



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-14-0327

Identifikácia nových biomarkerov a alternatívnych prístupov k analýze nádorovej DNA využiteľných v diagnostike a prognostike rakoviny prsníka

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

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita Komenského v Bratislava Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Žiadne.

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

Žiadne.

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

Prezentácia priebežných výsledkov formou posterov a prihlášok prijatých na významné slovenské, európske a svetové konferencie:

ESHG 2016-2018 - poster, v roku 2017 získané štipendium na základe zaslaného abstraktu

SABCS 2017-2018 - poster

ACTC 2017 - poster

Dni molekulovej patológie 2017 - prednáška

NewsLab 2/2018 - dva články

NewsLab 1/2019 - jeden článok prijatý do tlače

Uplatnenie výsledkov projektu

Spomedzi výsledkov výskumu získaných v priebehu riešenia projektu je možné v rámci hodnoteného obdobia v laboratórnej a klinickej praxi uplatniť nasledovné:

1. dizajn pre ochorenie špecifického génového panelu a analýza vzoriek DNA získaných z primárnych nádorov (tkanív) pacientov s rakovinou prsníka prostredníctvom masívneho paralelného sekvenovania, vrátane bioinformatickej a štatistickej analýzy získaných výsledkov pre identifikáciu genotypovo-fenotypových korelácií u pacientov rozdelených do skupín podľa prítomnosti rôznych typov CTC;

2. izoláciu celkovej RNA v hlbokozmrazených vzorkách primárnych nádorov (tkanív) pre účely analýzy prostredníctvom expresnej microarray zameranej na detekciu štatisticky významne odlišne exprimovaných RNA (mRNA a miRNA) s ohľadom na rozdelenie

pacientov do skupín podľa prítomnosti rôznych typov CTC;

3. zavedenie konfirmačných qRT-PCR analýz pre identifikované štatisticky signifikantne rozdielne exprimovaných mRNA (v súčasnosti je validovaných 10 kandidátnych mRNA);
4. izoláciu cirkulujúcej DNA z plazmy vybraných pacientov a overenie možnosti prípravy NGS knižníc pre ciele resekvenovanie pre ochorenie špecifického panelu génov za účelom pilotnej štúdie zameranej na identifikáciu nádorovo-špecifických mutácií vo vzorkách formou tzv. tekutej biopsie;
5. overenie možnosti prípravy genomických knižníc z cirkulujúcej DNA pre celogenómové NGS sekvenovanie s nízkym pokrytím pre účely sledovania zmien CNV typu na úrovni celého genómu uplatniteľnú pri analýze vzoriek formou tzv. tekutej biopsie.

V budúcnosti je možné v prípade potvrdenia rozdielnej expresie identifikovaných kandidátnych RNA počítať s ich zavedením do klinickej praxe ako nových biomarkerov pre stratifikáciu pacientov s potenciálnou diagnostickou, prognostickou, či o terapii rozhodujúcou hodnotou. V súvislosti s touto ambíciou je však potrebné počítať s dlhším časovým obdobím na hodnotenie získaných výsledkov s ohľadom na dlhodobo prebiehajúci zber klinických údajov týkajúcich sa pacientov, ktorých vzorky boli analyzované v priebehu projektu. V súčasnosti bol realizovaný zber klinicky relevantných údajov od týchto pacientov v rámci 5-ročného hodnoteného obdobia s ohľadom na dobu trvania bez progresie ochorenia a celkoveého prežívania pacientov s ohľadom na ich stratifikáciu podľa prítomnosti EMT CTC a zber údajov ďalej pokračuje.

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

S ohľadom na v projekte plánované ciele je možné konštatovať, že všetky boli naplnené v plánovanom rozsahu. K jednotlivým čiastkovým cieľom je možné uviesť konkrétne príklady dosiahnutých výsledkov:

