

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0178****Mechanizmus tolerancie indukovanej mezenchýmovými stromálnymi bunkami voči protinádorovej liečbe a cielená terapeutická intervencia v nádorových bunkách karcinómu prsníka**Zodpovedný riešiteľ **Mgr. Svetlana Miklíková, PhD.**Príjemca **Biomedicínske centrum SAV - Ústav experimentálnej onkológie**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Ústav experimentálnej onkológie Biomedicínskeho centra SAV

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Oslo University Hospital, Norway

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

PLAVÁ, Jana* - BURÍKOVÁ, Monika* - CIHOVÁ, Marína - TRNKOVÁ, Lenka - SMOLKOVÁ, Božena - BABÁL, Pavel - KRIVOŠÍKOVÁ, Lucia - JANEGA, Pavol - ROJÍKOVÁ, Lucia - DRAHOŠOVÁ, Slávka - BOHÁČ, Martin - DANIŠOVIČ, Ľuboš - KUČEROVÁ, Lucia** - MIKLÍKOVÁ, Svetlana**. Chemotherapy-triggered changes in stromal compartment drive tumor invasiveness and progression of breast cancer. In Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2021, vol 40 atr.no. 302. (2020: 11.161 – IF, Q1 - JCR, Q1 - SJR, karentované - CCC). (2020 - Current Contents, WOS, SCOPUS). Typ: ADCA

PLAVÁ, Jana* - CIHOVÁ, Marína* - BURÍKOVÁ, Monika - BOHÁČ, Martin - ADAMKOV, Marian - DRAHOŠOVÁ, S. - RUSNÁKOVÁ, Dominika - PINDAK, D. - KARABA, Marián - ŠIMO, Ján - MEGO, Michal - DANIŠOVIČ, Ľuboš - KUČEROVÁ, Lucia** - MIKLÍKOVÁ, Svetlana**. Permanent pro-tumorigenic shift in adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells induced by breast malignancy. In Cells, 2020, vol. 9, no. 2, art. no. 480. (2019: 4.366 - IF, Q2 - JCR). ISSN 2073-4409.

SMOLKOVÁ, Božena* - ČIERNA, Zuzana* - KAL'AVSKÁ, Katarína - MIKLÍKOVÁ, Svetlana - PLAVÁ, Jana - MINÁRIK, Gabriel - SEDLÁČKOVÁ, Tatiana - CHOLUJOVÁ, Dana - GRONESOVÁ, Paulína - CIHOVÁ, Marína - MAJEROVÁ, Karolína - KARABA, Marián - BENCA, Juraj - PINDAK, D. - MARDIAK, Jozef - MEGO, Michal**. Increased stromal infiltrating lymphocytes are associated with the risk of disease progression in mesenchymal circulating tumor cell-positive primary breast cancer patients. In International Journal of

Molecular Sciences, 2020, vol. 21, no. 24, art. no. 9460. (2019: 4.556 - IF, Q1 - JCR, 1.317 - SJR, Q1 - SJR, karentované - CCC). (2020 - Current Contents, WOS, SCOPUS). ISSN 1422-0067.

MIKLÍKOVÁ, Svetlana - MINÁRIK, Gabriel - SEDLACKOVÁ, T. - PLAVÁ, Jana - CIHOVÁ, Marína - JURIŠOVÁ, Silvia - KALAVSKÁ, Katarína - KARABA, Marián - BENCA, Juraj - SMOLKOVÁ, Božena - MEGO, Michal**. Inflammation-based scores increase the prognostic value of circulating tumor cells in primary breast cancer. In *Cancers*, 2020, vol. 12, no. 5, art.no. 1134. (2019: 6.126 - IF, Q1 - JCR, 1.938 - SJR, Q1 - SJR). ISSN 2072-6694.

