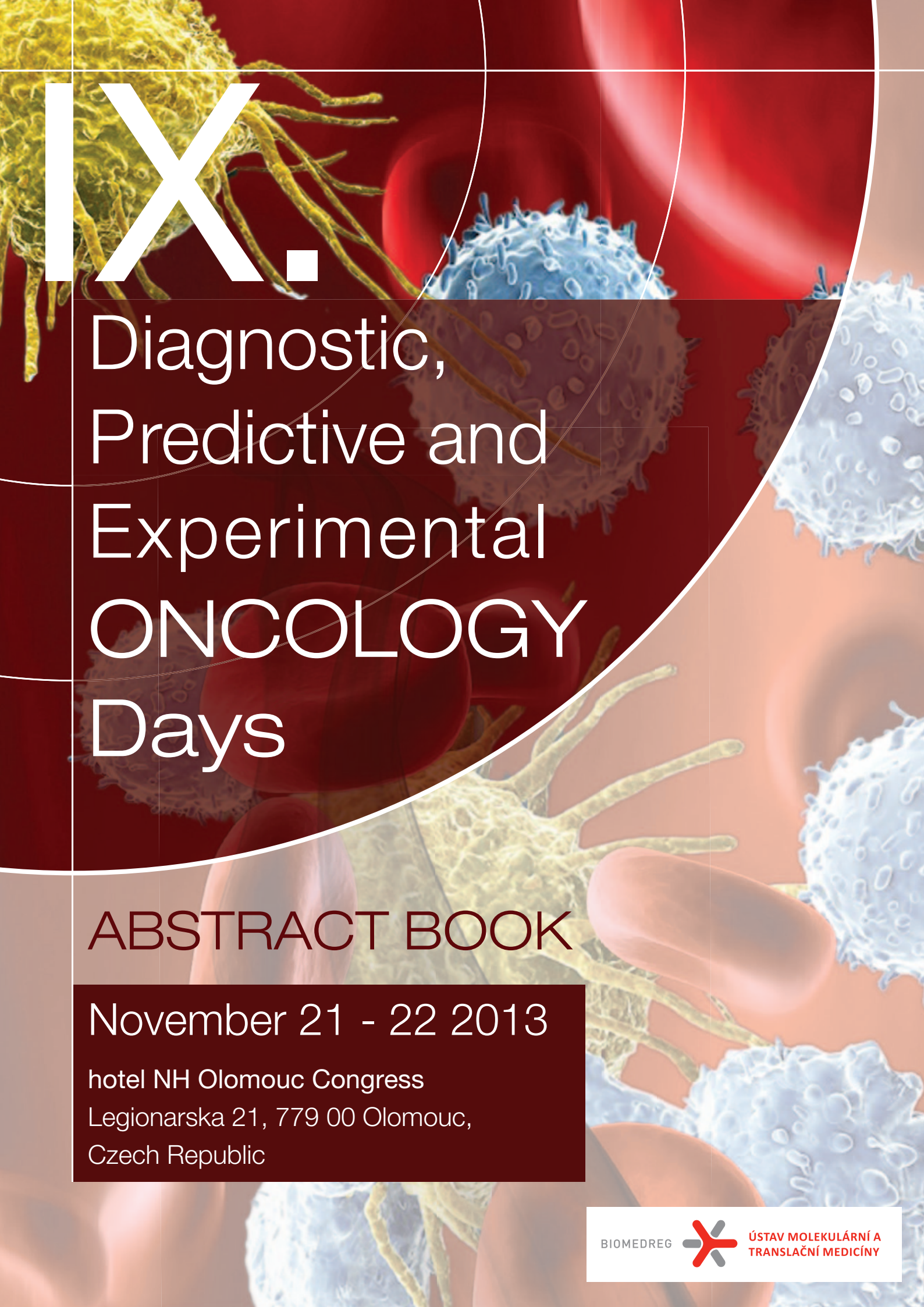




IX.

Diagnostic, Predictive and Experimental ONCOLOGY Days

ABSTRACT BOOK

November 21 - 22 2013

hotel NH Olomouc Congress

Legionarska 21, 779 00 Olomouc,
Czech Republic

BIOMEDREG



ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ A
TRANSLAČNÍ MEDICÍNY

laboratorní přístroje a služby

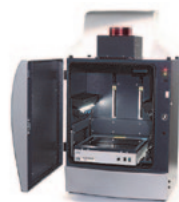
CENTRIFUGY, ULTRACENTRIFUGY

- mikrocentrifugy a malé centrifugy
- multifunkční centrifugy
- vysokootáčkové centrifugy
- velkokapacitní centrifugy
- ultracentrifugy
- zkumavky pro centrifugaci



MIKRODESTIČKOVÁ INSTRUMENTACE

- spektrofotometry, fotometry
- fluorometry, luminometry
- dávkovače, promývačky
- třepací termostaty pro mikrodestičky
- automatické pipetovací stanice
- magnetické purifikátory KingFisher®



GEL-IMAGING a ANALÝZA

- gelová dokumentace a analýza
- chemiluminiscence, fluorescence
- software pro 1D i 2D analýzu
- transiluminátory
- elektroforézy, zdroje pro elfo



MYČKY

- laboratorní myčky
- velkokapacitní myčky
- myčky pro chovné boxy
- autoklávy 25 až 160 litrů



KONCENTRÁTORY VZORKŮ

- vakuové centrifugační koncentrátory
- stolní lyofilizátory
- velkoobjemové lyofilizátory
- vakuové sušárny

PŘÍPRAVA ČISTÉ VODY

- reverzní osmóza
- deionizační systémy
- kompaktní laboratorní systémy
- poloprovozní systémy



AUTOKLÁVY

- stolní laboratorní autoklávy
- střední laboratorní autoklávy
- čidla pro validace autoklávů



REAGENCIE

- buněčná séra a média HyClone
- bioprocessing kontajnery HyClone
- reagenty a kity pro výzkum proteinů a protilátky Pierce



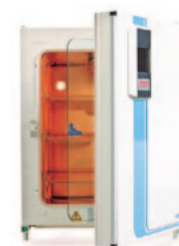
BIOHAZARDY, IZOLÁTORY LAMINÁRNÍ BOXY

- biohazard boxy
- laminární boxy
- biohazardy tř. III a izolátory
- boxy pro laboratorní zvířata
- bezodtahové digestoře
- dekontaminační systémy



INKUBÁTORY, TERMOSTATY

- CO₂, CO₂/O₂ inkubátory
- termostaty do 80°C, 300°C
- třepací termostaty
- chlazené termostaty
- anaerobní boxy
- mikroaerofilní boxy
- horkovzdušné sterilizátory
- klimatické a růstové boxy
- systémy pro monitoring teploty



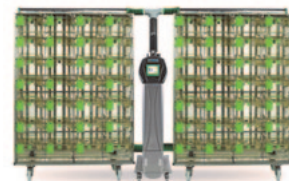
MRAZICÍ A CHLADICÍ BOXY, KRYO BOXY

- mrazicí boxy do -86°C a -150°C
- řízené zamrazování LN₂ -180°C
- skladovací boxy LN₂ -180°C
- mrazicí boxy -5°C až -40°C
- chladič boxy 0°C až +15°C
- transportní boxy
- výrobnyky ledu
- šokové zmrazovače



CHOV LABORATORNÍCH ZVÍŘAT

- IVC individuálně ventilované boxy
- chovné nádoby, příslušenství
- ochranné a přestýlací boxy
- komplexní projekty



PIPETY a PLASTIK

- pipety Finn timer a Matrix
- kompletní sortiment špiček
- spotřební plastik Nalgene, Nunc
- stripy a destičky
- steppery, dávkovače
- pipetovací nástavce



SERVIS

- akreditovaná kalibrační laboratoř
- záruční a pozáruční servis
- validace přístrojů
- ekologické likvidace



IX.

Diagnostic,
Predictive and
Experimental
ONCOLOGY
Days

Pořadatel

Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc

Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc

Odborná garance

*Sekce diagnostické a prediktivní onkologie České onkologické společnosti ČLS JEP
Komplexní onkologické centrum Olomouc*

Prezident akce

doc.MUDr. Marián Hajduch, Ph.D.

Organizační výbor

*doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D., RNDr. Radek Trojanec, Ph.D., MUDr. Kateřina Bouchalová, Ph.D.,
MUDr. Petr Džubák, Ph.D., MUDr. Josef Srovnal, Ph.D., RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.*

Organizátor

Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

Hněvotínská 5, 779 00, Olomouc

Kontaktní osoba: Mgr. Peter Vanek

mob.: +420 775 050 355, email: peter.vanek@upol.cz

IX. DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE /

IX. DIAGNOSTIC, PREDICTIVE AND EXPERIMENTAL ONCOLOGY DAYS

ČTVRTEK / THURSDAY - 21. listopadu, 2013 / November 21, 2013

8:00 REGISTRACE / REGISTRATION

9:30 ZAHÁJENÍ KONFERENCE / CONFERENCE OPENING

Biostatistika, prognostické a prediktivní biomarkery / Biostatistics, prognostic and predictive biomarkers

Předsedající / Chairs: Kateřina Bouchalová, Ondřej Slabý

9:45 Statistics in biomedicine in the 21st century: The challenges of collaboration.

Donna Neuberg

10:45 Breaking Bad: Inappropriate mathematics and wrong incentives are ruining science.

Tomáš Furst

11:00 Nové trendy ve výzkumu mikroRNA u solidních nádorů.

Ondřej Slabý

11:15 Vliv použité analgesie na hladinu cirkulujících nádorových buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem.

Josef Srovnal

11:30 Analýza přežití vzhledem k přítomnosti cirkulujících nádorových buněk u pacientů s karcinomem plic.

Andrea Prokopová

11:45 Mutační analýza genu NOTCH1 u pacientů s chronickou lymfocytární leukemií.

Barbara Kantorova

12:00 Correlation between BRCA1 expression and clinicopathological factors including brain metastases in patients with non-small-cell lung cancer.

Jozef Škarda

12:15 Prognostic significance of BNIP3 and LC3 autophagic protein in non-small cell lung cancer.

Ivo Überall

12:30 - 13:30 OBĚD / LUNCH

Seminář klastru MedChemBio - Nová protinádorová léčiva / Seminar of MedChemBio Cluster - New anticancer agents

Předsedající / Chairs: Tomáš Eckschlager, Viktor Brabec

13:30 High throughput synthesis analysis in development of new drugs and diagnostics.

Jan Hlaváč

14:00 Triterpenoid derivatives and their biological activities.

Milan Urban

14:15 Perspectives of 2-phenyl-3-hydroxyquinolin-4(1H)-ones as anticancer agents.

Kristýna Bürglová

14:30 Photoactive trans ammine/amine diazido platinum(IV) complexes: the potential for photoactivated chemotherapy.

Viktor Brabec

14:45 Protinádorové účinky inhibitorů histondeacetylázy (HDACi).

Tomáš Eckschlager

15:00 A novel anticancer platinum drug candidates with dual DNA binding and histone deacetylase inhibitory activity.

Jana Kašpárková

15:15 - 15:45 **PŘESTÁVKA / BREAK**

Poškození a metylace DNA - část 1 / DNA damage and methylation - part 1

Předsedající / Chairs: Jiří Bártek, Marián Hajdúch

- 15:45 Targeting defects of the genome integrity machinery as a cancer vulnerability.
Jiří Bártek
- 16:30 Autoantibody based cancer diagnostics.
Andreas Weinhäusel
- 17:00 Epigenetic changes in lung diseases: towards differential diagnosis of cancer, fibrosis and COPD.
Klemens Vierlinger

17:30 - 17:45 **PŘESTÁVKA / BREAK**

Poškození a metylace DNA - část 2/ DNA damage and methylation - part 2

- 17:45 Epigenetic study of 5-azacytidine nucleosides and their derivatives.
Khushboo Agrawal
- 18:00 Methylace promotoru tumor supresorových a DNA reparačních genů u kolorektálního karcinomu.
Pavel Procházka
- 18:15 Possible roles of telomerase in resistance of cancer cells to PARP inhibitors.
Juraj Kramara
- 18:30 Cyclin-dependent kinase 12 in cancer initiation and progression.
Jiří Kohoutek
- 19:00 **SPOLEČENSKÝ VEČER / CONFERENCE DINNER**

PÁTEK / FRIDAY - 22. listopadu, 2013 / November 22, 2013

Sloučeniny s protinádorovým účinkem - struktura a účinnost / Anticancer compounds - structure and activity

Předsedající / Chairs: Marián Hajdúch, Pavla Perlíková

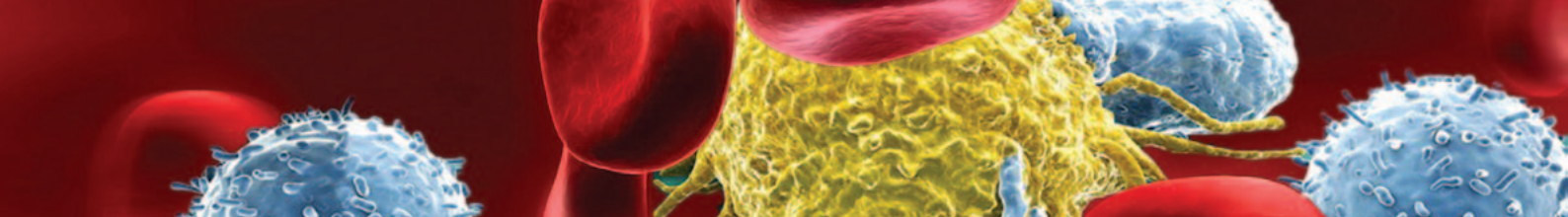
- 9:00 Biological activity and molecular target of quinolinone derivatives with anticancer effect.
Gabriela Rylová
- 9:15 A New generation of highly potent olomoucine derived CDK inhibitors.
Tomáš Gucký
- 9:30 7-Hetaryl-7-deazaadenosines: a novel class of cytostatic compounds and their mechanism of action.
Pavla Perlíková
- 9:45 Nucleosides – compounds with combined therapeutical activities.
Petr Konečný
- 10:00 Deriváty pyrimidinu jako potenciální inhibitory RAGE signalizace.
Ivo Frydrych
- 10:15 Sustained DNA damage response in proteasome inhibitor treated cancer cell lines.
Katarína Chromá

10:30 - 10:45 **PŘESTÁVKA / BREAK**

Prognostické a prediktivní biomarkery, nové technologie / Prognostic and predictive biomarkers, new technologies

Předsedající / Chairs: Jiří Drábek, Josef Srovnal

- 10:45 Vyšetření mutací genů RAS metodou CADMA (Competitive Amplification of Differentially Melting Amplicons).
Jiří Drábek
- 11:00 Diagnostics of minor mutations in RAS oncogenes in mCRC with next-gen sequencing.
Rastislav Slavkovský
- 11:15 Detekce HPV DNA v cervikovaginálním stěru - alternativní možnosti skríníngu karcinomu děložního čípku.
Hana Ondryášová



- 11:30 Vyšetření genu EGFR a mutací genu KRAS u olomouckého souboru pacientů s kolorektálním karcinomem.
Radek Trojanec
- 11:45 Vyšetření IDH1 a IDH2 mutací u gliálních nádorů metodou CADMA PCR.
Magdaléna Megová
- 12:00 Využití proteomických metod v klinické diagnostice nádorových onemocnění.
Dušan Holub
- 12:15 A system for identification and quantification of mutations in proteomic data.
Jiří Voller
- 12:30 Serum biomarker discovery and validation: a proteomics capability development initiative.
Lakshman Varanasi

12:45 - 13:45 OBĚD / LUNCH

13:45- 14:15 Posterová sekce / Poster session

Molekulární cíle a screeningové metody / Molecular targets and screening methods

Předsedající / Chairs: Martin Mistrík, Karel Koberna

- 14:15 Analysis of cell cycle using High Content Screening (HCS) system.
Pawel Znojek
- 14:30 Activity of demethylating agents in a three-dimensional cell culture model.
Viswanath Das
- 14:45 Identifikace molekulárního cíle pomocí metabolického značení SILAC.
Jiří Řehulka
- 15:00 In vitro proteomické profilování buněčné linie CEM platinovými protinádorovými léčivy.
Tomáš Oždian
- 15:15 Proteomický profil protinádorového účinku klinicky používaných rostlinných alkaloidů.
Jana Václavková

15:30 UKONČENÍ KONFERENCE, PŘEDÁNÍ CEN / CLOSING REMARKS AND AWARDS

Postery / Posters

- 1 Ermin Schadich *A rapid identification of chemical modulators of cellular cAMP and antioxidant response element (ARE) signaling using human reporter cell lines.*
- 2 Soňa Gurská *High-Throughput Screening in Drug Discovery; Implementation of Cytotoxic Assays.*
- 3 Iva Blažková *Encapsulation of doxorubicin into the apoferitin.*
- 4 Jana Štěpánková *Intratumoral pH alteration following carborans treatment.*
- 5 Marie Jindřichová *New approaches for cancer diagnostics and prognostics based on molecular analysis of circulating tumor cells.*
- 6 Michal Masařík *Metalothionein jako imunohistochemický biomarker karcinomů hlavy a krku – výsledky meta-analýzy.*
- 7 Michal Masařík *Expresní profil genů asociovaných s apoptózou u primokultur dlaždícobunečných karcinomů hlavy a krku.*
- 8 Michal Masařík *Zinek rezistentní PC-3 linie: expresní a imunocytochemická analýza vybraných genů korespondujících s metabolismem a transportem Zn²⁺ iontů.*
- 9 Miloš Petřík *¹²⁵I-labelled phenylalkyl malonic acid derivative for monitoring of tumor acidosis.*
- 10 Monika Holubová *Charakteristika zinek-rezistentních linií ve vztahu k apoptóze.*
- 11 Romana Mikyšková *Myeloid-derived suppressor cell accumulation during tumour growth and its cyclophosphamide treatment is inhibited by DNA demethylating agent 5-azacytidine.*
- 12 Zdeněk Dostál *Influence of selected natural substances on global microRNA expression in HepG2 cell line.*
- 13 Jan Balvan *Analýza cytotoxicity a změn exprese genů regulujících apoptózu u prostatických bunečných linií v přítomnosti naftochinonů.*
- 14 Jarmila Šimová *Alterace PI3K signální dráhy u pacientek s karcinomem prsu.*
- 15 Jan Hraběta *Affecting the expression of glutamate carboxypeptidase II by methyltransferases inhibitors.*
- 16 Jana Stránská *Celogenomová amplifikace (WGA) vyvolává nepřesnosti v detekci mutací genu KRAS u karcinomu tlustého střeva.*
- 17 Anna Ligasová *A new method of the revelation of BrdU – the marker of DNA replication.*
- 18 Karel Koberna *A new method for labeling of nuclear and mitochondrial DNA.*

Biostatistika, prognostické a prediktivní biomarkery / Biostatistics, prognostic and predictive biomarkers

Předsedající / Chairs: Kateřina Bouchalová, Ondřej Slabý

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 9.45 - 12.15 hod.

