Proteomic Analysis in Breast Screening Study

Thesis

Submitted For Partial Fulfillment for the Requirement of
M.D. Degree in Basic Sciences (Medical Biochemistry)

By

Marwa Matboly Sayed Abd El-Mogny
Assistant Lecturer of biochemistry
(***M.B., B. Ch. & M. Sc. Medical Biochemistry***)
Faculty of Medicine –Ain Shams University

Supervised By

Prof. Dr. Sanaa Eissa Mohamed
Prof. of Medical Biochemistry and Molecular Biology
Faculty of Medicine
Ain Shams University.

Prof. Dr. Hebat Allah Said Ali
Prof. of Medical Biochemistry and Molecular Biology
Faculty of Medicine
Ain Shams University.

Prof. Dr. Hassan Mohamed Elazzazy
Prof. of Chemistry
Faculty of Science and Engineering
American University in Cairo.

***Prof. Dr.* Fatin Abd El Monem Anous**
Prof. of General Surgery
Faculty of Medicine
Ain Shams University.

Medical Biochemistry Department
Ain Shams University
Faculty of Medicine
2012

بسم الله الرحمن الرحيم

"وقـــــل رب زدنـــي عـــــــلماً"

صدق الله العظيم
سورة طه
الآية 114

Acknowledgement

First of all, my utmost gratitude is to ***Allah,*** *The creator of all, for helping me to complete this work, thanks* ***GOD****.*

For ***Prof. Dr. Sanaa Eissa Mohamed,*** *Professor of medical Biochemistry and molecular biology, Faculty of Medicine; Ain shams University, words are not enough to thank her for here meticulous supervision, continuous guidance, and constructive criticism. I appreciate here patience and objectivity in tolerating the revision of this study. There is no aspect of this work in which she was not involved by her own rule "nothing accepted except excellence".*

My deepest gratitude for ***Prof. Dr. Hebat Allah Said Ali,*** *Professor of medical Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Ain Shams University for her kind supervision, her effort and generous ideas ,words cannot express my thanks to her.*

I am too grateful to ***Prof. Dr.Hassan Elazzazy,*** *Prof. of Chemistry, Faculty of Science and Engineering , American University College. for his generous help ,sincere advice and his kind help in the practical work.*

I am too grateful to ***Prof. Dr. Fatin Abd El Monem Anous,*** *Prof. of General Surgery ,Faculty of Medicine, Ain Shams University for his generous help and unlimited support in collection of samples.*

I am too grateful to ***Dr .Sherif Shawky*** *Doctoral fellow, Science and Technology Research Center ,American University College. for his generous help ,sincere advice and his kind help in the practical work*

Finally my deepest thank for my parents and my husband and daughter and son for their tolerance of my absence, physically and emotionally, many, many thanks.

Marwa Matboly Sayed Abd El-Mogny

DEDICATION

To My Dear Parents

For their pray to Allah for me

To My Husband , My Daughter and My Son

For their endurance and loving

To My Sister and My Brothers

For their love and support

Marwa Matboly Sayed Abd El-Mogny

Approval Sheet

TITEL OF THESIS: Proteomic Analysis in Breast Screening Study
NAME OF STUDENT: Marwa Matboly Sayed Abd El-Mogny

DEGREE: Master Degree in Basic Science (Medical Biochemistry)

THIS THESIS HAS BEEN SUPERVISED BY:

Prof. Dr. Sanaa Eissa Mohamed ----------

Prof. Dr. Hebat Allah Said Ali ----------

Prof. Dr. Fatin Abd El Monem Anous ----------

Prof. Dr.Hassan Elazzazy ----------

EXAMINATION COMMEITTTEE:

Prof. Dr. Sanaa Eissa Mohamed ----------

Prof. Dr. Hebat Allah Said Ali ----------

Prof. Dr. Hala Hany Mohamed El Said ---------

Ass .Prof. Dr. Mohamed El Shinawy ----------

DECLA RA TION

This thesis has not been submitted for a degree at

this University or any other University

Marwa Matboly Sayed Abd El-Mogny

SUMMARY

Proteomic Analysis in Breast Cancer screening Study

This study was done at Medical Biochemistry Department, Ain Shams Faculty of Medicine , BIOMIC Center , Sant George University ,London and Chemistry Department American University ,Cairo during the period from December **2009 – June 2012** and included 75 patients and 15 normal volunteers.

