

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-14-0816**

**Objasnenie nových prometastatických funkcií nádorovo-asociovej karbonickej anhydrázy IX a jej interakcie so zápalovou odpoveďou.**

Zodpovedný riešiteľ **Mgr. Eliška Švastová, PhD.**

Príjemca **Biomedicínske centrum SAV - Virologický ústav**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Biomedicínske centrum, Virologický ústav, SAV

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

-

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

-

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

Publikácie:

1. Michaela Debreova, Lucia Csaderova, Monika Burikova, Lubomira Lukacikova, Ivana Kajanova, Olga Sedlakova, Martin Kery, Juraj Kopacek, Miriam Zatovicova, Jozef Bizik, Silvia Pastorekova and Eliska Svastova. CAIX Regulates Invadopodia Formation through Both a pH-Dependent Mechanism and Interplay with Actin Regulatory Proteins. Int J Mol Sci. 2019 Jun 4;20(11). pii: E2745. doi: 10.3390/ijms20112745
2. Panisova E, Kery M, Sedlakova O, Brisson L, Debreova M, Sboarina M, Sonveaux P, Pastorekova S, Svastova E. Lactate stimulates CA IX expression in normoxic cancer cells. Oncotarget. 2017; 8:77819-77835. (6 WOS cit)
3. Panisova E, Kery M, Kopacek J, Pastorekova S, Svastova E. Enhanced metabolism as a common feature of cancer plasticity. Neoplasma. 2016;63(6):836-845.(3 WOS cit)

Pozvané prednášky na medzinárodných konferenciách:

(2017) Eliška Svastová, Elena Panisová, Olga Sedlaková, Martin Kery, Paolo E. Porporato, Petra Lacinová, Ľudovít Škultéty, Lucie Brisson, Martina Sboarina, Silvia Pastorekova, Pierre Sonveaux: The impact of carbonic anhydrase IX depletion on oxidative metabolism of cancer cells. 5th International Congress on Analytical Proteomics. Caparica, Portugal - Invited lecture

(2016) Debreova M, Csaderova L, Sedlakova O, Pastorekova S, Svastova E: Downregulation of carbonic anhydrase IX impairs ECM degradation and affects actin regulatory proteins during invadopodia formation. 4th International Conference on Tumor Microenvironment and Cellular Stress: Signaling, Metabolism, Imaging and Therapeutic

Targets. Rhodes, Greece - Invited lecture

(2016) Elena Ondriskova, Martin Kery, Olga Sedlakova, Paolo E. Porporato, Lucie Brisson, Martina Sboarina, Juraj Kopacek, Silvia Pastorekova, Pierre Sonveaux, Eliska Svastova:

Vplyv hypoxiou-indukovanej karbonickej anhydrázy IX na oxidatívny metabolizmus nádorových buniek. XXV. Biochemický sjezd, Praha. Vybraná prednáška.

Prezentácie výsledkov na medzinárodných konferenciách vo forme posterov:

(2017) Panisova E, Olga Sedlakova<sup>1</sup>, Martin Kery, Paolo E. Porporato, Lucie Brisson, Martina Sboarina, Petra Lacinová, Ľudovít Škultéty, Juraj Kopáček, Silvia Pastorekova, Pierre Sonveaux, Svastova E. Depletion of CA IX impairs glutamine and glucose driven fueling of the TCA cycle. 4th ISCaM meeting - "Cancer Metabolism", Bertinoro, Italy. Poster.

(2016) Panisova E., Brisson L., Sedlakova O., Sboarina M., Kery M., Sonveaux P., Pastorekova S., Svastova E: Lactate induces expression of carbonic anhydrase IX in normoxic cancer cells. 3rd ISCaM meeting - "Metabolic networks in cancer", Brussels – poster.

(2015) Debreova M., Csaderova L., Sedlakova O., Pastorekova S., Svastova E.: Invadopodia formation and extensive extracellular matrix degradation of tumor cells depend on CA IX expression and catalytic activity. 2nd ISCaM meeting - Metabolism and microenvironment in cancer plasticity, Venice, Italy – poster.

(2015) Debreová M., Csáderová L., Radvák P., Kopáček J., Pastoreková S., Švastová E: Carbonic anhydrase IX colocalized with paxillin in emerging focal contacts and mediates PG- domain dependent adhesion. Keystone meeting of Hypoxia: From Basic Mechanisms to Therapeutics. Dublin, Ireland : Royal Dublin Society – poster

### **Uplatnenie výsledkov projektu**

Výsledky získané počas riešenia tohto projektu poukazujú na možné využitie proteínu CA IX v anti-metastatickej terapii pomocou špecifických anti-CA IX protilátok (ktorými disponujeme). Inhibícia CA IX pomocou protilátok výrazne potláča schopnosť nádorových buniek invadovať z primárneho ložiska a taktiež redukuje ich schopnosť extravazácie a zakladania metastáz v sekundárnych orgánoch. Naše výsledky naznačujú, že tento inhibičný efekt prebieha cez zapojenie proteínu CAIX do tvorby invadopódií, regulácie pH a adhézie k extracelulárnej matrix.

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

Výsledky tohto projektu priniesli poznatky o novom mechanizme, pomocou ktorého proteín CAIX realizuje pro-invazívnu aktivitu. Ukázali sme, že CAIX je priamo lokalizovaná v invadopódiách spolu s invadopodiálnymi markermi MMP14 a kortaktínom, a ako prví sme dokázali jej kolokalizáciu s NBCe1 a fosfo-PKA v týchto membránových výbežkoch. Proces tvorby invadopódií reguluje CAIX cez svoju enzymatickú aktivitu a jej následkami na extracelulárne (pHe) a intracelulárne pH (pHi). Acidickým pHe v oblasti invadopódií zvyšuje aktivitu matrixových metaloproteáz štiepiacich ECM a prispieva k vyššej invazivite. Okrem toho expresia CAIX ovplyvňuje zložitú aktínovú mašínériu. Supresia CAIX znižuje fosforyláciu kortaktínu na tyrozíne Y421. Táto fosforylácia je esenciálna pre vytvorenie Nck1-WASP-Arp2/3 signálneho komplexu, ktorý riadi polymerizáciu aktínu a rast invadopódií. Na modeloch chorioalantoidných membrán (CAM) prepelice japonskej sme prvíkrát dokázali lokalizáciu CAIX v invadopódiách in vivo. Inhibícia CAIX pomocou špecifických protilátok výrazne potláča schopnosť nádorových buniek invadovať cez CAM a tvoriť pľúcne metastázy na myšacích modeloch in vivo. Taktiež sa nám ako prvým podarilo dokázať priamu interakciu CAIX s proteínom ECM menovite kolagénom. V oblasti štúdia interakcie zápal-CAIX sme dokázali, že zápalové cytokíny indukujú expresiu CAIX už v normoxii v rôznych bunkových modeloch. Nárast expresie CAIX bol sprevádzaný aj stimuláciou expresie viacerých markerov kmeňových buniek (CD44, Oct4), ako aj génov zapojených do EMT (Snai1, Slug, VIM, FN) alebo matrixových proteáz (MMP2, MMP9). Aplikácia antiflogistik potlačila indukciu proteínov CAIX a HIF1a v normoxii. Taktiež sme dokázali, že CAIX-závislé nádorové mikroprostredie prispieva k zvýšenej produkcii zápalových a pro-invazívnych cytokínov z MUF-fibroblastov a supresia CAIX znižuje produkciu cytokínov podporujúcich metastázovanie.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku**

**(max. 20 riadkov)**

Results of this project brought insights into new mechanisms by which CAIX protein exerts pro-invasive activity. We showed that CAIX is directly localized in invadopodia along with invadopodial markers MMP14 and cortactin, and we were the first to demonstrate its colocalization with NBCe1 and phospho-PKA in these membrane protrusions. CAIX regulates the invadopodial formation through its enzymatic activity and its effects on extracellular (pHe) and intracellular pH (pHi). Acidic pHe around invadopodia enhances the activity of matrix metalloproteases cleaving ECM and contributes to higher invasiveness. Moreover, CAIX expression affects the complex actin machinery. CAIX suppression reduces the cortactin phosphorylation on tyrosine Y421. This phosphorylation is essential for the formation of the Nck1-WASP-Arp2/3 signaling complex that drives actin polymerization and invadopodial growth. In the Japanese quail chorioallantoic membrane model (CAM), we first demonstrated the localization of CAIX in invadopodia in vivo. Inhibition of CAIX by specific antibodies significantly suppresses the ability of tumor cells to invade through CAM and to form lung metastases in murine models. We were the first who revealed the direct interaction of CAIX with ECM protein collagen. In our inflammation-CAIX interaction studies, we have shown that inflammatory cytokines induce CAIX expression in normoxia in various cell models. CAIX increase was also accompanied by stimulation of expression of several stem cell markers (CD44, Oct4) and genes involved in EMT (Snai1, Slug, VIM, FN) or matrix proteases (MMP2, MMP9). Application of anti-inflammatory drugs suppressed the induction of CAIX and HIF1a proteins in normoxia. We have also shown that CAIX-dependent tumor microenvironment contributes to increased production of inflammatory and pro-invasive cytokines from MUF-fibroblasts, and suppression of CAIX reduces the amount of cytokines promoting metastatic dissemination.