



SIMPOZIJ „PRVIH 10 GODINA HDIR-A”

KNJIGA SAŽETAKA



4. lipnja 2019.

Simpozij „Prvih 10 godina HDIR-a“ – knjiga sažetaka

Impressum:

Urednik:

Petar Ozretić, tajnik HDIR-a

Nakladnik:

Hrvatsko društvo za istraživanje raka (HDIR), Zagreb

ISBN 978-953-48672-0-4

URL: http://hdir.hr/docs/HDIR-10g_knjiga_sazetaka.pdf

Mjesto i godina izdavanja: Zagreb, 2019.

Copyright @ 2019, Hrvatsko društvo za istraživanje raka. Sva prava pridržana.

Simpozij „Prvih 10 godina HDIR-a“

Organizator:

Hrvatsko društvo za istraživanje raka (HDIR)

Bijenička 54, HR-10000 Zagreb

Mjesto održavanja:

Institut „Ruđer Bošković“

Bijenička 54, HR-10000 Zagreb

Vrijeme održavanja:

4. lipnja 2019.

Organizacijski / Znanstveni odbor:

Sonja Levanat

Biserka Nagy

Maja Osmak

Damir Eljuga

Neda Slade

Vesna Musani

Mirela Levačić Cvok

Maja Sabol

Petar Ozretić

U povodu desete godišnjice Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR)

Ove godine Hrvatsko društvo za istraživanje raka (HDIR) navršava svojih prvih deset godina!

Jedno smo od 14 nacionalnih društava unutar naše krovne organizacije, Europskog društva za istraživanje raka (European Association for Cancer Research, EACR), najjače europske neprofitne stručne organizacije koja pokriva kliničke i bazične aspekte istraživanja raka. EACR je najbrojnija i najpriznatija stručna organizacija iz područja istraživanja raka u Europi, ima preko 10.000 članova iz 101 zemlje svijeta i prošle je godine obilježila 50 godina postojanja.

S ponosom ističem da smo mlado društvo koje je od tridesetak individualnih članova EACR-a naraslo na preko 200 članova. Naš rast je značajan i to s ponosom ističemo u našoj krovnoj organizaciji EACR-u.

U proteklih deset godina možemo se pohvaliti izuzetno dobrom aktivnošću – iza nas je pet konferencija s međunarodnim sudjelovanjem (HDIR-1, HDIR-2, HDIR-3, HDIR-4 i HDIR-5), jedan simpozij s vrhunskim svjetskim predavačima iz područja radio- i imunoterapije raka, nekoliko radionica vezanih za računalnu kemiju i molekularno modeliranje te brojna predavanja.

Nadalje, HDIR je sa 16 stručnih društava sudjelovao u izradi Hrvatskih smjernica za genetičko savjetovanje i testiranje na nasljedni rak dojke te je 2017. godine dobio prvo priznanje za svoj rad – zahvalnicu Hrvatske lige protiv raka.

Naš glavni interes i dalje je povezivanje različitih grupa koje se bave istraživanjem raka, kliničkim i bazičnim istraživanjima u Hrvatskoj i šire. Trudimo se svake dvije godine organizirati zanimljivu i svima nama korisnu konferenciju s vrhunskim predavačima. Smatramo da smo do sada to dobro radili i nadam se da ćete i dalje aktivno sudjelovati s prijedlozima i savjetima kako bi slijedeće konferencije bile još bolje.

Naših prvih deset godina odlučili smo obilježiti jednodnevnim simpozijem posvećenom mlađim članovima našeg Društva koji će predstaviti svoja istraživanja ili istraživanja grupa u kojima rade. Iz programa i sažetaka ovog simpozija vidljivo je da su teme vrlo raznolike i sigurna sam da ćete sa zanimanjem pratiti izlaganja. Zahvaljujem svim predavačima i svima vama na odazivu i vremenu koje ste posvetili ovom druženju.

Nadamo se da će i ovo druženje doprinijeti još boljem međusobnom upoznavanju i povezivanju različitih grupa iz područja istraživanja raka, kako bazičnih tako kliničkih i epidemioloških te dati novi polet i snagu za daljnje djelovanje HDIR-a.

Prof. dr. sc. Sonja Levanat

predsjednica HDIR-a

PROGRAM

9:15-9:30 **Otvorenje**

9:30-11:15 **1. sekcija**

1. Višnja Stepanić, IRB - Polifenolima protiv raka
2. Maja Ledinski, PMF - Tajne antitumorskog djelovanja vitamina C
3. Marija Mioč, IRB - Krunasti eteri povećavaju osjetljivost tumorskih stanica na terapiju
4. Kate Šešelja, IRB - Generiranje novog TFF3 +/- soja na C57BL6N genetičkoj podlozi
5. Iva Bazina, IRB - Učinak stresa endoplazmatskog retikuluma na Trefoil factor family 3 (Tff3) deficijentne miševe
6. Tanja Živković Semren, IMI - Rak testisa i promjene u ciklusu limunske kiseline
7. Maja Jirouš, MEF Os - Antitumorska aktivnost novოსintetiziranih kinolinskih hibrida na tumorskim stanicama *in vitro*

11:15-11:45 **pauza za kavu**

11:45-13:30 **2. sekcija**

8. Martina Radić, IRB - Otpornost na ciljanu terapiju u metastatskom melanomu
9. Juran Kralj, IRB - Profiliranje gena varijanti stanica raka jajnika različito otpornih na karboplatinu u svrhu proučavanja lijekom-potaknute epitelno-mezenhimalne tranzicije
10. Margareta Pernar, IRB - Određivanje ključne(ih) miRNA u svrhu reguliranja lijekom potaknute epitelno-mezenhimalne tranzicije
11. Ivana Samaržija, IRB - Određivanje sastava adhesoma integrina u istraživanju migracije i invazije stanica tumora i njihove osjetljivosti na kemoterapiju
12. Anja Kafka, MEF Zg - Različito ponašanje gena i proteina DVL1, DVL2 i DVL3 u astrocitnim tumorima mozga
13. Nikolina Rinčić, IRB - Uloga proteina GLI u karcinogenezi jajnika
14. Bastien Proust, IRB - Expression and subcellular localization of human NME6 protein in tumor cell lines

13:30-14:30 **ručak**

14:30-16:30 **3. sekcija**

15. Marija Pinterić, IRB - Uloga Sirtuina 3 u estrogen-posredovanoj proliferaciji MCF-7 stanica raka dojke
16. Iva I. Podgorski, IRB - Uloga Sirtuina 3 u trostruko negativnim stanicama raka dojke (MDA-MB-231) u uvjetima hiperoksije
17. Davor Nestić, IRB - Adenovirusi kao vektori za prijenos gena i vakcinaciju
18. Anamaria Đukić, IRB - Onkogeni potencijal varijanti E6 onkoproteina HPV-16
19. Blanka Tariba Lovaković, IMI - Profil elemenata u krvi, serumu i urinu muškaraca s rakom testisa
20. Miroslav Čačić, KBCSM - Karakteristike bolesnika s neuroendokrinim tumorima koji se liječe u KBC Sestre milosrdnice
21. Paola Kučan Brlić, MEF Ri - Od temeljnih istraživanja do imunoterapije tumora: translacijska istraživanja Centra za proteomiku
22. Jure Krasić, MEF Zg - EpiMark – Predstavljanje istraživačke grupe

16:30 **Zatvaranje simpozija uz tortu**

SAŽECI

P1) Polifenolima protiv raka?

Višnja Stepanić

Laboratorij za epigenomiku, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Croatia

Polifenoli su prirodni spojevi koje biljke sintetiziraju kao sekundarne metabolite u šikimatskom/fenilpropanoidnom i/ili poliketidnom biosintetskom putu. Postoji oko 8000 biljnih polifenola koji se grupiraju prema strukturnim obilježjima u flavonoide, fenolne kiseline, stilbene, lignane, tanine, kurkumoide itd. (<http://phenol-explorer.eu/>). Polifenoli su zastupljeni u ljudskoj prehrani koja uključuje voće i povrće, začine, te napitke poput zelenog i crnog čaja ili crnog vina. Mnogobrojna istraživanja su provedene na polifenolima s ciljem da se utvrdi i objasni mehanizam njihovog kemopreventivnog djelovanja te istraži njihova primjena kao adjuvantne terapije u liječenju raka. U predavanju će se predstaviti istraživanja laboratorija vezana za antioksidativno djelovanje i ADMET (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija, toksičnost) - svojstva polifenola kvercetina, EGCG-a, kurkumina [1-5].