ČIERNA, Zuzana* - SMOLKOVÁ, Božena* - CHOLUJOVÁ, Dana - GRONESOVÁ, Paulína - MIKLÍKOVÁ, Svetlana - CIHOVÁ, Marína - PLAVÁ, Jana - MEGO, Michal**. Decreased levels of circulating cytokines VEGF, TNF- beta and IL- 15 indicate PD- L1 overexpression in tumours of primary breast cancer patients. In *Scientific Reports*, 2021, vol. 11, no. 1, art. no. 1294. (2020: 4.379 - IF, Q1 - JCR, 1.240 - SJR, Q1 - SJR, karentované - CCC). (2021 - Current Contents, WOS, SCOPUS). ISSN 2045-2322. Typ: ADMA

ZMETÁKOVÁ, Iveta* - KALINKOVÁ, Lenka* - SMOLKOVÁ, Božena** - HORVÁTHOVÁ KAJABOVÁ, Viera - ČIERNA, Zuzana - DANIHEL, Ľudovít - BOHÁČ, Martin - SEDLÁČKOVÁ, Tatiana - MINÁRIK, Gabriel - KARABA, Marián - BENCA, Juraj - CIHOVÁ, Marína - BUOČIKOVÁ, Verona - MIKLÍKOVÁ, Svetlana - MEGO, Michal* - FRIDRICHOVÁ, Ivana*. A disintegrin and metalloprotease 23 hypermethylation predicts decreased disease-free survival in low-risk breast cancer patients. In *Cancer Science*, 2019, vol. 110, no. 5, p. 1695-1704. (2018: 4.751 - IF, Q1 - JCR, 1.772 - SJR, Q1 - SJR, karentované - CCC). (2019 - Current Contents). ISSN 1347-9032.

Akceptované do tlače:

BUOČIKOVÁ V. et al. Decitabine potentiates efficacy of doxorubicin in a preclinical trastuzumab-resistant HER2-positive breast cancer models. *Biomedicine and Pharmacotherapy*

PLAVÁ, Jana - CIHOVÁ, Marína - BURÍKOVÁ, Monika - MATÚŠKOVÁ, Miroslava - KUČEROVÁ, Lucia - MIKLÍKOVÁ, Svetlana**. Recent advances in understanding tumor stroma-mediated chemoresistance in breast cancer. In *Molecular Cancer*, 2019, vol. 18, p. 67. (10.679 - IF2018). ISSN 1476-4598.

BUOČIKOVÁ, Verona - RIOS-MONDRAGON, Ivan - PILALIS, Eleftherios - CHATZIOANNOU, Aristotelis - MIKLÍKOVÁ, Svetlana - MEGO, Michal - PAJUSTE, Karlis - RUCINS, Martins - YAMANI, Naouale EI - LONGHIN, Eleonora Marta - SOBOLEV, Arkadij - FREIXANET, M. - PLOTNIECE, Aiva - DUŠINSKÁ, Mária - CIMPAN, M. R. - GÁBELOVÁ, Alena* - SMOLKOVÁ, Božena*. Epigenetics in breast cancer therapy - new strategies and future nanomedicine perspectives. In *Cancers*, 2020, vol. 12, art. no. 3622. (2019: 6.126 - IF, Q1 - JCR, 1.938 - SJR, Q1 - SJR). ISSN 2072-6694.

MIKLÍKOVÁ, Svetlana - TRNKOVÁ, Lenka - PLAVÁ, Jana - BOHÁČ, Martin - KUNIAKOVÁ, Marcela - CIHOVÁ, Marína. The role of BRCA1/2-mutated tumor microenvironment in breast cancer. In *Cancers*, 2021, vol. 13, no. 3, art. no. 575. (2020: 6.639 - IF, Q1 - JCR, 1.818 - SJR, Q1 - SJR). ISSN 2072-6694. Typ: ADMA