Statistics in biomedicine in the 21st century: The challenges of collaboration

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 9.45 - 10.45 hod.

Donna S. Neuberg¹

¹ Dana-Farber Cancer Institute,
Biostatistics and Computational
Biology, Boston, MA, USA

The role of biostatisticians in the planning, conduct, and analysis of clinical trials is well known. What basic science and clinical investigators may be less aware of is the expertise in study design that biostatisticians can bring not only to a laboratory or animal study, or to the development of a genomic investigation. We will review the investigational framework in which a statistician works, and indicate how this can be leveraged to address the increased complexity and sophistication of 21st century studies. We will also present strategies for establishing a collaborative rather than a consultative relationship, to incorporate study design firmly into the planning process of the research team.

Breaking Bad: Inappropriate mathematics and wrong incentives are ruining science

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 10.45 - 11.00 hod.

Tomáš Fürst¹, Jan Strojil²

¹ Palacky University in Olomouc,
Mathematical analysis, Olomouc,
Czech Republic

² Palacky University in Olomouc,
Institute of Pharmacology,
Olomouc, Czech Republic

Concern is growing about the impossibility to replicate many findings in medical research. For some reasons, science is going wrong. We will argue that it is a

combination of wrong incentives and inappropriate mathematics that is responsible for that. The wrong incentives include pressure to publish too much, real or perceived pressure to publish only positive results, insufficient effort and motivation to repeat experiments, and a perverse structure of research careers and financing. Inappropriate mathematics includes failure to understand and appreciate the difference between the classical (frequentist) and the Bayesian approach to hypothesis testing. We will discuss the consequences and address the question of what can be done. We will issue a warning and present an example of a science that has already been shattered by wrong incentives and inappropriate mathematics.

Nové trendy ve výzkumu mikroRNA u solidních nádorů

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 11.00 - 11.15 hod.

Ondřej Slabý^{1,2,3}

¹ Masarykův onkologický ústav,
KKOP, Brno, ČR

² Masarykova univerzita, CEITEC,
Brno, ČR

³ Univerzita Palackého, Lékařská
fakulta, IMTM, Olomouc, ČR

Východiska: MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA dlouhé 18-25 nukleotidů, které post-transkripčně regulují genovou expresi v průběhu rozličných buněčných procesů jako jsou apoptóza nebo diferenciace, ale i maligní transformace. Změny v expresních profilech miRNA již byly pozorovány u většiny solidních nádorů. Mechanistické studie v nádorové buňce prokázaly schopnost jednotlivých miRNA vykazovat funkci nádorových supresorů a onkogenů. Nejnovější pozorování navíc popisují potenciál jedné miRNA vykazovat v závislosti

na kontextu jak funkci nádorového supresoru tak onkogenů. Tato pozorování zásadním způsobem rozšířila koncept molekulární patogeneze nádorových onemocnění a naznačila potenciál miRNA nejen jako diagnostických biomarkerů, ale také jako terapeutických cílů.

Cíle: Sdělení zahrnuje novinky z oblasti biogeneze a funkce miRNA, izomiRs, koncept kompetujících endogenních RNA (ceRNAs), význam miRNA v nádorové biologii a jejich zapojení do hlavních znaků maligního nádoru, biologie nádorové kmenové buňky či autofagie. V kontextu našich výsledků bude diskutována schopnost vybraných miRNA sloužit jako tkáňové biomarkery (prognostické a prediktivní), sérové a močové biomarkery (diagnostické) a potenciální terapeutické cíle u kolorektálního karcinomu, renálního karcinomu a glioblastomu.

Závěr: Specifické expresní profily miRNA byly u pacientů se solidními nádory úspěšně využity ke stanovení prognózy, k predikci léčebné odpovědi na vybrané terapeutické režimy nebo upřesnění diagnostiky u metastáz neznámého původu. Přítomnost miRNA byla prokázána v krevním séru a plazmě, ale také moči nebo mozkomíšním moku, kde vykazovaly nejen vysokou míru stability, ale u vybraných solidních nádorů rovněž velice dobré analytické vlastnosti. V současné době je kromě možného diagnostického využití cirkulujících miRNA intenzivně studován jejich původ a příčiny jejich extrémně vysoké stability. MiRNA jsou také velice slibnými terapeutickými cíli, přičemž první protinádorová terapie na bázi miRNA vstupuje do klinického hodnocení začátkem příštího roku.

Výzkum byl podpořen granty IGA MZ ČR NT13549-4/2012, NT13860

4/2012, NT-13547 -04/2012, NT13514-4/2012 a NT11214-4/2010.

Vliv použité analgésie na hladinu cirkulujících nádorových buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 11.15 - 11.30 hod.

Josef Srovnal¹, Andrea Prokopová¹, Emil Berta¹, Petr Prášil², Pavel Skalický³, David Vrána⁴, Lenka Radová¹, Marián Hajdúch¹

¹ LF UP, ÚMTM, Olomouc, ČR

² FNOL, Klinika

anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Olomouc, ČR

³ FNOL, I. chirurgická klinika, Olomouc, ČR

⁴ FNOL, Onkologická klinika, Olomouc, ČR

Úvod: Cílem naší studie bylo ověřit hypotézu, zda-li je množství cirkulujících nádorových buněk (CTC) ovlivněno různými metodami anestezie a analgezie u pacientů podstupujících chirurgický zákrok pro kolorektální karcinom (CRC).

Pacienti a metody: Do retrospektivní studie bylo zařazeno 180 pacientů, kteří podstoupili radikální operaci kolorektálního karcinomu. Cirkulující nádorové buňky byly monitorovány v periferní krvi a kostní dřeni v době operace a jeden měsíc po operaci pomocí qPCR detekce karcinoembryonálního antigenu (CEA) a cytokeratinu 20 (CK20). Naměřené hodnoty CTC byly porovnány s údaji o perioperační analgezii, její účinnosti (Visual Analogue Scale, VAS), době trvání operace, ASA klasifikaci, věku, pohlaví, počtu transfúzí, komorbiditách, body mass indexu (BMI) a typu indukčního anestetika.

Výsledky: Podání morfinu v pooperační analgezii bylo spojeno s kratším celkovým přežitím a vyšší hladinou CTC v krvi a kostní dřeni měsíc po operaci za využití qPCR pro CK20 ($p=0,005$). Naopak, podání piritramidu bylo spojeno s příznivým vlivem na hladinu CTC v periferní krvi

měsíc po operaci ($p=0,051$). Dále jsme pozorovali, že hladiny CTC nebyly ovlivněny dávkou sufentanilu, VAS, délkou chirurgického výkonu, BMI, věkem, pohlavím, indukčním anestetikem, ani počtem podaných krevních derivátů.

Závěr: Zjistili jsme negativní vliv morfinu a naopak pozitivní vliv piritramidu na hladinu CTC u pacientů s kolorektálním karcinomem. Předpokládáme, že typ analgezie může být nezávislým prognostickým faktorem.

Poděkování: Tato studie byla podpořena granty IGA UP LF 2013_015, CZ.1.05/2.1.00/01.0030 a CZ.1.07/2.3.00/30.0004.

Analýza přežití vzhledem k přítomnosti cirkulujících nádorových buněk u pacientů s karcinomem plic

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 11.30-11.45 hod.

Andrea Prokopová¹, Josef Srovnal¹, Jiří Klein², Josef Chudáček³, Marek Szkorupa³, Věra Růžková¹, Jana Vrbková¹, Marián Hajdúch^{1,2}

¹ Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Laboratoř experimentální medicíny, Olomouc, ČR

² LF UP a FN Olomouc, Onkologická klinika, Olomouc, ČR

³ LF UP a FN Olomouc, I. chirurgická klinika, Olomouc, ČR

Úvod: Karcinom plic je celosvětově jednou z nejčastějších příčin úmrtí na nádorová onemocnění. Mortalita je úzce spojená se vznikem vzdálených metastáz, které se objeví až během protinádorové léčby nebo po jejím ukončení, nejsou však diagnostikovatelné v čase primární diagnózy. U souboru pacientů s karcinomem plic jsme vyšetřili přítomnost cirkulujících nádorových buněk (CTCs), které mohou být prekurzory těchto metastáz, a provedli analýzu přežití.

Pacienti a metody: Do studie bylo zařazeno 137 pacientů operovaných

s kurativním záměrem pro plicní karcinom. Metodou real-time RT-PCR byly na míru exprese karcinoembryonálního antigenu (CEA), receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), lung-specific X proteinu (LUNX) a receptoru pro hepatocytární růstový faktor (c-met) vyšetřeny vzorky kostní dřene, periferní krve a krve z plicní žíly. Naměřené hodnoty exprese testovaných markerů byly korelovány s klinicko-patologickými charakteristikami a s parametry přežití.

Výsledky: 137 pacientů s karcinomem plic jsme zahrnuli do analýzy přežití bez příznaků nemoci (disease-free survival, DFS) a celkového přežití (overall survival, OS). Recidiva byla zaznamenána u 34 (24,8 %) z nich s DFS mediánem 14,6 měsíce. 32 (23,4 %) pacientů zemřelo, OS medián byl 15,2 měsíce.

Pacienti s pozitivitou CEA v periferní krvi vykazovali signifikantně kratší DFS ($p<0,083$; HR=1,84 [95% CI: 0,91-3,71]) a kratší OS ($p<0,033$; HR=2,19 [95% CI: 1,05-4,58]) než pacienti bez přítomnosti CTCs.

Ačkoliv nebyly zaznamenány žádné další statisticky významné výsledky, je třeba zdůraznit, že periferní krev je snadno dostupný kompartment (ve srovnání s kostní dření a krví z plicní žíly) a je vhodným materiálem pro vyšetření přítomnosti CTCs.

Závěr: Výsledky naší studie dokazují negativní prognostický význam přítomnosti cirkulujících nádorových buněk u pacientů s karcinomem plic. Pomocí markeru CEA vyšetřeného v periferní krvi jsme identifikovali pacienty s kratším přežitím bez známek nemoci a kratším celkovým přežitím. Detekce přítomnosti CTCs zůstává využitelným a reprodukovatelným vyšetřením přispívajícím k individualizaci terapie.

Poděkování: Práce na tomto projektu je podporována granty IGA NT14406, CZ.1.05/2.1.00/01.0030 a IGA UP LF_2013_015.

Mutační analýza genu NOTCH1 u pacientů s chronickou lymfocytární leukemií

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 11.45-12.00 hod.

Barbara Kantorová^{1,2},
Jitka Malčíková^{1,2}, Jana
Šmardová³, Martin
Trbušek^{1,2}, Yvona
Brychtová¹, Michael
Doubek^{1,2}, Jiří Mayer^{1,2},
Šárka Pospíšilová^{1,2}

¹ Interní hematologická a onkologická klinika Fakultní nemocnice Brno, Centrum molekulární biologie a genové terapie, Brno, Česká Republika

² Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova Univerzita Brno, Molekulární medicína, Brno, Česká Republika

³ Ústav patologie Fakultní nemocnice Brno, Brno, Česká Republika

Úvod: Využití přístupů další generace sekvenování (tzv. next generation sequencing; NGS) při studiu biologické podstaty kancerogeneze přispělo k určení řady prognostických a prediktivních markerů u mnoha nádorových onemocnění. Mezi nové klinicky relevantní ukazatele délky přežívání a léčebné odpovědi pacientů s chronickou lymfocytární leukemií (CLL) patří také mutační stav genu kódujícího transkripční faktor NOTCH1. Výskyt mutací v genu NOTCH1 vedoucích ke stabilizaci proteinu a následné konstitutivní aktivaci NOTCH1 signální dráhy je spojován zejména s progresí onemocnění a rezistencí pacientů na standardně podávanou chemoterapii a představuje u CLL další slibný terapeutický cíl.

Cíl: Stanovení frekvence hotspot mutace v genu NOTCH1 u souboru pacientů s CLL sledovaných na Interní hematologické a onkologické klinice Fakultní nemocnice Brno a korelace s dalšími molekulárně-biologickými markery onemocnění.

Metodika: Přítomnost hotspot mutace (c.7544_7545delCT) v genu NOTCH1 byla vyšetřena na souboru

472 pacientů s CLL pomocí přímého sekvenování a u vybraných vzorků také alelově specifickou PCR; u 127 pacientů byla provedena opakovaná analýza na různých vzorcích získaných v průběhu onemocnění. Závislost mezi výskytem NOTCH1 mutace a mutačním stavem genů IgHV, přítomností cytogenetických aberací (13q14-, 12+, 11q22-, 17p13-) a TP53 mutací byla stanovena na základě Fišerova exaktního testu.

Výsledky: Mutace c.7544_7545delCT genu NOTCH1 byla detekována u 68 (14 %) analyzovaných pacientů. U NOTCH1-mutovaných pacientů byl pozorován značně vyšší výskyt nemutovaného stavu genů IgHV a trisomie chromosomu 12 při srovnání s pacienty bez průkazu NOTCH1 mutace (20 % vs. 3 %; $P < 0,0001$; 30 % vs. 12 %; $P = 0,0018$). V případě dalších vyšetřovaných markerů (13q14-, 11q22-, 17p13- a TP53 mutací) nebyl mezi pacienty z hlediska přítomnosti/absence c.7544_7545delCT genu NOTCH1 prokázán statisticky signifikantní rozdíl.

Závěr: Přítomnost hotspot mutace v genu NOTCH1 byla detekována u 14 % pacientů s CLL a v souladu s recentně publikovanými daty silně korelovala s nemutovaným stavem genů IgHV a výskytem trisomie chromosomu 12.

Studie byla podpořena granty IGA-MZ-CR NT13519-4/2012, MUNI/A/0723/2012, MH CZ - DRO (FNBr, 65269705), výzkumným záměrem MSMT-CR-MSM0021622430 a projektem OP VK SuPReMMe CZ.1.07/2.3.00/20.0045.

Correlation between BRCA1 expression and clinicopathological factors including brain metastases in patients with non-small-cell lung cancer.

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 12.00-12.15 hod.

Josef Škarda¹, Mariam Gachechiladze², Vitezslav

Kolek³, Jiri Klein⁴, Eddie Fridman⁵

¹ Medical faculty Palacky University, Laboratory of Molecular Pathology, Department of Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, Czech republic

² Medical faculty Palacky University, Laboratory of Molecular Pathology, Department of Pathology, Olomouc, Czech Republic

³ Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Department of Tuberculosis and Respiratory Diseases, Olomouc, Czech republic

⁴ Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Department of Surgery I, Olomouc, Czech republic

⁵ Sheba Health Medical Center, Department of Pathology, Tel-Hashomer, Izrael

BRCA1 plays a central role in DNA damage response (DDR). It undergoes phosphorylation by various DDR kinases at different serine residues, of which ser1524 is known to be specifically phosphorylated by ATM in response to genotoxic stress.

We performed BRCA1 immunohistochemistry on tissue microarrays (TMAs) of 113 early (I, II stage) and advanced (III, IV stage) NSCLCs, using MS110 antibody against the BRCA1 N-terminal and S1524 antibody against the phosphorylated form of BRCA1 protein at ser1524.

The results were correlated with overall survival (OS), disease free survival (DFS) and with the occurrence of brain metastases. BRCA1 S1524 nuclear positivity was significantly correlated with longer OS and DFS in stage I and II patients ($P < 0.05$), while OS and DFS were shorter in S1524 positive stage III and IV patients ($P < 0.05$).

The results show that BRCA1 phosphorylation, at least in ser1524, differentiates the prognosis of early and advanced NSCLC as well as response to chemotherapy, but the underlying mechanisms are not completely understood. Detection

of phosphorylated forms of BRCA1 might be a useful prognostic and predictive marker for patients with NSCLC.

Prognostic significance of BNIP3 and LC3 autophagic protein in non-small cell lung cancer

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 12.15-12.30 hod.

**Ivo Überall¹, Josef Škarda¹,
Maria Janíková², Lenka
Radová³, Eli Fridman⁴**

¹ Palacky University, Department of Clinical and Molecular Pathology, Olomouc, Czech Republic

² Palacky University and University Hospital, Department of Medical Genetics and Fetal Medicine, Olomouc, Czech Republic

³ Ceitec, Brno, Czech Republic

⁴ Sheba Health Medical Center, Department of Pathology, Tel-Hashomer, Israel

Evaluation of various prognostic factors, the role of autophagy a self-degradative process involved in the turnover of cytoplasmic material, remains unexplored in lung malignancy. Autophagic activity was studied in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) patients.

BNIP3 protein, a Bcl-2 family member, highly expressed in some tumours, plays a key role in the induction of autophagy. In the present study, we investigated the immunohistochemical expression and subcellular localization of BNIP3 in a series of early- and late-stage non-small-cell lung carcinomas and normal bronchial tissues, and correlated this expression with the occurrence of metastasis and survival. BNIP3 was strongly expressed in the nucleus of cancer cells in 16/79 (20.3%) cases. This BNIP3 positivity did not correlate with histological grade, stage, histology type, metastatic potential, or expression of BNIP3 according

to median values. No significant correlation was observed between the expression of BNIP3 and the overall survival of NSCLC patients ($p = 0.55$). Nor did we find any significant correlation between BNIP3 expression and the occurrence of site-specific metastasis ($p = 0.85$).

The microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3A) is an indispensable component in the autophagic machinery. Immunohistochemical examination revealed three patterns of autophagic activity (diffuse cytoplasmic, perinuclear cytoplasmic and „stone-like“ structures (SLS). A high count of SLS was associated with tumor-specific structures and had a relationship to prognosis of behaviour of tumors.

Supported by grant LF_2013_006 and project Biomedicine for regional development and human resources (BIOMEDREG) C1.05/2.1.00/01.0030.

ODBORNÉ ČASOPISY, SPECIÁLNÍ VYDÁNÍ, REPRINTY, KNIHY A DALŠÍ PUBLIKACE

- Medicína po promoci, Journal of Clinical Oncology, Gynekologie po promoci
- Clinical Cardiology Alert, Postgraduální nefrologie, Kapitoly z kardiologie pro praktické lékaře
- České verze časopisů „Current Opinion in...“
- Odborné knihy
- Výroční zprávy



MT BREVÍŘ – JEDINÝ TIŠTĚNÝ ZDROJ LÉKOVÝCH INFORMACÍ V ČR

Léková část:

- více než 4 000 článků k jednotlivým přípravkům

Rejstříky:

- vyhledávání podle ATC skupin | vyhledávání podle účinných látek | informace firem o nových přípravcích | adresář firem a obchodních zastoupení

➤ SPECIALIZOVANÁ KOMPENDIA PRO JEDNOTLIVÉ OBORY



EDUKAČNÍ MATERIÁLY PRO LÉKAŘE, PACIENTY ČI DO LÉKÁREN

- Postery (klasické i 3D)
- Flipcharty a kalendáře
- Miniatlasy
- Monotematické brožury
- Edukační aplikace pro iPad
- Edukační materiály s mobilními segmenty
- Display boxy a mnoho dalších produktů
- O NAŠE EDUKAČNÍ MATERIÁLY POŽÁDEJTE REPREZENTANTY FARMACEUTICKÝCH SPOLEČNOSTÍ



AKTUÁLNÍ INFORMACE NA INTERNETU I NA PAPIŘE



Seminář klastru MedChemBio - Nová protinádorová léčiva/ Seminar of MedChemBio Cluster - New anticancer agents

Předsedající / Chairs: Tomáš Eckschlager, Viktor Brabec

High throughput synthesis and analysis in development of new drugs and diagnostics

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 13.30-14.00 hod.

Jan Hlaváč¹

¹ Ústav molekulární a translační medicíny LF UP, Olomouc, Česká republika

In the few past years we were engaged in development of several methods for high-throughput synthesis of chemical libraries of derivatives having structural as well as substitution or chiral diversity, which was used for synthesis of active species against cancer cell lines in vitro. The synthesis of the chemical libraries was mainly achieved via solid-phase synthesis in connection with combinatorial chemistry. For the efficient use of high throughput mode of the synthesis also high-throughput analysis had to be developed. That's why we developed universal gradients for analytical as well as preparative separation of intermediates or final compounds. We also applied supercritical fluid chromatography for the analysis of chiral compounds, what allowed us to shorten time of analysis to few minutes instead of half an hour. The high-throughput synthesis was applied also for development of temperature sensors or novel fluorescent probes for determination of pH or concentration of various ions. The cell permeability of these species was successfully tested for the first compound series.

Triterpenoid derivatives and their biological activities.

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 14.00-14.15 hod.

Milan Urban^{1,2}, Marián Hajdúch², Jan Šarek^{1,2}, Petr Džubák²

¹ Palacký University in Olomouc, Dept. of Organic Chemistry, Faculty of Science, Olomouc, Czech Republic

² Palacký University in Olomouc, IMTM, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, Czech Republic

Triterpenoids are a large group of natural compounds that are found in numerous living organisms, and are particularly prevalent in plants. They often have a variety of biological activities. Betulinic acid, for example, has strong anti-HIV and anti-cancer activities.

The aim of this work was to synthesize lupane and oleanane derivatives with a heterocycle condensed to the terpenic skeleton and derivatives modified in the position 2 of the skeleton. Starting from betulin and betulinic acid, we prepared various precursors. Condensation of these precursors with ethylenediamine, hydrazine, phenylhydrazine, hydroxylamine, or thiourea yielded the pyrazine, pyrazole and phenylpyrazole derivatives, pyrazolones, isoxazoles, and thiazoles. The in vitro cytotoxicity of all compounds prepared in this study was screened on CCRF-CEM cell line, the most active derivatives were tested on a panel of seven cancer cell lines with/without MDR phenotype and non-tumor MRC-5 and BJ fibroblasts. The preferential cytotoxicity to cancer cell lines, particularly to hematological tumors was observed. Basic assumptions about structure-activity relationships and possible pharmacophores will be discussed.

Perspectives of 2-phenyl-3-hydroxyquinolin-4(1H)-ones as anticancer agents

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 14.15-14.30 hod.

Kristýna Bürglová¹, Jan

Hlaváč¹

¹ Palacký University, Institute of Molecular and Translational Medicine, Olomouc, Czech Republic

2-Phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinones (3HQs) can be considered as aza-analogues of flavones, compounds which are known for the wide-range of their biological activity. They have been recognized as compounds with promising anticancer activity against drug sensitive as well as drug resistant cancer cell lines in-vitro. The molecular target was recognized by affinity chromatography as the elongation factor EF1A1. According to these results the molecular modeling was performed to recognize the appropriate site of binding and to design better substitution and synthesize the more active compounds.

The main problem of these derivatives is their solubility and bioavailability. Therefore two strategies were applied for improvement of these drawbacks – binding of hydrophilic substituents on the N-site, which was predicted not to be directly responsible for the activity or preparation of bioavailable formulations.

The important pharmacological properties of tested 3HQs were calculated and used for prediction of new structures. The synthesis of novel derivatives was performed by solid-phase synthesis with application of combinatorial approach as well as solution-phase synthesis used especially for scale-up.

Photoactive trans ammine/amine diazido platinum(IV) complexes: the potential for photoactivated chemotherapy

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 14.30-14.45 hod.

Viktor Brabec^{1,2}

¹ *Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Brno, Czech Republic*

² *Palacky University, Faculty of Science, Department of Biophysics, Olomouc, Czech Republic*

Cisplatin (cis-[PtCl₂(NH₃)₂]) is a well-established potent anticancer drug. The mechanism of toxicity of cisplatin has been demonstrated to involve binding of the platinum to guanine residues of nuclear DNA. The resulting DNA lesions trigger cell death and result in the destruction of tumor tissue. As cisplatin does not discriminate between cancerous and healthy tissue, severe dose-limiting side effects are a serious problem. The handful of Pt drugs currently in the clinic and recent trials show small, yet significant, steps toward addressing these problems; however, there is still much scope for improvement.

The use of an inactive precursor or „prodrug“ is an important strategy in drug targeting. Inactive drug precursors can be selectively activated, following administration, to create a reactive species specifically where it is required, for example, at the tumor site. Photoactivation of a drug provides a degree of spatial and temporal control over drug dosage, and this strategy is being investigated for a number of anticancer drugs.

Photoactive drugs are currently used in the clinic in the modality of photodynamic therapy (PDT), which is an effective treatment for a number of cancers. A limitation of PDT is that the cytotoxic mechanism requires oxygen, which can be problematic since tumors are often hypoxic. Photochemotherapy, which is less dependent on oxygen for the cytotoxic effect, is therefore desirable. We have previously shown that photoactivation of nontoxic PtIV-azido complexes such as trans,trans,trans-[Pt(N₃)₂(OH)₂(NH₃)(py)] can generate potent, cytotoxic species capable of causing cell death in a number of cell lines by a mechanism distinct

from that of cisplatin. Recently, the Pt complex trans,trans,trans-[Pt(N₃)₂(OH)₂(pyridine)₂] (1) was synthesized, which is both highly soluble and stable in aqueous solution. It can be photoactivated over a range of wavelengths and is toxic toward cancer cells using low doses of UVA and, crucially, also with visible light. To assess the importance of the binding of photoactivated 1 to DNA for the efficacy of its anticancer action, we will report on an investigation of DNA binding of this photoactivated complex in tumor cells treated with this metallodrug. In addition, the fact that photoactivated 1 binds to DNA in cells prompted us to investigate the modifications induced in DNA in vitro (in cell-free media), including conformational alterations of DNA and the processing of these modifications by RNA polymerase II. We believe that a deep understanding of the reactions leading to bifunctional DNA cross-link formation by photoactivated 1 may provide guidance in future efforts to optimize the rational design of photoactivatable anticancer metallodrugs.

Reference: a Mackay, F. S., Woods, J. A., Heringova, P., Kasparkova, J., Pizarro, A. M., Moggach, S. A., Parsons, S., Brabec, V., and Sadler, P. J. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 20743–20748.

Protinádorové účinky inhibitorů histondeacetylázy (HDACi).

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 14.45-15.00 hod.

Tomáš Groh¹, Jan Hraběta², Helena Doktorová², Tomas Eckschlager²

¹ *Katedra biochemie, PřF UK, Praha,*

² *LF UK a FN Motol, KDHO, Praha, ČR*

Sledujeme efekt inhibitorů histondeacetylázy (HDACi) na nádorové buňky. Buňky neuroblastomů jsou citlivé k HDACi i cytostatikům v normo- i hypoxii. V hypoxii se účinky cytostatik, ale

ne HDACi, snižují. Vliv HDACi na cytostatiky indukovanou cytotoxicitu se liší v závislosti na sledu látek a typu cytostatika. Nejvíce cytotoxická je inkubace buněk s cytostatikem následovaná HDACi. Prokázali jsme i antiangiogenní účinek HDACi. HDACi se zdají být novou perspektivou v léčbě nádorů.

Podpořeno GAUK a GAČR.

A novel anticancer platinum drug candidates with dual DNA binding and histone deacetylase inhibitory activity *čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 15.00-15.15 hod.*

Jana Kašpárková^{1,2}

¹ *Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Brno, Czech Republic*

² *Palacky University, Faculty of Science, Department of Biophysics, Olomouc, Czech Republic*

Nearly 50% of all cancer therapies are platinum (Pt)-based, yet surprisingly to date only three Pt drugs have been approved for worldwide clinical use. The cytotoxicity of Pt drugs is attributed to their ability to bind DNA nucleobases and to induce apoptosis. Despite their enormous success, their widespread application and efficacy are hindered by toxic side effects, their limited activity against many human cancers and their susceptibility to acquired drug resistance. The need to overcome these drawbacks has stimulated the search for new molecular targets in addition to DNA which may present unique opportunities for therapeutic exploitation. The recent correlation between the inhibition of enzymes that regulate chromatin structure/function and tumor growth suppression has, for example, validated chromatin control as a promising new molecular target in contemporary medical oncology.

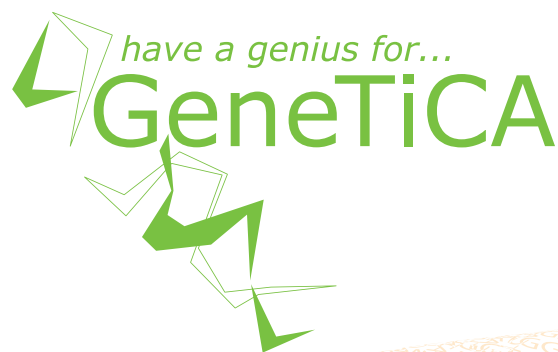
Histone deacetylases (HDACs) play an important role in the epigenetic regulation of gene expression by catalyzing the removal of acetyl groups, stimulating chromatin

condensation and promoting transcriptional repression. Since aberrant epigenetic changes are a hallmark of cancer, HDACs are a promising target for pharmacological inhibition. These properties have prompted numerous preclinical and clinical investigations evaluating the potential efficacy of HDAC inhibitors for a variety of malignancies.

Inspired by the lower side effects of oxaliplatin compared to „classical” cisplatin as well as high kinetic

inertness of Pt(IV) complexes, we proposed that using HDACs inhibitor valproic acid (VA) as ligands of Pt(IV) to form a oxaliplatin-like Pt(IV)–VA prodrug, would combine the advantages of VA and Pt(IV) compounds; VA would serve as not only a ligand, but also an HDAC inhibitor once the Pt(IV)–VA prodrug was intracellularly reduced to produce reactive Pt(II) agent and VA, and they might elicit synergistic antitumor activity. Moreover, the Pt(IV)-based prodrug should also

exhibit low side effects. With a view to (i) understanding more deeply the effects that may play an important role in the biological (pharmacological) properties of these new dual targeted Pt complexes and (ii) developing the next generation of Pt-HDACs inhibitors conjugates, the cytotoxicity, DNA binding, cellular accumulation and HDAC inhibitory activity of new Pt (IV) prodrugs were investigated and will be reported.



MiSeq



Sekvenátor pro každou aplikaci,
každý rozpočet, každou laboratoř...

HiSeq



www.genetica.cz

Poškození a metylace DNA - část 1 / DNA damage and methylation - part 1

Předsedající / Chairs: Jiří Bártek, Marián Hajdúch

Targeting defects of the genome integrity machinery as a cancer vulnerability.

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 15.45-16.30 hod.

Jiří Bártek^{1,2}

¹ Danish Cancer Society, Copenhagen, Denmark

² Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University in Olomouc

Autoantibody based cancer diagnostics

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 16.30-17.00 hod.

Andreas Weinhäusel¹, Christa Noehammer¹, Johana Fuchs-Luna¹, Istvan Gyurjan¹, Friedrich Längle², Johann Hofbauer³, Christian Singer⁴, Andrea Gsur⁵

¹ AIT, Austrian Institute of Technology, Molecular Diagnostics, Vienna, Austria

² LKH Wr Neustadt, Surgery, Wiener Neustadt, Austria

³ LKH Wr Neustadt, Urology, Wiener Neustadt, Austria

⁴ Medical Univ Vienna, Senology, Vienna, Austria

⁵ Medical Univ Vienna, Inst, for Cancer Research, Vienna, Austria

An estimated 12.7 million new cancer cases and 7.6 million cancer related deaths were reported worldwide in 2008. It is well accepted that early cancer diagnosis can improve survival, thus there is a great need and anticipation to identify novel biomarkers for cancer diagnosis at the earliest possible stage, which can ideally be integrated in minimal or even non-invasive diagnostic assays.

Cancer onset and progression produces mutated or aberrantly expressed proteins generally

also termed as tumor associated antigens (TAAs) which are able to act as antigens and evoke an immune response which results in the production of autoantibodies. These autoantibodies are able to be detected months or years before the clinical diagnosis of cancer and can therefore be used as biomarkers for the early diagnosis and prognosis of cancer. Along these lines we developed a 16k protein-microarray to screen cancer patients' sera for tumor-specific antibody profiles. This methodology, which will be described in detail, enabled us to define different TAA classifier panels for the big 4 cancer entities (breast, colon, prostate and lung cancer) which all show very promising classification successes in distinction of patients versus controls. Beside results from our 16k array-based screening experiments we will further present preliminary data from TAA biomarker validation studies currently performed on larger patient cohorts using targeted protein- or peptide arrays as well as Luminex bead assays. Last but not least we will report on preliminary results and experiences when performing tumor autoantibody profiling in different cancers.

Epigenetic changes in lung diseases: towards differential diagnosis of Cancer, Fibrosis and COPD

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 17.00-17.30 hod.

Klemens Vierlinger¹, Matthias Wielscher¹, Ulrike Kegler¹, Rolf Ziesche², Triantafillos Liloglou³, Andrea Gsur⁴, Christa Noehammer¹ and Andreas Weinhäusel¹

¹ AIT - Austrian Institute of Technology, Health & Environment Department, Molecular Diagnostics

Unit, Muthgasse 11/2, 1190 Vienna, Austria

² Universitätsklinik für Innere Medizin II, Klinische Abteilung für Pulmologie, Medizinische Universität Wien, Währinger Gürtel 18-20, 1090 Wien

³ Department of Molecular & Clinical Cancer Medicine, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom.

⁴ Institut für Krebsforschung, Medizinische Universität Wien, Währinger Gürtel 18-20, 1090 Wien

In a comparative study we assigned the genome wide methylation levels (Illumina Infinium 450k) of lung cancer patients (n=18), patients suffering from idiopathic lung fibrosis (IP, n=30) or hypersensitivity-pneumonitis (HP, n=8) and 42 patients suffering from chronic obstructive pulmonary disease, further 34 DNA samples derived from healthy-lungs. The authors could identify specific methylation patterns for each lung disease, which was enhanced by combination of the data from different pathogenesis. Via connection of methylation data with mRNA data also considerations about the influence of methylation on changed gene-expression will be presented. However, the major impact of the present study is the potential exploitation of the data for differential diagnostics. The authors will present the validation process of 192 probes via MSRE-qPCR, reaching validation rates of up to 80% and serum tests of the most promising 96 markers in different sera, where pilot studies showed correct classification rates of 85% on basis of 5 markers.

Poškození a metylace DNA - část 2 / DNA damage and methylation - part 2

Předsedající / Chairs: Jiří Bártek, Marián Hajdúch

Epigenetic study of 5-azacytidine nucleosides and their derivatives

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 17.45-
18.00 hod.

