



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-18-0125

Nové antrachinóny prírodného pôvodu pre biomedicínske aplikácie

Zodpovedný riešiteľ **prof. RNDr. Eva Čellárová, DrSc.**

Príjemca **Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach - Prírodovedecká fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied, Katedra genetiky a Katedra bunkovej biológie
Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra genetiky

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Centrálne laboratórium proteomiky, CEITEC Masarykova Univerzita, Brno, ČR (prof. RNDr. Zbyněk Zdráhal).
Technická univerzita v Dortmunde, Nemecko (doc. Dr. Souvik Kusari)
Ústav bioorganickej chémie Poľskej akadémie vied v Poznani (doc. Dr. Lukasz Marczak)

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

0

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

Babinčák M., Jendželovský R., Košuth J., Majerník M., Vargová J., Mikulášek K., Zdráhal Z., Fedoročko P. Death receptor 5 (TNFRSF10B) is upregulated and trail resistance is reversed in hypoxia and normoxia in colorectal cancer cell lines after treatment with skyrin, the active metabolite of Hypericum spp. In Cancers, 13(7): 2021, 1646, doi: 10.3390/cancers13071646 Q1 (Oncology), IF (2021) 6.575
Bruňáková K., Bálintová M., Henzelyová J., Kolarčík V., Kimáková A., Petijová L., Čellárová E. Phytochemical profiling of several Hypericum species identified using genetic markers. In: Phytochemistry, 187: 2021, 112742, doi: 10.1016/j.phytochem.2021.112742 Q1 (Plant Science), IF (2021) 4.004
Bruňáková K., Bálintová M., Petijová L., Čellárová E. Does phenotyping of Hypericum secondary metabolism reveal a tolerance to biotic/abiotic stressors? In: Frontiers in Plant Science, 13: 2022, 1042375, doi: 10.3389/fpls.2022.1042375 Q1 (Plant Science), IF (2022) 5.6
Bul'ková V., Vargová J., Babinčák M., Jendželovský R., Zdráhal Z., Roudnický P., Košuth J., Fedoročko P. New findings on the action of hypericin in hypoxic cancer cells with a focus on the modulation of side population cells. In: Biomedicine and Pharmacotherapy, 163: 2023, 114829, doi: 10.1016/j.biopha.2023.114829 Q1 (Pharmacology), IF (2021) 7.419

Henzelyová J., Antalová M., Nigutová K., Logoida M., Schreiberová A., Kusari S., Čellárová E. Isolation, characterization and targeted metabolic evaluation of endophytic fungi harbored in 14 seed-derived *Hypericum* species. In: *Planta Medica*, 86(13/14): 2020, pp. 997-1008, doi: 10.1055/a-1130-4703

Q2 (Pharmaceutical Science), IF (2020) 3.352

Majerník M., Jendželovský R., Fedoročko P. Potentiality, limitations, and consequences of different experimental models to improve photodynamic therapy for cancer treatment in relation to antiangiogenic mechanism. In: *Cancers*, 12: 2020, 2118, doi: 10.3390/cancers12082118

Q1 (Oncology), IF (2020) 6.639

Mund N.K., Čellárová E. Recent advances in the identification of biosynthetic genes and gene clusters of the polyketide-derived pathways for anthraquinone biosynthesis and biotechnological applications. In: *Biotechnology Advances*, 63: 2023, 108104, doi: 10.1016/j.biotechadv.2023.108104

Q1 (Biotechnology), IF (2022) 16.0

Petijová L., Henzelyová J., Kuncová J., Matoušková M., Čellárová E. In silico prediction of polyketide biosynthetic gene clusters in the genomes of *Hypericum*-borne endophytic fungi. 2023 [under review].

BMC Genomics: Q1 (Biotechnology), IF (2022) 4.4

Petijová L., Jurčáková Z., Čellárová E. Computational screening of miRNAs and their targets in leaves of *Hypericum* spp. by transcriptome-mining: A pilot study. In *Planta*, 251(2): 2020, 49, doi: 10.1007/s00425-020-03342-0

Q1 (Plant Science), IF (2020) 4.116

Revuru B., Bálintová M., Henzelyová J., Čellárová E., Kusari S. MALDI-HRMS Imaging maps the localization of skyrin, the precursor of hypericin, and pathway intermediates in leaves of *Hypericum* species. In *Molecules*, 25(17): 2020, 3964. doi: 10.3390/molecules25173964

Q1 (Pharmaceutical Science), IF (2020) 4.411

Zajíčková T., Horváthová E., Kyzek S., Šályová E., Túryová E., Ševčovičová A., Gálová E. Comparison of cytotoxic, genotoxic, and DNA- protective effects of skyrin on cancerous vs. non-cancerous human cells. In *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10): 2022, 5339., doi: 10.3390/ijms23105339

Q1 (Medicine - miscellaneous), IF (2022) 5.6

Zhou W., Wang Y., Li B., Petijová L., Hu S.Y., Zhang Q., Niu J.F., Wang D.H., Wang S.Q., Dong Y., Čellárová E., Wang Z.Z. Whole-genome sequence data of *Hypericum perforatum* and functional characterization of melatonin biosynthesis by N-acetylserotonin O-methyltransferase. In: *Journal of Pineal Research*, 70(2): 2021, e12709, doi: 10.1111/jpi.12709

