



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-18-0088

Komplexná molekulová charakterizácia heterogenity a signalizácie gliálnych buniek v procese tumorigenézy

Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Jozef Hatok, PhD.**

Príjemca

Univerzita Komenského v Bratislave - Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta UK v Martine.
2. Neurochirurgická klinika SZU, Fakultná nemocnica s poliklinikou F. D. Roosevelta, Banská Bystrica.
3. Neurochirurgická klinika, Jesseniova lekárska fakulta UK v Martine a UNM.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Katedra experimentálnej biológie PF UPOL, Česká republika.

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

Žiadne

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

Publikácie karentované:

1. Gondáš, Eduard et al. "Expression of pyruvate carboxylase in cultured human astrocytoma, glioblastoma and neuroblastoma cells." General physiology and biophysics vol. 40,2 (2021): 127-135. doi:10.4149/gpb_2021003.
 2. Gondáš, Eduard et al. "Expression of 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase in Brain Tumors and Capability to Catabolize Leucine by Human Neural Cancer Cells." Cancers vol. 14,3 585. 24 Jan. 2022, doi:10.3390/cancers14030585.
 3. Majercikova, Zuzana et al. "Different Approaches for the Profiling of Cancer Pathway-Related Genes in Glioblastoma Cells." International journal of molecular sciences vol. 23,18 10883. 17 Sep. 2022, doi:10.3390/ijms231810883.
 4. Gondáš, Eduard et al. "Immunodetection of Pyruvate Carboxylase Expression in Human Astrocytomas, Glioblastomas, Oligodendrogliomas, and Meningiomas." Neurochemical research vol. 48,6 (2023): 1728-1736. doi:10.1007/s11064-023-03856-5.
 5. Gondáš, E et al. "The presence of pyruvate carboxylase in the human brain and its role in the survival of cultured human astrocytes." Physiological research vol. 72,3 (2023): 403-414.
- Publikácie recenzované, nekarentované:
6. Hnilicova, P et al. "Noninvasive study of brain tumours metabolism using phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy." Bratislavské lekárske listy vol. 121,7 (2020): 488-492.

doi:10.4149/BLL_2020_080.

7. Vidomanova, Ľ et al. "The effect of temozolomide on apoptosis-related gene expression changes in glioblastoma cells." Bratislavske lekárske listy vol. 123,4 (2022): 236-243. doi:10.4149/BLL_2022_038.

8. Majerčíková, Z et al. "Quantitative profiling of genes associated with cancer pathways in brain tumors." "Kvantitatívne profilovanie génov asociovaných s dráhami vzniku mozgových nádorov." Klinická onkologie : časopis Česke a Slovenske onkologicke spoločnosti vol. 36,3 (2023): 224-233. doi:10.48095/ccko2023224.

Prednášky:

9. Majerčíková Z.- Synergický efekt inhibítorov na temozolomidom ovplyvnené nádorové línie mozgu. Interaktívna konferencia mladých vedcov 2021.

10. Majerčíková Z.- In vitro štúdium rezistencie glioblastómových buniek na temozolomid. Drobnicov memoriál 11. ročník, 2021.

11. Majerčíková Z.- Sledovanie exprese génov pri nádorových procesoch gliálnych buniek. Drobnicov memoriál 10. ročník, 2019.

12. Gondáš E.- Metabolická analýza vplyvu onkometabolitov na bazálny metabolizmus ľudských neuroblastómových buniek. Drobnicov memoriál 10. ročník, 2019.

Abstrakty príspevkov na konferenciách:

13. Majerčíková Z. - Dôležitosť voľby kontrolnej skupiny pri génových analýzach nádorových gliálnych buniek. Biochemické dni 2019 : zborník abstraktov z konferencie. - : 1. vyd. ISBN 978-80-89965-27-4. - Bratislava : Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu, 2019. - S. 100.

14. Hatok J. - Transkriptomické profilovanie nádorových buniek mozgu: personalizácia a vplyv selektívnych inhibítorov. Biochemické dni 2019 : zborník abstraktov z konferencie. - : 1. vyd. ISBN 978-80-89965-27-4. - Bratislava : Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu, 2019. - S. 80.

15. Hatok J. - Heterogenous expression of genes associated with cancer pathway in selected brain tumors. 6th Annual Meeting : Cancer Metabolic Rewiring: Mapping the Road to Clinical Translation. - : 1. vyd. [s.l.] : International Society of Cancer Metabolism, 2019. - S. 103.