1. Výber vzoriek z biobanky a zber klinických údajov - vybraných bolo 70 vzoriek umožňujúcich zabezpečenie nielen biologických materiálov reprezentovaných hlbokozmrazenými vzorkami z primárnych nádorov ale aj komplexných klinických údajov umožňujúcich následnú realizáciu genotypovo-fenotypových korelačných analýz. Pre pilotnú štúdiu analýz vzoriek formou tzv. tekutej biopsie bolo vybraných 15 vzoriek hlbokozmrazenej plazmy pre ciele analýzu formou cieleho resekvenovania panelu nádorovo-špecifických génov s vysokým pokrytím. Pre všetky analyzované vzorky sú dostupné klinicky relevantné údaje, pričom doba sledovania pacientov už ku dnešnému dňu presiahla 5 rokov.
2. RNA expresná analýza - zo vzoriek hlbokozmrazených primárnych nádorov (tkanív) vybraných pre účely projektu bola izolovaná RNA s vysokou čistotou a kvalitou, ktorá umožňovala realizáciu RNA expresných analýz formou microarray. Boli identifikované mRNA a miRNA s rozdielnou expresiou v rámci podskupín pacientov s identifikovanými EMT CTC (pacienti so zlou prognózou) a bez identifikovaných EMT CTC (pacienti s dobrou prognózou). V súčasnosti prebieha validácia 10 kandidátnych rozdielne exprimovaných mRNA.
3. Dizajn BRCA špecifického génového panelu pre NGS ciele resekvenčné analýzy - dizajn génového panelu bol realizovaný a NGS knižnice pripravené a sekvenované prostredníctvom NGS.
4. NGS analýzy rôznych typov vzoriek od pacientov - NGS knižnice boli pripravené úspešne ako pre vzorky DNA získané z hlbokozmrazených primárnych nádorov (tkanív) tak aj zo vzoriek plazmy. Navyše bola otestovaná a zavedená metóda prípravy celogenómových NGS knižníc pre identifikáciu genomických zmien typu CNV zo vzoriek plazmy.
5. Bioinformatická analýza získaných NGS dát - pre všetky analyzované vzorky prostredníctvom NGS boli získané dáta z cieleho resekvenovania panelu génov so štandardným aj vysokým pokrytím cieľových genomických oblastí ako aj z celogenómového sekvenovania s nízkym pokrytím úspešne analyzované v rámci projektu zavedenými resp. optimalizovanými bioinformatickými postupmi.
6. Genotypovo-fenotypovými korelačnými analýzami boli identifikované zmeny v expresii desiatok RNA (mRNA aj miRNA) pre podskupiny pacientov s rôznymi typmi CTC (90 mRNA a 10 miRNA pre EP CTC podskupinu, 199 mRNA a 16 miRNA pre EMT CTC podskupinu) a bol identifikovaný štatisticky signifikantne zvýšený výskyt BRCA1/2 nádorovo-špecifických mutácií v EP CTC podskupine pacientov.
7. Validácia zistených genotypovo-fenotypových korelácií - v nadväznosti na tento cieľ

projektu boli zavedené qRT-PCR analyzačné eseje pre validáciu výsledkov RNA expresných analýz pre 9 kandidátnych mRNA. Validácia kandidátnych mRNA v súčasnosti prebieha na skupine 70 vzoriek.

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

With regard to the planned objectives of the project, it can be stated that they were all fulfilled in the planned range. For each of the partial objectives, it is possible to give more detailed overview about achieved results:

1. Selection of samples from biobank and collection of clinical data - 70 samples were selected and provided not only as biological materials represented by deep-frozen samples from primary tumors (tissues) but also with complex clinical data enabling subsequent genotype-phenotype correlation analysis. For the pilot study of sample analyzes of so-called liquid biopsy were selected 15 deep-frozen plasma samples and used for targeted genomic analyses. All clinically relevant data are available for all the analyzed samples, with a follow-up period of up to 5 years.
2. RNA expression analysis - from samples of deep-frozen primary tumors (tissues) selected for the project RNA of high purity and quality were isolated and RNA expression microarray analyses were successfully performed. Different expression of mRNAs and miRNAs was identified in subgroups of patients with identified presence of CTC (patients with worse prognosis) and without identified presence of CTC (patients with better prognosis). Currently, validation of 10 candidates of differently expressed mRNAs is running.
3. Design of the BRCA specific gene panel for NGS targeted resequencing analysis - design of the gene panel was implemented and NGS libraries prepared and sequenced.
4. NGS analyzes of different sample types - NGS libraries were successfully prepared as for DNA samples obtained from deep-frozen primary tumors (tissues) as well as from plasma samples. In addition, the protocol for the preparation of whole-genome NGS libraries for the identification of genomic changes of the CNV type from plasma samples was tested and successfully implemented in laboratory routine.
5. Bioinformatic analysis of obtained NGS data - for all NGS sequenced samples data from targeted resequencing with both standard and high coverage of the targeted genomic regions as well as from low-coverage whole-genome sequencing were successfully analyzed within the project prepared or optimized bioinformatic pipelines.
6. Genotype-phenotype correlation analysis - changes in expression of dozens RNA (mRNA and miRNA) in the subgroup of patients with different types of CTC (90 mRNA and the 10 miRNAs in EP CTC sub-group, 199 mRNA and 16 miRNAs in EMT CTC sub-group) were identified and statistically significantly increased incidence of BRCA1/2 tumor-specific mutations was identified in the EP CTC sub-group of patients.
7. Validation of identified genotype-phenotype correlations / potentially novel biomarkers for patient stratification - following this goal, qRT-PCR analysis assays were tested to validate the results of original RNA expression analyses on 9 candidate mRNAs. Validation of candidate mRNAs is currently running on a group of 70 samples.

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

Zodpovedný riešiteľ
RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

Štatutárny zástupca príjemcu
prof., RNDr. Karol Mičieta, PhD.

V dňa

V dňa

.....

.....

Podpis zodpovedného riešiteľa

Podpis štatutárneho zástupcu príjemcu