

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0010****Identifikácia a validácia signálnych dráh asociovaných s cirkulujúcimi nádorovými bunkami pri karcinóme prsníka.**Zodpovedný riešiteľ **doc. MUDr. Michal Mego, PhD.**Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Lekárska fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

II.onkologická klinika LFUK a NOÚ

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Ontario Cancer Institute, Toronto, Canada,
University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA

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

Sine

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

Publikácie in extenso

1. Cierna Z, Smolkova B, Cholujova D, Gronosova P, Miklikova S, Cihova M, Plava J, Mego M. Decreased levels of circulating cytokines VEGF, TNF- β and IL-15 indicate PD-L1 overexpression in tumours of primary breast cancer patients. Sci Rep. 2021 Jan 14;11(1):1294. doi: 10.1038/s41598-020-80351-9. PMID: 33446741; PMCID: PMC7809365.
2. Kalavska K, Cierna Z, Karaba M, Minarik G, Benca J, Sedlackova T, Kolekova D, Mrvova I, Pindak D, Mardiak J, Mego M. Prognostic role of matrix metalloproteinase 9 in early breast cancer. Oncol Lett. 2021 Feb;21(2):78. doi: 10.3892/ol.2020.12339. Epub 2020 Nov 30. PMID: 33363615; PMCID: PMC7723168
3. Smolkova Bozena, Cierna Zuzana, Cholujova Dana, Gronosova Paulina, Miklikova Svetlana, Cihova Marina, Plava Jana, Mego Michal. Circulating cytokines predict PD-L1 expression in tumors of primary breast cancer patients. Sci Rep. 2021 Jan 14;11(1):1294. doi: 10.1038/s41598-020-80351-9. PMID: 33446741
4. Smolkova B, Cierna Z, Kalavska K, Miklikova S, Plava J, Minarik G, Sedlackova T, Cholujova D, Gronosova P, Cihova M, Majerova K, Karaba M, Benca J, Pindak D, Mardiak J, Mego M. Increased Stromal Infiltrating Lymphocytes Are Associated with the Risk of Disease Progression in Mesenchymal Circulating Tumor Cell-Positive Primary Breast Cancer Patients. Int J Mol Sci. 2020 Dec 12;21(24):9460. doi: 10.3390/ijms21249460. PMID: 33322711; PMCID: PMC7763628.
5. Buocikova V, Rios-Mondragon I, Pilalis E, Chatziioannou A, Miklikova S, Mego M, Pajuste K, Rucins M, Yamani NE, Longhin EM, Sobolev A, Freixanet M, Puentes V, Plotniece A,

