



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-0720-10

Analýza voľnej fetálnej DNA získanej zo slín tehotných žien a jej potenciálne využitie v neinvazívnej prenatálnej DNA diagnostike

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Gabriel Minárik, PhD.**

Príjemca **GENETON s.r.o.**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. GENETON s.r.o.
2. Univerzita Komenského v Bratislave Prírodovedecká fakulta
3. Univerzita Komenského v Bratislave Lekárska fakulta
- 4.
- 5.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

- 1.
- 2.
- 3.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

1. PCT/EP2014/068817 - Detection of contamination in noninvasive prenatal fetal gender test
- 2.
- 3.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Durdiaková J, Kamodyová N, Ostatníková D, Vlková B, Celec P.: Comparison of different collection procedures and two methods for DNA isolation from saliva. Clin Chem Lab Med. 2012 Apr;50(4):643-7
2. Repiská G, Sedláčková T, Szemes T, Celec P, Minárik G. Selection of the optimal manual method of cell free fetal DNA isolation from maternal plasma. Clin Chem Lab Med. 2012 Dec 8:1-5
3. Kamodyová N, Durdiaková J, Celec P, Sedláčková T, Repiská G, Sviežená B, Minárik G. Prevalence and persistence of male DNA identified in mixed saliva samples after intense kissing. Forensic Sci Int Genet. 2013 Jan;7(1):124-8

4. Sedlackova T, Repiska G, Minarik G. Selection of an optimal method for co-isolation of circulating DNA and miRNA from the plasma of pregnant women. Clin Chem Lab Med. 2014 Nov;52(11):1543-8
5. Repiská G, Sedláčková T, Szemes T, Minárik G. Effect of Different DNA Concentration Methods on Performance of Non-Invasive Fetal Y-Chromosomal Short Tandem Repeat Profiling from Maternal Plasma. Fetal Diagn Ther. 2014 Aug 1. [Epub ahead of print]

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky projektu boli uplatnené pri:

1. skvalitnení neinvazívnej prenatálnej diagnostiky pri nezávislom potvrdení neinvazívneho prenatálneho určenia pohlavia plodu, kedy je možné na základe Y-STR analýzy maternálnej cirkulujúcej DNA pozitívne potvrdiť pohlavie plodu zároveň aj s potvrdením otcovstva. Služba je v súčasnosti komerčne dostupná;
2. zavedení rýchleho a relatívne lacného neinvazívneho prenatálneho testu otcovstva, ktoré je možné uplatniť v prípade, že tehotná žena nesie plod mužského pohlavia. Služba je v súčasnosti komerčne dostupná;
3. pilotnom testovaní a optimalizácii metódy na odhalenie externej kontaminácie cirkulujúcej DNA získanej od tehotnej ženy externou mužskou DNA. Po komplexnom laboratórnom testovaní metódy bol jej princíp podaný vo forme patentovej žiadosti na patentovom úrade;
4. identifikácii obmedzení súvisiacich s odberom slinných vzoriek od tehotných žien. Identifikovaný postup pri odbere a skladovaní vzoriek slín sa využíva pri ďalších štúdiách;
5. zavedení metodiky pre celogenómovú analýzu slinných vzoriek a následnej bioinformatickej analýzy, ktorá poukazuje na prítomnosť fetálnej DNA v slinách tehotných žien. V analýze slinných vzoriek na rozsiahlejšom súbore pre potvrdenie výsledkov sa v súčasnosti stále pokračuje;
6. identifikácii možností koizolácie cirkulujúcej DNA a miRNA z rovnakej vzorky s využitím štandardizovaného laboratórneho protokolu.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

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

V priebehu riešenia projektu boli postupne naplnené čiastkové ciele projektu, ktoré umožnili jeho postupné úspešné napredovanie. Medzi ne patrili najmä - vytvorenie rozsiahlej biobanky so vzorkami krvi a slín od tehotných žien, identifikácia optimálneho spôsobu odberu slín, optimalizácia protokolu izolácie DNA zo slín a kontrolných krvných vzoriek, identifikácia optimálneho spôsobu koncentrovania izolovanej cirkulujúcej DNA, determinácia možných dopadov kontaminácie externou DNA v prípade analýzy vzoriek slín, dizajn a zavedenie postupu pre determináciu úrovne fragmentácie fetálnej DNA v maternálnej cirkulácii, identifikácia spôsobu umožňujúceho odhalenie externej kontaminácie cirkulujúcej DNA, zavedenie postupov pre identifikáciu paternálnych alel STR polymorfizmov v cirkulujúcej DNA, zavedenie celogenómových analýz umožňujúcich detekciu paternálnych alel SNP polymorfizmov, identifikácia možnosti koizolácie cirkulujúcej DNA a miRNA, detekcia prítomnosti fetálnej DNA v exozomálnej frakcii vzoriek plazmy a séra tehotných žien. Realizované analýzy však aj napriek svojej komplexnosti a rozsiahlemu súbore získaných výsledkov neumožnili jednoznačne a definitívne preukázať prítomnosť fetálnej DNA v maternálnych slinách. Na základe výsledkov celogenómového sekvenovania DNA realizovaného v záverečných fázach projektu existuje stále odôvodnený predpoklad, že fetálna DNA sa v slinách tehotných žien nachádza. Preto v súčasnosti pokračuje validácia výsledkov celogenómového sekvenovania na väčšom súbore vzoriek získaných od tehotných žien tesne pred pôrodom. Táto by mala čoskoro priniesť definitívne výsledky umožňujúce potvrdenie alebo vyvrátenie hypotézy o prítomnosti fetálnej DNA v slinách tehotných žien.

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

During the project planned milestones which allowed the gradual successful progress were reached. These included in particular – creation of biobank with saliva and blood samples from pregnant women, the identification of the optimal sampling of saliva, optimization of protocol for isolation of DNA from saliva and control blood samples, identification of the optimal method of concentrating of the isolated circulating DNA, determination of potential impact of external DNA contamination in the event of analysis of saliva samples, design and implementation of the procedure for the determination of the level of fragmentation of fetal DNA in maternal circulation, the identification of the method for detection of external contamination of circulating DNA, the introduction of procedures to identify paternal alleles of STR polymorphisms in circulating DNA, the introduction of whole genome analysis allowing the detection of fetal alleles of SNP polymorphisms, identification of the possibility of co-isolation of circulating DNA and miRNA, detection of fetal DNA in exosomal fraction of plasma and serum of pregnant women. However, despite the complexity and extensiveness of obtained results it was not possible to undoubtedly and definitely confirm the presence of fetal DNA in maternal saliva. But the results of whole-genome DNA sequencing carried out in the final stages of the project still indicate that, there is still reason to assume that fetal DNA is present in the saliva of pregnant women. Therefore, at present, validation study based on whole genome sequencing on a larger set of samples obtained from pregnant women shortly before delivery is running. This should soon bring definitive results to confirm or refute the hypothesis of the presence of fetal DNA in the saliva of pregnant women.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

Zodpovedný riešiteľ

RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

V Bratislave 28.11.2014

Štatutárny zástupca príjemcu

RNDr. Tomáš Szemes, PhD.

V Bratislave 28.11.2014

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu