

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0066**  
**Genomický profil a transkripčná signatúra kolorektálneho karcinómu.**

Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Zora Lasabová, PhD.**  
Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Jesseniova lekárska fakulta, Martin**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta, Martin, Ústav molekulovej biológie a genetiky

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Zodpovedná riešiteľka je koordinátorkou Akcie COST 17118 -Identifying Biomarkers Through Translational Research for Prevention and Stratification of Colorectal Cancer pre SR.

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

-

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

Najvýznamnejšie publikácie:

- 1.Lasabova Z, Kalman M, Holubekova V, Grendár M, Kasubova I, Jasek K, Mersakova S, Malicherova B, Baranenko D, Adamek M, Krizliak P, Plank L. Mutation analysis of POLE gene in patients with early-onset colorectal cancer revealed a rare silent variant within the endonuclease domain with potential effect on splicing. Clin Exp Med 2019; 19: 393-400.
- 2.Vanova B, Kalman M, Jasek K, Kasubova I, Burjanivova T, Farkasova A, Kruzliak P, Busselberg D, Plank L, Lasabova Z. Droplet digital PCR revealed high concordance between primary tumors and lymph node metastases in multiplex screening of KRAS mutations in colorectal cancer. Clin Exp Med. 2019; 19:219-224.
- 3.Snahnicanova Z, Kasubova I, Kalman M, Grendar M, Mikolajcik P, Gabonova E, Laca L, Caprnda M, Rodrigo L, Ciccocioppo R, Kruzliak P, Plank L, Lasabova Z. Genetic and epigenetic analysis of beta-2-microglobulin gene in microsatellite instable colorectal cancer. Clin Exp Med 2020; 20:87-95. doi: 10.1007/s10238-019-00601-7
- 4.Mersakova S, Lasabova Z, Strnádel J, Kalman M, Gabonova E, Sabaka P, Ciccocioppo R, Rodrigo L, Kruzliak P, Mikolajcik P. Genomic profile and immune contexture in colorectal cancer – relevance for prognosis and immunotherapy. Clin Exp Med 2021; 21: 195-204. doi: 10.1007/s10238-020-00649-w
- 5.Mikolajcik P, Lasabova Z, Loderer D, Grendar M, Kalman M, Kasubova I, Lucansky V, Wiederhold AJ, Marcinek J, Burjanivova T, Kudelova E, Vojtko M, Svec A, Plank L, Janik J, Laca L. Detection of therapeutically relevant and concomitant rare somatic variants in

colorectal cancer. *Neoplasma* 2021; 68(6): 1331-1340. doi:10.4149/neo\_2021\_210616N804  
6.Kudelova E, Holubekova V, Grendar M, Kolkova Z, Samce M, Vanova B, Mikolajcik P, Smolar M, Kudela E, Laca L, Lasabova Z. Circulating miRNA expression over the course of colorectal cancer treatment. *Oncology Letter* 2022; 23(18) doi: 10.3892/ol.2021.13136  
Najvýznamnejšie prezentácie

- 1.Mersakova S, Strnadel J, Grendar M, Kalman M, Mikolajcik A, Gabonova E, Laca L, Lasabova Z. Comparison of freshly prepared and frozen cell from colorectal cancer surgical samples for phenotyping experiments. A pilot study. *Annals of Oncology* 2019; 30 (Suppl 5) v778. (ESMO Conference, Barcelona 2019)
- 2.Kasubova I, Snahnicanova Z, Kalman M, PLank L, Lasabova Z. Mutation analysis of B2M gene in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Annals of Oncology* 2019; 30 (Suppl 5) v246. (ESMO Conference, Barcelona 2019)
- 3.Grednár M: Targeted RNA Sequencing and machine learning approach to biomarker identification in colorectal cancer. TRANSCOLONCAN, COST CA17118, Belgrade, Serbia , March 5-6, 2020.
- 4.Lasabova Z, Mikolajcik P, Loderer D, Grendar M, Gabonova E, Kasubiva I, Burjanivova T, Kalman M, PLank L, Laca L. Application of targeted next-generation sequencing in primary and metastatic colorectal cancer using hot-spot panel for detection of potentially therapeutically relevant rare variants. ESGF 2021 \_Virtual conference, August 28-31, 2021.

### **Uplatnenie výsledkov projektu**

V rámci projektu boli získané výstupy, ktoré sa dajú využiť v pokračujúcom klinickom výskume a tiež v klinickej praxi. Medzi významné výstupy patrí vytvorená biobanka tkanív, DNA a RNA spolu s adekvátnymi klinickými dátami, včítane dát o prežívaní pacientov, ktoré budú aj naďalej dopĺňané. Boli zavedené unikátne metódy sekvenácie novej generácie, droplet digital PCR a bioinformatické spracovania tzv. big data na úrovni cieľenej DNA a RNA sekvenácie, ktoré patria v súčasnosti k najinovatívnejším postupom v genomickom výskume a v personalizovanej terapii na základe genomiky. Tieto metódy boli validované, a budú využiteľné v nasledujúcich výskumných klinických projektoch, a v určitej miere aj prenesené do diagnostiky. Boli získané nové poznatky, ktoré vedú k lepšej identifikácii a pochopeniu známych a nových prognostických a prediktívnym biomarkerov pri kolorektálnom karcinóme. So zameraním sa na charakterizáciu špecifickej diferenciálnej génovej expresie nádorového transkriptómu a jej asociácie s mutačným stavom pacientov sa podarilo identifikovať gény, ktoré sú diferenciálne exprimované práve v závislosti od mutačného stavu a mohli by predstavovať nové terapeutické ciele pri daných mutáciách u pacientov s KRK. Tieto výsledky vytvárajú možnosti pre pokračovanie výskumu v tejto oblasti. V rámci projektu boli úspešne obhájené dizertačné a diplomové práce a jeho prínos je aj edukačný pri výchove mladej generácie výskumníkov a lekárov zameraných na chirurgiu, onkológiu a patologickú anatómiu. Výsledky projektu boli prezentované na podujatiach v zahraničí a tiež v rámci medzinárodného projektu COST, takže reprezentovali výsledky projektu v Európskom výskumnom priestore.