- Dusinska M, Cimpan MR, Gabelova A, Smolkova B. Epigenetics in Breast Cancer Therapy- New Strategies and Future Nanomedicine Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2020 Dec 3;12(12):3622. doi: 10.3390/cancers12123622. PMID: 33287297; PMCID: PMC7761669.
6. Dobiasova B, Mego M. Biomarkers for Inflammatory Breast Cancer: Diagnostic and Therapeutic Utility. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2020 Oct 14;12:153-163. doi: 10.2147/BCTT.S231502. PMID: 33116817; PMCID: PMC7569067.
7. Mego M, Kalavska K, Karaba M, Minarik G, Benca J, Sedlackova T, Gronosova P, Cholujova D, Pindak D, Mardiak J, Celec P. Plasma Nucleosomes in Primary Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 10;12(9):2587. doi: 10.3390/cancers12092587. PMID: 32927889; PMCID: PMC7563724.
8. Miklikova S, Minarik G, Sedlackova T, Plava J, Cihova M, Jurisova S, Kalavska K, Karaba M, Benca J, Smolkova B, Mego M. Inflammation-Based Scores Increase the Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 May 1;12(5):1134. doi: 10.3390/cancers12051134. PMID: 32369910; PMCID: PMC7281016.
9. Mego M, Karaba M, Sedlackova T, Benca J, Repiska G, Krasnicanova L, Macuch J, Sieberova G, Jurisova S, Pindak D, Kalavska K, Mardiak J, Minarik G. Circulating tumor cells and breast cancer-specific mutations in primary breast cancer. *Mol Clin Oncol*. 2020 Jun;12(6):565-573. doi: 10.3892/mco.2020.2026. Epub 2020 Apr 1. PMID: 32337039; PMCID: PMC7179389.
10. Plava J, Cihova M, Burikova M, Bohac M, Adamkov M, Drahosova S, Rusnakova D, Pindak D, Karaba M, Simo J, Mego M, Danisovic L, Kucerova L, Miklikova S. Permanent Pro-Tumorigenic Shift in Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Induced by Breast Malignancy. *Cells*. 2020 Feb 19;9(2):480. doi: 10.3390/cells9020480. PMID: 32093026; PMCID: PMC7072834.
11. Jurisova S, Karaba M, Minarik G, Benca J, Sedlackova T, Manasova D, Kalavska K, Pindak D, Mardiak J, Mego M. Circulating tumor cells and drug history in primary breast cancer patients. *Cancer Drug Resist* 2020;3:98-109. doi: 10.20517/cdr.2019.79
12. Mego M, Karaba M, Minarik G, Benca J, Silvia J, Sedlackova T, Manasova D, Kalavska K, Pindak D, Cristofanilli M, Reuben JM, Mardiak J. Circulating Tumor Cells With Epithelial-to-mesenchymal Transition Phenotypes Associated With Inferior Outcomes in Primary Breast Cancer. *Anticancer Res*. 2019 Apr;39(4):1829-1837. doi: 10.21873/anticancer.13290. PubMed PMID: 30952723.
13. Zmetakova I, Kalinkova L, Smolkova B, Horvathova Kajabova V, Cierna Z, Danihel L, Bohac M, Sedlackova T, Minarik G, Karaba M, Benca J, Cihova M, Buocikova V, Miklikova S, Mego M, Fridrichova I. A disintegrin and metalloprotease 23 hypermethylation predicts decreased disease-free survival in low-risk breast cancer patients. *Cancer Sci*. 2019 May;110(5):1695-1704. doi: 10.1111/cas.13985. Epub 2019 Mar 18. PubMed PMID: 30815959; PubMed Central PMCID: PMC6500989.
14. Mego M, Karaba M, Sedlackova T, Benca J, Repiska G, Krasnicanova L, Macuch J, Sieberova G, Jurisova S, Pindak J, Kalavska K, Mardiak J, Minarik G. Circulating tumor cells and breast cancer specific mutations in primary breast cancer. (*Molecular and Clinical Oncology*, 2020, accepted for publication)
15. Kalinkova L, Zmetakova I, Smolkova B, Minarik G, Sedlackova T, Horvathova Kajabova V, Cierna Z, Mego M, Fridrichova I. Decreased methylation in the SNAI2 and ADAM23 genes associated with de-differentiation and haematogenous dissemination in breast cancers. *BMC Cancer*. 2018 Sep 6;18(1):875. doi: 10.1186/s12885-018-4783-x. PubMed PMID: 30189837; PubMed Central PMCID: PMC6127923

Abstrakty a postery z konferencii

1. PLAVÁ, Jana - MIKLÍKOVÁ, Svetlana - CIHOVÁ, Marina - MATÚŠKOVÁ, Miroslava - KUKOLJ, Tamara - TRIVANOVIC, Drenka - JAUKOVIC, Aleksandra - BUGARSKI, Diana - KUČEROVÁ, Lucia. Analysis of molecular mechanisms involved in MSC-mediated chemoresistance in breast cancer. In XIV. Diagnostic, predictive and experimental oncology days : ddpeo 2018. - Olomouc, 2018, p. 40. ISBN 978-80-270-5084-0. ISSN 2336-8284.
2. SMOLKOVÁ, Božena - MEGO, Michal - ZMETÁKOVÁ, Iveta - HORVÁTHOVÁ KAJABOVÁ, Viera - MIKLÍKOVÁ, Svetlana - KALINKOVÁ, Lenka - MINÁRIK, G. - SEDLÁČKOVÁ, T. - ČIERNA, Zuzana - FRIDRICHOVÁ, Ivana. DNA methylation of ADAM23 is negatively associated with haematogenous spread in breast cancer. In ESMO open : cancer horizons. - European Society for Medical Oncology, 2018, vol. 3, suppl. 2, p. A177. ISSN 2059-7029.