Reference:

1. Kujundžić Novak R, Stepanić V, Milković L, Čipak Gašparović A, Tomljanović M, Gall Trošelj K. Curcumin and its potential for systemic targeting of inflamm-aging and metabolic reprogramming in cancer. *Int J Mol Sci.* 20(5) (2019) E1180.
2. Stepanić V, Matić S, Amić A, Lučić B, Milenković D, Marković Z. Effects of conjugation metabolism on radical scavenging and transport properties of quercetin – In silico study. *J. Mol. Graph. Model.* 86 (2019) 278-285.
3. Matić S, Jadrijević-Mladar Takač M, Barbarić M, Lučić B, Gall Trošelj K, Stepanić V. The influence of in vivo metabolic modifications on ADMET properties of green tea catechins-In silico analysis. *J. Pharm. Sci.* 107(11) (2018) 2957-2964.
4. Stepanić V, Čipak Gašparović A, Gall Trošelj K, Amić D, Žarković N. Selected attributes of polyphenols in targeting oxidative stress in cancer. *Curr. Top. Med. Chem.* 15(5) (2015) 496-509.
5. Stepanić V, Novak Kujundžić R, Gall Trošelj K. Epigenome, Cancer Prevention and Flavonoids and Curcumin // *Epigenetics and Epigenomics* / Christopher J. Payne (ur.). Rijeka: InTech, 2014. Str. 173-209.

P2) Tajne antitumorskog djelovanja vitamina C

Maja Ledinski, Maja Antunović, Karlo Skube, Katarina Caput Mihalić, Inga Marijanović

Zavod za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Vitaminom C se naziva nekoliko vitamera, uključujući askorbinsku kiselinu i njene soli te neke njene oksidirane forme poput dehidroaskorbinske kiseline (DHA). Askorbat i askorbinska kiselina ostaju prisutni u tijelu u ove dvije forme koje se međusobno izmjenjuju ovisno o pH, dok se oksidirane forme semiDHA i DHA mogu reducirati u tijelu NADPH-ovisnim enzimatskim mehanizmom ili putem glutaciona. Kada je vitamin C prisutan u fiziološkoj koncentraciji pokazuje antioksidativna svojstva te je njegova biološka uloga da djeluje kao reducirajući agens donirajući elektrone u različitim enzimskim i neenzimskim reakcijama. Farmakološke doze vitamina C su više i mogu se postići samo intravenskim unosom. Tada uslijed oksidacije dovodi do visoke razine H_2O_2 . Primijećeno je da tumorske stanice različito reagiraju na visoke razine vitamina C, a smatra se da je uzrok te razlike sposobnost uklanjanja H_2O_2 . Staničnu liniju HEK293, mezenhimske matične stanice, tumorsku liniju osteosarkoma U2OS, primarnu kulturu osteosarkoma te matične stanice osteosarkoma smo tretirali različitim dozama vitamina C kako bi utvrdili postoji li razlika u citotoksičnom učinku te smo odredili tip stanične smrti, razinu oksidativnog stresa i metabolički profil stanica. Utvrdili smo da su matične stanice sarkoma najosjetljivije na tretman vitaminom C te da već pri niskim koncentracijama vitamin C blokira glikolizu i uzrokuje oksidativni stres matičnih stanica osteosarkoma što ih u konačnici odvodi u apoptozu.

P3) Krunasti eteri povećavaju osjetljivost tumorskih stanica na terapiju

Marija Mioč, Marko Marjanović, Iva Guberović, Marijeta Kralj

Laboratorij za eksperimentalnu terapiju, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

Otpornost tumora na terapiju je pojava koja se često javlja u klinici i igra važnu ulogu u liječenju. Jedan od mehanizama kojim tumori stječu otpornost je pojačano ispoljavanje ABC transportera, kao što su ABCB1 (MDR1/P-glikoprotein) i ABCG2 (BCRP). Fiziološka uloga ABC transportera je izbacivanje ksenobiotika iz stanice, svojstvo koje tumori koriste za izbacivanje i zaštitu od kemoterapeutika. Stoga je jedan od pristupa u rješavanju problema otpornosti na terapiju inhibicija ABC transportera, što čini ovu skupinu proteina važnom metom u terapiji tumora. Pri tome je potrebno detaljno istražiti i shvatiti odnos strukture i aktivnosti inhibitora, kako bi inhibicija bila što bolja, a toksični učinak što manji.

U ovom smo istraživanju ispitivali potencijalni učinak skupine adamantanom supstituiranih diaza-18-kruna-6 spojeva na inhibiciju ABC transportera. Spojevi su se razlikovali prema strukturi bočnih lanaca na koje su vezane adamantanske skupine. U radu smo koristili stanične modele koji pojačano ispoljavaju proteine P-gp odnosno ABCG2. Istraživanja su dokazala da diaza-18-kruna-6 eteri djeluju inhibitorno na obje skupine transportera, te da njihova inhibitorna aktivnosti ovisi o lipofilnosti molekule, kao i o specifičnoj strukturi bočnih lanaca. Krunasti eteri koji su pokazali najjaču inhibitornu aktivnost uspješno su povećali osjetljivost tumorskih stanica na konvencionalne kemoterapeutike – paklitaksel i mitoksantron, supstrate P-glikoproteina odnosno ABCG2 transportera. Ovi rezultati pokazuju potencijal krunastih etera u terapiji tumora kroz inhibiciju ABC transportera i povećanje osjetljivosti tumorskih stanica na terapiju.

P4) Generiranje novog TFF3 -/- soja na C57BL6N genetičkoj podlozi

Kate Šešelja, Iva Bazina, Mirela Baus Lončar

Laboratorij za neurodegenerativne bolesti, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

TFF (trefoil factor family) proteini su skupina malih proteina, karakteriziranih trolisnom (trefoil) domenom. Skupinu čine TFF1, TFF2 i TFF3. Uloga TFF proteina je raznolika: povećavanje viskoznosti mukusa u gastrointestinalnom traktu, citoprotekcija, anti-apoptotički i kemotaktički učinak, uloga u imunološkom sustavu... TFF3 protein dereguliran je u tumorima, a uključen je i u patogenezu, proliferaciju, diferencijaciju, invaziju, migraciju i apoptozu u različitim tumorima npr. tumorima probavnog trakta, hepatocelularnom karcinomu, raku pluća i dojke.

Iako je proučavanje, kako tumora, tako i bilo kojeg drugog procesa, na staničnim kulturama dalo brojna važna saznanja, limitirano je nedostatkom fizioloških interakcija koje se odvijaju u *in vivo* sustavu. Stoga su životinjski modeli neizmjereno važan alat u biološkim istraživanjima.

Za istraživanje uloge TFF3 proteina do nedavno je postojao samo Tff3 -/- soj miješanog porijekla (C57BL6/J/Sv129). Problem sojeva miješanog porijekla je nemogućnost razlučivanja učinka nedostatka Tff3 proteina i fenotipskog učinka mogućih novih genetičkih kombinacija koje mogu nastati uslijed male populacije životinja. Rješenje tog problema je razvoj mišjeg soja na novoj genetičkoj podlozi stvaranjem tzv. kongeničnog soja. Novi Tff3 -/- soj, na C57BL6N Crl genetičkoj osnovi, od divljeg tipa razlikuje se samo u inaktivaciji Tff3 proteina i malom okolnom fragmentu, dok je ostatak genetičkih lokusa u genomu heterozigotan. Ovaj soj razvijen je takozvanim speed congenics pristupom, koji omogućuje razvoj soja kroz manji broj generacija nego klasičnim pristupom. Novi kongenični Tff3/C57BL6/N soj od velike je vrijednosti za brojna biomedicinska istraživanja.

Rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, projekt IP-06-2016-2717.

P5) Učinak stresa endoplazmatskog retikuluma na Trefoil factor family 3 (Tff3) deficijentne miševe

Iva Bazina, Kate Šešelja, Mirela Baus Lončar

Laboratorij za neurodegenerativne bolesti, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

Endoplazmatski retikulum (ER) je stanični organel koji doprinosi proizvodnji i smatanju staničnih proteina te je uključen u održavanje homeostaze stanice i suptilne ravnoteže između zdravlja i bolesti. Nakupljanje krivo smotanih ili nesmotanih proteina u lumenu endoplazmatskog retikuluma naziva se stresom endoplazmatskog retikuluma. Nekonrolirana aktivacija odgovora na ER stres (UPR-unfolded protein response) u pozadini je brojnih patologija, uključujući metaboličke, neurodegenerativne i upalne bolesti te rak. Brojni ljudski tumori (npr. hepatocelularni tumor, rak pluća, gušterače, dojke) karakterizirani su produljenom i nekontroliranom aktivacijom UPR odgovora, što pomaže rastu tumora i rezistenciji na terapiju.

