a vytvára v nej dvojvláknové zlomy. Žiarenie však zasiahne aj zdravé tkanivá a keďže približne 5 % pacientov, tzv. rádiosenzitívnych, má zníženú efektivitu opravy DNA, na ožarovanie reagujú prudkými klinickými symptómami. U pacientok s rakovinou prsníka tieto odpovede zahŕňajú výrazné začervenanie pokožky, olupovanie kože, opuch tkaniva či zápal sliznice [3]. Preto je dôležité hľadať markery, ktoré by pomohli s identifikáciou rádiosenzitívnych (RS) pacientov ešte pred začiatkom ich ožarovania, aby bolo možné RT predísť.

Jedným z potenciálnych markerov sú DNA opravné fokusy, ktoré reprezentujú miesto DNA dvojvláknového zlomu. Po vzniku zlomu sa spúšťa celá kaskáda procesov, ktoré zahŕňajú mnohé signalizačné a opravné proteíny, napr. fosforylovaný histón 2AX, teda γ H2AX, a proteín 53BP1. Vizualizáciou týchto proteínov môžeme v bunke zobrazit' miesto poškodenia ako farebný bod – fokus [4]. Ďalším potenciálnym markerom sú chromozómové aberácie. Po vzniku DNA dvojvláknového zlomu môže dôjsť k jeho nesprávnemu opraveniu. Vzniknuté voľné konce totiž veľmi rýchlo fúzujú s akýmkoľvek iným voľným koncom, ktorý je v ich blízkosti a to zapríčini vznik aberácií. Najčastejšie sledované aberácie ako dôsledok ionizujúceho žiarenia sú dicentrické a *ring* chromozómy [5]. Ako možný marker individuálnej RS sú v súčasnosti študované aj mikrojadrá. Pri delení buniek sa dcérske chromozómy segregujú do

opačných pólov bunky. Ak majú chromozómy poškodenú centroméru, nemajú ju alebo bolo poškodené deliace vretienko, môže sa stať, že niektorý chromozóm bude za ostatnými zaostávať. Pri vzniku novej jadrovej membrány vzniká membrána aj okolo zaostávajúcich chromozómov a vznikajú tak mikrojadrá [6].

Preto cieľom tejto práce bolo sledovanie spomínaných markerov DNA poškodenia, teda fokusov, aberácií a mikrojadier a validácia ich použitia pre identifikáciu RS pacientov. Pri všetkých markeroch sme sledovali *in vivo* lézie, no pri fokusoch aj poškodenie v *in vitro* podmienkach.

Materiál a metódy

Pre analýzu DNA opravných fokusov bola použitá periférna krv 56 pacientok, odobratá v štyroch rôznych časových etapách ich liečby: pred začiatkom RT, 24 h po 4. ožarovacej frakcii (doposiaľ prijatá dávka 10 Gy), jeden mesiac po skončení RT a jeden rok po skončení RT. Z krvi sme izolovali lymfocyty použitím lymfocytového separačného média a následne sme ich kultivovali pri 37°C v 5 % CO₂. Po kultivácii boli bunky prenesené na mikroskopické sklá, fixované v 3 % paraformaldehyde a permeabilizované pomocou 0,2 % roztoku Triton-X-100. Proteíny γ H2AX a 53BP1 boli imunologicky označené primárnymi protilátkami: monoklonálnou myšou anti- γ H2AX (NOVUS, Centennial, CO, USA) a polyklonálnou králičou anti-53BP1 (NOVUS, Centennial, CO, USA); a následne aj sekundárnymi protilátkami: kozou anti-myšou Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a kozou anti-králičou Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). DNA sme označili pomocou reagentu Vectashield s DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol). Lymfocyty boli analyzované fluorescenčným mikroskopom Zeiss Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Oberkochen, GE) a softvérom Metafer 5.0 (MetaSystems, Altlusheim, GE). V prípade *in vitro* experimentu, boli bunky po izolácii z periférnej krvi ožiarené γ lúčmi dávkou 2 Gy na ožarovacom systéme TrueBeam (Varian, Palo Alto, CA, USA) a kultivované pri 37°C v 5 % CO₂.

Pre analýzu chromozómových aberácií a mikrojadier sme použili periférnu krv 12 pacientok, ktorú sme odobrali v troch rôznych časových etapách ich liečby: pred začiatkom RT, 24 h po 4. ožarovacej frakcii (doposiaľ prijatá dávka 10 Gy) a jeden mesiac po skončení RT. Krv sme kultivovali 72 h pri 37°C v 5 % CO₂ v kultivačnom médiu s fytohemaglutinínom M (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), ktorý indukuje delenie T lymfocytov. V prípade CA sme 45 minút pred koncom kultivácie pridali do média kolchicín (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na zastavenie delenia buniek v metafáze, v prípade mikrojadier sme v 44. hodine kultivácie pridali cytochalazín B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ktorý zastavuje cytokinézu. Po kultivácii sme bunky inkubovali v 0,075 M hypotonickom roztoku KCl, ku ktorému sme neskôr pridali fixačný roztok glaciálnej kyseliny octovej s metanolom (1:3). Bunky sme opakovane fixovali fixačným roztokom, preniesli na mikroskopické sklá a značili činidlom Giemsa-Romanowsky. Mikroskopická analýza bola uskutočnená