3. Mego M, Tokar T, Minarik G, Hajduk M, Karaba M, Benca J, Sedlackova T, Repiska G, Krasnicanova L, Macuch J, Sieberova G, Pindak D, Cristofanilli M, Reuben JM, Jurisica I, Mardiak J. Comprehensive analysis of genomic alterations in tumor tissue associated with presence of various subpopulations of circulating tumor cells (CTCs) in primary breast cancer. *Cancer Research*. - Vol. 78, No. 4 Suppl. (2018), s. P2-01-05
4. Miklikova S, Plava J, Matuskova M, Mego M, Kucerova L. Molecular analysis of the MSC-facilitated derivation of novel CTC variant from the TNBC cell line. 3rd ACTC Advances in Circulating Tumour Cells Liquid Biopsy in Clinical Practice, (ACTC 2017, Greece). - Poster
5. Mego M, Jurisova S, Karaba M, Minarik G, Benca J, Sedlackova T, Pindak J, Cristofanilli M, Reuben JM, Mardiak J. Circulating tumor cells (CTCs) with epithelial to mesenchymal transition (EMT) phenotype are associated with inferior outcome in primary breast cancer. *Cancer Research*. - Roč. 79, č. Supplement 1 (2019), s. 1-1
6. Mego M, Kalavska K, Karaba M, Minarik G, Benca J, Sedláčková T, Manasova D, Pindak D, Mardiak J, Cierna Z. CTC with EMT phenotype are associated with PD-L1 expression in tumor associated stroma in primary breast cancer patients. *Cancer Research*. - Roč. 80, č. Supplement 1 (2020), s. 1-1
7. Mego M, Cierna Z, Karaba M, Minarik G, Benca J, Sedlackova T, Kolekova D, Mrvova I, Pindak D, Mardiak J, Kalavska K. Prognostic role of matrix metalloproteinase 9 in early breast cancer. *Cancer Research*. - Roč. 81, č. Supplement 1 (2021), s. 1-1

Uplatnenie výsledkov projektu

Na základe uvedených výsledkov bola v 12/2019 zahájená klinická štúdia fázy II u pacientok s metastatickým karcinómom prsníka s cieľom inhibície nádorovej kmeňovej bunky, kde CTC_EMT slúžia ako biomarker na zaradenie do štúdie a štúdiu liečbu. (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04265274)

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

- Bol prvýkrát dokázaný prognostický význam CTC s EMT fenotypom (*Anticancer Res*. 2019 Apr;39(4):1829-1837).
- Bol prvýkrát dokázaný prognostický význam cirkulujúcich nukleozómov pri primárnom Ca prsníka, nepodarilo sa nám dokázať asociáciu medzi CTC a cirkulujúcimi nukleozómami (*Cancers (Basel)*. 2020 Sep 10;12(9):2587.)
- Nepozorovali sme asociáciu medzi CTC a MMP9 (na rozdiel od MMP1), zistili sme asociáciu medzi MMP9 a viacerými klinicko-patologickými charakteristikami pri primárnom Ca prsníka (*Oncol Lett*. 2021 Feb;21(2):78).
- Pozorovali sme asociáciu medzi infiltráciou nádoru tumor infiltrujúcimi lymfocytmi (TIL) a prognózou u CTC_EMT-pozitívnych pacientov, na druhej strane sme nepozorovali asociáciu medzi CTC a TIL čo podporuje hypotézu o ich nezávislom prognostickom význame. Zistili sme tiež asociáciu medzi TILs a vybranými cytokínmi plazmy (*Int J Mol Sci*. 2020 Dec 12;21(24):9460.)
- Pozorovali sme asociáciu medzi prognózou pacienta a systémovým zápalovým indexom (SII) vytvorili sme kombinovaný model na predikciu prognózy u primárneho Ca prsníka kombináciou CTC a SII (*Cancers (Basel)*. 2020 May 1;12(5):1134)
- Zistili sme asociáciu medzi cirkulujúcimi cytokínmi a expresiou PD-L1 v nádoroch pacientok s primárnym karcinómom prsníka, nepozorovali sme asociáciu medzi CTC a PD-L1, avšak, PDL1 bolo prognostické len u pacientok s CTC_EMT (*Sci Rep*. 2021 Jan 14;11(1):1294.)
- Identifikovali sme somatické mutácie BRCA1 a 2 génu v nádore ako mutácie pozitívne asociované s CTC s epiteliálnym podtypom (*Mol Clin Oncol*. 2020 Jun;12(6):565-573.)
- Nepodarilo sa nám identifikovať asociáciu medzi liekovou anamnézou a prítomnosťou CTC (*Cancer Drug Resist* 2020;3:98-109)
- Porovnali sme expresiu génov v primárnom Ca prsníka medzi pacientami CTC_EMT+ a CTC-. Pomocou metódy RNA-seq bolo v 23 vzorkách identifikovaných 1202 génov s p hodnotou < 0,05 (z nich 14 génov s p.adj < 0,1). Medzi najvýraznejšími kandidátmi sa nachádza niekoľko génov z rodiny keratínov (KRT5, 14, 17) a kladínov (CLDN8, CLDN9). Pomocou DNA mikročipov bolo identifikovaných 2406 génov s p hodnotou < 0,05 (z nich 1 gén p.adj < 0,1). Vybrané gény boli následne validované pomocou qRT-PCR. (manuskript v príprave – submitovanie v pláne do konca roka 2021)