Trefoil factor family protein 3 (Tff3) mali je sekretorni protein koji regulira regeneraciju i popravak sluznice, a njegova ekspresija deregulirana je u brojnim tumorima pa i u hepatocelularnom karcinomu. Tff3, kroz interakciju sa regulatorima apoptoze, kao što je Bat3 protein, koji sudjeluje u apoptozi induciranoj stresom endoplazmatskog retikuluma (kroz interakcije s AIFM1), potencijalno utječe i na ER stres. Da bi rasvijetlili ulogu Tff3 proteina u jetri, kao ključnom metaboličkom organu i prvom mjestu prolaza krvi iz probavila, izazvali smo akutni ER stres iniciranjem tunikamicina u mužjake novog kongeničnog mišjeg soja Tff3^{-/-}/C57Bl6/N i odgovarajuće miševe divljeg tipa Tff3^{+/+}/C57Bl6/N, te smo pratili promijene na razini aktivacije gena /proteina ER i oksidativnog stresa i imunološki relevantnih gena.

Rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, projekt IP-06-2016-2717 i Europskih Strukturnih Fondova 2014-2020 (financiranje doktoranda I. Bazina).

P6) Rak testisa i promjene u ciklusu limunske kiseline

Tanja Živković Semren¹, Blanka Tariba Lovaković¹, Toni Safner², Stela Jokić³, Krunoslav Aladić⁴, Marija Gamulin⁵, Alica Pizent¹

¹*Jedinica za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska*

²*Zavod za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

³*Zavod za procesno inženjerstvo, Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta u Osijeku, Osijek, Hrvatska*

⁴*Hrvatski veterinarski institut - Veterinarski zavod Vinkovci, Vinkovci, Hrvatska*

⁵*Klinika za onkologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb, Hrvatska*

Nastanak tumorskih stanica povezan je s brojnim biokemijskim i molekularnim promjenama u organizmu čije uočavanje ima veliki potencijal u ranoj dijagnostici i liječenju. Tumori, kao abnormalne nakupine tkiva, oduzimaju organizmu hranjive tvari, kisik, hormone i ostale životno bitne sastojke u svrhu vlastitog rasta te tako utječu na metabolizam stanice i regulaciju njene funkcije. Poznavanje i razumijevanje metaboličkih razlika između normalnih stanica i stanica raka prepoznato je kao moguća meta za ubijanje tumorskih stanica. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti kvantitativni profil slobodnih aminokiselina i elemenata u urinu ispitanika s tumorom testisa u odnosu na njihove vrijednosti u kontrolnih ispitanika.

Koncentracije slobodnih aminokiselina izmjerene su primjenom GC-MS-a nakon pripreve uzoraka korištenjem komercijalnog seta reagensa Phenomenex EZ:faast, a koncentracije elemenata izmjerene su primjenom ICP-MS-a.

U ispitanika s tumorom testisa izmjerene su značajno povišene koncentracije asparaginske kiseline, mangana i cinka, a značajno snižene koncentracije treonina, serina, histidina i kobalta u odnosu na koncentracije izmjerene u kontrolnih ispitanika. Ovi rezultati upućuju na to da razvojem tumora u testisima dolazi do poremećaja u ciklusu limunske kiseline i ciklusu uree. Naime, asparaginska kiselina ima važnu ulogu u ciklusu limunske kiseline i ciklusu uree. Dosadašnja istraživanja su pokazala da asparaginska kiselina sudjeluje u proliferaciji, iako ne svih vrsta tumora. Kobalt je neophodna komponenta kobalamina (vitamina B12) i ima vrlo važnu ulogu u formiranju aminokiselina, dok kobalaminski enzimi kataliziraju reakcije nastanka međuprodukata koji ulaze u ciklus limunske kiseline. Mangan ima ključnu ulogu u mnogim staničnim procesima, uključujući metabolizam lipida, proteina i ugljikohidrata te je sastavni dio enzima arginaze uključenih u sintezu uree i metabolizam piruvata.

Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja o ulozi međuprodukata navedenih ciklusa u tumorigenezi što može pridonijeti eventualnom otkrivanju novih bioloških biljega tumora testisa.

P7) Antitumorska aktivnost novosintetiziranih kinolinskih hibrida na tumorskim stanicama *in vitro*

Maja Jirouš¹, Bruno Rugani¹, Marijana Jukić², Luka Krstulović³, Miro Bajić³, Ljubica Glavaš-Obrovac²

¹*Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska*

²*Odjel za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska*

³*Odjel za kemiju i biokemiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

Kinolin je aromatski spoj dušika sastavljen od benzenskog i piridinskog prstena. Brojne hibridne molekule s kinolinskom strukturom pokazuju antitumorsku aktivnost uzrokujući zaustavljanje staničnog ciklusa i aktivaciju apoptoze. Biološki učinak novosintetiziranih kinolinskih hibrida ispitan je na tumorskim staničnim linijama adenokarcinoma debelog crijeva (CaCo-2), adenokarcinoma dojke (MDAMB231), T limfoma (HuT-78), akutne limfoblastične leukemije (CCRF-CEM) i kronične mijeloidne leukemije (K562), kao i na normalnoj staničnoj liniji bubrega psa Madin-Darby (MDCK I). Citotoksičnost je testirana pomoću MTT testa nakon 72 h inkubacije s novim kinolinskim hibridima u koncentracijama od 1×10^{-4} – 1×10^{-6} M. Dobiveni rezultati pokazali su nižu osjetljivost normalnih stanica na ispitivane spojeve u usporedbi sa stanicama adenokarcinoma i leukemije. Promjene u distribuciji staničnog ciklusa, povećan broj stanica u apoptotozi i autofagiji također su uočeni nakon 24 - satnog tretmana. Daljnja istraživanja novosintetiziranih kinolinskih hibrida potrebna su za bolje razumijevanje antitumorskog mehanizma djelovanja.

P8) Otpornost na ciljanu terapiju u metastatskom melanomu

Martina Radić¹, Maja Jazvinščak Jembrek¹, Maja Sabol², Maja Herak Bosnar¹, Neda Slade²

¹Laboratorij za proteinsku dinamiku, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

²Laboratorij za nasljedni rak, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

Maligni melanom jedan je od najagresivnijih tumora u ljudi te unatoč velikom napretku u liječenju, pokazuje iznimnu otpornost na lijekove. Saznanja o molekularnoj pozadini bolesti i identifikacija signalnih puteva ključnih za razvoj melanoma dovela su do otkrića novih terapija kao što su imunoterapija i ciljana terapija. Oko 60% melanoma sadrži mutacije u genu BRAF koje aktiviraju protein BRAF, te se na taj način povećava proliferacija i preživljenje stanica melanoma. Najčešća mutacija proteina BRAF (približno 90% u kliničkim patološkim uzorcima) je BRAF V600E, mutacija koja dovodi do stalnog prijenosa signala u nizvodnoj kaskadi signalnog puta MAPK. Liječenje pacijenata koji sadrže mutaciju V600E inhibitorima proteina BRAF u početku se pokazalo iznimno učinkovito, ali većina pacijenata razvija otpornost unutar par mjeseci od početka liječenja. Vemurafenib je prva ciljana terapija korištena za liječenje melanoma koji posjeduju mutaciju V600E proteina BRAF. On uzrokuje programiranu staničnu smrt u stanicama melanoma tako da prekida BRAF/MEK korak u signalnom putu MAPK.

Cilj našeg istraživanja je otkriti još nepoznate razloge otpornosti melanoma na liječenje inhibitorom proteina BRAF, vemurafenibom. Iz tog razloga uzgojili smo podlinije staničnih linija A375M i WM793B otporne na vemurafenib višemjesečnim tretmanom u mediju s vemurafenibom. Pojavu otpornosti utvrdili smo testom MTT. Promjena morfologije stanica ukazala nam je na moguću epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT). EMT smo okarakterizirali analizom ekspresije ključnih biljega. Provjerili smo utjecaj pojave otpornosti na lijek na regulaciju staničnog ciklusa. Uzgojene stanične linije i dobiveni rezultati predstavljaju zanimljivo postignuće i postavljaju put za daljnja istraživanja.