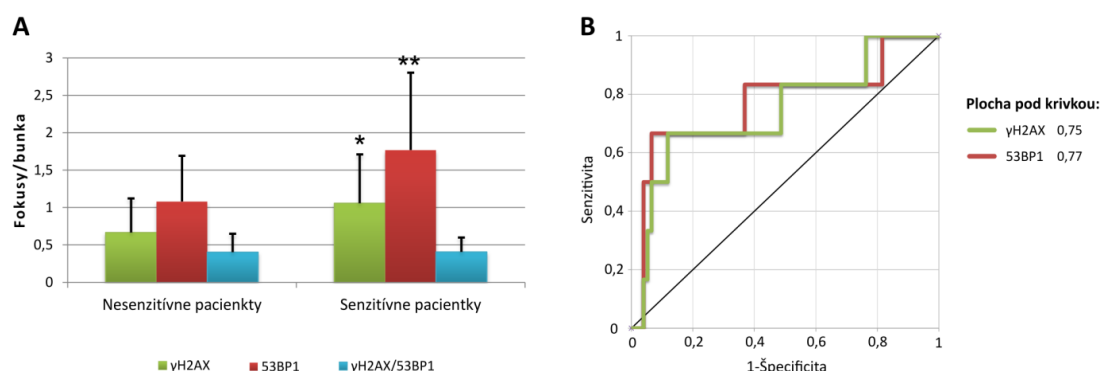
na mikroskope Zeiss Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Oberkochen, GE) so softvérom Metafer 5.0 (MetaSystems, Altlussheim, GE). V prípade CA sme hodnotili dicentrické a centrické *ring* chromozómy.

Dáta sme štatisticky analyzovali programom Statistica 8.0 pomocou multifaktoriálnej analýzy ANOVA a testu Fisher LSD. Výsledky boli považované za signifikantné pri $p < 0,05$. Analýza receiver operating characteristic (ROC) bola uskutočnená softvérom Sigma Plot 12.5.

Výsledky a diskusia

Analýza DNA opravných fokusov ukázala, že senzitivne pacientky majú pred začiatkom rádioterapie vyššie množstvo γ H2AX ($p = 0,01$) a 53BP1 fokusov ($p = 0,001$) ako nesenzitivne pacientky (Obrázok 1A), no tento rozdiel sa počas ožarovania stratil a nebol pozorovateľný ani po skončení RT (nezobrazené). Fokusy γ H2AX a 53BP1 sledované pred začatím RT by mohli byť ukazovateľom poškodenia DNA a senzitivity a preto sme sa rozhodli podrobiť ich tzv. ROC analýze (Obrázok 1B), aby sme overili, či sú vhodné na identifikáciu rádiosenzitivných jedincov. Pre obidva typy fokusov sme pozorovali miernu senzitivitu a špecifitu testu (AUC pre γ H2AX = 0,75; AUC pre 53BP1 = 0,77), tá však nie je postačujúca pre spoľahlivé rozlíšenie pacientov.

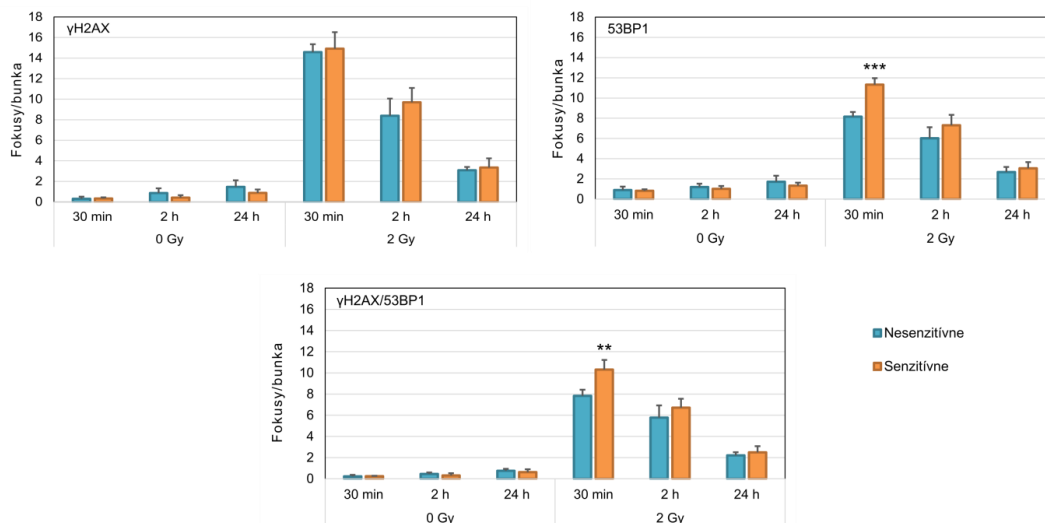
Objavili sme vplyv confundera – CHT. Pacientky liečené CHT majú pred začatím RT vyššie množstvo γ H2AX/53BP1 fokusov ($p = 0,043$) a počas nej po prijatej dávke 10 Gy viac 53BP1 ($p = 0,018$) a γ H2AX/53BP1 fokusov ($p = 0,043$) (nezobrazené). Je možné, že ide o dôsledok akumulácie poškodenia, ktoré vzniklo počas predchádzajúcej CHT. CHT pôsobí aj ako alkylačný či interkalačný agens a tvorba dvojvláknových zlomov je, teda, pre ňu bežná [7].



Obrázok 1. DNA opravné fokusy indukované in vivo pred rádioterapiou. A) Porovnanie množstva fokusov vo senzitivných a nesenzitivných pacientok. B) ROC analýza γ H2AX a 53BP1 fokusov. Chybové úsečky v tomto a vo všetkých ďalších grafoch predstavujú smerodajnú odchýlku, p -hodnoty sú zobrazené hviezdikami (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,001$).**

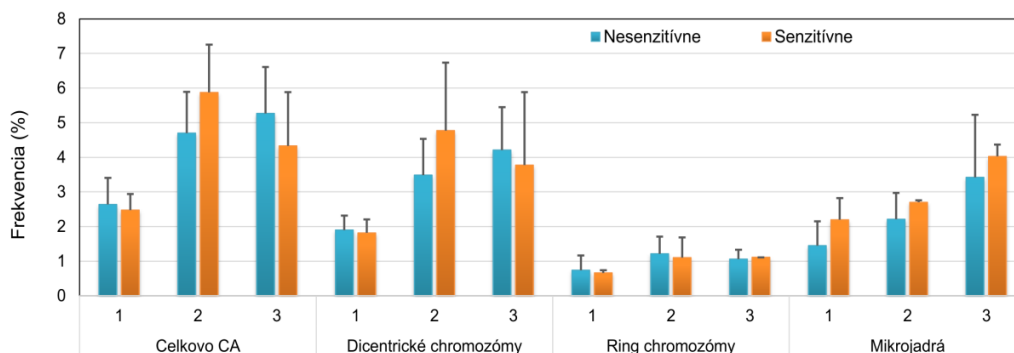
Po *in vitro* ožiarení ionizujúcim žiarením dávkou 2 Gy sme pozorovali rozdielnu kinetiku DNA opravných fokusov u senzitivných a nesenzitivných pacientok (Obrázok

2). Po 30 minútach od in vitro ožiarovania, kedy bol pozorovaný najvyšší počet fokusov v oboch skupinách, bolo u senzitivných pacientok vyššie množstvo 53BP1 ($p = 0001$) a γ H2AX/53BP1 ($p = 0,005$).