Uplatnenie výsledkov projektu

Na základe výsledkov získaných počas riešenia projektu a modelov vyvinutých pre jeho potreby, sme nadviazali viacero národných ako aj medzinárodných spoluprác a úspešne získali viacero projektov (národných - VEGA, APVV a medzinárodných - MMTS Horizont 2020). Prostredníctvom týchto projektov sme založili biobanku mezenchýmových stromálnych buniek, ktorá obsahuje viac ako 300 vzoriek MSC a biobanku nádorových tkanív kultivovaných vo forme organoidov, ktorá pozostáva z viac ako 30-tich vzoriek. Okrem toho sme vyvinuli rezistentné varianty viacerých nádorových bunkových línií, ktoré budú spolu s bunkami v biobankách predmetom výskumu v novo-získaných projektoch. Okrem spomínaných buniek sme získali viacero cenných spoluprác, pričom na základe detekcie inervácie u imunodeficientných myší budeme v spolupráci s Klinikou patológie LF UK analyzovať vzorky nádorov u pacientiek po neoadjuvancii, aby sme zistili, či je nami pozorovaná zvýšená inervácia prítomná aj u ľudí.

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

Chemoterapia predstavuje pri karcinóme prsníka štandardný liečebný postup napriek jej toxickým účinkom aj na zdravé tkanivá a aj napriek tomu, že práve tieto dlhotrvajúce účinky na nemalígne zdravé bunky môžu spätne ovplyvniť správanie nádorových buniek a ich odpoveď na terapiu. Hlavným cieľom projektu bolo odhaliť mechanizmus indukovanej tolerancie ku chemoterapeutikám, ktorú v nádorových bunkách navodzujú mezenchymové stromálne bunky (MSC) ovplyvnené chemoterapiou a identifikovať signálne dráhy a molekuly, ktoré tento efekt sprostredkujú. Pôsobením chemoterapie dochádza k výrazným zmenám v produkcii rôznych rastových faktorov a môže dochádzať aj k zmenám niektorých bunkových procesov. My sme pozorovali, že u MSC buniek vystavených účinku chemoterapeutík dochádza k čiastočnej senescencii a k zvýšeniu autofágie. Expozícia chemoterapeutikám viedla k zvýšeniu sekrécie SDF-1 α , IL-32, THBS-1, DPPIV a uPAR v porovnaní s neovplyvnenými MSC. Paclitaxelom ovplyvnené MSC produkovali menej CXCL5, endoglinu a DKK-1, ale expresia IL-32 sa ako pri ovplyvnení doxorubicínom zvýšila. Ovplyvnenie MSC buniek viedlo aj k zvýšeniu medzibunkovej komunikácie (prostredníctvom GAP junctions) s trojito-negatívnymi MDA-231 bunkami a s HER2 pozitívnymi JIMT-1 bunkami. Predpokladáme, že práve zvýšenie medzibunkovej signalizácie mohlo viesť k podpornému efektu DOX-MSC a PAC-MSC na invazívny potenciál nádorových buniek in vivo, ktorý bol detekovaný prostredníctvom histologickej analýzy. Na preparátoch sme vo vzorkách s predovplyvnenými MSC pozorovali invazívny front nádorových buniek, ktorý bol obklopený malými adipocytmi so širšími medzibunkovými priestormi, čo naznačuje prestavbu extracelulárnej matrix. Takéto štruktúry sa v literatúre označujú ako "crown-like structures" a pozostávajú z makrofágov obklopujúcich mŕtve alebo zomierajúce adipocyty a bývajú asociované s pro-zápalovými procesmi, ktorými tukové tkanivo prispieva k zhoršeniu prognózy karcinómu prsníka. Keď sme injekovali MDA+DOX-MSC imunodeficientným myšiam, pozorovali sme metastatické šírenie pozdĺž tukového tkaniva a detekovali prítomnosť metastatických buniek v pľúcach myší. Predpokladáme, že za tieto efekty by mohli byť rovnako zodpovedné zvýšené hladiny SDF-1 α a IL-32 produkované MSC bunkami po vystavení doxorubicínu, pričom za zvýšenú angiogézu by mohla byť zodpovedná aktivácia matrix metaloproteináz. Produkcia MMP bola asociovaná so zvýšenými hladinami IL-32 a CXCL12, ktorých zvýšená sekrécia bola u predovplyvnených MSC pozorovaná. Keď sme analyzovali expresiu VEGF v kokultúrach s DOX-/PAC-MSC, pozorovali sme opačné výsledky (zvýšenú expresiu u JIMT-1 buniek a zníženú u MDA-231 buniek), čo naznačuje, že hoci predovplyvnené MSC spôsobili rovnaký efekt (zvýšenú angiogézu), sú zaň zodpovedné rozličné mechanizmy v závislosti od rozličných molekulárnych typov nádorových buniek. Okrem zvýšeného invazívneho potenciálu sme pozorovali aj zvýšenú inerváciu nádorov obsahujúcich predovplyvnené MSC. Sympatíkový nervový systém bol korelovaný so zhoršenou prognózou a zvýšeným metastázovaním u karcinómu prsníka. Naše výsledky naznačujú, že neoadjuvantná chemoterapia môže ovplyvniť inak zdravé bunky v prsníkovom tkanive a pozmeniť ich na nádor a metastázovanie podporujúce prostredie. Správne pochopenie nádorového mikroprostredia a jeho komplexnej signalizačnej siete nás môže priviesť bližšie k schopnosti rozoznať mechanizmy, ktoré vedú k neúčinnosti štandardnej liečby a k dosiahnutiu lepšieho liečebného výsledku.