P9) Profiliranje gena varijanti stanica raka jajnika različito otpornih na karboplatinu u svrhu proučavanja lijekom-potaknute epitelno-mezenhimalne tranzicije

Juran Kralj¹, Margareta Pernar¹, Sanja Dabelić², Darija Stupin Polančec³, Thorsten Wachtmeister⁴, Karl Köhrer⁴, Anamaria Brozovic¹

¹Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

²Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

³Fidelta d.o.o., Zagreb, Hrvatska

⁴Laboratorij za genomiku i transkriptomiku, Sveučilište Heinrich Heine, Düsseldorf, Njemačka

Visoka stopa smrtnosti u slučaju raka jajnika rezultat je kasne dijagnostike, kada je bolest već napredovala te razvoja otpornosti na terapiju. U svrhu proučavanja promjena gena uključenih u otpornost, razvijeno je sedam otpornih varijanti stanica (MES-OV CBP2-CBP8), postepenim izlaganjem ljudskih stanica raka jajnika (MES-OV) rastućim koncentracijama karboplatine (CBP). Ovako dobivene stanice fenotipom su sličnije stanicama mezenhima nego roditeljskim epitelnim stanicama. Nakon provedenog profiliranja mRNA, korištenjem ClariomTM S testa (human), pokazano je da broj različito eksprimiranih gena raste razmjerno s otpornošću na CBP. Najveća razlika u ekspresiji gena u CBP otpornim, u odnosu na roditeljske MES-OV stanice, uočena je kod gena za proteine membrane stanice, pri čemu su dva transportera – SLC4A4 i SLC38A5 pokazali najveću razliku u ekspresiji. Rezultati analize signalnih puteva pokazali su da najznačajnije promijenjeni geni pripadaju signalnom putu receptora jezgre, fokalnih adhezija, putevima regulacije aktinskog citoskeleta, PI3K-Akt, VEGFA-VEGFR2 i MAPK. Također su zabilježene i analizirane razlike u obrascima ekspresije gena između stanica s nižom (CBP2-CBP4) i višom razinom otpornosti (CBP5-CBP8) na karboplatinu. Uzrok spomenutim razlikama mogle bi biti razlike u ekspresiji gena uključenih u signaliziranje putem miRNA, YAP/TAZ, signalnu mrežu selena i razlike ekspresija gena vezanih uz izvanstanični matriks. Ovim, do sada još neobjavljenim pristupom profiliranja gena u varijantama stanica karakteriziranih rastućom otpornošću na terapiju i povećanom pokretljivošću mogao bi se dobiti dodatni uvid u molekule i signalne puteve koji su uključeni u lijekom-potaknutu epitelno-mezenhimalnu tranziciju, procesu nužnom za metastaziranje stanica raka. Daljnje povezivanje i analiza ta dva procesa omogućit će pronalazak nekih novih terapijskih rješenja.

P10) Određivanje ključne(ih) miRNA u svrhu reguliranja lijekom potaknute epitelno-mezenhimalne tranzicije

Margareta Pernar¹, Juran Kralj¹, Sanja Dabelić², Darija Stupin Polančec³, Zoran Čulig⁴, Anamaria Brozović¹

¹Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

²Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

³Fidelta d.o.o., Zagreb, Hrvatska

⁴Zavod za urologiju - Eksperimentalna urologija, Medicinsko sveučilište Innsbruck, Innsbruck, Austrija

Kasna pojava simptoma i nedostatak učinkovitih dijagnostičkih metoda učinili su rak jajnika najsmrtonosnijim od svih ginekoloških karcinoma. Poodmakli stadij bolesti i razvoj otpornosti na terapiju glavni su razlog neuspješnosti terapije, koja najčešće uključuje lijekove s platinom i taksane. Otpornost tumora na terapiju sve se češće povezuje s epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (EMT), procesom uključenim u metastaziranje tumora. MikroRNA (miRNA) su male ne-kodirajuće RNA koje reguliraju ekspresiju gena na post-transkripcijskoj razini. E-kadherin i drugi regulatori EMT glavni su ciljevi miRNA. Osim članova obitelji miRNA-200, ulogu u EMT imaju i druge miRNA, kao što su miR-10, miR-155, miR-7, miR-221/222. U našem laboratoriju upotrebljavaju se tri linije stanica raka jajnika otporne na karboplatinu (OVCAR-3 CBP, MES-OV CBP, SK-OV-3 CBP), s fenotipom sličnom onome stanica mezenhimalnog podrijetla. OVCAR-3 CBP i MES-OV CBP su križno otporne na paklitaksel i pokazuju smanjenu ekspresiju članova obitelji miRNA-200. S ciljem određivanja potencijalnih miRNA od važnosti, uključenih u procese otpornosti na CBP i EMT, odabrana je roditeljska MES-OV i otporna MES-OV CBP linija stanica. Profiliranje miRNA rezultiralo je identifikacijom 379 miRNA različito eksprimiranih u MES-OV CBP stanicama u odnosu na MES-OV liniju stanica. Analizom dobivenih podataka te proučavanjem literature, kao potencijalno najznačajnije izdvojeno je devet miRNA kandidata, šest s povećanom te tri sa smanjenom ekspresijom. Njihova ekspresija u sva tri para staničnih linija provjerena je korištenjem metode RT-qPCR. Od izdvojenih, miR-1269a i miR-665 pokazale su jednak uzorak povećane ekspresije u sve tri linije stanica te je postavljena hipoteza da bi upravo one mogle imati ulogu u oba procesa od interesa. Njihova moguća uključenost u karboplatinom potaknutoj EMT bit će ispitana transfekcijom roditeljskih OVCAR-3 stanica s mimic-RNA sekvencama.

P11) Određivanje sastava adhesoma integrina u istraživanju migracije i invazije stanica tumora i njihove osjetljivosti na kemoterapiju

Mladen Paradžik¹, Ana Dekanić¹, Jonathan D. Humphries², Nikolina Stojanović¹, Ivana Samaržija¹, Dragomira Majhen¹, Davor Nestić¹, Igor Weber³, Martin J. Humphries², Andreja Ambriović Ristov¹

¹Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

²Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Biology, Medicine & Health, University of Manchester, Manchester, United Kingdom

³Laboratorij za biofiziku stanice, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

Integrini su adhezijski transmembranski receptori koji imaju ulogu u vezanju na proteine izvanstaničnog matriksa (ECM) i druge stanice. Sastoje se od nekovalentno povezanih α i β podjedinica čijom kombinacijom može nastati 24 različita heterodimera. Nakon vezanja integrina za ligand, na citoplazmatskom kraju heterodimera stvara se kompleks adhezije integrina (engl. integrin adhesion complex, IAC), koji se sastoji od nekoliko stotina proteina i povezuje ECM sa citoskeletom te potiče niz signalnih puteva kojima se reguliraju mnogobrojni stanični procesi kao što su proliferacija, preživljenje, diferencijacija i migracija. Postoji više vrsta različitih IAC-a koji variraju po sastavu, veličini, stabilnosti i ulozu te obuhvaćaju nascentne, fokalne i fibrilarne adhezije, podosome i invadopodije te hemidesmosome. Nedavno je otkrivena nova vrsta IAC-a posredovana integrinom $\alpha V\beta 5$, tzv. retikularne adhezije, koje imaju ulogu prijanjanja stanice uz podlogu tijekom stanične diobe. Svi proteini koji se nalaze unutar IAC-a nazivaju se adhesom integrina. Istraživanje adhesoma integrina je u zadnjih desetak godina potaknuto brzim razvojem biokemijskih metoda za njegovo izdvajanje kao i masene spektrometrije.

Integrini su povećano eksprimirani u mnogim vrstama tumora te u pravilu osiguravaju otpornost stanica tumora na kemoterapiju, radioterapiju, ali i na ciljanu terapiju. Osim toga, integrini imaju ulogu u procesu metastaziranja te se stoga smatraju potencijalnim metama za terapiju tumora. Do nedavno su naša istraživanja bila usmjerena na mehanizme promjene osjetljivosti stanica tumora na kemoterapiju nakon prekomjerne ekspresije integrina ili nakon njihovog utišavanja. Tako smo otkrili mehanizam kojim stanice tumora glave i vrata nakon de novo ekspresije integrina $\alpha V\beta 3$ postaju otporne na više različitih kemoterapeutika te imaju povećanu sposobnost migracije i invazije. U stanicama trostruko negativnog tumora dojke i melanoma pokazali smo da utišavanje integrina αV , točnije smanjena ekspresija integrina $\alpha V\beta 5$, povećava osjetljivost stanica na otrove mikrotubula, paklitaksel i vinkristin, te smanjuje migraciju i invaziju. U zadnjih par godina usmjerili smo naša istraživanja na adhesom. Zanima nas kojim se integrinima stanice u kulturi vežu na podlogu kao i sastav adhesoma integrina. Dosad smo analizirali adhesome dviju staničnih linija melanoma, jedne stanične linije trostruko negativnog tumora dojke te jedne stanične linije tumora glave i vrata te od njih dobivene klonove u kojima je ekspresija integrina $\alpha V\beta 3$ i/ili $\alpha V\beta 5$ promijenjena. Ovi eksperimenti imaju za cilj odrediti sastav adhesoma integrina αV , posebice $\alpha V\beta 3$ i $\alpha V\beta 5$, koji će pridonijeti boljem razumijevanju signalnih puteva nizvodno od integrina i moguće identificirati nove potencijalne mete za terapiju tumora. U ovom predavanju prikazat će se ukratko metodologija istraživanja adhesoma integrina s primjerima vlastitih rezultata.

P12) Različito ponašanje gena i proteina DVL1, DVL2 i DVL3 u astrocitnim tumorima mozga

Anja Kafka^{1,2}, Nives Pećina-Šlaus^{1,2}

¹Laboratorij za neuroonkologiju, Hrvatski institut za istraživanje mozga, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

²Zavod za biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Astrocitomi su najčešći primarni tumori središnjeg živčanog sustava. Prema klasifikaciji WHO u astrocitnim tumorima postoje 4 gradusa/stupnja malignosti, ovisno o njihovoj histologiji, molekularnim karakteristikama i prognozi, gdje je gradus IV (glioblastom) najsmrtonosniji i još uvijek bez učinkovite terapije. Cilj istraživanja bio je ispitati promjene gena i proteina obitelji Dishevelled i čimbenika transkripcije TCF1 i LEF1, molekularnih komponenti signalnog puta Wnt, u astrocitnim tumorima mozga i usporediti rezultate s kliničkim parametrima. Četiri odabrana mikrosatelitna biljega za gene DVL1 (D1S468 i D1S243), DVL2 (D17S960) i DVL3 (D3S1262) pokazala su određen broj uzoraka s MSI i LOH, genskim promjenama koje doprinose stanju nestabilnosti genoma tumorskih stanica. Najveći postotak MSI (53.8%) imali su difuzni astrocitomi analizirani biljegom D1S468 ($p=0.008$), dok je LOH bio najzastupljeniji kod glioblastoma (31.2%) ispitanih biljegom D3S1262 ($p=0.007$). Rezultati dobiveni na ukupnom uzorku upućuju da je pojavnost mikrosatelitne nestabilnosti konstantno prisutna kroz graduse s tim da je nešto češća u nižim gradusima te može biti uzrok nastanka astrocitoma, dok su velike delecije značajnije pridružene najvišem gradusu i imaju ulogu u progresiji. Razina izraženosti proteina DVL1, DVL2 i DVL3 nije pokazala statistički značajnu korelaciju s genskim promjenama, no opažene su statistički značajne razlike u broju stanica s određenom izraženošću pojedinog proteina između gradusa. Međusobnom bivarijantnom korelacijom svih analiziranih proteina dobivena je statistički značajna pozitivna korelacija između proteina DVL3 i TCF1 ($p=0.020$), DVL3 i LEF1 ($p=0.006$), TCF1 i LEF1 ($p=0.021$), dok su DVL1 i DVL3 bili negativno korelirani ($p=0.002$). DVL1 je bio negativno koreliran ($p<0.001$) s gradusom astrocitoma za razliku od DVL3 ($p<0.001$), TCF1 ($p=0.008$) i LEF1 ($p<0.001$) koji su pokazali pozitivnu korelaciju sa stupnjem malignosti sugerirajući uključenost ovih proteina u malignu progresiju. Dobiveni rezultati doprinose boljem razumijevanju molekularnog profila astrocitnih tumora mozga te bi mogli poslužiti kao molekularni biljezi progresije.

P13) Uloga proteina GLI u karcinogenezi jajnika

Nikolina Rinčić¹, Maja Sabol¹, Diana Trnski¹, Vesna Musani¹, Petar Ozretić¹, Maja Gregorić², Sonja Levanat¹

¹Laboratorij za nasljedni rak, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

²Zdravstveno učilište Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Karcinom jajnika predstavlja najletalniji ginekološki karcinom. Naziva se još "tihi ubojica" jer više od 80% oboljelih nema simptome u trenutku kada je bolest uznapredovala. Simptomi su veoma nespecifični, te iako postotak izlječenja u ranom stadiju bolesti iznosi 90%, samo 20% bolesnika biva dijagnosticirano na vrijeme. Signalni put Hedgehog-Gli (HH-GLI) je jedan od ključnih regulatora pravilnog embrionalnog razvoja. Unatoč slabijoj aktivnosti u odraslom organizmu, pravilno funkcioniranje HH-GLI nužno je za održavanje matičnih i progenitorskih stanica, te regeneraciju tkiva. HH-GLI je uključen u karcinogenezu jajnika kroz nekoliko mehanizama koji u konačnici dovode do aktivacije proteina GLI. Do nedavno se primarno odgovornim za razvoj karcinoma jajnika smatrao protein GLI1, no GLI2 i GLI3 također igraju ulogu u tom procesu modulirajući njegovu aktivnost te transkripciju zajedničkih ciljnih gena.

U svrhu određivanja funkcije pojedinog proteina GLI u karcinogenezi jajnika, konstruirane su stanične linije karcinoma jajnika SKOV3 kojima su pomoću sustava CRISPR/Cas9 uklonjeni geni GLI1, GLI2 ili GLI3. Istražen je utjecaj inhibitora proteina GLI, GANT-61 na staničnu proliferaciju, apoptozu, stanični ciklus, migraciju te sposobnost formiranja kolonija. Različiti odgovori staničnih linija međusobno te u odnosu na stanice divljeg tipa dokazuju da su sva tri proteina GLI uključena u razvoj karcinoma jajnika. Također je ispitana uloga pojedinih proteina GLI u regulaciji ekspresije gena BIRC5, koji kodira nekoliko izoformi proteina survivina. Survivin je inhibitor apoptoze koji predstavlja direktnu transkripcijsku metu HH-GLI. Ekspresija survivina u tumorima povezuje se s agresivnošću tumora, rezistencijom na terapiju te lošijom stopom preživljenja. Do sada je opisano pet izoformi ovog proteina (divlji tip, 2 α , 2B, 3B i Δ Ex3). Smatra se da ekspresija različitih izoformi survivina oblikuje patološke karakteristike nekih tumora.

Koristeći konstruirane stanične linije SKOV3, ispitana je uloga proteina GLI na regulaciju ekspresije izoformi survivina. Kod KO staničnih linija GLI1 i GLI2 dokazana je smanjena ekspresija izoformi survivina, dok GLI3 KO nema utjecaj na ekspresiju izoformi. GLI1 KO regulira ekspresiju svih izoformi, a GLI2 ima utjecaj isključivo na izoforme 3B i Δ Ex3. Tretman KO staničnih linija inhibitorom GANT-61 ima efekt na izoformu divljeg tipa, 2 α i 2B iz čega se može zaključiti da su ove izoforme kontrolirane od strane GLI1 i GLI2. Usporedbom bazalne ekspresije izoformi survivina u staničnim linijama i tkivu karcinoma jajnika, potvrđeno je da stanična linija SKOV3 predstavlja vjerodostojan model za proučavanje izoformi survivina u karcinomu jajnika.

