



Diagnostyka molekularna raka piersi

mgr Katarzyna Czudek

Zakład Farmacji Stosowanej

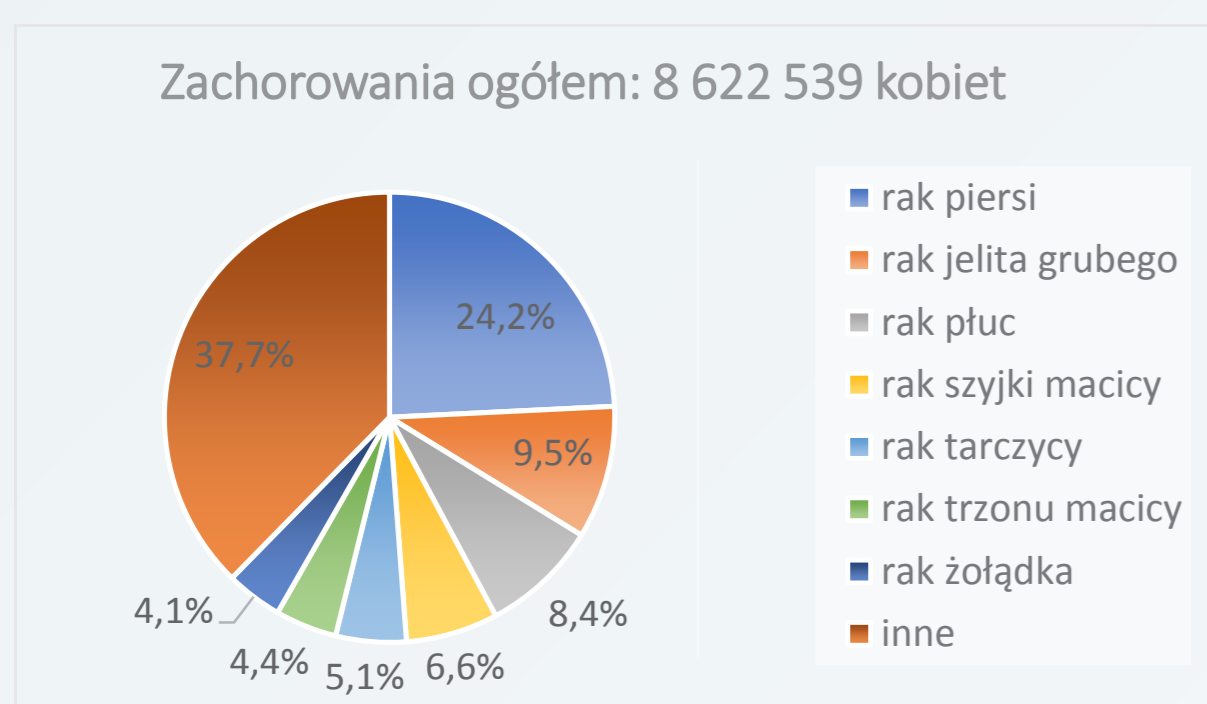
prof. dr hab. n. farm. Maciej Małecki
dr n. farm. Agnieszka Zajkowska