Organizovanie vedeckých kurzov a konferencií:

16. Metabolické možnosti nádorových buniek pri rezistencii na liečbu a metódy ich detekcie, Malá Trňa 2021.

17. Biochemické zmeny mozgových buniek počas tumorogenézy a metódy ich detekcie, Látka 2022.

18. Metabolické stratégie mozgových buniek pri nadobudnutí nádorového charakteru, Richňava 2023.

Uplatnenie výsledkov projektu

V rámci základného výskumu sú naše výsledky odrazovým mostíkom pri charakterizácii mechanizmov vzniku vybraných nádorov mozgu, ako aj pochopenia vývoja rezistencie na temozolomid - ako hlavného používaného liečiva. Naše nadobudnuté poznatky pri profilovaní génov zodpovedných za rozvoj rakoviny, ako na patientských vzorkách tak aj na bunkových modeloch, predstavujú individuálny pohľad na definovanie molekulovej charakterizácie tumorogenézy. Okrem transkriptomického pohľadu sme sa zamerali aj na individuálne aminokyseliny resp. enzýmy základných energetických dejov, kde sme potvrdili, metabolickú komplexnosť, či prispôsobovanie sa nádorových buniek okolitým podmienkam. Kombinácia experimentálnych výsledkov z viacerých OMIC výstupov je novým prístupom, ktorého cieľom je pomôcť identifikovať latentné molekulové vzťahy, ktoré nám pomôžu k odhaleniu potenciálnych prognostických a prediktívnych markerov a tým sprostredkujú personalizovaný prístup k pacientom. Navyše, vygenerovaním rezistentnej bunkovej línie na temozolomid môžeme v budúcnosti testovať špecifické (nové) inhibitory, ktoré by boli efektívnejšie pri liečbe glioblastómov.

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

Nádory z gliálnych buniek sú charakterizované vysokým stupňom variability medzi rôznymi typmi gliómov, ako aj v rámci jedného nádoru, obzvlášť u multiformného glioblastómu. My sme sa preto zamerali na komplexnú molekulovú charakterizáciu procesu vzniku gliálnych

tumorov na základe kombinácie štyroch oblastí: i.) transkriptomickéj; ii.) epigenetickej; iii.) proteomickej a iv.) metabolomickej.

- Hlavným výsledkom projektu bola profilácia génov v 9tich signálnych dráhach zodpovedných za tumorigenézu, kde sme najvýraznejšie deregulácie zaznamenali u génov spájaných s epiteliálno-mezenchymálnou tranzíciou (CDH2, FOXC2, GSC, SNAI2 a SOX10), bunkovým starnutím (BMI1, ETS2, MAP2K1 a SOD1), opravou DNA (DDB2, ERCC3, GADD45G a LIG4) a dynamikou telomér (TEP1, TERF2IP, TNKS a TNKS2);
- U metaloproteázovej štúdií sme zistili, že zdravé tkanivo oproti nádorovému neprodukuje MMP1, MMP8 a MMP13;
- Porovnaním oblastí mozgu pomocou 31P MRS medzi tumorom a zdravým tkanivom sme u pacientov detegovali rozdiely pri membránových fosfolipidoch ako aj pokles pomeru energetických markerov u tumorov;
- Ako jedni z mála sme u pacientov dokázali, že pyruvát karboxyláza je exprimovaná u glioblastómu, astrocytómu, oligodendrogliómu a meningiómu a tak prispieva k anabolickému metabolizmu bunkových zložiek;
- Celkové percentuálne hladiny metylácie v periférnej krvi boli 63,7%, v nádorovom tkanive mozgu, tých istých pacientov 30,7%. U pacientov so zhubným nádorovým ochorením mozgu sme zaznamenali vyššiu hladinu metylácie v periférnej krvi oproti nezhubným (s meningiómom).

