

Príloha č. 2 Zmluvy o poskytnutí prostriedkov mechanizmu

## OPIS PROJEKTU

Opis projektu pre účel výzvy s kódom 09I03-03-V04 „Štipendia pre excelentných výskumníkov a výskumníčky R2-R4“.

I. Všeobecné informácie o projekte	
Názov projektu:	Zapojenie hypoxiou indukovanej karboanhydrázy IX v interakcii nádorových buniek s krvnými bunkami počas metastatického šírenia
Akronym projektu:	METADISCA
Kód projektu:	09I03-03-V04-00444
Názov programu:	Plán obnovy a odolnosti SR
Komponent:	9. Efektívnejšie riadenie a posilnenie financovania výskumu, vývoja a inovácií Plánu obnovy a odolnosti Slovenskej republiky
Investícia:	3. Excelentná veda
Schéma pomoci	Neuplatňuje sa
Anotácia projektu	<i>Hematogénne šírenie nádorových buniek z primárneho tumoru je hlavnou cestou, ktorou sa dostávajú do sekundárných orgánov a zakladajú metastázy, ktoré sú hlavnou príčinou úmrtí na rakovinu. Cirkulujúce nádorové bunky (CTC) sa vylučujú do krvného obehu ako jednotlivé CTC alebo CTC zhluky, ktoré vykazujú vyšší metastatický potenciál. Intravazácia, kľúčový krok v šírení rakoviny, je kriticky ovplyvnená mikroprostredím nádoru, konkrétne hypoxiou. CAIX, kľúčový komponent adaptácie buniek na hypoxiu, je exprimovaný v mnohých karcinómoch so zlou prognózou a je prítomný aj v CTC. Funkčné vlastnosti CAIX sú relevantné pre šírenie klastrov CTC, vrátane zvýšenej migrácie/invazivity a úlohy v bunkovej adhézii. Tvorba heterotypických zhlukov nádorových buniek a krvných buniek v krvnom riečisku podporuje metastázovanie. V navrhovanom projekte budeme študovať interakcie medzi biomarkerom hypoxie CAIX a krvnými bunkami/vaskulárnymi adhéznymi proteínmi s cieľom vyvinúť novú antimetastatickú liečbu.</i>
II. Harmonogram projektu	
Začiatok realizácie Projektu (MM/RRRR)	08/2024
Ukončenie vecnej realizácie Projektu (MM/RRRR)	06/2026
III. Pracovné balíky projektu	
1. Interakcia CAIX-bunky	1. Interakcia CAIX-bunky
M1	M1
M16	M16
2. Úloha selektínu/integrínu	2. Úloha selektínu/integrínu
M7	M7
M20	M20
3. Identifikácia domény	3. Identifikácia domény
M13	M13
M23	M23
4. Invadovanie nádorových buniek	4. Invadovanie nádorových buniek
M13	M13
M23	M23