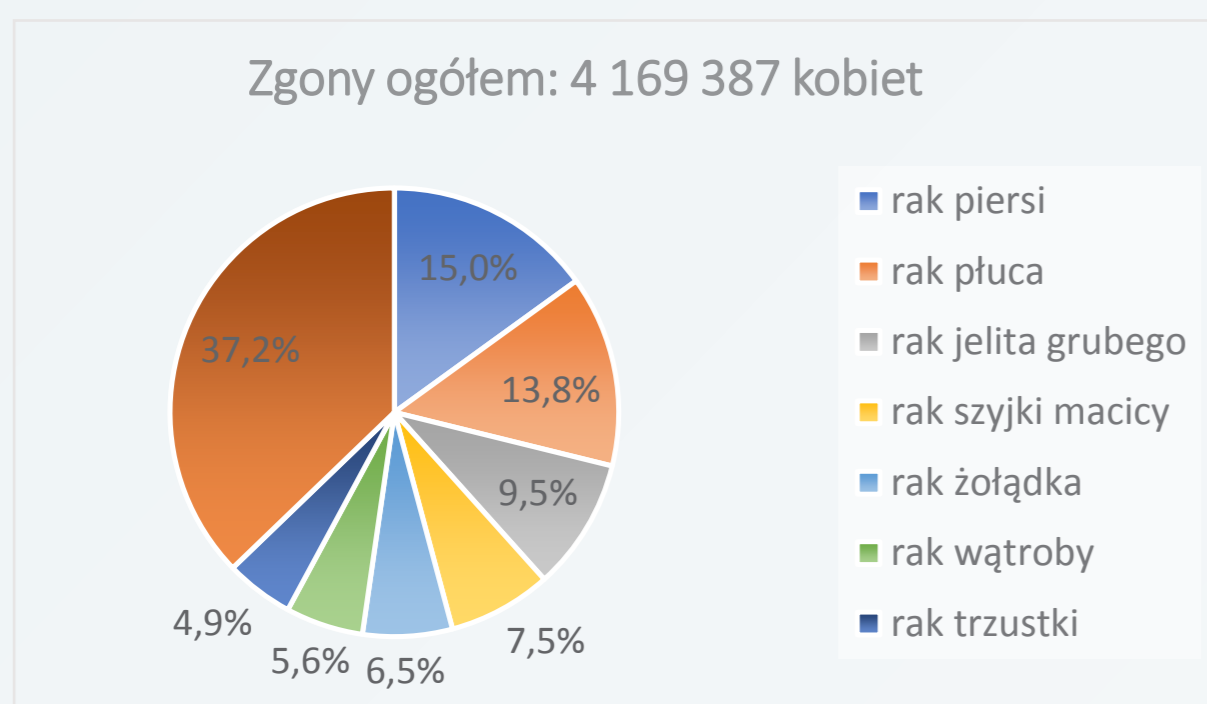
WSTĘP

Rak piersi jest nowotworem o największej zapadalności i śmiertelności wśród chorób nowotworowych u kobiet na świecie. Pomimo szerokiego wachlarza dostępnych metod terapeutycznych, nadal nie ma w pełni skutecznego sposobu leczenia tej choroby. Ponadto brakuje narzędzia diagnostycznego, które pozwalałoby na dokładne określenie podtypu raka piersi u wszystkich chorych.