Na bunkových líniiach sme na viacerých úrovniach dospeli k nasledovným výsledkom:

- Imunodetekciou sme zistili prítomnosť a rozdiely expresie pyruvátkarboxylázy (PC) u ľudských astrocytémov, glioblastémov a neuroblastémov. Zároveň sme odhalili, že u nádorových buniek mozgu prispieva PC, svojou anaplerotickou aktivitou, k udržaniu metabolizmu rakovinových buniek;
- Pri využití imunosondovacej metódy na vyhodnotenie expresie 3-metylcrotonyl-CoA karboxylázy (MCC) v kultivovaných bunkách sme poukázali na fakt, že mozgové nádorové bunky (v kultúre aj insitné) exprimujú MCC a katabolizujú leucín. Tieto výsledky naznačujú, že dané bunky mozgu môžu využívať katabolity leucínu ako substrát pre ich metabolizmus;
- Špecifickým matematickým prístupom sa nám podarilo poukázať na dôležitosť výberu kontrolnej skupiny pri transkriptomických analýzach a tým pádom vyhnúť sa falošným výsledkom;
- Kombináciou špecifických inhibítorov (Embelin, MK-1755 a ABT-199) sme potencovali efekt pôsobenia temozolomidu u vybraných bunkových línii;
- Dokázali sme vygenerovať rezistentnú líniu T98G na temozolomid, a tým pádom sme získali model pre nasledujúce experimenty pri definovaní odpovede, resp. mechanizmu glioblastómovej rezistencie.

Aplikácia týchto výsledkov môže priniesť nové poznatky a potenciálne vylepšenia v diagnostike, liečbe a výskume mozgových nádorov. Okrem toho, tieto poznatky môžu prispieť k lepšiemu porozumeniu mechanizmov vzniku a šírenia nádorov a tým otvárajú nové perspektívy pre ďalšie terapeutické stratégie.

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

Tumors of glial cells are characterized by a high degree of variability among different types of gliomas, as well as within a single tumor, particularly in the case of multiform glioblastoma. Therefore, we focused on a comprehensive molecular characterization of the process of glioma formation based on the combination of four areas: i.) transcriptomics; ii.) epigenetics; iii.) proteomics; and iv.) metabolomics.

- The main outcome of the project was the profiling of genes in nine signaling pathways responsible for tumorigenesis, where the most significant deregulations were observed in genes associated with epithelial-to-mesenchymal transition (CDH2, FOXC2, GSC, SNAI2, and SOX10), cellular senescence (BMI1, ETS2, MAP2K1, and SOD1), DNA repair (DDB2, ERCC3, GADD45G, and LIG4), and telomere dynamics (TEP1, TERF2IP, TNKS, and TNKS2).
- In the metalloprotease study, we found that healthy tissue does not produce MMP1, MMP8, and MMP13, in contrast to tumor tissue.
- Comparing brain regions using 31P MRS between tumor and healthy tissue, we detected differences in membrane phospholipids as well as a decrease in the ratio of energy markers in tumors among the patients.

- As one of the few findings, we demonstrated that pyruvate carboxylase is expressed in glioblastoma, astrocytoma, oligodendroglioma, and meningioma, contributing to the anabolic metabolism of cellular components.

- The overall percentage of methylation in peripheral blood was 63.7%, while in the brain tumor tissue of the same patients, it was 30.7%. Patients with malignant brain tumors exhibited higher levels of methylation in peripheral blood compared to benign tumors (meningioma).

On cell lines, we have reached the following results on multiple levels: - Through immunodetection, we identified the presence and differential expression of pyruvate carboxylase (PC) in human astrocytomas, glioblastomas, and neuroblastomas. Additionally, we discovered that PC contributes to maintaining the metabolism of cancer cells in brain tumors through its anaplerotic activity.

- By utilizing immunosensor-based methods to evaluate the expression of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) in cultured cells, we demonstrated that brain tumor cells (both in culture and in situ) express MCC and catabolize leucine. These findings suggest that brain cells can utilize leucine catabolites as substrates for their metabolism.

- Through a specific mathematical approach, we highlighted the importance of selecting an appropriate control group in transcriptomic analyses to avoid false results.

- The combination of specific inhibitors (Embelin, MK-1755, and ABT-199) allowed us to potentiate the effect of temozolomide in selected cell lines.

- We successfully generated a temozolomide-resistant T98G cell line, providing a model for further experiments to define the response and mechanism of glioblastoma resistance.

The application of these results can bring new insights and potential improvements in the diagnosis, treatment, and research of brain tumors. Moreover, these findings can contribute to a better understanding of the mechanisms of tumor formation and dissemination, thus opening new perspectives for further therapeutic strategies.