**Khushboo Agrawal¹, Petr
Džubák¹, Ivo Frydrych¹,
Dušan Holub¹, Petr Vojta¹,
Marcela Krečmerová²,
Miroslav Otmar², Marián
Hajdúch¹**

¹ Institute of Molecular and
Translational Medicine, Olomouc,
Czech Republic

² Institute of Organic Chemistry and
Biochemistry AS CR, v.v.i., Gilead
Sciences and IOCB Research
Center, Prague, Czech Republic

Existence of aberrant DNA methylation remains the major hallmark of cancer. Hypermethylation of gene promoter sequences resulting in transcriptional silencing of tumor suppressor genes has long been explored as a therapeutic target in cancer. The cytosine analogues, 5-azacytidine and 2'-deoxy-5-azacytidine, function as DNA methyltransferase inhibitors and are currently most advanced drugs for epigenetic cancer therapies. Despite encouraging results, mechanisms of in vivo resistance to these nucleoside analogues remain unresolved, limiting their clinical application. This emphasizes the need for more potent drugs targeting methylation. To characterize the hypomethylation activity of wide range of methylation inhibitors, we successfully established a fluorescence detection system with high sensitivity, suitable for screening by robust high content cellular imaging techniques. LEM-789, the epigenetic drug discovered and developed by the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, the Czech Republic, showed significant demethylation activity

in preclinical studies. In addition, we also developed several HCT116 p53 wild-type cell clones resistant towards 2'-deoxy-5-azacytidine to investigate the mechanisms of resistance and here we also present the preliminary data characterizing the resistant clones. In MTT cytotoxicity assay, all clones showed a high degree of resistance. Flow cytometry based studies revealed significant up-regulation of DNA and RNA synthesis. In addition, there was no change in P-glycoprotein expression between parental and the resistant clones. Moreover, molecular profiling of resistant clones using proteome wide analysis and transcriptomic sequencing unveiled different sets of proteins and corresponding protein coding genes with varying expressions, suggesting different mechanisms of resistance towards the studied methylation inhibitor. Further characterization of these resistant clones which include target mutation analyses and other gene expression studies together with the search for more potent methylation inhibitors is ongoing. This will aid our understanding of the molecular basis of clinical response and acquired tumor resistance to 2'-deoxy-5-azacytidine. It will also facilitate the introduction of novel therapeutics targeting demethylation.

Acknowledgement: This work was supported by internal grant of Palacky University (LF_2013_016), BIOMEDREG (CZ.1.05/2.1.00/01.0030) and Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (FR-TI4/625).

Methylace promotoru tumor supresorových a DNA reparačních genů u kolorektálního karcinomu

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 18.00-
18.15 hod.

Pavel Procházka^{1,2}, Veronika

**Vlková³, Jana Slyšková^{1,2},
Veronika Poláková^{1,2}, Ludmila
Vodičková^{1,2}, Pavel Vodička^{1,2}**

¹ Ústav experimentální medicíny AV
ČR, v.v.i., Oddělení molekulární
biologie nádorů, Praha, Česká
republika

² Ústav biologie a lékařské genetiky,
1. lékařská fakulta, Univerzita
Karlova v Praze, , Praha, Česká
republika

³ Institute of Molecular Genetics,
Academy of Sciences of the Czech
Republic, Tumour Immunology,
Prague, Czech Republic

Kolorektální karcinom (CRC) je velmi častým nádorovým onemocněním. Hypermethylace CpG ostrovů promotoru genů vedoucí k utlumení mRNA exprese byla identifikována jako možná příčina gastrointestinálních nádorů.

Z našich výsledků vyplývá, že metylace neovlivňuje expresi tumor-supresorových genů v experimentálním potkaním modelu kancerogeneze; na druhou stranu hypermethylace vybraných reparačních genů má význam zejména pro počáteční stádia CRC.

Podpora: GA CR: GA 304/12/1585 a P301/12/1734.

Possible roles of telomerase in resistance of cancer cells to PARP inhibitors

čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 18.15-
18.30 hod.

**Juraj Kramara¹, Lenka
Opluštilová², Martin Mistrík¹,
Jiří Bártek^{1,3}**

¹ Institute of Molecular and
Translational Medicine, Laboratory
of Genome Integrity, Olomouc,
Czech Republic

² AstraZeneca, Pharmaceuticals
Department, Nether Alderley,
Cheshire, United Kingdom

³ Danish Cancer Society, Genome

*Integrity Unit, Copenhagen ,
Denmark*

The PARP1 enzyme (Poly-ADP-ribose polymerase) is widely considered to be a promising drug target in treatment of various types of cancers, particularly breast tumors. Despite encouraging results of initial clinical trials, frequent instances of resistance to PARP1 inhibitors (PARPi) have been reported in later studies. We have identified elevated expression of the telomerase reverse transcriptase (TERT) as one of the factors causing resistance to the PARPi. Throughout the lecture possible molecular mechanisms of the telomerase driven PARPi resistance will be discussed.

Cyclin-dependent kinase 12 in cancer initiation and progression

*čtvrtek / 21. listopadu 2013 / 18.30-
18.45 hod.*

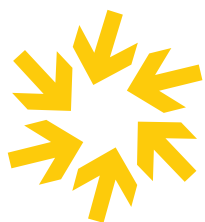
Jiří Kohoutek¹

¹ Výzkumný ústav veterinárního
lékařství, , Brno, Česká republika

One of the typical characteristics of cancer development is the acquisition of unlimited cell division potential. Therefore, it is not surprising that the physiological activity of specific cellular factors orchestrating cell division is often deregulated across a broad range of tumors. Protein complexes driving transition through each phase of cell division consist of the cyclin- dependent kinases (CDKs) and cyclins, their binding partners. Besides already described function of CDKs in the control of cell division, CDKs play an indispensable role in the regulation of transcription. Our work has recently identified CDK12 as a crucial factor regulating transcription of DNA damage response/repair (DDR) genes. Down-regulation of CDK12 not only led to aberrant transcription of DDR genes, such as BRCA1, ATR, FANCI and FANCD2, but it also led to activation of the DDR pathway and increased genomic instability. In summary, we conclude that CDK12 represents, in many aspects, biologically interesting and clinically promising

target for further investigation. As an example, CDK12 could be potentially employed as a useful diagnostic marker, since overexpression of CDK12, together with frequent amplification of CDK12 gene, was found in various types of tumors. Similarly, identification of functional impact of CDK12 mutations, identified in broad spectrum of tumors, during the process of cancer initiation and progression is very promising direction in any scientific attempts.

The project is supported by the grant from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health, NT14599-3/2013.



Rakovina věc veřejná

NADACE PRO VÝZKUM RAKOVINY

Počet nově diagnostikovaných nádorů roste v České republice každých deset let o čtvrtinu. I proto byla v roce 1997 založena nadace pro výzkum rakoviny Olomouc, jejímž cílem je podpora výzkumu a vývoje v oblasti nádorových onemocnění, v oblasti primární a sekundární prevence zhoubných novotvarů a jiných závažných civilizačních nemocí.

Cíle nadace jsou:

Podpora výzkumu a vývoje v oblasti nádorových nemocí a biomedicíny, včetně poskytování finančních prostředků na pořízení technických prostředků a přímých či nepřímých nákladů výzkumu a vývoje.

Financování programů zaměřených na primární nebo sekundární prevenci zhoubných novotvarů a jiných závažných civilizačních nemocí v české populaci.

Financování projektů a činnosti v oblasti výchovy a dalšího vzdělávání odborníků týkající se přímo, či nepřímo problematiky zhoubných nemocí.

Poskytování stipendií a mzdových fondů pro studenty a odborníky řešící přímo či nepřímo onkologické anebo biomedicínské projekty.

Poskytování finančních prostředků na zřizování standardních i nestandardních zdravotnických a vědecko-výzkumných zařízení, včetně financování jejich vybavení, provozu a rozvoje.

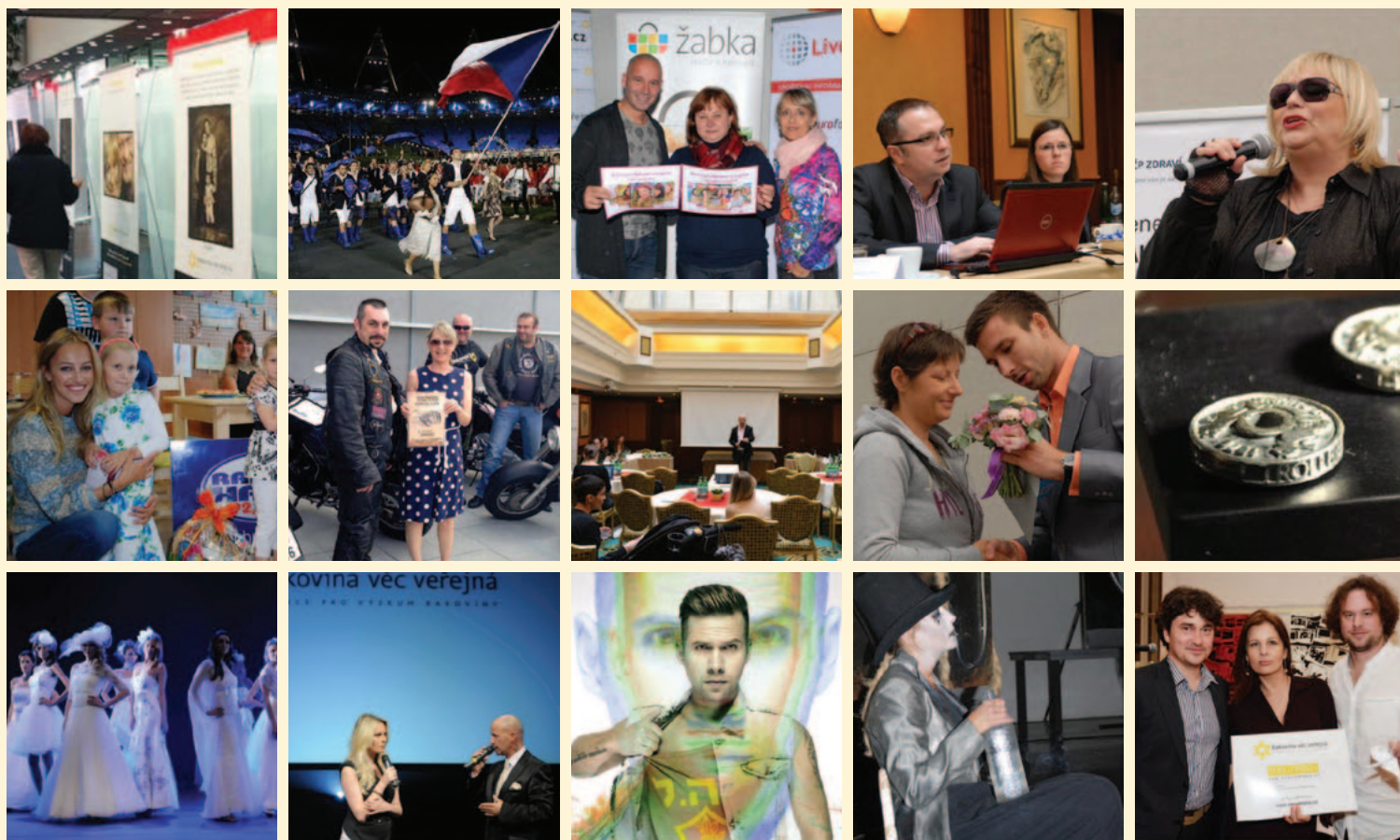
Financování a zprostředkovávání specializovaných vyšetření, léčby a léčebných pobytů nemocných v České republice i v zahraničí.

Nadace Rakovina věc veřejná založila v roce 2012 stejnojmennou obecně prospěšnou společnost, pomocí níž chce zvýšit povědomí o problematice infekce HPV virem (Human Papillomavirus) mezi ženami. Hodlá je také motivovat k molekulárnímu vyšetření HPV infekce, a to zejména infekce nejrizikovějšími genotypy tohoto viru, takzvanými hrHPV (high-risk HPV). V případě pozitivního výsledku na hrHPV infekci klientky vyhledají svého gynekologa, který na základě cytologických nebo histologických vyšetření doporučí další kroky.



Zajímavé projekty nadace Rakovina věc veřejná:

- V rámci projektu „Pošli příběh“ se uskutečnilo divadelní představení s Vandou Hybnerovou ve studiu Alta nebo veřejné čtení veršů Tomáše Tajchnera, které četl Saša Rašilov
- Výstava fotografií Pavly Hodkové za podpory Jana Saudka
- Dražba darů sportovců, účastníků Olympijských her
- Každoroční nadační kalendáře, v letošním roce se fotilo s dětmi, které prodělaly náročnou onkologickou léčbu
- Tradiční benefice, spojené s módní přehlídkou v Praze a Olomouci



Děkujeme všem partnerům, známým osobnostem i široké veřejnosti, kteří se v roce 2013 zapojili do benefičních projektů nadace Rakovina věc veřejná.

Přejeme hodně úspěchů v roce 2014.

Renata Hilšer Grmolenská
ředitelka nadace



Sloučeniny s protinádorovým účinkem - struktura a účinnost / Anticancer compounds - structure and activity

Předsedající / Chairs: Marián Hajdúch, Pavla Perlíková

Biological activity and molecular target of quinolinone derivatives with anticancer effect

pátek / 22. listopadu 2013 / 9.00-9.15 hod.

Gabriela Rylová¹, Petr Džubák¹, Anna Janošťáková¹, Ivo Frydrych¹, Petr Konečný¹, Dušan Holub¹, Tomáš Ožďian¹, Dalibor Doležal¹, Miroslav Sural², Jan Hlaváč², Marián Hajdúch¹

¹ Institute of Molecular and Translational Medicine, Olomouc, Czech republic

² Institute of Molecular and Translational Medicine, Department of Organic Chemistry, Olomouc, Czech republic

We are testing chemical libraries of quinolinone derivatives, compounds with high cytotoxicity and various biological effects. These compounds, derived from quinolone antibiotics, are well known for their antibacterial, antiprotozoal, cytotoxic, and immunosuppressive effects.

2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinones were tested by MTT assay and they yielded IC₅₀ values in submicromolar and micromolar concentrations.

The most active derivative was tested in in vivo cancer model using hollow fibres. Hollow fibres were filled by leukemic cancer CEM cell line and were implanted to mice. Afterwards mice were treated by tested compound. Hollow fibres were taken from mice after treatment and viable cells were tested by cytotoxic MTT assay.

Activity of tested compound was comparable to doxorubicine.

For protein targets identification of these derivatives we have synthesized biotinylated molecules

of original compounds. Biotinylated compounds were immobilized on the surface of streptavidin coated magnetic beads and whole complex was incubated with total protein cell lysate of the CEM cell line. Then, free proteins were washed-out and specifically bound proteins were separated on 1D-SDS gel. The following silver-staining of the gel allowed to compare sample lines with proteins specifically bound to biotinylated compound and negative control. Specific proteins were cut off from the gel and trypsinized to get peptides for protein identification by mass spectrometry. Identified targets are proteins associated with translational regulation, glucose metabolism, and cytoskeleton. Identified proteins were validated by Western blot and by other cell/biochemical tests.

The work was supported by grants: Internal grant of Faculty of Medicine UP (LF_2012_018), CZ.1.07/2.3.00/20.0009, Operational Programme Research and Development for Innovations (project CZ.1.05/2.1.00/01.0030) and IGA UP LF_2013_016

A new generation of highly potent Olomoucine derived CDK inhibitors

pátek / 22. listopadu 2013 / 9.15-9.30 hod.

Tomáš Gucký¹, Vladimír Kryštof², Radek Jorda², Karel Berka³, Marek Zatloukal¹, Eva Řezníčková², Miroslav Strnad²

¹ Palacký University, Centre of the Region Haná, Olomouc, Czech Republic

² Palacký University, Laboratory of growth Regulators, Olomouc, Czech Republic

³ Palacký University, Regional Centre of Advanced Technologies

and Materials, Olomouc, Czech Republic

The cyclin-dependent kinases (CDKs) are pivotal regulators of the cell cycle. Due to their frequent deregulation in cancer cells, CDKs have been viewed as valid drug targets and to this date, more than 20 inhibitors have entered clinical trials in cancer patients. One of them, roscovitine is currently being evaluated as an oncology drug candidate in patients diagnosed with non-small cell lung cancer and nasopharyngeal cancer or other malignancies.

Using structure-activity relationship studies together with a good knowledge of ATP binding sites in various CDKs, the modification of the roscovitine molecule in its substitutable positions has given rise to purine derivatives with increased CDK inhibitory activity and anticancer cytotoxicity. We have recently focused on further modifications of roscovitine molecule with the aim to increase the desired biological activities of known 2,6,9-trisubstituted purine CDK inhibitors.

We synthesized and screened a novel series of 2-substituted-6-biaryl-methylamino-9-cyclopentylpurine derivatives and identified some new pharmacophores which significantly increased CDK inhibitory activity and cytotoxicity in human cancer cell lines that correlated with robust CDK1/2/7/9 inhibition and caspase activation. Molecular modelling of selected compounds in the active site of CDK2 revealed a high interaction energy, which we believe is due to the 6-heterobiaryl-methylamino substitution of the purine moiety. Finally, the lead compounds of the series underwent in vivo experiments with promising results; they effectively repressed tumor formation in mice xenografted with

human hepatocellular carcinomas and significantly diminished diethylnitrosamine (DEN)-induced hepatoma development. Our data demonstrate superior efficacy of tested CDK inhibitors compared with currently used chemotherapeutics in hepatocellular carcinomas.

7-Hetaryl-7-deazaadenosines: a novel class of cytostatic compounds and their mechanism of action

pátek / 22. listopadu 2013 / 9.30-9.45 hod.

Pavla Perlíková¹, Marián Hajdúch², Michal Hocek^{1,3}

¹ Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, , Prague, Czech Republic

² Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University Olomouc, Institute of Molecular and Translational Medicine, Olomouc, Czech Republic

³ Faculty of Science, Charles University in Prague, Department of Organic Chemistry, Prague, Czech Republic

Nucleoside analogues are commonly used for cancer treatment. A new class of nucleoside analogues, 7-hetaryl-7-deazaadenosines, has been developed in our group. [1] 7-Hetaryl-7-deazaadenosines exhibit strong cytostatic effect against a panel of cancer cell lines in nanomolar concentrations. Even though preliminary experiments had shown fast and strong inhibition of cellular RNA synthesis after treatment with this class of compounds, the molecular target of 7-hetaryl-7-deazaadenosines was unknown. Here we report our results on further investigation of their mechanism of action. We have shown that 7-hetaryl-7-deazaadenosines can be incorporated both into DNA and RNA in cells. We have proven that 7-hetaryl-7-deazaadenosine triphosphates can be incorporated into mRNA and block its translation. The same effect was also observed in mice.

Literature:

[1] Bourderioux, A.; Nauš, P.; Perlíková, P.; Pohl, R.; Pichová, I.; Votruba, I.; Džubák, P.; Konečný, P.; Hajdúch, M.; Stray, K.M.; Wang, T.; Ray, A.S.; Feng, J.Y.; Birkus, G.; Cihlar, T.; Hocek, M. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 5498–5507.

Nucleosides – compounds with combined therapeutical activities

pátek / 22. listopadu 2013 / 9.45-10.00 hod.

Petr Konečný¹, Petr Džubák¹, Michal Hocek², Marián Hajdúch¹

¹ Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and University Hospital in Olomouc, Institute of Molecular and Translational Medicine, Olomouc, Czech Republic

² Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, , Czech Republic

It is necessary to discover therapeutical entities due to multiple resistance developing at different cancer types and bacterial strains. One of the most problematic issues of these days is frequent occurrence of TBC disease, caused by *Mycobacterium tuberculosis*. 7-deazapurine ribonucleosides are a diverse group of compounds with various therapeutical activities, including the anticancer and antimicrobial effects, even in micromolar or submicromolar concentrations. Moreover, these compounds were synthesized with expected activity towards bacterial strain responsible for TBC development, *Mycobacterium*, via specific inhibition its adenosine kinase. For activity and IC50 evaluation, the vaccinating strain of *Mycobacterium bovis*, obtained from BCG vaccine, was subjected to standard MTT test. It was proven, that some of the nucleosides have specific activity towards *M. bovis*, contrary to other bacterial and fungal strains. Except antibacterial and antifungal screening, data from cell toxicity towards different

cancer cell lines together with flow cytometric analysis, were obtained for closer understanding of compounds' properties and therefore suggesting direction in further synthetic modifications.

This work was supported by Internal Grant of Medical Faculty, Palacký University in Olomouc (LF_2013_016 and LF_2013_015); the infrastructural part of the project (IMTM) was supported by OP Research and Development for Innovation (CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Deriváty pyrimidinu jako potenciální inhibitory RAGE signalizace

pátek / 22. listopadu 2013 / 10.00-10.15 hod.

Ivo Frydrych¹, Markéta Sztalmachová², Zdeněk Zídek³, Martina Axmanová^{4,5}, Marián Hajdúch¹

¹ Ústav molekulární a translační medicíny, , Olomouc, Česká republika

² Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Ústav patologické fyziologie, Brno, Česká republika

³ Ústav experimentální medicíny AV ČR, , Praha, Česká republika

⁴ Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Ústav Biochemie, Olomouc, Česká republika

⁵ Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Ústav patologické fyziologie, Brno, Česká republika

RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products) je multiligandový povrchový receptor imunoglobulinového typu, který byl objeven jako receptor pro heterogenní skupinu AGEs (Advanced Glycation End Products), vznikajících neenzymatickými glykačními a oxidačními procesy. RAGE se podílí na regulaci celé řady fyziologických a patologických procesů. jako jsou nádorová a neurodegenerativní onemocnění nebo záněty. Zatímco za fyziologických podmínek je exprimován v nízkých koncentracích, v tkáních postižených RAGE-příbuzným patogenním stavem lze pozorovat jeho výrazně zvýšenou

expresi, což představuje zajímavý terapeutický cíl. RAGE signalizace je poměrně komplexní a zahrnuje aktivaci různorodých transkripčních faktorů, které mají centrální úlohu především v regulaci imunitní odpovědi a zánětu. Klíčovou úlohu patrně zaujímá signální dráha NFκappaB. V naší chemické knihovně jsme identifikovali skupinu látek strukturně odvozených od pyrimidinu, která vykazuje významné protizánětlivé účinky. Některé z těchto látek působí jako velmi účinné inhibitory RAGE signalizace. Na buněčných liniích jsme prokázali, že tyto látky inhibují klíčové signální dráhy (NFκappaB, MAPK/JNK a JAK/STAT3) RAGE signalizace.

Práce byla podpořena projekty CZ.1.07/2.3.00/30.0041 (Podpora vytváření excelentních výzkumných

týmů a intersektorální mobility na Univerzitě Palackého v Olomouci II) a CZ.1.05/2.1.00/01.0030 (Operační program Výzkum a vývoj pro inovace).

Sustained DNA damage response in proteasome inhibitor treated cancer cell lines

pátek / 22. listopadu 2013 / 10.15-10.30 hod.

Katarína Chromá¹, Juraj Kramara¹, Pavel Moudrý², Martin Mistrík¹, Jiří Bártek^{1,2}

¹ *Institute of Molecular and Translational Medicine, Laboratory of Genome Integrity, Olomouc, Czech Republic*

² *Danish Cancer Society, Genome Integrity Unit, Copenhagen,*

Denmark

DNA damage signaling utilizes several types of protein modifications including phosphorylation, sumoylation, and ubiquitylation. Upon depletion of free ubiquitin levels by inhibition of ubiquitin recycling in the proteasome complex, part of the DNA damage response is compromised and several crucial repair proteins such as 53BP1 and BRCA1 are not recruited to sites of DNA lesions. However, we have identified several cancer cell lines exhibiting 53BP1 recruitment even after proteasome inhibition. Mechanism of the sustained DNA damage response and clinical implications of this interesting phenotype will be discussed during the lecture.

Prognostické a prediktivní biomarkery, nové technologie / Prognostic and predictive biomarkers, new technologies

Předsedající / Chairs: Jiří Drábek, Josef Srovnal

Vyšetření mutací genů RAS metodou CADMA (Competitive amplification of differentially melting amplicons).

pátek / 22. listopadu 2013 / 10.45-
11.00 hod.

**Jiří Drábek¹, Jana Stránská¹,
Eva Hrušková¹, Rastislav
Slavkovský¹, Sylwia Jančík¹,
Zachary Dwight², Miroslava
Rabčanová¹, Veronika
Holinková¹, Marián Hajdúch¹**

¹ Lékařská fakulta UP, Ústav
molekulární a translační medicíny,
Olomouc, Czech Republic

² University of Utah, Department of
Pathology, Utah, USA

Dne 29. 8. 2013 přibyla v SPC Vectibixu, biologického léčiva používaného u kolorektálního karcinomu od roku 2009, důležitá věta: „Před zahájením léčby musí být potvrzen standardní typ onkogenu RAS (KRAS a NRAS). Mutační stav by měl být stanoven v laboratoři s odpovídajícími zkušenostmi a používající validovanou metodu ke stanovení mutací KRAS (exony 2, 3, a 4) a NRAS (exony 2, 3, a 4).“

Přestože pro klinika může tato změna vypadat jako kosmetická, její důsledky pro laboratoře jsou dalekosáhlé: počet vyšetřovaných kodonů se navýšil z dosavadních 2 (12 a 13 genu KRAS) na nyníšších 12 (KRAS: 12, 13, 59, 61, 117, 146; NRAS: 12, 13, 59, 61, 117, 146), nemluvě o celkovém počtu testovaných mutací a počtu PCR reakcí nutných při použití dříve zavedených typizačních postupů na bázi alelicky specifické PCR (TheraScreen, Cobas, Pentagene a další). Pro zvládnutí tohoto nárůstu volí genotypizační laboratoře převážně dvě cesty: vysokoobrátkové sekvenování (NGS, Next Generation Sequencing) anebo metodu, která byla použita u poslední vectibixové klinické studie (skriningové štěpení

celerovou nukleázou následované dHLPC - WAVE Surveyor, v případě pozitivitu potvrzované Sangerovým sekvenováním).

Přestože zavádíme metodu NGS pro použití v typizačním algoritmu: vyšetření KRAS 12/13 kitem TheraScreen – v případě negativitu následné vyšetření NGS nebo pyrosekvenování, rozhodli jsme se zavést také metodu na bázi PCR. Metoda CADMA využívá kompetici překrývajících se primerů pro standardní a pro mutovanou alelu při vazbě k templátu ke generování ampikonů, rozlišitelných dle teploty tání. Rozhodnutí o testování PCR metody bylo způsobené jejími atraktivními vlastnostmi jako je rychlost, použití levných neznačených primerů, možnost multiplexingu (testování několika mutací v jediné zkumavce), které jsme si potvrdili zopakováním pokusů, popsaných loni v původní publikaci Kristensena v časopise Human Mutation.

Ve svém příspěvku uvádíme výsledky pilotní srovnávací studie metody CADMA vs. NGS, popřípadě vs. další metody (DiaCarta, IntelliMed).

Poděkování: Práce byla podporována grantovými projekty CZ.1.05/2.1.00/01.0030 a CZ.1.07/2.3.00/30.0041. Děkujeme Mgr. Jitce Berkovcové, PhD. za alikvoty vzorků s RAS mutací.

Diagnostics of minor mutations in RAS oncogenes in mCRC with next-gen sequencing

pátek / 22. listopadu 2013 / 11.00-
11.15 hod.

**Rastislav Slavkovský¹, Sylwia
Jančík¹, Petr Vojta¹, Jana
Stránská¹, Marián Hajdúch¹,
Jiří Drábek¹**

¹ Faculty of Medicine and Dentistry,
Palacky University, Institute of
Molecular and Translational
Medicine, Olomouc,

Metastatic colorectal carcinoma (mCRC) is one of the most common cancer. The identification of KRAS codons 12 and 13 mutations status as a predictive biomarker for anti-EGFR therapy in mCRC represents a major breakthrough in personalized medicine. Nevertheless, not all mCRC patients with wild-type KRAS codons 12, 13 benefit from the biological therapy. Recent studies have assessed the value of further KRAS and NRAS mutations screened by WAVE DHPLC technology as a predictive marker in mCRC patients. The aim of our study was to find out whether amplicon next-generation sequencing (NGS) using Illumina MiSeq platform would be a viable method for a sensitive detection of minority RAS mutations in genes KRAS (codons 59, 61, 117, and 146) and NRAS (codons 12, 13, 59, 61, 117, and 146).

The amplicons (189 - 284 bp) for exons 2, 3, and 4 of RAS genes were designed using Primer3. Pair-end 2x150 bp read protocol was used for amplicon sequencing. Data were processed using MiSeq Reporter and VBA scripts; the detection limit for the somatic mutation call was set to 1%.

Preliminary results from 23 KRAS-codon-12, 13-wild-type samples identified 7 samples with minority RAS mutations. RAS mutation status was confirmed by homemade CADMA PCR and/or DiaCarta qPCR. Control samples with 50% frequency of defined mutation in NRAS codon 61 (Q61K, Q61L, and Q61H) were correctly identified with 48.6%±1.4% mutation frequency.

NGS is a suitable method for direct detection of minority mutations in RAS genes. The quality of DNA is crucial when amplicons are longer. Comparing to other methods the NGS is significantly more laborious, therefore the automation

of sample preparation is strongly advisable for routine diagnostics. The disadvantage of NGS are high investment cost; however, if more samples are investigated at the same time, the price per sample is significantly reduced.

Acknowledgements: Project was supported by grants CZ.1.07/2.3.00/30.0041 and CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

Detekce HPV DNA v cervikovaginálním stěru- alternativní možnosti screeningu karcinomu cervixu
pátek / 22. listopadu 2013 / 11.15-11.30 hod.

Hana Ondryášová¹, Vladimíra Koudeláková¹, Marián Hajdúch¹

¹ Ústav molekulární a translační medicíny, Laboratoř experimentální medicíny, Olomouc,

Úvod: Infekce lidským papilomavirem (HPV) je asociována se vznikem řady nádorových onemocnění, především karcinomu cervixu. Počáteční stádia karcinomu cervixu jsou asymptomatická, proto je screening pro odhalení cervikálního karcinomu v dobře léčitelném stádiu nezbytný. Hlavním problémem screeningu karcinomu cervixu je nízká účast - podílí se na něm pouze 50 % českých žen. Právě ženy, které se cervikálního screeningu neúčastní, mají vyšší riziko vzniku karcinomu cervixu. Možnost použití samoodběrové sady jako nové screeningové alternativy by eliminovalo hlavní důvody (emocionální i praktické), proč se ženy screeningu vyhýbají.

Metody: Pomocí samoodběrové sady Evalyn Brush byly získány cervikovaginální stěry asymptomatických žen. Takto získané vzorky byly systémem Cobas 4800 (Roche) testovány na přítomnost HPV 16/18 a dalších hrHPV genotypů. HPV pozitivní vzorky byly dále analyzovány PapilloCheck HPV- Screening system (Greiner bio-one).

Výsledky: Všechny ženy, které

vyzkoušely samoodběrovou sadu Evalyn Brush, ji shledaly snadno použitelnou a upřednostňovaly samoodběr před odběrem vzorku u gynekologa. Všechny vzorky od asymptomatických žen byly odebrány korektně a daly validní výsledky (založeno na interní kontrole kvality). Z 81 vzorků bylo 24 pozitivních na přítomnost hrHPV genotypů (30%). Nejčastěji se vyskytující hrHPV genotypy byly HPV16 (7%) a 51 (6%).

Shrnutí: Samoodběrová sada Evalyn Brush je vhodná pro detekci hrHPV. Její použití bylo ženami velmi dobře akceptováno. Možnost samoodběru by mohla zvýšit počet žen účastnících se screeningu cervikálního karcinomu a tím se podílet na snížení morbidit cervikálního karcinomu.

Poděkování: Práce byla provedena za podpory grantů IGA UP LF_2013_015 a Biomedreg CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Vyšetření genu EGFR a mutací genu KRAS u olomouckého souboru pacientů s kolorektálním karcinomem.
pátek / 22. listopadu 2013 / 11.30-11.45 hod.

Radek Trojanec¹, Jiří Drábek¹, Jana Potočková¹, Jana Stránská¹, Zuzana Crlíková¹, Soňa Mlčochová¹, Jana Vrbková¹, Marián Hajdúch¹

¹ Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Ústav molekulární a translační medicíny, Olomouc, Česká republika

Kolorektální karcinom (CRC) patří v České republice mezi nejčastější onkologická onemocnění a jeho incidence meziročně stoupá. Podle údajů SVOD je Česká republika na 5. místě v celosvětovém výskytu tohoto onemocnění. CRC se vyskytuje u osob >50 let (nejčastěji mezi 60. - 70. rokem života) a až u 1/4 nově diagnostikovaných případů jsou přítomny metastázy, nejčastěji do jater. I u tohoto onemocnění se standardem stalo použití cílené

terapie, s použitím bevacizumabu (inhibice angiogeneze) a anti-EGFR protilátek (cetuximab, panitumumab). Aktivací transmembránového receptoru EGFR (ERBB; HER1; Human epidermal growth factor receptor) dochází ke spuštění intracelulární signální kaskády, ovlivňující expresi genů, a výsledně k buněčné proliferaci. Deregulace EGFR signální dráhy může tedy vést k progresi nádoru. Biomarkerem účinnosti léčby je status genu EGFR a přítomnost mutací v KRAS genu. Mutace KRAS se vyskytují u 35 - 50% CRC (více než 90% mutací je v kodonu 12 a 13) a jejich přítomnost indikuje rezistenci nádoru vůči anti-EGFR protilátkám. Nebyla prokázána korelace mezi odpovědí na anti-EGFR léčbu a pozitivním imunohistochemickým vyšetřením EGFR, avšak zvýšený počet kopií EGFR, v případě wild-type KRAS, bývá považován za prediktor účinnosti anti-EGFR terapie. Nicméně, hlavním problémem použití počtu kopií genu (GCN) jako prediktoru je především velmi nejednotný způsob interpretace výsledků vyšetření. GCN bývá nejčastěji vyšetřován metodou FISH, avšak cut-off hodnoty pro pozitivitu se liší mezi laboratořemi. Za pozitivní někdy bývají považovány i případy s polyzomií. Díky tomuto faktu bývá zvýšený GCN popisován ve velmi širokém rozmezí, u 6,9 - 88,9% CRC. Na olomouckém pracovišti bylo vyšetřeno 1216 pacientů s CRC (794 [65,3%] mužů a 422 [34,7%] žen), ve věku 35-89, průměr 64,9) let. Standardně byl vyšetřován EGFR GCN a mutace genu KRAS. Experimentálně byly vyšetřovány mutace genu EGFR a nově jsme zavedli i vyšetření mutací v kodonech 59, 61, 117, 146 genu KRAS a v kodonech 12, 13, 59, 61, 146 genu NRAS. V současné době probíhá vyhodnocování souboru. Budou prezentovány charakteristiky souboru a jeho srovnání s mezinárodními studiemi. Jedná se o primární data, která v budoucnu plánujeme doplnit klinickými údaji a provést analýzy zaměřené především na stanovení správných cut-off pro GCN genu EGFR.

Práce byla podporována projektem Biomedreg CZ.1.05/2.1.00/01.0030

Vyšetření IDH1 a IDH2 mutací u gliálních nádorů metodou CADMA PCR

pátek / 22. listopadu 2013 / 11.45-12.00 hod.

Magdalena Megová¹, Drábek Jiří¹, Vladimíra Koudeláková¹, Radek Trojanec¹, Ondřej Kalita², Soňa Mlčochová¹, Miroslava Rabčanová¹, Marián Hajdúch¹

¹ Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Ústav molekulární a translační medicíny, Olomouc, Česká republika

² Lékařská fakulta Univerzita Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci, Neurochirurgická klinika, Olomouc, Česká republika

NADP-dependentní enzym isocitrátdehydrogenáza (IDH1 v jádře, IDH2 v mitochondriích) se účastní Krebsova cyklu při oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na alfa-ketoglutarát. Mutace IDH1/2 vznikají na počátku gliogeneze a nachází se u většiny astrocytomů, oligodendrogliomů, oligoastrocytomů a sekundárních glioblastomů. U high-grade gliomů (grade III a IV) jsou spojovány s lepší prognózou onemocnění a uvádí se, že IDH1/2 mutantní protein by mohl být potenciálním terapeutickým cílem. Identifikace IDH1/2 mutací hraje tedy klíčovou roli ve studiu gliálních nádorů.

