

Katedra i Zakład Genetyki
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

**Analiza transkryptomu w komórkach raka piersi –
poszukiwanie markerów prognostycznych
u pacjentek z różną odpowiedzią na leczenie**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

lek. Stanisław Supplitt

Promotor: dr hab. Izabela Łacmańska

Katedra i Zakład Genetyki
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Promotor pomocniczy: dr Paweł Karpiński

Katedra i Zakład Genetyki
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wrocław, 2023

RECENZENCI:

dr hab. n. med. Artur Kowalik, prof. UJK

Kierownik Zakładu Diagnostyki Molekularnej
Świętokrzyskie Centrum Onkologii w Kielcach

dr hab. n. med. Edyta Pawlak, prof. PAN

Kierownik Laboratorium Immunopatologii
Zakład Terapii Doświadczalnej
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu

dr hab. n. med. i n. o zdr. Małgorzata Dawidowska, prof. PAN

Zakład Genetyki Molekularnej i Klinicznej
Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

PODZIĘKOWANIA:

Składam serdeczne podziękowania

Promotorom niniejszej rozprawy doktorskiej – pani **dr hab. Izabeli Łaczmańskiej** oraz panu **dr Pawłowi Karpińskiemu** za opiekę merytoryczną, wszechstronną pomoc, inspirację, poświęcony czas, cierpliwość i wyrozumiałość

Pani **prof. dr hab. Marii M. Sasiadek** za nieoceniony wkład merytoryczny w powstanie niniejszej rozprawy

lek. Ewelinie Iwaneczko, specjalistce patomorfologii z DCOPIH, za wykonanie badań histopatologicznych komórek nowotworowych i wyselekcjonowanie tkanek do badań

Panu **prof. dr hab. Rafałowi Matkowskemu** – za udostępnienie materiałów do badań

Zespołowi **Zakładu Diagnostyki Molekularnej Nowotworów DCOPIH** oraz **Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki PAN** za pomoc w przeprowadzeniu badań laboratoryjnych

DEDYKACJA:

*Dla Mamy **Barbary Supplitt** za wsparcie i niegasnącą wiarę we mnie*

SPIS TREŚCI

ALFABETYCZNY WYKAZ SKRÓTÓW UŻYWANYCH W TEKŚCIE	8-10
1. WSTĘP	11
2. NOWOTWORY JAKO HETEROGENNA GRUPA CHORÓB	11-13
3. RAK PIERSI	13
3.1. Czynniki ryzyka zachorowania na raka piersi	13-14
3.2. Podłoże genetyczne nowotworów, a rak piersi	14-15
3.2.1. Protoonkogeny	15-17
3.2.2. Geny supresorowe	17-18
3.2.3. Geny mutatorowe	18
3.3. Predyspozycja do nowotworów piersi	18
3.3.1. Nowotwory dziedziczne piersi	19-21
3.3.2. Zachorowania rodzinne	21
3.3.3. Zachorowanie sporadyczne	21-22
3.4. Diagnostyka raka piersi	22
3.4.1. Objawy podmiotowe i przedmiotowe	22-23
3.4.2. Metody diagnostyki obrazowej	23
3.4.3. Histologia raka piersi	24
3.4.4. Metody immunohistochemiczne	24-25
3.4.5. Klasyfikacja molekularna raka piersi na podstawie analizy ekspresji genów	25-27
3.4.6. Rak piersi potrójnie ujemny (TNBC)	27-29
3.5. Leczenie personalizowane raka piersi	29
3.5.1. Rak piersi luminalny	29-30
3.5.2. Rak piersi HER2-pozytywny	30
3.5.3. Rak piersi potrójnie-ujemny	30-31
3.6. Ocena zaawansowania choroby i systemy prognozowania	31-34
4. OMIKA: GENOM, TRANSKRYPTOM I PROTEOM	34-37
4.1. Transkryptom	37
5. METODY DIAGNOSTYCZNE W ONKOGENETYCE	37-38
5.1. Metody analizy transkryptomu	38-39
5.1.1. Mikromacierze	39
5.1.2. Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym	40

5.1.3. Sekwencjonowanie DNA / RNA	40-41
5.1.4. Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)	41-43
6. ZASTOSOWANIE ANALIZY TRANSKRYPTOMU WE WSPÓŁCZESNEJ ONKOLOGII	43-44
6.1. Zastosowanie transkryptomu w tworzeniu klasyfikacji klinicznej nowotworów	44-45
6.2. Tworzenie paneli prognostycznych i predykcyjnych	45-46
6.3. Identyfikacja biomarkerów nowotworowych	46-48
7. CEL PRACY	49
8. CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ	50
9. MATERIAŁY I METODY	51
9.1. Plan leczenia i projekt badania	51-53
9.2. Pozyskiwanie danych zewnętrznych	53-54
9.3. Metody	54
9.3.1. Izolacja RNA	54
9.3.2. RNA-Seq	55-56
9.3.3. Wstępna analiza danych RNA-Seq	56-57
9.3.4. Metody statystyczne	57-58
10. WYNIKI	58
10.1. Uzyskane dane	58-59
10.2. Integracja z danymi kohorty raka piersi z TCGA	59-61
10.3. Analiza ekspresji genów	61-66
11. DYSKUSJA	67-69
11.1. Gen <i>KCNE4</i>	69-70
11.2. Geny <i>ABCA3</i> i <i>ABCC11</i>	70
11.3. Gen <i>APOD</i>	70
11.4. Gen <i>ARHGEF38</i>	71
11.5. Gen <i>CYB5A</i>	71
11.6. Gen <i>SPDEF</i>	71-72
11.7. Gen <i>MUCL1</i>	72
11.8. Gen <i>PRR15</i>	72-73
12. PODSUMOWANIE	73
13. WNIOSKI	74
14. STRESZCZENIE	75-76
15. SUMMARY	77-78

16. BIBLIOGRAFIA	79-98
17. WYKAZ TABEL, RYSUNKÓW I SCHEMATÓW	99
17.1. Wykaz tabel	99
17.2. Wykaz rysunków i schematów	99-101

ALFABETYCZNY WYKAZ SKRÓTÓW UŻYWANYCH W TEKŚCIE

aCGH – array comparative genomic hybridization – porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy

BC – breast cancer – rak piersi

BCI – breast cancer index – wskaźnik raka piersi

BRCA1/2 – breast cancer gene 1/2 - gen raka piersi 1/2

CAR-T - chimeric antigen receptor T-cell – komórki T z chimerycznym receptorem antygenowym

cDNA – complementary DNA – komplementarny DNA

CEA – carcinoembryonic antigen - antygen rakowo- płodowy

CISH – chromogenic *in situ* hybridization – chromogeniczna hybrydyzacja *in situ*

ChIP-Seq – chromatin immunoprecipitation sequencing – sekwencjonowanie immunoprecypitacji chromatyny

CNB – core needle biopsy – biopsja gruboigłowa

CNV-Seq – copy number variation sequencing – sekwencjonowanie zmienności liczby kopii

CRC – colorectal cancer – rak jelita grubego

CSC – cancer stem cells – nowotworowe komórki macierzyste

CT – computed tomography – tomografia komputerowa

DCIS – ductal carcinoma *in situ* – rak przewodowy *in situ*

dNTP – trójfosforan deoksynukleozydu

ddNTP – trójfosforan dideoksynukleozydu

EMT – epithelial – mesenchymal transition – przejście nabłonkowo - mezenchymalne

ER – estrogen receptor - receptor estrogenowy

ESCC – esophageal squamous cell carcinoma - rak płaskonabłonkowy przełyku

ESTs – expressed sequence tags – znaczniki ekspresji sekwencji

FDR – false discovery rate – oczekiwana proporcja błędów wśród wyników istotnych statystycznie

FF – fresh frozen – świeżo zamrożone

FFPE – formalin-fixed, paraffin-embedded – utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie

FISH – fluorescent *in situ* hybridization – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

HBOC – hereditary breast and ovarian cancer – dziedziczny rak piersi i jajnika

HER-2 – human epidermal growth factor receptor 2 – receptor naskórkowego czynnika wzrostu 2

HGP – Human Genome Project – projekt poznania ludzkiego genomu

IBC – inflammatory breast cancer – rak zapalny piersi

IGFBP-4 – insulin-like growth factor binding protein 4

MAPK – mitogen activated protein kinases – kinazy aktywowane proteinami

MLPA – multiplex ligase-dependent probe amplification – amplifikacja sond zależna od ligacji

Komórki NK – komórki „*natural killer*”

LASSO – least absolute shrinkage and selection operator

LCC – large-cell lung carcinoma - neuroendokryny rak płuca z dużych komórek

LCIS – lobular carcinoma *in situ* – rak zrazikowy *in situ*

MLPA - multiplex ligation-dependent probe amplification - multipleksowa amplifikacja sond zależna od ligacji

MMR – mismatch repair genes – geny naprawy błędnie sparowanych zasad

MRI – magnetic resonance imaging – rezonans magnetyczny

mRNA – messenger RNA – informacyjny RNA

ncRNA – non coding RNA – RNA niekodujący

NGS – next-generation sequencing – sekwencjonowanie następnej generacji

NSCLC – non-small cell lung carcinom – rak niedrobnokomórkowy płuc

NTP – nearest template prediction

OS – overall survival – czas całkowitego przeżycia

PCA – principal component analysis – analiza głównych składowych

pCR – pathological complete response – całkowita odpowiedź patomorfologiczna

PCR – polymerase chain reaction – łańcuchowa reakcja polimerazy

PCR-RFLP – restriction fragment length polymorphism – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

pcRNA – protein-coding RNA – RNA kodujące białka

PD – progressive disease - progresja choroby

PFS – progression-free survival – czas przeżycia wolny od progresji

PgR – progesterone receptor – receptor progesteronowy

piRNA – PIWI-interacting RNA

PLSR – partial least squares regression - regresja cząstkowych najmniejszych kwadrantów

PR – partial response – częściowa odpowiedź (na leczenie)

PSA – prostate specific antigen – swoisty antygen sterczowy

qPCR – quantitative fluorescent polymerase chain reaction – fluorescencyjna ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

RR – reduced response – ograniczona odpowiedź (na leczenie)

rRNA – RNA rybosomalny

SCC-Ag – squamous cell carcinoma antigen – antygen raka płaskonabłonkowego

siRNA – small interfering RNA – małe RNA interferujące

snRNA – small nuclear RNA – małe jądrowe RNA

SVM – support vector machines – maszyna wektorów nośnych

TME – tumor microenvironment – mikrośrodowisko guza

tRNA – RNA transferowy

TCGA – The Cancer Genome Atlas Program

TNM – skala „*tumor*”, „*nodes*”, „*metastasis*” do oceny stopnia zaawansowania choroby nowotworowej

VAB – vacuum assisted biopsy – biopsja gruboigłowa wspomagana próżnią

USG – ultrasonography – ultrasonografia

WES – whole exome sequencing – sekwencjonowanie całego eksomu

WGS – whole genome sequencing – sekwencjonowanie całego genomu

1. WSTĘP

Nowotwory stanowią jedną z głównych przyczyn zachorowalności i śmiertelności na całym świecie. Według danych GLOBOCAN (na podstawie statystyk ze 185 krajów) w 2020 roku zanotowano około 19,3 milionów nowych zachorowań na nowotwory i prawie 10 milionów zgonów z ich powodu [1]. Występowanie nowotworów stale wzrasta we wszystkich regionach świata. Według danych Krajowego Rejestru Nowotworów, w 2021 roku w Polsce żyło 1,17 mln ludzi z rozpoznaną chorobą nowotworową, a rocznie notuje się około 100 tysięcy zgonów z powodu choroby nowotworowej. Stanowi to ponad 25% wszystkich zgonów w Polsce [2]. Mimo postępów w ich wykrywaniu i leczeniu, co przekłada się na poprawę wskaźników umieralności, konieczny jest rozwój nowych metod ich wczesnej diagnostyki i skutecznej terapii, a także poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych. Aktualny postęp w onkologii skupia się przede wszystkim na personalizacji leczenia, możliwej dzięki rozwojowi wielogenowych technik molekularnych [3].

Medycyna personalizowana to inaczej podanie właściwego leku, właściwemu pacjentowi, we właściwym czasie [4]. Koncepcja onkologii personalizowanej opiera się na dokładnym zdefiniowaniu podstaw molekularnych transformacji nowotworowej, co otwiera drogę do identyfikacji określonych zmian w ekspresji genowej komórek guza, a w efekcie umożliwia postawienie precyzyjnego rozpoznania i zastosowanie terapii celowanej - „*szytej na miarę*” pacjenta, ukierunkowanej na zablokowanie kluczowego mechanizmu w rozwoju choroby. Obecnie w onkologii personalizowanej coraz częściej wykorzystywane jest molekularne profilowanie wielogenowe nowotworu mające wartość diagnostyczną (postawienie rozpoznania), prognostyczną (pozwalającą na prognozowanie rokowania) i/lub predykcyjną (prognozowanie odpowiedzi na leczenie). Wykorzystanie paneli prognostycznych i predykcyjnych umożliwia indywidualizację terapii, wpływając pozytywnie na wyniki leczenia, ograniczając jednocześnie jego stopień toksyczności [5].

2. NOWOTWORY JAKO HETEROGENNA GRUPA CHORÓB

Postępy w diagnostyce molekularnej i technologiach sekwencjonowania odegrały istotną rolę w charakteryzowaniu zmian w materiale genetycznym nowotworów, co doprowadziło do poznania wielu kluczowych mechanizmów karcynogenezy. Proces transformacji od komórki prawidłowej do nowotworowej jest obecnie opisywany głównie jako wynik sekwencyjnego nabycia zmian prowadzących do zwiększonej proliferacji komórek,

unikania sygnałów hamujących wzrost i śmierć komórek, indukcji angiogenezy, a ostatecznie aktywacji programów prowadzących do przerzutowania [6][7]. Losowy charakter mutacji inicjatorowej może wzmacniać przekonanie, że rozwój nowotworu nie podlega stałemu przebiegowi, ale mógłby być postrzegany jako zintegrowane destabilizowanie kluczowych procesów komórkowych. Nawet po przejściu w stan „złośliwy” (inwazyjny), rak pozostaje dynamicznym tworem i nadal ewoluuje. Ta trwająca ewolucja może ostatecznie prowadzić do powstania molekularnie zróżnicowanego guza składającego się ze spektrum komórek nowotworowych o różnych wzorcach molekularnych i różnym poziomie wrażliwości na terapie przeciwnowotworowe [8]. Obserwowana heterogenność może wynikać z zmian genetycznych, transkryptomocnych, epigenetycznych i/lub fenotypowych [9][10].

Na poziomie populacji heterogenność nowotworu można podzielić na heterogenność między nowotworami (u dwóch różnych osób z tym samym rozpoznaniem klinicznym) i wewnątrz guza (u tego samego pacjenta onkologicznego) [8]. Heterogenność między nowotworami, która odnosi się do różnorodności między pacjentami chorującymi na nowotwory o tym samym typie histologicznym, jest znana od dawna i uważa się, że wynika z czynników specyficznych dla pacjenta, w tym odmian genetycznych linii zarodkowej, różnic w profilu mutacji somatycznych i wpływu czynników środowiskowych [11]. Z kolei heterogenność wewnątrz guza może manifestować się jako heterogenność przestrzenna, (nierównomierny rozkład genetycznie zróżnicowanych subpopulacji komórkowych w różnych miejscach guza) lub jako heterogenność czasowa (jako wyraz dynamicznych zmian we wzorcach genetycznych nowotworu u jednego pacjenta w czasie) [12].

Wgląd we właściwości molekularne niektórych nowotworów, takich jak rak np. piersi, wpływa na zmianę paradygmatu leczenia promując stosowanie terapii personalizowanych. Ta strategia jest najbardziej skuteczna w leczeniu nowotworów dla których ustalono kluczowe zmiany genomowe i transkryptomocne, ponieważ taką podatność można terapeutycznie wykorzystać, stosując leki ukierunkowane molekularnie. Jednakże prawie wszystkie nowotwory po pewnym czasie rozwijają oporność na terapie ukierunkowane molekularnie. Obserwacja ta potwierdza obecne rozumienie raka jako choroby dynamicznej, a nie molekularnie stabilnej. Wyniki wielu badań obejmujących różnorodne rodzaje nowotworów sugerują, że heterogenność wewnątrz guza napędza ewolucję nowotworów i sprzyja oporności na leki. Dlatego kompleksowe zrozumienie podstaw molekularnych rozwoju nowotworu jest niezbędne do opracowania skutecznych i trwałych strategii terapeutycznych [13].

Powyższa teza dotycząca heterogenności nowotworów stanowi podstawę do poszukiwania markerów prognostycznych m.in. u pacjentek z różną odpowiedzią na leczenie raka piersi.

3. RAK PIERSI

Rak piersi (RP; ang. *breast cancer* - BC) jest najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym wśród kobiet na świecie. Ryzyko populacyjne zachorowania na RP u kobiet wynosi 12% [14]. W roku 2020 zdiagnozowanych zostało ok. 2,3 miliona nowych przypadków, co stanowi ok. 11,7% zachorowań na wszystkie nowotwory. Śmiertelność w przypadku raka piersi oscyluje na poziomie ok. 6,9% rozpoznanych przypadków [1]. Występowanie RP wzrasta we wszystkich regionach świata, ale najwyższa zachorowalność występuje w krajach uprzemysłowionych. Prawie połowa przypadków na skalę globalną dotyczy krajów rozwiniętych [15]. Trend ten wynika przede wszystkim z zachowań charakterystycznych dla stylu życia zachodniego, związanego z niezdrową dietą, paleniem tytoniu, nadmiernym stresem i małą aktywnością fizyczną [16]. Wysoki wskaźnik zachorowalności sprawia, że ma on duże znaczenie zdrowotne i społeczne.

Rak piersi jest chorobą wysoce heterogenną, co oznacza, że może przybierać wiele różnych podtypów histologicznych i molekularnych. Prezentuje nie tylko szeroki zakres cech patologicznych i objawów klinicznych, ale także dużą różnorodność zmian na poziomie genetycznym, epigenetycznym i transkryptomycznym. Fakt ten w zestawieniu z wysokim poziomem zachorowalności, sprawia, że RP jest interesującym obiektem badań naukowych, które mają na celu zrozumienie przyczyn, mechanizmów rozwoju oraz leczenia tej choroby [17][18].

3.1. Czynniki ryzyka zachorowania na raka piersi

Do czynników ryzyka zachorowania na raka piersi zalicza się [19]:

- **Wiek** – około 80% zachorowań u kobiet przypada na wiek po 50 roku życia;
- **Wywiad rodzinny** – potencjalna predyspozycja genetyczna lub zachorowania rodzinne;
- **Czynniki reproduktywne** – wczesny wiek pierwszej miesiączki, późny wiek wystąpienia menopauzy oraz późny wiek urodzenia pierwszego dziecka. Szacuje się, że każdy rok opóźnienia menopauzy wzmacnia ryzyko zachorowania na raka piersi o około 3% [20].

Urodzenie pierwszego dziecka po 35. roku życia podwyższa ryzyko zachorowania na RP o około 50% [21];

- **Czynniki hormonalne** – zaburzenia gospodarki estrogenowej (estrogen zarówno endogeny, jak i egzogeny). Wyższe ryzyko zachorowania na RP obserwuje się u kobiet stosujących doustną antykoncepcję i/lub hormonalną terapię zastępczą [22];
- **Dieta i styl życia** – nadwaga, nadmierna podaż tłuszczów (zwłaszcza nasyconych) w diecie, brak regularnej aktywności fizycznej;
- **Nadmierne spożywanie alkoholu** – konsumpcja alkoholu może podnieść poziom estrogenów i ich hormonów pochodnych we krwi. Metaanaliza oparta na kilkudziesięciu pracach badawczych wskazuje, że codzienne spożycie alkoholu na poziomie 35g wzmacnia ryzyko rozwoju raka piersi o około 32% [23].
- **Palenie papierosów** – badania ostatnich lat wskazują, że regularne palenie papierosów zwłaszcza w młodym wieku generuje większe ryzyko rozwoju [24];
- **Gęsta tkanka gruczołowa piersi** - piersi mogą przyjmować budowę tłuszczową, gruczołową lub mieszaną (w zależności od dominującej tkanki). Rozwojowi nowotworów złośliwych sprzyja zwłaszcza gęste utkanie gruczołowe [25].
- **Wcześniejsze zachorowanie na nowotwór złośliwy** zwłaszcza dotyczy to raka piersi, jajnika lub trzonu macicy.

3.2. Podłoże genetyczne nowotworów, a rak piersi

Karcynogeneza jest procesem wielostopniowym i wieloczynnikowym, stymulowanym przez predyspozycje genetyczne oraz czynniki środowiskowe. Główne mechanizmy komórkowe umożliwiające jej postęp to unikanie apoptozy, nieograniczona zdolność do podziałów komórkowych, zwiększona angiogeneza, oporność na sygnały antyproliferacyjne oraz indukcja własnych sygnałów wzrostu, a także nabywanie zdolności do przerzutowania [6]. W ujęciu genetycznym karcynogeneza jest wynikiem mutacji w genach, które w warunkach fizjologicznych regulują zdolność komórki do wzrostu i podziałów [26].

Obecnie stosowana i zalecana klasyfikacja germinalnych wariantów genetycznych (dziedziczne, obecne we wszystkich komórkach) opiera się na wytycznych ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*) oraz AMP (*Association for Molecular Pathology*) z 2015 roku, gdzie zaproponowano 5 klas: warianty patogenne (klasa 5), warianty potencjalnie patogenne (klasa 4), warianty o niepewnym znaczeniu (*variants of uncertain significance* - VUS)

(klasa 3), warianty potencjalnie łagodne (klasa 2) oraz warianty łagodne (klasa 1). Istnieją szczegółowe wytyczne klasyfikacji wariantów do poszczególnych klas, a proponowana terminologia jest stosowana w genetyce i w tym także w czołowych bazach danych np. Clinvar, GnomAD, Varsome, Franklin i innych [27]. W badaniach diagnostycznych raportowane są obligatoryjnie warianty klasy 4 i 5, natomiast raportowanie wariantów typu VUS, pozostawiono do decyzji laboratorium (przy czym zaleca się, by były one wymienione w osobnej sekcji), z zasady nie raportuje się wariantów klasy 1 i 2 [27].

Ponadto dla wariantów somatycznych (nabytych, obecnych w komórkach danego narządu/tkanki) zalecana jest osobna klasyfikacja oparta na wytycznych *Association for Molecular Pathology*, *American Society of Clinical Oncology*, oraz *College of American Pathologists* z 2017 roku odnosząca się do ich znaczenia diagnostycznego, terapeutycznego i prognostycznego. Według tej klasyfikacji wyróżnia się 4 klasy: Tier I: warianty o silnym znaczeniu klinicznym (*Variants of Strong Clinical Significance*), Tier II: warianty o potencjalnym znaczeniu klinicznym (*Variants of Potential Clinical Significance*), Tier III: warianty o nieznanym znaczeniu klinicznym (*Variants of Unknown Clinical Significance*) oraz Tier IV: warianty łagodne i prawdopodobnie łagodne (*Benign or Likely Benign Variants*). Podobnie jak dla klasyfikacji ACMG zaleca się raportowanie wariantów typu Tier I i Tier II, pozostawiając do decyzji laboratorium raportowanie klasy Tier III. Opisane przez Li MM i wsp. wytyczne są respektowane w onkogenetyce i stosowane także przez w/w bazy danych [28].

Można przyjąć, że starszy termin „mutacja” jest obecnie równoważny z wariantami potencjalnie patogennymi i patogennymi oraz wariantami o silnym i potencjalnym znaczeniu klinicznym. Na potrzeby niniejszej dysertacji, w celu uproszczenia, przyjęto stosowanie starszego terminu „mutacja”.

Dla rozwoju nowotworu szczególne znaczenie mają mutacje w trzech grupach genów: protoonkogeny, geny supresorowe i geny mutatorowe.

3.2.1. Protoonkogeny

Protoonkogeny to prawidłowe geny, które w normalnych warunkach pełnią funkcje regulacyjne w organizmie, kodując białka kontrolujące procesy związane z wzrostem, podziałem i różnicowaniem komórek. W wyniku mutacji aktywujących lub zmian w ekspresji tych genów, mogą one ulec przekształceniu w onkogeny. Onkogeny są aktywną postacią protoonkogenów, zdolną do wywoływania niekontrolowanego wzrostu komórek i stymulującą rozwój nowotworów [29]. U człowieka zidentyfikowano kilka mechanizmów przekształcenia

protoonkogeny w onkogeny, takich jak mutacje punktowe, amplifikacje genów, translokacje chromosomowe, lub zmiany w ekspresji (**Tabela 1**).

Mechanizm	Protoonkogen	Przykład nowotworu
Translokacja chromosomowa	<i>c-myc</i> <i>c-abl</i>	Chłoniak B-komórkowy [30] Przewlekła białaczka mielocytowa [31]
Mutacja punktowa	<i>c-ras-Ha</i> <i>BRAF</i> <i>N-ras</i>	Ostra białaczka szpikowa [32] Rak jelita grubego, czerniak, chłoniaki nieziarnicze, rak trzustki [33][34]
Amplifikacja	<i>N-myc</i>	Guzy neuroendokrynne [35]

Tabela 1. Mechanizmy aktywacji protoonkogenów na przykładzie różnych nowotworów.

Do onkogenów uczestniczących w rozwoju raka piersi zalicza się między innymi *HER2*, *Ras* oraz *C-myc*.

HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*), znany również jako *c-erbB-2* (*ERBB2*) jest kluczowym onkogenem w patogenezie raka piersi i zlokalizowany jest na ramieniu długim chromosome 17 (17q12). Ulega on nadekspresji w około 20-30% przypadków raka piersi [36]. Genem homologicznym u myszy jest gen *Neu*, który został po raz pierwszy zidentyfikowany w komórkach nerwiaka płodowego [37], stąd często spotykaną nazwą genu *HER2* jest także *HER2/Neu*. Nadekspresja genu *HER2* powodowana jest głównie przez jego amplifikację lub rearanżację. Białko *HER2* (należące do rodziny białek EGFR) jest receptorem dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), zaangażowanym w przekazywaniem komórkom sygnałów związanych z kontrolą ich wzrostu. Nadekspresja *HER2*, która obserwowana w około 20% przypadków raka piersi, podwyższa odsetek komórek rakowych poprzez deregulację

ścieżki sygnałowej EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 (odpowiedzialnej za kontrolę cyklu komórkowego) i w ten sposób odpowiada za gorsze rokowania choroby [38][39].

Białka kodowane przez geny **Ras** należą do nadrodziny białek G (określanych także jako „białka N”, czyli białek wiążących GTP) [40]. Wyróżnia się trzech członków rodziny genowej *Ras*: *H-ras* (11p15), *K-ras* (12p12), *N-ras* (1p22). Mutacje punktowe zwykle powodują nadekspresję *Ras*, która prowadzi do deregulacji komórkowych ścieżek sygnałowych zależnych od kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen activated protein kinases* - MAPK). MAPK odgrywają rolę w regulacji odpowiedzi na sygnały zewnętrzne dochodzące do komórki (mitogeny). Mają one zatem wpływ na podziały komórkowe oraz na różnicowanie i apoptozę komórek. Aktywowane białko Ras aktywuje kinazę proteinową RAF, która z kolei fosforyluje i aktywuje kinazę MAPK/ERK (MEK1 lub MEK2). Fosforylowana MEK aktywuje kolejno kinazę ERK. Nadmierna aktywacja ścieżki Ras/Raf/MEK/ERK prowadzi do niekontrolowanego wzrostu komórek i przyczynia się do rozwoju nowotworów. Z tego powodu poszukiwane są substancje o potencjalnym znaczeniu chemioterapeutycznym, zdolne do zahamowania ścieżki MAPK/ERK, także w kontekście raka piersi [41][42][43]. Zaburzenia ścieżki Ras/Raf/MEK/ERK obserwowane są zarówno w łagodnych, jak i złośliwych procesach rozrostowych piersi. Niemniej jednak, w raku piersi mutacje *Ras* obserwowane są stosunkowo rzadko – w <5% przypadków [44]. Nadekspresja H-Ras uważana jest za zły czynnik prognostyczny raka piersi [45][46].

Gen **c-Myc** zlokalizowany jest na ramieniu długim chromosomu 8 (9q24) i koduje białko Myc – czynnik transkrypcyjny zawierający domeny bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*, podstawowa helisa-pętla-helisa) oraz LZ (ang. *leucin zipper*, zamek leucynowy), umożliwiające wiązanie z DNA i regulację aktywności licznych genów odpowiedzialnych na zdolność komórki do proliferacji [47]. Część z genów regulowanych przez Myc, np. *MTA1*, *hTERT*, *PEG10* odgrywa ważną rolę w progresji raka piersi [48][49][50]. Nadekspresja *c-Myc* jest obserwowana w rakach piersi o wysokim stopniu złośliwości, z kolei w tkankach prawidłowych zwykle nie obserwuje się amplifikacji *c-Myc* [51][52].

