

Správa o výsledkoch riešenia projektu

Analýza *DPYD* a *TYMS* génových polymorfizmov na predikciu toxicity k 5-FU.

Zameranie projektu bolo orientované na problém neželanej (niekedy až letálnej) toxicity k chemoterapii na báze 5-fluorouracilu (5-FU). Táto látka sa veľmi často používa najmä pri liečbe kolorektálneho karcinómu, ale aj pri liečbe iných nádorov. Toxická reakcia na 5-FU môže byť asociovaná s niektorými polymorfizmami v génoch *DPYD* a *TYMS*. Proteínové produkty týchto génov sa podieľajú na metabolizme 5-FU.

Ciele projektu boli špecifikované nasledovne:

1. etablovať a validovať vlastnú nízko-nákladovú a rýchlu metodiku na analýzu génových polymorfizmov v *DPYD* a *TYMS* génoch
2. analyzovať retrospektívne frekvenciu výskytu *DPYD* a *TYMS* génových polymorfizmov u pacientov, ktorí vykazovali nadpriemernú toxicitu po liečbe na báze 5-FU
3. zaviesť algoritmus prospektívneho testovania *DPYD* a *TYMS* polymorfizmov u pacientov pred zahájením liečby na báze 5-FU

Realizácia cieľov bola podľa schváleného projektu rozvrhnutá do niekoľkých etáp:

05-09/2012: vývoj vlastnej metodiky, štandardizácia a validácia (vid'. cieľ 1)

10-12/2012: retrospektívna štúdia (vid'. cieľ 2)

01-03/2013: zavádzanie algoritmu prospektívneho testovania (vid'. cieľ 3)

04-05/2013: vyhodnotenie, seminár, popularizácia, písanie publikácie

Stav čerpania poskytnutých finančných prostriedkov: Z poskytnutých finančných prostriedkov (10 000 Eur) boli zakúpené komponenty potrebné na PCR reakcie (PCR primery, KAPA 2G Robust HS Ready mix), SNaPshot analýzy (HPLC purifikované oligonukleotidy, SNaPshot Multiplex Kit, 120-LIZ štandard) a sekvenačné kity na báze BigDye Terminátorov potrebné na validáciu metodiky. Príslušné faktúry sú priložené.

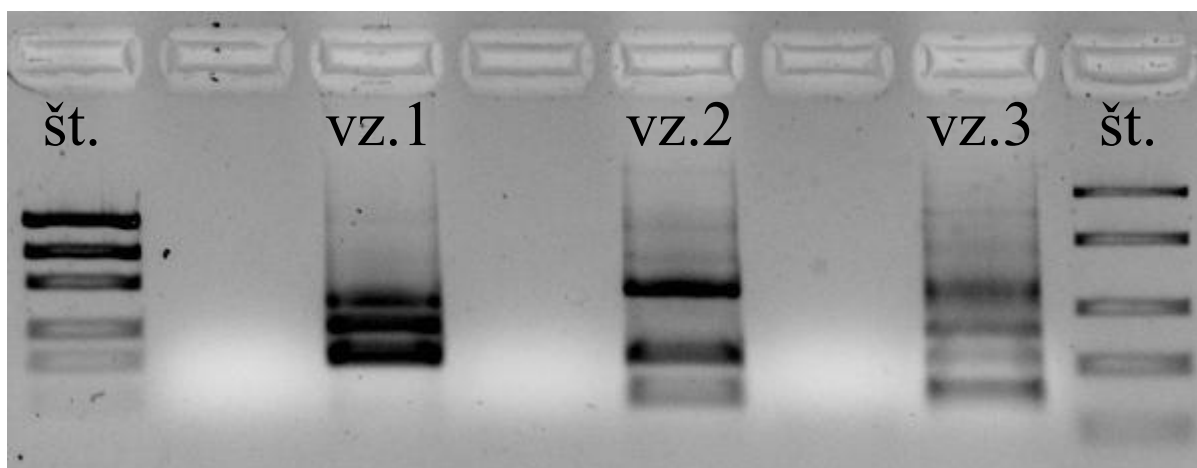
Výsledky riešenia projektu: Doteraz dosiahnuté výsledky predstavujú najmä etablovanie metodiky analýzy piatich polymorfizmov v géne *DPYD* a delečného polymorfizmu 6bp_del 1494 v géne *TYMS*. Pri výbere polymorfizmov sme postupovali podľa najnovšej literatúry a podľa niektorých zahraničných komerčných súprav. Vybrané polymorfizmy v géne *DPYD* a ich efekt sú uvedené v Tabuľke 1. Navrhli sme úseky génov a príslušné primery na ich PCR amplifikáciu. Optimalizovali sme multiplexnú PCR za účelom redukcie časovej a finančnej náročnosti metodiky. Dosiahli sme amplifikáciu všetkých fragmentov v sextaplexe (Obrázok 1). Ďalej sme navrhli extenzné primery na SNaPshot analýzu. SNaPshot primery sme postupne testovali v uniplexoch a multiplexoch pri rôznych koncentráciách, kým sme dosiahli optimálnu výšku píkov pre jednotlivé polymorfizmy.

VARIANT	BEŽNÝ NÁZOV	FENOTYP	EFEKT NA AK
IVS14+1 G>A	*2	Neaktívny enzým	Intrón 14 (alternatívny zostrih)
c. 85 T>C	*9A	Znížená aktivita	p. Cys 29 Arg
c. 1679 T>G	*13	Znížená aktivita	p. Ile 560 Ser
c. -1590 T>C	-	Znížená aktivita	-
c. 2846 A>T	-	Znížená aktivita	p. Asp 949Val

V októbri 2012 sme začali analyzovať retrospektívne prvé klinické vzorky. Doposiaľ sme analyzovali 12 vzoriek od rôznych jedincov. Vo viacerých vzorkách sme zistili výskyt génových polymorfizmov. Tieto aktuálne overujeme metódou priameho genomického sekvenovania. Názorné príklady etablovanej SNaPshot analýzy daných polymorfizmov sú na Obrázku 2.

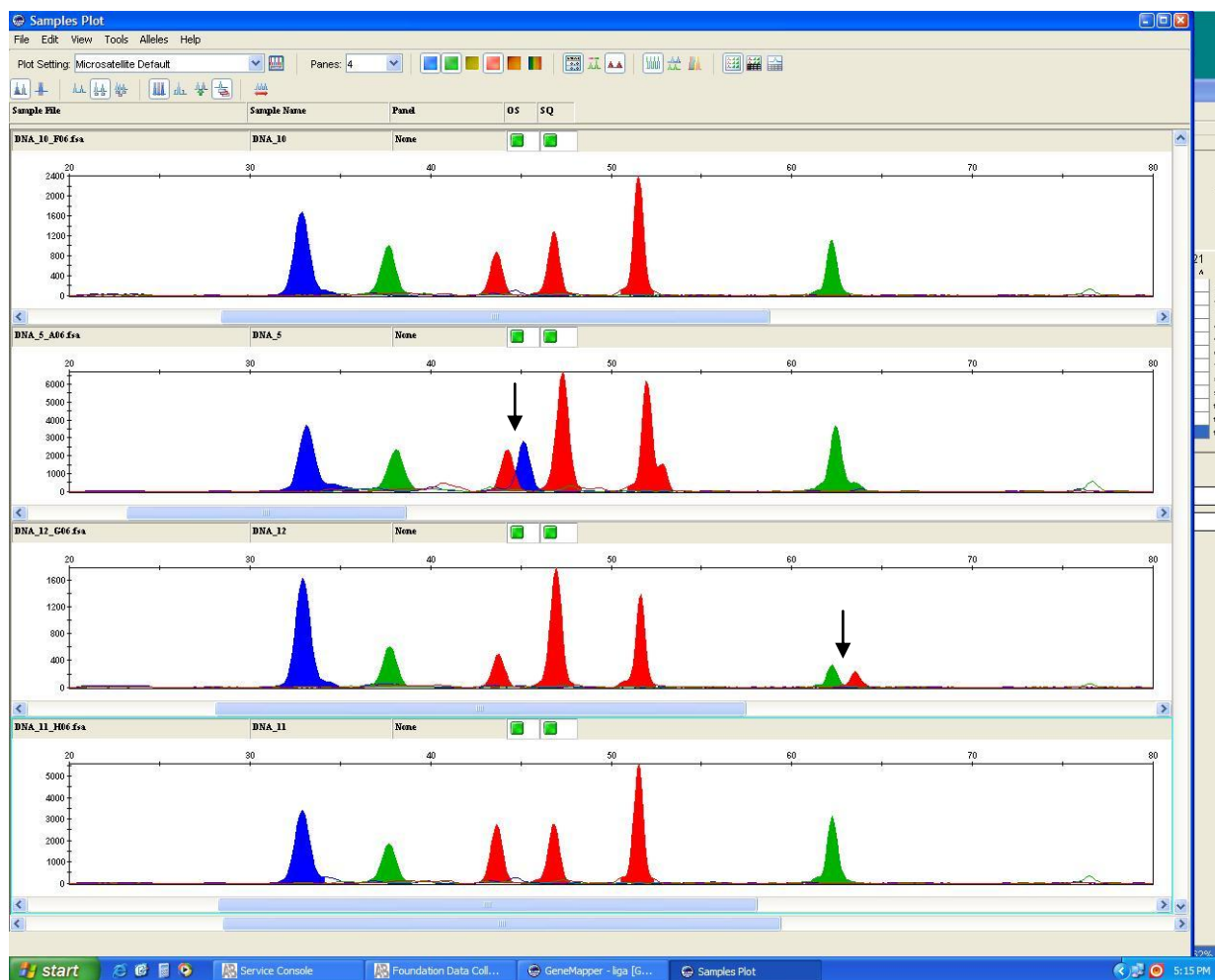
Zvyšné ciele plánujeme zrealizovať podľa harmonogramu, ktorý sme uviedli v návrhu projektu (Poznámka: napriek snahe nebolo možné riešenie projektu nijako urýchliť, najmä kvôli sťahovaniu oddelenia do nových priestorov)

Obrázok 1: optimalizácia multiplexnej PCR -*DPYD* a *TYMS* génových fragmentov



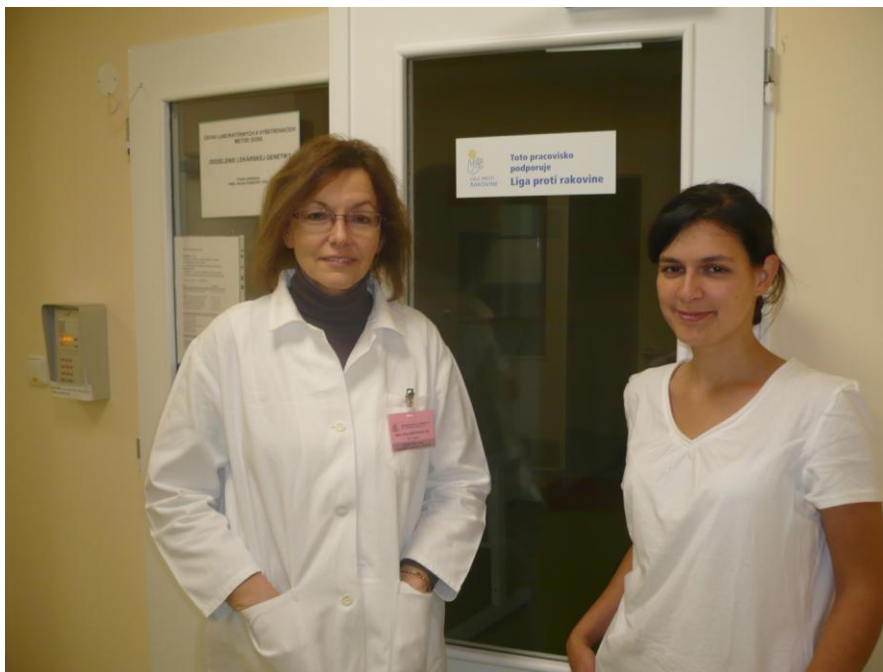
št. = PCR štandard, vz.1= triplex prvej trojice génových fragmentov, vz.2 = triplex druhej trojice génových fragmentov, vz.3 = sextaplex všetkých šiestich génových fragmentov

Obrázok 2: príklady SNaPshot analýzy *DPYD* a *TYMS* polymorfizmov



Jednotlivé píky predstavujú polymorfné nukleotidy v géne *DPYD* na nukleotidových pozíciach IVS14+1, c.1679, c.2846, c.85, c.-1590 a v géne *TYMS* na c.1494. Na druhom a treťom paneli sú dvojpíky, ktoré signalizujú prítomnosť polymorfizmu (označené šípkou).

Medializácia projektu: Obdržaná nálepka Ligy proti rakovine je umiestnená na vstupných dverách na Oddelenie lekárskej genetiky v nových priestoroch v budove na Kolárskej ulici (obrázok 3). Seminár, popularizáciu a písanie publikácie z výsledkov projektu sme plánovali na apríl/máj 2013 po dovŕšení všetkých etáp riešenia (viď. časový harmonogram projektu). Doposiaľ bola o realizácii projektu publikovaná predbežná informácia v článku s názvom: „Nový test predikcie toxicity“ v časopise Naša Nemocnica č. 3/2012 (originál článku je priložený k správe). Časopis je prístupný aj na internetovom portáli OÚSA (<http://www.ousa.eu/sk/o-nas/casopis-nasa-nemocnica>). Obdobný článok bol podaný ako tlačová správa a je k dispozícii médiám. Seminár na Onkologickom ústave sv. Alžbety s názvom „Informácia o projekte financovanom Ligou proti rakovine: Analýza *DPYD* a *TYMS* génových polymorfizmov na predikciu toxicity k 5-FU.“ sa uskutoční 14. januára 2013. Odborný článok bude publikovaný po získaní väčšieho súboru analyzovaných vzoriek a vyhodnotení všetkých výsledkov. Po zavedení algoritmu prospektívneho testovania *DPYD* a *TYMS* polymorfizmov u pacientov indikovaných na liečbu 5-Fluorouracilom bude spustená diagnostika, ktorej bude predchádzať intenzívna propagácia testu. Jej súčasťou bude informácia, že vďaka Lige proti rakovine budú prvé genetické testy na toxicitu k 5-FU bezplatné.



Obrázok 3 : RNDr. Zdena Bartošová, CSc. a Bc. Oľga Tichá, ktoré pracujú na projekte zavedenia analýzy *DPYD* a *TYMS* génových polymorfizmov na predikciu toxicity k 5-FU pred vchodom na Oddelenie lekárskej genetiky OÚSA.

O ďalšej medializácii budeme priebežne informovať. Obsah tejto správy je umiestnený na webovej stránke Onkologického ústavu sv. Alžbety www.ousa.sk s titulkom: Vďaka Lige proti rakovine budú prvé genetické testy na toxicitu k 5-FU bezplatné.

Na záver si dovoľujeme poďakovať za finančné prostriedky pridelené na projekt.

Správu vypracovala RNDr. Zdena Bartošová, CSc.

V Bratislave 30.10.2012

RNDr. Zdena Bartošová, CSc.
zodp. riešiteľka projektu