

Identyfikacja i ocena funkcjonalna mutacji-kandydatów powiązanych z destabilizacją genomu w nienowotworowej tkance nabłonka wydzielniczego gruczołu sutkowego od pacjentek z rakiem piersi.

Rak piersi jest pierwszą przyczyną zachorowalności na nowotwory złośliwe, zajmując również czołowe miejsce pod względem zgonów spowodowanych przez nowotwory. Kluczowymi czynnikami warunkującymi skuteczność podjętego leczenia są profilaktyka i diagnostyka, które umożliwiają wczesne wykrycie choroby. Pomimo znacznej poprawy profilaktyki w ostatnich latach, czynnikiem ograniczającym jest diagnostyka, ponieważ zdecydowana większość metod pozwala na postawienie diagnozy dopiero po wykształceniu klinicznie wykrywalnego guza. Pod tym względem unikatowe są molekularne metody diagnostyczne oparte o analizę DNA, które pozwalają na wykrycie szkodliwych zmian w sekwencji genomu człowieka, tj. mutacji. Mutacje mogą mieć bardzo ograniczony zakres (tzw. mutacje punktowe), lub obejmować znaczną część genomu (tzw. rearanżacje strukturalne) prowadząc do jego destabilizacji. Metody molekularne umożliwiają oszacowanie predyspozycji genetycznej, tj. ryzyka zachorowania wynikającego zasadniczo z czynników/mutacji dziedzicznych. Metody molekularne umożliwiają także wykrycie wczesnych zmian genetycznych, tzw. mutacji somatycznych w tkance „źródłowej” z której wywodzi się rak, zanim wystąpią jakiegokolwiek objawy kliniczne choroby. Taką tkanką „źródłową” w przypadku raka piersi jest nabłonek wydzielniczy gruczołu piersiowego, tj. tkanka w normalnych warunkach odpowiedzialna za laktację. Dlatego, w przypadku raka piersi, nabłonek wydzielniczy gruczołu piersiowego może stanowić model badawczy umożliwiający wykrycie wczesnych zmian genetycznych związanych z nowotworzeniem. Tym bardziej, że istnieją liczne przesłanki wskazujące, że proces nowotworzenia rozpoczyna się na długo przed wystąpieniem jakichkolwiek objawów klinicznych. Dodatkowo, badanie wczesnych etapów nowotworzenia może pomóc wyjaśnić znaczenie funkcjonalne i wzajemne powiązanie efektów różnych mutacji, co nie jest zadaniem trywialnym. Obecnie większość badań prowadzonych jest jednak na w pełni rozwiniętych guzach, lub wyizolowanych komórkach nowotworowych, które przeszły pełną transformację. Taki materiał wyróżnia mnogość wtórnych efektów związanych z nowotworzeniem, które dodatkowo utrudniają interpretację efektów czynników dziedzicznych i wczesnych mutacji somatycznych, które *de facto* są pierwotną przyczyną nowotworzenia.

Dlatego, nadrzędnym celem proponowanego projektu jest identyfikacja i ocena funkcjonalna mutacji w nienowotworowej tkance nabłonka wydzielniczego gruczołu sutkowego, pobranej od pacjentek z rakiem piersi. Jako że możliwości oceny wszystkich efektów mutacji wykraczają poza ramy pojedynczego badania, dlatego w proponowanym projekcie prowadzona będzie ocena powiązania mutacji punktowych z rearanżacjami strukturalnymi powodującymi destabilizację genomu.

Wybór destabilizacji genomu jako badanego efektu mutacji jest uzasadniony dużą częstością występowania tego zaburzenia molekularnego w przebiegu raka piersi, a także jego przyczynowością dla kaskady wtórnych zdarzeń i deregulacji podstawowych funkcji komórki. Badania kilku zespołów, w tym naszego wskazują, że do destabilizacji genomu może dochodzić we wczesnych etapach nowotworzenia, tj. w pozornie normalnej tkance gruczołu piersiowego. Jednocześnie, ze względu na szeroki zakres, destabilizacja genomu jest stosunkowo łatwa do wykrycia. Dlatego w pierwszym etapie badań wyselekcjonujemy próby nienowotworowej tkanki gruczołowej wykazującej destabilizację genomu. Następnie będziemy poszukiwać możliwej przyczyny genetycznej, tj. zmian w sekwencji genów odpowiedzialnych za utrzymanie integralności genomu, a jednocześnie powiązanych z genezą raka piersi. Aby uzyskać pełniejszy obraz istniejących powiązań w próbach klinicznych od pacjentów, w kolejnym etapie badań będziemy prowadzić analizę różnych poziomów funkcjonalnych komórki, tj. oprócz analizy sekwencji DNA i rearanżacji strukturalnych genomu, przeprowadzimy również analizę ekspresji genów na poziomie transkryptów (RNA), oraz zbadamy jeden z aspektów tzw. modyfikacji epigenetycznych, w znaczeniu metylacji DNA. Zarówno zmiany ekspresji genów, jak i metylacji DNA są nierozdzielnie powiązane z mutacjami i destabilizacją genomu. Przeprowadzimy również doświadczenia w warunkach *in vitro*, polegające na indukcji odpowiedzi na stres podczas hormonalnej stymulacji komórek nabłonka gruczołowego pobranego od pacjentek. Uważa się, że takie warunki sprzyjają powstawaniu wczesnej destabilizacji genomu w warunkach fizjologicznych, tj. podczas dojrzewania lub ciąży. Odtwarzając te warunki *in vitro* oczekujemy, że efekty mutacji leżących u podłoża destabilizacji genomu będą bardziej podkreślone niż w próbach klinicznych, a w konsekwencji łatwiejsze do zaobserwowania i interpretacji.

Badania będą prowadzone z zastosowaniem nowoczesnych metod wysokoprzepustowych i zaawansowanej analizy danych umożliwiających szeroką, wielokierunkową ocenę obserwowanych efektów i ich kontekstu molekularnego.

Ocena funkcjonalnego powiązania mutacji z destabilizacją genomu w nienowotworowej tkance gruczołu piersiowego może w przyszłości mieć znaczenie dla diagnostyki, rokowania i wyborów terapeutycznych.