Obrázok 2. In vitro kinetika DNA opravných fokusov. γ H2AX, 53BP1 a γ H2AX/53BP1 fokusy boli pozorované 30 min, 2 h a 24 h po ožiarení lymfocytov pacientok ionizujúcim žiarením dávkou 2 Gy.

Rozdielnosť v indukcii fokusov by mohla byť zapríčinená odlišnou signalizáciou DNA poškodenia. Keďže počet γ H2AX fokusov sa medzi pacientkami nelíšil, rozdiel v signalizácii by sa mohol nachádzať v downstream časti signalizačnej dráhy od H2AX [8]. Po 2 a 24 hodinách, kedy počet fokusov klesal, sa množstvo fokusov nelíšilo, čo naznačuje rovnakú efektivitu opravy DNA.



Obrázok 3. Úroveň chromozomových aberácií a mikrojadier na rádioterapiu. Lymfocyty boli pacientkam odobraté pred rádioterapiou (1), počas nej po dávke 10 Gy (2) a jeden mesiac po jej skončení (3).

V priebehu RT a po nej dochádza k akumulácii CA, najmä dicentrických chromozómov, ale aj mikrojadier (Obrázok 3). Významné rozdiely medzi senzitivnými

a nesenzitívnymi pacientkami sme neobjavili, no je tu prítomný trend vyššieho počtu mikrojadier u senzitívnych pacientok.

Pod'akovanie

Ďakujeme docentovi Králikovi a doktorke Kontrišovej za pomoc pri ožiarení buniek ionizujúcim žiarením a doktorovi Roškovi za pomoc pri štatistickej analýze. Tento projekt bol podporený grantmi VEGA 2/0147/17, TRANSMED 2, ITMS 26240120030 a IAEA Research Contract No. 24714.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209-249.
- [2] Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2019; 30: 1674.
- [3] De Ruysscher D, Niedermann G, Burnet NG, Siva S, Lee AWM et al. Radiotherapy toxicity. *Nat Rev Dis Primers* 2019; 5: 13.
- [4] Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, Ellender M, Rana Z et al. DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ Mol Mutagen* 2015; 56: 491-504.
- [5] Kato TA. Human Lymphocyte Metaphase Chromosome Preparation for Radiation-Induced Chromosome Aberration Analysis. *Methods Mol Biol* 2019; 1984: 1-6.
- [6] Krupina K, Goginashvili A, Cleveland DW. Causes and consequences of micronuclei. *Curr Opin Cell Biol* 2021; 70: 91-99.
- [7] Kim S, Jun DH, Kim HJ, Jeong KC, Lee CH. Development of a high-content screening method for chemicals modulating DNA damage response. *J Biomol Screen* 2011; 16: 259-265.
- [8] Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 2010; 40: 179-204.

Downregulácia mir-205-5p a upregulácia *ZEB1* ako charakteristika diseminácie nádorových buniek u pacientov s invazívnym duktálnym karcinómom prsníka



Lenka Kalinková¹, Nataliia Nikolaieva¹,
Bozena Smolková², Sona Čierniková¹, Karol
Kajo^{1,3}, Vladimír Bella⁴, Viera Horvathová
Kajabová², Helena Kosnacová¹, Gabriel
Minarik⁵, Ivana Fridrichová¹

¹*Oddelenie genetiky, Ústav experimentálnej onkológie,
Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v.v.i.,
Bratislava, Slovensko*

²*Oddelenie molekulárnej onkológie, Ústav experimentálnej
onkológie, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie
vied, v.v.i., Bratislava, Slovensko*

³*Oddelenie patológie, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava, Slovensko*

⁴*Mamologická ambulancia I., Onkologický ústav sv. Alžbety, 81250 Bratislava, Slovensko*

⁵*Ústav molekulárnej biomedicíny, Lekárska fakulta UK v Bratislave, Slovensko*

Úvod

Karcinóm prsníka patrí medzi najčastejšie onkologické ochorenia u žien s približne 24,2% incidenciou a 15% úrovňou mortality, čo predstavuje okolo 2,1 milióna nových prípadov a 0,63 milióna úmrtí [1]. Diseminácia nádorových buniek prostredníctvom hematogénnej alebo lymfogénnej cirkulácie vedie k tvorbe metastatickej choroby až u približne jednej tretiny pacientov. Faktory určujúce spôsob šírenia rakovinových buniek závisia najmä od typu rakoviny a vlastností mikroprostredia nádoru [2]. Pri karcinóme prsníka, lymfovaskulárna invázia v strede a okolo nádorového tkaniva naznačuje mechanizmy šírenia rakoviny. Nádorové bunky sa šíria z nádorovej hmoty lymfatickým obehom spôsobom intenzívnej neovaskularizácie - neolymfangiogenézy [3]. Metastázy v lymfatických uzlinách sa považujú za kľúčový prognostický marker šírenia a agresivity nádoru [4].

