

W ostatnich latach znacząco wzrosło zainteresowanie procesami epigenetycznymi. Epigenetyka odnosi się do dziedzicznych zmian w ekspresji genów, które nie są kodowane w genomowym DNA. Jednym z najlepiej scharakteryzowanych mechanizmów epigenetycznych jest metylacja cytozyny w DNA. Proces ten jest uważany za stabilną zmianę epigenetyczną, która może mieć wpływ na kontrolę ekspresji genów. Ostatnie doniesienia naukowe wskazują na istnienie aktywnej demetylacji DNA – dynamicznego procesu modyfikującego wzór metylacji poprzez hydroksylację/deaminację 5-metylocytozyny oraz eliminację powstałych produktów w procesie naprawy DNA. Reakcje prowadzące do aktywnej demetylacji DNA są kontrolowane m.in. przez enzymy TET (*ang. ten eleven translocation*) i glikozylazę TDG (*ang. thymine DNA glycosylase*). Zaburzenia w metylacji DNA są cechą charakterystyczną nowotworów, w tym raka piersi.

Rak piersi jest najczęściej diagnozowanym nowotworem i drugą najczęstszą przyczyną śmierci wśród kobiet chorujących na raka. Według Amerykańskiego Towarzystwa Onkologicznego, rocznie na całym świecie diagnozuje się prawie 1,7 miliona nowych przypadków zachorowań na raka piersi. Jest to choroba heterogenna, charakteryzująca się wieloma podtypami ze zróżnicowaną odpowiedzią na leczenie. Leczenie raka piersi zależy głównie od obecności receptorów: estrogenowego (ER), progesteronowego (PR) i ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2) w komórkach raka piersi. Selektywne modulatory receptora estrogenowego (SERM) są grupą leków stosowanych w terapii hormonozależnego raka piersi. Najpowszechniej używanym przedstawicielem SERM jest tamoksifen. Działanie tamoksifenu uwarunkowane jest typem receptora, z którym oddziałuje, jego lokalizacją w komórce oraz rozmieszczeniem w tkankach.

Głównym celem projektu jest sprawdzenie, czy narażenie linii komórkowych raka piersi na działanie estrogenów i/lub SERM może wywoływać zmiany w metylacji DNA. Dotychczas nie przeprowadzono tego typu badań. Proponowane przez nas badania pozwolą ocenić, czy istnieje zależność pomiędzy stopniem metylacji/demetylacji DNA a ekspresją receptorów hormonalnych w komórkach raka piersi, a także wpływem selektywnych modulatorów receptora estrogenowego. Wiedza ta pozwoli na lepsze zrozumienie mechanizmów działania związków antyestrogenowych i ich potencjalnego wpływu na procesy epigenetyczne, m.in. aktywną demetylację i deaminację DNA w komórkach nowotworowych gruczołu piersiowego.

W naszych doświadczeniach wykorzystamy linie komórkowe raka piersi o różnej ekspresji receptorów steroidowych (ER, PR) oraz receptora estrogenowego związanego z białkami G (GPER). Nasz projekt obejmuje cztery różne eksperymenty z wykorzystaniem hodowli komórkowych: bez suplementacji (A), z ekspozycją na β -estradiol (B), z ekspozycją SERM (C), z ekspozycją na β -estradiol i SERM (D). W DNA komórek uzyskanych z powyższych eksperymentów zamierzamy oznaczyć ilościowo 5-mC (5-metylocytozynę) oraz produkty demetylacji/deaminacji DNA: 5-hmC (5-hydroksymetylocytozynę) i 5-hmU (5-hydroksymetylouracyl). Ponadto chcielibyśmy ocenić ekspresję genów TET1, TET2, TET3 i TDG i odpowiadających im białek, które odgrywają kluczową rolę w szlakach demetylacji DNA. W celu oznaczenia ilościowego wyżej wymienionych modyfikacji DNA wykorzystamy wysoce zaawansowaną technikę badawczą: dwuwymiarową ultrasprawną chromatografię cieczową z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii mas (2D-UPLC/MS/MS) z użyciem wewnętrznych standardów znakowanych izotopowo. Do analizy poziomu ekspresji genów zaangażowanych w proces aktywnej demetylacji DNA (TET1, TET2, TET3, TDG) zostanie wykorzystana technika qRT-PCR, natomiast do oceny ilości białek metoda Western Blot.

Rezultaty z naszych badań mogą rzucić nowe światło na mechanizmy leżące u podstaw rozwoju raka piersi oraz na nowe podejście do zapobiegania i leczenia tego nowotworu. Ponadto, wyniki proponowanego projektu mogą dostarczyć informacji, które mogą znaleźć zastosowanie w nowych metodach diagnostycznych i terapeutycznych, a także w medycynie spersonalizowanej.