Cílem naší práce byla identifikace mutací IDH1 R132H a IDH2 R172K u souboru pacientů s gliálními nádory pomocí nově navržené metody jednokrokové CADMA PCR (Competitive Amplification of Differentially Melting Amplicons). U souboru 120 pacientů (55 prim. glioblastom, 14 a. astrocytom, 15 dif. astrocytomem, 11 sek. glioblastom, 6 a. oligoastrocytom, 4 oligoastrocytom, 2 oligodendrogliom, 13 jiných gliálních nádorů) byl medián věku pacientů v době operace 55 let (24 – 80 let), 66% pacientů tvořili muži, medián doby od první operace

(respektive poslední kontroly) byl 10,2 měsíce (0,1 – 19,7 měsíce). V souboru 54 patientských DNA byl IDH1 mutační status ověřen také pomocí metody PCR s následnou restriční analýzou. Výsledky obou metod se téměř úplně shodovaly až na jednoho pacienta, u kterého byla nepřítomnost IDH1 R132H mutace potvrzena pomocí sekvenční analýzy.

90 pacientů bylo IDH1 R132H negativních, 30 bylo IDH1 R132H pozitivních. IDH1 R132H mutace byla nejčastěji nalezena u anaplastických astrocytomů (71%, 10/14), difúzních astrocytomů (40%, 9/15), anaplastických oligoastrocytomů (67%, 4/6) a sekundárních glioblastomů (27%, 3/11) oproti primárním glioblastomům (9%, 5/55) a jiným gliálním nádorům (0%, 0/13). IDH2 R172K mutace nebyla prokázána u žádného z vyšetřených gliálních nádorů. CADMA PCR metoda testování IDH1 a IDH2 mutací je vhodná také pro kvantifikaci těchto mutací a je schopna odhalit nejméně 5% mutované DNA. Nově zavedená metoda CADMA PCR se jeví jako vhodnější metoda pro stanovení IDH1 a IDH2 mutací než dvoukroková PCR metoda s následnou restriční analýzou.

(Práce byla podpořena grantovými projekty: IGA MZČR NT13581, CZ.1.05/2.1.00/01.0030, LF_2013_015.)

Využití proteomických metod v klinické diagnostice nádorových onemocnění

pátek / 22. listopadu 2013 / 12.00-12.15 hod.

Dušan Holub¹, Petr Džubák¹, Marián Hajdúch¹

¹ Lékařská fakulta UP, ÚMTM, Olomouc, Česká republika

Shotgun proteomika je slibná analytická metoda pro charakterizaci komplexních proteomů z různých druhů biologických materiálů (tělní tekutiny, tkáně a buňky). V dnešní době lze díky moderním technologiím detegovat dle potřeby až 10 000 proteinů z buněčného

lyzátu a stejně tak z parafrinované tkáně. V nedávné době vyšlo mnoho publikací využívající shotgun proteomiku ke studiu různých typů nádorů. Výsledkem bylo nalezení několika proteinových biomarkerů, které spadají do tří aplikačních oblastí: diagnostické markery, prognostické markery a terapeutické markery.

Na příkladu typizace amyloidózy prezentujeme význam shotgun proteomické metody. Pouze z nepatrného množství (600 nl) amyloidního depozita z parafrinované tkáně jsme schopni detekovat diagnostický marker v podobě nejvíce abundantního amyloidogenního proteinu. Do budoucna počítáme, že podobným způsobem budeme zpracovávat parafrinovanou tkáň z různých typů nádorů ke stanovování cílených proteinových markerů.

Na dalším příkladu chceme prezentovat využití cílené proteomiky, která se zabývá detekcí a kvantifikací vybraných biomarkerů. Hepcidin je peptidový hormon, který je specificky kvantifikován ze séra pomocí metody "monitorování vybraných reakcí" (SRM). Tato metoda je schopna z jedno vzorku kvantifikovat až několik stovek cílených proteinů.

Proteomika nabízí celou škálu cílených a necílených metod, které lze široce využít v diagnostice nádorových onemocnění.

Tento projekt byl podpořen interním grantem Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (LF_2013_016 a LF_2013_015); infrastrukturální část tohoto projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena z Operačního programu Věda a výzkum pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

A system for identification and quantification of mutations in proteomic data

pátek / 22. listopadu 2013 / 12.15-12.30 hod.

Jiří Voller¹, Miroslav Hruška¹, Petr Džubák¹, Khushboo Agrawal¹, Dušan Holub¹, Petr Vojta¹, Zuzana Macečková¹, Marián Hajdúch¹

¹ *Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*

A typical cancer cell harbours mutations in up to hundreds genes. Knowledge of mutation profiles allows us to understand which processes are altered in the cancer cells of individual patients and select therapy accordingly. Modern high-throughput methods like SNP arrays or next generation sequencing (NGS) are used for mutation screening. However, the mass spectrometry of proteome, another method with a great potential in personalized medicine, is not used for this purpose yet. The limiting factor is insufficient coverage of mutant variants in proteome databases.

We developed a software for the identification of mutant, polymorphic and/or alternatively spliced genes

on protein level using MS spectra/fragmentation data. It uses a dedicated mutation/SNPs/splice variant database with a unique coverage (number of both mutation and integrated information sources). The search space can be extended beyond the known disease-associated mutations by including in silico generated sequences such as predicted non-canonical/aberrant splicing variants. The software allows both confirmation of changes observed in high-throughput genomic experiments and generation of reference proteoms based on such data.

The system is fully automated, built out of components of well-established open-source software. R is used for biological sequence handling. Identification of protein alterations is performed using multi-search engine OpenMS pipeline. The solution is deployed on a high-performance computer cluster and is highly scalable and extensible.

The software allows to “upgrade” mass-spectrometer into a tool for identification of mutations, polymorphisms and protein splicing variants. This type of information is critical in both cancer research and diagnostics of somatic mutations but can be used also in other genetic/

proteomic applications.

Serum biomarker discovery and validation: a proteomics capability development initiative

pátek / 22. listopadu 2013 / 12.30-12.45 hod.

Lakshman Varanasi¹, Dušan Holub¹, Miroslav Hruška², Petr Džubák¹, Marián Hajdúch¹

¹ *Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*

² *Department of Computer Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*

The number of biomarkers in clinical practice is abysmally small, given the large number of biomarker candidates that have been identified to date. However, the coming-of-age of high-throughput mass-spectrometry holds promise for proteomic biomarker discovery and validation. Biomarker development requires a collaborative effort by statisticians, clinicians, and scientists. Such an exercise is underway at IMTM. We present here an overview of the system that has been developed for this purpose.

Posterová sekce / Poster section

A rapid identification of chemical modulators of cellular cAMP and antioxidant response element (ARE) signaling using human reporter cell lines

Ermin Schadich¹, Jiří Řehulka¹, Petr Džubák¹, Marián Hajdúch¹

¹ Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

We developed two stable human reporter cell lines for identification of modulators of cellular signal transduction pathways associated with pathogenesis of cancer. They are cAMP response element binding protein (CREB)-human embryonic kidney cells HEK293 and antioxidant response element (ARE)-human hepatocellular carcinoma HepG2 reporter cell line. Their signals were highly specific and sensitive both in bioassays with known effective drugs and novel pathway modulators from ginger plant.

High-Throughput Screening in Drug Discovery; Implementation of Cytotoxic Assays.

Soňa Gurská¹, Petr Džubák¹, Marián Hajdúch¹

¹ Institute of Molecular and Translational Medicine, Olomouc, Czech Republic

The High-Throughput Screening (HTS) is basically a process of screening and assaying a large number of biological modulators and effectors against selected and specific targets. The main goal of this technique is to accelerate drug discovery by screening large compound libraries, it is possible to screen up to 10,000 compounds

per day. The 96-well plates have been replaced by higher density microplates with 384- or 1536-wells per plate and the typical working volume decreased to 20 or 5 µl. In the HTS robotic systems, data processing and control software, liquid handling devices, and sensitive detectors are used.

Firstly, the chemical compounds are tested in the primary screen and only compounds with positive results (HITs) are investigated in the secondary screen and the IC50 values are calculated. Secondary screening is performed by biological and biochemical tests. In our newly-installed robotic system MTT and XTT assays for first and second screens are validated. Cells were plated on 384-well plates using peripump dispenser of the EL406 and the treatment with conventional cytostatics was done by the Echo Liquid Handler. After 72 hours the MTT or XTT was added by Multidrop Combi and after appropriate incubation time the absorbances were read on EnVision from Perkin Elmer. The IC50 values were calculated and compared.

This work was supported by Medical Faculty Palacky University Olomouc Internal Grant (LF_2013_016 and LF_2013_015); the infrastructural part of the project (IMTM) was supported by OP Research and Development for Innovation (CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Encapsulation of doxorubicin into the apoferitin

Iva Blažková¹, Romana Konečná¹, Simona Dostálová¹, Pavel Kopel^{1,2}, Maja Stanisavljević¹, Markéta Vaculovičová^{1,2}, Vojtěch Adam^{1,2}, René Kizek^{1,2}

¹ Mendel University in Brno, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy,

Brno, Czech Republic

² Brno University of Technology, Central European Institute of Technology, Brno, Czech Republic

The encapsulation of doxorubicin into the apoferitin was investigated. At low pH, the protein is disassembled and in neutral pH, the structure is reassembled and doxorubicin molecules are encapsulated in the cavity. The efficiency of the doxorubicin encapsulation was studied by fluorimetry and capillary electrophoresis with LIF detection. This feature allows the application of apoferitin as a drug nanocarrier with specific low pH initiated release.

The support by IGA IP22/2013 is acknowledged.

Intratumoral pH alteration following carborans treatment

Jana Štěpánková¹, Petr Džubák¹, Miloš Petřík¹, Zbyněk Nový¹, Petr Konečný¹, Bohumír Grüner², Václav Šícha², Jiří Brynda³, Dalibor Doležal¹, Marián Hajdúch¹

¹ Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University Olomouc, Institute of Molecular and Translational Medicine, Olomouc, Czech Republic

² Institute of Inorganic Chemistry of the AS CR, v.v.i., Department of Syntheses, Husinec Řež, Czech Republic

³ Institute of Organic Chemistry and Biochemistry ASCR, v.v.i., Structural Biology, Prague, Czech Republic

Carbonic anhydrase 9 (CA9) is highly overexpressed in different solid tumours. Its expression, which is regulated by the HIF-1 transcription factor, serve as hypoxic marker and prognostic indicator. Carbonic anhydrases (CA) generally catalyze reversible hydration of carbon

dioxide to bicarbonate ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). CA9 is a transmembrane isoform of CA with an extracellular-facing catalytic site and therefore is well positioned to act in control of tumour pH.

Function of CA9 can be inhibited by CA9-selective sulphonamides. Inhibition of its function perturbs in vitro survival under hypoxia conditions. Recent studies have revealed direct functional involvement of CA9 in regulation of pH in tumour microenvironment and suggest novel strategies based on selective CA9 inhibitors.

The aim of this study was to evaluate the effect on CA9 function of new carboranes with functional sulfonamide residues. As activator of HIF-1, we used CoCl₂ and hypoxia. We tested level of CA9 expression on five cell lines and we detected cell viability under hypoxia conditions after treatment with CA9 inhibitors. For in vivo studies, female SCID mice were injected subcutaneously with human colon adenocarcinoma cell line HT-29.

Once tumors reached the desired volume, mice were tested on detection change of intratumoral pH following carborans treatment.

We observed intratumoral pH change after CB-30 treatment; no change of pH was observed for vehicle and acetazolamide treatment. To study tumour pH, we used radioiodinated phenylalkyl melonic acid derivate as pH-sensitive SPECT tracer. Preliminary experiments indicate a clear pH dependent uptake and visualization regions of acidosis.

Acknowledgement: ProMedChem (C.Z.1.07/2.3.00/30.0060) and BIOMEDREG (CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

New approaches for cancer diagnostics and prognostics based on molecular analysis of circulating tumor cells

Marie Jindřichová¹, Robert Sjöback², Mikael Kubista^{1,2}

¹ Institute of Biotechnology AS CR, v.v.i., Laboratory of Gene

Expression, Prague, Czech Republic

² TATAA Biocenter, Medicinargatan 7B, Göteborg, Sweden

Circulating tumor cells (CTCs) released from the primary tumor and spread via lymphatic/hematogenous system to distant organs are early indicators for the metastatic process. The detection of CTCs in the peripheral blood and their molecular analysis shall help with early stratification of patients to optimal therapy that increases the chance to be cured and to survive. However, the detection and gene expression profiling of CTCs remain technically challenging. Here we present key points of optimisation for molecular analysis of breast cancer CTCs.

Metallothionein jako imunohistochemický biomarker karcinomů hlavy a krku – výsledky meta-analýzy

Jaromír Gumulec¹, Markéta Sztalmachová¹, Hana Polanská¹, Monika Holubová¹, Jan Balvan¹, Kristýna Hudcová¹, Hana Binková², Zuzana Horáková², Rom Kostřica², Martina Raudenská¹, Ondřej Zítka³, Vojtěch Adam³, René Kizek³, Michal Masařík¹

¹ Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Ústav patologické fyziologie, Brno, Česká republika

² Fakultní nemocnice U Svaté Anny, Klinika otorhinolaryngologie, chirurgie hlavy a krku, Brno, Česká republika

³ Mendelova univerzita v Brně, Ústav chemie a biochemie, Brno, Česká republika

Karcinomy hlavy a krku jsou významným onkologickým problémem současnosti. Řada studií popisuje změny v hladinách metalothioneinu, proteinu, účastníciho se antioxidačních pochodů a regulace apoptózy. Výsledky studií byly analyzovány

meta-analýzou. U těchto nádorů byl identifikován signifikantní vzestup positivity imunohistochemického barvení oproti nenádorové tkáni. Takovýto postup může být benefitem pro rutinní diagnostiku.

Poděkování: Práce byla podpořena projektem IGA MZ NT14337-3/2013.

Expresní profil genů asociovaných s apoptózou u primokultur dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku

Jaromír Gumulec¹, Markéta Sztalmachová¹, Hana Polanská¹, Monika Holubová¹, Jan Balvan¹, Kristýna Hudcová¹, Hana Binková², Zuzana Horáková², Rom Kostřica², Martina Raudenská¹, Ondřej Zítka³, Vojtěch Adam³, René Kizek³, Michal Masařík¹

¹ Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Ústav patologické fyziologie, Brno, Česká republika

² Fakultní nemocnice U Svaté Anny, Klinika otorhinolaryngologie, chirurgie hlavy a krku, Brno, Česká republika

³ Mendelova univerzita v Brně, Ústav chemie a biochemie, Brno, Česká republika

Pochopení molekulárních mechanismů karcinogeneze je nedílnou součástí pochopení chování nádorových buněk. V této studii byla vytvořena primokultura z histologicky definovaného spinocelulárního karcinomu hlavy a krku. Pomocí RT-PCR byla analyzována exprese genů Bax, Bcl-2 a p53. Oproti nenádorové tkáni byly identifikovány signifikantní rozdíly v expresi těchto genů. Výsledky byly korelovány s růstovou charakteristikou buněk.

Poděkování: Práce byla podpořena projektem IGA MZ NT14337-3/2013.

**Zinek rezistentní PC-3 linie:
expresní a imunocytochemická
analýza vybraných
genů korespondujících
s metabolismem
a transportem Zn²⁺ iontů**

**Martina Axmanová^{1,2},
Monika Holubová^{2,3},
Jaromír Gumulec², Markéta
Sztalmachová², Hana
Polanská², Jan Balvan²,
Kristýna Hudcová², Martina
Raudenská², René Kizek⁴,
Michal Masařík²**

¹ Přírodovědecká fakulta, Univerzita
Palackého, Ústav Biochemie,
Olomouc, Česká republika

² Lékařská fakulta, Masarykova
univerzita, Ústav patologické
fyziologie, Brno, Česká republika

³ Přírodovědecká fakulta,
Masarykova univerzita, Ústav
Biochemie, Brno, Česká republika

⁴ Mendelova univerzita v Brně, Ústav
chemie a biochemie, Brno, Česká
republika

Pro analýzu vlivu zvýšené koncentrace zinečnatých iontů v nádorově změněných buňkách jsme vytvořili zinek rezistentní buněčnou linii odvozenou z wild type PC 3 prostatické buněčné linie. Zaměřili jsme se na expresní a imunocytochemickou analýzu genů a proteinových produktů, které úzce souvisí s transportem a metabolismem zinečnatých iontů. Jednalo se konkrétně o metalothionein, kovy regulující transkripční faktor a zinkové transportéry ZnT-1 a ZIP1.

Práce byla podpořena projektem MUNI/C/0965/2012.

**¹²⁵I-labelled phenylalkyl
malonic acid derivative for
monitoring of tumor acidosis**

**Zbyněk Nový¹, Jana
Štěpánková¹, Milan Urban¹,
Marta Khoylou¹, Miloš Petřík¹**

¹ Faculty of Medicine and Dentistry
of Palacky University, Institute
of Molecular and Translational
Medicine, Olomouc, Czech

Republic

Objectives: It is known that the intratumoral microenvironment of both animal and human tumors is acidic compared to normal tissues. It is caused by elevated anaerobic as well as aerobic glycolysis in tumors. In general, the extracellular pH (pHe) in tumors is below 7.0, whereas the intracellular pH (pHi) is maintained at neutral range. Radiolabelled malonic acid derivatives were recently developed as apoptosis tracers. The rationale is that, when undergoing apoptosis, cells drastically lower their pHe, resulting in a specific uptake of radiolabelled malonic acid derivatives into apoptotic cells. In this study we have monitored the biodistribution of ¹²⁵I-labelled 2-(4-iodophenethyl)-malonic acid (IPM) in tumor-bearing mice to evaluate the potential of radioiodinated IPM to be used as a tracer for pH imaging.

Methods: IPM was labeled with ¹²⁵I using copper assisted labelling method at 90°C for 60 min. The reaction product was purified using solid-phase extraction. In vivo biodistribution was performed in SCID tumor-bearing mice treated with acetazolamide, carborane derivative (cb-30) and citric acid. The animals were sacrificed in various time intervals and excised organs were measured in a gammacounter. Tumor tissue was frozen for autoradiography.

Results: IPM was radioiodinated with the yield of around 50%. ¹²⁵I-IPM in tumor-bearing mice showed slow renal excretion, high blood pool retention and high activity in all highly perfused organs. The highest intratumoral accumulation of ¹²⁵I-IPM was observed in the cb-30 treated mice (4.7±0.3 %ID/g 1h p.i.) showing a clear difference compared to not treated control animals (4.1±0.4 %ID/g 1h p.i.). The in vivo accumulation of ¹²⁵I-IPM in acidic environment was confirmed by autoradiography of tumor slices of treated (intratumoral injection of 1% citric acid) and untreated tumors in mice.