3.2.2. Geny supresorowe

Geny supresorowe pełnią kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy komórkowej zapobiegając nadmiernemu wzrostowi komórek. Ich produkty białkowe zaangażowane są także w naprawę uszkodzeń DNA zapobiegając mutacjom i błędom w procesie replikacji DNA. W przypadku uszkodzeń DNA geny supresorowe mogą aktywować mechanizmy naprawy lub

inicjować apoptozę, aby uniknąć dalszego rozprzestrzeniania się i rozwoju komórek z uszkodzonym DNA [29]. W wyniku mutacji deaktywującej gen supresorowy traci swoją funkcję, co promuje w komórce nieprawidłowy wzrost i niekontrolowane podziały komórkowe. W przeciwieństwie do onkogenów, geny supresorowe podlegają tzw. hipotezie dwóch uderzeń Knudsona, która zakłada, że oba allele kodujące określone białko muszą zostać uszkodzone, aby doprowadzić do efektu fenotypowego. Jeśli tylko jeden allel genu zostanie uszkodzony, drugi może nadal produkować wystarczającą ilość właściwego białka, aby zachować odpowiednią funkcję [53]. Mutacje alleli genów supresorowych mają charakter recesywny, podczas gdy mutacje w allelach onkogenów mają charakter dominujący. Przykładami genów supresorowych są *TP53*, *RBI*, *BRCA1* oraz *BRCA2* [54][55][56].

3.2.3. Geny mutatorowe

Geny mutatorowe zwane także genami naprawy DNA (MMR - *mismatch repair genes*, geny naprawy źle sparowanych zasad), kodują białka uczestniczące w procesie usuwania źle sparowanych zasad i odpowiadają za zdolność komórki do naprawy i utrzymania stabilności swojego materiału genetycznego. Mutacje w genach mutatorowych wpływają na utratę funkcji naprawczych i promują niestabilność mikrosatelitarną związaną z krótkimi powtórzeniami nukleotydów w DNA. Inaktywacja genów mutatorowych, podobnie jak genów supresorowych ma charakter zmiany recesywnej (opartej na teorii dwóch uderzeń Knudsona). Przykładami genów mutatorowych są: *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6*, *MED1* [57].

3.3. Predyspozycja do nowotworów piersi

Istnieją czynniki, które zwiększają ryzyko wystąpienia nowotworu u danej osoby. Czynniki te mogą być genetyczne, środowiskowe lub wynikać z kombinacji ich obu. Nowotwory mogą występować jako:

- nowotwory dziedziczne
- zachorowania rodzinne
- nowotwory sporadyczne

3.3.1. Nowotwory dziedziczne piersi

Dziedziczna predyspozycja do raka piersi związana jest z około 10% nowo rozpoznanych przypadków zachorowań. Zachorowania te uwarunkowane są dziedzicznymi mutacjami genów predysponującymi ich nosicieli do większego niż populacyjne ryzyko zachorowania podczas życia na nowotwór złośliwy [58]. Spełniają kryteria rodowodowo-kliniczne rozpoznania (liczba chorych, stopień pokrewieństwa między chorymi, wiek zachorowania). W odniesieniu do raka piersi, mutacje, które wiążą się z najwyższą predyspozycją genetyczną do zachorowania to mutacje w supresorowych genach o wysokiej penetracji: *BRCA1* i *BRCA2* (mutacje w tych genach odpowiadają za około 25% przypadków dziedzicznego raka piersi i/lub jajnika). Nosicielstwo tych mutacji w odniesieniu do ogólnej populacji chorych na raka piersi stwierdza się w od 3 do 5% przypadków badanych kobiet i wiąże się ono z ponad 10-krotnie wyższym ryzykiem zachorowania na ten nowotwór. Szacuje się również, że około 20-30% raków piersi u mężczyzn oraz do 17% raków jajnika uwarunkowanych jest mutacją germinalną w jednym z genów dziedzicznej predyspozycji zachorowania na nowotwór [59].

Do rozwoju nowotworu uwarunkowanego dziedziczną predyspozycją do konieczne są dwie mutacje: pierwsza mutacja w genie „wysokiej penetracji” – mutacja germinalna oraz druga mutacja – somatyczna. Do inaktywacji genu supresorowego (np. *BRCA1/BRCA2*) lub genów mutatorowych konieczne jest wystąpienie mutacji w obu allelach: germinalnej i somatycznej – jak w przypadku dziedzicznej predyspozycji, lub dwóch somatycznych, jak w przypadku nowotworów sporadycznych [60].

Do genów wysokiej predyspozycji dla raka piersi zalicza się m.in.:

- *BRCA1* i *BRCA2*
- *PALB2*
- *CDH1*
- *TP-53* (zespół Li-Fraumeni)
- *PTEN* (zespół Cowdena)

Ponadto wyróżnia się geny średniej predyspozycji do RP, których nosicielstwo mutacji zwiększa ryzyko zachorowania około 3-krotnie: *CHEK2*, *STK11* (zespół Peutza-Jaghersa), *ATM* (zespół ataksja-teleangiektazja), *NBN* (zespół Nijmegen), *BRIP1*.

Za kryterium rodowodowo-kliniczne rozpoznania dziedzicznego raka piersi i jajnika (ang. *hereditary breast and ovarian cancer* - HBOC) uważa się stwierdzenie wśród krewnych I/II/III stopnia 3 zachorowań na raka piersi i/lub jajnika w dowolnym wieku. Z kolei do cech rodowodowo-klinicznych związanych z wyższym ryzykiem wystąpienia HBOC zalicza się:

- wystąpienie 2 przypadków raka piersi lub raka jajnika u krewnych pierwszego stopnia lub drugiego stopnia u mężczyzny;
- wczesne zachorowanie na raka piersi przed 40 rokiem życia;
- wystąpienie raka piersi u mężczyzny w rodzinie;
- rak piersi obustronny
- synchroniczne lub metachroniczne zachorowanie na raka piersi i jajnika
- typy histologiczne raka piersi: rak rdzeniasty lub atypowy rdzeniasty oraz potrójnie ujemny rak piersi – zwłaszcza u kobiet w okresie przedmenopauzalnym;
- potwierdzona w testach molekularnych obecność mutacji genów wysokiej predyspozycji rozwoju raka piersi w rodzinie.

Gen *BRCA1* zlokalizowany jest na chromosomie 17 (17q21) i zawiera 24 eksony. Nosicielstwo mutacji w genie *BRCA1* zwiększa prawdopodobieństwo zachorowania nie tylko na raka piersi, statystycznie częściej rozpoznaje się wśród jej nosicieli także raka jajnika, jak również (rzadziej) raka jajowodu, otrzewnej, okrężnicy i raka prostaty u mężczyzn. W Polsce występują trzy mutacje założycielskie genu *BRCA1*, które stanowią (zależnie od źródła) około 30-70% wszystkich mutacji: c.5266dup (p.Gln1756fs), c.4034delA (p.Glu1346fs) oraz c.181T>G (p.Cys61Gly). Niewykrycie wyżej wymienionych mutacji w genie *BRCA1* stanowi wskazanie do poszerzenia diagnostyki o inne mutacje zarówno w genie *BRCA1*, jak i *BRCA2* oraz innych genach powiązanych z dziedziczną predyspozycją do HBOC. Zastosowanie techniki sekwencjonowania następnej generacji (ang. *next-generation sequencing* – NGS) i coraz więcej dostępnych danych z sekwencjonowania wszystkich eksonów *BRCA1/2* u pacjentek w Polsce sugerują, że lepszym rozwiązaniem diagnostycznym, pozwalającym oszczędzić czas i środki finansowe, jest objęcie wszystkich pacjentek badaniem wysokoprzepustowym, z pominięciem wstępnego etapu dla najczęstszych mutacji [61].

Gen *BRCA2* zlokalizowany jest na chromosomie 13 (13q12) i składa się z 27 eksonów. Mutacje w tym genie zwiększają ryzyko zachorowania na raka piersi w ciągu życia o około 40-45% oraz na raka jajnika o około 15-30% [62][63]. Ponadto nosicielstwo mutacji *BRCA2* zwiększa ryzyko zachorowania na: raka trzustki, raka pęcherzyka żółciowego, nowotwory złośliwe dróg żółciowych, raka jajowodu, czerniaka oraz raka prostaty [64].

W kwalifikacji do wykonania badań genetycznych w kierunku nosicielstwa mutacji *BRCA1* i *BRCA2* nadal najistotniejszym czynnikiem jest dobrze zebrany wywiad rodzinny uzupełniony o informacje dotyczące krewnych zarówno w linii żeńskiej, jak i męskiej probantki/probanta. W praktyce klinicznej lekarza genetyka pomocnym narzędziem do oceny

ryzyka wystąpienia mutacji w rodzinie są programy komputerowe z algorytmami liczącymi prawdopodobieństwo nosicielstwa mutacji *BRCA1* / *BRCA2* (Gail, Claus, Cuzick-Tyrer, BRCAPRO, BOADICEA, Myriad 1 i 2, Manchester) [65][66][67].

Kobiety, które powinny pozostawać pod ścisłą kontrolą onkologiczną to te, które na podstawie kryteriów kliniczno-rodowodowych oraz wyników badań molekularnych zakwalifikowane zostały do grupy wysokiego ryzyka zachorowania na raka piersi - stanowią one około 0,5 – 1% ogólnej populacji kobiet w Polsce i około 15% wśród chorych na raka piersi [68].

3.3.2. Zachorowania rodzinne

U około 15% chorych na nowotwory, w tym na raka piersi, obserwuje się kumulację zachorowań w rodzinie, jednak bez ustalonej mutacji. Rodziny te nie spełniają kryteriów rozpoznania dziedzicznych predyspozycji na nowotwory (np. cechują się późnym wiekiem pojawienia się choroby). Uważa się, że zachorowania rodzinne na nowotwory uwarunkowane są wielogenowo lub wieloczynnikowo. Ryzyko zachorowań na nowotwory u kolejnych członków takiej rodziny szacowane jest na poziomie ryzyka średniego lub małego. W przypadku zachorowań rodzinnych dziedziczona jest skłonność do wystąpienia choroby nowotworowej wśród krewnych (dziedziczenie wielogenowe, w genach „średniej” oraz „niskiej penetracji”). Pojawienie się nowotworu w rodzinie uwarunkowane jest także działaniem środowiskowych czynników ryzyka [69].

3.3.3. Zachorowania sporadyczne

Zdecydowana większość nowo diagnozowanych przypadków raka piersi (75-80%) to nowotwory sporadyczne, które rozwijają się bez ewidentnej predyspozycji dziedzicznej. Przyczyny rozwoju takich nowotworów są złożone, ale nie są one, zgodnie z obecnym stanem wiedzy, związane z dziedziczeniem mutacji genetycznych. U podłoża rozwoju nowotworów sporadycznych leży nagromadzenie się w ciągu życia uszkodzeń DNA prowadzących do niekontrolowanej proliferacji komórek. Etiologia ich rozwoju jest złożona, ściśle związana ze środowiskowymi (rakotwórczymi) czynnikami ryzyka. Istotna jest osobnicza zmienność genetyczna, warunkująca indywidualną wrażliwość na działanie tych czynników. Do powstania nowotworu sporadycznego konieczne są dwie mutacje somatyczne (nabyte), obecne w komórkach danego narządu [70].

3.4. Diagnostyka raka piersi

Kluczowe znaczenie w procesie diagnostyczno-terapeutycznym ma wczesne wykrywanie raka piersi, co może znacząco poprawić rokowanie i szanse na skuteczne leczenie. Diagnostyka RP obejmuje różne metody i techniki, które pozwalają na możliwie wczesne wykrycie nowotworu, ustalenie stadium jego rozwoju i podtypu oraz planowanie odpowiedniej terapii. W badaniu fizykalnym piersi lekarz ocenia rozmiar dostępnego palpacyjnie guza, jego umiejscowienie, kształt i konsystencję. Lekarz sprawdza również węzły chłonne pachowe stanowiące pierwotną drogę rozsiewu chłonnego. Badanie kliniczne stanowi ważny punkt wyjścia dla dalszej diagnostyki. Ostateczna diagnoza opiera się na wynikach badań histopatologicznych próbek tkanki nowotworowej pobranych podczas biopsji lub badania śródoperacyjnego oraz na dalszych badaniach molekularnych.

3.4.1. Objawy podmiotowe i przedmiotowe

Wywiad u chorej z podejrzeniem raka piersi powinien obejmować informacje dotyczące czasu i nasilenia objawów klinicznych oraz występowania potencjalnych czynników ryzyka (omówiono w podrozdziale 3.1). W każdym przypadku niezwykle istotny jest wywiad rodzinny ze szczególnym uwzględnieniem przypadków zachorowań na raka piersi oraz raka jajnika.

Badanie przedmiotowe obejmuje oglądanie i palpację piersi. U kobiet w okresie przedmenopauzalnym badanie najlepiej kilka dni po miesiączce, kiedy gruczoły są mniej napięte i niebolesne. W pierwszym etapie ocenia się symetrię i zarys piersi oraz brodawek sutkowych, a także ocenia się napięcie skóry (należy zwrócić uwagę na ewentualne zaciągnięcia skóry). Następnie w badaniu palpacyjnym, uciskając powolnymi ruchami dłoni, ocenia się poszczególne części narządu. Badanie najlepiej przeprowadzić w pozycji stojącej z rękami opartymi na biodrach oraz uniesionymi. W przypadku wykrycia podejrzonej zmiany, należy ocenić jej położenie na piersi, wielkość, kształt oraz spoistość. Zawsze należy zwrócić uwagę na węzły chłonne pachowe, szyjne, nadobojczykowe oraz podobojczykowe. Objawami wskazującymi na ryzyko zmiany złośliwej są:

- zmniejszona ruchomość zmiany w piersi,
- wciągnięcie skóry / brodawki sutkowej;
- owrzodzenie,
- sączące zmiany skórne

- pogrubienie skóry,
- obecność guzków satelitarnych,
- „skórka pomarańczy” (efekt nagromadzenia chłonniki) [71]

3.4.2. Metody diagnostyki obrazowej

Do metod diagnostyki obrazowej raka piersi zalicza się przede wszystkim mammografię i badanie ultrasonograficzne (USG). Mammografia to obrazowanie rentgenowskie piersi, które jest podstawową metodą przesiewowej diagnostyki RP. Pozwala ona na wczesne wykrycie zmian w tkankach piersi, zwłaszcza o utkaniu tłuszczowym, nawet przed pojawieniem się objawów. Mammografia w Polsce jest zwykle wykonywana rutynowo u kobiet regularnie co 2 lata od 50. roku życia w ramach Populacyjnego Programu Wczesnego Wykrywania Raka Piersi. Ultrasonografia, czyli USG, może być stosowana w celu potwierdzenia zmian wykrytych w mammografii lub do pierwotnej oceny guzów zwłaszcza u młodszych kobiet, u których dominuje utkanie gruczołowe piersi. Jeśli zostanie wykryta podejrzana zmiana w piersiach, konieczne jest przeprowadzenie biopsji celem dalszej oceny histopatologicznej tkanki. Istnieją różne techniki biopsji, takie jak biopsja cienkoigłowa, biopsja gruboigłowa lub biopsja chirurgiczna. Podstawowe znaczenie w diagnostyce raka piersi ma biopsja gruboigłowa. W niektórych przypadkach może być potrzebne dodatkowe obrazowanie, takie jak rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging* - MRI) piersi lub tomografia komputerowa (ang. *computed tomography* - CT), aby uzyskać bardziej szczegółowy obraz zmiany przed podjęciem się biopsji guza. Po potwierdzeniu obecności raka piersi, lekarze oceniają stadium, jego zaawansowania w skali TNM (*tumor, nodules, metastasis*), co obejmuje ocenę rozmiaru guza, obecność przerzutów do węzłów chłonnych i ewentualne przerzuty odległe. Stanowi to kluczowy etap dla zaplanowania leczenia pacjenta [72].

3.4.3. Histologia raka piersi

Według klasyfikacji nowotworów Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organisation* – WHO), wśród potencjalnie złośliwych zmian rozrostowych piersi, wyróżnia się zmiany prekursorowe (przedinwazyjne) i raki inwazyjne [73][74].

Raki piersi przedinwazyjne:

- **Rak przewodowy *in situ*** (ang. *ductal carcinoma in situ* - DCIS) – nowotworzenie komórek nabłonkowych przewodów mlekowych, bez cech naciekania poza błonę podstawną. Stanowią około 15-30% rozpoznawanych raków.

- **Rak zrazikowy *in situ*** (ang. *lobular carcinoma in situ* - LCIS) – zaburzenie struktury zrazików obejmujące końcowe odcinki układu przewodowo-zrazikowego o trzech podtypach: klasycznym, *florid* oraz polimorficznym.

LCIS i DCIS zwiększają ryzyko rozwoju raka naciekającego (inwazyjnego) piersi [75].

Raki piersi inwazyjne:

- **Inwazyjny rak przewodowy** - najczęstszy rodzaj raka piersi. W tym przypadku komórki nowotworowe przenikają nabłonek kanalików mlekowych piersi.

- **Naciekający rak zrazikowy (około 10% przypadków)** - rozwija się w komórkach zrazików mlekowych. Charakteryzuje się utratą integralności komórek zrazikowych.

Do rzadszych postaci raków inwazyjnych należą: rak rdzeniasty, rak cewkowy, rak śluzowotwórczy, rak onkocytny, rak bogatołuszczowy, rak bogatoglikogenowy, rak łojowy, gruczolakorak apokrynowy, rak mikrobrodawkowy naciekający piersi i inne [74].

Szczególną postacią raka piersi jest rak zapalny (ang. *inflammatory breast cancer* - IBC) - jest to agresywny rodzaj raka piersi, który charakteryzuje się szybko narastającym obrzękiem, rumieniem skóry, bolesnością i tkliwością piersi [76].

Oprócz wymienionych powyżej istnieje wiele innych postaci raka piersi co sprawia, że jego diagnoza i leczenie są wyjątkowo skomplikowane i wymagają ścisłej personalizacji terapii.

3.4.4. Badanie immunohistochemiczne

Podczas badania patomorfologicznego wykonuje się także badanie immunohistochemiczne (*immunohistochemistry* - IHC) oceniające ekspresję receptorów na powierzchni komórek nowotworowych oraz wskaźnik proliferacji Ki-67.

W badaniu immunohistochemicznym raka piersi ocenia się stopień ekspresji trzech rodzajów receptorów w materiale biopsyjnym:

1. **Receptor estrogenowy (ER):** nowotwór piersi może być sklasyfikowany jako ER-ujemny (ER-) lub ER-pozytywny (ER+), w zależności od obecności lub braku receptora estrogenowego na powierzchni komórek nowotworowych. Rak ER+ reaguje na terapie hormonalne, takie jak tamoksifen, czy inhibitory aromatazy.

2. **Receptor progesteronowy (PgR):** podobnie jak w przypadku ER, rak piersi może być sklasyfikowany jako PgR-ujemny (PgR-) lub PgR-pozytywny (PgR+), w zależności od obecności lub braku receptora progesteronowego. Przeciwnie do ER, PgR nie jest głównym celem hormonoterapii, ale jego obecność może mieć znaczenie w leczeniu;

3. **Receptor HER2:** nowotwór piersi jest klasyfikowany jako HER2-ujemny (HER2-) lub HER2-pozytywny (HER2+), w zależności od nadmiernej ekspresji *HER2*. W ocenie HER2 wyniki – i +1 określa się jako wyniki ujemne, a +3 jako dodatni. Wynik +2 w badaniu IHC wymaga poszerzenia diagnostyki o ocenę liczby kopii genu *HER2* metodą hybrydyzacji *in situ* (FISH). Terapie celowane, takie jak trastuzumab (Herceptin), są skuteczne w leczeniu raka HER2-pozytywnego.

Ponadto w badaniu immunohistochemicznym raka piersi ocenie podlega także indeks proliferacji Ki-67. Uważany jest on za wskaźnik potencjału mitotycznego komórek i koreluje często z przebiegiem choroby nowotworowej, pełniąc funkcję biomarkera prognostycznego choroby. W przypadku raka piersi, kryterium wysokiego wskaźnika Ki-67 jest próg min. 20%, co związane jest ze złym rokowaniem choroby [77][78]. Immunohistochemiczna ocena Ki67 ma jednak pewne ograniczenia niejednakowy wybór przeciwciał do testów oraz potencjalne problemy wynikające z heterogenności guza [79].

3.4.5. Klasyfikacja molekularna raka piersi na podstawie analizy ekspresji genów

Na początku XXI wieku, w badaniach Perou oraz Sørlie i wsp. na podstawie analizy z wykorzystaniem mikromacierzy DNA, wyróżniono kilka podtypów molekularnych raka piersi o różnych cechach klinicznych i rokowaniu [80][81]:

- **Luminalny A** - związany z wyraźną ekspresją receptorów estrogenowych (ER+). Nowotwory te są zwykle niskiego stopnia złośliwości i charakteryzują się lepszym rokowaniem. Są one również często wrażliwe na terapie hormonalne, takie jak tamoksifen czy inhibitory aromatazy.

- **Luminalny B** – wykazuje ekspresję ER oraz szybszą dynamikę rozwoju niż typ luminalny A.

- **HER2-dodatni** – charakteryzuje się brakiem ekspresji ER i PgR, nadekspresją HER2 oraz wrażliwością na leczenie anty-HER2, np. trastuzumab.

- **Bazalopodobny (*basal-like*)** – w większości nie wykazuje ekspresji ER, PgR oraz HER2 – tzw. „**rak piersi potrójnie ujemny**” (ER-, PgR-, HER2-). Raki te cechują się szybkim rozwojem i skłonnością do przerzutów, niewrażliwością na hormonoterapię oraz wrażliwością na chemioterapię.

Podsumowanie podtypów molekularnych i wyników badań immunohistochemicznych raka piersi zapewnia klasyfikacja St. Gallen (**Tabela 2**). Klasyfikacja molekularna St. Gallen to międzynarodowy konsensus ekspercki, który jest aktualizowany co kilka lat i zawiera wytyczne dotyczące diagnostyki i leczenia raka piersi. Ma na celu dostarczenie wytycznych lekarzom klinicyzom w celu podejmowania decyzji dotyczących leczenia raka piersi i uwzględnia wiele czynników, takich jak podtypy molekularne, stopień zaawansowania, obecność receptorów hormonalnych i HER2 oraz inne cechy molekularne. Klasyfikacja ta opiera się na poziomach ekspresji genów i receptorów hormonalnych oraz ocenia ryzyko nawrotu raka piersi. Według St. Gallen wyróżnia kilka podtypów, w tym: luminalny A, luminalny B, bazalopodobny oraz HER-dodatni [82].

Podtyp raka piersi	Definicja
Luminalny A	ER+ PgR+ (>20%) HER2- Niski indeks Ki-67 < 20%
Luminalny B	Luminalny B HER2-ujemny: ER+ PgR- lub <20% HER2- Wysoki indeks Ki-67 >20%
	Luminalny B HER2-dodatni: ER+ HER2+ Każdy wynik Ki67 oraz PgR
HER2-dodatni	HER2+ ER-

	PgR-
Bazalopodobny (potrójnie-ujemny)	ER- PgR- HER2- * ok. 80% raków „potrójnie-ujemnych” to raki bazalopodobne, ale mieszczą się tutaj także podtypy histologiczne o wysokiej złośliwości, np. rak rdzeniasty.
Inne typy histologiczne	ER+ (sitowaty, cewkowy, śluzowy) ER- (apokrynowy, rdzeniasty, gruczołowo-torbielowaty, metaplastyczny)

Tabela 2. Klasyfikacja raka piersi na podstawie konsensusu eksperckiego St. Gallen [82].

3.4.6. Rak piersi potrójnie ujemny (TNBC)

Podtypem raka piersi, który zasługuje na szczególną uwagę, jest potrójnie ujemny rak piersi (*triple-negative breast cancer* - TNBC), charakteryzujący się brakiem ekspresji trzech głównych celów terapeutycznych (ER, PR, HER-2). Stanowi on 15-20% wszystkich przypadków raka piersi, jest bardziej agresywny, charakteryzuje się szybszym tempem wzrostu, wyższym ryzykiem przerzutów i ryzykiem nawrotu, a w rezultacie gorszym rokowaniem, niż raki piersi wykazujące ekspresję receptorów hormonalnych [83]. Ze względu na swój specyficzny profil molekularny (utrata ekspresji receptorów) TNBC nie jest wrażliwy na terapię hormonalną. W takich przypadkach chemioterapia stanowi główne leczenie systemowe, ale skuteczność konwencjonalnej adiuwantowej chemioradioterapii pooperacyjnej dla TNBC jest niska [84][85][86].

Badania ostatnich lat wykazały, że stosowanie chemioterapii neoadiuwantowej w leczeniu TNBC prowadzi do istotnie wyższej pełnej odpowiedzi patomorfologicznej (ang. *pathological complete response* - pCR) niż w przypadku RP z obecnością receptorów hormonalnych [87]. Osiągnięcie pCR jest także wskaźnikiem lepszych wyników leczenia długoterminowego, a zatem pozytywnym czynnikiem rokowniczym [88]. Obecne wytyczne zalecają stosowanie kombinacji schematów chemioterapeutycznych opartych na taksanach,

antracyklinie, cyklofosfamidzie, cisplatynie i fluorouracylu. Standardowa strategia neoadiuwantowa obejmuje schematy z antracykliną (epirubicyną/doksorubicyną) + cyklofosfamidem (AC), po których następują cykle z taksonami (doksetaksel/paklitaksel). Ten schemat prowadzi do uzyskiwania istotnie lepszych wskaźników pCR u pacjentek z TNBC w porównaniu z pacjentkami nie-TNBC (51,2% vs. 12%) [89][90]. Niemniej jednak kontrowersje wynikają z faktu, że TNBC to choroba o wysokiej heterogenności i obserwuje się różną wrażliwość na powszechnie stosowane leki pomimo tego samego rozpoznania choroby [91]. Zwraca się uwagę na rozbieżności w skuteczności stosowanych schematów terapeutycznych. W związku z tym istnieje konieczność poszukiwania nowych metod umożliwiających prognozowanie przebiegu choroby u pacjentek poddawanych chemioterapii neoadjuwantowej.

W kontekście heterogenności nowotworów, w tym także TNBC, każda diagnoza nowotworu jest wyjątkowa i różni się na podłożu molekularnym u poszczególnych pacjentek. Tradycyjna klasyfikacja raka piersi oparta na histologicznych i immunohistochemicznych cechach guzów ma ograniczenia w zakresie spersonalizowanych strategii leczenia – tylko częściowo uwzględnia skomplikowane zmiany genetyczne leżące u podstaw procesów wzrostowych nowotworu [92].

Analiza ekspresji genów może pomóc w identyfikacji różnych podtypów molekularnych TNBC, umożliwiających stworzenie paneli prognostycznych pomocnych w ocenie rokowania choroby, doborze selektywnej terapii, a nawet wcześniejszym wykrywaniu TNBC. Jednym z pierwszych badań dotyczących molekularnej heterogenności TNBC było zaobserwowanie 6 różnych molekularnych wzorców ekspresji genów w TNBC przez Lehmann i wsp., którzy wyróżnili 2 podtypy bazalopodobnych TNBC (BL1 i BL2), immunomodulacyjny (IM), mezenchymalny (M), mezenchymalny przypominający komórki macierzyste (MSL) oraz luminalny z receptorami androgenowymi (LAR) [93]. Kolejne, bardziej zaawansowane klasyfikacje uwzględniające implikacje kliniczne podtypów zaproponowanych przez Lehmann i wsp. potwierdziły istnienie 4 podtypów TNBC: LAR oraz nie-LAR (a wśród nich: *basal-like immunoactivated*, *basal-like immunosuppressed* oraz mezenchymalny) [94][95][96]. Co ważne, wiele badań jednoznacznie wykazało, że pacjenci z podtypem LAR wykazują istotnie gorszy odsetek odpowiedzi na chemioterapię neoadjuwantową [96]. Dlatego też sukces głównych wyzwań diagnostycznych i terapeutycznych zależy od zdefiniowania konkretnych podtypów TNBC oraz istotnych biomarkerów mogących wpłynąć na zindywidualizowane podejście do pacjentów z TNBC [97].

3.5. Leczenie personalizowane raka piersi

Obecnie leczenie personalizowane raka piersi oparte jest na ocenie dobrze znanych markerów immunohistochemicznych: receptorów estrogenowych, progesteronowych oraz amplifikacji HER2 oraz na blokowaniu szlaków molekularnych wpływających na agresywny wzrost nowotworu [5].

3.5.1. Rak piersi luminalny

Terapia hormonalna stanowi podstawę leczenia podtypów raka piersi wykazujących ekspresję receptorów ER/PgR na powierzchni komórek. Kluczowe znaczenie w tej terapii ma blokowanie działania estrogenu przez kompetycyjnych antagonistów receptora ER – tamoksifen lub fulwestrant oraz hamowanie jego produkcji przez inhibitory aromatazy (steroidowe lub niesteroidowe) [98]. Główną barierą w długotrwałym leczeniu raka piersi przy pomocy tamoksifenu są mechanizmy nabytej oporności, dlatego podejmowane są próby niwelowania tego efektu poprzez identyfikację i modulację szlaków molekularnych uczestniczących w jej wytworzeniu, takich jak ścieżki sygnałowe receptora estrogenowego, zmiany ekspresji receptorów czynników wzrostu, deregulacja szlaków sygnalizacyjnych PI3K-PTEN/AKT/mTOR, czy NFκB [99].

W badaniu MONARCH3 analiza działania inhibitora kinaz zależnych od cyklin CDK4/6 -abemacyklibu - w skojarzeniu z niesteroidowym inhibitorem aromatazy (anastrozol lub letrozol) wykazały pozytywne wyniki leczenia ze znacznie dłuższą medianą czasu przeżycia wolnego od progresji (ang. *progression-free survival* - PFS) w porównaniu do grupy placebo (28.18 vs. 14.76 miesięcy) [100]. Dobre wyniki osiągnęto także w skojarzeniu hormonoterapii z innym inhibitorem CDK4/6 – rybocyklibem [101]. W badaniu BOLERO-2 wykazano, że zastosowany inhibitor szlaku mTOR (ewerolimus) w skojarzeniu z inhibitorem aromatazy eksemestanem przynosi poprawę PFS w luminalnym raku piersi [102]. Ponadto, inhibitory deacetylazy histonowej, takie jak etinostat, przyniosły pozytywne efekty w leczeniu luminalnego raka piersi ograniczając oporność na hormonoterapię [103].