Avšak detekcia a počet cirkulujúcich nádorových buniek (CTC) v krvnej cirkulácii sa taktiež používa ako nezávislý prognostický faktor pre primárny a metastatický karcinóm prsníka. Pri hematogénnej diseminácii karcinómu prsníka zohráva hlavnú úlohu epiteliálno-mezenchymálny prechod (EMT) a z neho vyplývajúce bunky s mezenchymálnym fenotypom, ktoré sú charakterizované zvýšenou migračnou kapacitou, invazívnosťou, apoptózou a rezistenciou [5]. *In vitro* štúdie zamerané na karcinóm prsníka na modeloch bazálnych bunkových línii zaznamenali zníženú expresiu členov klastra miR-200 a upreguláciu EMT génov *SNAIL*, *SNAIL2*, *ZEB1* a *ZEB2*. Okrem

toho, *ZEB1* a *ZEB2* boli priamo regulované miR-205. Znížené hladiny miR-205 iniciovali EMT a súviseli s metastatickým fenotypom pacientov [6]. V našej štúdii sme skúmali nové prognostické vlastnosti charakteristické pre procesy invazivity a metastázovania. Na vzorkách nádorov od pacientok s invazívnym duktálnym karcinómom prsníka sme vyhodnocovali expresiu 7 miRNA a 6 génov regulujúcich epiteliálno-mezenchymálny prechod a to vrátane centra tumoru (TU-C), invazívneho frontu tumoru (TU-IF), metastáz v lymfatických uzlinách (MLU) a frakcie periférnej krvi obohatenej o CTC. Na vzorkách tkaniva od pacientov so vzdialenými metastázami sme zistili vysokú expresiu génu *ZEB1*. Naproti tomu, v depletovanej frakcii periférnej krvi sme pozorovali downreguláciu miR-205-5p u pacientov s epiteliálnymi a/alebo mezenchymálnymi markermi charakteristickými pre CTC (CTC+). Podľa získaných výsledkov miR-205-5p a gén *ZEB1* sú sľubnými kandidátmi pre markery metastatického potenciálu v duktálnom karcinóme prsníka.

Materiál a metódy

Pacienti. V našej štúdii sme analyzovali vzorky tkaniva invazívneho duktálneho karcinómu prsníka v parafínových bločkoch (FFPE) od 31 pacientok a vzorky periférnej krvi od 30 pacientok. Vzorky tkaniva boli odobraté z centra nádoru, invazívneho frontu a metastáz v lymfatickej uzline. 13 vzoriek prsného tkaniva a 12 vzoriek periférnej krvi sa použilo od zdravých žien. Zo záznamov pacientov sa získali klinické a histopatologické charakteristiky, imunohistochemické údaje (veľkosť nádoru, histologický stupeň, stav regionálnych lymfatických uzlín (LN) a metastáz (MTS), štádium TNM (T-tumor, N-nodus (uzlina) a M-metastáza), LVI (lymfovaskulárna invázia), stav hormonálnych receptorov (ER/PR – estrogénový a progesterónový receptor) a expresia HER2 – receptor pre ľudský epidermálny rastový faktor, expresia Ki-67 a E-kadherínu). Definícia nádorov bola klasifikovaná podľa TNM systému. Materiál a klinicko-histopatologické záznamy boli pripravené na Ústave patológie OÚSA.

Metódy. Vo vzorkách 31 pacientok s invazívnym duktálnym karcinómom prsníka sme vyhodnocovali expresiu 7 miRNA (miR-9-5p, miR-124-3p, miR-200c-3p, miR-203a-3p, miR-205-5p, miR-221-3p, miR-720) a 6 génov (*CDHI*, *TWIST*, *SNAIL*, *SNAIL2*, *ZEB1*, *ZEB2*) a to vrátane centra tumoru (TU-C), invazívneho frontu tumoru (TU-IF), metastáz v lymfatických uzlinách (MLU) a frakcie periférnej krvi obohatenej o cirkulujúce nádorové bunky (CTC).

Frakcie periférnej krvi obohatenej o cirkulujúce nádorové bunky boli spracované pomocou RosetteSep Human CD45 Depletion Cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada). Detekcia CTC sa uskutočnila pomocou kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie v reálnom čase (qRT-PCR). Extrakcia RNA z frakcie periférnej krvi bola analyzovaná na prítomnosť transkriptov EMT génov *TWIST1*, *SNAIL1*, *SLUG* a *ZEB1*, a epitelového antigénu (CK19) pomocou TaqMan Assay (LifeTechnologies, USA). Vzorky s vyššími hladinami expresie epitelového a/alebo

mezenchymálneho génu v porovnaní s kontrolami boli považované za CTC pozitívne (CTC+). miRNA a mRNA z frakcie periférnej krvi obohatenej o cirkulujúce nádorové bunky a tkaniva nádoru FFPE sa použili pre analýzu génovej expresie. miRNA z frakcie CTC sa izolovali pomocou miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko) a miRNA z FFPE vzoriek sa izolovali pomocou miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko) podľa pokynov výrobcu.

mRNA z frakcií CTC boli izolované pomocou miRNeasy Mini Kit RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko) a mRNA zo vzoriek FFPE – pomocou súpravy PureLink FFPE Total RNA Isolation Kit (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) podľa protokolu.

miRNA a mRNA boli reverzne prepísané do cDNA pomocou miScript II RT Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko) a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litva).

Na expresnú analýzu miRNA sa použil miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Maryland, USA) a metóda RT-PCR bola realizovaná pomocou miScript miRNA PCR Array (CMIHS02741, Qiagen, Nemecko) v systéme AriaMx Real-Time PCR System (Agilent, Santa Clara, CA, USA) za nasledujúcich podmienok: pred-denaturácia pri 95 °C 15 min, 40 cyklov pri 94 °C 15 s, 55 °C 30 s a 70 °C 30 s, cyklus topenia pri 95 °C 30 s, 65 °C 30 s a 95 °C 30 s. Normalizácia pre expresiu miRNA bola stanovená podľa referenčného génu *Snord95*. Expresia *CDH1*, *TWIST1*, *SNAIL*, *SNAIL2*, *ZEB1*, *ZEB2* a referenčného génu *18S* a qRT-PCR bola analyzovaná pomocou TaqMan Gene Expression Assays – single tube assays (Thermo Fisher Scientific, Pleasanton, CA, USA) v systéme AriaMx Real-Time PCR System (Agilent, Santa Clara, CA, USA) za nasledujúcich podmienok: inkubácia uracil-N-glykozylázy – 1 cyklus pri 50 °C 2 min, aktivácia enzýmu – 1 cyklus pri 95 °C 20 s, denaturácia – 40 cyklov pri 95 °C 30 s a hybridizácia primerov (annealing) 60 °C 30 s. Fluorescencia bola detegovaná medzi 10. a 40. cyklom a fold change bol vypočítaný ako normalizovaná relatívna génová expresia pomocou vzorca $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Expresie miRNA a mRNA a asociácie s klinicko-patologickými charakteristikami boli štatisticky vyhodnotené.