5. Zhluky CTC;	5. Zhluky CTC;
M8	M8
M23	M23
6. Riadenie projektu	6. Riadenie projektu
M1	M1
M23	M23

#### IV. Cieľ projektu a výstupy projektu

<b>Cieľ projektu</b>	<p>Šírenie rakovinových buniek a tvorba metastáz sú hlavnou príčinou úmrtí súvisiacich s rakovinou. Hlavný cieľ projektu je zameraný na objasnenie interakcie medzi cirkulujúcimi nádorovými bunkami (CTC) a imunitnými bunkami počas šírenia rakoviny krvou s potenciálnym využitím v antimetastatickej terapii s dôrazom na hypoxiu. Cirkulujúce nádorové bunky sú prekursori metastázovania u väčšiny solídnych nádorov. Povrchové markery spojené s CTC môžu slúžiť ako potenciálne ciele pre antimetastatickú terapiu. Keďže význam špecifických povrchových markerov sa môže líšiť v závislosti od typu rakoviny, spoločný jav väčšiny solídnych nádorov - hypoxia môže vyvolať všeobecnejšie ciele antimetastatickej liečby. Hypoxia, ktorá sa vzťahuje na stav nízkych hladín kyslíka v tkanivách, zohráva významnú úlohu pri šírení CTC do krvného obehu a sprostredkúva rôzne aspekty metastatického procesu vrátane prežívania CTC, vyhýbania sa imunitnému systému a adhézie na krvné bunky. V navrhovanom projekte budeme študovať interakcie medzi hypoxickým biomarkerom karbonickej anhydrázy IX (CAIX), ktorý je široko exprimovaný vo väčšine hypoxických nádorov, a krvnými bunkami s cieľom vyvinúť nové terapeutické stratégie zamerané na interakciu medzi CTC a imunitnými bunkami počas procesu metastázovania.</p> <p>Konkrétne ciele projektu sú tieto:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Objasniť, či expresia CAIX na povrchu nádorových buniek uľahčuje interakciu medzi nádorovými bunkami a krvnými bunkami. Tento špecifický cieľ sa dosiahne porovnaním interakcie medzi CAIX-vyradenými a hypoxiou indukovanými CAIX-expresnými bunkami (napr. MCF7, MDA-MB-231, HCT116 atď.) s krvnými bunkami (izolované PBMC, trombocyty, endotelová bunková línia) a porovnaním normoxických a hypoxických nádorových buniek s krvnými bunkami. Overenie sa vykoná pomocou pôvodne CAIX-negatívnych buniek v porovnaní s CAIX-wt nadmerne exprimujúcimi (transfekovanými) rakovinovými bunkami s krvnými bunkami.</li> <li>Definovať, či nádorom exprimovaný CAIX interaguje s adhezívnymi receptormi cievnych buniek - selektínmi (P-, L-, E-) a integrínom <math>\alpha 2\beta 1</math>, ktorý podporuje extravazáciu a metastázovanie nádorových buniek. Tento špecifický cieľ sa dosiahne ko-inkubáciou CAIX-negatívnych oproti CAIX-wt nadmerne exprimovaným (transfekovaným) nádorovým bunkám s purifikovanými chimérickými selektínovými molekulami (P-, L-, E-) a analyzuje sa pomocou prietokovej cytometrie a konfokálnej mikroskopie. Použijú sa aj hypoxické rakovinové bunky s endogénnou expresiou CAIX s následnou kvantifikáciou selektínového signálu pre CAIX-positívnu vs. CAIX-negatívnu subpopuláciu. Overenie sa vykoná pomocou hypoxických rakovinových buniek s nadmernou expresiou CAIX-KO a CAIX-wt s purifikovanými selektínmi (FACS, IF-kolokalizácia). Interakcia sa bude hodnotiť aj koprecipitáciou purifikovaných selektínových chimér a purifikovaného fúzneho proteínu CAIX-SBP. Overenie sa vykoná koprecipitáciou purifikovaných selektínov s extraktmi rakovinových buniek a/alebo médiami s bunkovým stavom obsahujúcimi extrašedú formu proteínu CAIX (CAIX-ES).</li> </ol>
----------------------	---