P14) Expression and subcellular localization of human NME6 protein in tumor cell lines

Bastien Proust¹, Martina Radić¹, Nikolina Škrobot Vidaček¹, Lucija Ačkar¹, Helena Četković², Maja Herak Bosnar¹

¹Laboratory for Protein Dynamics, Division of Molecular Medicine, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia

²Laboratory for Molecular Genetics, Division of Molecular Biology, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia

Nucleoside diphosphate kinase (NDPK/NME/Nm23) family is composed of enzymes catalyzing the transfer of gamma phosphate from nucleoside triphosphates to nucleoside diphosphates. The family has sparked considerable interest from the early nineties after the discovery of tumor metastasis regulation activity of NME1. The Group I members (NME1-NME4) are highly conserved in their amino acid sequence, highly homologous among themselves and exhibit NDPK activity, while Group II (NME5-NME9) members display less homology and seem to lack NDPK activity, with a possible exception of NME6. Although little is known about Group II members, those evolutionary very old genes are presumed to participate in one or more basic cellular process. Therefore, we focused our studies on revealing the subcellular localization, quaternary structure and function of the human Group II NME6 protein. The expression of NME6 was screened in several human tumor cell lines by Western blot, using specific anti-NME6 antibodies. Subcellular localization has been addressed using immunofluorescence coupled with confocal microscopy and confirmed by cell fractionation followed by Western blot analysis. Conventional cloning technics were used to obtain “knock-in” stable clones overexpressing NME6. CRISPR/Cas9 genome editing system was used for generating NME6 “knock-out” clones.

All human tumor cell lines studied express significant amounts of NME6 protein. Immunofluorescence revealed the colocalization of NME6 predominantly with mitochondria. The cell fractionation confirmed the presence of NME6 in the mitochondrial fraction although human NME6 protein does not possess the mitochondrial targeting sequence. Complete NME6 “knock-out” clones could not be obtained, while partial NME6 “knock-outs” did not show decrease in NME6 expression, indicating that NME6 could plays a significant role in cell survival. Further studies will be conducted to detect the NME6 potential NDPK activity, interacting partners, its function in cellular processes and potential role in cancer.

P15) Uloga Sirtuina 3 u estrogen-posredovanoj proliferaciji MCF-7 stanica raka dojke

Marija Pinterić¹, Iva I. Podgorski¹, Sandra Sobočanec¹, Marijana Popović Hadžija¹, Ana Dekanić², Vedrana Filić³, Ivan Ciganek¹, Denis Pleše¹, Dora Marčinko¹, Andreja Ambriović Ristov², Tihomir Balog¹

¹Laboratorij za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

²Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

³Laboratorij za biofiziku stanice, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

Tumor dojke najčešći je tumor među ženama i 70% svih tumora dojke su estrogen receptor (ER) pozitivni. MCF-7 stanice raka dojke osjetljive na estrogen (E2) karakterizira slaba genska te izostanak proteinske ekspresije sirtuina 3 (Sirt3), NAD+ ovisne deacetilaze smještene u mitohondrijima. Sirt3 kontrolira acetilacijski status proteina i tako regulira obranu stanice od stresa, produkciju reaktivnih kisikovih vrsta, metabolizam, ATP sintezu, stanični ciklus, apoptozu i proliferaciju zbog čega se naglašava njegova važna uloga u karcinogenezi. Nedavno smo pokazali da de novo eksprimirani Sirt3 u ER- α pozitivnim MCF-7 stanicama raka dojke uzrokuje veću ekspresiju ER- α , ali smanjuje tumorska svojstva. Stoga predlažemo da Sirt3/ER- α okosnica uzrokuje smanjenje tumorskih svojstava MCF-7 stanica. Kako bi istražili tu povezanost koristimo kombinaciju tretmana (E2 i njegovog antagonista (ICI)), nadekspresiju i utišavanje Sirt3 proteina. Dobiveni rezultati pokazuju da Sirt3 smanjuje sposobnost MCF-7 stanica raka dojke da formiraju kolonije te djeluje antagonistički na E2-induciranu proliferaciju. Nadalje, Sirt3 povećava metaboličku aktivnost i količinu mitohondrijskih kompleksa uključenih u oksidativnu fosforilaciju, za tumorske stanice energetski nepovoljniji metabolički put. Kod utišanog Sirt3 proteina opazili smo smanjenje ekspresije ER- α proteina u Sirt3 klonovima. Osim navedenoga, istražujemo i utjecaj tretmana na stanični ciklus, mitohondrijski i redoks status stanice, a pomoću konfokalne mikroskopije pratimo lokalizaciju ciljanih proteina te istražujemo potencijalne interakcijske partnere ER- α i Sirt3. Ovo istraživanje bi doprinijelo razumijevanju mehanizma djelovanja Sirt3 proteina u hormon-ovisnim stanicama raka dojke, kao potencijalne farmakološke molekule od interesa.

P16) Uloga Sirtuina 3 u trostruko negativnim stanicama raka dojke (MDA-MB-231) u uvjetima hiperoksije

Iva I. Podgorski¹, Marija Pinterić¹, Sandra Sobočanec¹, Marijana Popović Hadžija¹, Vedrana Filić², Dora Marčinko¹, Ivan Ciganek¹, Denis Pleše¹, Tihomir Balog¹

¹Laboratorij za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

²Laboratorij za biofiziku stanice, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

Sirtuin 3 (Sirt3) je glavna mitohondrijska NAD⁺-ovisna deacetilaza bitna u održavanju energetske homeostaze, s dualnom ulogom u različitim tipovima raka pa ovisno o specifičnom staničnom kontekstu može imati ili onkogeno ili tumor-supresorska svojstva. Pošto je Sirt3 jedan od ključnih regulatora metaboličkih procesa, ključnu ulogu ima i u obrani stanice od oksidativnog stresa deacetilirajući enzime antioksidativnog sustava. Oksidativni stres nastaje kao posljedica visoke razine reaktivnih kisikovih vrsta (RKV) koje izazivaju oštećenja DNA i genomsku nestabilnost. Tretman hiperoksijom (95% O₂), koja potiče stvaranje RKV-a, u većini slučajeva pokazuje tumor-supresorsko djelovanje na stanice raka. Tumor dojke najčešći je tumor među ženama te ujedno vodeći uzrok smrti uzrokovane tumorom. Trostruko negativne stanice raka dojke (TNBC) su zbog nedostatka hormonskih receptora, kao i receptora epidermalnog faktora rasta puno agresivnije i otpornije na liječenje endokrinom terapijom. Iz tog razloga istražujemo utjecaj hiperoksije i Sirt3 na TNBC staničnu liniju MDA-MB-231. S obzirom na reduciranu ekspresiju Sirt3 u mnogim staničnim linijama tumora dojke, naša hipoteza je da će njegova nadekspresija imati tumor-supresivno djelovanje, a posebice u kombinaciji s hiperoksičnim tretmanom. Zbog toga ispitujemo utjecaj Sirt3 i hiperoksije na rast, poliferaciju, preživljenje, metaboličku aktivnost i mitohondrijsku funkciju MDA-MB-231 stanica raka dojke. Također pratimo lokalizaciju i jačinu signala proteina od interesa, te pokušavamo pronaći potencijalne interagirajuće partnere Sirtuina 3. Rezultati ovog istraživanja će dati uvid u zajednički utjecaj Sirt3 i hiperoksije na TNBC stanice te dati smjernice za daljnja istraživanja potencijalnih terapijskih meta u liječenju trostruko negativnih tumora dojke.

P17) Adenovirusi kao vektori za prijenos gena i vakcinaciju

Davor Nestić¹, Ksenija Božinović¹, Andreja Ambriović Ristov¹, Karim Benihoud², Jerome Custers³, Dragomira Majhen¹

¹Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

²Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203 CNRS, Univ. Paris-Sud, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, Francuska

³Viral Vaccine Discovery and Early Development, Janssen Vaccines and Prevention BV, Leiden, Nizozemska

Svojestvo virusa da efikasno dopremaju genetički materijal u stanice iskorišteno je u razvoju viralnih vektora koji mogu poboljšati zdravlje ljudi. Do danas, mnogi su virusi konstruirani kao viralni vektori, a vodeći izbor su adenovirusi zbog relativno jednostavne manipulacije genoma, širokog raspona stanica čovjeka koje mogu biti inficirane adenovirusnim vektorom (AdV), kao i poticanja povoljnog odgovora urođene imunosti putem T- i B-limfocita. Osim toga, AdV se zbog duge tradicije upotrebe, opsežnog literaturno opisanog znanja i velikog broja kliničkih studija smatraju izrazito sigurnim vektorima posebno zbog činjenice da se AdV genom ne ugrađuje u genom stanice domaćina, već ostaje episomalno, zbog čega nema bojazni od insercijske mutageneze. Kao vektori, adenovirusi se trenutno istražuju i koriste u genskoj terapiji i razvoju vakcina.