Q1 (Endocrinology), IF (2021) 12.081

Uplatnenie výsledkov projektu

Perspektívne uplatnenie výsledkov projektu je jednak v oblasti produkcie bioaktívnych antrachinónov alternatívnou biotechnologickou cestou a jednak v rozšírení možností ich využitia v terapii a diagnostike nádorov. Prvý aspekt uplatnenia výsledkov vychádza z reálneho stavu dostupnosti uvedených látok na trhu, keď jediným prírodným zdrojom hypericínu, ktorý je v klinických testoch pre terapiu nádorov a odporúčaný na diagnostické účely je *Hypericum perforatum*. Napriek tomu jeho biosyntéza v rastlinách rodu *Hypericum*, ktorý je jediným rastlinným producentom hypericínu a jeho derivátov, nie je dostatočne objasnená. Potenciál pre produkciu týchto prírodných antrachinónov majú aj endofytické mikroorganizmy žijúce v symbiotickom vzťahu so svojimi hostiteľmi, kde je známych viacero biosyntetických génových klastrov, ktoré kódujú enzýmy biosyntézy. Práve tieto mikroorganizmy alebo iné jednoduché eukaryotické modely by sa perspektívne mohli použiť ako "bunkové továrne" na produkciu uvedených látok. Nevyhnutnou podmienkou je ale funkčná validácia kandidátnych génov, ktorá je len v začiatkoch a dosiaľ nepriniesla uspokojivé výsledky. Druhým aspektom uplatnenia výsledkov je oblasť diagnostiky a terapie nádorov. Napriek veľkému množstvu poznatkov o hypericine, o účinkoch iných príbuzných antrachinónov existuje len málo spoľahlivých údajov. Naše výsledky protinádorových účinkov skyrínu, emodínu a ich kombinácií indikujú nové možnosti ich využitia, a to predovšetkým v kombináciách, ktoré majú synergický efekt. Z tohto hľadiska prichádzajú do

úvahy aj nové antrachinóny identifikované v rámci projektu v dosiaľ málo študovaných druhoch rodu *Hypericum*.

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

V rámci uvedeného projektu sme s cieľom prispieť k poznaniu regulácie biosyntézy hypericínu a jeho derivátov identifikovali a charakterizovali nové prírodné zdroje týchto látok v zástupcoch rodu *Hypericum* a vo fungálnych endofytoch izolovaných z týchto hostiteľov a identifikovali nové antrachinóny. V genomických dátach endofytov sme predikovali antrachinónové biosyntetické génové klastre. V hostiteľských rastlinách sme zistili množinu geneticky konzervovaných a potenciálne nových miRNA a ich interakcie s kandidátnymi proteínmi v biosyntéze hypericínu. Vypracovali sme transformačný systém na báze eukaryotického modelu *Yarrowia lipolytica* na validáciu kandidátnych biosyntetických génov. Z hľadiska protinádorového pôsobenia sme sa zamerali predovšetkým na účinky bisantrachinónu skyrínu. Popísali sme negatívny účinok skyrínu na bunkové línie kolorektálneho karcinómu v normoxických a hypoxických podmienkach, ktorý bol spojený so zvýšením hladiny receptora DR5 (death receptor 5), a obmedzením rezistencie k TRAIL z rodiny tumor-nekrotizujúcich faktorov. Popísali sme tiež účinok hypericínu na bunky pľúcneho karcinómu v hypoxii, kde spôsobil redukciu veľkosti rezistentnej frakcie buniek a stimuloval migračné vlastnosti týchto buniek. Z hľadiska objasnenia interakcií medzi hypericínom a proteínom BRCP (breast cancer resistance protein) sme identifikovali bunkové línie, ktoré exprimujú mutovanú aj štandardnú alelu tohto proteínu. Výsledky genotoxikologických analýz skyrínu, emodínu a ich kombinácií potvrdili DNA-protetívny a antigenotoxický účinok na zdravé bunky a cytotoxický efekt na nádorové bunky línie HepG2. Výsledky projektu indikujú možnosti perspektívnej biotechnologickej produkcie bioaktívnych antrachinónov a rozšírenie ich terapeutického potenciálu v onkológii.

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

As part of this project, in order to contribute to the knowledge on regulation of biosynthesis of hypericin and its derivatives, we identified and characterized new natural sources of these substances in representatives of the genus *Hypericum* and *Hypericum*-borne fungal endophytes and identified new anthraquinones. Based on the genomic data of the endophytes, we predicted in silico the anthraquinone biosynthetic gene clusters. In host plants, we found a set of genetically conserved and potentially new miRNAs and their interactions with candidate proteins in hypericin biosynthesis. We have developed a transformation system based on the eukaryotic model of *Yarrowia lipolytica* for prospective functional validation of candidate biosynthetic genes. In terms of antitumor action, we focused mainly on the effects of bisantraquinone skyrin. We described the negative effect of skyrin on colorectal cancer cells under normoxic and hypoxic conditions, which was associated with an increase in DR5 (death receptor 5) levels and a reduction in TRAIL resistance from the tumor-necrosis factor family. We also described the effect of hypericin on lung cancer cells in hypoxia, where it caused a reduction in the size of the resistant fraction of cells and stimulated the migration properties of these cells. In terms of elucidating the interactions between hypericin and breast cancer resistance protein (BRCP), we have identified cell lines that express both mutant and standard alleles coding for this protein. The results of genotoxicological analyses of skyrin, emodin and their combinations confirmed DNA-protective and antigenotoxic effect on healthy cells and cytotoxic effect on tumor cells of the HepG2 line. The results of the project indicate the possibilities of prospective biotechnological production of bioactive anthraquinones and expansion of their therapeutic potential in oncology.