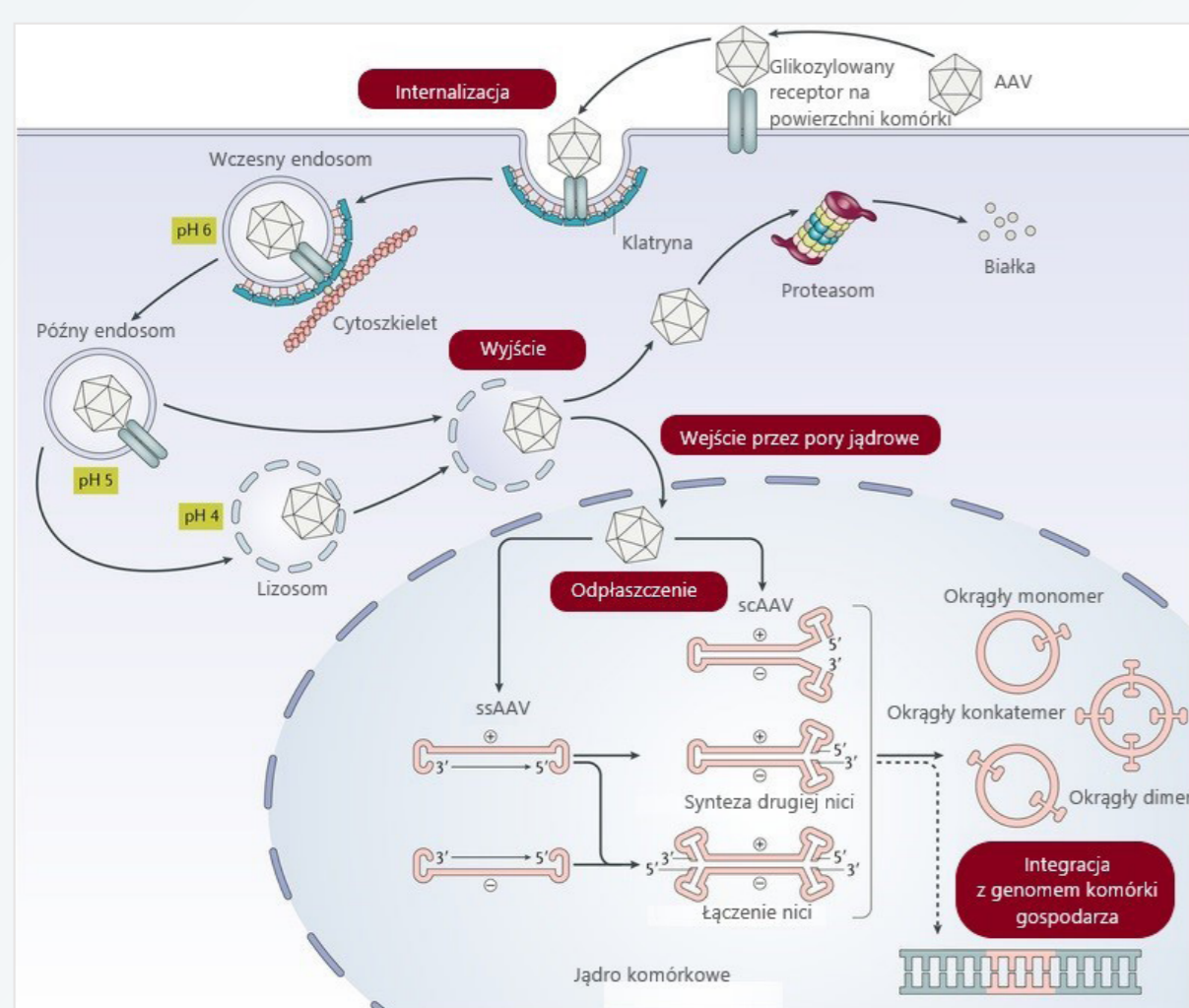
Terapia genowa to nowoczesny sposób leczenia różnorodnych chorób. Polega ona na podaniu pacjentowi wektora, który niesie gen terapeutyczny. W organizmie pacjenta niesiony gen ulega ekspresji wywołując efekt terapeutyczny. Obecnie wielkie zainteresowanie budzi stosowanie AAV (wirusa związanego z adenowirusem) jako wektora w terapii genowej.



Zachorowania na nowotwory u kobiet na świecie w 2018r. (dane z International Agency for Research on Cancer)



Zgony na nowotwory u kobiet na świecie w 2018r. (dane z International Agency for Research on Cancer)



Mechanizm infekcji wirusa związanego z adenowirusem

MATERIAŁY I METODY

Podstawą wykonania testu jest zastosowanie techniki PCR w czasie rzeczywistym i wykorzystanie sond molekularnych typu TaqMan. Test przeprowadzany jest na płytce 96-dółkowej zawierającej sondy molekularne komplementarne do wybranych genów, co umożliwi analizę ekspresji 48 genów w dwóch powtórzeniach.

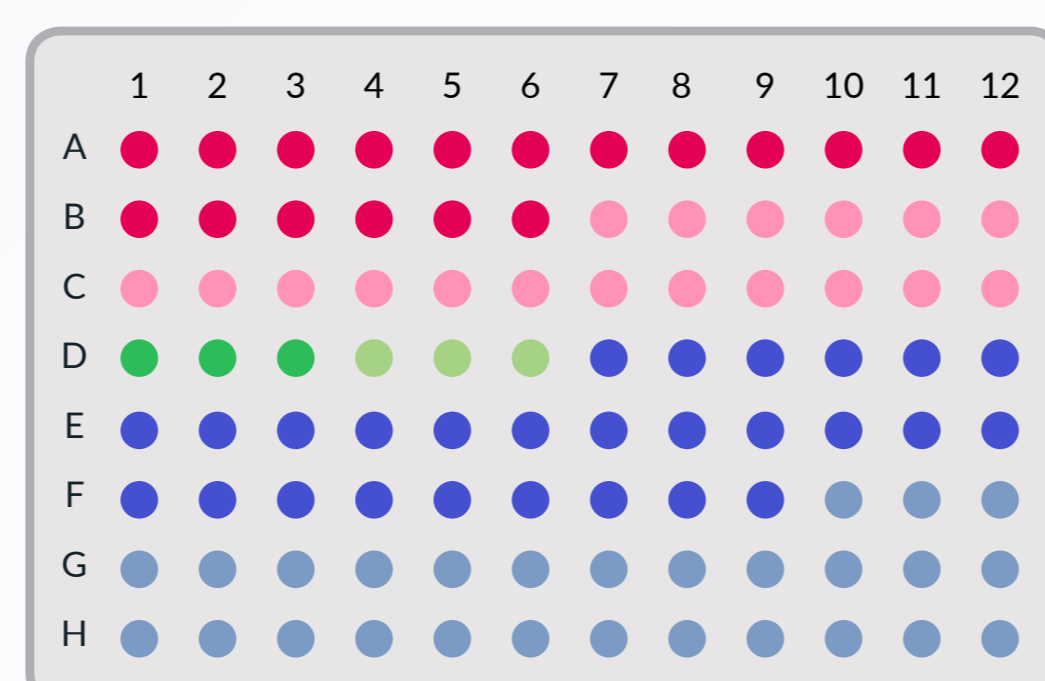
W celu wyselekcjonowania genów badanych w proponowanym teście dokonano przeglądu publikacji udostępnionych w bazie **PubMed**, przeanalizowano dostępne testy molekularne stosowane w diagnostyce raka piersi oraz skorzystano z bazy **GeneCards**. Ponadto w celu wybrania sond molekularnych typu TaqMan skorzystano z bazy **ThermoFischer**.

CEL PRACY

Celem pracy było zaprojektowanie testu badającego ekspresję 48 genów związanych z rakiem piersi, genów referencyjnych oraz genów związanych z transdukcją rAAV. W teście wykorzystano sondy molekularne oraz technikę PCR w czasie rzeczywistym. Proponowany test służy do diagnostyki raka piersi oraz określenia podtypu molekularnego, co może pomóc w personalizacji terapii genowej.

Lp.	Gen	Identyfikator HGNC	Sonda TaqMan
1	BAG1	937	Hs00185390_m1
2	BCL2	990	Hs04986394_s1
3	BIRC5	593	Hs04194392_s1
4	CCNB1	1579	Hs01030099_m1
5	CENPA	1851	Hs00156455_m1
6	ERBB2	3430	Hs01001580_m1
7	ESR1	3467	Hs01046816_m1
8	GRB7	4567	Hs00917999_g1
9	KNTC2	17255	Hs01092161_m1
10	MELK	16870	Hs01106438_m1
11	MKI67	7107	Hs04260396_g1
12	MMP11	7157	Hs00968295_m1
13	MYBL2	7548	Hs00942540_m1
14	ORC6L	17151	Hs00204876_m1
15	PGR	8910	Hs01556702_m1
16	RRM2	10452	Hs00357247_g1
17	SCUBE2	30425	Hs00221277_m1
18	UBE2C	15937	Hs00964100_g1
19	ACTB	132	Hs01060665_g1
20	GAPDH	4141	Hs02786624_g1
21	RPLP0	10371	Hs00420895_gH
22	HSPG2	5273	Hs01078536_m1
23	RPSA	6502	Hs03046712_g1
24	FGFR1	3688	Hs00241111_m1
25	MET	7029	Hs01565584_m1
26	PDGFRA	8803	Hs00998018_m1
27	PDGFRB	8804	Hs01019589_m1
28	EGFR	3236	Hs01076090_m1
29	CD9	1709	Hs01124022_m1
30	ITGAV	6150	Hs00233808_m1
31	ITGA5	6141	Hs01547673_m1
32	KIAA0319L	30071	Hs00967343_m1
33	GPR108	17829	Hs01035930_m1
34	TM9SF2	11865	Hs00191267_m1
35	CLIC2	2063	Hs01574555_m1
36	IFNAR2	5433	Hs01022059_m1
37	PHF5A	18000	Hs00992149_g1
38	SF3B1	10768	Hs00961640_g1
39	U2AF1	12453	Hs00739599_m1
40	CRB3	20237	Hs01548179_m1
41	MRE11	7230	Hs00967437_m1
42	NBS1	7652	Hs01039845_m1
43	RAD50	9816	Hs00990023_m1
44	UBE2I	12485	Hs00163336_m1
45	SAE1	30660	Hs00271440_m1
46	UBA2	30661	Hs01072619_m1
47	SETD8	29489	Hs00360662_s1
48	CDY2	1810	Hs00371558_s1