Razlikujemo više od 60 serotipova adenovirusa koji u ljudi uzrokuju blage infekcije (gastrointestinalne, respiratorne, okularne), a samo u imunokompromitiranim ljudima mogu uzrokovati komplikacije. Adenovirusi su građeni od proteinske kapside ikozaedralne geometrije unutar koje se nalazi dvolančana DNA vezana s proteinima srži. Glavni proteini kapside zaslužni za vezanje AdV, ali i prepoznavanje od strane imunskog sustava čovjeka su protein vlakno, baza pentona i hekson. Put infekcije adenovirusom počinje vezanjem na primarni receptor nakon čega slijedi interakcija s α v integrinima na površini stanice što omogućuje endocitozu viralne čestice. Nakon što se oslobodi iz endosoma, adenovirus putuje po mikrotubulima do jezgrine pore gdje oslobađa DNA u jezgru stanice.

Najbolje opisani serotip AdV je serotip 5 (AdV5) koji je ujedno i najčešće korišteni AdV u kliničkim ispitivanjima. Visoka koncentracija neutralizirajućih protutijela prisutna u populaciji ljudi ograničava upotrebu AdV5 kao vektora, zbog čega se intenzivno istražuju serotipovi AdV niske seroprevalencije. Naša grupa bavi se istraživanjem adenovirusa tipa 26 (AdV26) koji ima nisku hepatotoksičnost i seroprevalenciju što ga čini obećavajućim vektorom za razvoj vakcina. Iako su sigurnost i imunogenost AdV26 *in vivo* intenzivno istraženi, bazična biologija ovog virusa je slabo opisana. Nedavno smo pokazali da je za uspješnu transdukciju epitelnih stanica s AdV26 potreban α v β 3 integrin, a trenutna istraživanja usmjerena su na istraživanje ulaska i unutarstaničnog putovanja AdV26, kao i poticanje urođenog imunskog odgovora tijekom infekcije. Vektor na bazi AdV26 trenutno se ispituje u trećoj fazi kliničkih istraživanja kao vektorska vakcina za Ebolu.

Osim kao vektori za vakcinaciju AdV se koriste i kao vektori u genskoj terapiji tumora. Jedan od pristupa uključuje ciljani unos terapeutskog vektora u stanice u angiogenezi koje su nužne za dopremu nutrijenata da tumora. Kako bi inficirali samo ciljne stanice, AdV se može preusmjeravati što uključuje kemijsku ili gensku modifikaciju AdV s ciljem mijenjanja tropizma. U našem prethodnom istraživanju ugradili smo u kapsidne proteine AdV5 preusmjeravajući slijed NGR čime smo povećali specifičnost vezanja vektora na ciljne stanice. Preusmjeravajući slijed NGR se veže na aminopeptidazu N koja je jako eksprimirana na endotelnim stanicama u angiogenezi, čime predstavlja moguću metu za usmjeravanje AdV5 s ugrađenim NGR peptidnim slijedom, a sve s ciljem inhibicije angiogeneze. Trenutno istražujemo endocitozu AdV5 koji sadrže NGR slijed ugrađen u proteine vlakno i hekson.

P18) Onkogeni potencijal varijanti E6 onkoproteina HPV-16

Anamaria Đukić¹, Jayashree Vijay Thatte², Miranda Thomas², Paola Massimi², Josipa Skelin¹, Lucija Lulić¹, Lawrence Banks², Vjekoslav Tomaić¹

¹Laboratorij za molekularnu virologiju i bakteriologiju, Zavod za molekularnu medicine, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

²Laboratorij za tumorsku virologiju, Međunarodni centar za genetsko inženjerstvo i biotehnologiju, Trst, Italija

Prema dosadašnjim podacima iz znanstvene literature, opisano je otprilike oko 200 različitih sojeva humanog papiloma virusa (HPV), koji inficiraju bazalne stanice pločastog epitelnog tkiva. Od toga je 15 sojeva svrstano u skupinu onkogenih ili visokorizičnih sojeva radi njihove utvrđene etiološke uloge u nastanku i razvoju karcinoma vrata maternice, anogenitalnih karcinoma te karcinoma glave i vrata. Virusni soj 16 (HPV-16) klasificiran je kao najučestaliji virusni tip povezan sa razvojem spomenutih malignosti. Visokorizični sojevi HPV-a kodiraju dva glavna onkoproteina, E6 i E7, čije je zajedničko i udruženo djelovanje odgovorno za malignu progresiju koja se odvija u epitelnom tkivu. Naime, putem ostvarenja interakcija sa brojnim staničnim proteinima, virusni onkoprotein E6 uključen je u regulaciju različitih staničnih signalnih puteva te svojim onkogenim djelovanjem doprinosi razvoju kasnijih stupnjeva malignosti povezanih sa dugotrajnom i perzistentnom infekcijom visokorizičnih sojeva HPV-a. Najznačajnija uloga koju onkoprotein E6 iz visokorizičnih sojeva HPV-a ima u poticanju maligne progresije jest interakcija sa glavnim staničnim tumorsupresorskim proteinom p53, kojeg razgrađuje uz pomoć stanične proteasomske mašinerije. onkoprotein E6 svoju ulogu u malignoj transformaciji dodatno ostvaruje putem interakcije i razgradnje staničnih proapoptotskih faktora BAK i BAX te staničnih proteina koji sadrže domene PDZ. Dodatno, valja naglasiti da je opisano mnogo različitih genetičkih varijanti E6 HPV-16 te je za određene varijante ustanovljena povećana prevalentnost u HPV-induciranim malignostima, što upućuje na postojanje značajnih razlika u samom onkogenom potencijalu između pojedinih varijanti. Navedene razlike djelom su rezultat razlika u sposobnosti interakcije sa poznatim staničnim metama E6 te posljedično izmijenjenom utjecaju u regulaciji uključenih staničnih signalnih puteva. U ovom istraživanju provedena je funkcionalna analiza triju prirodno prisutnih varijanti E6 HPV-16 za koje je prethodno utvrđena različita stopa prevalencije u karcinomima vrata maternice. Biokemijska aktivnost spomenutih varijanti onkoproteina E6 evaluirana je uz pomoć korištenja nekoliko različitih eseja *in vitro*, a istražili smo kako su promjene aminokiselinskog slijeda u varijantama E6 povezane sa kapacitetom i jačinom proteinske interakcije sa poznatim staničnim metama te posljedično sa razinom njihove proteinske ekspresije.

P19) Profil elemenata u krvi, serumu i urinu muškaraca s rakom testisa

Blanka Tariba Lovaković¹, Tanja Živković Semren¹, Toni Safner², Marija Gamulin³, Alica Pizent¹

¹*Jedinica za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska*

²*Zavod za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

³*Klinika za onkologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb, Hrvatska*

Dosadašnja epidemiološka istraživanja raka testisa pokazala su da je u uvjetima profesionalne izloženosti elementima poput As, Cd, Ni i Pb značajno povećan rizik za razvoj ove bolesti. Literaturni podaci ukazali su također na štetno djelovanje pojedinih elemenata u uvjetima niske do umjerene razine izloženosti, osobito kada je ta izloženost dugotrajna. S obzirom na to da su elementi široko rasprostranjeni u čovjekovu okolišu, čovjek im je neizbježno izložen. Stoga je važno razmatrati i utjecaj elemenata u uvjetima ekološke, relativno niske razine izloženosti, kao i utjecaj istovremene izloženosti različitim elementima.

Cilj ovog istraživanja bio je izmjeriti koncentraciju Al, As, B, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Pt, Se, Sn i Zn u punoj krvi, serumu i urinu muškaraca s germinativnim tumorima testisa koji nisu profesionalno izloženi metalima i dobivene vrijednosti usporediti s onima izmjerenima u zdravih muškaraca. Profil elemenata u krvi, serumu i urinu i učinak koji oni mogu imati na razine tumorskih biljega do sada nisu proučavani u muškaraca s rakom testisa.