- Na základe uvedených výsledkov bola v 12/2019 zahájená klinická štúdia fázy II u pacientok s metastatickým karcinómom prsníka s cieľom inhibície nádorovej kmeňovej bunky, kde CTC_EMT slúžia ako biomarker na zaradenie do štúdie a štúdióvu liečbu. (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04265274)

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

- The prognostic significance of CTC with EMT phenotype has been demonstrated for the first time (Anticancer Res. 2019 Apr; 39 (4): 1829-1837).
- The prognostic significance of circulating nucleosomes in primary breast Ca has been demonstrated for the first time, we have not been able to prove the association between CTC and circulating nucleosomes ((Cancers (Basel). 2020 May 1;12(5):1134)
- We did not observe an association between CTC and MMP9 (as opposed to MMP1), we found an association between MMP9 and several clinicopathological characteristics in primary breast Ca (Oncol Lett. 2021 Feb; 21 (2): 78).
- We observed an association between tumor infiltration by tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in CTC_EMT-positive patients, on the other hand, we did not observe an association between CTC and TIL, which supports the hypothesis of their independent prognostic significance. We also found an association between TILs and selected plasma cytokines (Int J Mol Sci. 2020 Dec 12; 21 (24): 9460.)
- We observed an association between patient prognosis and systemic inflammatory index (SII) and created a combined model to predict prognosis in primary breast Ca by a combination of CTC and SII (Cancers (Basel). 2020 May 1; 12 (5): 1134)
- We found an association between circulating cytokines and PD-L1 expression in tumors of patients with primary breast cancer, we did not observe an association between CTC and PD-L1, however, PDL1 was prognostic only in patients with CTC_EMT (Sci Rep. 2021 Jan 14; 11 (1): 1294.)
- We identified somatic mutations in the BRCA1 and 2 genes in the tumor as mutations positively associated with CTC with an epithelial subtype (Mol Clin Oncol. 2020 Jun; 12 (6): 565-573.)
- We failed to identify the association between drug history and the presence of CTC (Cancer Drug Resist 2020; 3: 98-109)
- We compared gene expression in primary breast Ca between patients CTC_EMT + and CTC-. Using the RNA-seq method, 1202 genes with a p value <0.05 were identified in 23 samples (of which 14 genes with a p.adj <0.1). Among the most prominent candidates are several genes from the keratin family (KRT5, 14, 17) and claudins (CLDN8, CLDN9). 2406 genes with a p value <0.05 were identified using DNA microarrays (of which 1 gene p.adj <0.1). Selected genes were subsequently validated by qRT-PCR. (manuscript in preparation - submission in the plan by the end of 2021)
- Based on these results, a phase II clinical study was initiated in patients with metastatic breast cancer to inhibit tumor stem cells in 12/2019, where CTC_EMT serves as a biomarker for study inclusion and treatment (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04265274).