	<p><i>Interakcia CAIX s integrínom <math>\alpha 2\beta 1</math> na povrchu trombocytov sa dosiahne metódou koimunoprecipitácie po spoločnej kultivácii rakovinových buniek s trombocytmi. Overenie sa vykoná pomocou metódy imunofluorescenčnej kolokalizácie a proximity ligation assay (PLA), ktorá indikuje priamu interakciu proteínov in situ.</i></p> <p><i>3. Potvrdenie interakcie medzi hypoxiou indukovaným CAIX na povrchu rakovinových buniek a vybranými krvnými bunkami, ktoré sa podieľajú na tvorbe heterotypických zhlukov CTCs - krvných buniek, ktoré sú rozhodujúce pre hematogénne metastázy.</i></p> <p><i>V závislosti od výsledkov z cieľa 2 porovnáme interakciu rakovinových buniek s nadmernou expresiou CAIX a CAIX-negatívnych rakovinových buniek (alebo CAIX-KO vs CAIX-wt) s izolovanými vybranými krvnými bunkami (trombocyty, neutrofilly) exprimujúcimi špecifické selektíny/integríny (P-, L-, <math>\alpha 2\beta 1</math> integrín) pomocou prietokovej cytometrie. Identifikácia špecifických proteínov interagujúcich s CAIX sa vykoná pomocou protilátok blokujúcich funkciu príslušných receptorov (napr. anti-P-selektín a <math>\alpha 2\beta 1</math>-integrín Ab).</i></p> <p><i>Overenie sa vykoná pomocou testu adhézie pomocou konfokálnej mikroskopie s analýzou kolokalizácie CAIX a študovaných proteínov a PLA testu. Túto interakciu overíme aj pomocou rakovinových buniek s endogénnou expresiou CAIX indukovanou hypoxiou a následnou kvantifikáciou viazaných buniek na CAIX-pozitívne alebo CAIX-negatívne subpopulácie</i></p> <p><i>4. Identifikovať špecifickú doménu CAIX zodpovednú za interakciu selektínu s integrínom.</i></p> <p><i>Tento cieľ sa dosiahne použitím delečných mutantov CAIX s odstránenou jednou z extracelulárnych domén CAIX (dPG, dCA). Určíme význam glykozylačných miest CAIX pomocou glykozylačných mutantov (Ser54, Thr115 - v prípade domény PG; Asp346 - v prípade domény CA).</i></p> <p><i>Overenie sa vykoná pomocou špecifických protilátok, ktoré sa viažu na PG-doménu (M75) alebo CA-doménu (VII/20, V/10). Tento prístup prináša aj poznatok, či by protilátky proti CAIX mohli byť účinné v antimetastatickej liečbe.</i></p> <p><i>5. Hodnotenie schopnosti invázie a aktivácie signálnych dráh CAIX+/CAIX-nádorových buniek prostredníctvom priameho kontaktu s krvnými bunkami uvedenými v predchádzajúcich cieľoch (trombocyty/neutrofilly)</i></p> <p><i>Tento cieľ sa dosiahne pomocou testu transmigrácie rakovinových buniek inkubovaných s bunkami izolovanými z ľudskej krvi (trombocyty/neutrofilly) počítaním migrovaných buniek. Porovnáme tu vplyv priameho kontaktu s krvnými bunkami na inváziu s ohľadom na expresiu CAIX (CAIX-KO verzus hypoxické rakovinové bunky exprimujúce CAIX; CAIX-negatívne verzus CAIX-overexpresívne (transfekované) rakovinové bunky; normoxické verzus hypoxické rakovinové bunky). Vplyv spoločnej kultivácie na signálne dráhy podieľajúce sa na invázii sa bude analyzovať pomocou proteómového profilového testu (XL-oncology array; fosfokinázová array) a mRNA.</i></p> <p><i>Overenie vplyvu expresie CAIX na schopnosť invázie po priamom kontakte s krvnými bunkami sa vykoná pomocou protilátok blokujúcich funkciu (anti-CAIX, antiselektíny/integríny). Rovnaký prístup sa použije pri hodnotení signálnych dráh).</i></p> <p><i>6. Hodnotenie prítomnosti CAIX v CTC - zhlukoch krvných buniek oddelených z klinických vzoriek pacientov s rakovinou a ich korelácia s klinickým výsledkom.</i></p> <p><i>Tento cieľ bude dosiahnutý v spolupráci s prof. Borsigom Luborom (Inštitút fyziológie, Univerzita v Zürichu, Švajčiarsko) a prof. Aceto Nicola (Inštitút molekulárnych zdravotných vied, ETH Zürich, Švajčiarsko). CTC získané od pacientov sa budú zachytávať pomocou separačnej kazety Parsortix</i></p>
<p><b>Výstupy projektu</b></p>	<p><b>WP1</b> D1.1 Protokol popisujúci adhézny test medzi vybranými krvnými bunkami a TC D1.2 Seminár - inštitucionálny seminár s prezentáciou výsledkov o zapojení CAIX do interakcií s krvnými bunkami otvorený aj pre vedcov mimo BMC</p> <p><b>WP2</b></p>

