

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-0669-10**

Oprava DNA a preleukemické klony v kmeňových bunkách pupočníkovej krvi

Zodpovedný riešiteľ **Igor Beliaev**

Príjemca **ÚEO SAV**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. ÚEO SAV
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

- 1.
- 2.
- 3.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

- 1.
- 2.
- 3.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Skorvaga M, Nikitina E, Kubes M, Kosik P, Gajdosechova B, Leitnerova M, Copakova L, Belyaev I. 2014. Incidence of common preleukemic gene fusions in umbilical cord blood in Slovak population. PLoS ONE 9(3):e91116.
2. Skorvaga M, Nikitina E, Kolenova A, Puskacova J, Leitnerova M, Copakova L, Belyaev I. 2014. Combined multiplex and monoplex RT-PCR as a reliable and cost-effective method for molecular diagnostics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Neoplasma 61(6):758-765.
3. Somsedikova A, Markova E, Kolenova A, Puskacova J, Kubes M, Belyaev I. 2014. Constitutive 53BP1/gamma H2AX foci are increased in cells of ALL patients dependent on BCR-ABL and TEL-AML1 preleukemic gene fusions. Neoplasma 61(5):617-625.
4. Sorokina S, Markova E, Gursky J, Dobrovodsky J, Belyaev I. 2013. Relative biological

efficiency of protons at low and therapeutic doses in induction of 53BP1/gammaH2AX foci in lymphocytes from umbilical cord blood. *International Journal of Radiation Biology* 89(9):716-23.

5. Vasilyev SA, Kubes M, Markova E, Belyaev I. 2013. DNA damage response in CD133 + stem/progenitor cells from umbilical cord blood: Low level of endogenous foci and high recruitment of 53BP1. *International Journal of Radiation Biology* 89(4):301-309.
6. Somsedíková A, Kosik P, Nikitina E, Zastko L, Durdík M, Gajdošechová B, et al. DSB, apoptosis and preleukemic clones in UCB CD34+/CD34- cells exposed to RF from a test-mobile phone. In: Kuster N, editor. 2nd International Workshop EMF Health Risk Research: Lessons Learned and Recommendations for the Future; 2012 October 21-25, 2012; Monte Verita, Ascona, Switzerland: IT'IS Foundation, Zurich, Switzerland; 2012. p. 21.
7. Belyaev I. DNA repair foci in cancer risk assessment, diagnostics and treatment. In: Piršel M, editor. 6th DNA Repair Workshop; 2012 June 3-7, 2012; Smolenice Castle, Slovak Republic: Cancer Research Institute, SAV, Bratislava, Slovak Republic; 2012. p. 26 (invited lecture).
8. Kozics K, Horvathova E, Sorokina S, Gursky J, Zastko L, Plavčková P, et al. DNA damage response in stem/progenitor CD34+ and CD34- umbilical cord blood cells. 42nd Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society; 2012 September 16-20, 2012; Warsaw, Poland: European Environmental Mutagen Society, Warsaw, Poland; 2012. p. 173.
9. Vokalova L, Fajtova M, Vyparinová K, Somsedíková A, Kosik P, et al. DNA damage response in hematopoietic cells of acute lymphoblastic leukemia patients. In: Kalina T, editor; 2013 September 21-24, 2013; Mikulov, Czech Republic. AMCA, Prague, Czech Republic. pp. 181-182.
10. Vasilyev S, Zastko L, Sorokina S, Gursky J, Plavckova P, et al. DNA damage response in human lymphocytes and hematopoietic stem cells to radiation at low and therapeutical doses; 2013 March 11-13, 2013; Tomsk Research Center, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Science, Seversk-Tomsk, Russia. Federal Medical and Biological Agency, Russia pp. 79-80.
11. Marková E, Vasilyev S, Sorokina S, Gursky J, Zastko L, et al. Response of human hematopoietic stem cells and lymphocytes from umbilical cord blood to γ -radiation and protons at low and therapeutical doses; 2013 April 24-26, 2013; The Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden. DoReMi, 7th Framework Program of the European Atomic Energy Community, Stockholm, Sweden. pp. 32A.
12. Belyaev I, Marková E, Somsedíková A, Vasilyev S, Sorokina S, Durdik M, Kosik P, Zastko L, Plavckova P, Vokalova L. Radiation-induced DNA repair foci: fundamental and applied aspects. In: Yasko NA (ed.); 2014 October 21-24, 2014; Moscow, Russia. People's Friendship University of Russia. p 72 (invited lecture).
13. Durdik M, Gursky J, Kosik P, Marková E, Belyaev I. Assessment of DNA repair foci and γ H2AX pan-staining in relationship to radiation-induced apoptosis; 2014 September 14-19, 2014; Rhodes, Greece. p 127.
14. Kosik P, Vokalova L, Zastko L, Plavckova P, Kubes M, Marková E, Belyaev I. Apoptosis and DNA damage response in human hematopoietic stem/progenitor cells from umbilical cord blood 2014; September 14-19, 2014; Rhodes, Greece. p 128.
15. Belyaev I. Induction of preleukemic gene fusions in hematopoietic stem cells as a key mechanism for assessment and prevention of ELF-induced leukemia. In: Henshaw D (ed.); 2014 September 22-23, 2014; London, UK. Children with Cancer UK. p 15 (invited lecture).

Uplatnenie výsledkov projektu

1. Na molekulárnu diagnózu najčastejšie sa vyskytujúcich fúzných transkriptov asociovaných s detskou akútnou lymfoblastovou leukémiou (ALL) sme navrhli novú metódu, ktorá vznikla kombináciou multiplex a monoplex reverzne-transkripčnej polymerázovej reťazovej reakcie (RT-PCR). Táto metóda predstavuje spoľahlivú, špecifickú, dostatočne senzitivnú a rentabilnú alternatívu v porovnaní s oveľa komplexnejšími a finančne náročnejšími technikami „real-time“ kvantitatívnej PCR (R-T qPCR).

2. Na izoláciu vysokokvalitnej RNA zo zmrazenej pupočníkovej krvi sme vyvinuli techniku, ktorá je vhodná na testovanie bežných fúzných transkriptov asociovaných s detskou akútnou leukémiou.
3. Analýzou 500 vzoriek pupočníkovej krvi v slovenskej populácii sme zistili extrémne nízke hladiny troch prognosticky najvýznamnejších fúzných transkriptov asociovaných s detskou ALL, ktoré v prípade použitia na alogénnu transplantáciu predstavujú určité riziko vzniku DCL („donor cell leukemia“) u recipienta. Podľa našej hypotézy stupeň tohto rizika bude závisieť v prvom rade od času vzniku primárneho zásahu a typu buniek, v ktorom primárna chromozomálna translokácia bola indukovaná.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Po prvýkrát sme urobili skrining vzoriek pupočníkovej krvi novorodencov na prítomnosť najčastejších ALL - špecifických preleukemických génových fúzií (PGF: TEL-AML1, BCR-ABL a MLL-AF4). Analýza 500 vzoriek ukazuje, že približne 5% novorodencov obsahuje bunky s PGF o veľmi nízkej frekvencii (cca 10⁻⁵). Naše údaje naznačujú, že nízka hladina PGF v UCB odráža ich relatívne neskorší pôvod a že budú pravdepodobne eliminované v priebehu ďalšieho vývinu, zatiaľ čo vyššie počty PGF odrážajú skoršiu dobu vzniku a môžu predstavovať vyššie riziko vzniku leukémie. Okrem toho sme zaviedli moderné techniky stanovenia DNA opravných fokusov, ktoré sme využili na analýzu DSB v hematopoetických kmeňových bunkách (HSC) a lymfocytoch z UCB. Endogénne γH2AX/53BP1 fokusy v bunkách UCB nekorelovali s PGF s nízkou hladinou. Zistili sme, že hladina konštitutívnych γH2AX/53BP1 fokusov je signifikantne vyššia v bunkách pediatrických pacientov s ALL než u zdravých jedincov. Zvýšená hladina DSB v bunkách pediatrických pacientov s ALL podporuje model, podľa ktorého BCR-ABL/TEL-AML1 indukujú nestabilitu DNA uľahčením mutagenézy a vzniku ďalších genetických zmien, ktoré poháňajú leukemogézu. Overili sme aplikáciu multiplexnej RT-PCR pre molekulárnu diagnostiku najčastejších fúzných transkriptov asociovaných s detskou ALL. Naše dáta ukazujú, že skrining kostnej drene a/alebo periférnej krvi pomocou RT-PCR, pozostávajúcej z multiplexnej a monoplexnej PCR, potvrdzuje výsledky real-time kvantitatívnej PCR (R-T qPCR). Tento skrining môže poskytnúť spoľahlivú, špecifickú a citlivú metódu prístupnú štandardnej laboratórnej praxi a cenovo výhodnú alternatívu ku komplexnejším a nákladnejším technikám R-T qPCR.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

For the first time, we have screened umbilical cord blood (UCB) samples from newborns for the most frequent ALL specific preleukemic gene fusions (PGF: TEL-AML1, BCR-ABL, and MLL-AF4). Our data from 500 samples have revealed that about 5% of newborns possess cells with PGF at very low frequency (of about 10⁻⁵). Our data suggested that low UCB PGF numbers reflect their relatively late origin and are likely to be eliminated in further development while higher number of PGF may reflect earlier origination and represent higher risk for leukemia. We have established state-of-the-art DNA repair foci techniques and used it for analyzing DSB in UCB hematopoietic stem cells (HSC) and lymphocytes. Endogenous γH2AX/53BP1 foci in UCB cells did not correlate with appearance of PGF at low levels. We found that level of constitutive H2AX/53BP1 foci is significantly higher in cells of ALL patients than in healthy subjects. Our data on increased DSB levels in the BCR-ABL/TEL-AML1 ALL pediatric patient's cells support a model where BCR-ABL/TEL-AML1 induce DNA instability through facilitating mutagenesis and appearance of additional genetic alterations driving leukemogenesis. We validated the application of multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for molecular diagnosis of the most common pediatric acute lymphoblastic leukemia-associated fusion transcripts. Our data show that screening of bone marrow and/or peripheral blood by RT-PCR, consisting of multiplex and monoplex PCR, confirmed results of real-time quantitative PCR (R-T qPCR). This screening may provide a reliable, specific and sensitive method amenable to standard laboratory practice and a cost-

effective alternative to more complex and expensive R-T qPCR techniques.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

Zodpovedný riešiteľ

Doc. Ing. Beliaev Igor, DrSC

V Bratislave 27. 11. 2014

Štatutárny zástupca príjemcu

RNDr. Ján Sedlák, DrSc

V Bratislave 27. 11.2014

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu