

Novel molecular disease monitoring tools for clear cell renal cell carcinoma (ccRCC)

Nowe molekularne narzędzie umożliwiające monitoring choroby dla jasnokomórkowego raka nerki (ccRCC)

Weronika Majer- Burman

Abstract

Renal cell carcinoma (RCC) is one of the 10 most common cancers worldwide with nearly nonsymptomatic disease course. RCC is divided into histological subtypes: clear cell (74%), papillary (10%), chromophobe (5%) and oncocytoma (1%). The low 5-year recovery rate (12.3%) of ccRCC patients is related to late detection and diagnosis. RCC detection is performed using imaging techniques in combination with non-RCC specific morphological and biochemical read-outs. Despite advanced molecular characterization of RCC clinically applicable and ideally non-invasive molecular tools aiding RCC management do not exist. Hence, many recent studies are devoted to identifying molecular markers that will assist with RCC sub-classification and monitoring. The solution for earlier noninvasive detection might be delivered by biomarkers derived from body fluids (blood and urine) like cell free DNA (cfDNA) or miRNA. Recent studies revealed that concentration of cfDNA is significantly higher in cancer patients in comparison to healthy controls. The aim of the study is to use NGS techniques to identify chromosomal aberrations characteristic for ccRCC in cell free DNA extracted from urine and plasma. Results of our study showed differences between cfDNA concentration in plasma of patients and healthy controls. Unfortunately, our results showed that method used in the study was not suitable for analysis chromosomal aberration in tumor cfDNA. Due to unsatisfactory results of cfDNA analysis we set off to analyze the utility of changes in miRNA levels in kidney tissue of RCC patients. We performed a meta-analysis study using high-throughput experiments (NGS and Microarrays) attempting to define a miRNA panel characteristic for oncocytoma, papillary RCC and ccRCC. We distinguished 8 miRNA commonly deregulated in all ccRCC experiments (miRNA-21-5p, miRNA-224-5p, miRNA-155-5p, miRNA-210-3p, miRNA-200c-3p, miRNA-363-3p, miRNA-362-5p and miRNA-204-5p). Metanalysis results were followed by a validation of changes of selected miRNAs expression profiles using qPCR in tissue samples from patients with three RCC subtypes: ccRCC, papillary RCC and oncocytoma. Moreover, we compared levels of 8 commonly deregulated miRNA in ccRCC samples divided according to Furhman's grades. Our results revealed that changes in

expression of selected miRNA might be potentially utilized as biomarkers for detection of ccRCC grade and diagnosis of renal cancer subtypes.

Abstrakt

Rak nerki (RCC) należy do jednego z 10 najczęściej występujących nowotworów na świecie, charakteryzuje się niemal nie symptomatycznym przebiegiem choroby. RCC dzieli się na histologiczne podtypy: jasnokomórkowy (74%), brodawkowy (10%), chromofobowy (5%) oraz onkocytomę (1%). Niski 5-letni wskaźnik wyzdrowienia (12,3%) pacjentów z ccRCC jest związany z późnym wykrywaniem i diagnozowaniem choroby. Wykrywanie RCC przeprowadza się przy użyciu technik obrazowania w połączeniu z niespecyficznymi dla RCC odczytami morfologicznymi i biochemicznymi. Pomimo zaawansowanych metod pozwalających na kliniczną charakterystykę RCC nie istnieje odpowiednie nieinwazyjne molekularne narzędzie umożliwiające detekcję i wspomagające leczenie RCC. Stąd w literaturze wiele ostatnich badań zostało poświęconych identyfikacji markerów molekularnych, które pomogą w pod klasyfikacji i monitorowaniu RCC. Rozwiązaniem dla wcześniejszej detekcji raka nerki mogą być biomarkery pochodzące z płynów ustrojowych (krwi i moczu) takie jak wolnokrążące DNA (cfDNA) czy mikroRNA (miRNA). Ostatnie badania ujawniły że poziom cfDNA jest istotnie wyższy w przypadku pacjentów nowotworowych w porównaniu do prób kontrolnych. Jednym z celów dysertacji jest zbadanie możliwości wykorzystania technik NGS do identyfikacji aberracji chromosomowych charakterystycznych dla jasnokomórkowego raka nerki (ccRCC) w cfDNA wyizolowanych z moczu i plazmy. Wyniki naszych badań pokazały różnice w koncentracji cfDNA w płazmie pacjentów i zdrowych prób kontrolnych. Niestety rezultaty analizy aberracji chromosomowych pokazały, że metoda zastosowana w badaniu nie jest odpowiednia. Ze względu na niezadowalające wyniki analizy cfDNA postanowiliśmy sprawdzić przydatność zmian poziomu miRNA w tkance nerkowej pacjentów z RCC. Przeprowadziliśmy meta-analizę używając eksperymentów wysokoprzepusowych (NGS and Mikromacierzy) w celu zdefiniowania panelu miRNA charakterystycznych dla onkocytomy, brodawkowego oraz jasnokomórkowego raka nerki. Wyróżniliśmy 8 miRNA powszechnie deregulowanych we wszystkich 8 eksperymentach na próbach z ccRCC (miRNA-21-5p, miRNA-224-5p, miRNA-155-5p, miRNA-210-3p, miRNA-200c-3p, miRNA-363-3p, miRNA-362-5p i miRNA -204-5p. Po uzyskaniu wyników metanalizy dokonano walidacji zmian wybranych profili ekspresji miRNA

za pomocą qPCR w próbkach tkanek od pacjentów z trzema podtypami RCC: ccRCC, brodawkowaty RCC i onkocytoma. Ponadto porównaliśmy poziomy 8 deregulowanych miRNA w próbach z ccRCC rozdzielonych według stopni Furhmana. Nasze wyniki pokazały, że zmiany w ekspresji wybranych miRNA mogą być potencjalnie wykorzystane jako biomarkery do wykrywania stopnia ccRCC i diagnostyki podtypów raka nerki.