Udowodniono także, że selektywne inhibitory kinazy fosfatydyloinozytolu-3 (PI3K) – taselisib oraz alpelisib w skojarzeniu z fulwestrantem wydłużają czas przeżycia wolny od progresji [104][105][106]. U chorych z mutacją aktywującą w genie *PIK3CA* dochodzi do nadmiernej aktywacji ścieżki sygnałowej PI3K-AKT w komórkach nowotworowych, promując ich wzrost, proliferację i zdolność naciekania [107]. Wyniki badania klinicznego III fazy

SOLAR-1 wykazały, że dodanie alpelisibu (który blokuje szlak PI3K) do terapii hormonalnej wiąże się z istotną klinicznie korzyścią w zakresie czasu przeżycia całkowitego w porównaniu do samej hormonoterapii u chorych na zaawansowanego hormonozależnego, HER2-ujemnego raka piersi [108].

Istotnym problemem jest nawrotowy rak piersi oraz przerzuty odległe nowotworu zachowujące się bardziej agresywnie i wykazujące większą oporność na leczenie niż guz pierwotny [109]. W tym kontekście użycie inhibitora AKT – kapiwasertibu wraz z antagonistą ER przynosi obiecujące rezultaty zmniejszając potencjał proliferacyjny komórek raka piersi [110].

3.5.2. Rak piersi HER2-pozytywny

Terapie ukierunkowane na białko HER2 stanowią podstawą strategię postępowania w raku piersi HER2-pozytywnym. Próba kliniczna CLEOPATRA wykazała skuteczność działania schematów leczniczych, opartych na blokowaniu HER2 przez trastuzumab/pertuzumab w skojarzeniu z chemioterapią (paklitaksel, docetaksel, lub kapecytabina), co stanowi obecnie złoty standard w leczeniu raka piersi HER2-dodatniego [111]. W kontekście nowotworów HER2-dodatnich wykazano, że włączenie inhibitorów kinazy tyrozynowej receptora EGFR takich jak: neratynib, tukatynib i lapatynib przy terapii trastuzumabem lub kapecytabiną wydłuża czas wolny od progresji oraz spowalnia wzrost guza [112][113].

3.5.3. Rak piersi potrójnie-ujemny

Z uwagi na znaczną heterogenność wewnętrzną oraz brak klasycznych punktów uchwytu dla terapii celowanych (receptorów), standardem w leczeniu TNBC pozostaje neoadjuwantowa chemioterapia mająca na celu redukcję wielkości guza i naciekania przez niego okolicznych struktur (przygotowanie pacjenta przed leczeniem chirurgicznym) oraz eliminację mikroprzerzutów i przerzutów węzłowych [114]. Oparta jest na antracyklinach, taksanach oraz związkach bazujących na platynie, np. cisplatyna. Obecnie stosowanych jest 6 schematów chemioterapii neoadjuwantowej u pacjentek z TNBC:

- **TAC:** docetaksel (Taxotere) + doksorubicyna (Adriamycin) + cyklofosfoamid (Cytosan)
- **TC:** docetaksel (Taxotere) + cyklofosfamid (Cytosan)

- **AC:** dokсорubicyna (Adriamycin) + cyklofosfamid (Xytozan)
- **ACdd** (*dose-dense*): AC w skojarzeniu z czynnikami pobudzającymi wzrost kolonii granulocytarnych
- **CMF:** cyklofosfamid + metotreksat + fluorouracyl
- **CAF:** cyklofosfamid + dokсорubicyna + fluorouracyl
- **CEF-T:** cyklofosfamid + dokсорubicyna + fluorouracyl + paklitaksel/docetaksel [115]

Pomimo tego, że wiele przypadków TNBC prezentuje początkowo dobre efekty chemioterapii neoadjuwantowej, dużą wadą powyższych schematów jest zjawisko lekooporności nabytej implikujące długotrwałą efektywność leczenia [116][117].

U pacjentek chorujących na TNBC i wykazujących mutację *BRCA1/2* wykazano skuteczność talazoparibu i olaparybu – inhibitorów polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP), czyli enzymu uczestniczącego w naprawie DNA [118][119], przyczyniając się do wydłużenia czasu przeżycia wolnego od progresji. Inhibitory PARP wykazują skuteczność także w rakach piersi BRCA+ i HER2-ujemnych [120]. Ponadto leczenie z hamowaniem szlaku AKT (z użyciem ipatasertibu i kapiwasertybu) wykazało skuteczność u pacjentek z przerzutowym TNBC poddawanych terapii paklitakselem [121]. W odniesieniu do podtypu molekularnego LAR TNBC, zastosowanie enzalutamidu – inhibitora receptora androgenowego cechuje się wydłużeniem czasu przeżycia u pacjentek z chorobą przerzutową [122].

Pomimo dotychczasowych badań nad profilem molekularnym TNBC, chemioterapia pozostaje złotym standardem leczenia tego podtypu raka piersi. Konieczne są dalsze badania nad wyróżnieniem podtypów molekularnych TNBC co mogłoby usprawnić postępowanie kliniczne u pacjentek z tą chorobą.

3.6. Ocena zaawansowania choroby i systemy prognozowania

Podobnie jak w większości nowotworów litych, klasycznie stopień zaawansowania raka piersi określa się na podstawie skali TNM. Wstępnej klasyfikacji klinicznej pacjentki (cTNM) dokonuje się na podstawie zgromadzonych danych klinicznych, jednak decyzje terapeutyczne oparte są w głównej mierze o wyniki uzyskane po ocenie histopatologicznej tkanki biopsyjnej (pTNM). Stopień zaawansowania nowotworu w skali TNM jest także najważniejszym czynnikiem prognostycznym w raku piersi. Dalsze rokowanie choroby uzależnione jest m.in.

od postaci histologicznej raka, zróżnicowania nowotworu, ekspresji receptorów, amplifikacji genu HER2 oraz indeksu Ki-67 [77].

VIII edycja klasyfikacji AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*) zaleca ponadto stosowanie rokowniczego stopnia zaawansowania klinicznego, zawierającego dodatkowo ocenę stanu receptorów (ER, PgR, HER2), ocenę stopnia złośliwości (cecha G) oraz profilu molekularnego Oncotype DX [123][124].

W ostatnich latach wykazano silne znaczenie prognostyczne poszczególnych podtypów molekularnych raka piersi, spośród których najlepsze rokowniczo są raki luminalne A, a najgorszej prognozują raki bazalopodobne. Poznanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw procesu karcynogenezy pozwala na ich molekularne scharakteryzowanie oraz zastosowanie indywidualnego leczenia.

Zmiany molekularne obserwowane w nowotworach można wykorzystać przy tworzeniu swoistych paneli prognostycznych (czynniki pozwalające przewidzieć przebieg choroby) i predykcyjnych (czynniki pozwalające na przewidywanie reakcji na zastosowane leczenie).

Współcześnie stosowane testy oparte są na analizie różnych genów w tkance nowotworu i różnią się między sobą zakresem możliwości prognostycznych i/lub predykcyjnych oraz liczbą analizowanych genów. W przypadku raka piersi, do najczęściej stosowanych paneli oceniających ryzyko nawrotu choroby i wystąpienia przerzutów zalicza się:

- **MammaPrint®:** panel diagnostyczny zawierający 70 genów, który został opracowany do oceny ryzyka nawrotu raka piersi oraz pojawienia się przerzutów odległych.
- **Oncotype DX®:** panel 21 genów określający ryzyko nawrotu choroby u kobiet chorych na raka piersi, ze szczególnym uwzględnieniem pacjentek z wczesnym stadium, rakiem ER-pozytywnym (receptor estrogenowy), HER2-ujemnym i guzami piersi bez przerzutów do węzłów chłonnych. **Oncotype DX®** pomaga określić reakcję na chemioterapię [125].
- **Prosigna PAM-50 Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay®:** panel 50-genowy;
- **EndoPredict®:** panel 12-genowy.
- **Breast Cancer Index®:** panel służący do analizy stosunku ekspresji genów *HOXB13* : *IL17BR* (H/I) do predykcji reakcji na terapię hormonalną [126].

Stosowane dotychczas panele prognostyczne raka piersi podsumowano w **Tabeli 3**.

Nazwa testu	Panel genowy	Producent	Referencje
Oncotype DX®	<i>Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MYBL2, ESRI, PGR, BCL2, SCUBE2, MMP11, CTSL2, BAG1, CD68, GSTM1, HER2, GRB7, ACTB, GADPH, RPLPO, GUS, TRFC</i>	Genomic Health, Inc.	[127]
MammaPrint®	<i>BBC3, EGLN1, TGFB3, ESM1, IGFBP5, FGF18, SCUBE2, WISPI, FLT1, HRASLS, STK32B, RASSF7, DCK, MELK, EXT1, GANZ, EBF4, MTDH, PITRM1, QSCN6L1, CCNE2, ECT2, CENPA, LIN9, KNTC2, MCM6, NUSAP1, ORC6L, TSPYL5, RUNDC1, PRC1, RFC4, RECQL5, CDCA7, DTL, COL4A2, GPR180, MMP9, GPR126, RTN4RL1, DIAPH3, CDC42BPA, PALM2, ALHH4A1, AYTL2, OXCT1, PEI, GMPS, GSTM3, SLC2A3, FGF18, LGP2, NMU, UCHL5, JHDM1D, AP2B1, MS4A7, RAB6B, LOC100288906, C9orf30, ZNF533, C16orf61, SERF1A, C20orf46, LOC730018, LOC100131053, AA555029 RC</i>	Agendia BV	[128]
Prosigna PAM-50®	<i>ACTR3B, ANLN, BAG1, BCL2, BIRC5, BLVRA, CCNB1, CCNE1, CDC20, CDC6, CDCA1, CDH3, CENPF, CEP55, CXXC5, EGFR, ERBB2, ESRI, EXO1, FGFR4, FOXA1, FOXC1, GPR160, GRB7, KIF2C, KNTC2, KRT14, KRT17, KRT5, MAPT, MDM2, MELK, MIA, MKI67, MLPH, MMP11, MYBL2, MYC, NAT1, ORC6L, PGR,</i>	NanoString Technologies, Inc.	[129]

	<i>PHGDH, PTTG1, RRM2, SFRP1, SLC39A6, TMEM45B, TYMS, UBE2C, UBE2T</i>		
EndoPredict®	<i>BIRC5, UBE2C, DHCR7, RBBP8, IL6ST, AZGP1, MGP, STC2, CALM2, OAZ1, RPL37A</i>	Sividon Diagnostics GmbH	[130]

Tabela 3. Zestawienie przykładowych paneli prognostycznych raka piersi.

W związku z tym, że każda diagnoza raka piersi jest unikalna, a heterogenność kliniczna i genetyczna nowotworu sprawia, że często nie ma jednoznacznej ścieżki oceny precyzyjnego prognozowania przebiegu choroby u konkretnej pacjentki, istotnym problem medycznym, który wydaje się cechować się pewną losowością, pozostaje różna odpowiedź pacjentek na zastosowane leczenie. W związku z tym, konieczne są badania mające na celu opracowanie testów molekularnych umożliwiających prognozowanie przebiegu choroby, jak również paneli predykcyjnych ułatwiających przewidywanie oraz monitorowanie indywidualnej reakcji na leczenie raka piersi.

4. OMIKA: GENOM, TRANSKRYPTOM I PROTEOM

Na przestrzeni ostatnich lat rozumienie biologii nowotworu zmieniło się dzięki postępowi molekularnych technik diagnostycznych. Dzięki rozwojowi sekwencjonowania następnej generacji (ang. *next-generation sequencing*, NGS), znacznie poszerzyła się wiedza dotycząca genomu i mechanizmów regulujących ekspresję genów w komórkach nowotworowych. Nowoczesne mechanizmy sekwencjonowania DNA i RNA pozwalają na prowadzenie badań w nowych obszarach onkogenetyki, takich jak zmiany ekspresji genów lub oddziaływania czynników epigenetycznych na aktywność poszczególnych regionów genomu. Poznanie podłoża genetycznego karcynogenezy przyczynia się do zrozumienia mechanizmów molekularnych biorących udział w rozwoju poszczególnych nowotworów i do odkrywania nowych metod ich wykrywania, prognozowania dynamiki wzrostu oraz projektowania terapii [18].

Zmiany genetyczne i globalne zmiany w ekspresji genów można rozważać na trzech różnych poziomach, tj. genomowym, transkryptomycznym i proteomicznym, gdzie każdy

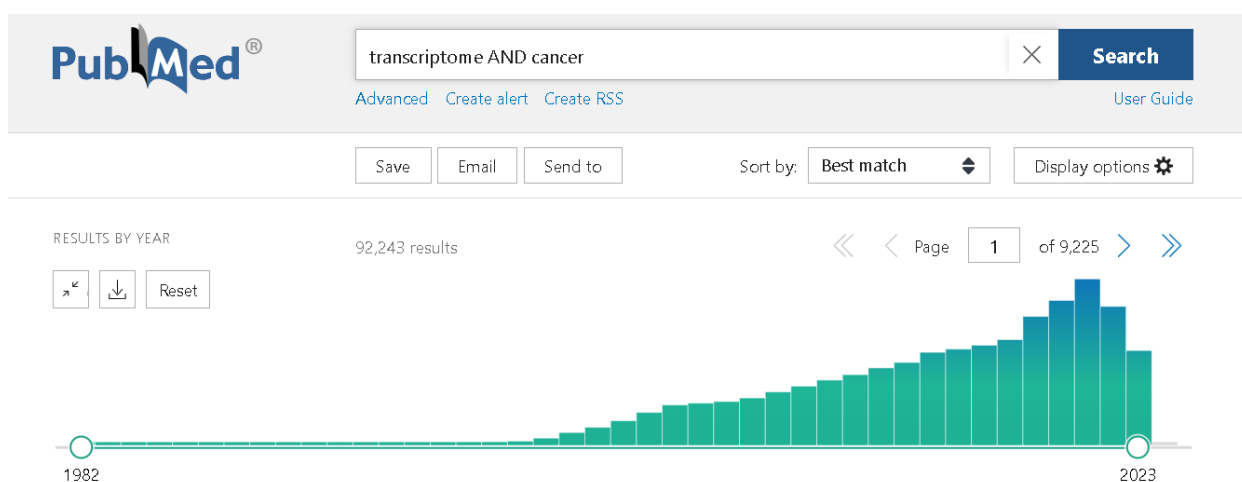
poziom ma swoje unikalne zalety i ograniczenia. Analiza skomplikowanych interakcji między powyższymi poziomami molekularnymi stanowi podstawę zrozumienia onkologii personalizowanej [131].

Genom to zbiór całego materiału genetycznego organizmu. Składa się z sekwencji DNA, które zawierają informacje genetyczne niezbędne do syntezy RNA oraz kodujące białka. **Poziom genomowy** może być uważany za najdalszy od fenotypu komórkowego. Od momentu zsekwencjonowania ludzkiego genomu dokonano znaczącego postępu w badaniach mutacji inicjujących transformację nowotworową. Zidentyfikowano konkretne mutacje genowe odpowiedzialne za dziedziczne zespoły nowotworowe. Pomimo licznych zalet płynących z możliwości sekwencjonowania DNA, badanie zmian na tym poziomie ma pewne ograniczenia w klinicznej medycynie spersonalizowanej. W związku z tym, że tylko mały procent ludzkiego genomu ulega ekspresji do poziomu białek a ekspresja genów to bardzo skomplikowany i wieloetapowy proces, kontrolowany przez liczne mechanizmy regulacyjne, takie jak metylacja DNA, białka wiążące DNA czy mały RNA interferujący (siRNA) na produkt białkowy może wpływać wiele zaburzeń niewynikających z kodującej go sekwencji nukleotydowej. Ponadto badania molekularne, a także cytogenetyczne jak kariotypowanie i hybrydyzacja genomowa, ujawniły znaczną heterogenność komórek nowotworowych. co wpływa na odmienną sytuację kliniczną. Podsumowując, analiza genomu nowotworowego może dostarczyć cennych informacji na temat sekwencji DNA i jego struktury, ale może być niewystarczające do opisanie rzeczywistego fenotypu tkanki oraz cech klinicznych nowotworu. Dlatego też konieczne jest szersze podejście do prawidłowego zrozumienia biologii guza i znalezienia odpowiednich molekularnych celów diagnostycznych oraz opracowania konkretnej terapii dla pacjenta onkologicznego.

Proteom to kompletny zestaw białek obecnych w organizmie – aparat wykonawczy procesów zachodzących w komórce. Białka są produkowane na podstawie informacji zawartych w transkryptach genów. Każde białko z kolei ma swoją unikalną strukturę i funkcję, co wpływa na różnorodność procesów biologicznych zachodzących w organizmach. **Poziom proteomiczny**, który jest bliższy molekularnym mechanizmom decydującym o fenotypie komórki niż genomika, koncentruje się na ilościowych pomiarach białek mających na celu charakteryzację procesów biologicznych i rozszyfrowania białkowych mechanizmów regulacji ekspresji genów w żywej komórce [33,34]. Białka pełnią kluczowe funkcje we wszystkich procesach komórkowych, a mutacje zmieniają ich ekspresję, własności i aktywność. Analiza proteomu komórki nowotworowej pozwala na uzyskanie obrazu modyfikacji postranslacyjnych oraz interakcji między mechanizmami komórkowym [132].

Wśród technik analizy białek, najczęściej wykorzystywane są mikromacierze. Metoda ta wykorzystuje przeciwciała monoklonalne lub inne ligandy do identyfikacji konkretnego białka. Mikromacierze białkowe znalazły szerokie zastosowanie w diagnostyce molekularnej, zwłaszcza w odkrywaniu biomarkerów nowotworowych. Niemniej jednak trudności techniczne związane z tą metodą, takie jak różnice we właściwościach fizycznych i chemicznych białek oraz konieczność użycia wysoce specyficznych paneli przeciwciał, stanowią istotne przeszkody dla badań proteomicznych w szerokim zakresie [132].

Kluczowym połączeniem między proteomem i genomem jest **transkryptom**. Jest to zbiór wszystkich transkryptów, czyli kopii komplementarnych genów w postaci RNA. Zawiera on informacje zakodowane pierwotnie w DNA. Transkryptom, w przeciwieństwie do genomu, jest zbiorem dynamicznym - co oznacza, że dostarcza informacji o tym, które geny są aktywne w danym czasie i w danej tkance, co zmienia się w różnych warunkach środowiska. Transkryptom reaguje aktywnie na warunki fizjologiczne lub patologiczne, dostosowując metabolizm komórkowy do bodźców napływających z zewnątrz. Zmiany w transkryptomie odzwierciedlają różne stany komórek, etapy rozwojowe i mechanizmy regulacyjne. Obecnie, transkryptomika znalazła się w centrum uwagi naukowej dzięki szybkiemu rozwojowi metod sekwencjonowania RNA (RNA-Seq) [133]. W bazie Pubmed w sierpniu 2023r. było zgromadzonych ponad 92 tysiące publikacji z zakresu badania transkryptomu w komórkach nowotworowych (**Rysunek 1**).



Rysunek 1. Wzrost liczby publikacji z zakresu badania transkryptomu w komórkach nowotworowych w latach 1982 - 2023 w bazie PubMed (źródło: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> z dnia 01.09.2023)

4.1. Transkryptom

Obszarem o szczególnym potencjale użyteczności w onkologii klinicznej jest badanie transkryptomu. Badanie aktywności genowej w oparciu o RNA może umożliwić określenie podtypów nowotworów i dobór odpowiedniego leczenia we wczesnym stadium rozwoju guza, jak również przewidywanie odpowiedzi pacjenta na terapię, ograniczając w ten sposób prawdopodobieństwo rozwoju działań niepożądanych chemioterapeutyków [134].

Badania wykazują, że około 93% ludzkiego DNA jest transkrybowane na RNA, jednak tylko 2% na RNA kodujące białka (pcRNA) [135]. Te cząsteczki, w dojrzałej formie, określają sekwencję aminokwasów w białku i uczestniczą w translacji. Pozostała część ludzkiego transkryptomu składa się z RNA niekodującego (ncRNA) i obejmuje dotychczas odkryte: RNA rybosomalne (rRNA), RNA transferowe (tRNA), mikro RNA (miRNA), małe RNA interferujące (siRNA), RNA oddziałujące z białkiem PIWI (piRNA), małe RNA jądrowe (snRNA), małe RNA jąderkowe (snoRNA), RNA pozakomórkowe (exRNA), RNA przewodnikowe (grRNA), małe RNA specyficzne dla ciałek Cajala (scaRNA), RNA kołowe (circRNA), długie RNA niekodujące (lncRNA), takie jak transkrypt specyficzny dla inaktywacji chromosomu X (XIST) i RNA antysensowny transkryptu HOX (HOTAIR). Ich funkcje komórkowe znacząco różnią się od siebie. Niektóre ncRNA pełnią funkcje katalityczne, np. biorą udział w produkcji tRNA i rRNA, podczas gdy inne uczestniczą w kontrolowaniu funkcji mRNA, np. miRNA, snRNA, snoRNA. Wszystkie wyżej wymienione rodzaje ncRNA potencjalnie przyczyniają się do procesu onkogenezy. Co więcej, ciągle odkrywane są nowe rodzaje RNA dzięki nowoczesnym technikom molekularnym. Skrupulatna analiza funkcji RNA i rozwijanie nowych technik może przyczynić się do lepszego zrozumienia transkryptomu.

5. METODY DIAGNOSTYCZNE W ONKOGENETYCE

Wyróżnia się 3 grupy laboratoryjnych metod diagnostycznych stosowanych w onkogenetyce:

1. **Metody cytogenetyki klasycznej** (analiza prążkowa chromosomów, pozwalająca na analizę aberracji liczbowych i strukturalnych oraz ocenę ich złamań i innych uszkodzeń), charakteryzuje się stosunkowo niską rozdzielczością, około 10 Mbpz i wymaga hodowli komórkowych [136].

2. **Metody cytogenetyki molekularnej**

a) **FISH** (ang. *fluorescent in situ hybridization*, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*) – polega na hybrydyzacji sekwencji DNA ze specyficznymi sondami znakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi, jest ograniczona poprzez możliwość stosowania tylko kilku różnych sond na raz (zwykle 2-3) i ma rozdzielczość do 40-100 kpz [137].

b) **aCGH** (ang. *array comparative genomic hybridization*, porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy) – polega na oznakowaniu dwóch genomów (badanego i wzorcowego) różnymi fluorochromami i porównaniu natężenia ich fluorescencji poprzez ich równoczesną hybrydyzację do genomu wzorcowego. Mikromacierze CGH umożliwiają wykrycie delecji i/lub duplikacji a także, do pewnego zakresu, amplifikacji fragmentów materiału genetycznego. Ich rozdzielczość zależy od stosowanej macierzy [138].

c) **MLPA** (ang. *multiplex ligase-dependent probe amplification*, multipleksowa amplifikacja sond zależna od ligacji) - jest to ilościowa ocena wybranych sekwencji DNA poprzez ich hybrydyzację z zestawem sond, pozwalających na ocenę delecji, duplikacji i do pewnego zakresu, amplifikacji. Rozdzielczość tej metody osiąga poziom nawet pojedynczych nukleotydów, ale ogranicza ją zestaw stosowanych sond – badanie dotyczy tylko wybranych fragmentów. Odmianą MLPA jest MS-MLPA (methyl-specific MLPA) pozwalająca na ocenę statusu metylacyjnego, np. analizę metylacji promotorów wybranych genów [139].

3. **Metody biologii molekularnej** – opisane w dalszej części monografii, m.in.

a) **PCR** (ang. *polymerase chain reaction*) i jej odmiany

b) **RT-PCR (qPCR)** (Real-Time PCR, PCR ilościowy)

c) **Sekwencjonowanie klasyczne metodą Sanger**

d) **NGS** [140]

5.1. Metody analizy transkryptomu

Rozwój technik molekularnych, a szczególnie technik wysokoprzepustowych, pozwolił na identyfikację markerów, umożliwiających zdefiniowanie potencjalnego „celu” molekularnego, na który należy ukierunkować leczenie pacjenta zwiększając tym samym selektywność i skuteczność terapii. Jednocześnie rozwój ten pozwolił na lepszą identyfikację mechanizmów modulujących indywidualną odpowiedź na leczenie oraz na opracowanie molekularnych markerów predykcyjnych dla niektórych leków [141].

Dotychczas rozwinięto kilka metod diagnostyki molekularnej, które pomagają określić rolę całkowitego RNA tworzących transkryptom w genezie różnych chorób. Pierwsze próby badania transkryptomu człowieka oparte były na ilościowym oznaczaniu mRNA za pomocą

metody Northern Blotting. Ta czasochłonna metoda wykorzystuje specyficzne dla genów sondy DNA, które hybrydują z RNA i umożliwiają analizę maksymalnie kilku transkryptów genów jednocześnie [142]. Następnie wprowadzono do analizy transkryptomu nowsze metody oparte na hybrydacji sond komplementarnych. Obecnie w metodach badań transkryptomu można wyróżnić trzy główne kierunki: mikromacierze, ilościową reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) oraz sekwencjonowanie wysokoprzepustowe (NGS), reprezentowane w głównej mierze przez metodę RNA-Seq [143].

5.1.1. Mikromacierze

Technologia mikromacierzy zdobyła szerokie uznanie od momentu jej odkrycia w połowie lat 90. i szybko stała się najczęściej stosowaną metodą do profilowania transkryptomu [144]. Mikromacierz to zbiór mikroczipów zawierających sondy DNA (oligomery nukleotydów) odpowiadające określonym sekwencjom. RNA jest izolowany z badanych próbek, poddawany jest odwrotnej transkrypcji i znakowaniu, a następnie tak uzyskany cDNA jest hybrydowany z mikromacierzą. Intensywność hybrydacji jest określana ilościowo za pomocą pomiaru fluorescencji poszczególnych cząsteczek, a wyniki pozwalają na ocenę poziomu ekspresji [144].

Mikromacierze znalazły szerokie zastosowanie także w badaniach mRNA nowotworów, umożliwiając w szczególności identyfikację genów ulegających zmiennej ekspresji, uczestniczących w kluczowych ścieżkach molekularnych i odkrycie licznych biomarkerów nowotworów [145]. Pomimo że pomiar obniżonej lub podwyższonej ekspresji mRNA za pomocą mikromacierzy jest dobrym narzędziem do analizy aktywności genów i zachowania molekularnego transkryptomu, wyniki mogą znacząco różnić się w zależności od rodzajów platform mikromacierzy, rodzaju skanerów laserowych, procedur laboratoryjnych i metod analizy [146]. Dlatego analiza ekspresji mRNA za pomocą mikromacierzy powinna być traktowana jako krok wstępny i zweryfikowana za pomocą RT-PCR lub metod immunohistochemicznych [147].

5.1.2. Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

Kolejną techniką, która jest wykorzystywana do profilowania transkryptomu, jest ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Metoda ta została po raz pierwszy skutecznie zastosowana do weryfikacji analizy RNA na

mikromacierzach a następnie rozszerzono ją jako samodzielną metodę, ponieważ jest szybka, niezawodna i umożliwia dokładne i jednoczesne profilowanie ekspresji genów. W tej metodzie komplementarny DNA (cDNA) jest generowany na podstawie matrycy RNA w procesie odwrotnej transkrypcji, a konkretne fragmenty DNA są amplifikowane za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). RT-qPCR pozwala na ocenę wzrostu liczby kopii badanych sekwencji w czasie rzeczywistym. Jest to możliwe dzięki oznaczaniu starterów, sond lub produktów amplifikacji fluoroforami, zaś reakcja jest wykrywana poprzez odczyt sygnału fluorescencyjnego [148].

Warto zaznaczyć, że metoda qPCR znalazła szerokie zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu leczenia w onkologii. Wykorzystywana jest w badaniach prognostycznych i predykcyjnych biomarkerów nowotworów, na przykład w raku jelita grubego, piersi, czerniaku, płuca czy raku wątrobowokomórkowym, a także w innych celach, takich jak wykrywanie mikroprzerzutów czy wykrywanie krążących we krwi komórek nowotworowych (tzw. płynna biopsja) [149].

5.1.3. Sekwencjonowanie DNA / RNA

Wspomniane wcześniej metody oparte na hybrydyzacji cechują się istotnymi ograniczeniami, głównie przez konieczność posiadania wcześniejszej wiedzy na temat sekwencji badanego fragmentu kwasu nukleinowego. Dlatego transkryptomika ewoluowała w kierunku technik opartych na sekwencjonowaniu od podstaw, w tym kolejno: sekwencjonowania metodą Sangera, sekwencji ekspresyjnych ESTs i NGS.

Sekwencjonowanie metodą Sangera to metoda oparta na terminacji łańcucha DNA. Proces sekwencjonowania wymaga matrycy (fragmentu DNA powielonego wcześniej w reakcji PCR, który podlega sekwencjonowaniu), polimerazy DNA, jednego startera, mieszaniny znakowanych fluorescencyjnie trójfosforanów dideoksynukleozydów (ddNTP) oraz deoksynukleozydów (dNTP). Polimeraza DNA służy do syntezy komplementarnej do matrycy nici DNA. W przeprowadzanej reakcji oprócz obecności dideoksynukleotydu konieczna jest obecność trójfosforanów deoksynukleozydów, co pozwala na swobodną syntezę komplementarnej nici DNA i jej terminację w losowym miejscu, zależnie od komplementarnego dideoksynukleotydu. Rozdział elektroforetyczny populacji uzyskanych produktów reakcji zależnie od ich długości umożliwia odczytanie sygnałów fluorescencyjnych, a co za tym idzie, sekwencji nukleotydów. Ograniczeniem tej metody jest stosunkowo niska

czułość (około 20% komórek z wariantem) oraz wielkość badanego produktu – zwykle około 500-1000 nukleotydów [150].