Conclusion: ¹²⁵I-IPM displayed relatively slow pharmacokinetics with high blood pool retention. Nevertheless ¹²⁵I-IPM did show a clear pH dependent uptake in tumors. Further studies to elucidate the usefulness of radioiodinated IPM as a tracer for pH imaging are currently ongoing.

**Charakteristika zinek-
rezistentních linií ve vztahu
k apoptóze**

**Monika Holubová^{1,2}, Martina
Axmanová¹, Markéta
Sztalmachová¹, Jaromír
Gumulec^{1,3}, Michal Masařík^{1,3}**

¹ Masarykova Univerzita, Ústav
patologické fyziologie, Brno, Česká
republika

² Masarykova univerzita,
Přírodovědecká fakulta, Brno,
Česká republika

³ Vysoké učení technické,
Středoevropský technologický
institut, Brno, Česká republika

Zinek rezistentní buněčné linie byly vytvořeny jako unikátní model pro studium procesů spojených s maligní transformací prostatické tkáně.

V této práci je porovnán vztah k programované buněčné smrti u standardních linií (odvozených od nádorové i nenádorové tkáně prostaty) při krátkodobém treatmentu iontů zinku a linií se získanou rezistencí k těmto iontům.

Rezistentní linie byly viabilní i při koncentracích převyšujících jejich běžnou IC₅₀, což potvrzuje modifikaci významných regulačních drah v buňce.

Práce byla podpořena grantovým projektem MUNI/C/0965/2012.

**Myeloid-derived suppressor
cell accumulation during
tumour growth and
its cyclophosphamide
treatment is inhibited by
DNA demethylating agent
5-azacytidine**

**Romana Mikyšková¹,
Marie Indrová¹, Veronika
Vlková¹, Jana Bieblova¹,**

Jana Šimová¹, Elzbieta Pajtasz-Piasecka², Joanna Rossowska², Milan Reiniš¹

¹ Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Tumour Immunology, Prague, Czech Republic

² Ludwik Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Department of Experimental Oncology, Wrocław, Poland

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are the key players mediating immunosuppression. In this study, the effect of 5-azacytidine (5AC) on MDSC induced in mice by tumour growth and CY therapy was examined. Indeed, the percentage of MDSC in the tumour microenvironment and spleens of 5AC-treated mice bearing tumours was found decreased. CY treatment of the tumours resulted in additional MDSC accumulation. This accumulation was subsequently inhibited by 5AC treatment. Further, cultivation of spleen MDSC in the presence of 5AC reduced the percentage of MDSC and increased the percentage of CD11c+ and CD86+/MHCII+ cells. This was accompanied by the Arg-1 gene expression reduction and lower VEGF production. Our findings indicate that, beside the direct antitumour effect, 5AC can reduce MDSC accumulating during tumour growth and CY chemotherapy, which can be beneficial for the outcome of cancer therapy.

Grants: GAP301/11/P220, GA301/10/2174, and Polish-Czech Research Project (2012-2014).

Influence of selected natural substances on global microRNA expression in HepG2 cell line.

Zdeněk Dostál¹, Martin Sebera², Josef Srovnal³, Michaela Sedláčková³, Martin Modrianský¹

¹ Palacky University, Department of Medical Chemistry and

Biochemistry, Olomouc, Czech Republic

² Masaryk University, Faculty of sport studies, Brno, Czech Republic

³ Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Institute of Molecular and Translational Medicine, Olomouc, Czech Republic

Polyphenols belong to a group of natural compounds present in fruits, vegetables, beverages such as coffee or tea, and in several other foods and natural products. In general these substances display positive effects and due to a relatively high consumption are they considered beneficial. According to many studies the daily dose of these substances may reach more than 1 g/day. Hypothesis appeared that beneficial biological activity of these substances may not be just of antioxidant nature but may affect signaling pathways or cellular behavior that are regulated by transcription factors and thereby participate in gene expression.

One of such regulatory pathways involves microRNA, or precisely change in microRNA expression. MicroRNA regulation is ultimately involved in cancerogenesis because of its influence on the protein translation process. Any changes in microRNA levels of expression will be mirrored by changes in proteome leading to changes in phenotype. Selected polyphenols: caffeic acid, gallic acid, vanillic acid, quercetin, taxifolin, silybin, and dehydrosilybin were tested for their ability to influence global microRNA expression. We selected HepG2 cell line because it is derived from human hepatoma. The dose of each polyphenol was selected as 1 microM based on toxicity studies. The treatment time period was established as 24 hours. Total RNA was isolated and applied to gene chip arrays. Our data suggests certain resemblance in influence on microRNA expression among structurally related compounds and overall.

For example miR-29c star, miR-190b, miR-301b, miR-566, miR-4699-3p or miR-4670-5p were increased, miR-509-3-5p, miR-3942-5p and miR-4744 were decreased. Data clustering revealed a significant likeness on microRNA influenced by gallic acid and silybin. Some microRNAs influenced by tested polyphenols are involved in epigenetics due to DNA methyltransferase regulation (miR-29c star, miR-301b) or cyclin D3 expression (miR-138-2). We conclude that low, physiologically achievable concentrations of selected polyphenols may conjure significant changes microRNA expression, thereby influencing cell life.

Acknowledgements: this work was supported by grants LF_2013_008 and CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

Analýza cytotoxicity a změn exprese genů regulujících apoptózu u prostatických buněčných linií v přítomnosti naftochinonů

Jan Balvan¹

¹ Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie, Brno, Česká republika

Plumbagin a naftazarin jsou v přírodě se běžně vyskytující látky fenolického charakteru, které stejně jako některá cytostatika, obsahují ve své struktuře chinonové jádro. V buňce způsobují tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) a reagují s thiolovými skupinami proteinů a glutathionu. V této práci jsme stanovili cytotoxicitu těchto látek pro nádorové buněčné linie prostaty metodami MTT a xCELLigence a sledovali jsme změny v expresi genů regulujících apoptózu (Bax, Bcl-2, p53) metodou qRT-PCR.

Alterace PI3K signální dráhy u pacientek s karcinomem prsu

Jarmila Šimová^{1,2}, Barbora Kubová¹, Magdalena Uvírová^{1,2}, Irena Urbanovská^{1,2}, David

**Konvalinka¹, Radek Měch¹,
Andrea Hopenštoková¹, Jana
Mazurová¹, Iveta Žebráková²,
Kateřina Benková²,
Martina Kubošová²,
Robert Ondrušek¹, Jana
Dvořáčková^{1,2,3}**

¹ Vzdělávací a výzkumný institut
AGEL, o.p.s. – pobočka Ostrava-
Vítkovice, CGB laboratoř a.s.,
Laboratoř molekulární genetiky a
patologie, Ostrava,

² Ostravská Univerzita, Lékařská
fakulta, Ostrava,

³ Fakultní nemocnice Ostrava, Ústav
patologie, Ostrava,

ÚVOD: Karcinom prsu patří mezi nejčastější zhoubná onemocnění u žen. Deregulace PI3K/AKT signální dráhy hraje důležitou roli v karcinogenezi, nejen u tohoto typu nádoru. Mezi nejčastější alterace patří mutace PIK3CA genu a ztráta exprese PTEN proteinu. Jako další možné biomarkery mohou sloužit i změny expresních profilů mikroRNA (miRNA), případně ovlivnění jejich funkce v důsledku výskytu jednonukleotidových polymorfismů (SNP). G-alela SNP rs61764370 v let-7 miRNA komplementárním místě (KRAS-LCS6) v 3'UTR oblasti onkogenu KRAS byla v několika studiích asociována s vyšším rizikem vzniku různých typů nádorů a jako potenciální marker odpovědi na cílenou léčbu.

MATERIÁL A METODY DETEKCE: DNA byla izolována z fixované nádorové tkáně pacientek s karcinomem prsu. Detekce mutací v kodonech 542, 545 a 1047 PIK3CA genu byla provedena pomocí modifikované metody extenze primerů (SNaPshot assay), přímého sekvenování, případně pomocí real-time PCR. Analýza SNP rs61764370 byla provedena pomocí PCR+RFLP. Exprese PTEN proteinu byla stanovena imunohistochemicky.

VÝSLEDKY: Retrospektivně byl analyzován soubor 174 nádorových DNA pacientek s histologicky verifikovaným karcinomem prsu. V analyzovaném souboru byly somatické mutace v PIK3CA genu

detekovány v 28,7% (50/174). Z toho v 32 % případů (16/50) byla mutace zachycena v exonu 9 a v 60 % (30/50) v exonu 20 PIK3CA genu. Koexistence mutací v exonu 9 a 20 PIK3CA genu byla zachycena v 8 % (4/50). Ve skupině ER pozitivních karcinomů prsu byla mutace v PIK3CA genu nalezena u 33,9 % (22/65), ve skupině ER negativních v 16 % (4/25). Ve skupině HER2 pozitivních byla mutace v PIK3CA genu nalezena ve 25,9 % (7/27), ve skupině HER2 negativních ve 34,8% (31/89) a u skupiny triple negativních karcinomů prsu (ER-/PR-/HER2-) se mutace vyskytovala v 13,3 % (2/15). KRAS-LCS6 G-alela byla nalezena u 16,1 % (29/180) pacientek s diagnózou karcinomu prsu a u 15,8 % (61/387) zdravé populace (kontrol). Ztráta exprese PTEN proteinu byla prokázána u 86% (37/43).

DISKUSE A ZÁVĚR: Relativně vysoké frekvence mutací v PIK3CA genu ve studovaném souboru korelují s publikovanými údaji, stejně tak odpovídá vyšší procento výskytu mutací v exonu 20 tohoto genu. Mnohem častěji byly nalezeny mutace v PIK3CA genu ve skupině ER pozitivních a HER2 negativních nádorů prsu. Vzhledem k vysokému výskytu alterací (zejména mutace PIK3CA genu a ztrátě exprese PTEN proteinu) v této signální dráze a k novým možným terapeutickým možnostem (PI3K, AKT a mTOR inhibitory, miRNA) je vhodné další genetické profilování nádoru pro získání nových potenciálních prognostických a prediktivních markerů.

Tato práce byla podpořena z projektu studentské grantové soutěže specifického vysokoškolského výzkumu LF OU (SGS - 1101/0030/13).

**Affecting the expression of
glutamate carboxypeptidase
II by methyltransferases
inhibitors**

**Jan Hraběta¹, Pavel Šácha²,
Jan Konvalinka², Tomáš
Eckschlager¹**

¹ 2nd Medical School, Charles
University, Department of Pediatric
Hematology and Oncology,
Prague, Czech Republic

² Academy of Sciences, Institute
of Organic Chemistry and
Biochemistry, Prague, Czech
Republic

Methyltransferases are implicated in a variety of processes, including gene expression and protein function changes. GCPII is a metallocarboxypeptidase that cleaves C-terminal glutamate from peptide NAAG in central nervous system and from polyglutamate in jejunum. The pathologic consequence of GCPII expression is unknown. Our results show changes in expression of GCPII in medulloblastoma and prostate carcinoma cells after treatment by methyltransferases inhibitors.

Supported by GACR P304/12/0847

**Celogenomová amplifikace
(WGA) vyvolává nepřesnosti
v detekci mutací genu KRAS
u karcinomu tlustého střeva**

**Jana Stránská¹, Jiří Drábek¹,
Sylwia Jančík¹, Rastislav
Slavkovský¹, Veronika
Holinková¹, Miroslava
Rabčanová¹, Marián
Hajdúch¹**

¹ Ústav molekulární a translační
medicíny Lékařské fakulty
Univerzity Palackého v Olomouci,
Laboratoř experimentální medicíny,
Olomouc, Česká republika

Celogenomová amplifikace (WGA) pomáhá překonat omezení dané nedostatečným množstvím DNA z nereprezentativního nebo minimálního vzorku. FFPE vzorky kolorektálního karcinomu mají obvykle dostatečné množství buněk/DNA a WGA je proto zbytečná. Nemusí to být však pravda u vzorků zasílaných v rámci externí kontroly kvality.

V rámci mezinárodní externí kontroly kvality genotypizace KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) karcinomu tlustého střeva

mikroskopické zhodnocení počtu buněk u zaslaných vzorků ukázalo, že DNA nebude dostačovat pro případné opakování pokusu. Použili jsme proto GenomePlex® Tissue Whole Genome Amplification Kit (WGA5, Sigma Aldrich Co.). Následovala mutační analýza soupravou KRAS StripAssay® (ViennaLab Diagnostics GmbH), což je jedna ze dvou metod, které jsme v té době měli akreditované pro vyšetření KRAS dle ISO17025. V externí kontrole jsme nebyli úspěšní. V rámci nápravných opatření jsme provedli sérii pokusů k nalezení zdroje nesrovnalostí (např. vertikální audit genotypizace, nová interpretace výsledků, reanalýza vzorků kity TheraScreen®: K-RAS Mutation Kit, Roche Molecular Systems Inc. a cobas® KRAS Mutation Test, Roche Molecular Systems Inc. v externí laboratoři, nová extrakce a genotypizace DNA pomocí cobas® DNA Sample Preparation Kit, kontrola identity vzorků pomocí mikrosatelitů, atd.).

Vyhodnotili jsme, že nesrovnalost mohla být způsobena kombinací heterogenity vzorku se zkrácenou amplifikací díky stochastickým vlivům během rané fáze WGA. Při dalších analýzách vzorků jsme vyzkoušeli kit pro WGA fungující na rozdílném principu než WGA5, REPLI-g FFPE Kit (Qiagen) a detekovali změny v zastoupení mutované DNA pomocí next-generation sequencing (platforma Illumina MiSeq) v původních a amplifikovaných vzorcích. Oba principy celogenomové amplifikace způsobily významné změny v zastoupení mutace ve vzorku. Náš náález je důležité brát v úvahu ve všech metodách, které celogenomovou amplifikaci používají před krokem, který kvantifikuje množství mutace ve vzorku.

Poděkování: Děkujeme dr. Jitce Berkovcové, Ph.D. za provedení reanalýzy vzorků kitem cobas a grantovému projektu CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

A new method of the revelation of BrdU – the marker of DNA replication

Anna Ligasová^{1,2}, Karel Koberna^{1,2}

¹ *Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*

² *Institute of Biophysics, Department of Molecular Cytology and Cytometry, Brno, Czech Republic*

Eukaryotic chromosomal DNA is divided into hundreds to thousands of subunits that replicate from a single origin. These subunits are called replicons. Replicons are continuously activated in a non-synchronous manner during the S phase. In cells, the active replicons were located in discrete nuclear foci, also called replication foci or sites, which can be observed after the immunocytochemical detection of DNA synthetic activity (e.g. 1–7). Modified nucleotides such as 5-bromo-deoxyuridine (BrdU), 5-chloro-deoxyuridine (CldU), 5-jodo-deoxyuridine (IdU) and specific antibodies raised against these nucleosides are commonly used for the detection of replicated DNA. Another possibility represents the use of 5-ethynyl-deoxyuridine (EdU) and azido-dyes. After the incorporation of BrdU, CldU and IdU into DNA, these nucleosides are not accessible for specific antibodies and a specific treatment is required for their detection. The most frequent protocols of that visualization include a treatment with strong acids (hydrochloric acid) or alkali (sodium hydroxide), the use of enzymes such as DNase I or a combination of DNase I with exonuclease (e.g. 8–9). The use of acids or alkali results in the destruction of the most of cell components including RNA and proteins, while the enzymatic approach provides a relatively low detectable signal. Consequently, the co-localization studies between BrdU (CldU, IdU)-labeled DNA and

EdU-labeled DNA can be performed only at the cost of the destruction of cell components or a low signal provided by halogen-labeled nucleosides.

We have developed a completely new approach enabling the effective detection of incorporated nucleotides such as BrdU, CldU, IdU or 5-methylcytosin in DNA. It can be performed in one or two steps depending on the need. The one-step procedure usually provides a lower signal, however at lower cost, whereas the two-step procedure is faster and yields a higher signal. The method developed enables the coincident detection of BrdU-, CldU- or IdU-labeled DNA or 5-methylcytosin with protein epitomes, as it does not result in protein destruction.

1. Nakamura, H., et al. (1986). *Exp Cell Res* 165: 291-7.
2. Nakayasu, H. and R. Berezney (1989). *J Cell Biol* 108: 1-11.
3. Fox, M. H., et al. (1991). *J Cell Sci* 99: 247-53.
4. O'Keefe, R. T., et al. (1992). *J Cell Biol* 116: 1095-110.
5. Dimitrova, D. S. and D. M. Gilbert (1999). *Mol Cell* 4: 983-93.
6. Ma, H., et al. (1998). *J Cell Biol* 143: 1415-25.
7. Leonhardt, H., et al. (2000). *J Cell Biol* 149: 271-80.
8. Dimitrova, D. S. and R. Berezney (2002) *J Cell Sci*, 115: 4037-4051.
9. Kennedy, B. K., et al. (2000). *Genes Dev* 14: 2855-2868.

This work has been supported by the Technology Agency of the Czech Republic (TA03010598 and TA03010719). The infrastructural part of the project (IMTM) was supported by grant project CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

A new method for labeling of nuclear and mitochondrial DNA

Anna Ligasová^{1,2}, Karel Koberna^{1,2}

¹ *Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*

² *Institute of Biophysics, Department of Molecular Cytology and Cytometry, Brno, Czech Republic*

The double-stranded DNA is commonly labeled by substances which bind to DNA and simultaneously serve as fluorescent dyes. The examples of such dyes

include DAPI, Hoechst 33258 and Hoechst 33342. These dyes bind to the minor groove of double-stranded DNA. Another group of substances intercalate into the structure of DNA (YOYO-1, TOTO-1). However, many such dyes also exhibit an affinity to RNA. This represents a crucial problem for the detection of DNA in cells where a high amount of RNA is commonly present. Moreover, some of the labels also have a sequential specificity. One such example is DAPI, which preferentially binds to sequences containing A-T pairs.

