

Abstract

Critical role of Bruton's Tyrosine Kinase signaling in Neuroblastoma cancer stem cells: *in vitro* and *in silico* gene-target prediction

Background: Neuroblastoma, a common childhood tumor, remains one of the most elusive to treat in pediatric oncology clinics, thus, to date, high-risk neuroblastoma is associated with very low survival rates. To overcome this, novel and more effective therapeutic strategies are continually being explored. In this study, we propose that the Bruton Tyrosine Kinase (BTK) as a potential molecular target for neuroblastoma therapy. Recent studies have demonstrated the involvement of BTK in solid tumors such as in the breast, ovary, prostate and lung cancers. These findings also provided insights into the role of BTK in cellular processes such as cell growth, differentiation, motility, and inflammation, all of which contribute to the progression of cancer, when deregulated. Despite its role in many solid tumor types, the role of BTK in neuroblastoma remains largely unexplored.

Methods: To confirm the importance of BTK in the neuroblastoma patients, we used dataset that were downloaded from R2 dataset. The function of BTK we assessed in the in vitro study using SK-N-BE(2) and SH-SY5Y cell lines (neuroblastoma cell lines). These cell lines were then treated with BTK shRNA and Ibrutinib to inhibit BTK activity. We then performed western blot, viability, migration invasion, and tumorsphere assays. We also combined ibrutinib and cisplatin to evaluate these drugs synergism. In addition, we applied *in silico* approach to find the most probable miRNA to target BTK and its potential to act as biomarker in neuroblastoma.

Results: Our results showed that BTK activity inhibition using shRNA technology and Ibrutinib showed marked decrease in colony-formation, migration, invasion and neurosphere-forming capabilities. Our drug combination experiment also showed that ibrutinib has synergism with cisplatin in eradicating neuroblastoma cancer cells. We also found that miRNA hsa-let-7a-2 is highly predicted to target BTK and may potentially be used as a prognostic biomarker in neuroblastoma.

Conclusion: In summary, our findings show for the first time, to our knowledge, that BTK is a therapeutically-targetable driver of neuroblastoma, and highlight its potential role as a novel anti-neuroblastoma therapeutic strategy.

Keywords: Neuroblastoma, BTK, cancer stem cell, miRNA

Abstrak

Peran penting dari Bruton's Tyrosine Kinase signaling dalam sel induk kanker

Neuroblastoma: prediksi target gen in vitro dan in silico

Latar belakang: Neuroblastoma, tumor yang umum ditemui pada masa kanak-kanak, masih menjadi salah satu kanker yang paling sulit diobati di klinik onkologi pediatric. Hingga saat ini, neuroblastoma risiko tinggi dikaitkan dengan tingkat kelangsungan hidup yang sangat rendah. Untuk mengatasi hal ini, strategi terapi baru dan lebih efektif terus dieksplorasi. Dalam studi ini, kami mengusulkan bahwa Bruton Tyrosine Kinase (BTK) sebagai target molekuler potensial untuk terapi neuroblastoma. Penelitian terbaru menunjukkan keterlibatan BTK pada tumor padat seperti pada kanker payudara, ovarium, prostat dan paru-paru. Temuan ini juga memberikan wawasan tentang peran BTK dalam proses seluler seperti pertumbuhan sel, diferensiasi, motilitas, dan peradangan, yang semuanya berkontribusi pada perkembangan kanker, ketika dideregulasi. Meskipun perannya dalam banyak jenis tumor padat, peran BTK di neuroblastoma sebagian besar masih belum dieksplorasi.

Metode: Untuk mengkonfirmasi pentingnya BTK pada pasien neuroblastoma, kami menggunakan dataset yang diunduh dari dataset R2. Fungsi BTK kami menilai dalam studi in vitro menggunakan *cell line* SK-N-BE (2) dan SH-SY5Y (*cell line* neuroblastoma). *Cell line* ini kemudian diobati dengan BTK shRNA dan Ibrutinib untuk menghambat aktivitas BTK. Kami kemudian melakukan uji western blot, viabilitas, invasi migrasi, dan *tumorsphere*. Kami juga mengkombinasikan ibrutinib dan cisplatin untuk mengevaluasi sinergisme kedua obat ini. Selain itu, kami menerapkan pendekatan in silico untuk menemukan miRNA yang paling mungkin untuk menargetkan BTK dan potensinya untuk bertindak sebagai biomarker di neuroblastoma.

Hasil: Hasil penelitian kami menunjukkan bahwa penghambatan aktivitas BTK menggunakan teknologi shRNA dan Ibrutinib menunjukkan penurunan yang nyata pada kemampuan pembentukan koloni, migrasi, invasi dan pembentukan *tumorsphere*. Percobaan kombinasi obat kami juga menunjukkan bahwa ibrutinib memiliki sinergisme dengan cisplatin dalam memberantas sel kanker neuroblastoma. Kami juga menemukan bahwa miRNA hsa-let-7a-2 sangat diprediksi menargetkan BTK dan berpotensi digunakan sebagai biomarker prognostik di neuroblastoma.

Kesimpulan: Singkat kata, temuan kami menunjukkan untuk pertama kalinya, sejauh pengetahuan kami, bahwa BTK adalah pendorong neuroblastoma yang dapat disasar secara terapeutik, dan menyoroti potensinya sebagai terapi anti-neuroblastoma baru.

Kata kunci: Neuroblastoma, BTK, cancer stem cell, miRNA