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

Počas riešenia projektu sme vytvoril prospektívny klinický súbor pacientov s kolorektálnym karcinómom (KRK) s patričnými klinickými dátami, z ktorého sú už uverejnené publikačné výstupy. Prospektívny súbor obsahuje biologický materiál od pacientov s KRK, čerstvé chirurgické tkanivá, z ktorých bola vytvorená nádorová tkanivová biobanka, a z podskupiny biobanka buniek imunitného systému. Z dvojíc nádorového a nenádorového tkaniva bola vytvorená biobanka DNA a RNA. Na charakterizáciu súboru boli aplikované moderné molekulovo-biologické metódy ako Sangerova sekvenácia, detekcia MSI fragmentovou analýzou, detekcia metylačného stavu vybraných oblastí génov, qPCR, droplet digital PCR (ddPCR), vďaka čomu boli získané aj nové poznatky o význame týchto parametrov v patogenéze ochorenia. Metylácia B2M génu, ktorá vedie k v znížení jeho expresie, je potenciálne novým biomarkerom zlyhávania imunoterapie. Mutácie POLE génu zase môžu predstavovať nový biomarker pre pozitívnu predikciu liečby inhibítorami strážnych bodov imunity. Boli zavedené inovatívne metódy charakterizácie buniek pomocou cytometrie, sekvenácia novej generácie (NGS) DNA a RNA na úrovni génových panelov génov a signálnych dráh nádorového transkriptómu, bioinformatické

vyhodnocovanie výsledkov NGS. Okrem toho boli využívané analýzy génovej expresie vybraných génov imunitného systému a vybraných miRNA. Pomocou cielenej RNA sekvenácie nádorového transkriptómu sme dokázali odlíšiť nádorové a nenádorové vzorky na základe diferenciálnej génovej expresie určitých génov. Identifikovali sme diferenciálnu génovú expresiu medzi nádormi s mutáciami v génoch KRAS, APC a TP53, hlavne v génoch podieľajúcich sa angiogenéze, hypoxii, WNT signálnej dráhe a epitelovo-mezenchýmovej tranzícii. Zníženú génovú expresiu u pacientov s mutáciou v géne KRAS sme tiež pozorovali v génoch TFPI2, PTGS2 a WNT5B, u pacientov s mutáciou v géne TP53 v génoch TNFRSF11B a CCND, a u pacientov s mutáciou v géne APC hlavne v géne IFG1. Vo validačných analýzach sme zistili signifikantne zníženú génovú expresiu pre BLNK v nádorovom tkanive všeobecne, v pečenej metastázach v závislosti od prítomnosti mutácie v géne KRAS. CCR4 má signifikantne zvýšenú génovú expresiu v nádorovom tkanive, ale má zníženú génovú expresiu vzorkách s KRAS mutáciou v porovnaní so vzorkami bez KRAS mutácie. Získané výsledky umožnili naplnenie vytýčených vedeckých cieľov projektu a vytvárajú možnosti pokračovať v ďalšom klinickom výskume KRK.

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

During the project, we created a prospective clinical cohort of patients with colorectal cancer (CRC) with appropriate clinical data, from which results are already published. The prospective cohort contains biological material from patients with CRC, fresh surgical tissues from which the tumor tissue biobank was created, and a subset of immune system cell biobanks. A biobank of DNA and RNA was created from pairs of tumor and non-tumor tissue. Modern molecular biological methods such as Sanger sequencing, detection of microsatellite instability (MSI) by fragment analysis, detection of methylation status of selected gene regions, qPCR, droplet digital PCR (ddPCR) were applied to characterize the patient group, and new knowledge about the importance of these parameters in disease pathogenesis was gained. Methylation of the B2M gene, which leads to a reduction in its expression, is a potentially novel biomarker of immunotherapy failure. Mutations in the POLE gene, in turn, may represent a new biomarker for positive prediction of checkpoint inhibitor therapy. Innovative methods for characterization of cells by cytometry, next-generation sequencing (NGS) of DNA and RNA at the level of gene panels and signaling pathways of the tumor transcriptome, bioinformatic evaluation of NGS results were introduced. In addition, gene expression analyzes of selected genes of the immune system and selected miRNAs were used. Using targeted RNA sequencing of the tumor transcriptome, we were able to distinguish between tumor and non-tumor samples based on the differential gene expression of certain genes. We identified differential gene expression between tumors with mutations in the KRAS, APC and TP53 genes, mainly in genes involved in angiogenesis, hypoxia, the WNT signaling pathway, and epithelial-mesenchymal transition. Reduced gene expression in patients with a mutation in the KRAS gene was also observed in the TFPI2, PTGS2 and WNT5B genes, in patients with a mutation in the TP53 gene in the TNFRSF11B and CCND genes, and in patients with a mutation in the APC gene mainly in the IFG1 gene. In validation analyzes, we found significantly reduced gene expression for BLNK in tumor tissue in general, in liver metastases, depending on the presence of a mutation in the KRAS gene. CCR4 has significantly overexpressed in tumor tissue, but was downregulated in samples with the KRAS mutation compared to samples without the KRAS mutation. The obtained results enabled the fulfillment of the set scientific goals of the project and create opportunities for further clinical research on CRC.