	<p>D2.1 Purifikovaný proteín CAIX-SBP</p> <p>D2.2 Bunkové extrakty získané po kokultivácii nádorových buniek a krvných buniek</p> <p>D2.3 Protokol - opis koprecipitačnej metódy použitej na potvrdenie interakcie medzi CAIX a selektínmi/integrínom <math>\alpha 2\beta 1</math></p> <p>D2.4 Priebežná správa - zhrnutie najdôležitejších výsledkov dosiahnutých počas prvých 18 mesiacov realizácie projektu</p> <p>D2.5 Verejná prezentácia výsledkov projektu</p> <p><b>WP3</b></p> <p>D3.1 Transfekované HEK bunky exprimujúce delečné a glykozylačné mutanty CAIX proteínu fúzovaného s SBP, konkrétne dPG-SBP, dCA-SBP, CAIX-S54-SBP, CAIX-T115-SBP a CAIX-N346-SBP</p> <p>D3.2 Purifikované delečné a glykozylačné mutanty proteínu CAIX fúzované s SBP</p> <p>D3.3 Konferencia - aktívna účasť na medzinárodnej vedeckej konferencii s cieľom podeliť sa o pokrok s vedeckým publikom</p> <p>D3.4 Publikácia - článok vo významnom vedeckom časopise s otvoreným prístupom indexovanom vo WoS/Scopus, zaradený v kvartile Q1/Q2</p> <p><b>WP4</b></p> <p>D4.1 Proteínové bunkové extrakty získané po priamej kokultivácii nádorových buniek a krvných buniek s ohľadom na expresiu CAIX</p> <p>D4.2 RNA izolovaná po priamej kokultivácii nádorových buniek a krvných buniek</p> <p>D4.3 Zoznam diferenciálne exprimovaných proteínov po kokultivácii vzhľadom na expresiu CAIX na TC</p> <p>D4.4 Zoznam diferenciálne exprimovaných génov po kokultivácii vzhľadom na expresiu CAIX na TC</p> <p>D4.5 Rukopis pripravený na zaslanie do príslušného vedeckého časopisu s otvoreným prístupom indexovaného vo WoS/Scopus, zaradený do kvartilu Q1/Q2</p> <p><b>WP5</b></p> <p>D5.1 Seminár - inštitucionálny seminár rekapitulujúci výsledky získané počas realizácie projektu, otvorený aj pre vedcov mimo BMC</p> <p>D5.2 Záverečná správa - podrobný opis najdôležitejších nových výsledkov získaných počas realizácie projektu vrátane nových metód zavedených na účely projektu</p> <p><b>WP6</b></p> <p>D6.1 Úvodné stretnutie</p> <p>D6.2 Úložisko projektu obsahujúce všetky výsledky projektu, protokoly, súbory</p> <p>D6.3 Projektové stretnutia (interné)</p> <p>D6.4 Projektové stretnutia (externé)</p> <p>D6.5 Predloženie výskumného projektu so zapojením výskumníka - príprava a predloženie výskumného projektu, ktorý vychádza z výsledkov získaných počas realizácie projektu a rozširuje ich</p>																												
<p><b>Míľniky projektu</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Číslo míľnika</th> <th>Míľnik</th> <th>Číslo pracovného balíka</th> <th>Metóda overovania</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>Identifikácia krvných buniek interagujúcich s CAIX</td> <td>WP1</td> <td>Úložisko projektu</td> </tr> <tr> <td>2.</td> <td>Proteín interagujúci s CAIX</td> <td>WP2</td> <td>Úložisko projektu</td> </tr> <tr> <td>3.</td> <td>Identifikácia CAIX-interakčnej domény</td> <td>WP3</td> <td>Úložisko projektu</td> </tr> <tr> <td>4.</td> <td>Vplyv CAIX na inváziu TC vyvolanú BCs</td> <td>WP4</td> <td>Úložisko projektu</td> </tr> <tr> <td>5.</td> <td>Vplyv CAIX na signalizáciu vyvolanú TCs-BCs</td> <td>WP4</td> <td>Úložisko projektu</td> </tr> <tr> <td>6.</td> <td>Detekcia CAIX v klastroch CTCs-BCs u pacientov</td> <td>WP5</td> <td>Úložisko projektu</td> </tr> </tbody> </table>	Číslo míľnika	Míľnik	Číslo pracovného balíka	Metóda overovania	1.	Identifikácia krvných buniek interagujúcich s CAIX	WP1	Úložisko projektu	2.	Proteín interagujúci s CAIX	WP2	Úložisko projektu	3.	Identifikácia CAIX-interakčnej domény	WP3	Úložisko projektu	4.	Vplyv CAIX na inváziu TC vyvolanú BCs	WP4	Úložisko projektu	5.	Vplyv CAIX na signalizáciu vyvolanú TCs-BCs	WP4	Úložisko projektu	6.	Detekcia CAIX v klastroch CTCs-BCs u pacientov	WP5	Úložisko projektu
Číslo míľnika	Míľnik	Číslo pracovného balíka	Metóda overovania																										
1.	Identifikácia krvných buniek interagujúcich s CAIX	WP1	Úložisko projektu																										
2.	Proteín interagujúci s CAIX	WP2	Úložisko projektu																										
3.	Identifikácia CAIX-interakčnej domény	WP3	Úložisko projektu																										
4.	Vplyv CAIX na inváziu TC vyvolanú BCs	WP4	Úložisko projektu																										
5.	Vplyv CAIX na signalizáciu vyvolanú TCs-BCs	WP4	Úložisko projektu																										
6.	Detekcia CAIX v klastroch CTCs-BCs u pacientov	WP5	Úložisko projektu																										

V. Informácie o výskumníkovi/výskumníčke			
Identifikácia výskumníka/výskumníčky	Eliška Švastová		
Typ podpory/fáza kariéry	B) Štipendium výskumníka R3		
Vedná oblasť	Prírodné a lekárske vedy		
VI. Rozpočet projektu			
Celková výška oprávnených výdavkov	164 636,10 €		
Výška prostriedkov mechanizmu bez DPH	157 665,75 €		
Výška prostriedkov mechanizmu – na DPH	6 970,35 €		
Prostriedky mechanizmu na mzdové náklady výskumníka	Prostriedky mechanizmu na výskum bez DPH	Prostriedky mechanizmu na výskumný tím	Prostriedky mechanizmu na nepriame náklady bez DPH
86 814,00 €	19 500,00 €	36 000,00 €	15 351,75 €