Geny wybrane do testu molekularnego wraz z identyfikatorami HGNC oraz sondami TaqMan (1-18 geny związane z rakiem piersi; 19-21 geny referencyjne; 22-48 geny związane z transdukcją rAAV)



Schemat przedstawiający proponowany test molekularny na płytce 96-dółkowej

WYNIKI

Na podstawie przeprowadzonych analiz wybrano 48 genów, które podzielono na trzy grupy:

- geny związane z rakiem piersi
- geny referencyjne
- geny związane z transdukcją rAAV.

Geny związane z rakiem piersi zostały wyselekcjonowane na podstawie analizy dostępnych 7 testów molekularnych służących do diagnostyki raka piersi (MammaPrint, Prosigna/PAM, OncotypeDX, EndoPredict, Breast Cancer Index, Mammostrat, IHC4). Wybrano geny występujące w więcej niż jednym teście molekularnym.

Geny referencyjne zostały wybrane na podstawie analizy publikacji udostępnionych w bazie PubMed. Wybrano 3 geny najczęściej występujące w publikacjach jako geny odniesienia podczas wykonywania PCR w czasie rzeczywistym na komórkach raka piersi. Wybrane geny referencyjne to tzw. geny *housekeepingowe* charakteryzujące się niewielką zmiennością ekspresji w badanych tkankach.

Geny związane z transdukcją rAAV wyselekcjonowano na podstawie analizy publikacji dostępnych w bazie PubMed oraz danych pochodzących z bazy GeneCards. Wybrane geny należą do dwóch grup: geny związane z receptorami i koreceptorami dla AAV oraz geny mające wpływ na skuteczność transdukcji AAV.

Dla wybranych genów dobrano sondy molekularne typu TaqMan korzystając z bazy ThermoFischer. Wybierano sondy oznaczone etykietą „best coverage”, co stanowi o najlepszym dopasowaniu do badanego genu.

Wszystkie wybrane geny opatrzone identyfikatorem z bazy genów HGNC oraz oznaczeniem sondy TaqMan umieszczono w tabeli obok.

WNIOSKI

Opracowano zestaw 48 sond molekularnych TaqMan, które pozwalają na ocenę ekspresji genów z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym.

Wybrano:

- 18 genów związanych z rakiem piersi (np. *ESR1*, *PGR*, *ERBB2*)
- 3 geny referencyjne (*ACTB*, *GAPDH*, *RPLP0*)
- 27 genów związanych z transdukcją rAAV (np. *HSPG2*, *KIAA0319L*, *MRE11*).

Proponowany test służy do diagnostyki molekularnej nowotworów złośliwych piersi oraz do określenia profilu molekularnego guzów w celu klasyfikacji do właściwego leczenia z użyciem terapii genowej opartej na wektorologii rAAV.