The aim of this study was to validate and evaluate the efficacy of histidine rich glycoprotein (HRG) as potential selected diagnostic marker in breast biopsies and serum and to compare three methods for its detection(RT PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction and a nanoparticle based molecular detection for ***HRG*** mRNA based on the unmodified gold nanoparticles) for (HRG) mRNA expression in the breast biopsies and ELISA technique to measure serum level of HRG protein) .

.

The studied individuals were classified into three main groups:

- **Group I:** including 60 breast cancer patients
- **Group II:** including 15 benign breast lesion patients .
- **Group III:** including 15 healthy volunteers was coming for breast reduction surgery.

All patients in our study were subjected to complete detailed history taking, general and local examination, routine laboratory investigations, radio diagnostic investigations as chest X ray, and CT

scan. Also all patients were subjected to detection of ER,PR Her-2 neu screening by immunohistochemistry in breast tissue biopsies, HRG protein was identified in serum by MALDI/TOF MS , then was validated by RNA extraction of in breast tissue biopsies and RT PCR ,RT-PCR for beta actin as house keeping genes in all samples , nanoassay using unmodified approach for HRG RNA and ELISA technique to measure serum level of HRG protein. Patients were examined and the tumor was resected and sent for pathological staging and grading of the tumor according to (TNM) classification. Then the results were calculated and statistically analyzed by the SPSS software.

Patients who had history of another malignancy (kidney-ureter-urethra), had inflammatory mastitis ,received chemotherapy or radiotherapy were excluded from this study. The results of the study showed the following:

Group I:

- **A nanoparticle** based molecular detection for HRG mRNA based on the unmodified gold nanoparticles: the percentage of patients who were HRG positive in this group was 90%.
- **RT PCR*:*** the percentage of patients who were HRG positive in this group was 71.7%.
- **ELISA** technique to measure serum level of HRG protein***:*** the percentage of patients who were HRG positive in this group was 86.7%.

Group II: (Benign)

- **A nanoparticle** based molecular detection for HRG mRNA based on the unmodified gold nanoparticles: the percentage of patients who were HRG positive in this group was 20%.
- **RT PCR*:*** the percentage of patients who were HRG positive in this group was 13.3%.
- **ELISA** technique to measure serum level of HRG protein***:*** the percentage of patients who were HRG positive in this group was 26.7%.

Group III (Healthy normal)

- **A nanoparticle** based molecular detection for HRG mRNA based on the unmodified gold nanoparticles: all individuals of this group were negative for HRG.
- **RT PCR*:*** all individuals of this group were negative for HRG.
- **ELISA** technique to measure serum level of HRG protein***:*** The percentage of patients who were positive HRG protein in this group was 13.3%.

In the present study serum HRG Protein was identified using WCX followed by trypsinization and MALDI -TOF/TOFMS analysis with (5.88) the average score for protein expression of a specific protein in the Cancer group.(9.86)Ave2- The average score for protein expression of a specific protein in the Cancer control group. (3.8) StdDev- standard deviation ,(p=0.001). Then it was validated by two methods, RT PCR to justify the source of HRG RNA by RT-PCR and nanoassay in breast tissue biopsies showed 71.7% and 90% sensitivity, 93.33% ,90%specificity, 95.5% ,94.7% PPV, 62.5% ,82.2% NPV and 78.89% ,91.11% accuracy.

A significant difference was observed in Positivity rate of HRG RNA in breast tissue biopsies using by RT-PCR and nanoassay in relation to malignant group i.e. (71.7%,90%) as compared with both benign breast lesion group (13.1%,20%) and healthy normal group (0%) (P= 0.01).

There was no significant difference observed in Positivity rate of HRG RNA by RT –PCR or nanoassay in breast tissue biopsies using RT PCR in relation to in relation to parity , family history, BMI, OCT ,HT, pathological type and grade except for the type (nanoassay).

.

Applying **(3.12 mg/dl),** as a cut off value which was calculated by ROC curve, the serum HRG protein by ELISA showed 86.7% sensitivity, 80% specificity, 75% PPV, 89.66% NPV and 84.44% accuracy.

A significant difference was found between mean rank of levels of HRG in malignant group i.e. (55.62mg/dl) as compared with either benign breast condition group (30.93mg/dl) or healthy normal group (19.6mg/dl) (P=0.000).

ELISA of serum HRG positivity showed significant difference in relation to family history and grade .

Breast tissue HRG RNA by nanoassay has higher sensitivity (90%) than the other two methods(71.7% and 86.7%) with slight decrease in the specificity(90%) compared to the RT-PCR (93.3%) . These indices suggest that serum HRG could serve as a non invasive marker for breast cancer screening in high risk groups, as well as for monitoring tumor recurrence in previously treated patients.

الملخص باللغة العربية

تم عمل هذا البحث كجزء من مشروع دراسة المحتوى البروتينى لمرضى سرطان الثدى بقسم الكيميا ء الحيوية الطبية بكلية الطب– جامعة عين شمس و جامعة سانت جورج– لندن و قسم الكيمياء بكلية العلوم و الهندسة–الجامعة الامريكية بالقاهرة، وذلك في الفترة من (2009–2012م).

كان الهدف من هذا العمل البحثي هو التعرف على بروتين الهستدين ريش جليكوبروتين (جليكوبروتين الغنى بالهستيدين) بواسطة ***الثدي باستخدام التقنيات المعتمدة على جهاز قياس طيف الكتلة ثم تقييم هذا البروتين عن طريق*** مقارنة ثلاث طرق لتعيين **جين الحامض الريبوزى النووي** الهستدين ريش جليكوبروتين وكذلك **تعيين** بروتين الهستدين ريش جليكوبروتين كدلالة أورام للكشف المبكر عن أورام الثدى والكشف عن مدى حساسية وفاعلية هذه الطرق

تضمن البحث 90 حالة حيث تم تقسيمها إلى ثلاث مجموعات:

- **المجموعة الأولى:** تشمل مرضى سرطان الثدى ، وعددهم 60 مريض.
- **المجموعة الثانية:** تشمل المرضى المصابون باورام حميدة بالثدى وعددهم 15 مريض.
- **المجموعة الثالثة:** و تشمل أصحاء متطوعين وعددهم 15 شخصاً (المجموعة الضابطة).

تم تجميع عينات دم وأنسجة الثدي من جميع المشتركين في الدراسة حسب التوصيات المتبعة من لجنة اخلاقيات البحث العلمى بجامعة عين شمس *حيث تم* اجراء تحاليل المحتوى البروتينى على *عينات دم يتم* اجراء تحاليل المحتوى البروتينى على *عينات دم وأنسجة الثدي* الماخوذة من مرضى معلومى الخصائص الباثولوجية والهستولوجية , تم تقييم النتائج الخاصة بالهستيدين ريتش جليكوبروتين بثلاث طرق :

1. طريقة لقياس الحمض الريبوزى النووي رنا للهستيدين ريتش جليكوبروتين فى الانسجة بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل العكسي المتداخل (RT PCR).
2. طريقة لقياس الحمض الريبوزى النووي رنا للهستيدين ريتش جليكوبروتين فى الانسجة بطريقة المعتمدة على تقنيات النانوتكنولوجى.
2. طريقة لقياس للهستيدين ريتش جليكوبروتين فى الدم بطريقة الاليزاELISA)

- **المجموعة الأولى**:

أثبتت أي من الطرق لقياس (للهستيدين ريتش جليكوبروتين)حساسية قدرها 71.7% و 90%و86.7 % عند استخدام الطريقة الأولى والطريقة الثانية والثالثة بالترتيب .

- **المجموعة الثانية:**

كانت النتائج إيجابية في 13.3%و20% و26.7%من الحالات عند استخدام الطريقة الأولى والطريقة الثانية على التوالي .

- **المجموعة الثالثة**:

كانت النتائج سلبية في كل حالات فى الطريقة الاولى كانت النتائج إيجابية في 13.3% فى الطريقة الثالثة .

نتائج الطريقة الأولى لقياس للهستيدين ريتش جليكوبروتين:

أوضحت الدراسة وجود فرق إحصائي في النتائج الإيجابية للهستيدين ريتش جليكوبروتين المعين بهذه الطريقة بين الثلاث مجموعات. و قد أظهرت هذه الطريقة حساسية 71.7%و خصوصية 93.33% و دقة بنسبة 78.89 %و قيمة سلبية متوقعة 62.22% و قيمة إيجابية متوقعة95.56%.

كما أظهرت الدراسة عدم وجود فروق إحصائية بين النتائج الإيجابية **للهستيدين ريتش جليكوبروتين** المعين بالطريقة الأولى وجميع العوامل الإكلينيكية و الباثولوجية المختبرة .

نتائج الطريقة الثانية لقياس للهستيدين ريتش جليكوبروتين:

أوضحت الدراسة وجود فرق إحصائي في النتائج الإيجابية للهستيدين ريتش جليكوبروتين المعين بهذه الطريقة بين الثلاث مجموعات. و قد أظهرت هذه الطريقة حساسية 90%و خصوصية 90% و دقة بنسبة 91.1%و قيمة سلبية متوقعة 82.5% و قيمة إيجابية متوقعة94.7%

كما أظهرت الدراسة عدم وجود فروق إحصائية بين النتائج الإيجابية **للهستيدين ريتش جليكوبروتين** المعين بالطريقة الثانية وجميع العوامل الإكلينيكية و الباثولوجية المختبرة عدا نوع الورم.

نتائج الطريقة الثالثة لقياس الهستيدين ريتش جليكوبروتين :

أوضحت الدراسة وجود فرق إحصائي في القيمة الوسطية الإيجابية عدم بين الثلاث مجموعات و قد تم استخدام منحنى ROC لقياس القيمة الفاصلة **للهستيدين ريتش جليكوبروتين** بين المجموعة السرطانية والمجموعة غير السرطانية. و باستخدام هذه القيمة أظهرت هذه الطريقة حساسية 86.7%و خصوصية 80%و دقة 84.44%و قيمة سلبية متوقعة 89.66%و قيمة إيجابية متوقعة 75%

كما أظهرت الدراسة وجود فروق إحصائية بين النتائج الإيجابية **للهستيدين ريتش جليكوبروتين** المعين بالطريقة الثالثة وتواجد تاريخ مرضى مماثل فى العائلة وكذلك الدرجة لباثولوجية و عدم وجود فروق إحصائية مع باقى العوامل الإكلينيكية و الباثولوجية المختبرة .

العلاقة بين الطرق المستخدمة لقياس للهستيدين ريتش جليكوبروتين:

و بمقارنة نتائج **الطرق الثلاث** من حيث الحساسية تبين أن الطريقة الثانية اكثر الحساسية(90%). وقد أوضحت هذه الدراسة أن الطريقة الاولى أكثر خصوصية (93.33%) و أن الطريقة الثانية هى الأفضل من حيث القيمة الايجابية المتوقعة(94.7%%)؛ وكذلك الدقة (91.11%).

REFERENCES

Aardema MJ. and MacGregor JT. (2002). Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. Mutat Res **499**(1): 13-25.

Abeloff MD., Wolff AC. and Weber BL.(2008). Cancer of the Breast. In: Abeloff MD, Armitage JO, Lichter AS, et al, eds. Clinical Oncology. 4th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier; 1875–1943.

Abramson RD. and Myers TW. (1993). Nucleic acid amplification technologies. *Curr Opin Biotechnol*, 4:41-47.

Aebersold R. and Mann M. (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." Nature **422**(6928): 198-207.

Aggarwal K., Choe LH. and Lee KH. (2006). "Shotgun proteomics using the ITRAQ isobaric tags." Brief Funct Genomic Proteomic **5**(2): 112-20.

Ahmed N., Barker G., Oliva KT., Hoffmann P., Riley C., Reeve S., Smith AI., Kemp BE., Quinn MA., Rice GE. (2004). "Proteomic-based identification of haptoglobin-1 precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer." Br J Cancer **91**(1): 129-40.

Altekruse SF., Kosary CL. and Krapcho MG. (eds)(2010). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.

American Cancer Society (2012). Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta, Ga: American Cancer Society.

American Joint Committee on Cancer (2010). Breast. In: *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. New York: Springer; 2010: 347–369.

Anderson NL. and Anderson NG. (2002). "The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects." Mol Cell Proteomics **1**(11): 845-67.

Anderson OB. (2009). " Breast cancer hormone receptor status in Egypt: are we asking the questions that matter most? " Breast cancer research and treatment journal 10. DOI: 1007/s10549-009-0474-2.

Antoniou A. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies Am J Hum Genet; 72(5):1117-30.

Azzazy HM. and Mansour MM. (2009). In vitro diagnostic prospects of nanoparticles. *Clin Chim Acta*, 403:1-8.

Baptista P., Pereira E., Eaton P., Doria G., Miranda A., Gomes I., Quaresma P. and Franco R. (2008). Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal Bioanal Chem*, 391:943-950 .

Baptista P., Koziol-Montewka M., Paluch-Oles J., Doria G. and Franco R. (2006). Gold-nanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples. *Clin Chem*, 52:1433-1434 .

Baptista P., Doria G., Henriques D., Pereira E .and Franco R. (2005). Colorimetric detection of eukaryotic gene