Výsledky a diskusia

V našej štúdii sme analyzovali expresie miRNA a mRNA na vzorkách z TU-C, TU-IF, MLU a CTC. Vzorky z LMU boli downregulované pre miR-205-5p a upregulované pre *ZEB1* (Tabuľka 1). V porovnaní s TU-C a TU-IF gén *ZEB1* bol upregulovaný v MLU. Pri porovnaní vzoriek CTC+ a CTC- sme zaznamenali downreguláciu miR-205-5p. Vo vzorkách CTC+ expresia miR-205-5p negatívne korelovala so *ZEB1* (r v rozsahu od -0,853 do -0,588 a p -hodnota v rozsahu od 0,001 do 0,044).

Tabuľka 1. Porovnanie expresie miR-205-5p a génu *ZEB1* medzi kontrolami a rôznymi typmi vzoriek pacientov s karcinómom prsníka.

miRNA/gén	TU-C vs. C-Tkanivo		TU-IF vs. C- Tkanivo		LNM vs. C- Tkanivo	
	FC	<i>p</i> -hodnota	FC	<i>p</i> - hodnota	FC	<i>p</i> - hodnota
miR-205-5p	0,512	0,251	0,350	0,054	0,210	0,012
<i>ZEB1</i>	0,482	0,117	0,474	0,052	22,08	0,043
	CTC- vs. C-Krv		CTC+ vs. C- Krv		CTC+ vs. CTC-	
	FC	<i>p</i> - hodnota	FC	<i>p</i> - hodnota	FC	<i>p</i> - hodnota
miR-205-5p	10,792	0,082	0,443	0,370	0,041	0,010
<i>ZEB1</i>	0,683	0,206	1,121	0,751	1,641	0,410
	TU-IF vs. TU C		LNM vs. TU C		LNM vs. TU IF	
	FC	<i>p</i> - hodnota	FC	<i>p</i> - hodnota	FC	<i>p</i> - hodnota
miR-205-5p	0,684	0,612	0,409	0,100	0,598	0,318
<i>ZEB1</i>	0,982	0,947	45,794	0,015	46,615	0,014

FC – fold change.

Vyššie uvedené výsledky naznačujú dôležitú úlohu *ZEB1* pri invázii [7]. Transkripčný faktor *ZEB1* je regulovaný viacerými signálnymi dráhami a molekulami, ako sú TGF- β , β -katenín a miRNA. Okrem toho *ZEB1* iniciuje chemorezistenciu, ale inhibuje apikálno-bazálnu polaritu rakovinových buniek a antiestrogénovú citlivosť [8]. Nadmerná expresia *ZEB1* prispieva k zachovaniu kmeňových vlastností a epigenetickému preprogramovaniu [9]. Tieto funkcie by mohli prispieť k odolnosti a prežívaniu hematogénne diseminovaných buniek karcinómu prsníka pri zvýšení hladín génu *ZEB1*.

Pomocou jednorozmernej štatistickej analýzy sme našli asociácie medzi up- alebo downregulovanou expresiou miRNA a EMT génom a relevantnými klinicko-patologickými charakteristikami (Tabuľka 2). Vo vzorkách TU-IF boli detegované kombinácie downregulovaného *ZEB1* s metastázami v lymfatických uzlinách, LVI a vyšším TNM. V tkanivách MLU upregulácia *ZEB1* bola spojená s ER+, vyšším TNM a MTS+ v primárnom nádore. Navyše sme zistili, že miR-205-5p bola upregulovaná u pacientov s LNM+ a vyšším TNM, ale významne downregulovaná u pacientov s CTC+. Znižujúce sa hladiny miR-205-5p boli pozorované u menej agresívnych podtypov karcinómu prsníka a ER+/PR+ nádorov až po agresívnejšie prípady [6]. Znížená hladina miR-205-5p prispieva k chemorezistencii CTC, ktorá vyplýva z nadmernej expresie VEGF-A a FGF2 [10]. Znížené hladiny expresie miR-205-5p vo vzorkách CTC+ umožňujú vyššiu expresiu génu *ZEB1*, čo môže zlepšiť metastatický potenciál hematogénne diseminovaných nádorových buniek. Našli sme iba jednu štúdiu *in silico*, v ktorej boli identifikované špecifické rozdielne exprimované miRNA, medzi ktorými bola miR-205 pre metastatický karcinóm prsníka [6].

Tabuľka 2. Kombinácia významných výsledkov up- a downregulácie miR-205-5p a expresie génu ZEB1 u pacientov s karcinómom prsníka vo vzťahu s rôznymi klinicko-patologickými parametrami.

