

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-14-0334**

Možná duálna funkcia P-glykoproteínu pri viacliekovej rezistencii leukemických buniek: efluxná pumpa a regulačný proteín.

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Zdena Sulová, DrSc.**

Príjemca **Centrum biovied SAV - Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky Centrum biovied SAV

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

bez zahraničnej spolupráce

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

neboli

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

1. PAVLÍKOVÁ, Lucia - ŠEREŠ, Mário - IMRICHOVÁ, Denisa - HANO, Milan - RUSNÁK, Andrej - ZÁMOROVÁ, Martina - KATRLÍK, Jaroslav - BREIER, Albert - SULOVÁ, Zdena. The expression of P-gp in leukemia cells is associated with cross-resistance to protein N-glycosylation inhibitor tunicamycin. In *General Physiology and Biophysics*, 2016, vol. 35, p. 497-510. (0.892 - IF2015).
2. COCULOVÁ, Martina - IMRICHOVÁ, Denisa - ŠEREŠ, Mário - MESSINGEROVÁ, Lucia - BOHÁČOVÁ, Viera - SULOVÁ, Zdena - BREIER, Albert. The expression of P-glycoprotein in leukemia cells is associated with the upregulated expression of nestin, a class 6 filament protein. In *Leukemia Research*, 2016, vol. 48, p. 32-39. (2.606 - IF2015).
3. MESSINGEROVÁ, Lucia - IMRICHOVÁ, Denisa - KAVCOVÁ, Helena - ŠEREŠ, Mário - SULOVÁ, Zdena - BREIER, Albert. A decrease in cellular microRNA-27a content is involved in azacytidine-induced P-glycoprotein expression in SKM-1 cells. In *Toxicology in vitro*, 2016, vol. 36, p. 81-88. (3.338 - IF2015).
4. TOPOROVA Lucia, MACEJOVA Dana., BRTKO Július. Radioligand binding assay for accurate determination of nuclear retinoid X receptors: A case of triorganotin endocrine disrupting ligands. In *Toxicol. Lett.*, 2016, 254: 32-36.
5. PAVLÍKOVÁ, Lucia - ŠEREŠ, Mário - HANO, Milan - BOHÁČOVÁ, Viera - ŠEVČÍKOVÁ, Ivana - KYCA, Tomáš - BREIER, Albert - SULOVÁ, Zdena. L1210 Cells Overexpressing ABCB1 Drug Transporters Are Resistant to Inhibitors of the N-and O-glycosylation of Proteins. In *Molecules*, 2017, vol. 22, p. 1104. (2.861-IF2016)
6. Elefantova K, Lakatos B, Kubickova J, Sulova Z, Breier A. 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. *Int J Mol Sci.* 2018 Jul 7;19(7). pii: E1985. doi: 10.3390/ijms19071985

7. Kocibalova Z, Guzyova M, Imrichova D, Sulova Z, Breier A. Overexpression of the ABCB1 drug transporter in acute myeloid leukemia cells is associated with downregulation of latrophilin-1. *Gen Physiol Biophys.* 2018 May;37(3):353-357. doi: 10.4149/gpb_2018008.

8. Bohacova V, Seres M, Pavlikova L, Kontar S, Cagala M, Bobal P, Otevrel J, Brtko J, Sulova Z, Breier A Triorganotin Derivatives Induce Cell Death Effects on L1210 Leukemia Cells at Submicromolar Concentrations Independently of P-glycoprotein Expression.. *Molecules.* 2018 May 1;23(5). pii: E1053. doi: 10.3390/molecules23051053.

9. Hano M, Tomášová L, Šereš M, Pavlíková L, Breier A, Sulová Z Interplay between P-Glycoprotein Expression and Resistance to Endoplasmic Reticulum Stressors. *Molecules.* 2018 Feb 6;23(2). pii: E337. doi: 10.3390/molecules23020337. Review.

Príspevky na medzinárodných konferenciách v karentovaných časopisoch

1. IMRICHOVÁ, Denisa - GUZYOVÁ, Martina - ŠEREŠ, Mário - MESSINGEROVÁ, Lucia - BOHÁČOVÁ, Viera - SULOVÁ, Zdena - BREIER, Albert. P-glycoprotein positive phenotype is associated with changes in CD33 and nestin expression. In *Leukemia Research*, 2017, vol. 55, supplement 1, p. S133 (2.501 - IF2016).

2. MESSINGEROVÁ, Lucia -KAVCOVÁ, Helena - ŠEREŠ, Mário - IMRICHOVÁ, Denisa - SULOVÁ, Zdena - BREIER, Albert. MicroRNA - 27A is involved in azacytidine induced P-glycoprotein expression in SKM-1 cells. In *Leukemia Research*, 2017, vol. 55, supplement 1, p. S134. (2.501-IF2016).

Kapitola v zahraničnej monografii

Messingerova, L., – Imrichova, D., – Coculova, M., – Zelina, M., – Pavlikova, P., – Kavcova, H., – Seres, M., – Bohacova, V., – Lakatos, B., – Sulova, Z., – Breier A. Different Mechanisms of Drug Resistance in Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia. In: *Myelodysplastic Syndromes* (Fuchs, O. ed). InTech – open science | open minds, 2016, pp 181-200, ISBN 978-953-51-2586-0, DOI: 10.5772/63483,

Príspevky na medzinárodných konferenciách

1. ZÁMOROVÁ, Martina - DAMBORSKÝ, Pavel - HOLAZOVÁ, Alena - PAVLÍKOVÁ, Lucia - SULOVÁ, Zdena – KATRLÍK, Jaroslav. Glycan profiling analysis of membrane glycoproteins from leukemic cell lines using various lectin-based biosensing approaches. *Biosensors 2016, 26th Anniversary World Congress on Biosensors, 25/27 May 2016, Gothenburg Sweden.*

2. MESSINGEROVÁ, Lucia - IMRICHOVÁ, Denisa - KAVCOVÁ, Helena - BREIER, Albert - SULOVÁ, Zdena. Bunkové línie MOLM-13 a SKM-1 rezistentné na azacytidín vykazujú cross-rezistenciu k substrátom P-glykoproteínu. In *XXV. Biochemický sjezd : Sborník přednášek a posteru, program.* - Praha : Venice Praha, 2016, s. 221. ISBN 978-80-270-0331-0.

3. BOHÁČOVÁ, Viera - SULOVÁ, Zdena - ŠEREŠ, Mário - BRTKO, Július - BREIER, Albert. Cytotoxický účinok organocínových derivátov na myšie leukemické línie L1210. In *XXV. Biochemický sjezd : Sborník přednášek a posteru, program.* - Praha : Venice Praha, 2016, s. 144. ISBN 978-80-270-0331-0.

4. COCULOVA, Martina - IMRICHOVÁ, Denisa - ŠEREŠ, Mário - MESSINGEROVÁ, Lucia - BOHÁČOVÁ, Viera - SULOVÁ, Zdena - BREIER, Albert. Expresia P-glykoproteínu v leukemických bunkách je spojená s expresiou nestínu, markerom nervových kmeňových a progenitorových buniek. In *XXV. Biochemický sjezd : Sborník přednášek a posteru, program.* - Praha : Venice Praha, 2016, s. 150. ISBN 978-80-270-0331-0.

5. PAVLÍKOVÁ, Lucia - ŠEREŠ, Mário - BOHÁČOVÁ, Viera - ŠEVČÍKOVÁ, Ivana - SULOVÁ, Zdena. Vplyv inhibítora N-glykozylácie tunikamycínu na leukemické bunky exprimujúce P-glykoproteín. In *XXV. Biochemický sjezd : Sborník přednášek a posteru, program.* - Praha : Venice Praha, 2016, s. 231. ISBN 978-80-270-0331-0.

6. ŠEREŠ, Mário - KYCA, Tomáš - BREIER, Albert - SULOVÁ, Zdena. P-glykoproteín-exprimujúce bunky L1210 vykazujú zníženú citlivosť na vplyv tunikamycínu a MG-132. In *XXV. Biochemický sjezd : Sborník přednášek a posteru, program.* - Praha : Venice Praha, 2016, s. 255. ISBN 978-80-270-0331-0.

7. TURÁKOVÁ, Katarína - PAVLÍKOVÁ, Lucia - MESSINGEROVÁ, Lucia - LAKATOŠ, B. - BREIER, Albert - SULOVÁ, Zdena. Látky ovplyvňujúce metabolizmus komplexných lipidov v

bunkách L1210. In XXV. Biochemický sjezd : Sborník přednášek a posteru, program. - Praha : Venice Praha, 2016, s. 271. ISBN 978-80-270-0331-0.

8. Katrlík, Jaroslav; Križáková, Martina; Chudá, Katarína; Kobayashi, Yuka; Bystrický, Branislav (2018). Glycosylation changes in cancer determined by lectin-based protein microarray. In: 29th International Carbohydrate Symposium, 14.-19.7.2018, Lisboa, Portugal. Book of Abstracts, p. 524.

9. Katrlík, Jaroslav; Pakanová, Zuzana; Križáková, Martina; Nemčovič, Marek; Ziburová, Jana; Šesták, Sergej; Baráth, Peter; Mucha, Ján (2018). Determination of glycosylation defects in congenital disorders of glycosylation: application of lectin-based protein microarray and mass spectrometry approaches. In: 2nd GlycoCom and 1st Human Glycome Project Meeting, 3.-6.10.2018, Dubrovnik Croatia. Book of Abstracts, p. 91.

10. Katrlík, Jaroslav (2018). Glycoprofiling by lectin-based protein microarrays for biomedical applications. Invited lecture, Microarrays and Nanoarrays in Microfluidics and Multiplex Diagnostics within IVD & POCT (MMM) Workshop 2018, 11.-12.10.2018, Vienna, Austria. Book of Abstracts, p. 17.

11. J. Brtko, D. Strouhalova, L. Toporova, M. Lastovickova, D. Macejova, J. Bobalova Proteomic analysis of the effect of triorganotin compounds (RXR ligands) alone or with all-trans retinoic acid (RAR ligand) in human breast cancer MDA- MB- 231 cell line. EMBO Workshop Nuclear receptors and biological networks, 11-15 September 2018 Kolymbari, Crete, Greece, Abstrakt book P15, p. 101

12. D. Macejova, J. Podoba, L. Toporova K., Kajo, J. Brtko: mRNA expression status of nuclear retinoid/rexinoid receptors, thyroid hormone receptors, vitamin D progesterone receptor (PGR) and selected co-regulators in papillary thyroid carcinomas (PTCs) with or without autoimmune thyroiditis (AIT.) EMBO Workshop Nuclear receptors and biological networks, 11-15 September 2018 Kolymbari, Crete, Greece, Abstrakt book P72 p. 140

Domáce konferencie neuvádzam

Vysokoškolská učebnica

BREIER, Albert-LAKATOŠ, Boris-VAREČKA, Ľudovít-MIHALOV, J.-BARTEKOVÁ, Monika. Princípy molekulárnej medicíny. Bratislava : Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, 2017. 306 s. ISBN 978 -80-89597-59-8

Uplatnenie výsledkov projektu

Riešenie projektu prinieslo výsledky, ktoré prispievajú k objasneniu niektorých aspektov rozvoja a mechanizmov mnohobočetnej liekovej rezistencie, čo môže mať uplatnenie pri zefektívňovaní terapie nádorových ochorení. V práci Kočibalová a spol. sme zistili, že expresia P-gp je spojená s down reguláciou latrofilínu, pričom latrofilín sa považuje za marker akútnej myeloidnej leukémie. Momentálne tieto výsledky overujeme na vzorkách od pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou. V spolupráci s kolegami s Chemického ústavu SAV sme pomocou lektín čipov potvrdili zmeny v glykozylnácii povrchových proteínov. Táto metóda sa testuje aj na vzorkách od pacientov s karcinómom prostaty a má potenciálne klinické využitie.

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

V priebehu riešenia projektu sme zistili, že leukemické bunky exprimujúce P-gp sú rezistentné na inhibitory N- a O-glykozylnácie na rozdiel od senzitívnych buniek. V P-gp pozitívnych bunkách sme detegovali vyššiu hladinu ubiquitínovaných proteínov na bunkovom povrchu ako u P-gp negatívnych buniek. Aplikácia tunikamycínu obsah ubiquitínovaných foriem proteínov v týchto bunkách ešte prehýbala. Detegovali sme aj prítomnosť neglykozylovaného ubiquitínovaného P-gp ako jeho hlavnej izoformy, pričom nedošlo k strate transportnej aktivity. Expresia P-gp nejakým spôsobom ovplyvňuje proces kontroly kvality proteínov v endoplazmatickom retikule, ktorý je založený na špecifickej sekvencii N-glykozylačných reakcií. Z našich priebežných výsledkov je zrejme, že v P-gp pozitívnych bunkách v porovnaní s parentálnymi P-gp neexprimujúcimi bunkami je zmenená expresia stresových receptorov ER aj stresových transkripčných faktorov (CHOP, sXBP) a dochádza aj k zmenám v hladinách a lokalizácii niektorých šaperónov ER (GRP78/BIP, kalnexín a GRP94). Ďalej sme zistili, že organocínové deriváty (xeno-ligandy RXR receptorov) majú toxický efekt na leukemické bunkové línie nezávisle od expresie a transportnej aktivity P-gp, pričom ich vplyv na nenádorové krvné bunky je menej výrazný.

Zistili sme, že expresia P-gp zasahuje do procesov apoptózy, mení sa expresia pro- aj antiapoptotických proteínov v porovnaní so senzitívnymi bunkami a to aj v prípade látok, ktoré nie sú substrátmi P-gp. Expresia P-gp ovplyvňuje aj expresiu viacerých proteínov, ako nestín, latrofilín, CD33, mucíny atď. V priebehu riešenia projektu sme preukázali, že P-gp v leukemických bunkách nevystupuje len ako proteín transportujúci cudzorodé látky z bunky, ale, že zasahuje aj do celého radu procesov v bunke, čo bolo základným cieľom tohto projektu.

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

We found resistance of P-gp expressing leukemia cells against of N- or O-glycosylation inhibitors when compared with P-gp negative counterparts' cells. Moreover, we detect an elevated level of ubiquitinated surface protein on plasma membrane in P-gp positive than in P-gp negative cells. Application of tunicamycin (N-glycosylation inhibitor) induced additional increase of proteins on plasma membrane. We also detect unglycosylated but ubiquitylated P-glycoprotein as its prevalent isoform in P-gp positive leukemia cells, which was not accompanied with depression of its transport activity. Expression of P-gp in leukemia cells seems to be influenced by undiscovered mechanism the processes of protein quality control in endoplasmic reticulum that is based on specific N-glycosylation reaction sequence. Our preliminary results indicated an alteration in expression and function of endoplasmic reticulum stress receptors/transcription factors (CHOP, sXBP), associated with changes in levels and cellular localization of ER chaperones (GRP78/BIP, calnexin, GRP94). We also proved organotin derivatives (xeno-ligands RXR receptors) as substances that induced cell death in leukemia cells independently on expression/drug efflux activity of P-gp, while effect of these substance on nonleukemia lymphocyte cell model is less pronounced. Expression of P-gp is linked with apoptosis induction/progression regulation associated with changes in cell content of pro- and antiapoptotic as compared with sensitive counterpart cells, that could be observed also in case when apoptosis was induced by substances that are not P-gp substrate. Alterations in expression of several proteins (nestin, latrofilin, CD33, mucins etc.) were observed to be linked with overexpression of P-gp in leukemia cells. Solving of this project revealed that P-gp is not only drug transport protein but it is active also cell regulation processes that was most important delivery of our project.

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

Zodpovedný riešiteľ
Ing. Zdena Sulová, DrSc.

Štatutárny zástupca príjemcu
Ing. Zdena Sulová, DrSc.

V dňa

V dňa

.....
Podpis zodpovedného riešiteľa

.....
Podpis štatutárneho zástupcu príjemcu