Uspješnost diskriminacije ispitanika s rakom testisa u odnosu na kontrolne ispitanike temeljem profila svih mjerenih elemenata iznosila je preko 95% za sve tri biološke matrice (krv, serum i urin). Rezultati linearne diskriminantne analize (LDA) izdvojili su izmjerene koncentracije Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Na i Zn u krvi, Ca, Cu, Na i Ni u serumu, te koncentraciju Cd, Co, Fe i Mn u urinu kao najjače prediktore bolesti. Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između koncentracije α -fetoproteina (AFP) i Cu, β -humanog korionskog gonadotropina (β -HCG) i Cu te povezanost laktat dehidrogenaze (LDH) s koncentracijom Cu, Ca i K u serumu ispitanika s rakom testisa. Utvrđena je statistički značajna inverzna povezanost između koncentracije Fe u serumu s razinama AFP i LDH, kao i značajna inverzna povezanost između LDH i Se.

S obzirom na važnu ulogu ispitivanih elemenata u mehanizmima koji određuju konačan ishod štetnog djelovanja različitih agenasa na ljudsko zdravlje, poremećaj homeostaze toksičnih i esencijalnih elemenata mogao bi dovesti do povećane osjetljivosti organizma i doprinijeti razvoju raka testisa, čak i u uvjetima umjerene do niske razine izloženosti.

P20) Karakteristike bolesnika s neuroendokrinim tumorima koji se liječe u KBC Sestre milosrdnice

Miroslav Čačić, Ivan Kruljac, Milan Vrkljan

Zavod za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, KBC Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Analizirali smo karakteristike bolesnika koji boluju od neuroendokrinih tumora i koji su liječeni dugodjelujućim oktreotidom u razdoblju od 2011. do 2019. godine. U analizu je ušlo 183 bolesnika s neuroendokrinim tumorima od kojih je 86 bolesnika imalo metastatsku bolest, a u njih 48 je provedeno liječenje dugodjelujućim okterotidom. 53,66% bolesnika su činile žene, a 46,34% muškarci. Medijan dobi iznosio je 59 godina. Najvećem broju bolesnika primarno sijelo tumora je bio pankreas (41,46%). Najčešći gradus prema WHO klasifikaciji je bio 2 (48,78% bolesnika). Bolesnici su najčešće imali metastaze u 2 organska sustava (i to jetra i limfni čvorovi). U 95% bolesnika u prvoj liniji liječenja započeto liječenje dugodjelujućim oktreotidom u dozi od 30mg svakih mjesec dana. Medijan do prve progresije bolesti (u mjesecima) iznosio je: za gradus 1 – 30 mjeseci; za gradus 2 – 18 mjeseci; za gradus 3 – 10 mjeseci. Nakon prve progresije odlučili smo se za: kod trećine bolesnika za povećanje doze oktreotida; kod trećine za povećanje doze oktreotida i drugi modalitet liječenja; kod trećine drugi modalitet liječenja. Najveći broj bolesnika je kao drugi modalitet liječenja primio kemoterapiju po protokolu za temozolomid – kapecitabin (53,85%). Postotak preživjelih nakon 5 godina od postavljanja dijagnoze – 60%.

P21) Od temeljnih istraživanja do imunoterapije tumora: translacijska istraživanja Centra za proteomiku

Paola Kučan Brlić¹, Tihana Tršan¹, Lea Hiršl¹, Marija Mazor¹, Marko Šustić¹, Hrvoje Šimić¹, Pini Tsukerman², Stipan Jonjić¹

¹*Centar za Proteomiku, Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka, Hrvatska*

²*Nectin Therapeutics Ltd., Hi-Tech Campus Givat Ram, Jeruzalem, Izrael*

Razvoj učinkovitijih pristupa u liječenju karcinoma jedan je od glavnih ciljeva znanstvenih istraživanja današnjice. Pritom je imunoterapija, strategija kojom se imunološki sustav pacijenta aktivira i potiče na uništavanje tumorskih stanica, u posljednjih nekoliko godina postigla bitan napredak u liječenju malignih bolesti. U tom kontekstu, naša grupa već neko vrijeme istražuje dva pristupa: korištenje virusnih cjepiva baziranih na citomegalovirusima te korištenje monoklonskih protutijela na tzv. checkpoint inhibitore.

Naša istraživanja pokazala su da korištenje rekombinantnog MCMV virusa koji ispoljava NKG2D ligand RAE-1 γ i antigenski epitop rezultira pojačanim odgovorom CD8 T-limfocita specifičnih za vektorske epitope (Trsan et al, PNAS 2013) a vakcinacija s navedenim vektorom dovodi do odgode rasta tumora i boljeg preživljenja životinja (Trsan et al, Eur J Immunol 2017) sugerirajući snažan potencijal ovog vektora kao cjepiva protiv malignih tumora. Potaknuti obećavajućim rezultatima na mišjem modelu, istraživanja smo proširili na cjepivo bazirano na analognom sustavu humanog CMV-a na modelu PDX glioblastoma koji testiramo u tzv. humaniziranim miševima (imunodeficientni miševi sa rekonstitucijom humanim imunološkim stanicama).

Osim navedenih istraživanja, s obzirom da je jedna od temeljnih djelatnosti Centra za proteomiku proizvodnja monoklonskih protutijela, u suradnji s Izraelskim partnerima, razvijamo i testiramo protu-tumorski potencijal protutijela usmjerenih na nove mete checkpoint terapije: proteine iz obitelji Nektina i proteina nalik na nektine. Naime, sve veći broj istraživanja ukazuje na važnu ulogu članova ove obitelji proteina u imunološkom odgovoru kao i činjenicu da brojni tumori modificiraju razinu ispoljenosti članova ove obitelji, što se povezuje s njihovom pojačanom progresijom i izbjegavanjem imunološkog nadzora (Kučan Brlić et al, CMI 2018).

P22) Predstavljanje grupe EpiMark

Jure Kراسić^{1,2,3}, Nino Sinčić^{1,2,3}

¹EpiMark

²Centar izvrsnosti za regenerativnu i reproduktivnu medicinu (CERRM)

³Laboratorij za epigenetiku i molekularnu medicinu, Zavod za medicinsku biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Napredak tehnologije i znanja omogućuje novu fazu u procesu otkrivanja i validacije biomarkera. Dosadašnjim proteinskim biomarkerima je nedostajala osjetljivost i specifičnost koja je neophodna konceptu personalizirane medicine, a prognostički markeri se tek istražuju. Genetički biomarkeri su veće osjetljivost i specifičnost te omogućuju raniju detekciju brojnih stanja, ali počesto izostavljaju epigenetičke biljege koji su sve prepoznatljiviji u razumijevanju bolesti. Napredak u analitici je pratio i napredak u tehnologiji uzorkovanja, koja se odmaknula od klasičnih biopsija prema konceptu tekućih biopsija. Otkrivanje biomarkera zahtjeva određenu širinu i ekspertizu, tako da se brojne institucije okreću kolaboracijama s grupama stručnjaka koji nude oboje. EpiMark je jedna od tih grupa.

EpiMark je proizašao iz Znanstvenog Centra Izvrsnosti za Regenerativnu i Reproductivnu Medicinu. Sastoji se od znanstvenika iz područja molekularne biologije, biokemije, genetike i epigenetike okupljenih oko Zavoda za Medicinsku Biologiju na Medicinskom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. EpiMark primjenjuje svoje znanje u suradničkim grupama kojima je to potrebno, provodi vlastita istraživanja i projekte, standardizira metode i protokole koji se koriste unutar njegove mreže za veću iskoristivost i vidljivost generiranih podataka, uvodi nove metode i tehnike, razvija *in vitro* i *in vivo* modele, radi s kliničkim uzorcima te funkcionira kao posrednik različitim grupama unutar i izvan mreže omogućujući nacionalnu i međunarodnu komunikaciju i suradnju. Grupa trenutno radi na karcinomima testisa, prostate i kolorektuma, leukemiji, neplodnosti i poremećajima razvoja. Šira mreža uključuje kliničke bolnice i centre, institute, privatne klinike te međunarodne organizacije poput IACR-a. Što rezultira istraživanjima razvoja raka, biomarkera i rizičnih faktora.

Uspostavljena mreža kroz suradnju omogućuje iskorištavanja informacija i ideja koje bi inače ostale zapostavljene i neiskorištene u uobičajenom radu članica mreže. To omogućuje pojedinim istraživačima iskustva mimo njihovog neposrednog zanimanja, što im daje širu perspektivu u svom predmetu istraživanja. Izvrsnost je standard znanstvenog diskursa i kvalifikacija centra koji je omogućio ideju EpiMarka, ideju da je izvrsnost mjesto suradnje.

SPONZOR:

KEMOMED

BRINGING SOLUTIONS

Kemomed d.o.o.

Remetinečka cesta 7

HR-10000 Zagreb