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

Chemotherapy remains a standard treatment option for breast cancer despite its toxic effects to normal tissues and despite the fact that the long-lasting effects of chemotherapy on non-malignant cells may influence tumor cell behavior and response to treatment. The main aim of this project was to analyse the mechanism of the mesenchymal stromal cell-induced tolerance to antitumor treatment and to identify the responsible signalling pathways. Following chemotherapy, the microenvironment of breast cancer changes the milieu of growth factors and could lead to changes in many cellular processes. We have observed partially senescent MSC population after treatment and higher autophagy in DOX- and PAC-MSC. The exposure to chemotherapy was associated also with increased secretion of SDF-1 α , IL-32, THBS-1, DPPIV and uPAR when compared to unexposed MSC. Paclitaxel exposure resulted in decreased production of CXCL5, endoglin, Dkk-1 and increased production of IL-32. The chemotherapy-exposed MSC communicated with triple-negative MDA-MB-231 cells and HER2+ JIMT cells via gap junctions more than unexposed MSC. This could be the reason for higher supportive effect of DOX-MSC and PAC-MSC on the

invasive potential of tumor cells in vivo, where histological tumor xenograft analysis revealed increased tumor cell invasion only in MDA cells co-injected with DOX-MSK or PAC-MSK. Additionally, tumor invasive front was surrounded by smaller adipocytes with wider intercellular spaces showing rearrangements of the extracellular matrix in close proximity to the invasive front. Those crown-like structures composed of macrophages surrounding dead or dying adipocytes were associated with pro-inflammatory processes by which adipose tissue contributes to a worse prognosis of breast cancer. When MDA+DOX-MSK were injected into immunodeficient mice, metastatic tumor cells migrating alongside adipose tissue and the presence of metastatic cells in the lungs were detected. We suppose that also higher levels of SDF-1 and IL-32 produced by MSK after DOX exposure may contribute to the metastasizing into lungs and to the increased angiogenesis via activation of MMPs. MMPs production was shown to be connected to increased level of IL-32 and CXCL12, which higher secretion was found in chemotherapy-exposed MSK. When we analyzed the expression of VEGF in co-cultures with DOX-/PAC-MSK, opposite results in VEGF expression were achieved (increased expression of VEGF in case of JIMT cells and decreased in MDA cells). This suggests that even though chemotherapy-exposed MSK caused a similar effect on angiogenesis, the underlying mechanism might differ for individual molecular subtypes. In addition to the higher invasive potential of tumor cells co-injected with chemotherapy-exposed MSK, we have observed also increased neural infiltration and increased nerve fibers formation. The sympathetic nervous system was found to be correlated with poor prognosis and metastatic rate in breast cancer. Data presented in this study suggest that neoadjuvant chemotherapy could possibly alter otherwise healthy stroma in breast tissue into a hostile tumor-promoting and metastasis favoring niche. Understanding of the tumor microenvironment and its complex net of signals brings us closer to the ability to recognize the mechanisms that prevent failure of standard therapy and accomplish the curative purpose.