



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-19-0286

Je HIF-1a hlavný regulátor DNA reparačnej kapacity a odpovede na chemoterapiu v nádoroch semenníkov z germinatívnych buniek?

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Dana Jurkovičová, PhD.**

Príjemca **Biomedicínske centrum SAV, v. v. i. - Ústav experimentálnej onkológie**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Biomedicínske centrum SAV
Ústav experimentálnej onkológie

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

bez spolupracujúceho zahraničného pracoviska

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

1. ROŠKA Jan - LOBO Joao - IVOVIČ Danica - WACHSMANNOVÁ Lenka - MUELLER Thomas - HENRIQUE Rui - JERÓNIMO Carmen - CHO VANEC Miroslav - JURKOVIČOVÁ Dana. Integrated Microarray-Based Data Analysis of miRNA Expression Profiles: Identification of Novel Biomarkers of Cisplatin-Resistance in Testicular Germ Cell Tumours. Int J Mol Sci. 2023 Jan 27;24(3):2495. doi: 10.3390/ijms24032495. PMID: 36768818; PMCID: PMC9916636.

2. IVOVIČ Danica - KABELÍKOVÁ Pavlína - JURKOVIČOVÁ Dana. Unraveling the complexity: A comprehensive analysis of the PP2A in cancer and its potential for novel targeted therapies. Neoplasma. 2023 Aug;70(4):485-499. doi: 10.4149/neo_2023_230806N411. PMID: 37789785.

3. HOLÍČKOVÁ, Andrea - ROŠKA, Jan* - ÓRÁSOVÁ, Eveline - BRUDEROVÁ, V. - PALACKA, Patrik - JURKOVIČOVÁ, Dana* - CHO VANEC, Miroslav**. Response of the Urothelial Carcinoma Cell Lines to Cisplatin. In International Journal of Molecular Sciences, 2022, vol. 23, no. 20, art. no. 12488. (2021: 6.208 - IF, Q1 - JCR, 1.176 - SJR, Q1 - SJR, karentované - CCC). (2022 - Current Contents). ISSN 1422-0067. Dostupné na: <https://doi.org/10.3390/ijms232012488>

4. IVOVIC Danica - KABELIKOVA Pavlina - ROSKA Jan - HOLICKOVA Andrea - ORASOVA Eveline - GULATI Sachin - KALINKOVA Lenka - BALOGHOVA Vanessa - JURKOVICOVA Dana. PP2A and its epigenetic regulation in chemoresistant testicular germ cell tumors. Potential for novel targeted therapies. (AJP-Cell Physiology, Special Issue:

Uplatnenie výsledkov projektu

Získané výsledky môžu byť využité ako nové doplňujúce diagnostické biomarkery, ktoré v rámci personalizovaného prístupu ku pacientovi môžu presnejšie charakterizovať histologický podtyp TGCT, a tým umožniť presnejšiu stratifikáciu jednotlivých pacientov. Tieto biomarkery môžu včas odhaliť vznik alebo rozvoj chemorezistencie na štandardnú terapiu, na začiatku alebo v priebehu liečby pacienta, tým zmierniť zbytočné vedľajšie účinky toxikkej liečby, ktorá je pre pacienta neefektívna. Pacientovi následne môže byť aplikovaná iná alebo intenzívnejšia terapia vedúca k lepším výsledkom. Tieto biomarkery môžu zefektívniť monitoring prebiehajúcej liečby, a tým jej úspešnosť. Využitiu týchto nových biomarkerov samozrejme musí predchádzať klinická validácia.

Charakterizácia úlohy regulačnej osi HIF/miR-218/PP2A-PPP2R5A v chemorezistencii otvára aj nové možnosti terapeutického cielenia jej jednotlivých komponentov. Tým výsledky projektu môžu potenciálne prispieť k vývoju nových terapeutík alebo liečebných režimov. V neposlednom rade sú výsledky projektu príspevkom k poznaniu molekulárneho pozadia malignity TGCT a pochopeniu regulačných súvislostí na úrovni bunky. Tieto výsledky podporujú dôležitosť komplexnej epigenetickej regulácie pri nádorových ochoreniach a ich liečbe. TGCT sú veľmi dobrým modelom pre štúdium CDDP rezistencie, nakoľko mnohé na CDDP dobre odpovedajú a vysoké percento pacientov je možné vyliečiť konvenčnou terapiou na báze CDDP, dokonca aj v metastatickom štádiu. Poznanie mechanizmov, ktorými sa líši rezistentný fenotyp od senzitívneho, otvára nové možnosti liečby nielen pre TGCT, ale aj pre iné solídne malignity, kde liečba pomocou CDDP zvyčajne býva prvolíniovou voľbou.

Publikované výsledky projektu môžu vyvolať potenciálne nové projektové žiadosti, prípadne nové spolupráce s domácimi alebo zahraničnými pracoviskami.

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

Naše výsledky ukázali, že expresia komponentov regulačnej osi HIF/miR-218/PP2A-PPP2R5A je asociovaná s mierou rezistencie TGCT buniek jednotlivých histologických podtypov a významne moduluje ich odpoveď na cisplatinu (CDDP). Transkripčný faktor HIF-1a je kľúčovým regulátorom a miR-218 túto odpoveď epigeneticky moduluje. Porovnanie TGCT bunkových línií ukázalo signifikantne vyššiu expresiu miR-218, HIF-1/2/3 a SLIT2/SLIT3 v rezistentných líniách oproti senzitívnym a zdravej kontrole. Expresia oboch fosfatáz PP2A a PPP2R5A bola významne vyššia vo všetkých TGCT líniách oproti zdravej kontrole, ale rezistentné línie sa od senzitívnych signifikantne líšili ich zníženou hladinou. Využitím siRNA inhibítorov miR-218 a HIF-1a sme ukázali, že obe fosfatázy sú post-transkripčne regulované prostredníctvom miR-218, ktorá je spolu s oboma hostiteľskými génmi SLIT2/3 (s HRE elementom v promótoe) pod kontrolou transkripčného faktora HIF-1a. Analýza promótorov fosfatáz ukázala zanedbateľnú mieru metylácie, naznačujúc výhradnú kontrolu ich downregulácie pri chemorezistencii prostredníctvom miR-218. Epigenetickú kontrolu prostredníctvom miR-218 sme potvrdili aj pri vybraných génoch DNA opravy. Funkčné zapojenie regulačnej osi HIF/miR-218/PP2A-PPP2R5A do CDDP odpovede sme overili evaluáciou dvojvláknových DNA zlomov (DSB) a porovnaním množstva fosforylovanej vs. nefosforylovanej formy ATM, kľúčového komplexného aktivátora DNA opravy. Zvýšené množstvo fosforylovanej formy ATM v rezistentných TGCT naznačuje možnú platnosť našej hypotézy, že HIF-1a-indukovaná expresia miR-218 downreguluje fosfatázy, ktoré nedostatočne defosforylujú ATM, tým predlžujú aktiváciu DNA opravných dráh s následkom zvýšenej kapacity DNA opravy vedúcu k chemorezistencii. Zvýšená expresia HIF-1a/miR-218 a aktivácia osi HIF/miR-218/PP2A-PPP2R5A kompromituje homologickú rekombináciu, ktorá spolu so zvýšenou účinnosťou opravy nukleotidovej excíznej opravy (upreguláciou XPA), môže zvýšiť chemorezistenciu a predikovať horšiu prognózu pre TGCT pacienta. Komponenty osi HIF/miR-218/fosfatázy predstavujú potenciálne nové biomarkery CDDP rezistencie a prediktory úspešnosti CDDP liečby. Splnením cieľov projektu sa nám podarilo potvrdiť platnosť stanovených hypotéz.

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

Our results showed that the expression of components of the HIF/miR-218/PP2A-PPP2R5A regulatory axis is associated with the degree of resistance of TGCT cells of individual histological subtypes and significantly modulates their response to cisplatin (CDDP). The transcription factor HIF-1a is a key regulator, and miR-218 epigenetically modulates this response. Comparison of TGCT cell lines showed significantly higher expression of miR-218, HIF-1/2/3 and SLIT2/SLIT3 in resistant lines compared to sensitive and healthy control. The expression of both phosphatases PP2A and PPP2R5A was significantly higher in all TGCT lines compared to the healthy control, but the resistant lines differed significantly from the sensitive ones in their reduced level. Using siRNA inhibitors of miR-218 and HIF-1a, we showed that both phosphatases are post-transcriptionally regulated by miR-218, which together with both host genes SLIT2/3 (with an HRE element in the promoter) is under the control of the transcription factor HIF-1a. Analysis of phosphatases' promoters showed a negligible level of methylation, suggesting exclusive control of their downregulation in chemoresistance by miR-218. We also confirmed epigenetic control by miR-218 for selected DNA repair genes. We verified the functional involvement of the HIF/miR-218/PP2A-PPP2R5A regulatory axis in the CDDP response by evaluating double-stranded DNA breaks (DSB) and comparing the amount of phosphorylated vs. non-phosphorylated form of ATM, a key complex activator of DNA repair. The increased amount of the phosphorylated form of ATM in resistant TGCTs suggests the potential validity of our hypothesis that HIF-1a-induced expression of miR-218 downregulates phosphatases that insufficiently dephosphorylate ATM, thus prolonging the activation of DNA repair pathways with the consequence of increased DNA repair capacity leading to chemoresistance. Increased expression of HIF-1a/miR-218 and activation of the HIF/miR-218/PP2A-PPP2R5A axis compromises homologous recombination, which together with increased efficiency of nucleotide excision repair (upregulation of XPA), may increase chemoresistance and predict worse prognosis for TGCT patient. Components of the HIF/miR-218/phosphatase axis represent potential novel biomarkers of CDDP resistance and predictors of CDDP treatment outcomes. By meeting the goals of the project, we managed to confirm the validity of the proposed hypotheses.