Vzorky	miRNA/Gén	Klinické charakteristiky	FC	p-Value	95% CI
TU-IF	ZEB1	LNM+ vs. LNM-	0,497	0,035	0,079–4,408
		TNM III and IV vs. TNM I and II	0,438	0,007	0,059–2,126
LNM Frakcie periférnej krvi	ZEB1 miR-205-5p	LVI+ vs. LVI-	0,482	0,034	0,079–3,844
		MTS + vs. MTS-	824,73	0,018	0,283–1584361,8
		CTC+ vs. CTC-	0,041	0,010	0,000–69,820
		CTC+ vs. CTC- LNM+ vs. LNM-	0,041 22,961	0,010 0,035	0,000–69,820 0,012–400412,9

Zriedkavé publikácie o expresie miRNA v CTC poukazujú na prínos originálnych výsledkov našej štúdie, v ktorej boli vzorky periférnej krvi obohatenej o CTC charakterizované epitelovými a/alebo mezenchymálnymi znakmi. Nadmerná expresia ZEB1 by mohla zvýšiť metastatický potenciál rakovinových buniek šírených cez lymfatický obeh. Naproti tomu, znížená expresia miR-205-5p by mohla prispieť k iniciácii ochranných prvkov – imunitný únik a chemorezistencia prostredníctvom zvýšenej expresie niekoľkých cieľových génov vrátane ZEB1. miR-205-5p a gén ZEB1 by mohli byť sľubnými kandidátmi pre markery metastatického potenciálu v duktálnom karcinóme prsníka.

Podakovanie

Táto práca vznikla za podpory Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR a Slovenskej akadémie vied v rámci projektu VEGA 2/0036/19.

Literárne zdroje

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. et al. CA Cancer J. Clin. 2018; 68: 394–424.
- [2] Wong SY, Hynes RO. Lymphatic or hematogenous dissemination: How does a metastatic tumor cell decide? Cell Cycle 2006; 5: 812–817.
- [3] Paduch R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. Cell Oncol. 2016; 39: 397–410.
- [4] Nathanson SD, Krag D, Kuerer HM, Newman LA, Brown M et al. Breast cancer metastasis through the lympho-vascular system. Clin. Exp. Metastasis 2018; 35: 443–454.
- [5] Bulfoni M, Gerratana L, Del Ben F, Marzinotto S, Sorrentino M et al. In patients with metastatic breast cancer the identification of circulating tumor cells in epithelial-to-mesenchymal transition is associated with a poor prognosis. Breast Cancer Res. 2016; 18: 30.

- [6] Sun E-H, Zhou Q, Liu K-S, Wei W, Wang C-M et al. Screening miRNAs related to different subtypes of breast cancer with miRNAs microarray. *Eur. Rev. Med. Pharm. Sci.* 2014; 18: 2783–2788.
- [7] Kalinkova L, Nikolaieva N, Smolková B et al. miR-205-5p downregulation and *ZEB1* upregulation characterize the dissemination tumor cells in patients with invasive ductal breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23: 103.
- [8] Wu H-T, Zhong H-T, Li G-W, Shen J-X, Ye Q-Q et al. Oncogenic functions of the EMT-related transcription factor *ZEB1* in breast cancer. *J. Transl. Med.* 2020; 18: 51.
- [9] Zhang Y, Xu L, Li A, Han X. The roles of *ZEB1* in tumorigenic progression and epigenetic modifications. *Biomed. Pharm.* 2019; 110: 400–408.
- [10] Hu Y, Qiu Y, Yague E, Ji W, Liu J et al. miRNA-205 targets VEGFA and FGF2 and regulates resistance to chemotherapeutics in breast cancer. *Cell Death Dis.* 2016; 7: e2291.

ABSTRAKTY SÚŤAŽNÝCH PRÍSPEVKOV

PTEN GENE MUTATIONS IN UTERINE SEROUS CARCINOMA AND THEIR RELEVANCE IN PERSONALISED CANCER TREATMENT

Lajos Gergely¹, Vanda Repiská¹, Vladimír Šišovský², Kristína Mosná², Petra Priščáková¹

¹*Institute of Medical Biology, Genetics and Clinical Genetics, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, SR*

²*Institute of Pathological Anatomy, Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, SR*

Introduction: Uterine serous carcinoma (SC) is an aggressive variant of endometrial cancer with unfavourable prognosis. Mutations of the *TP53* tumour suppressor gene are characteristic in SC, while the mutations of the *PTEN* tumour suppressor gene are considered as atypical according to the literature. In contrast, mutations of the *PTEN* gene are the most frequent in the endometrioid variant of endometrial cancer.

Aim of the study: To evaluate an association between the histomorphology of SC and the presence of *PTEN* mutations and in this way to determine if the sequencing analysis of the *PTEN* gene from SC tumour samples provides potentially useful information for therapeutic decision-making in patients from the Slovak population.

Patients and methods: In our study, the DNA was isolated from microdissections from eight formalin fixed paraffin embedded SC tissue samples of patients from the Slovak population. All (9) exons of the *PTEN* gene were amplified with PCR and then analysed with Sanger sequencing.

Results: We found more mutations than expected based on international standards, and we also found rare mutations in our study group. Of the eight analysed samples, three were found to have mutations in the *PTEN* gene, two of which contained two mutations in heterozygous state (c.389G>A + c.419T>G and c.19G>T + c.1021T>G), and one contained a single mutation in homozygous state (c.730C>T). All detected mutations can be found in the COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) database and are classified as pathogenic, therefore are considered relevant in neoplastic context.

Conclusion: Comparing our results with the study of the TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) Research Network and data from COSMIC, we suggest that in the population of the Slovak Republic, the frequency of *PTEN* gene mutations in SC is higher than the American (TCGA – approx. 2 %) or international (COSMIC – 7 %) average. Thus, the sequencing analysis of this gene from tumour samples would be an effective, useful laboratory method with clinically relevant results. The protein encoded by the *PTEN* gene (PTEN) is the main negative regulator of the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway, which alterations are important in the biology of many gynecologic

malignancies such as gestational trophoblastic tumors. Loss of PTEN function leads to hyperactivity of this pathway, deregulating the cell cycle. Therefore, mutations of the *PTEN* gene can be exploited in the therapy as they increase the sensitivity of the tumour cells to PI3K and mTOR inhibitors. In this way, *PTEN* mutational analysis could be a relevant component useful in clinical practice.

Acknowledgement: The authors disclosed receipt of the following financial support for the research and/or authorship of this article: VEGA 1/0559/22 from The Ministry of Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic.

SKYRÍN – OD MALEJ BIOMOLEKULY PO ZVRÁTENIE REZISTENCIE NA TRAIL V HYPOXII

Marián Babinčák, Rastislav Jendželovský, Ján Košuth, Martin Majerník, Jana Vargová, Peter Fedoročko

Katedra bunkovej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Skyrín (SKR) je malá prírodná biomolekula, potenciálny prekursor v biosyntéze hypericínu. Táto molekula s bisantrachinónovou štruktúrou sa prirodzene vyskytuje vo veľkom množstve rôznych húb, lišajníkov a rastlín, medzi inými aj *Hypericum* spp. Hoci bola cytotoxicita tejto molekuly testovaná na viacerých bunkových liniách, presný mechanizmus jej účinku dosiaľ nie je známy.

Na stanovenie vplyvu SKR na bunkové línie kolorektálneho adenokarcinómu sme v našich experimentoch použili bunkové línie HCT 116, HT-29 a SW620. Všetky experimenty sme uskutočnili paralelne v hypoxických (1% kyslíka) a v normoxických podmienkach (20% kyslíka). Vykonané boli testy metabolickej aktivity buniek (MTT assay), stanovenie celularity, viability, množstva apoptotických a mŕtvych buniek, fázy bunkového cyklu a klonogénnej schopnosti týchto buniek. Na stanovenie mechanizmu účinku SKR bola vykonaná komparatívna proteomická analýza spojená s bioinformatickou analýzou získaných dát a ich verifikáciou s využitím RT-qPCR.

Na základe našich výsledkov, SKR mal negatívny efekt na nádorové bunkové línie HCT 116 a HT-29 v hypoxických aj v normoxických podmienkach. Efekt SKR na bunkovú líniu HCT 116 bol výraznejší, čo sa prejavilo zníženou metabolickou aktivitou (MTT assay), celularitou a akumuláciou buniek v G1 fáze bunkového cyklu. Zaznamenali sme taktiež signifikantný nárast množstva apoptotických buniek v hypoxii aj normoxii.

Na základe výsledkov z komparatívnej proteomickej analýzy (kompletné dáta sú dostupné prostredníctvom databázy ProteomeXchange s identifikátorom PXD019995) spojenou s bioinformatickou analýzou dát a verifikáciou pomocou RT-qPCR predpokladáme, že mechanizmus účinku SKR je spojený so signifikantnou upreguláciou Receptora smrti 5 (DR5; Death receptor 5; *TNFRSF10B*, UniProt O14763). Nárast množstva tohto receptora na TRAIL je spojený so zvrátením rezistencie na TRAIL v hypoxii, ako aj pri TRAIL rezistentných bunkových liniách (HT-29 a SW620). Na základe našich výsledkov predpokladáme, že SKR môže byť využitý ako protinádorové liečivo respektíve ako adjuvans pri liečbe zacielenej na receptory TRAIL.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla s podporou: APVV-18-0125, VEGA 1/0022/19 a projektu OPENMED (ITMS2014+: 313011V455) spolufinancovaného zo zdrojov ERDF.

CHEMOTERAPIOU VYVOLANÉ ZMENY V NÁDOROVOM MIKROPROSTREDÍ ZVYŠUJÚ IVAZIVITU A METASTÁZOVANIE BUNIEK KARCINÓMU PRSNÍKA



Jana Plavá¹, Monika Buríková¹, Marína Cihová¹, Lenka Trnková¹, Pavel Babál², Martin Boháč^{3,4,5}, Ľuboš Danišovič^{5,6}, Lucia Kučerová^{1,3}, Svetlana Miklíková¹

¹*Biomedicínske centrum SAV v.v.i., Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava*

²*Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava*

³*Jednotka translačného výskumu, II. onkologická klinika LF UK a NOÚ, Klenová 1, 833 10 Bratislava*

⁴*Klinika chirurgickej onkológie SZU a NOÚ, Klenová 1, 833 10 Bratislava*

⁵*Regenmed Ltd, Medená 29, 811 08 Bratislava*

⁶*Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava*

Chemoterapeutická liečba patrí medzi štandardné liečebné postupy pri karcinómoch prsníka. Hlavným cieľom chemoterapie sú rýchlo sa deliace bunky, no jej toxickým účinkom sú rovnako vystavené aj bunky nádorového mikroprostredia. Keďže aktívne komunikujú s nádorovými bunkami, zmeny v nádorovom mikroprostredí spôsobené chemoterapiou môžu ovplyvniť správanie nádorových buniek. Je známe, že komunikácia medzi nádorovými bunkami a okolitými stromálnymi zložkami môže ovplyvňovať terapeutickú odpoveď (1). V našej práci sme sa preto zamerali na efekt doxorubicínu (DOX) a paklitaxelu (PAC) na mezenchýmové stromálne bunky (MSC), ktoré tvoria dôležitú súčasť mikroprostredia nádorov prsníka.

Chemoterapiou ovplyvnené MSC (DOX-MSC, PAC-MSC) sme kultivovali s tromi rôznymi prsníkovými nádorovými líniami, aby sme ukázali efekt chemoterapiou ovplyvneného mikroprostredia na správanie nádorových buniek *in vitro* a *in vivo*. Kondicionované média z ko-kultivácií sme použili na stanovenie zmien cytokínov a chemokínov po ovplyvnení MSC doxorubicínom a paklitaxelom. Nádorové bunky spolu s ovplyvnenými aj neovplyvnenými MSC sme subkutánne podali imunodeficientným SCID/Beige myšiam. Následne sme analyzovali invazivitu nádorových buniek do okolitého tkaniva a metastázovanie do okolitých orgánov. Na štúdium angiogenézy sme použili rovnaké kombinácie buniek, ktoré sme aplikovali na chorioalantoickú membránu prepeličieho embrya.