5.1.4. Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)

Nową erę profilowania transkryptomu zapoczątkowało opracowanie metody NGS. Daje ona możliwość jednoczesnego badania aktywności tysięcy genów, a w efekcie analiz skomplikowanych mechanizmów molekularnych uczestniczących w onkogenezie przyczyniając się ten sposób do rozwoju medycyny precyzyjnej. Technologia NGS, po raz pierwszy wprowadzona w 2004 roku, może być obecnie stosowana w różnych obszarach np. celem sekwencjonowania całego genomu (ang. *whole genome sequencing* - WGS), eksomu (ang. *whole exome sequencing* - WES) jak i transkryptomu (RNA-Seq). Badanie RNA-Seq jest obecnie nazywane "złotym standardem" analizy transkryptomu. Ponadto technologii NGS używa się także do analizy interakcji między DNA, a białkami do badania wykorzystując immunoprecypitację chromatyny wraz z sekwencjonowaniem wysokoprzepustowym (ChIP-Seq) oraz do badania zmian liczby kopii (CNV-Seq) [151].

RNA-Seq umożliwia analizę ekspresji genów na dużą skalę z niezwykłą precyzją dostarczając danych na temat sekwencji RNA, poziomu ekspresji, wariantów splicingowych, i modyfikacji posttranskrypcyjnych [152]. Umożliwia także analizę modyfikacji epigenetycznych i ncRNA odgrywających rolę w mechanizmach regulacyjnych. Technologia ta znacząco zwiększyła efektywność, czułość, dokładność w analizie RNA w uzyskiwanych wynikach w porównaniu do stosowanych wcześniej mikromacierzy. Do najczęściej stosowanych platform sekwencjonowania zaliczają się: 454 Sequencing (454 Life Sciences; obecnie Roche Holding AG, Bazylea, Szwajcaria), system PyroMark ID (Qiagen, Hilden, Niemcy), MiSeq (Illumina, USA), Ion Torrent (Thermo Fisher, USA).

RNA-seq zostało szeroko wykorzystane w badaniach ekspresji genów w różnych nowotworach i okazało się efektywnym narzędziem w badaniu procesu karcynogenezy, identyfikacji biomarkerów nowotworowych i rozwoju nowych strategii terapeutycznych.

Laboratoryjne metody diagnostyczne najczęściej stosowane w onkogenetyce personalizowanej podsumowano w **Tabeli 4**.

Metoda	Zalety	Wady
--------	--------	------

Immunohistochemia (IHC)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ rutynowo stosowana w histopatologii ✓ niska cena ✓ możliwość wizualnej oceny komórek wykazujących nadekspresję danego białka 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ metoda jakościowa ✗ subiektywność oceny
Cytogenetyka klasyczna	<ul style="list-style-type: none"> ✓ możliwa ocena kariotypu 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ złożona analiza wymagająca długiego szkolenia ✗ niska rozdzielczość ✗ długi czas wykonania badania ✗ konieczność zakładania hodowli komórkowych
Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (FISH)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ łatwość oceny rearanżacji/delecji/amplifikacji genów ✓ prosta w wykonaniu 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ wysoka cena ✗ ograniczenie do kilku regionów w jednym badaniu ✗ niska rozdzielczość
Sekwencjonowanie Sangera	<ul style="list-style-type: none"> ✓ skuteczna w wykrywaniu i identyfikacji mutacji 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ czasochłonna ✗ niska czułość ✗ wrażliwa na degradację DNA ✗ wymaga kosztownego sprzętu
Real-Time PCR	<ul style="list-style-type: none"> ✓ szybka i czuła metoda ✓ mniej wrażliwa na degradację DNA ✓ stosunkowo prosta w wykonaniu 	<ul style="list-style-type: none"> ✗ wykrywa tylko znane mutacje

Sekwencjonowanie następnej generacji (NGS)	✓ metoda	✗ wymaga
	wysokoprzepustowa	zaawansowanego
	✓ generuje wiele danych	i kosztownego sprzętu
	✓ umożliwia badanie całych genów/genomów	✗ czasochłonna
		✗ trudna w wykonaniu w porównaniu do innych metod molekularnych
		✗ trudna w analizie

Tabela 4. Najczęściej stosowane metody laboratoryjne w diagnostyce onkologicznej [4].

6. ZASTOSOWANIE ANALIZY TRANSKRYPTOMU WE WSPÓŁCZESNEJ ONKOLOGII

Badania transkryptomu, czyli analiza ekspresji genów, otworzyła nowy rozdział w zrozumieniu podłoża molekularnego nowotworów. Pozwala ona na eksplorację podstaw molekularnych nowotworów na poziomie funkcjonowania komórki. Rozwój zaawansowanych technik analitycznych może pozwolić na wyodrębnienie nowych genów markerowych, których ekspresja ulega widocznym zmianom w związku z transformacją i progresją nowotworu. Badania transkryptomu otwierają potencjalną ścieżkę do ścisłej personalizacji procesu diagnostyczno-terapeutycznego pacjentów poprzez:

1. **Odkrywanie nowych biomarkerów**, które mogą być używane do wczesnego wykrywania nowotworów lub monitorowania ich postępu. To z kolei może prowadzić do rozwoju nowych paneli diagnostycznych.

2. **Identyfikację molekularnych podtypów nowotworów** co fundamentalnie znacznie we współczesnej onkologii, ponieważ różne podtypy molekularne tego samego nowotworu w klasycznym ujęciu histopatologicznych mogą reagować inaczej na zastosowaną terapię. Dzięki badaniom nad transkryptomem można dostosować leczenie do konkretnego podtypu nowotworu, co zwiększa szanse na skuteczną terapię.

3. **Profilowanie genów o wartości prognostycznej** pozwalające na identyfikację genów, których zmiany w ekspresji podczas toczącego się procesu nowotworowego umożliwiają prognozowanie przebiegu choroby, a to z kolei jest związane z rokowaniem. Dzięki temu można przewidzieć nawrót nowotworu i dostosować plan leczenia.

4. **Monitorowanie odpowiedzi na leczenie** śledzenie poziomu ekspresji genów związanych z procesem nowotworowym pozwala na monitorowanie terapii i ewentualne podjęcie działań korekcyjnych.

5. **Personalizacja terapii** - na podstawie profilu ekspresji nowotworu można wybrać leki lub terapie celowane, które są bardziej skuteczne w indywidualnym przypadku danego pacjenta, minimalizując jednocześnie działania niepożądane.

7. **Rola w immunoterapii** - możliwość zrozumienia interakcji między układem odpornościowym a tkanką nowotworową. Jest to istotne w kontekście immunoterapii, która opiera się na wzmacnianiu odpowiedzi immunologicznej pacjenta przeciwko nowotworowi.

6.1. Zastosowanie analizy transkryptomu w tworzeniu klasyfikacji klinicznej nowotworów

Analiza transkryptomu przyczyniła się do znacznego usprawnienia klinicznej klasyfikacji wielu nowotworów. Dotychczas przeprowadzono liczne badania profilowania ekspresji genów i tym samym stworzono molekularne klasyfikacje oraz identyfikację celów terapeutycznych i diagnostycznych w raku piersi [153]. Jednym z pierwszych udanych prób opartej na ekspresji genów charakteryzacji raka było badanie przeprowadzone przez Perou i wsp. W 65 próbkach raka piersi pobranych od 42 pacjentów stwierdzono unikalne wzorce ekspresji genów dla każdego pacjenta [80]. Podgrupy BC wyodrębnione w tym badaniu wykazywały różnice w ekspresji markerów immunohistochemicznych: receptorów estrogenowych, Her-2 i Ki-67, stąd wyciągnięto wniosek, że klinicznie powinny być traktowane jako „odrębne” choroby. Ponadto podobne wnioski wyciągnięto w badaniu Sørlie i wsp. [81], gdzie typ luminalny raka piersi został podzielony na dwa podtypy: luminalny A (z wysokim wyrażeniem receptora estrogenowego i niskim wyrażeniem markerów proliferacji, np. Ki67) i luminalny B (charakteryzujący się niższą ekspresją receptora estrogenowego i wysokim poziomem ekspresji genów związanych z proliferacją). Wyżej wymienione badania przeprowadzono przy użyciu technologii mikromacierzy i przyczyniły się do opracowania stosowanej obecnie molekularnej klasyfikacji raka piersi opisanej w rozdziale 3.4.5.

Analogiczne badania zostały przeprowadzone celem sklasyfikowania raka jelita grubego (CRC). W badaniach przeprowadzonych przez Guinney i wsp. wyodrębniono cztery molekularne podtypy CRC: CMS1 (z niestabilnością mikrosatelitarną z silną aktywacją układu immunologicznego), CMS2 (klasyczny - z aktywacją szlaków sygnalizacyjnych WNT i MYC), CMS3 (metaboliczny - nabłonkowy z wyraźną dysregulacją metaboliczną) i CMS4

(mezenchymalna - z aktywacją czynników wzrostu, inwazją stromalną i angiogenezą) [154]. Wiele badań klinicznych ostatnich lat potwierdziło użyteczność tej klasyfikacji, potwierdzając różną wrażliwość subklas na leczenie, a także różne tendencje do nawrotu i przerzutów poszczególnych podtypów CMS [155][156][157][158][159].

Inne próby klasyfikowania nowotworów na podstawie poziomów ekspresji genów zostały podjęte (między innymi) w przypadku czerniaka naczyniówki [160], guzów takich jak: neuroblastoma, rabdomiosarcoma, chłoniak nieziarniczny, guz Ewinga [161], czy raka płuca [162] oraz raka płaskonabłonkowego głowy i szyi [163].

6.2. Tworzenie paneli prognostycznych i predykcyjnych

Dotychczas kilka testów prognostycznych i predykcyjnych, opartych na analizie ekspresji genów znalazło zastosowanie kliniczne w celu spersonalizowanego kierowania ścieżką terapeutyczną pacjenta onkologicznego. Testy te są narzędziami diagnostycznymi, które pomagają lekarzom ocenić ryzyko nawrotu nowotworu oraz odpowiedź pacjenta na terapię. Do paneli prognostycznych w onkologii należą m.in.:

1. **MammaPrint®**, **Oncotype DX®**, **Prosigna®-Assay (PAM50)**, **Endopredict®**: opisane powyżej w rozdziale 3.6;

2. **Oncotype DX® Colon Cancer Assay**: test używany w diagnostyce raka jelita grubego, oparty na badaniu ekspresji 12 genów, pomagający w identyfikacji guzów z wysokim ryzykiem nawrotu i ustalaniu konieczności terapii adiuwantowej.

3. **Afirma® Gene Expression Classifier**: test mikromacierzy używany do diagnozowania raka tarczycy, który pomaga w odróżnieniu raka inwazyjnego od łagodnych guzów tarczycy.

4. **ThyroidPrint®**: klasyfikator oparty na badaniu 10 genów, również używany w diagnozowaniu raka tarczycy.

5. **ThyroSeq v3**: test NGS analizujący ekspresję 112 genów, stosowany w diagnostyce raka tarczycy.

6. **RosettaGX Reveal**: narzędzie służące do analizy ekspresji genów w różnych rodzajach nowotworów.

7. **ThyraMIR/ThyGenX™**: testy molekularne używane w diagnozowaniu raka tarczycy, które pomagają w identyfikacji raka złośliwego i ocenie ryzyka nawrotu [164].

Wymienione panele prognostyczne oparte na analizie ekspresji genów pomagają dostosować plan leczenia do indywidualnych potrzeb pacjentów oraz minimalizować ryzyko

nawrotu nowotworu. Dzięki ich zastosowaniu możliwa jest modyfikacja leczenia pacjenta tak, aby uzyskać najlepszy wskaźnik skuteczności terapii do toksyczności leczenia i minimalizacji działań niepożądanych, np. pacjenci przypisani do grupy o niskim ryzyku w panelu Oncotype DX® Colon Cancer Assay mogą otrzymywać niższe dawki chemioterapii adiuwantowej [165].

6.3. Identyfikacja biomarkerów nowotworowych

Głównym problemem warunkującym obniżoną skuteczność leczenia pacjentów onkologicznych jest zbyt późna diagnostyka nowotworu. Istnieje potrzeba znalezienia nowych biomarkerów umożliwiających wczesne diagnozowanie i monitorowanie skuteczności leczenia w onkologii. Na przykład kliniczna użyteczność i wiarygodność antygenu CA125, który jest najczęściej stosowanym markerem surowiczym raka jajnika, wciąż pozostaje kontrowersyjna. Specyficzność CA125 wynosi od 35% do 91% [166]. Poziom CA125 jest podwyższony tylko u około 50% pacjentek z wczesnym rakiem jajnika i aż u około 90% w zaawansowanym stadium [167]. Poszukiwane są inne biomarkery raka jajnika, spośród których potencjalną użyteczność kliniczną wykazuje, np. IGFBP-4. Badanie Mosig i wsp., przeprowadzone na podstawie analizy transkryptomu opartej na RNA-Seq z 22 próbek od pacjentek z rakiem jajnika, wykazało istotną nadprodukcję białka IGFBP-4. Poziom IGFBP-4 był podwyższony zarówno w początkowej fazie choroby, jak i w zaawansowanym stadium, bez względu na poziomy CA125 [168].

Kolejnym przykładem wykorzystania profilowania ekspresji genów przy detekcji biomarkerów są nowotwory przewodu pokarmowego. Pomimo rozwoju wielodyscyplinarnego leczenia raka przełyku, wyniki kliniczne często pozostają niewystarczające ze względu na późne diagnozowanie choroby [169]. Dlatego odkrycie odpowiednich biomarkerów umożliwiających wczesne badania przesiewowe ma ogromne znaczenie. Obecnie najczęściej używane biomarkery w diagnozie raka płaskonabłonkowego przełyku (ang. *esophageal squamous cell carcinoma* - ESCC) to: Cyfra21-1, CA19-9, CA72-4, antygen rakowo-płodowy CEA i antygen SCC-Ag [170]. Wymienione białka charakteryzują się wysoką swoistością wobec ESCC, ale niską wrażliwością, wahającą się od 10% do 40% [171]. Badania ostatnich lat łączą sekwencjonowanie mRNA z analizą proteomu i technikami bioinformatycznymi, co pozwala zidentyfikować geny o wysokim poziomie ekspresji lub nadprodukowane białka, które mogą służyć jako biomarkery wczesnego wykrywania raka przełyku.

Bioinformatyka umożliwia równoczesną analizę tysięcy zmiennych w skali genomowej oraz ocenę ich istotności, co ułatwia wybór przydatnych zmiennych i pozwala na istotne

statystycznie interpretacje [172]. Statystyczne porównania danych uzyskanych dla tkanek zdrowych, łagodnych nowotworów i tkanek nowotworów złośliwych za pomocą metod bioinformatycznych stanowią powszechny sposób poszukiwania i priorytetyzacji potencjalnej użyteczności biomarkerów [173]. W odniesieniu do analiz statystycznych stosowanych w celu porównywania ekspresji genów w tych samych tkankach nowotworowych, lecz na różnych etapie zaawansowania choroby, istnieje ogromna różnorodność metod obróbki danych, w tym stosunkowo proste algorytmy, np. test t, analiza głównych składowych (PCA), klasyfikator NTP, czy metoda LASSO, a także bardziej matematycznie zaawansowane podejścia, np. oparte na maszynie wektorów nośnych (SVM), czy oparte na sieciach neuronowych [174]. Należy podkreślić, że różnice w wydajności (swoistość, wrażliwość, dokładność) są porównywalne między tymi dwiema klasami metod eksploracji (prostymi i zaawansowanymi). Dlatego w obecnych badaniach nad biomarkerami popularne są proste rozwiązania takie jak klasyfikator NTP [175].

Ponadto zestawy wybranych markerów oferują znacznie lepszą wydajność niż pojedynczy marker, dlatego obecnie w różnych badaniach z powodu przewagi predykcyjnej wykorzystuje się podejście wielomarkerowe [176]. Na przykład w badaniu Xing i wsp., trzy markery surowicy zostały ocenione jako potencjalnie użyteczne klinicznie: CHI3L1, MMP13 i SPP1, spośród ponad 4000 genów ulegających różnej ekspresji w bazie danych transkryptomu ESCC. Panel diagnostyczny, wykorzystujący kombinację CHI3L1, MMP13 i SPP1, zidentyfikował około 90% przypadków wczesnego ESCC, gdzie wykrywalność fałszywie dodatnia panelu w tkankach nie nowotworowych wynosiła od 10% do 15% [177]. Ponadto różne cząsteczki RNA mogą służyć jako niezależne biomarkery nowotworów [178]. W ostatnich latach wiele RNA okazało się przydatnych w onkologii personalizowanej. Na przykład profil ekspresji snRNA [179] i 4-miRNA [180] mogą być używane do wczesnej diagnozy niedrobnokomórkowego raka płuc (NSCLC). Ponadto na podstawie kilku badań, miR-106b, miR-20a i miR-221 uznaje się za biomarkery wczesnego wykrywania raka żołądka [181][182]. PiRNA, które biorą udział w mechanizmach ciszenia wyciszania na poziomie transkrypcyjnym i posttranskrypcyjnym, mogą służyć jako biomarkery do wczesnej diagnozy, skuteczności leczenia i rokowania w przypadku raka nerek [183][184], raka wątroby [185], glejaków [186] i raka żołądka [187]. Ponadto lncRNA, takie jak XIST, to potencjalni kandydaci do wykrywania wczesnego raka żołądka [188]. Coraz więcej badań wskazuje na możliwość zastosowania ncRNA także w przypadku diagnostyki raka jelita grubego (CRC) [189][190].

7. CEL PRACY

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej miały na celu określenie zależności kliniczno-molekularnych u wybranych grup pacjentek z rakiem piersi i wyłonienie grup genowych (z wykorzystaniem metody NGS RNA-seq), których zaburzona ekspresja może przyczyniać się do zmiennych odpowiedzi na stosowanie leczenia.

Dodatkowym celem pracy było wytypowanie genów mogących stanowić potencjalny panel prognostyczno-predykcyjny ułatwiający podejmowanie decyzji klinicznych u pacjentek chorujących na raka piersi.

W pracy postawiono następujące pytania:

1. Czy w grupie pacjentek z takim samym rozpoznaniem histopatologicznym raka piersi mogą istnieć różne profile ekspresji podobnych grup genowych?
2. Czy w grupie pacjentek z takim samym rozpoznaniem histopatologicznym i podobnym profilem ekspresji istnieje podobna, czy inna odpowiedź na zastosowane leczenie?
3. Czy profile ekspresji genów różnią się w grupach pacjentek o różnej odpowiedzi na leczenie?

8. CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ

Do badania zakwalifikowano 46 kobiet zdiagnozowanych w latach 2018-2021 w Centrum Chorób Piersi Dolnośląskiego Centrum Onkologii, Hematologii i Pulmonologii (DCOPiH) we Wrocławiu. Grupę badaną stanowiły kobiety z rozpoznaniem rakiem piersi

potrójnie-ujemnym (TNBC) zakwalifikowane do otrzymania systemowej chemioterapii neoadjuwantowej.

Kliniczne kryteria wyłączające z grupy badanej obejmowały:

- obecność choroby z przerzutami odległymi (M1 i wyższe w skali TNM),
- dziedziczną predyspozycję do raka piersi i/lub jajnika (potwierdzona obecność mutacji germinalnych *BRCA1/BRCA2*) lub obciążony wywiad rodzinny (ocena lekarza genetyka klinicznego)
- inny nowotwór leczony w przeszłości.

Ponadto z grupy badanej zostały wyłączone przypadki pacjentek, u których ilość tkanki guza uzyskana podczas biopsji okazała się niewystarczająca do dalszej analizy RNA.

Wszystkie badania zostały przeprowadzone w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Pracowni Diagnostyki Molekularnej Nowotworów w Dolnośląskim Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii we Wrocławiu oraz Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Projekt został pozytywnie zaopiniowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu – opinia nr KB-611/2019. Wszystkie pacjentki biorące udział w badaniu podpisały świadomą zgodę na udział w badaniu. Wszystkie próbki raka piersi użyte w badaniu pobrano jedynie w toku planowych działań diagnostycznych i terapeutycznych chorych. Wszystkie procedury przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej były zgodne z zasadami badań medycznych zawartych w Deklaracji Helsińskiej z 1964 roku i jej późniejszych poprawek lub równoważnych standardów etycznych.

9. MATERIAŁY I METODY

9.1. Plan leczenia i projekt badania

Materiał tkankowy raka piersi został pobrany za pomocą biopsji gruboigłowej (CNB) lub biopsji mammotomicznej (gruboigłowej wspomagananej próżnią – VAB) od 46 pacjentek z

diagnozą TNBC, zakwalifikowanych do otrzymania terapii neoadiuwantowej, przed rozpoczęciem leczenia systemowego. Materiał tkankowy został utrwalony w bloczkach w formalinie i zatopiony w parafinie (ang. *formalin-fixed, paraffin-embedded* - FFPE) w celu wykonania badań immunohistochemicznych oraz genetycznych, w tym ekstrakcji i analizy RNA.

Pacjentki zostały zakwalifikowane do dwóch grup – z całkowitą patologiczną odpowiedzią na leczenie i z brakiem odpowiedzi na leczenie (progresja choroby) (**Tabela 5**).

Lp.	Wiek w chwili diagnozy	TNM przed rozpoczęciem leczenia			TNM po leczeniu			Odpowiedź na leczenie
		T	N	M	T	N	M	
1	45	2	1	0	3	2	0	PD
2	39	2	1	0	2	2	0	PD
3	39	3	0	0	1	0	0	PR
4	40	3	0	0	2	0	0	PR
5	45	2	0	0	1	1	0	PR
6	52	3	0	0	1	0	0	PR
7	75	4	2	0	1	1	0	PR
8	70	3	2	0	2	1	0	PR
9	60	2	2	0	2	1	0	PR
10	59	2	3	0	2	2	0	PR
11	73	4	2	0	3	2	0	PR
12	75	3	1	0	2	0	0	PR
13	73	3	1	0	2	0	0	PR
14	66	2	2	0	1	0	0	PR
15	60	3	0	0	2	0	0	PR
16	73	2	1	0	1	1	0	PR
17	75	2	1	0	1	1	0	PR
18	73	2	1	0	1	1	0	PR
19	66	2	0	0	1	0	0	PR
20	60	2	1	0	1	1	0	PR
21	42	1	2	0	0	0	0	pCR

22	41	3	2	0	0	0	0	pCR
23	40	2	0	0	0	0	0	pCR
24	37	3	1	0	0	0	0	pCR
25	37	2	0	0	0	0	0	pCR
26	65	3	0	0	0	0	0	pCR
27	76	3	2	0	0	0	0	pCR
28	57	2	1	0	0	0	0	pCR
29	63	2	1	0	0	0	0	pCR
30	52	4	1	0	0	0	0	pCR
31	72	2	2	0	0	0	0	pCR
32	51	3	1	0	0	0	0	pCR
33	49	2	1	0	0	0	0	pCR
34	56	1	1	0	0	0	0	pCR
35	75	2	1	0	0	0	0	pCR
36	55	2	0	0	0	0	0	pCR
37	39	2	0	0	0	0	0	pCR
38	59	2	2	0	0	0	0	pCR
39	71	3	1	0	0	0	0	pCR
40	65	2	2	0	0	0	0	pCR
41	56	1	1	0	0	0	0	pCR
21	54	2	0	0	0	0	0	pCR
42	51	2	1	0	0	0	0	pCR
43	53	1	1	0	0	0	0	pCR
44	54	2	0	0	0	0	0	pCR
45	54	2	0	0	0	0	0	pCR
46	53	2	0	0	0	0	0	pCR

Tabela 5. Zestawienie danych pacjentek w grupie badanej z uwzględnieniem stopnia zaawansowania nowotworu TNM przed i po terapii neoadjuwantowej. PD – *progressive disease* – progresja choroby. PR – *partial response* – częściowa odpowiedź. pCR – *pathological complete response* – całkowita odpowiedź patologiczna.

Terapię neoadjuwantową rozpoczęto od podania doksorubicyny (w dawce 60 mg/m²) w połączeniu z cyklofosfamidem (600 mg/m²) (schemat AC), w cyklach co 14-21 dni

powtarzanych 4-krotnie. Część PacjenteK (wiek <50 roku życia, z wysokim indeksem proliferacji Ki67) została zakwalifikowana do schematu AC tzw. *dose-dense* (ACdd) przy skróceniu przerw między cyklami chemioterapii do 2 tygodni, w skojarzeniu z czynnikami pobudzającymi wzrost kolonii granulocytarnych (celem minimalizacji ryzyka gorączki neutropeniczej). Następnie u wszystkich PacjenteK terapię kontynuowano poprzez podawanie paklitakselu (80 mg/m²) lub docetakselu (75 mg/m²) co tydzień przez okres do 12 tygodni (cykli).

Po zakończonej chemioterapii pacjentki były poddawane biopsji śródoperacyjnej celem oceny klinicznej odpowiedzi na zastosowane leczenie. Zgodnie z kryteriami oceny odpowiedzi na leczenie wg. RECIST 1.1 pacjentki z kompletną patologiczną odpowiedzią (*pathological complete response* - pCR) zostały przypisane do grupy wrażliwej na leczenie. Przypadki częściowej odpowiedzi patologicznej (*partial response* - PR) i progresji choroby (*progressive disease* - PD) zostały zaklasyfikowane do grupy o ograniczonej odpowiedzi na leczenie (*reduced response* - RR). Kompletna patologiczna odpowiedź (pCR) została zdefiniowana jako brak komórek nowotworowych w usuniętym fragmencie piersi, jak również we wszystkich pobranych węzłach chłonnych regionalnych po zakończeniu terapii neoadiuwantowej.

9.2. Pozyskiwanie danych zewnętrznych

Dane dotyczące raka piersi zostały uzyskane z bazy *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), i obejmowały 1112 próbek pierwotnych guzów piersi [191]. Dane dotyczące statystyk przeżycia pacjentów z rakiem piersi z TCGA uzyskano z badań Liu i wsp. [192]. Wybrano 123 przypadki potrójnie ujemnego raka piersi (TNBC) z TCGA na podstawie danych opublikowanych przez Thompsona i wsp. [193]. Dane dotyczące ekspresji genów i wrażliwości na leki dla 63 linii komórkowych raka piersi uzyskano z *Dependency Map (DepMap) Consortium* [194]. Ponadto wykorzystano serwer TISCH2 do analizy poziomów ekspresji wybranych genów w pojedynczych komórkach guzów piersi uzyskanych przy pomocy sekwencjowania RNA na pojedynczych komórkach (single-cell RNA-seq) [195]. Do badań użyto trzech zbiorów danych, z których każdy zawierał dane dotyczące pierwotnych guzów piersi u więcej niż 10 pacjentów (GSE176078, EMTAB8107 i GSE161529) [196][197][198].

9.3. Metody

9.3.1. Izolacja RNA

Tkanki raka piersi zostały poddane ocenie histopatologicznej przez lekarza patomorfologa w celu wyselekcjonowania najbardziej reprezentatywnych wycinków tkankowych zawierających co najmniej 30% komórek nowotworowych.

Całkowity RNA został wyizolowany z utrwalonych w bloczkach FFPE wycinkach tkankowych raka piersi przy użyciu zestawu RNeasy® FFPE Kit (QIAGEN) zgodnie z protokołem producenta.

- Usunięcie parafiny z materiału tkankowego przy użyciu roztworu do deparafinizacji
- Inkubacja próbek w buforze lizującym zawierającym proteinazę K celem uwolnienia RNA z wycinków tkankowych
- Krótka inkubacja w wysokiej temperaturze celem częściowego odwrócenia usieciowania formaliny w uwolnionych kwasach nukleinowych (dla poprawy jakości RNA i jego właściwości w próbie enzymatycznej)
- Usunięcie genomowego DNA przy użyciu DNazy (deoksyrybonukleazy)
- Mieszanie uzyskanego lizatu z buforem RBC
- Dodanie etanolu do roztworu dla optymalizacji warunków do wiązania dla RNA
- Próbkę przelano do kolumny RNeasy MinElute, gdzie uzyskany całkowity RNA wiąże się do błony filtracyjnej i wypłukiwane są zanieczyszczenia.
- W ostatnim kroku uzyskany RNA został wypłukany z użyciem 15 µL wody pozbawionej RNazy.

Po dokonaniu ekstrakcji, oceny czystości RNA dokonano przy użyciu NanoPhotometer N60 (Implen).

9.3.2. RNA-Seq

Przebieg analizy RNA-Seq zilustrowano na **Schemacie 1**.