We have developed a highly selective and effective approach enabling the labeling of double-stranded DNA. This method is based

on the incorporation of the labeled nucleotides into the DNA chains. The approach provides efficient staining of DNA independently of the DNA sequence. Besides this, the method is insensitive to the RNA. This approach enables a visualization of both nuclear and mitochondrial DNA.

This work has been supported by the Technology Agency of the Czech Republic (TA03010598 and TA03010719). The infrastructural part of the project (Institute of Molecular and Translational Medicine) has been supported from the Operational Program Research and Development for Innovations (project CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Molekulární cíle a skriningové metody / Molecular targets and screening methods

Předsedající / Chairs: Martin Mistrík, Karel Koberna

Analysis of cell cycle using High Content Screening (HCS) system.

pátek / 22. listopadu 2013 / 14.15-14.30 hod.

Pawel Znojek¹

¹ Institute of Molecular and Translational Medicine Faculty of Medicine and Dentistry, University Hospital, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

To develop a sensitive high content screening assay for cell cycle analysis, we used cells stably expressing the Cdt1 and the Geminin FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-based Cell-Cycle Indicator) reporters. As means of tracking cell cycle progression, FUCCI exploits cyclical expression and degradation of the ubiquitination oscillators Cdt1 and Geminin connected respectively with red and green fluorescent proteins to specifically mark cell cycle phases in living cells. For future screening purpose, the assay was automated regarding cell plating, addition of compounds, time lapse video-microscopy, and cytotoxicity assay. We validated this assay with anticancer therapeutics and by measuring of fluorescence intensity of Cdt1 and Geminin and results with the aid of image cytometry software.

Acknowledgement: This work was supported by grant projects CZ.1.07/2.3.00/30.0041 and CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

Activity of demethylating agents in a three-dimensional cell culture model

pátek / 22. listopadu 2013 / 14.30-14.45 hod.

Viswanath Das¹, Khushboo Agarwal¹, Petr Džubák¹, Marián Hajdúch¹

¹ Institute of Molecular and Translational Medicine, Olomouc,

Czech Republic

Growing evidence implicates the aberrant DNA methylation in tumorigenesis and leukemogenesis. Hypermethylation of promoter CpG islands results in transcriptional silencing of tumor suppressor genes, whereas global hypomethylation of DNA leads to chromosomal instability and aneuploidy. Accordingly, demethylating agents are being explored as promising epigenetic candidates for the treatment of solid tumors and other malignancies. While majority of in vitro studies with demethylating agents have been done in monolayer cell cultures, there are only sparing reports using multicellular tumor spheroid models that display intermediate complexity between in vivo tumors and monolayer cultures.

Herein, we report the demethylating activity of analogues of decitabin and azacitidine, LEM 791 and LEM 787, respectively, and that of a potential demethylating agent, LEM 789, in spheroid cultures of HCT116 colorectal carcinoma cells. With more physiologically relevant and tumor-like features, multicellular spheroids will be more predictive models of in vivo efficacy of potential demethylating agents before moving on to animal models.

Acknowledgment: This work was supported by internal grant of Palacky University (LF_2013_016), BIOMEDREG (CZ.1.05/2.1.00/01.0030) and Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (FR-TI4/625).

Identifikace molekulárního cíle pomocí metabolického značení SILAC

pátek / 22. listopadu 2013 / 14.45-15.00 hod.

Jiří Řehulka¹, Milan Urban², Niall Dickinson², Dušan

Holub¹, Petr Džubák¹, Marián Hajdúch¹

¹ Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci, Olomouc, Česká republika

² Katedra organické chemie, Ústav molekulární a translační medicíny, PřF UP, Olomouc, Česká republika

Kyselina betulinová je přírodní produkt s protizánětlivými, antibakteriálními, ale i protinádorovými a antioxidantními účinky. Její antiproliferativní efekt je namířen specificky proti nádorovým buňkám, dochází i k indukci programované buněčné smrti. Semisyntetické deriváty kyseliny betulinové mají zvýšenou protinádorovou a anti-HIV aktivitu.

Pro hledání molekulárního cíle přírodních nebo syntetických látek odvozených od kyseliny betulinové mohou být použity metody chemické proteomiky.

Cílem práce bylo zavedení metody kombinující afinitní purifikaci s kvantitativní proteomikou. Metoda je založena na specifické interakci léčiva nebo studované chemické látky s jejími proteinovými cíli v buňce. Modelový triterpen odvozený od kyseliny betulinové byl imobilizován na matici a zachycené proteiny analyzovány pomocí kapalinové chromatografie spřažené s hmotnostní spektrometrií (LC/MS). Použití metabolického značení SILAC umožnilo zvýšit specifitu a senzitivitu metody. Provedení reverzních replikátů s izotopicky značenými a neznačenými proteiny zvýšilo stringenci metody a eliminovalo falešně pozitivní výsledky.

Práce vznikla za finanční podpory operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace

(CZ.1.05/2.1.00/01.0030) a vnitřního grantu LF UP (LF_2013_016).

In vitro proteomické profilování buněčné linie CEM platinovými protinádorovými léčivy.

pátek / 22. listopadu 2013 / 15.00-15.15 hod.

Tomáš Oždian¹, Dušan Holub¹, Petr Džubák¹, Gabriela Rylová¹, Madhusudhan Kollareddy¹, Jiří Řehulka¹, Lenka Radová¹, Marián Hajdúch¹

¹ Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, Česká Republika

Platinová léčiva jsou již dlouhou dobu neodmyslitelnou součástí protinádorové terapie. Přes svou chemickou i biologickou podobnost se liší ve spektru nádorů, jež jsou jimi léčeny. Naším cílem bylo charakterizovat proteomické profily po použití těchto léčiv na modelové nádorové línii. Aby jejich porovnání získalo vyšší výpovědní hodnotu, přidali jsme do testovaného souboru vinkristin a daunorubicin jako chemicky a funkčně nepřibuzná léčiva. K profilování jsme zvolili buněčnou línii CCRF-CEM odvozenou od akutní lymfoblastické leukemie, která se vyznačuje dostatečnou citlivostí na širokou škálu běžně používaných cytostatik. Buněčná linie byla označena izotopicky značenými aminokyselinami a následně ošetřena vybranými léčivy o koncentraci 5xIC₅₀. Doba ošetření byla definována jako polovina času do indukce apoptózy. Takto ošetřené buňky byly smíchány s neznačenými kontrolními v poměru 1:1, lyzovány a následně separovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy, kde byly rozděleny do 20 frakcí. Jednotlivé elektroforetické frakce jsme podrobili štěpení trypsinem a analyzovali pomocí HPLC-MS na přístroji Orbitrap. Celkově jsme identifikovali 2964 ± 762 proteinů. Identifikované a kvantifikované

proteiny jsme vyhodnotili statistickou metodou Signifikance B dle Max Planckova Institutu. Signifikantně změněné proteiny se u cisplatinu podílely na buněčné signalizaci, metabolismu a buněčné mobilitě. Proteiny ovlivněné u karboplatinu se podílely na glykolýze, redukčně-oxidačním metabolismu, organizaci mitózy a telomerů. Proteiny ovlivněné oxaliplatinou byly převážně s nukleolární lokalizací, ribozomální proteiny, proteiny signálních drah a metabolické proteiny. U daunorubicinu byly nalezeny proteiny interagující s mikrotubuly a signální proteiny. U vinkristinu byly nalezeny signifikantně změněné signální proteiny. Metodou hierarchického clusterování jsme zjistili dle očekávání blízkou příbuznost cis a karboplatinu. Oxaliplatin byla nejdostupnějším léčivem z celého souboru. Toto bylo způsobeno velkým množstvím změněných ribozomálních proteinů.

Tento projekt byl podpořen interním grantem Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci (LF_2013_016 a LF_2013_015); infrastrukturu část tohoto projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena z Operačního programu Věda a výzkum pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Proteomický profil protinádorového účinku klinicky používaných rostlinných alkaloidů

pátek / 22. listopadu 2013 / 15.15-15.30 hod.

Jana Václavková¹, Tomáš Oždian¹, Dušan Holub¹, Petr Džubák¹, Gabriela Rylová¹, Madhusudhan Kollareddy¹, Jiří Řehulka¹, Lenka Radová¹, Marián Hajdúch¹

¹ Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice, Olomouc, ČR

Byl testován rozdíl vlivu protinádorových léčiv docetaxelu, vinkristinu a vinorelbínu na proteom buněčné linie CCRF-CEM. Zmíněná

léčiva patří do skupiny rostlinných alkaloidů a své uplatnění naleznou zejména při léčbě rakoviny prsu, plic a některých leukemií. Tato léčiva fungují jako mitotické jedy: docetaxel stabilizuje mikrotubuly a podporuje tvorbu mikrotubulů, vinorelbin a vinkristin inhibují skládání mikrotubulů a způsobují rozpad dělicího vřeténka. Proteomické profily buněk po ošetření cytostatiky nebyly doposud ve větší míře studovány. Analýza proteomického profilu může pomoci identifikovat nové diagnostické a prognostické markery, prediktivní faktory chemorezistence, nebo chemosenzitivity nádorových onemocnění pacientů k cytostatikům a také vhodné terapeutické cíle pro nová protinádorová léčiva. Proteomické profily protinádorového účinku léčiv byly analyzovány 1D-elektroforézou a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií (ESI/IT a MALDI/TOF-TOF). Pro kvantifikaci proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie byla použita metoda SILAC. Ve statistickém softwaru Perseus byly proteomické profily buněk ošetřených jednotlivými léčivy porovnány mezi sebou. V buňkách ošetřených jednotlivými léčivy byla zjištěna signifikantní změna exprese proteinů spojených s genovou expresí a sestřihem genů. K signifikantní změně exprese dále docházelo u chaperonů, proteinů signálních drah, metabolických proteinů, některých podjednotek proteasomu a proteinů zodpovědných za ubiquitinylaci proteinů. Proteomické profily byly také zpracovány pomocí softwaru pro analýzu buněčných procesů GeneGo.

Tato práce vznikla v rámci projektu, který byl podpořen interním grantem IGA UP LF_2013_16. Infrastrukturu část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Poznámky / Notes:



Poznámky / Notes:



Poznámky / Notes:

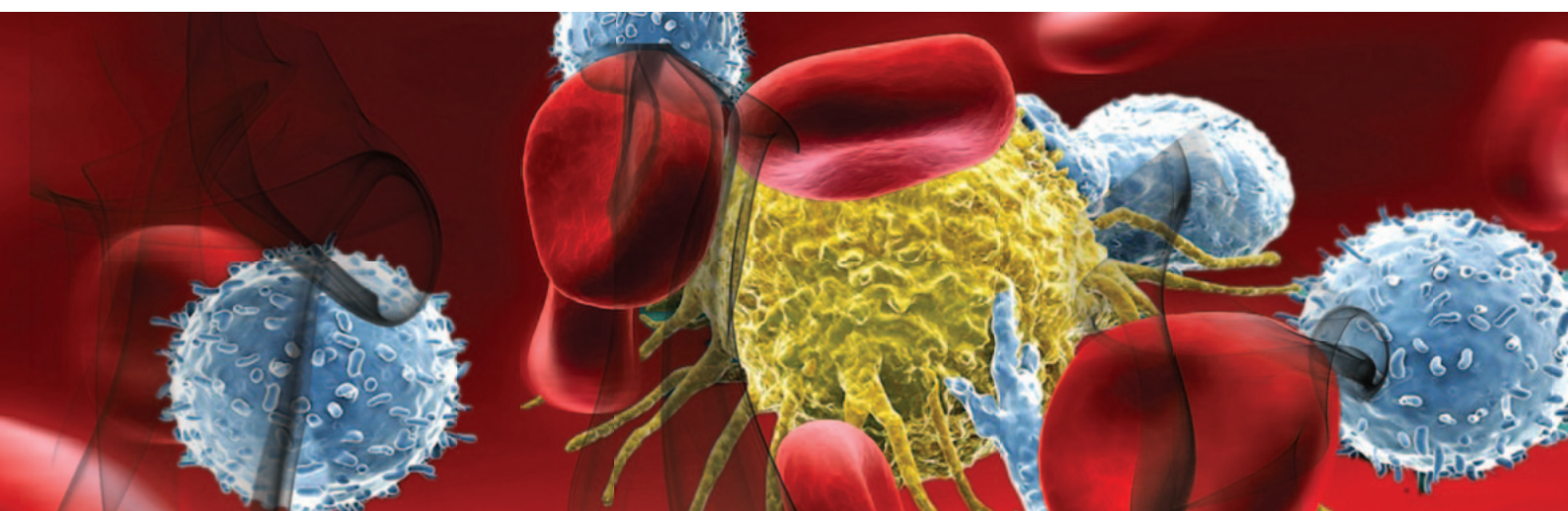


Poznámky / Notes:



Ústav molekulární a translační medicíny
Lékařské fakulty Univerzity Palackého
děkuje všem partnerům, kteří se zúčastnili
a podpořili konferenci

IX. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie



Generální partner:



Partneři:



Mediální partneři:





**INSTITUTE OF MOLECULAR AND
TRANSLATIONAL MEDICINE**

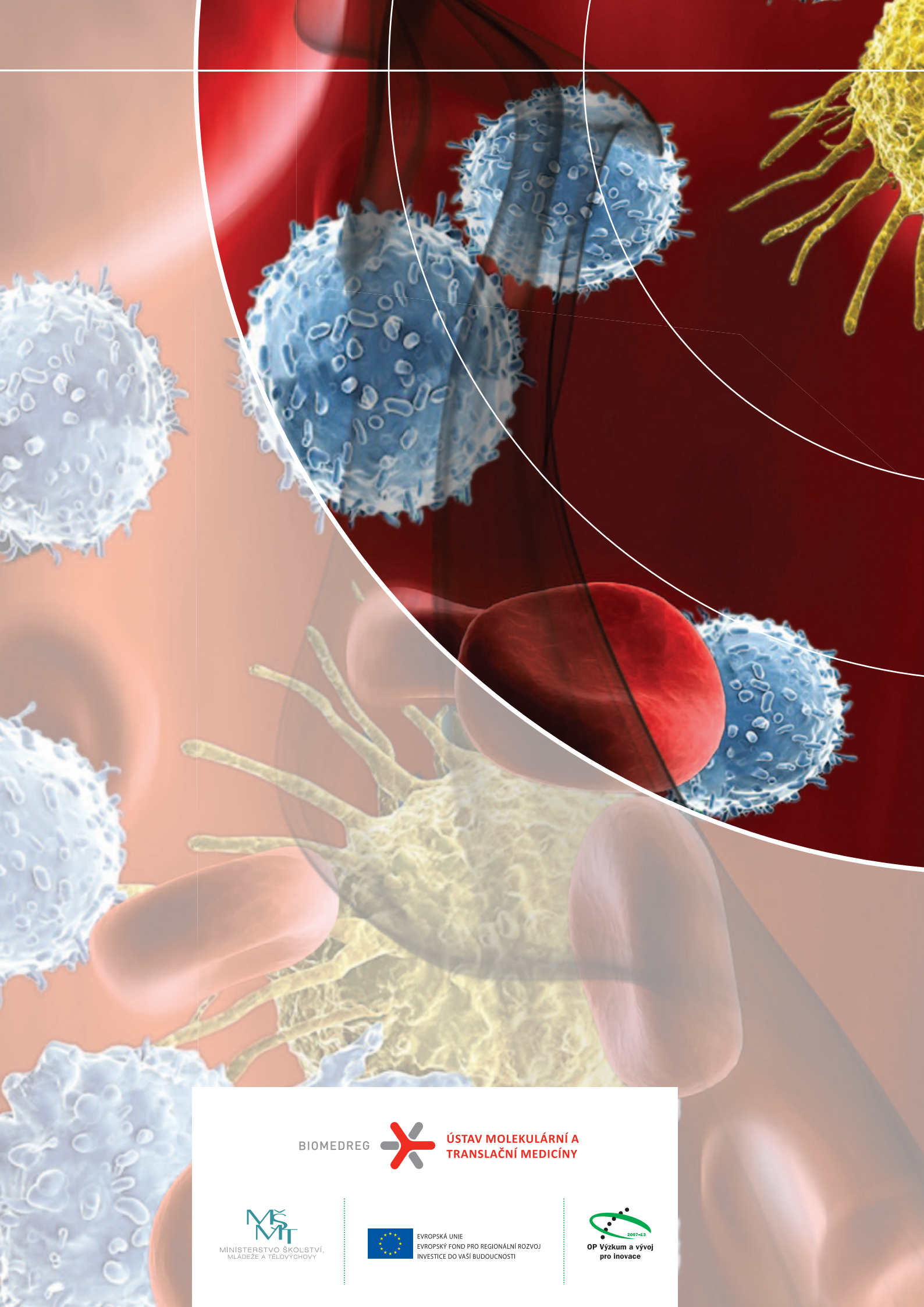
YOUR ACADEMIC PARTNER IN TRANSLATIONAL RESEARCH

One-stop access to:

- **High-end infrastructure with innovative translational methods, research protocols, data models and other state-of-the-art research tools**
- **High-quality data suited to the regulatory process for drugs and diagnostics development**
- **Flexible drug and biomarker discovery and validation engine**
- **Medicinal chemistry expertise including combinatorial chemistry and radiochemistry**
- **One of the largest academic uHTS/HCA platforms including screening under BSL2+/BSL3 conditions**
- **Integrated omics technologies (genomics, proteomics, metabolomics)**
- **Animal models and cutting-edge imaging technologies**
- **Screening and preclinical models based on primary human cells/tissues**
- **Large and diverse patient groups complemented with unique tissue biobanking**
- **Proof-of-concept clinical trials**
- **National node for EATRIS (European Advance Translational Medicine Infrastructure)**

**INSTITUTE OF MOLECULAR AND
TRANSLATIONAL MEDICINE**
FACULTY OF MEDICINE AND DENTISTRY
Palacký University in Olomouc
Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc
Czech Republic





BIOMEDREG



ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ A
TRANSLAČNÍ MEDICÍNY

MT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



OP Výzkum a vývoj
pro inovace