Chemoterapiou ovplyvnené MSC zmenili sekrečný profil a ovplyvnili proliferáciu a sekréciu cytokínov u nádorových buniek. Imunohistochemická analýza xenograftov odhalila zvýšený invazívny potenciál nádorových buniek, ktoré boli myšiam injektované spolu s DOX- a PAC-MSC a infiltráciu nádorov nervovými vláknami. Takéto MSC zároveň zvýšili angiogézu, ktorá hrá kľúčovú úlohu pri tumorigenéze (2).

Výsledky prezentované v tejto štúdii poukazujú nato, že neoadjuvantná chemoterapeutická liečba by mohla meniť inak zdravú strómu na tzv. nádor podporujúcu. Zmeny, ktoré chemoterapia spôsobuje v mezenchýmových stromálnych bunkách výrazne vplyvajú na invazivitu a metastázovanie nádorových buniek a zvyšujú angiogézu. Pochopenie nádorového mikroprostredia a jeho komplexnej siete signálov preto môže v budúcnosti napomôcť pri modifikovaní liečebných postupov alebo ich cielení na rôzne mechanizmy.

PodĎakovanie

Táto práca vznikla s podporou projektov APVV-16-0178, VEGA 2/0138/20. Experimenty na prístroji IncuCyte ZOOM™ boli uskutočnené s finančnou podporou Nadácie Výskum rakoviny

- [1] Mehraj et al. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2021;87(2):147–58. Epub 2021/01/10.
- [2] Plava et al. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021 Sep 27;40(1):302.

Identifikácia potenciálnych prognostických a terapeutických cieľov u refraktérnych testikulárných nádorov z germinatívnych buniek



Silvia Schmidtová^{1,2}, Katarína Kaľavská^{1,2,3}, Natália Udvardová^{1,4}, Zuzana Čierna^{5,6}, Michal Chovanec^{2,3}, Lucia Kučerová^{1,2}, Michal Mego^{1,2,3}

¹Ústav experimentálnej onkológie BMC SAV, v.v.i., Bratislava

²Jednotka translačného výskumu LFUK a NOÚ, Bratislava

³II. onkologická klinika LFUK a NOÚ, Bratislava

⁴Lekárska fakulta Univerzity Komenského Bratislava

⁵Ústav patologickej anatómie LF UK a UN Bratislava, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava

⁶Ústav patológie, FZaSP TU a FN Trnava, Trnava

Testikulárne nádory z germinatívnych buniek (TGCTs, z angl. *testicular germ cell tumors*) predstavujú približne 1% všetkých mužských malignít, napriek tomu sa jedná o najčastejšie solídne nádorové ochorenie u mužov do 34 rokov [1]. Signifikantné zníženie mortality a zlepšenie celkového 5-ročného prežívania na viac ako 95% prinieslo v liečbe TGCTs až zavedenie cisplatiny [2]. Napriek tomu však približne 10-15% pacientov vykazuje rezistenciu voči cisplatine, ktorá predstavuje výrazný klinický problém. Rozvoj chemorezistencie je hlavnou príčinou morbidít a mortality TGCTs pacientov a pre týchto pacientov zatiaľ neexistujú vhodné liečebné alternatívy [3].

V tejto práci sme sa zamerali na identifikáciu možných prognostických a terapeutických markerov v TGCTs rezistentných voči cisplatine. Ako modelové systémy sme použili viaceré bunkové línie a ich rezistentné varianty, ako aj *in vivo* modely a patientske tkanivá. Z metodických prístupov využívame metódy molekulárnej biológie, imunohistochemické farbenia a rôzne funkčné testy. Analýza expresie AIF (apoptózu indukujúci faktor) v TGCTs ukázala, že pacienti s metastatickými TGCTs s vysokou expresiou AIF mali lepšie celkové prežitie v porovnaní s pacientmi s nízkou AIF expresiou ($p=0,048$) [4]. V bunkovej línii NOY-1 CisR (chemorezistentná línia odvodená z nádoru zo žltkového vaku) sme detegovali zvýšenú expresiu viacerých markerov nádorových kmeňových buniek, pričom pri ALDH3A1 géne táto nadexpresia korelovala so zníženou metyláciou. Predovplyvnenie NOY-1 CisR buniek napabucasinom, inhibítorom markerov nádorových kmeňových buniek, zvýšilo citlivosť týchto buniek na cisplatinu v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach [5]. Molekulárna analýza TGCTs bunkových línii ukázala dereguláciu Wnt/ β -katenin signálnej dráhy a potenciál

inhibície tejto signálnej dráhy v prekonaní chemorezistencie TGCTs sme dokázali aj v *in vivo* podmienkach [6]. Ďalší možný terapeutický cieľ by mohol predstavovať PARP, avšak kombinácia PARP inhibítora (veliparib) a cisplatiny *in vivo* nepotvrdila synergický účinok pozorovaný v *in vitro* experimentoch. Zlepšenie terapeutického efektu by mohli priniesť iné PARP inhibítory, príp. ich kombinácia s inými liečivami.

V našej práci sme ukázali viacero biomarkerov, ktoré by mohli slúžiť ako nové terapeutické, ale aj prognostické ciele. Na základe našich výsledkov by v budúcnosti bolo možné v klinickej praxi lepšie nastaviť liečbu u refraktérnych TGCTs pacientov, vyhnúť sa tak nežiaducim účinkom chemoterapie a tým zvýšiť aj kvalitu ich života.

PodĎakovanie

Túto prácu finančne podporila Agentúra na podporu výskumu a vývoja – grant APVV-20-0158 a Vedecká grantová agentúra MŠVVaŠ SR a SAV – grant VEGA 2/0124/21. Táto práca vznikla s podporou Nadácie Výskum rakoviny a organizácie Liga proti rakovine.

- [1] Bray F. et al., *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Siegel R.L. et al., *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- [3] Jacobsen C. et al., *Andrology*, 2015, 3(1): 111-21.
- [4] Letkovska K. et al., *Cancers*, 2021, 13(4): 776.
- [5] Schmidtova S. et al., *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 1-16.
- [6] Schmidtova S. et al., *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 4263.