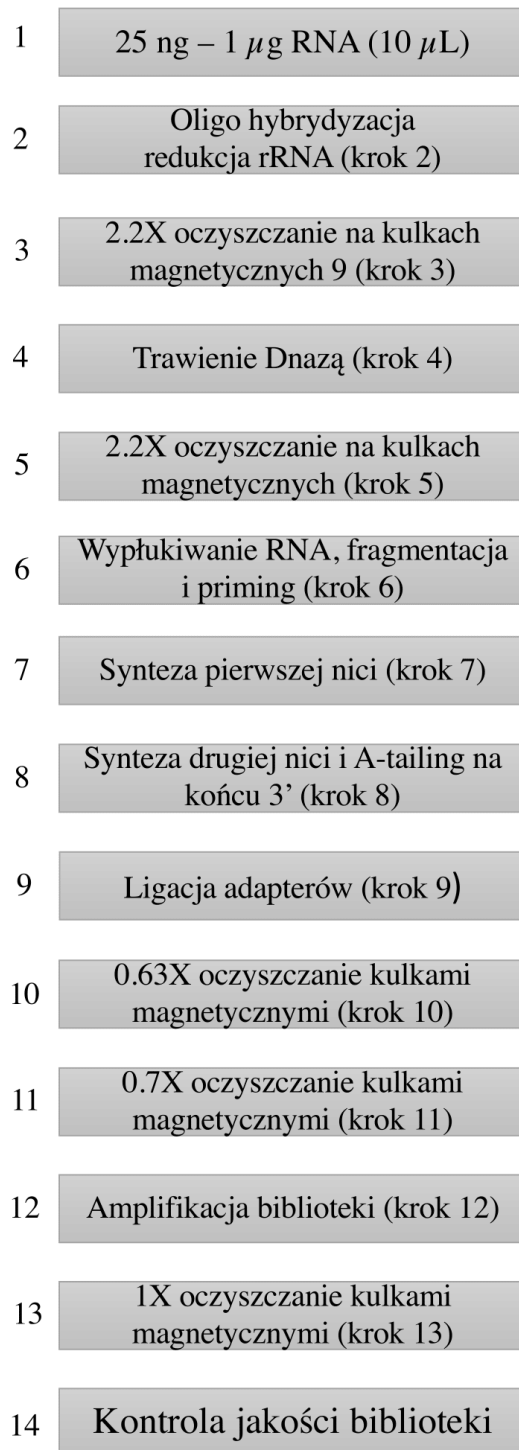
Stężenie próbek RNA zmierzono fluorymetrycznie na aparacie Quantus z wykorzystaniem zestawu QuantiFluor® RNA System. Ocenę jakości RNA przeprowadzono przy użyciu systemu High Sensitivity RNA ScreenTape na TapeStation 4200 (Agilent).

Zgodnie z oczekiwaniem RNA było słabej jakości (pochodził z bloczków parafinowych), RIN wynosił w przedziale 1-2. Z tego powodu biblioteki przygotowano przy użyciu zestawu KAPA HyperPrep Kit with RiboErase (HMR) zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem producenta dla zdegradowanych próbek (FFPE) wejściowych.

Przygotowanie bibliotek obejmowało: deplecję ludzkiego rRNA, fragmentację, syntezę pierwszej nici cDNA przy użyciu losowych starterów, połączoną syntezę drugiej nici cDNA i A-tailing, ligację adapterów i amplifikację biblioteki.

Powstałe biblioteki poddano ocenie jakościowej i ilościowej, a następnie normalizacji stężenia. Stężenie biblioteki zmierzono metodą fluorometryczną (QuantiFluor dsDNA System, Promega), a kontrolę jakości bibliotek przeprowadzono za pomocą elektroforezy kapilarnej (High Sensitivity D1000 ScreenTape System na Tape Station (Agilent)).

Biblioteki rozcieńczono do stężenia 4 nM zgodnie z przewodnikiem NextSeq System Denature and Dilute Libraries (Illumina) i spulowano. Sekwencjonowanie typu "*paired-end*" przeprowadzono przy użyciu reagentów NextSeq HighOutput (Illumina).



Schemat 1. Przebieg RNA-Seq wg protokołu KAPA HyperPrep Kit (KAPA Biosystems).

9.3.3. Wstępna analiza danych RNA-Seq

Uzyskane odczyty zostały scalone, a następnie przeprowadzono filtrację jakości i przycinanie za pomocą pakietu Bioconductor Rfastp. Następnie przefiltrowane dane w postaci

plików FASTQ zostały przyrównane za pomocą pakietu Rsubread w wersji 2.8.1 do referencyjnego genomu GENECODE wersji 33 (GRCh38.p13) [199]. Następnie użyto funkcji `featureCounts()` z pakietu Rsubread do zsumowania wartości ekspresji genów. W zależności od zastosowania, dane na poziomie genów RNA-seq były przekształcane różnymi sposobami. Do obliczeń różnicowej ekspresji używano surowych poziomów ekspresji genów (*raw count*). W celu integracji z zbiorem danych raka piersi pochodzącym z TCGA zastosowano korekcję ComBat-seq, a następnie przekształcenie log₂-counts per million (log-CPM) i normalizację kwantylową [200]. Do wszystkich innych analiz surowe poziomy ekspresji genów były przekształcane w log₂-transcripts per million (log-TPM).

Po zakończeniu części laboratoryjnej nastąpiła analiza bioinformatyczna uzyskanych danych w celu uzyskania informacji na temat różnic w ekspresji genów próbek TNBC poddanych badaniu.

9.3.4. Metody statystyczne

Wszystkie analizy przeprowadzono w środowisku R/Bioconductor. Po uzyskaniu poziomów ekspresji genów, usunięto geny nieulegające ekspresji lub słabo ulegające ekspresji za pomocą funkcji `filterByExpr` z pakietu edgeR [201]. Liczba genów zachowanych do testów wynosiła 24237. Wykorzystano paczkę edgeR, do obliczenia różnicowej ekspresji (DE) między badanymi podgrupami. Geny DE zostały zdefiniowane jako te geny, których skorygowana wartość *p* wyniosła poniżej 0,05 a absolutną zlogarytmowaną zmianę krotności ekspresji (absolute logFC) > 1,2.

Aby ocenić, które geny DE uzyskane w poprzednim kroku mogą być związane z wybraną opornością na leki (docetaksel, dokсорubicyna, paklitaksel i cyklofosfamid), użyto regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLSR), zaimplementowanej w pakiecie mixOmics [202]. W skrócie, zebrano dane dotyczące ekspresji genów i wrażliwości na leki (obszar pod dopasowaną krzywą dawki - AUC) dla 63 linii komórek raka piersi. Po ograniczeniu danych dotyczących ekspresji genów do genów o statystycznie znaczącej różnicowej ekspresji (DE) zdefiniowano macierz ekspresji genów jako predyktora i macierz AUC jako odpowiedź. Wyniki PLSR zostały zobrazowane przez sieć w pakiecie mixOmics [202]. Rozważano tylko wartości korelacji bezwzględnej $\geq 0,4$.

Profile ekspresji naszych próbek zostały przypisane do dwóch podtypów TNBC, zaproponowanych niedawno przez Thompsona i in. [193]: LAR oraz Non-LAR. Wykorzystano dane TCGA, obejmujące 123 przypadki TNBC z przypisanymi podtypami TNBC

zaproponowanymi przez Thompsona i in. [193], aby uzyskać listę genów różnicujących pomiędzy podtypami LAR i Non-LAR. Następnie wykorzystano klasyfikator nearest template prediction (NTP) aby oznaczyć własne próbki TNBC jako LAR i Non-LAR [203][204]. Specyficzność predykcji oceniano na podstawie 1000 testów permutacyjnych i skorygowanej na wielokrotne testowanie wartości p (FDR) <0.05 . Pakiet Survminer został użyty do obliczenia jednowymiarowego modelu proporcjonalnych zagrożeń Coxa w celu analizy związku ekspresji wybranych genów z przeżywalnością całkowitą (*overall survival* – OS). w próbkach raka piersi pochodzących z TCGA. Punkty odcięcia dla wartości ekspresji genów definiujące poziomy wysokiej/niskiej ekspresji zostały obliczone za pomocą statystyki rankingu maksymalnego wyboru (Maximally Selected Rank Statistics). Krzywe przeżywalności zostały narysowane w pakiecie Survminer.

10. WYNIKI

10.1. Uzyskane dane

Podstawowe cechy pacjentów w korelacji z uzyskanymi wynikami podsumowano w **Tabeli 6**. Korzystając z klasyfikatora NTP uczonego na danych TCGA ograniczonych do TNBC i opartego na sygnaturze składającej się z 390 genów, zidentyfikowano 13 przypadków podtypu LAR i 31 przypadków podtypu non-LAR w posiadanym zestawie danych. Dwie spośród 46 próbek wykazały niską pewność predykcji ($FDR \geq 0,05$) i zostały ustawione jako "NA" w kolejnej analizie statystycznej. Nie zaobserwowano istotnych różnic między grupami w odpowiedzi na leczenie systemowe. Mimo że próbki non-LAR przeważały głównie w podgrupie pCR (84% próbek), a próbki LAR były obecne w większej ilości w podgrupie PR (47% próbek), to różnice w rozkładzie podtypów TNBC między podgrupami pCR a RR nie były statystycznie istotne (wartość p - 0,054).

Cecha	Wszyscy pacjenci N=46	Całkowita odpowiedź patologiczna (pCR) N=26	Ograniczona odpowiedź na leczenie (RR) N=20	wartość p
Wiek	53.5 [39.0;62.8]	51.0 [38.2;60.0]	60.0 [42.0;65.8]	0.1908

Status Ki67 (%)	60.0 [40.0;70.0]	60.0 [46.2;70.0]	60.0 [37.5;70.0]	0.2444
Czystość próbki (%)	55.0 [50.0;68.8]	50.0 [50.0;60.0]	60.0 [47.5;76.2]	0.2752
Podtyp TNBC: LAR	13 (29,5%)	4 (16.0%)	9 (47.4%)	0.0542
Podtyp TNBC Non-LAR	31 (70,5%)	21 (84.0%)	10 (52.6%)	

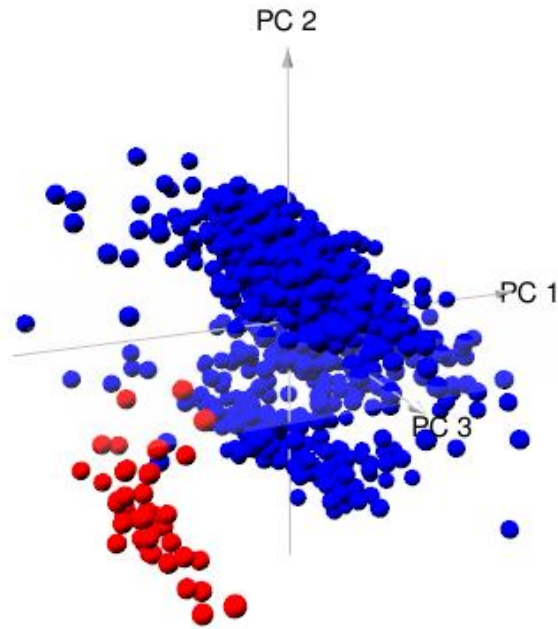
Tabela 6. Podsumowanie grupy badanej według odpowiedzi na leczenie.

10.2. Integracja z danymi kohorty raka piersi z TCGA

W celu oceny jakości ekstrahowanego RNA z bloczków FFPE, zdecydowaliśmy się połączyć profile ekspresji naszych próbek z profilami ekspresji próbek świeżo zamrożonych (ang. *fresh-frozen*, FF) o wysokiej jakości, z badania z bazy TCGA. Wykorzystaliśmy analizę głównych składowych (PCA) aby ocenić różnice i podobieństwa między próbkami FFPE, a próbkami FF z bazy TCGA (**Rysunek 2A** i **Rysunek 2B**). Przed korekcją partii zaobserwowano dwa różne skupiska odpowiadające próbkom FF i FFPE, jednak po korekcji partii próbki FF i FFPE utworzyły jedno spójne skupisko. Sugeruje to, że profile ekspresji genów uzyskane z próbek FFPE były jakościowo porównywalne do próbek FF.

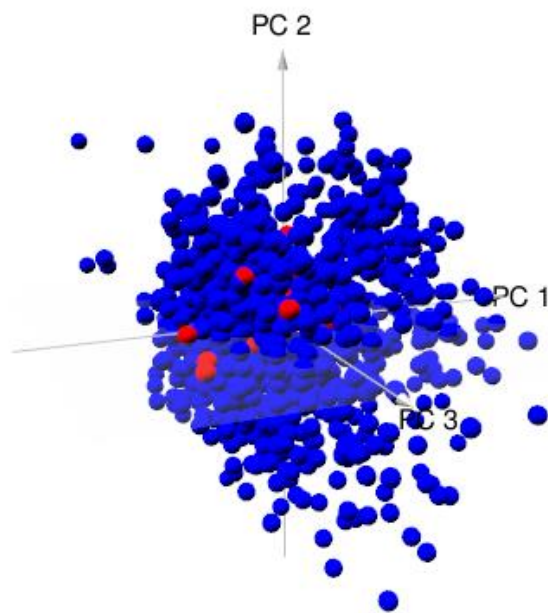
- TCGA
- This_study

A



- TCGA
- This_study

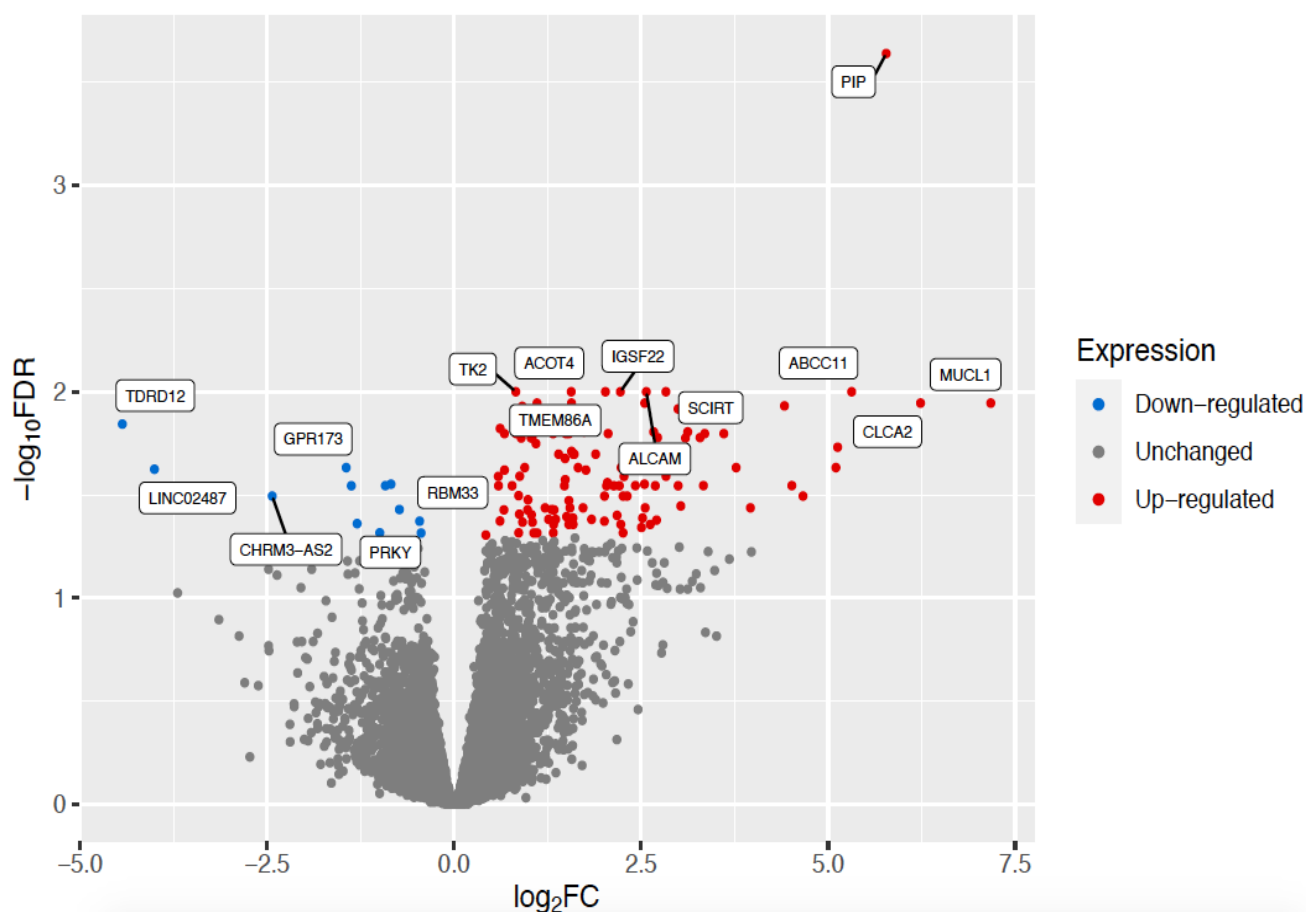
B



Rysunek 2. Analiza głównych składowych (PCA) przeprowadzona na profilach ekspresji genów użyciu danych z próbek FF (TCGA) lub FFPE (badanie własne). **(A)** Przed korekcją partii zidentyfikowano dwa różne skupiska w analizie PCA. **(B)** Po korekcji partii próbki FF i FFPE utworzyły jedno skupisko.

10.3. Analiza ekspresji genów

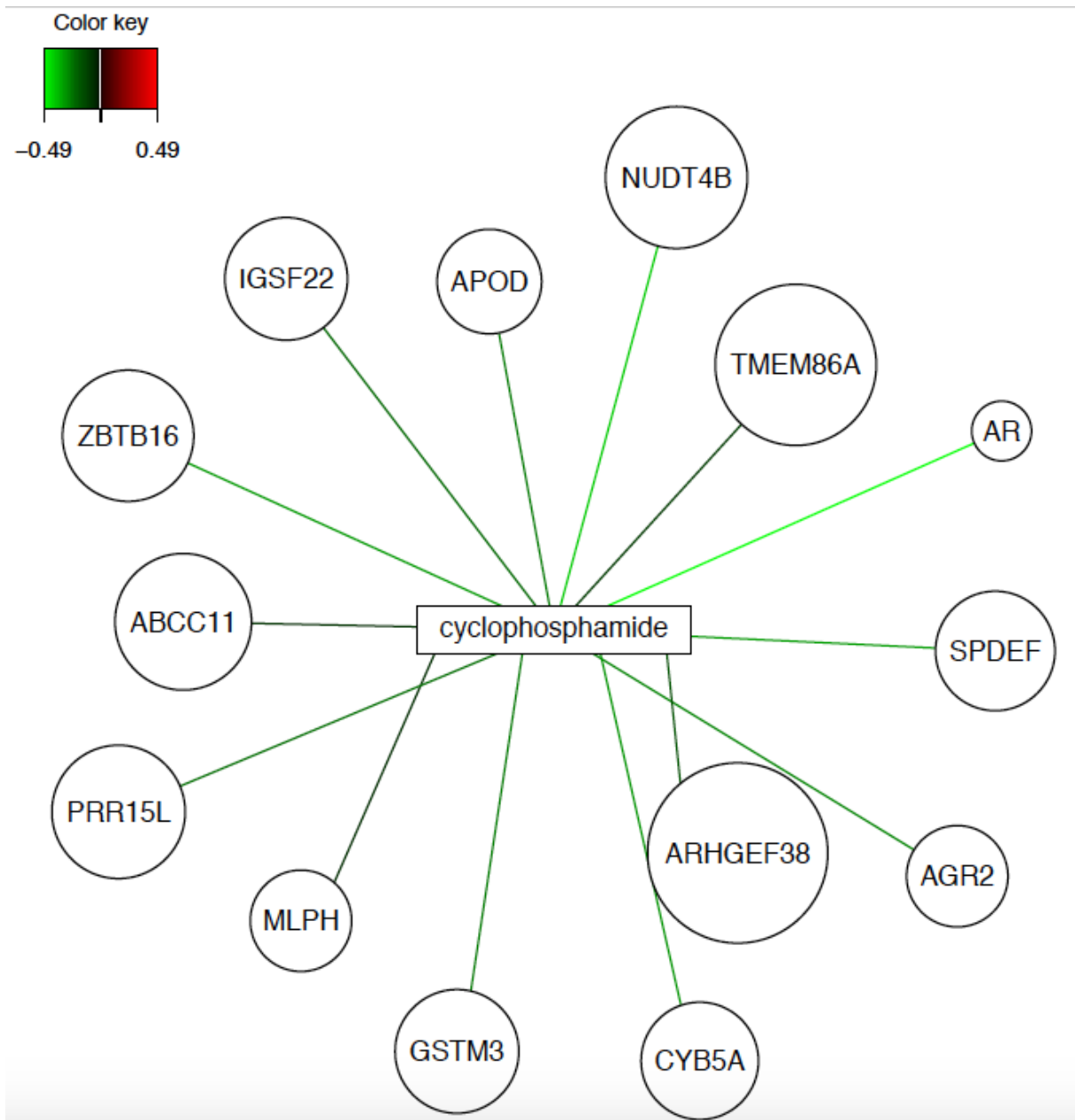
Analiza różnic w ekspresji genów między grupami RR, a pCR została przeprowadzona za pomocą narzędzia edgeR dla całkowitej liczby 24 237 genów. Łącznie 105 genów wykazywało istotne statystycznie różnice w ekspresji między pacjentami z grup RR, a pCR na poziomie istotności $FDR \leq 0,05$ i zmiany składnika bezwzględnej $\geq 1,2$ (**Rysunek 3**), w tym 6 genów o istotnie obniżonej ekspresji i 99 o istotnie podwyższonej ekspresji. Poniżej wymieniono wszystkie 105 wykazujących różnice w ekspresji: *ABCA3, ABCC11, ABLIM3, ABLIM3-AS, ACOT4, AGR2, AKR1B15, ALCAM, ALDH3B2, ALOX15B, APOD, AQP3, AR, ARHGAP40, ARHGEF38, C6orf223, CADPS2-AS, CAPN13, CBR3-AS1, CHRM3-AS2, CLCA2, CRAT, CROT, CYB5A, CYP4F12, DRAIC, ELOVL5, ENSG00000237773, ENSG00000260417, ENSG00000283236, F2RL1, FAM234B, FAM240C, FMO1-AS, FMO4, FMO6P, FOXA1, FTOP1, GASK1B-AS1, GLYATL1P4, GPR173, GRIN1, GSTM3, GSTM5, GUSB, HECW2-AS1, HPGD, HSPA2, IGSF22, KAZN-AS1, KCNE4, KRT10, LDHD, LIN7A, LINC00862, LINC00993, LINC02487, LINC02701, LOC100507336, LOC646804, MAPK10, MCCC2, MLPH, MOGAT2, MPV17L, MROH9, MSX2, MUCL1, NUDT4B, OLFML3, PIP, PLA2G4F, PLEKHG7, PRKY, PRR15L, PTK6, PXMP4, RGMB-AS1, RND1, RORA-AS, RPL12P20, SCD, SCIRT, SCP2, SCUBE1, SERHL, SERHL2, SHROOM1, SLC49A3, SORD2P, SPDEF, ST6GALNAC1, STEAP4, STEAP4-AS, SYTL2, TDRD12, TMEM45B, TMEM86A, TPH1, TSPAN15, UGDH, ZBTB16, ZNF350, ZNF350-AS1, ZNF613.*



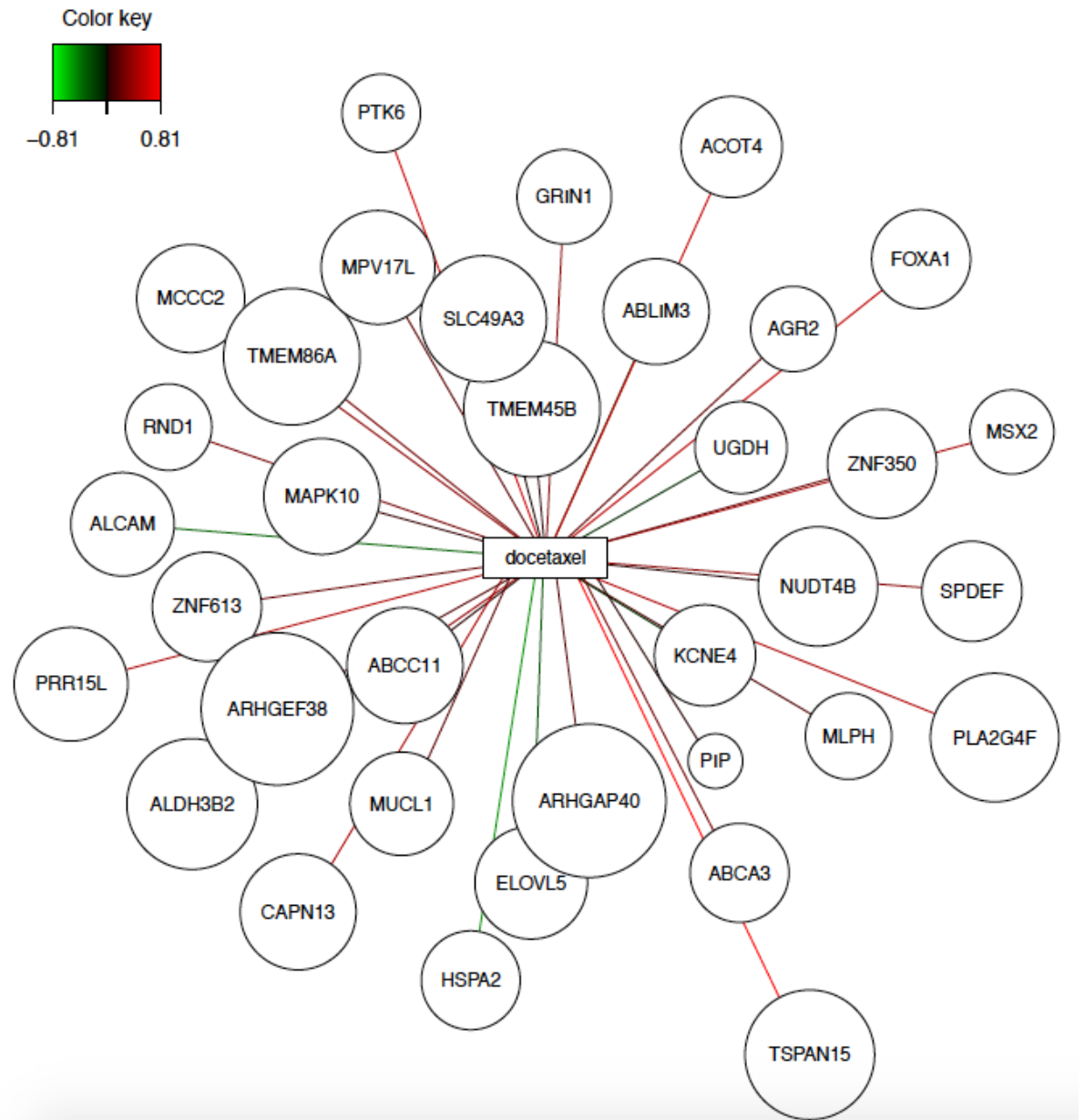
Rysunek 3. Wykres „volcano plot” ilustrujący różnice w ekspresji analizowanych genów pomiędzy pacjentkami RR a pacjentkami pCR. Geny o znacznie zmienionej ekspresji ($\text{abs. log}_2\text{FC} \geq 1,2$, $\text{FDR} \leq 0,05$) oznaczono niebieskimi kropkami (obniżona ekspresja) oraz czerwonymi kropkami (podwyższona ekspresja).

Jak wykazała analiza PLSR w komórkach raka piersi, spośród 105 genów o zderegulowanej ekspresji, 42 były związane z wrażliwością na docetaksel, doksorubicynę, paklitaksel i/lub cyklofosfamid w liniach komórkowych raka piersi. Wyniki analizy PLSR przedstawiono na w postaci sieci korelacji. Wyniki analizy PLSR przedstawiające geny DE o wysokiej korelacji ($\geq 0,4$) z wrażliwością linii komórek raka piersi na cyklofosfamid (**rysunek 4A**), docetaksel (**rysunek 4B**) i doksorubicynę (**rysunek 4C**) oraz paklitaksel (**rysunek 4D**).

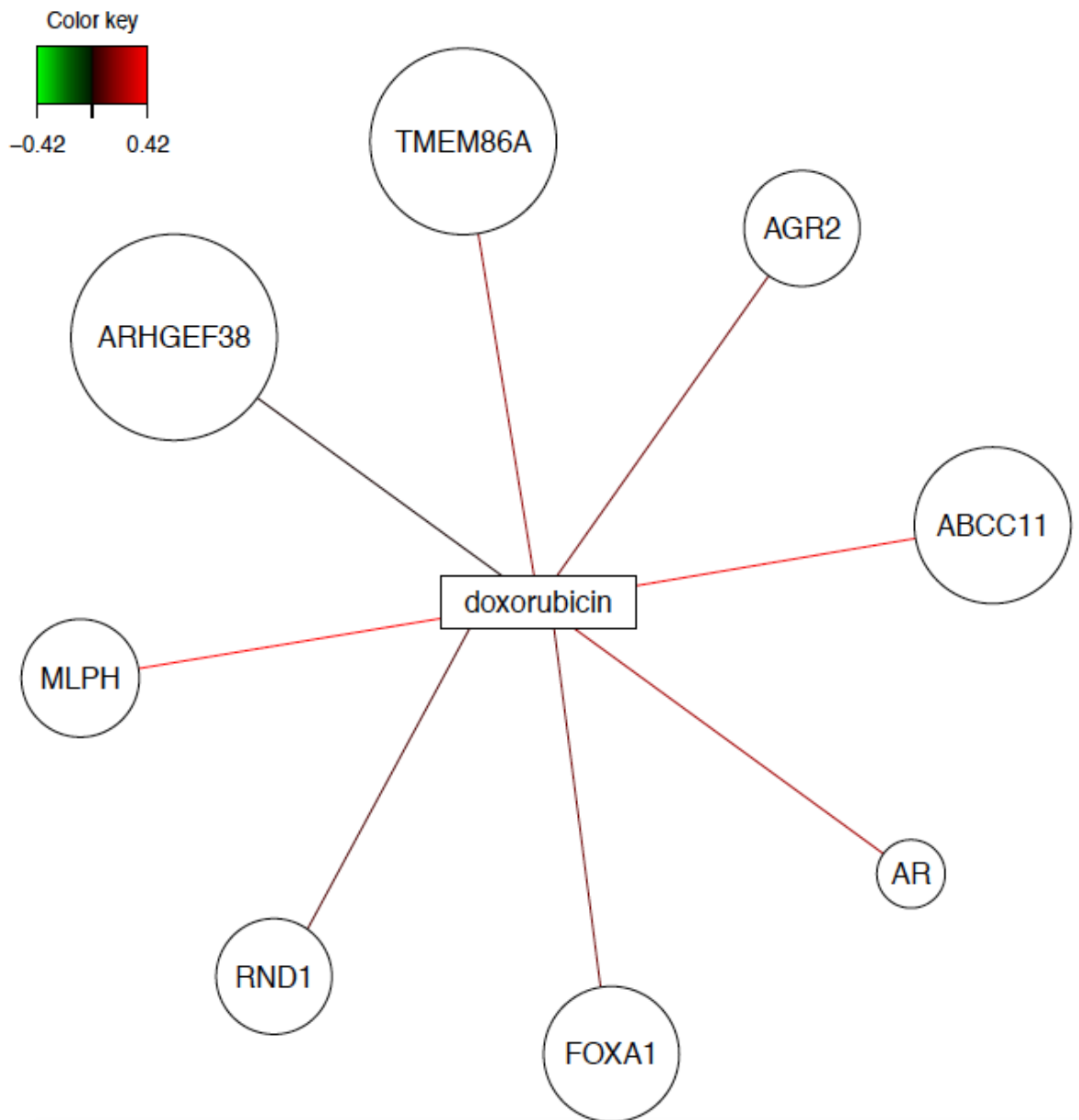
Następnie zbadano 3 bazy danych single-cell RNA-seq pierwotnego raka piersi, aby wybrać tylko te geny z powyższych, które ulegały ekspresji w komórkach nowotworowych guzów. 24 z 42 genów związanych z wrażliwością na chemioterapeutyki wykazywały umiarkowaną lub silną ekspresję w komórkach nowotworowych piersi (**Rysunek 4A-D**).



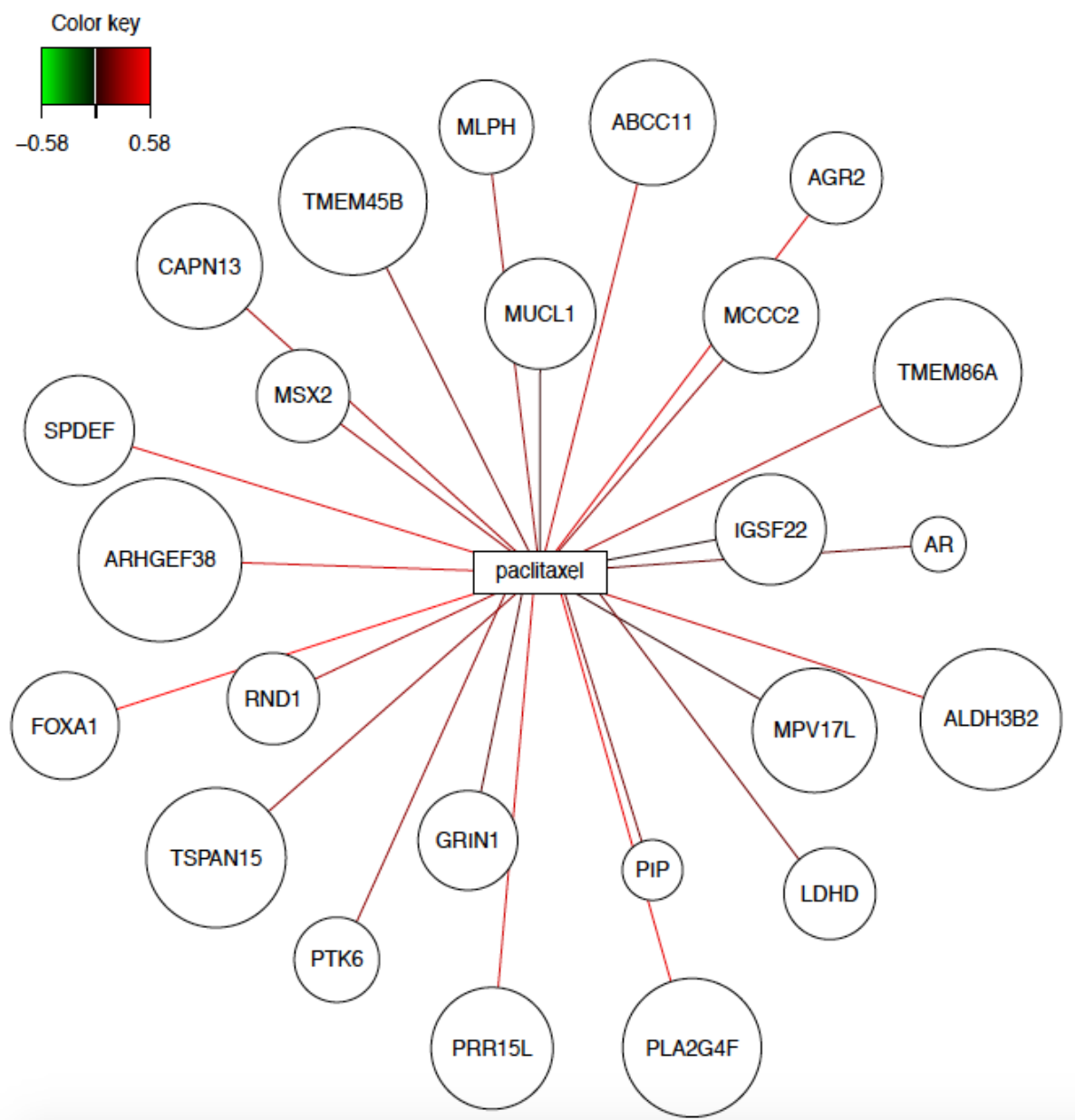
Rysunek 4A. Geny związane z wrażliwością na cyklofosfamid o zaburzonym wzorcu ekspresji pomiędzy pacjentkami RR, a pacjentkami pCR.



Rysunek 4B. Geny związane z wrażliwością na docetaxel o zaburzonym wzorcu ekspresji pomiędzy pacjentkami RR, a pacjentkami pCR.



Rysunek 4C. Geny związane z wrażliwością na doksorubicynę o zaburzonym wzorcu ekspresji pomiędzy pacjentkami RR, a pacjentkami pCR.



Rysunek 4D. Geny związane z wrażliwością na paklitaksel o zaburzonym wzorcu ekspresji pomiędzy pacjentkami RR, a pacjentkami pCR.

Finalnie przeanalizowano, które z wybranych 24 genów były istotnie związane z całkowitym czasem przeżycia (*overall survival* - OS) w grupie pacjentek TNBC z bazy TCGA. Stwierdzono, że dychotomia w poziomie ekspresji (wysoka/niska) 9 niżej wymienionych genów z puli 24 genów była istotnie związana z OS: *MUCL1*, *ABCC11*, *SPDEF*, *APOD*, *ARHGEF38*, *PRR15L*, *ABCA3*, *KCNE4* i *CYB5A*. Podwyższona ekspresja 7 spośród w/w 9 genów była związana z krótszym OS w przypadku TNBC, z wyjątkiem *APOD* i *ARHGEF38*, dla których podwyższona ekspresja była związana z dłuższym OS w przypadku TNBC.

11. DYSKUSJA

Oporność na chemioterapię, czyli brak wrażliwości komórek rakowych na zastosowane leczenie, jest zjawiskiem powszechnym w leczeniu raka piersi, także w przypadku TNBC [40]. Niektóre pacjentki są odporne na leczenie jeszcze przed jego wdrożeniem (*oporność pierwotna* – związana z obecnością mutacji w komórkach nowotworowych powodujących niewrażliwość na zastosowany terapeutyk) lub tracą odpowiedź na leczenie w jego trakcie (*oporność wtórna*). Część mechanizmów komórkowych prowadzących do nabywania oporności na leki jest dobrze scharakteryzowana i opisana, ale wciąż, ze względu na heterogenność i ewolucję nowotworów, istnieje konieczność prowadzenia nowych badań mających na celu lepsze zrozumienie zjawiska chemiooporności. Do znanych przyczyn oporności na leczenie w raku piersi zaliczane są:

- Mutacje w genach *TWISTI* [205] i *MDR1* [206] warunkujące pierwotną oporność na chemioterapię,
- Nadekspresja genów kodujących transportery ABC (*ATP-binding cassette transporters*), warunkujących wypompowywanie leków z komórek nowotworowych. Do kluczowych transporterów ABC w raku piersi zalicza się białka BCRP (ang. *breast cancer resistance protein*; kodowane przez gen *ABCG2*), P-gp (kodowane przez gen *ACB1*) oraz MRP1 (gen *ABCC1*) [207][208].
- Aktywacja szlaków sygnalizacyjnych istotnych dla przeżycia i inwazji komórek rakowych. W raku piersi szlaki sygnałowe takie jak szlak EGFR, szlak insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1R), czy PIK3K/AKT/mTOR oraz RAS/MAPK/ERK odpowiadają za oporność na hormonoterapię [209].
- Niekodujące RNA (ncRNA), zwłaszcza mikro RNA (miRNA), np. miR-451 oraz miR-326 obniżają ekspresję genów związanych z produkcją nadrodziny białe ABC prowadząc do zwiększenia wrażliwości na doksorubicynę [210]. Niektóre mikroRNA, takie jak miR-221/222, miR-342-3p [211], miR-873, Let-7b/Let-7i [212], obniżają ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję receptora estrogenowego, prowadząc do oporności na tamoksifen.
- Nowotworowe komórki macierzyste (ang. *cancer stem cells* – CSC), które cechują się szczególnie wzmożoną nadekspresją transporterów ABC, aktywacją kaskad sygnałowych odpowiedzialnych za wzrost guza oraz indukują szlaki naprawy DNA po chemioterapii umożliwiające uniknięcie toksyczności leków [213][214].

Wyżej wymienione mechanizmy stanowią jedynie część szlaków indukujących oporność na chemioterapię w raku piersi, co świadczy o tym, jak złożone procesy na podłożu molekularnym mogą decydować o powodzeniu zastosowanego leczenia. Biorąc pod uwagę heterogenność guzów potrójnie ujemnych, uzasadniającą trudności w leczeniu TNBC, w przypadku tego typu RP sugeruje się ścisłą personalizację strategii diagnostycznych i terapeutycznych.

Badania skupiają się obecnie na poszukiwaniu nowych biomarkerów prognostycznych dla TNBC opartych na zmianach w profilach ekspresji genów i interakcjach między nimi, w celu zidentyfikowania bardziej szczegółowych podtypów molekularnych. Profilowanie transkryptomu u pacjentek prezentujących odmienną odpowiedź na leczenie (lekooporne i lekowrażliwe) może pomóc znaleźć nowe podtypy molekularne TNBC różniące się wrażliwością na zastosowaną chemioterapię.

Przeprowadzone w ostatnich latach badania nad analizą transkryptomu raka piersi wykazały wiele różnic w ekspresji szerokiego spektrum genów u poszczególnych chorych. U pacjentek z TNBC zidentyfikowano grupę genów zaangażowanych w różnicowanie się przewodów mlekowych (*FSIP1, ADCY5, FSD1, HMSD, CMTM5, AFF3, CYP2A7, ATP1A2 i C11orf86*), które wiążą się rokowaniem choroby. Trzy z nich: *ADCY5, CYP2A7, ATP1A2* uczestniczą w kaskadach sygnałowych zależnych od receptorów hormonalnych [215]. Inne badanie TNBC poddawanego terapii neoadjuwantowej wykazało, że niższa ekspresja genów: *CIQTNF3, CTF1, OLFML3, PLA2RI, PODN, KRT15* i *HLA-A* oraz nadmierna ekspresja *TUBB* i *TCPI* były charakterystyczne dla pacjentek z chemoopornością i gorszym rokowaniem. Geny te kodują białka błony komórkowej i macierzy międzykomórkowej, uczestniczące w transdukcji sygnałów [216]. Ponadto wykryte zostały zmiany w ekspresji genów u pacjentek z BC ER+. Wyższą ekspresję genów *ER, HER2, GATA3, AKT, RAS* i *p63*, które promują proliferację komórek, zaobserwowano w przypadku guzów opornych, co jest zgodne z mechanizmami oporności na terapię hormonalną [217].

W prezentowanych badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej z zastosowaniem RNA-seq, wyselekcjonowano 9 różnych genów ulegających istotnej statystycznie nadekspresji u pacjentek TNBC o ograniczonej odpowiedzi na chemioterapię:

1. *MUCL1 (Mucin-like 1)*
2. *ABCC11 (ATP-binding cassette transporter subfamily C member 11)*
3. *SPDEF (SAM pointed domain-containing ETS transcription factor)*
4. *APOD (Apolipoprotein D)*

5. *ARHGEF38 (Rho guanine nucleotide exchange factor 38)*
6. *CYB5A (Cytochrome b5 type A)*
7. *PRR15 (Proline rich 15)*
8. *ABCA3 (ATP-binding cassette subfamily A member 3)*
9. *KCNE4 (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 4)*

Wyselekcjonowane w badaniu geny uczestniczą w różnych szlakach sygnałowych komórki, zaangażowanych w procesie karcynogenezy oraz wytworzeniu oporności na chemioterapeutyki. Kodowane przez nie białka należą m.in. do nadrodziny transporterów ABC (*ABCA3*, *ABCC11*), cytochromów (*CYB5A*) oraz białek kontrolujących polaryzację komórek (*KCNE4*). Część z opisywanych genów ulegających zmienionej ekspresji w grupie badanej nie została dotychczas ujęta w powszechnie stosowanych panelach prognostycznych i predykcyjnych i stanowią obiecujący obszar do dalszych analiz i określenia nowych biomarkerów TNBC.

11.1. Gen *KCNE4*

W prezentowanym badaniu, nadekspresja *KCNE4* była skorelowana z gorszą odpowiedzią na leczenie u pacjentek z TNBC. *KCNE4* kodujący białko odpowiedzialne za regulację aktywności podrodziny E potasowych kanałów napięciowo-zależnego, został zidentyfikowany jako gen o wzmożonej ekspresji u pacjentek opornych, w stosunku do pacjentek wrażliwych na leczenie. Nadekspresja *KCNE4* została dotychczas uznana za czynnik złego rokowania w różnych nowotworach złośliwych [218][219][220]. Liczne badania wskazują na nadekspresję kanałów potasowych także w komórkach raka piersi – zarówno kanałów K⁺ jono-zależnych (Kv10.1, Kv1.3, hERG1), jak i zależnych od jonów wapnia (KCa1.1, KCa2.1, KCa2.2, KCa2.3, KCa3.1). Na przykład potwierdzono, że nadekspresja KCa1.1 koreluje z występowaniem przerzutów raka piersi do mózgu [221] oraz wysoką atypią jądrową wiążącą się z gorszym rokowaniem [222].

Kanały jonowe zlokalizowane w błonie komórkowej mogą stanowić biomarkery nowotworów, a ich wykrycie jest możliwe z użyciem konwencjonalnych technik immunohistochemicznych i molekularnych. Z tego samego powodu, stanowią one potencjalny cel dla terapii celowanych [223]. Geny odpowiedzialne za potasowe kanały napięciowo-zależne różnych podgrup ulegają zwiększonej ekspresji także w TNBC [224].

Uzyskane wyniki są zbieżne z wcześniejszymi badaniami, które wykazały korelację między nadekspresją kanałów potasowych, a podwyższonym ryzykiem rozwoju przerzutów i gorszym rokowaniem w TNBC [221][225][226].

11.2. Geny *ABCA3* i *ABCC11*

W prezentowanym badaniu wykazano nadekspresję dwóch genów kodujących białka z rodziny transporterów ABC: *ABCA3* i *ABCC11*. Liczne transportery ABC uczestniczą w rozwoju oporności na chemioterapeutyki w różnych nowotworach litych, w tym raku piersi [227].

W przeciwieństwie do *ABCC11*, gen *ABCA3* dotychczas nie został dobrze scharakteryzowany w kontekście potencjalnej roli w raku piersi. W badaniu Schimanski i wsp. wykazano, że obniżona ekspresja w genie *ABCA3* stanowi niezależny czynnik ryzyka nawrotu raka piersi [228]. W innych badaniach, nadekspresja *ABCA3* korelowała pozytywnie z lekoopornością [229] oraz krótszym PFS w różnych nowotworach [230].

W przypadku TNBC we wcześniejszych badaniach była już obserwowana istotnie statystycznie zwiększona ekspresja *ABCC11* w porównaniu do innych raków piersi [231][232]. Wykazano także, że nadekspresja *ABCC11* wiąże się z gorszym rokowaniem TNBC [233] i z opornością wtórną na antracykliny, taksany i metotreksat [234].

11.3. Gen *APOD*

W grupie badanej wykazano zwiększoną ekspresję *APOD* u pacjentek o ograniczonej odpowiedzi na leczenie. Apolipoproteina D (ApoD) jest dobrze poznaną, multifunkcyjną glikoproteiną, która ulega 1000-razy większej ekspresji u kobiet z torbielami piersi niż u pacjentek niewykazujących zmian ogniskowych [235]. ApoD stanowi biomarker raka piersi o obiecujących wartościach prognostycznych. Wiele badań wskazuje na użyteczność oznaczania ApoD w jako czynnika korelującego z gorszą przeżywalnością [236][237]. W badaniu Søiland i in. wykazano, że pacjentki otrzymujące tamoksifen i niewykazujące nadekspresji *APOD* prezentowały lepsze wyniki przeżywalności niż pacjentki z nadekspresją *APOD* [236]. Powyższe badania wskazują na potencjalną rolę apolipoproteiny D jako czynnika gorszego rokowania raka piersi i korelują z wynikami uzyskanymi w niniejszej analizie.

11.4. Gen *ARHGEF38*

U pacjentek z progresją choroby zaobserwowano nadekspresję *ARHGEF38*. To gen zaangażowany w zdrowej komórce w aktywność katalityczną oraz polaryzację błony komórkowej. Dotychczas został opisany jako potencjalnie użyteczny biomarker w diagnostyce gruczolakoraka płuca i raka płaskonabłonkowego płuca [238]. Niektóre badania wskazują na jego rolę jako markera prognostycznego raka prostaty [239][240]. Liu i wsp. wykazali, że białko ARHGEF38 występuje w wyższym stężeniu w przerzutach węzłowych raka prostaty, aniżeli u pacjentów z cechą N0, co sugeruje rolę nadekspresji *ARHGEF38* w prognozowaniu potencjału przerzutowego nowotworu [239].

Przedstawione wyniki badania łączą się z powyższymi pracami, wskazując nadekspresję *ARHGEF38* jako czynnika gorszego rokowania TNBC.

11.5. Gen *CYB5A*

CYB5A jest genem kodującym cytochrom b5 (Cyb5a) odpowiedzialny za detoksykację aromatyczną karcynogenów zawartych m.in. w dymie papierosowym [241]. W grupie pacjentek o ograniczonej odpowiedzi na leczenie zanotowano wzrost ekspresji *CYB5A*. Szczegółowa funkcja i mechanizmy regulacyjne cytochromu b5 w komórkach raka piersi pozostają niejasne i są obiektem intensywnych badań.

Badania potwierdzają, że Cyb5a redukuje poziom stresu oksydacyjnego, przyspiesza szlak apoptozy, reguluje szlaki ERK1/2 i Akt, a zatem odgrywa istotną rolę w regulacji równowagi oksydacyjnej w komórce nowotworowej [242][243]. Niemniej jednak, efekty nadekspresji *CYB5* mogą różnić się w poszczególnych przypadkach raka piersi, co prawdopodobnie związane jest z polimorfizmami genowymi [241].

W celu ustalenia szczegółowej roli zmienionej ekspresji *CYB5A* w raku piersi i jej wpływu na rokowanie choroby, konieczne są dalsze analizy na większej grupie badanych.

11.6. Gen *SPDEF*

W uzyskanych wynikach gen *SPDEF* ulega nadekspresji u pacjentek TNBC bez pełnej odpowiedzi na leczenie. Gen *SPDEF* został po raz pierwszy zidentyfikowany jako aktywator swoistego antygeny sterczowego (PSA) [244], który wykrywany jest w tkankach nabłonkowych regulowanych hormonalnie, narządów takich jak gruczoł krokowy, piersi, czy

jajnik [245]. Kilka badań wykazało, że nadekspresja *SPDEF* promuje rozwój raka piersi luminalnego i wpływa na gorszy współczynnik przeżywalności u pacjentek ER+ [245][246][247]. Powyższe obserwacje plasują *SPDEF* jako czynnik złego rokowania BC. Ponadto w badaniu Turner i wsp. wykazano, że obniżenie ekspresji *SPDEF* w komórkach raka piersi działa spowalniająco na rozwój nowotworu [248].

Dotychczasowe badania łączą się z uzyskanymi wynikami i wskazują, że nadekspresja *SPDEF* jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym także dla raka piersi, jednak w kontekście TNBC konieczne są dalsze analizy potwierdzające potencjalną użyteczność profilu ekspresji tego genu w praktyce klinicznej.

11.7. Gen *MUCL1*

W grupie badanej ekspresja *MUCL1* była wyraźnie wzmożona u pacjentek o zredukowanej odpowiedzi na chemioterapię. Gen *MUCL1* koduje białka zaangażowane w progresję raka piersi poprzez indukcję przejścia nabłonkowo-mezenchymalne (ang. *epithelial – mesenchymal transition*, EMT), czyli procesu, w którym komórka epitelialna traci polaryzację oraz połączenia międzykomórkowe, a zyskuje zdolność do migracji i inwazyjności stając się komórką mezenchymalną [249]. W badaniu Liu i wsp. wykazano, że *MUCL1* jest potencjalnym markerem predykcyjnym u pacjentek z rakiem piersi poddawanych leczeniu neoadjuwantowemu. W opisywanym badaniu, po 3 cyklach chemioterapii, ekspresja *MUCL1* wyraźnie spadła u o. 58% pacjentek [249]. Z uwagi na znacznie ograniczoną ekspresję w zdrowej tkance i istotny wzrost wraz z progresją nowotworu, *MUCL1* wydaje się być czułym markerem o potencjale terapeutycznym [250]. Część badań wskazuje także na rolę *MUCL1* jako potencjalnego biomarkera mikroprzerzutów [251][249].

Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu uzupełniają się z powyższymi pracami, ponieważ pacjentki z gorszą odpowiedzią na leczenie wykazywały nadekspresję *MUCL1*.

11.8. Gen *PRR15*

W przeprowadzonym badaniu gen *PRR15* ulegał nadekspresji u pacjentek o ograniczonej odpowiedzi na leczenie. Spośród niewielu doniesień naukowych skupiających się na *PRR15*, dostępne są wzmianki o jego roli w rozwoju embrionalnym, chorobach neurologicznych i kilku nowotworach [252][253][254][255]. W badaniu Wang i wsp. wykazano, że *PRR15* promuje wzrost raka brodawkowego tarczycy, wpływając także

mikrośrodowisko guza. Zaobserwowano, że wzrost ekspresji *PRR15* koreluje ze wzmożoną infiltracją komórek układu odpornościowego, zwłaszcza przez eozynofile i komórki NK [256]. Dostępna literatura wskazuje na dysregulację ekspresji *PRR15* w różnych nowotworach jako na negatywny czynnik rokowniczy, m.in. w raku piersi, raku przełyku i innych nowotworach przewodu pokarmowego [257][258][255].

Niemniej jednak rola *PRR15* w raku piersi pozostaje kontrowersyjna. W badaniu Guo i wsp. wykazano, że proliferacja TNBC rośnie wraz ze spadkiem ekspresji *PRR15*, a zatem odwrotnie do uzyskanych w naszej próbie wyników [259]. Konieczne są zatem dalsze prace nad szczegółowym wyjaśnieniem wpływu zmian ekspresji tego genu na rozwój TNBC.

12. PODSUMOWANIE

Rak piersi jest chorobą wysoce heterogenną na poziomie histopatologicznym i molekularnym. Ma to swoje odzwierciedlenie w toku postępowania klinicznego, gdzie poszczególne przypadki różnią się między sobą dynamiką i rokowaniem nowotworu. Istotnym problemem pozostaje różna odpowiedź pacjentek na zastosowanie leczenia raka piersi. Znajomość patogenezy molekularnej zmian u konkretnego pacjenta umożliwi dobór selektywnej terapii, która będzie potencjalnie najbardziej skuteczna. Pomocnym narzędziem w badaniu profilu molekularnego choroby pacjenta jest analiza ekspresji genów (transkryptomu) w tkance nowotworowej z użyciem sekwencjonowania wysokoprzepustowego. Uzyskiwane w ten sposób panele genów o zmienionej ekspresji mogą mieć znaczenie prognostyczne (pozwalają przewidzieć przebieg choroby) lub predykcyjne (umożliwiają przewidywanie reakcji na zastosowane leczenie). Obecnie w onkologii personalizowanej raka piersi stosuje się z sukcesem kilka paneli opartych na analizie ekspresji genów (OncoType DX, Mamma Print, etc.), jednak konieczne są dalsze prace nad stworzeniem testów pozwalających na bardziej precyzyjne prognozowanie odpowiedzi na leczenie. W nurt tych badań wpisuje się obecna praca, w której wykazano różnice w ekspresji genów u pacjentek chorujących na TNBC, wrażliwych i opornych na zastosowaną chemioterapię neoadjuwantową.

Wyselekcjonowane w badaniach, przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, geny uczestniczą w różnych szlakach sygnałowych komórki, zaangażowanych w proces karcynogenezy oraz wytworzeniu oporności na chemioterapeutyki. Część z opisywanych genów ulegających zmienionej ekspresji w grupie badanej nie została dotychczas ujęta w znanych panelach prognostycznych i predykcyjnych, co stanowi obiecujące podstawy do dalszych analiz i identyfikacji nowych biomarkerów odpowiedzi na leczenie w TNBC.

13. WNIOSKI

1. Wśród pacjentek z rozpoznaniem tego samego podtypu histopatologicznego raka piersi – TNBC, obserwuje się różne profile ekspresji grup genowych.
2. W grupie pacjentek z takim samym rozpoznaniem histopatologicznym raka piersi i podobnym profilem ekspresji genowej istnieje podobna odpowiedź na zastosowane leczenie.
3. W grupie pacjentek o różnej odpowiedzi na leczenie, wyróżnia się grupy genów wykazujących odmienny, statystycznie istotny poziom ekspresji.

14. STRESZCZENIE

WSTĘP

Koncepcja onkologii personalizowanej opiera się na dokładnym zdefiniowaniu podstaw molekularnych transformacji nowotworowej, co otwiera drogę do identyfikacji określonych zmian w ekspresji genowej komórek każdego guza, a w efekcie umożliwia postawienie precyzyjnego rozpoznania i zastosowanie terapii celowanej, dobranej indywidualnie dla pacjenta. Kluczowe znaczenie dla personalizacji leczenia ma wielogenowe profilowanie molekularne nowotworu mające wartość prognostyczną (pozwalają na prognozowanie rokowania) lub predykcyjną (prognozowanie odpowiedzi na leczenie). Rak piersi jest chorobą wysoce heterogenną na poziomie histopatologicznym i molekularnym. Ma to swoje odzwierciedlenie w toku postępowania klinicznego, gdzie poszczególne przypadki różnią się między sobą dynamiką i przebiegiem choroby. Istotnym problemem pozostaje różna odpowiedź pacjentek na zastosowanie leczenia raka piersi. Wykorzystanie paneli genowych opartych o analizę ekspresji genów umożliwia indywidualizację terapii, wpływając pozytywnie na wyniki leczenia, ograniczając jednocześnie jego stopień toksyczności.

CEL PRACY

Określenie zależności kliniczno-molekularnych u wybranych grup pacjentek z rakiem piersi (TNBC) i wyłonienie grup genowych (z wykorzystaniem metody NGS), których zaburzona ekspresja może przyczyniać się do zmiennych odpowiedzi na stosowanie leczenia.

Dodatkowym celem pracy było wytypowanie genów mogących wejść w skład potencjalnego panelu prognostyczno-predykcyjnego ułatwiającego podejmowanie decyzji klinicznych u pacjentek chorujących na ten typ raka piersi.

MATERIAŁY I METODY

W badaniu wykorzystano materiał biopsyjny raka piersi uzyskany od 46 pacjentek. Grupę badaną stanowiły kobiety z rozpoznaniem rakiem piersi potrójnie-ujemnym (TNBC) zakwalifikowane do otrzymania systemowej chemioterapii neoadjuwantowej. Po ekstrakcji RNA z białek FFPE przeprowadzono sekwencjonowanie całkowitego RNA przy pomocy sekwencjonowania następnej generacji (NGS) Analizy uzyskanych wyników i ich korelacji

z danymi klinicznymi z bazy TCGA dokonano z wykorzystaniem metod statycznych w środowisku R/Bioconductor.

WYNIKI

W badaniu, przy użyciu RNA-seq, zidentyfikowano 9 różnych genów ulegających istotnej statystycznie nadekspresji u pacjentek TNBC opornych na chemioterapię: *MUCL1*, *ABCC11*, *SPDEF*, *APOD*, *ARHGEF38*, *PRR15*, *ABCA3*, *KCNE4*, *CYB5A*. Wykryte w badaniu geny uczestniczą w różnych szlakach sygnałowych komórki, zaangażowanych w procesie karcynogenezy oraz wytworzeniu oporności na chemioterapeutyki. Część z opisywanych genów ulegających zmienionej ekspresji w grupie badanej nie została dotychczas ujęta w powszechnie stosowanych panelach prognostycznych i predykcyjnych i stanowią obiecujący obszar do dalszych analiz i poszukiwania nowych biomarkerów TNBC.

15. SUMMARY

INTRODUCTION

The concept of personalized oncology is based on the precise definition of the molecular foundations of carcinogenesis, which allows to identify changes in gene expression in the tumor, and ultimately enabling precise diagnosis and the application of individually tailored targeted therapies for patients. A crucial aspect of treatment personalization is the multi-gene molecular profiling of the tumor with prognostic (allowing the assessment of disease's prognosis) or predictive (predicting the treatment response) value. Breast cancer is a highly heterogeneous disease at both histopathological and molecular levels. This is reflected in the clinical course, where individual cases differ in disease dynamics and progression. An important issue remains the varying response to treatment in breast cancer patients. The use of panels based on gene expression analysis allows for therapy individualization, and thus positively influencing treatment outcomes, while simultaneously reducing its toxicity.

THE AIM OF THE STUDY

The aim of the study was determining the clinical-molecular relationships in selected groups of breast cancer patients (TNBC) with variable treatment responses by identifying gene groups (using NGS method) with altered expression. An additional aim of the research was to identify genes that could be included in a potential prognostic-predictive panel to facilitate clinical decision-making for patients with this type of breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Breast cancer biopsy material obtained from 46 patients was used in the study. The study group consisted of women diagnosed with triple-negative breast cancer (TNBC) who were eligible for neoadjuvant systemic chemotherapy. After RNA extraction from FFPE blocks, total RNA sequencing was performed using next generation sequencing (NGS). Analysis of the obtained results and their correlation with clinical data from the TCGA database was performed using statistical methods in the R/Bioconductor environment.

RESULTS:

In the study, using RNA-seq, 9 different genes exhibiting statistically significant overexpression were identified in chemotherapy-resistant TNBC patients: *MUCL1*, *ABCC11*, *SPDEF*, *APOD*, *ARHGEF38*, *PRR15*, *ABCA3*, *KCNE4*, *CYB5A*. The genes identified in the study participate in various cellular signaling pathways involved in carcinogenesis and the development of chemotherapy resistance. Up to date, some of the described genes with altered expression in the study group have not been included in commonly used prognostic and predictive panels, making them a promising area for further analysis and the search for new TNBC biomarkers.

16. BIBLIOGRAFIA:

- [1] J. Ferlay *et al.*, “Cancer statistics for the year 2020: An overview,” *Int. J. cancer*, vol. 149, no. 4, pp. 778–789, Aug. 2021.
- [2] “Nowotwory złośliwe w Polsce | Krajowy Rejestr Nowotworów.” [Online]. Available: <https://onkologia.org.pl/pl/epidemiologia/nowodwory-zlosliwe-w-polsce>. [Accessed: 10-Sep-2023].
- [3] Y. Wang and D. Zheng, “The importance of precision medicine in modern molecular oncology,” *Clin. Genet.*, vol. 100, no. 3, pp. 248–257, Sep. 2021.
- [4] “Medycyna personalizowana. Mity, fakty, rekomendacje Redakcja Adam Fronczak,” 2016.
- [5] M. J. Duffy and J. Crown, “A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help,” *Clin. Chem.*, vol. 54, no. 11, pp. 1770–1779, Nov. 2008.
- [6] D. B. Couch, “Carcinogenesis: basic principles,” *Drug Chem. Toxicol.*, vol. 19, no. 3, pp. 133–148, 1996.
- [7] A. Sinjab, G. Han, L. Wang, and H. Kadara, “Field Carcinogenesis in Cancer Evolution: What the Cell Is Going On?,” *Cancer Res.*, vol. 80, no. 22, pp. 4888–4891, Nov. 2020.
- [8] I. Dagogo-Jack and A. T. Shaw, “Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 15, no. 2, pp. 81–94, Feb. 2018.
- [9] S. Beyes, N. G. Bediaga, and A. Zippo, “An Epigenetic Perspective on Intra-Tumour Heterogeneity: Novel Insights and New Challenges from Multiple Fields,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 19, Oct. 2021.
- [10] A. Baranovsky, T. Ivanov, M. Granovskaya, D. Papatsenko, and D. D. Pervouchine, “Transcriptome analysis reveals high tumor heterogeneity with respect to re-activation of stemness and proliferation programs,” *PLoS One*, vol. 17, no. 5, May 2022.
- [11] I. Vitale, E. Shema, S. Loi, and L. Galluzzi, “Intratumoral heterogeneity in cancer progression and response to immunotherapy,” *Nat. Med.*, vol. 27, no. 2, pp. 212–224, Feb. 2021.
- [12] K. D. Sutherland and J. E. Visvader, “Cellular Mechanisms Underlying Intertumoral Heterogeneity,” *Trends in cancer*, vol. 1, no. 1, pp. 15–23, Sep. 2015.
- [13] E. N. Kontomanolis *et al.*, “Basic principles of molecular biology of cancer cell-Molecular cancer indicators,” *JBUON*, vol. 26, no. 5, pp. 1723–1734, 2021.
- [14] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2016,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 66, no. 1, pp. 7–30, Jan. 2016.

- [15] M. Bellanger, N. Zeinomar, P. Tehranifar, and M. B. Terry, “Are Global Breast Cancer Incidence and Mortality Patterns Related to Country-Specific Economic Development and Prevention Strategies?,” *J. Glob. Oncol.*, vol. 4, no. 4, pp. 1–16, Mar. 2018.
- [16] S. Nardin *et al.*, “Breast Cancer Survivorship, Quality of Life, and Late Toxicities,” *Front. Oncol.*, vol. 10, p. 864, Jun. 2020.
- [17] F. Miglietta, M. Bottosso, G. Griguolo, M. V. Dieci, and V. Guarneri, “Major advancements in metastatic breast cancer treatment: when expanding options means prolonging survival,” *ESMO open*, vol. 7, no. 2, Apr. 2022.
- [18] S. Levva, “Recent advances in breast cancer treatment,” *Hell. J. Nucl. Med.*, vol. 26 Suppl, pp. 83–84, 2023.
- [19] Y. S. Sun *et al.*, “Risk Factors and Preventions of Breast Cancer,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 13, no. 11, p. 1387, 2017.
- [20] G. V. Dall and K. L. Britt, “Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk,” *Front. Oncol.*, vol. 7, no. MAY, p. 1, May 2017.
- [21] J. Horn, B. O. Åsvold, S. Opdahl, S. Tretli, and L. J. Vatten, “Reproductive factors and the risk of breast cancer in old age: a Norwegian cohort study,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 139, no. 1, pp. 237–243, May 2013.
- [22] E. H. and B. C. C. Group, “Sex hormones and breast cancer risk in premenopausal women: collaborative reanalysis of seven prospective studies,” *Lancet Oncol.*, vol. 14, no. 10, p. 1009, Sep. 2013.
- [23] N. Hamajima *et al.*, “Alcohol, tobacco and breast cancer – collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58515 women with breast cancer and 95067 women without the disease,” *Br. J. Cancer*, vol. 87, no. 11, p. 1234, Nov. 2002.
- [24] S. Kispert and J. McHowat, “Recent insights into cigarette smoking as a lifestyle risk factor for breast cancer,” *Breast Cancer (London)*, vol. 9, p. 127, Mar. 2017.
- [25] S. H. Lee *et al.*, “Glandular Tissue Component and Breast Cancer Risk in Mammographically Dense Breasts at Screening Breast US,” *Radiology*, vol. 301, no. 1, pp. 57–65, Oct. 2021.
- [26] P. Vineis, “Cancer as an evolutionary process at the cell level: an epidemiological perspective,” *Carcinogenesis*, vol. 24, no. 1, pp. 1–6, Jan. 2003.
- [27] S. Richards *et al.*, “Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology,” *Genet. Med.*, vol. 17, no. 5, pp. 405–424, May 2015.

- [28] M. M. Li *et al.*, “Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists,” *J. Mol. Diagn.*, vol. 19, no. 1, pp. 4–23, Jan. 2017.
- [29] E. N. Kontomanolis *et al.*, “Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review,” *Anticancer Res.*, vol. 40, no. 11, pp. 6009–6015, Nov. 2020.
- [30] G. W. Slack and R. D. Gascoyne, “MYC and aggressive B-cell lymphomas,” *Adv. Anat. Pathol.*, vol. 18, no. 3, pp. 219–228, May 2011.
- [31] L. J. Campbell, C. Patsouris, K. C. Rayeroux, K. Somana, E. H. Januszewicz, and J. Szer, “BCR/ABL amplification in chronic myelocytic leukemia blast crisis following imatinib mesylate administration,” *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 139, no. 1, pp. 30–33, Nov. 2002.
- [32] D. T. Bowen *et al.*, “RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years,” *Blood*, vol. 106, no. 6, pp. 2113–2119, Sep. 2005.
- [33] J. A. Jakob *et al.*, “NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma,” *Cancer*, vol. 118, no. 16, pp. 4014–4023, Aug. 2012.
- [34] B. R. Halle and D. B. Johnson, “Defining and Targeting BRAF Mutations in Solid Tumors,” *Curr. Treat. Options Oncol.*, vol. 22, no. 4, Apr. 2021.
- [35] J. K. Lee *et al.*, “N-Myc Drives Neuroendocrine Prostate Cancer Initiated from Human Prostate Epithelial Cells,” *Cancer Cell*, vol. 29, no. 4, p. 536, Apr. 2016.
- [36] Z. Mitri, T. Constantine, and R. O’Regan, “The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy,” *Chemother. Res. Pract.*, vol. 2012, pp. 1–7, Dec. 2012.
- [37] C. Shih, L. C. Padhy, M. Murray, and R. A. Weinberg, “Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts,” *Nature*, vol. 290, no. 5803, pp. 261–264, 1981.
- [38] P. V. Elizalde, R. I. C. Russo, M. F. Chervo, and R. Schillaci, “ErbB-2 nuclear function in breast cancer growth, metastasis and resistance to therapy,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 23, no. 12, pp. T243–T257, Dec. 2016.
- [39] N. M. Davis *et al.*, “Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 13, p. 4603, 2014.
- [40] Y. Pylayeva-Gupta, E. Grabocka, and D. Bar-Sagi, “RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 11, p. 761, Nov. 2011.

- [41] Z. Zhang, A. Richmond, and C. Yan, “Immunomodulatory Properties of PI3K/AKT/mTOR and MAPK/MEK/ERK Inhibition Augment Response to Immune Checkpoint Blockade in Melanoma and Triple-Negative Breast Cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 13, Jul. 2022.
- [42] M. Xing *et al.*, “TFPI inhibits breast cancer progression by suppressing ERK/p38 MAPK signaling pathway,” *Genes Genomics*, vol. 44, no. 7, pp. 801–812, Jul. 2022.
- [43] F. Khojasteh Poor *et al.*, “Mini review: The FDA-approved prescription drugs that target the MAPK signaling pathway in women with breast cancer,” *Breast Dis.*, vol. 40, no. 2, pp. 51–62, Jun. 2021.
- [44] L. L. S. van Reesema *et al.*, “RAS pathway biomarkers for breast cancer prognosis,” *Clin. Lab. Int.*, vol. 40, p. 18, Nov. 2016.
- [45] A. Fernández-Medarde and E. Santos, “Ras in Cancer and Developmental Diseases,” *Genes Cancer*, vol. 2, no. 3, p. 344, Mar. 2011.
- [46] A. Ray and B. K. Ray, “Induction of Ras by SAF-1/MAZ through a feed-forward loop promotes angiogenesis in breast cancer,” *Cancer Med.*, vol. 4, no. 2, p. 224, Feb. 2015.
- [47] P. B. Rahl and R. A. Young, “MYC and Transcription Elongation,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 4, no. 1, 2014.
- [48] B. N. Hannafon, A. L. Gin, Y. F. Xu, M. Bruns, C. L. Calloway, and W. Q. Ding, “Metastasis-associated protein 1 (MTA1) is transferred by exosomes and contributes to the regulation of hypoxia and estrogen signaling in breast cancer cells,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 17, no. 1, Feb. 2019.
- [49] A. Romaniuk-Drapała *et al.*, “hTERT Downregulation Attenuates Resistance to DOX, Impairs FAK-Mediated Adhesion, and Leads to Autophagy Induction in Breast Cancer Cells,” *Cells*, vol. 10, no. 4, Apr. 2021.
- [50] X. Li *et al.*, “PEG10 promotes human breast cancer cell proliferation, migration and invasion,” *Int. J. Oncol.*, vol. 48, no. 5, pp. 1933–1942, May 2016.
- [51] Y. Chen and O. I. Olopade, “MYC in breast tumor progression,” *Expert Rev. Anticancer Ther.*, vol. 8, no. 10, p. 1689, 2008.
- [52] M. S. Jung *et al.*, “A Myc Activity Signature Predicts Poor Clinical Outcomes in Myc-Associated Cancers,” *Cancer Res.*, vol. 77, no. 4, pp. 971–981, Feb. 2017.
- [53] J. Lipsick, “A History of Cancer Research: Tumor Suppressor Genes,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 12, no. 2, Feb. 2020.
- [54] T. Soussi, “The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 910, pp. 121–139, 2000.

- [55] D. W. Goodrich, “The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule,” *Oncogene*, vol. 25, no. 38, pp. 5233–5243, Aug. 2006.
- [56] K. Yoshida and Y. Miki, “Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage,” *Cancer Sci.*, vol. 95, no. 11, pp. 866–871, Nov. 2004.
- [57] G. M. Li, “Mechanisms and functions of DNA mismatch repair,” *Cell Res.*, vol. 18, no. 1, pp. 85–98, Jan. 2008.
- [58] L. W. Ellisen and D. A. Haber, “Hereditary breast cancer,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 49, pp. 425–436, 1998.
- [59] D. F. Easton *et al.*, “Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 56, no. 1, p. 265, 1995.
- [60] A. J. W. Paige, “Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 60, no. 10, pp. 2147–2163, Oct. 2003.
- [61] A. Kowalik *et al.*, “BRCA1 founder mutations and beyond in the Polish population: A single-institution BRCA1/2 next-generation sequencing study,” *PLoS One*, vol. 13, no. 7, Jul. 2018.
- [62] E. C. Smith, “An overview of hereditary breast and ovarian cancer syndrome,” *J. Midwifery Womens. Health*, vol. 57, no. 6, pp. 577–584, 2012.
- [63] D. G. Evans *et al.*, “Screening for familial ovarian cancer: poor survival of BRCA1/2 related cancers,” *J. Med. Genet.*, vol. 46, no. 9, pp. 593–597, Sep. 2009.
- [64] “ACOG Practice Bulletin No. 103: Hereditary breast and ovarian cancer syndrome,” *Obstet. Gynecol.*, vol. 113, no. 4, pp. 957–966, Apr. 2009.
- [65] A. C. Antoniou *et al.*, “BRCA1 and BRCA2 mutation predictions using the BOADICEA and BRCAPRO models and penetrance estimation in high-risk French-Canadian families,” *Breast Cancer Res.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2006.
- [66] J. J. T. Van Harssel *et al.*, “Efficiency of BRCAPRO and Myriad II mutation probability thresholds versus cancer history criteria alone for BRCA1/2 mutation detection,” *Fam. Cancer*, vol. 9, no. 2, pp. 193–201, Jun. 2010.
- [67] K. K. Oros *et al.*, “Application of BRCA1 and BRCA2 mutation carrier prediction models in breast and/or ovarian cancer families of French Canadian descent,” *Clin. Genet.*, vol. 70, no. 4, pp. 320–329, 2006.
- [68] R. M. Anna Doraczyńska-Kowalik, Gabriela Janus-Szymańska and M. M. S. Katarzyna Gabalewicz, Dagmara Michałowska, “Genetyka i onkologia (część 2.). Podstawy medycyny personalizowanej w leczeniu raka piersi i raka jajnika,” *Biul. Pol. Tow. Onkol. Nowotw.*, vol.

5, no. 5, pp. 255–272, 2020.

[69] K. Hemminki, K. Sundquist, J. Sundquist, A. Försti, A. Hemminki, and X. Li, “Familial Risks and Proportions Describing Population Landscape of Familial Cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 17, Sep. 2021.

[70] P. Kenemans, R. A. Verstraeten, and R. H. M. Verheijen, “Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer,” *Maturitas*, vol. 49, no. 1, pp. 34–43, Sep. 2004.

[71] P. W. Maciej Krzakowski, Piotr Potemski, *Onkologia Kliniczna TOM I*. Via Medica, 2023.

[72] S. H. Jafari *et al.*, “Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 7, pp. 5200–5213, Jul. 2018.

[73] J. Jassem *et al.*, “WYTYCZNE POSTĘPOWANIA DIAGNOSTYCZNO-TERAPEUTYCZNEGO Rak piersi Breast cancer.”

[74] P. H. Tan *et al.*, “The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast,” *Histopathology*, vol. 77, no. 2, pp. 181–185, Aug. 2020.

[75] C. I. Li, K. E. Malone, B. S. Saltzman, and J. R. Daling, “Risk of invasive breast carcinoma among women diagnosed with ductal carcinoma in situ and lobular carcinoma in situ, 1988-2001,” *Cancer*, vol. 106, no. 10, pp. 2104–2112, May 2006.

[76] F. Mamouch, N. Berrada, Z. Aoullay, B. El Khanoussi, and H. Errihani, “Inflammatory Breast Cancer: A Literature Review,” *World J. Oncol.*, vol. 9, no. 5–6, p. 129, 2018.

[77] T. O. Nielsen *et al.*, “Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 113, no. 7, pp. 808–819, Jul. 2021.

[78] M. G. Davey, S. O. Hynes, M. J. Kerin, N. Miller, and A. J. Lowery, “Ki-67 as a Prognostic Biomarker in Invasive Breast Cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 17, Sep. 2021.

[79] M. Dowsett *et al.*, “Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group,” *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 103, no. 22, p. 1656, Nov. 2011.

[80] C. M. Perou *et al.*, “Molecular portraits of human breast tumours,” *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747–752, Aug. 2000.

[81] T. Sørlie *et al.*, “Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 19, pp. 10869–10874, Sep. 2001.

[82] H. J. Burstein *et al.*, “Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast

cancer 2021,” *Ann. Oncol.*, vol. 32, no. 10, p. 1216, Oct. 2021.

[83] G. Cserni *et al.*, “Triple-Negative Breast Cancer Histological Subtypes with a Favourable Prognosis,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 22, Nov. 2021.

[84] L. Yin, J. J. Duan, X. W. Bian, and S. C. Yu, “Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress,” *Breast Cancer Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–13, Jun. 2020.

[85] Y. H. Zhang *et al.*, “Outcomes of Breast Cancer Patients with High Volume of Residual Disease Following Neoadjuvant Chemotherapy,” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, Mar. 2022.

[86] P. Cortazar *et al.*, “Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: The CTNeoBC pooled analysis,” *Lancet*, vol. 384, no. 9938, pp. 164–172, Jul. 2014.

[87] M. Holanek *et al.*, “Neoadjuvant Chemotherapy of Triple-Negative Breast Cancer: Evaluation of Early Clinical Response, Pathological Complete Response Rates, and Addition of Platinum Salts Benefit Based on Real-World Evidence,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 7, Apr. 2021.

[88] G. Von Minckwitz *et al.*, “Response-guided neoadjuvant chemotherapy for breast cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 29, pp. 3623–3630, Oct. 2013.

[89] J. Lee, “Current Treatment Landscape for Early Triple-Negative Breast Cancer (TNBC),” *J. Clin. Med. 2023, Vol. 12, Page 1524*, vol. 12, no. 4, p. 1524, Feb. 2023.

[90] S. Wang and ほか, “Response to Neoadjuvant Therapy and Disease Free Survival in Patients with Triple-Negative Breast Cancer,” *癌と化学療法*, vol. 36, no. 2, pp. 255–258, Jan. 2009.

[91] X. Bai, J. Ni, J. Beretov, P. Graham, and Y. Li, “Triple-negative breast cancer therapeutic resistance: Where is the Achilles’ heel?,” *Cancer Lett.*, vol. 497, pp. 100–111, Jan. 2021.

[92] O. Yersal and S. Barutca, “Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications,” *World J. Clin. Oncol.*, vol. 5, no. 3, p. 412, Aug. 2014.

[93] B. D. Lehmann *et al.*, “Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies,” *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 7, pp. 2750–2767, Jul. 2011.

[94] X. Chen *et al.*, “TNBCtype: A Subtyping Tool for Triple-Negative Breast Cancer,” *Cancer Inform.*, vol. 11, pp. 147–156, 2012.

[95] X. Yu, Y. Liu, and M. Chen, “Reassessment of Reliability and Reproducibility for Triple-Negative Breast Cancer Subtyping,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 11, Jun. 2022.

- [96] K. J. Thompson *et al.*, “Luminal androgen receptor breast cancer subtype and investigation of the microenvironment and neoadjuvant chemotherapy response,” *NAR cancer*, vol. 4, no. 2, Apr. 2022.
- [97] M. C. A. Balkenhol, W. Vreuls, C. A. P. Wauters, S. J. J. Mol, J. A. W. M. van der Laak, and P. Bult, “Histological subtypes in triple negative breast cancer are associated with specific information on survival,” *Ann. Diagn. Pathol.*, vol. 46, p. 151490, Jun. 2020.
- [98] I. H. Abdulkareem and I. B. Zurmi, “Review of hormonal treatment of breast cancer,” *Niger. J. Clin. Pract.*, vol. 15, no. 1, pp. 9–14, Jan. 2012.
- [99] S. R. Hosford and T. W. Miller, “Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4/6, Src, JAK/STAT, PARP, HDAC, and PI3K/AKT/mTOR pathways,” *Pharmgenomics. Pers. Med.*, vol. 7, no. 1, pp. 203–215, Aug. 2014.
- [100] M. P. Goetz *et al.*, “MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 35, no. 32, pp. 3638–3646, Nov. 2017.
- [101] G. N. Hortobagyi *et al.*, “Overall Survival with Ribociclib plus Letrozole in Advanced Breast Cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 386, no. 10, pp. 942–950, Mar. 2022.
- [102] J. A. Beaver and B. H. Park, “The BOLERO-2 trial: the addition of everolimus to exemestane in the treatment of postmenopausal hormone receptor-positive advanced breast cancer,” *Future Oncol.*, vol. 8, no. 6, pp. 651–657, Jun. 2012.
- [103] D. A. Yardley *et al.*, “Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase inhibitor,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 17, pp. 2128–2135, Jun. 2013.
- [104] M. N. Dickler *et al.*, “Phase II Study of Taselisib (GDC-0032) in Combination with Fulvestrant in Patients with HER2-Negative, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, no. 18, pp. 4380–4387, Sep. 2018.
- [105] J. Baselga *et al.*, “Phase III study of taselisib (GDC-0032) + fulvestrant (FULV) v FULV in patients (pts) with estrogen receptor (ER)-positive, PIK3CA-mutant (MUT), locally advanced or metastatic breast cancer (MBC): Primary analysis from SANDPIPER.,” https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.18_suppl.LBA1006, vol. 36, no. 18_suppl, pp. LBA1006–LBA1006, Jun. 2018.
- [106] F. André *et al.*, “Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 380, no. 20, pp. 1929–1940, May 2019.
- [107] R. Mishra, H. Patel, S. Alanazi, M. K. Kilroy, and J. T. Garrett, “PI3K Inhibitors in Cancer: Clinical Implications and Adverse Effects,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 7, Apr. 2021.

- [108] F. André *et al.*, “Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 32, no. 2, pp. 208–217, Feb. 2021.
- [109] M. Zhang, A. V. Lee, and J. M. Rosen, “The Cellular Origin and Evolution of Breast Cancer,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 7, no. 3, Mar. 2017.
- [110] R. H. Jones *et al.*, “Fulvestrant plus capivasertib versus placebo after relapse or progression on an aromatase inhibitor in metastatic, oestrogen receptor-positive breast cancer (FAKTION): a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial,” *Lancet. Oncol.*, vol. 21, no. 3, pp. 345–357, Mar. 2020.
- [111] G. von Minckwitz *et al.*, “Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 2, pp. 122–131, Jul. 2017.
- [112] R. K. Murthy *et al.*, “Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 382, no. 7, pp. 597–609, Feb. 2020.
- [113] C. Saura *et al.*, “Neratinib Plus Capecitabine Versus Lapatinib Plus Capecitabine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Previously Treated With ≥ 2 HER2-Directed Regimens: Phase III NALA Trial,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 38, no. 27, pp. 3138–3149, Sep. 2020.
- [114] B. Asselain *et al.*, “Long-term outcomes for neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in early breast cancer: meta-analysis of individual patient data from ten randomised trials,” *Lancet Oncol.*, vol. 19, no. 1, pp. 27–39, Jan. 2018.
- [115] M. Bou Zerdan *et al.*, “Triple Negative Breast Cancer: Updates on Classification and Treatment in 2021,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 5, p. 1253, Mar. 2022.
- [116] G. V. Echeverria *et al.*, “Resistance to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer mediated by a reversible drug-tolerant state,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 11, no. 488, Apr. 2019.
- [117] L. Carbognin *et al.*, “Neoadjuvant strategies for triple negative breast cancer: ‘state-of-the-art’ and future perspectives,” *Anticancer. Agents Med. Chem.*, vol. 15, no. 1, pp. 15–25, Dec. 2015.
- [118] J. K. Litton *et al.*, “Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 379, no. 8, pp. 753–763, Aug. 2018.
- [119] H. P. Eikesdal *et al.*, “Olaparib monotherapy as primary treatment in unselected triple negative breast cancer,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 32, no. 2, pp. 240–249, Feb. 2021.
- [120] L. Collet *et al.*, “PARP Inhibitors: A Major Therapeutic Option in Endocrine-Receptor

Positive Breast Cancers,” *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 3, p. 599, Feb. 2022.

[121] P. Schmid *et al.*, “Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 38, no. 5, pp. 423–433, Feb. 2020.

[122] T. A. Traina *et al.*, “Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, no. 9, pp. 884–890, 2018.

[123] M. B. Amin *et al.*, “The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more ‘personalized’ approach to cancer staging,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 67, no. 2, pp. 93–99, Mar. 2017.

[124] H. Zhu and B. E. Doğan, “American Joint Committee on Cancer’s Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: Summary for Clinicians,” *Eur. J. Breast Heal.*, vol. 17, no. 3, p. 234, Jul. 2021.

[125] A. Smith and K. Farrah, “Gene Expression Profiling Tests for Breast Cancer: A Rapid Qualitative Review,” *Gene Expr. Profiling Tests Breast Cancer A Rapid Qual. Rev.*, pp. 4–5, Apr. 2019.

[126] J. M. S. Bartlett *et al.*, “Breast Cancer Index Is a Predictive Biomarker of Treatment Benefit and Outcome from Extended Tamoxifen Therapy: Final Analysis of the Trans-aTTom Study,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 28, no. 9, pp. 1871–1880, May 2022.

[127] A. F. Vieira and F. Schmitt, “An Update on Breast Cancer Multigene Prognostic Tests—Emergent Clinical Biomarkers,” *Front. Med.*, vol. 5, no. SEP, 2018.

[128] F. Cardoso *et al.*, “70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 375, no. 8, pp. 717–729, Aug. 2016.

[129] A. V. Lønkhof *et al.*, “PAM50 Risk of Recurrence Score Predicts 10-Year Distant Recurrence in a Comprehensive Danish Cohort of Postmenopausal Women Allocated to 5 Years of Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Early Breast Cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, no. 8, pp. 735–740, Mar. 2018.

[130] F. Fitzal *et al.*, “The genomic expression test EndoPredict is a prognostic tool for identifying risk of local recurrence in postmenopausal endocrine receptor-positive, her2neu-negative breast cancer patients randomised within the prospective ABCSG 8 trial,” *Br. J. Cancer*, vol. 112, no. 8, p. 1405, Apr. 2015.

[131] D. Kumar, G. Bansal, A. Narang, T. Basak, T. Abbas, and D. Dash, “Integrating transcriptome and proteome profiling: Strategies and applications,” *Proteomics*, vol. 16, no. 19. Wiley-VCH Verlag, pp. 2533–2544, 01-Oct-2016.

[132] J. Wang *et al.*, “Pan-Cancer Proteomics Analysis to Identify Tumor-Enriched and

- Highly Expressed Cell Surface Antigens as Potential Targets for Cancer Therapeutics,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 22, no. 9, p. 100626, Sep. 2023.
- [133] H. Zhang, L. He, and L. Cai, “Transcriptome Sequencing: RNA-Seq,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1754, pp. 15–27, 2018.
- [134] S. Roychowdhury and A. M. Chinnaiyan, “Translating cancer genomes and transcriptomes for precision oncology,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 66, no. 1, pp. 75–88, Jan. 2016.
- [135] D. Balamurali and M. Stoll, “Non-Coding RNA Databases in Cardiovascular Research,” *Non-coding RNA*, vol. 6, no. 3, pp. 1–13, Sep. 2020.
- [136] R. A. F. MacLeod and H. G. Drexler, “Classical and molecular cytogenetic analysis,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 946, pp. 39–60, 2013.
- [137] E. Garimberti and S. Tosi, “Fluorescence in situ hybridization (FISH), basic principles and methodology,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 659, pp. 3–20, 2010.
- [138] M. A. Vollebergh *et al.*, “An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 22, no. 7, pp. 1561–1570, Jul. 2011.
- [139] F. López *et al.*, “Utility of MS-MLPA in DNA methylation profiling in primary laryngeal squamous cell carcinoma,” *Oral Oncol.*, vol. 50, no. 4, pp. 291–297, 2014.
- [140] A. Imran *et al.*, “Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article,” *Iran. J. Public Health*, vol. 46, no. 11, p. 1475, 2017.
- [141] A. A. Kolodziejczyk and T. Lönnberg, “Global and targeted approaches to single-cell transcriptome characterization,” *Brief. Funct. Genomics*, vol. 17, no. 4, pp. 209–219, 2018.
- [142] R. Krumlauf, “Northern blot analysis of gene expression,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 7, pp. 307–324, Nov. 1991.
- [143] R. Lowe, N. Shirley, M. Bleackley, S. Dolan, and T. Shafee, “Transcriptomics technologies,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 13, no. 5, May 2017.
- [144] M. an Sun, X. Shao, and Y. Wang, “Microarray Data Analysis for Transcriptome Profiling,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1751, pp. 17–33, 2018.
- [145] L. Gabriele, F. Moretti, M. A. Pierotti, F. M. Marincola, R. Foà, and F. M. Belardelli, “The use of microarray technologies in clinical oncology,” *J. Transl. Med.*, vol. 4, p. 8, Feb. 2006.
- [146] G. Russo, C. Zegar, and A. Giordano, “Advantages and limitations of microarray technology in human cancer,” *Oncogene*, vol. 22, no. 42, pp. 6497–6507, Oct. 2003.
- [147] O. Gangisetty and D. S. Reddy, “The optimization of TaqMan real-time RT-PCR assay

for transcriptional profiling of GABA-A receptor subunit plasticity,” *J. Neurosci. Methods*, vol. 181, no. 1, pp. 58–66, Jun. 2009.

[148] M. Guo *et al.*, “Real-time quantitative RT-PCR detection of circulating tumor cells from breast cancer patients,” *Int. J. Oncol.*, vol. 46, no. 1, pp. 281–289, Jan. 2015.

[149] A. Ståhlberg, N. Zoric, P. Åman, and M. Kubista, “Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case,” *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 5, no. 2, pp. 221–230, Mar. 2005.

[150] B. M. Crossley *et al.*, “Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring,” *J. Vet. Diagn. Invest.*, vol. 32, no. 6, p. 767, Nov. 2020.

[151] V. Costa, C. Angelini, I. De Feis, and A. Ciccodicola, “Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq,” *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, 2010.

[152] M. Sultan *et al.*, “A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome,” *Science (80-.)*, vol. 321, no. 5891, pp. 956–960, Aug. 2008.

[153] D. Tan and H. T. Lynch, *Principles of molecular diagnostics and personalized cancer medicine*. .

[154] J. Guinney *et al.*, “The consensus molecular subtypes of colorectal cancer,” *Nat. Med.*, vol. 21, no. 11, pp. 1350–1356, Nov. 2015.

[155] L. Marisa *et al.*, “Clinical utility of colon cancer molecular subtypes: Validation of two main colorectal molecular classifications on the PETACC-8 phase III trial cohort.,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 35, no. 15_suppl, pp. 3509–3509, May 2017.

[156] A. Okita *et al.*, “Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy against metastatic colorectal cancer,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 27, pp. 18698–18711, Apr. 2018.

[157] H.-J. Lenz *et al.*, “Impact of consensus molecular subtyping (CMS) on overall survival (OS) and progression free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance).,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 35, no. 15_suppl, pp. 3511–3511, May 2017.

[158] S. Stintzing *et al.*, “Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial.,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 35, no. 15_suppl, pp. 3510–3510, May 2017.

[159] J. K. Mooi *et al.*, “The prognostic impact of consensus molecular subtypes (CMS) and its predictive effects for bevacizumab benefit in metastatic colorectal cancer: molecular analysis of the AGITG MAX clinical trial.,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 29, no. 11,

pp. 2240–2246, 2018.

- [160] F. Tschentscher *et al.*, “Tumor Classification Based on Gene Expression Profiling Shows That Uveal Melanomas with and without Monosomy 3 Represent Two Distinct Entities,” *Cancer Res.*, vol. 63, no. 10, 2003.
- [161] J. Khan *et al.*, “Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks,” *Nat. Med.*, vol. 7, no. 6, pp. 673–679, 2001.
- [162] A. Karlsson *et al.*, “Gene Expression Profiling of Large Cell Lung Cancer Links Transcriptional Phenotypes to the New Histological WHO 2015 Classification,” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 12, no. 8, pp. 1257–1267, Aug. 2017.
- [163] V. Zivicova *et al.*, “Detection of Distinct Changes in Gene-expression Profiles in Specimens of Tumors and Transition Zones of Tenascin-positive/-negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma,” *Anticancer Res.*, vol. 38, no. 3, pp. 1279–1290, Mar. 2018.
- [164] J. W. Sistrunk *et al.*, “Clinical performance of multiplatform mutation panel and microRNA risk classifier in indeterminate thyroid nodules,” *J. Am. Soc. Cytopathol.*, vol. 9, no. 4, pp. 232–241, Jul. 2020.
- [165] X. Pivot *et al.*, “In the Era of Genomics, Should Tumor Size Be Reconsidered as a Criterion for Neoadjuvant Chemotherapy?,” *Oncologist*, vol. 20, no. 4, pp. 344–350, Apr. 2015.
- [166] K. Pepin, M. Del Carmen, and S. Dizon, “CA 125 and epithelial Ovarian cancer: role in Screening, diagnosis, and Surveillance,” Dec. 2014.
- [167] E. L. Moss, J. Hollingworth, and T. M. Reynolds, “The role of CA125 in clinical practice,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 58, no. 3, pp. 308–312, Mar. 2005.
- [168] R. A. Mosig *et al.*, “IGFBP-4 tumor and serum levels are increased across all stages of epithelial ovarian cancer,” *J. Ovarian Res.*, vol. 5, no. 1, p. 3, Jan. 2012.
- [169] A. Nassri, H. Zhu, M. Muftah, and Z. Ramzan, “Epidemiology and Survival of Esophageal Cancer Patients in an American Cohort,” *Cureus*, vol. 10, no. 4, Apr. 2018.
- [170] Y. Yang *et al.*, “Clinical use of tumor biomarkers in prediction for prognosis and chemotherapeutic effect in esophageal squamous cell carcinoma,” *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, p. 526, May 2019.
- [171] X. Zheng *et al.*, “Establishment of using serum YKL-40 and SCCA in combination for the diagnosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma,” *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, p. 490, Jul. 2014.
- [172] L. Shi, J. A. Westerhuis, J. Rosén, R. Landberg, and C. Brunius, “Variable selection and validation in multivariate modelling,” *Bioinformatics*, vol. 35, no. 6, pp. 972–980, Mar. 2019.
- [173] C. Baumgartner, M. Osl, M. Netzer, and D. Baumgartner, “Bioinformatic-driven search

for metabolic biomarkers in disease,” *Journal of Clinical Bioinformatics*, vol. 1, no. 1. BioMed Central Ltd., 20-Jan-2011.

[174] Z. M. Hira and D. F. Gillies, “A review of feature selection and feature extraction methods applied on microarray data,” *Adv. Bioinformatics*, vol. 2015, 2015.

[175] P. W. Eide, J. Bruun, R. A. Lothe, and A. Sveen, “CMScaller: an R package for consensus molecular subtyping of colorectal cancer pre-clinical models,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017.

[176] M. Tsagris and I. Tsamardinos, “Feature selection with the R package MXM,” *F1000Research*, vol. 7, 2019.

[177] S. Xing *et al.*, “Development and validation of a serum biomarker panel for the detection of esophageal squamous cell carcinoma through RNA transcriptome sequencing,” *J. Cancer*, vol. 8, no. 12, pp. 2346–2355, 2017.

[178] X. Xi *et al.*, “RNA biomarkers: Frontier of precision medicine for cancer,” *Non-coding RNA*, vol. 3, no. 1. MDPI AG, 20-Feb-2017.

[179] J. Liao *et al.*, “Small nucleolar RNA signatures as biomarkers for non-small-cell lung cancer,” *Mol. Cancer*, vol. 9, p. 198, Jul. 2010.

[180] E. Nadal *et al.*, “A Novel Serum 4-microRNA Signature for Lung Cancer Detection,” *Sci. Rep.*, vol. 5, Jul. 2015.

[181] H. Cai, Y. Yuan, Y. F. Hao, T. K. Guo, X. Wei, and Y. M. Zhang, “Plasma microRNAs serve as novel potential biomarkers for early detection of gastric cancer,” *Med. Oncol.*, vol. 30, no. 1, p. 452, Mar. 2013.

[182] Y. Toiyama, Y. Okugawa, and A. Goel, “DNA methylation and microRNA biomarkers for noninvasive detection of gastric and colorectal cancer,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 455, no. 1–2. Academic Press Inc., pp. 43–57, 05-Dec-2014.

[183] J. Busch *et al.*, “Piwi-interacting RNAs as novel prognostic markers in clear cell renal cell carcinomas,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 34, no. 1, p. 61, Jun. 2015.

[184] Y. Li *et al.*, “Piwi-interacting RNAs (piRNAs) are dysregulated in renal cell carcinoma and associated with tumor metastasis and cancer-specific survival,” *Mol. Med.*, vol. 21, pp. 381–388, Apr. 2015.

[185] F. Rizzo *et al.*, “Specific patterns of PIWI-interacting small noncoding RNA expression in dysplastic liver nodules and hepatocellular carcinoma,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 34, pp. 54650–54661, 2016.

[186] Y. Liu *et al.*, “The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer,” *Molecular Cancer*, vol. 18, no. 1. BioMed Central Ltd., pp. 1–15, 09-Aug-2019.

- [187] L. Cui *et al.*, “Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using piRNAs as markers,” *Clin. Biochem.*, vol. 44, no. 13, pp. 1050–1057, Sep. 2011.
- [188] Q. Lu, T. Yu, X. Ou, D. Cao, T. Xie, and X. Chen, “Potential lncRNA diagnostic biomarkers for early gastric cancer,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 16, no. 6, pp. 9545–9552, Dec. 2017.
- [189] P. Vychytilova-Faltejskova *et al.*, “Circulating PIWI-interacting RNAs piR-5937 and piR-28876 are promising diagnostic biomarkers of colon cancer,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 27, no. 9, pp. 1019–1028, Sep. 2018.
- [190] O. Slaby, “Non-coding RNAs as biomarkers for colorectal cancer screening and early detection,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 937, pp. 153–170, 2016.
- [191] M. Rahman, L. K. Jackson, W. E. Johnson, D. Y. Li, A. H. Bild, and S. R. Piccolo, “Alternative preprocessing of RNA-Sequencing data in The Cancer Genome Atlas leads to improved analysis results,” *Bioinformatics*, vol. 31, no. 22, pp. 3666–3672, May 2015.
- [192] J. Liu *et al.*, “An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics,” *Cell*, vol. 173, no. 2, pp. 400–416.e11, Apr. 2018.
- [193] K. J. Thompson *et al.*, “Luminal androgen receptor breast cancer subtype and investigation of the microenvironment and neoadjuvant chemotherapy response,” *NAR cancer*, vol. 4, no. 2, Jun. 2022.
- [194] M. Ghandi *et al.*, “Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia,” *Nature*, vol. 569, no. 7757, pp. 503–508, May 2019.
- [195] D. Sun *et al.*, “TISCH: a comprehensive web resource enabling interactive single-cell transcriptome visualization of tumor microenvironment,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. D1, pp. D1420–D1430, Jan. 2021.
- [196] S. Z. Wu *et al.*, “A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers,” *Nat. Genet.*, vol. 53, no. 9, pp. 1334–1347, Sep. 2021.
- [197] J. Qian *et al.*, “A pan-cancer blueprint of the heterogeneous tumor microenvironment revealed by single-cell profiling,” *Cell Res.*, vol. 30, no. 9, pp. 745–762, Sep. 2020.
- [198] B. Pal *et al.*, “A single-cell RNA expression atlas of normal, preneoplastic and tumorigenic states in the human breast,” *EMBO J.*, vol. 40, no. 11, Jun. 2021.
- [199] A. Frankish *et al.*, “GENCODE 2021,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. D1, pp. D916–D923, Jan. 2021.
- [200] Y. Zhang, G. Parmigiani, and W. E. Johnson, “ComBat-seq: batch effect adjustment for RNA-seq count data,” *NAR genomics Bioinforma.*, vol. 2, no. 3, Sep. 2020.
- [201] Y. Chen, A. T. L. Lun, and G. K. Smyth, “From reads to genes to pathways: Differential

expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline,” *F1000Research*, vol. 5, 2016.

[202] F. Rohart, B. Gautier, A. Singh, and K. A. Lê Cao, “mixOmics: An R package for ’omics feature selection and multiple data integration,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 13, no. 11, Nov. 2017.

[203] P. W. Eide, J. Bruun, R. A. Lothe, and A. Sveen, “CMScaller: An R package for consensus molecular subtyping of colorectal cancer pre-clinical models,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017.

[204] Y. Hoshida, “Nearest template prediction: a single-sample-based flexible class prediction with confidence assessment,” *PLoS One*, vol. 5, no. 11, 2010.

[205] Q. Q. Zhu, C. Ma, Q. Wang, Y. Song, and T. Lv, “The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers,” *Tumour Biol.*, vol. 37, no. 1, pp. 185–197, Jan. 2016.

[206] L. Gao, Y. Yang, S. Song, H. Hong, X. Zhao, and D. Li, “The association between genetic variant of MDR1 gene and breast cancer risk factors in Chinese women,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 17, no. 1, pp. 88–91, Sep. 2013.

[207] A. Kort, S. Durmus, R. W. Sparidans, E. Wagenaar, J. H. Beijnen, and A. H. Schinkel, “Brain and testis accumulation of regorafenib is restricted by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) and P-glycoprotein (P-GP/ABCB1),” *Pharm. Res.*, vol. 32, no. 7, pp. 2205–2216, Jul. 2015.

[208] T. Krech, E. Scheuerer, R. Geffers, H. Kreipe, U. Lehmann, and M. Christgen, “ABCB1/MDR1 contributes to the anticancer drug-resistant phenotype of IPH-926 human lobular breast cancer cells,” *Cancer Lett.*, vol. 315, no. 2, pp. 153–160, Feb. 2012.

[209] M. F. Ziauddin, D. Hua, and S. C. Tang, “Emerging strategies to overcome resistance to endocrine therapy for breast cancer,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 33, no. 2–3, pp. 791–807, 2014.

[210] O. Kovalchuk *et al.*, “Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 7, no. 7, pp. 2152–2159, 2008.

[211] Y. J. He *et al.*, “miR-342 is associated with estrogen receptor- α expression and response to tamoxifen in breast cancer,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 5, no. 3, pp. 813–818, Mar. 2013.

[212] P. Muluhngwi and C. M. Klinge, “Roles for miRNAs in endocrine resistance in breast cancer,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 22, no. 5, pp. R279–R300, Oct. 2015.

[213] J. Cao, M. Zhang, B. Wang, L. Zhang, M. Fang, and F. Zhou, “Chemoresistance and Metastasis in Breast Cancer Molecular Mechanisms and Novel Clinical Strategies,” *Front. Oncol.*, vol. 11, no. July, pp. 1–11, 2021.

- [214] X. Ji, Y. Lu, H. Tian, X. Meng, M. Wei, and W. C. Cho, “Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 114, Jun. 2019.
- [215] F. Chen *et al.*, “RNA-seq analysis identified hormone-related genes associated with prognosis of triple negative breast cancer,” *J. Biomed. Res.*, vol. 34, no. 2, pp. 129–138, 2020.
- [216] C. A. Barrón-Gallardo *et al.*, “Transcriptomic Analysis of Breast Cancer Patients Sensitive and Resistant to Chemotherapy: Looking for Overall Survival and Drug Resistance Biomarkers,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 21, pp. 1–14, 2022.
- [217] Y. Xia *et al.*, “Integrated DNA and RNA Sequencing Reveals Drivers of Endocrine Resistance in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 28, no. 16, pp. 3618–3629, 2022.
- [218] R. Mano *et al.*, “Induction of potassium channel regulator KCNE4 in a submandibular lymph node metastasis model,” *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, Dec. 2022.
- [219] Z. H. Wu, C. Li, Y. J. Zhang, and W. Zhou, “Identification of a Cancer Stem Cells Signature of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma,” *Front. Genet.*, vol. 13, May 2022.
- [220] Y. Xu, D. Wang, and G. Zhao, “Potassium voltage-gated channel subfamily E member 4 facilitates the malignant progression of colon cancer by enhancing EGF containing fibulin extracellular matrix protein 2 expression,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 26, no. 2, p. 392, Jul. 2023.
- [221] D. Khaitan *et al.*, “Role of KCNMA1 gene in breast cancer invasion and metastasis to brain,” *BMC Cancer*, vol. 9, p. 258, Jul. 2009.
- [222] M. Oeggerli *et al.*, “Role of KCNMA1 in Breast Cancer,” *PLoS One*, vol. 7, no. 8, pp. 14–2010, Aug. 2012.
- [223] J. H. Ko, E. A. Ko, W. Gu, I. Lim, H. Bang, and T. Zhou, “Expression profiling of ion channel genes predicts clinical outcome in breast cancer,” *Mol. Cancer*, vol. 12, no. 1, p. 106, Sep. 2013.
- [224] E. Lastraioli, “Focus on Triple-Negative Breast Cancer: Potassium Channel Expression and Clinical Correlates,” *Front. Pharmacol.*, vol. 11, May 2020.
- [225] M. Brevet, N. Haren, H. Sevestre, P. Merviel, and H. Ouadid-Ahidouch, “DNA methylation of K(v)1.3 potassium channel gene promoter is associated with poorly differentiated breast adenocarcinoma,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 24, no. 1–2, pp. 25–32, 2009.
- [226] S. H. Jang, K. S. Kang, P. D. Ryu, and S. Y. Lee, “Kv1.3 voltage-gated K(+) channel subunit as a potential diagnostic marker and therapeutic target for breast cancer,” *BMB Rep.*, vol. 42, no. 8, pp. 535–539, 2009.
- [227] W. Muriithi *et al.*, “ABC transporters and the hallmarks of cancer: roles in cancer

aggressiveness beyond multidrug resistance,” *Cancer Biol. Med.*, vol. 17, no. 2, pp. 253–269, May 2020.

[228] S. Schimanski *et al.*, “Expression of the lipid transporters ABCA3 and ABCA1 is diminished in human breast cancer tissue,” *Horm. Metab. Res.*, vol. 42, no. 2, pp. 102–109, 2010.

[229] T. R. Overbeck *et al.*, “Intracellular ATP-binding cassette transporter A3 is expressed in lung cancer cells and modulates susceptibility to cisplatin and paclitaxel,” *Oncology*, vol. 84, no. 6, pp. 362–370, Jun. 2013.

[230] S. Bartholomae *et al.*, “Coexpression of Multiple ABC-Transporters is Strongly Associated with Treatment Response in Childhood Acute Myeloid Leukemia,” *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 63, no. 2, pp. 242–247, Feb. 2016.

[231] A. Yamada *et al.*, “High expression of ATP-binding cassette transporter ABCC11 in breast tumors is associated with aggressive subtypes and low disease-free survival,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 137, no. 3, p. 773, Feb. 2013.

[232] L. Xu, Z. Zhao, K. Wang, H. Zhou, and C. Xing, “Expression of aldehyde dehydrogenase 1 and ATP-binding cassette superfamily G member 2 is enhanced in primary foci and metastatic lymph node from patients with triple-negative breast cancer,” *Biomed. Res.*, vol. 28, no. 11.

[233] M. Nedeljković and A. Damjanović, “Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge,” *Cells*, vol. 8, no. 9, Sep. 2019.

[234] T. M. Sissung, C. E. Baum, C. T. Kirkland, R. Gao, E. R. Gardner, and W. D. Figg, “Pharmacogenetics of Membrane Transporters: An Update on Current Approaches,” *Mol. Biotechnol.*, vol. 44, no. 2, p. 152, Feb. 2010.

[235] T. Jankovic-Karasoulos *et al.*, “Elevated levels of tumour apolipoprotein D independently predict poor outcome in breast cancer patients,” *Histopathology*, vol. 76, no. 7, pp. 976–987, Jun. 2020.

[236] H. Søyland *et al.*, “Co-expression of estrogen receptor alpha and Apolipoprotein D in node positive operable breast cancer--possible relevance for survival and effects of adjuvant tamoxifen in postmenopausal patients,” *Acta Oncol.*, vol. 48, no. 4, pp. 514–521, 2009.

[237] I. Díez-Itza *et al.*, “Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer,” *Am. J. Pathol.*, vol. 144, no. 2, p. 310, Feb. 1994.

[238] J. W. Chen and J. Dhahbi, “Lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma cancer classification, biomarker identification, and gene expression analysis using overlapping

- feature selection methods,” *Sci. Reports 2021 111*, vol. 11, no. 1, pp. 1–15, Jun. 2021.
- [239] K. Liu *et al.*, “ARHGEF38 as a novel biomarker to predict aggressive prostate cancer,” *Genes Dis.*, vol. 7, no. 2, pp. 217–224, Jun. 2019.
- [240] Z. Sun *et al.*, “Identification of ARHGEF38, NETO2, GOLM1, and SAPCD2 Associated With Prostate Cancer Progression by Bioinformatic Analysis and Experimental Validation,” *Front. cell Dev. Biol.*, vol. 9, Sep. 2021.
- [241] K. L. Blanke, J. C. Sacco, R. C. Millikan, A. F. Olshan, J. Luo, and L. A. Trepanier, “Polymorphisms in the carcinogen detoxification genes CYB5A and CYB5R3 and breast cancer risk in African American women,” *Cancer Causes Control*, vol. 25, no. 11, pp. 1513–1521, Oct. 2014.
- [242] X. Y. Tong, X. Z. Yang, S. Q. Gao, X. J. Wang, G. B. Wen, and Y. W. Lin, “Regulating Effect of Cytochrome b5 Overexpression on Human Breast Cancer Cells,” *Molecules*, vol. 27, no. 14, Jul. 2022.
- [243] H. Guo *et al.*, “Cytochrome B5 type A alleviates HCC metastasis via regulating STOML2 related autophagy and promoting sensitivity to ruxolitinib,” *Cell Death Dis.*, vol. 13, no. 7, Jul. 2022.
- [244] P. Oettgen *et al.*, “PDEF, a novel prostate epithelium-specific ets transcription factor, interacts with the androgen receptor and activates prostate-specific antigen gene expression,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 2, pp. 1216–1225, Jan. 2000.
- [245] G. Buchwalter *et al.*, “PDEF Promotes Luminal Differentiation and Acts as a Survival Factor for ER-Positive Breast Cancer Cells,” *Cancer Cell*, vol. 23, no. 6, p. 753, Jun. 2013.
- [246] A. K. Sood *et al.*, “Expression characteristics of PDEF support a role in breast and prostate cancer progression,” *Hum. Pathol.*, vol. 38, no. 11, p. 1628, Nov. 2007.
- [247] A. K. Sood, J. Wang, P. Mhawech-Fauceglia, B. Jana, P. Liang, and J. Geradts, “Sam-pointed domain containing Ets transcription factor in luminal breast cancer pathogenesis,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 18, no. 6, pp. 1899–1903, Jun. 2009.
- [248] D. P. Turner, O. Moussa, M. Sauane, P. B. Fisher, and D. K. Watson, “Prostate-derived ETS factor is a mediator of metastatic potential through the inhibition of migration and invasion in breast cancer,” *Cancer Res.*, vol. 67, no. 4, pp. 1618–1625, Feb. 2007.
- [249] Z. Z. Liu, X. D. Xie, S. X. Qu, Z. D. Zheng, and Y. K. Wang, “Small breast epithelial mucin (SBEM) has the potential to be a marker for predicting hematogenous micrometastasis and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer,” *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 27, no. 4, pp. 251–259, Apr. 2010.
- [250] S. J. Conley, E. E. Bosco, D. A. Tice, R. E. Hollingsworth, R. Herbst, and Z. Xiao,

- “HER2 drives Mucin-like 1 to control proliferation in breast cancer cells,” *Oncogene* 2016 3532, vol. 35, no. 32, pp. 4225–4234, Jan. 2016.
- [251] M. Valladares-Ayerbes *et al.*, “Diagnostic accuracy of small breast epithelial mucin mRNA as a marker for bone marrow micrometastasis in breast cancer: a pilot study,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 135, no. 9, pp. 1185–1195, Sep. 2009.
- [252] S. H. Purcell, J. D. Cantlon, C. D. Wright, L. E. Henkes, G. E. Seidel, and R. V. Anthony, “The involvement of proline-rich 15 in early conceptus development in sheep,” *Biol. Reprod.*, vol. 81, no. 6, pp. 1112–1121, 2009.
- [253] K. C. Gates, L. N. Goetzmann, J. D. Cantlon, K. M. Jeckel, and R. V. Anthony, “Effect of proline rich 15-deficiency on trophoblast viability and survival,” *PLoS One*, vol. 12, no. 4, Apr. 2017.
- [254] T. Kiba, Y. Kintaka, Y. Suzuki, N. Ishizuka, Y. Ishigaki, and S. Inoue, “Gene expression profiling in rat pancreas after ventromedial hypothalamic lesioning,” *Pancreas*, vol. 39, no. 5, pp. 627–632, 2010.
- [255] D. Meunier *et al.*, “Expression analysis of proline rich 15 (Prr15) in mouse and human gastrointestinal tumors,” *Mol. Carcinog.*, vol. 50, no. 1, pp. 8–15, Jan. 2011.
- [256] L. Wang, X. Deng, Y. Chen, Y. Zhao, and Z. Li, “PRR15 Is a Novel Diagnostic and Prognostic Biomarker in Papillary Thyroid Cancer and Modulates the Tumor Microenvironment,” *J. Oncol.*, vol. 2022, 2022.
- [257] X. Yin *et al.*, “Identification of key modules and genes associated with breast cancer prognosis using WGCNA and ceRNA network analysis,” *Aging (Albany. NY)*, vol. 13, no. 2, pp. 2519–2538, Jan. 2020.
- [258] Q. Wang, X. Yu, N. Yang, L. Xu, and Y. Zhou, “LncRNA AC007255.1, an immune-related prognostic enhancer RNA in esophageal cancer,” *PeerJ*, vol. 9, Jul. 2021.
- [259] F. Guo *et al.*, “PRR15 deficiency facilitates malignant progression by mediating PI3K/Akt signaling and predicts clinical prognosis in triple-negative rather than non-triple-negative breast cancer,” *Cell Death Dis.* 2023 144, vol. 14, no. 4, pp. 1–14, Apr. 2023.

17. WYKAZ TABEL, RYSUNKÓW I SCHEMATÓW

17.1. Wykaz tabel

Numer strony	Numer tabeli, nazwa tabeli
16	1. Mechanizmy aktywacji protoonkogenów na przykładzie różnych nowotworów.
26-27	2. Klasyfikacja raka piersi na podstawie konsensusu eksperckiego St. Gallen
33-34	3. Zestawienie przykładowych paneli prognostycznych raka piersi.
42-43	4. Najczęściej stosowane metody laboratoryjne w diagnostyce onkologicznej
51-52	5. Zestawienie danych pacjentek w grupie badanej z uwzględnieniem stopnia zaawansowania nowotworu TNM przed i po terapii neoadjuwantowej. PD – <i>progressive disease</i> – progresja choroby. PR – <i>partial response</i> – częściowa odpowiedź. pCR – <i>pathological complete response</i> – całkowita odpowiedź patologiczna.
58-59	6. Podsumowanie grupy badanej według odpowiedzi na leczenie.

17.2. Wykaz rysunków i schematów

Numer strony	Numer i nazwa rysunku / schematu
37	Rysunek 1. Wzrost liczby publikacji z zakresu badania transkryptomu w komórkach nowotworowych w latach 1982 - 2023 w bazie PubMed (źródło:

	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov z dnia 01.09.2023)
60	Rysunek 2. Analiza głównych składowych (PCA) przeprowadzona na profilach ekspresji genów użyciu danych z próbek FF (TCGA) lub FFPE (badanie własne). (A) Przed korekcją partii zidentyfikowano dwa różne skupiska w analizie PCA. (B) Po korekcji partii próbki FF i FFPE utworzyły jedno skupisko.
62	Rysunek 3. Wykres „volcano plot” ilustrujący różnice w ekspresji analizowanych genów pomiędzy pacjentkami RR a pacjentkami pCR. Geny o znacznie zmienionej ekspresji ($\text{abs. logFC} \geq 1,2$, $\text{FDR} \leq 0,05$) oznaczono niebieskimi kropkami (obniżona ekspresja) oraz czerwonymi kropkami (podwyższona ekspresja).
63-66	Rysunek 4A. Geny związane z wrażliwością na cyklofosfamid o zaburzonym wzorcu ekspresji pomiędzy pacjentkami RR, a pacjentkami pCR. Rysunek 4B. Geny związane z wrażliwością na docetaksel o zaburzonym wzorcu ekspresji pomiędzy pacjentkami RR, a pacjentkami pCR. Rysunek 4C. Geny związane z wrażliwością na doksorubicynę o zaburzonym wzorcu ekspresji pomiędzy pacjentkami RR, a pacjentkami pCR. Rysunek 4D. Geny związane z wrażliwością na paklitaksel o zaburzonym wzorcu ekspresji pomiędzy

	pacjentkami RR, a pacjentkami pCR.
56	Schemat 1. Przebieg RNA-Seq wg protokołu KAPA HyperPrep Kit (KAPA Biosystems).