

Mikromacierze DNA w onkologii weterynaryjnej^{*)}

MAGDALENA KRÓL, KAROL M. PAWŁOWSKI, TOMASZ MOTYL

Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-786 Warszawa

Król M., Pawłowski K. M., Motyl T.
DNA microarrays in veterinary oncology

Summary

The development of DNA microarray technique has opened the possibility of large-scale studies on genomic determinants of growth and malignancy of neoplasms. It enables a wide analysis of cancer gene expression in a short period of time. Such defined and specific profiles of gene expression are a molecular signature ("molecular portrait"), which in the future could be used as a reliable marker of cancer malignancy and prognosis. Molecular identification of breast cancer sub-types and their relation with prognosis was one of the most important microarray studies. Unfortunately, in contrast to medical oncogenomics, the development of veterinary oncogenomics is not so dynamic. The first oncogenomic studies on canine mammary gland tumor cell lines were performed at Utrecht University. They successfully identified deregulated pathways pertaining to cell line phenotype similar to the published human breast cancer data sets. The results presented in this paper show that high proliferative and anti-apoptotic potential of canine mammary gland cancer cells may be associated with an enhanced expression of genes involved in the Ca^{2+} signaling pathway (calmodulin 1, 2 and 3, and ryanodine receptor) and growth hormone cellular pathway. Moreover, a comparative study of gene expression in canine mammary tumor tissue and primary cell lines derived from those tumors was conducted. The obtained results show that the transcriptional profile of the primary cell culture resembles that in tumor tissue, and prove that cell cultures can be used as a reliable model for oncogenomic and pharmacogenomic studies. These promising results make it possible to anticipate a progressive development of veterinary oncogenomics.

Keywords: DNA microarrays, oncogenomics, cancer, mammary gland, dog

Od wielu lat naukowcy na całym świecie starają się jak najdokładniej poznać biologię nowotworów na poziomie molekularnym, a wiedzę tę wykorzystać do intensywnych poszukiwań metod skutecznego leczenia. Prowadzenie badań na szeroką skalę stało się możliwe dopiero po przełomowym wynalezieniu mikromacierzy DNA – jednego z najnowocześniejszych narzędzi badawczych funkcjonalnej genomiki. Technologia mikromacierzy DNA została opracowana po raz pierwszy na Uniwersytecie Stanford (USA). Mikromacierze to płytki szklane lub plastikowe, z regularnie naniesionymi sondami cDNA lub oligonukleotydowymi. Mikromacierze DNA są najczęściej wykorzystywane do porównawczej analizy ekspresji genów. Technika ta pozwala przede wszystkim na uzyskanie nieporównywalnie dużej (w odróżnieniu od innych metod) ilości informacji na temat ekspresji genów z jednej próbki materiału biologicznego.

W warunkach patologicznych aktywność komórkowa staje się nieprawidłowa w wyniku zmiany ekspresji genów. Informacje dotyczące ekspresji poszczególnych genów mogą być związane z fenotypem komórek. Taki specyficzny profil ekspresji genów nazywa-

ny jest „molekularnym portretem” (molecular portrait). Na podstawie wyników badań z ostatnich lat wykonanych z wykorzystaniem mikromacierzy DNA można przypuszczać, że taki „molekularny portret” znajdzie w przyszłości zastosowanie do identyfikowania stanów klinicznych, rodzajów lub stopnia zaawansowania danej choroby. W onkologii opracowanie „portretu molekularnego” może dostarczyć cennych informacji dotyczących rokowania, ponieważ guzy mogą mieć podobne cechy morfologiczne, ale zupełnie inną charakterystykę molekularną, warunkującą skuteczność leczenia. Zastosowanie mikromacierzy DNA wraz z programami komputerowymi do analizy danych, klasyfikacji ontologicznej genów i określanie funkcji ich produktów w szlakach komórkowych stwarza nadzieję na identyfikację nowych powiązań pomiędzy szlakami metabolicznymi a ich podłożem genetycznym oraz określenia rzeczywistych funkcji wielu genów.

W odniesieniu do nowotworów piersi, pomimo że poznano już wiele, wciąż poszukiwane są nowe czynniki rokownicze i predykcyjne, opierające się na wskaźnikach molekularnych oraz znajomości innych cech komórek nowotworowych, które umożliwiają prawidłową ocenę przebiegu choroby, ryzyka nawrotu

^{*)} Badania finansowane z grantu MNiSzW Nr N30800632/0667.

nowotworu i podatności na leczenie. Od końca lat 90. ub. wieku datuje się dynamiczny rozwój badań z zastosowaniem mikromacierzy DNA w ocenie transkryptomów tkanek nowotworowych. Badania prowadzone z wykorzystaniem tej metody w biologii gruczołu sutkowego i raka tego narządu dotyczyły bardzo różnorodnej tematyki, m.in. molekularnego mechanizmu przebudowy gruczołu sutkowego myszy, profilu transkryptomicznego indukowanych guzów gruczołu sutkowego u szczura (15), choć chyba najważniejszym z nich była próba identyfikacji podtypów raka piersi i w zależności od zaklasyfikowania do danego podtypu – stawianie rokowania (12, 17). Wykazano, że systematyczne badanie profilu ekspresyjnego tysięcy genów w tkance raka piersi z wykorzystaniem mikromacierzy cDNA i ich połączenie z cechami różnicowania fenotypowego może dostarczyć nowych danych dla poprawy taksonomii raka (12). Analiza hierarchicznego grupowania genów w nowotworach pozwala na różnicowanie ich podtypów (17). Dotychczasowa analiza profili transkryptomicznych dotyczyła przede wszystkim: raka piersi, białaczek, raka gruczołu krokowego, czerniaka, a także różnych nowotworowych linii komórkowych oraz indukowanych guzów gruczołu sutkowego u myszy i szczurów jako modelu dla raka piersi.

W przeciwieństwie do onkogenomiki medycznej, onkogenomika weterynaryjna rozwija się mało dynamicznie. W literaturze spotyka się pojedyncze prace z zastosowaniem mikromacierzy DNA w badaniach nowotworów gruczołu sutkowego psa. Przeprowadzenie takich zaawansowanych badań stało się możliwe dopiero po zsekwencjonowaniu genomu psa (maj 2005 roku). Dr Jan A. Mol z Uniwersytetu w Utrechcie (Holandia) zaprojektował mikromacierze cDNA specyficzne dla *Canis familiaris* oraz zastosował je do oceny ekspresji genów trzech linii komórkowych nowotworów gruczołu sutkowego suki. Guzy gruczołu sutkowego suk są ciekawym i jednocześnie ważnym dla praktyki weterynaryjnej modelem badawczym, ponieważ należą do najczęściej obok skóry występujących nowotworów u psów. Występują one trzy razy częściej niż u kobiet i dużo częściej niż u samic innych gatunków. W ocenie histopatologicznej ok. 40-50% z nich stanowią nowotwory złośliwe (19) z czego większość jest pochodzenia nabłonkowego (5, 16). Jak powszechnie wiadomo, nowotwory te wywodzą się z nabłonka pęcherzyków lub przewodów mlecznych i przybierają postać raków litych, gruczolakoraków brodawkowatych lub cewkowych prostych lub złożonych. U suk dominującą grupę stanowią gruczolakoraki o różnym stopniu złośliwości.

Badania przeprowadzone przez zespół dr. Jana Mola (14) pozwoliły na wykrycie genów o zwiększonej ekspresji zaangażowanych w szlaki komórkowe podobne do tych, które występują w liniach raka piersi. Scharakteryzowali oni transkryptomicznie trzy nowotworowe linie komórkowe wywodzące się z gruczołu sut-

kowego suki, o różnym pochodzeniu: kostniakomięsak, łagodny guz mieszany (nowotwory mezenchymalne) oraz rak anaplastyczny (nowotwór nabłonkowy). Porównanie genów o zwiększonej ekspresji w tych trzech liniach komórkowych z genami, których ekspresja jest zwiększona w raku piersi, ujawniło szereg genów, których produkty zaangażowane są w te same szlaki sygnałowe, co w raku piersi. Należą do nich: szlak Wnt, integrynowy, regulacji cyklu komórkowego, cytokin/Rho-GTPazy oraz szlak Alzheimerera. Tak określony profil ekspresji genów oraz szlaków komórkowych tych linii nowotworowych stał się ważnym punktem wyjścia do wyznaczenia celów dalszych badań.

Mol w ramach współpracy naukowej udostępnił autorom niniejszego opracowania mikromacierze cDNA specyficzne dla *Canis familiaris*, które zastosowano do porównania transkryptomów linii komórkowej raka prostego gruczołu sutkowego suki CMT-U27 i linii komórkowej guza wrzecionowato-komórkowego CMT-U309. Obie linie zostały wyizolowane przez dr Hellmen z Uniwersytetu w Uppsali. Celem badań własnych było zidentyfikowanie genów odpowiedzialnych za szybką proliferację i potencjał antyapoptotyczny komórek. W świetle istniejących danych literaturowych (1), z których wynika, że szybkość proliferacji komórek nowotworowych ściśle koreluje z histologicznym stopniem złośliwości nowotworu, badania takie wydają się szczególnie interesujące. Szybkość wzrostu obu linii znacząco się różni. Linia CMT-U27 ma cykl komórkowy dwukrotnie krótszy niż CMT-U309 i wynosi on 53,4 godz. Linia CMT-U27 wykazuje również znacznie wyższy potencjał antyapoptotyczny, który został określony poprzez wyznaczenie poziomu ekspresji białka Bcl-2 (najsilniejszego czynnika antyapoptotycznego), a także poprzez ocenę liczby komórek apoptotycznych w warunkach kontrolnych oraz po inkubacji z kamptotecyną (5). Porównanie transkryptomów pozwoliło na wykrycie 29 genów różniących się ekspresją pomiędzy badanymi liniami, zaangażowanymi w proliferację, adhezję i apoptozę. Spośród genów o zwiększonej ekspresji w linii CMT-U27 aż 14 było zaangażowanych w regulację proliferacji komórek, 3 w adhezję i 2 w apoptozę. W przypadku linii CMT-U309 zaobserwowano wyższą ekspresję genów zaangażowanych głównie w adhezję i szlaki związane z czynnikami wzrostu – EGF i FGF (9 genów). Uzyskane wyniki ujawniły, że wysoki potencjał proliferacyjny i antyapoptotyczny może być związany ze zwiększoną ekspresją genów zaangażowanych w szlak przekazywania Ca^{2+} (kalmoduliny 1,2 i 3, receptor rianodynowy), a także w szlak przekazywania hormonu wzrostu. Na podstawie analizy szlaków komórkowych kalmodulin oraz szlaku przekazywania receptora hormonu wzrostu ustalono, że oba szlaki prowadzą do aktywacji czynników związanych z nadmierną proliferacją komórek, poprzez aktywację fosfokinazy białkowej C alfa (PRKCA) oraz kaskady MAPK1, a także aktywację białek Jun i Fos,

które, łącząc się w kompleks AP1, zwiększają transkrypcję wszystkich czynników związanych z niekontrolowanymi podziałami komórkowymi oraz ochroną komórki przed zniszczeniem. Kalmoduliny hamują również czynnik supresyjny nowotworu Rb1. Oba szlaki przekazywania są zależne od wapnia wewnątrzkomórkowego. Podobne wyniki badań przedstawili Gebre-Medhin i wsp. (3), wykrywając obecność receptora hormonu wzrostu w tkance nowotworowej raka piersi i zwiększoną jego ekspresję w porównaniu do zdrowej tkanki. Już w 1993 Ng i wsp. (9) przedstawili istotny wpływ hormonu wzrostu na wzrost tkanki gruczołu sutkowego oraz indeks proliferacyjny komórek nabłonkowych gruczołu. Nabarro (8) oraz Melmed i wsp. (7) opisali zwiększone ryzyko wystąpienia raka piersi u pacjentów z akromegalią, a Xiao i wsp. (20) opisali wyniki hamowania szlaku komórkowego hormonu wzrostu w komórkach nowotworowych gruczołu sutkowego, polegające na zahamowaniu rozwoju raka.

Linie komórkowe od lat są stosowane jako model doświadczalny w badaniach biologii komórki nowotworowej oraz w badaniach farmakologicznych, jednakże zdolność linii komórkowych do odzwierciedlania fenotypu i genotypu tkanek macierzystych wciąż pozostaje pytaniem. Próba odpowiedzi na to pytanie była celem kolejnych badań, które polegały na porównaniu profilu transkryptomicznego nowotworowych linii komórkowych z ekspresją genów tkanki macierzystej guza, z którego te komórki zostały wyizolowane. Badania te były przeprowadzone na guzach gruczołu sutkowego suki o różnym pochodzeniu: nabłonkowym-gruczolakoraku i mezenchymalnym-chrzęstniakomięsaku oraz wyizolowanych z nich liniach pierwotnych. Okazało się, że profile ekspresji genów linii komórkowych i odpowiednich tkanek guza są do siebie bardzo zbliżone. Istotne różnice ekspresji genów w przypadku gruczolakoraka wynosiły 6,0%, a w przypadku chrzęstniakomięsaka 2,7% genów wykazujących ekspresję. Najbardziej znaczące różnice pomiędzy transkryptomem tkanki guza i linii komórkowych dotyczyły ekspresji genów związanych z metabolizmem i modyfikacją białek, przekazywaniem sygnału, a także metabolizmem nukleotydów, nukleozydów i kwasów nukleinowych (10). Różnice te mogą wynikać z innych warunków środowiska komórek nowotworowych w guzie *in vivo* oraz w hodowli *in vitro*, wpływu składników podłoża i braku oddziaływań nerwowo-hormonalnych w hodowlach komórkowych. Wyniki tych badań są podobne do wyników badań przeprowadzonych wcześniej, które również wykazały brak znaczących różnic w ekspresji genów pomiędzy liniami komórkowymi, a macierzystą tkanką. Jessen i wsp. (4) oraz Perkins i wsp. (11) opisali podobieństwo w ekspresji genów pomiędzy linią komórkową wyizolowaną z wątroby i tkanką wątroby, które wynosiło 80-88%. Ertel i wsp. (2) stwierdzili również podobieństwo w ekspresji genów w tkance sześciu rodzajów guza (gruczołu sutkowego, centralnego układu nerwo-

wego, prostaty, gruczołu krokowego, jajnika i nerki) i wyizolowanych z nich linii komórkowych. Badania przeprowadzone na liniach komórkowych i macierzystej tkance przy użyciu mikromacierzy DNA pozwalają przypuszczać, że linie komórkowe mogą odzwierciedlać procesy zachodzące *in vivo* w tkankach, przez co mogą być używane z powodzeniem do badań onkogenomicznych i farmakogenomicznych.

Rao i wsp. (13) opisali zmienioną ekspresję genów w przerście gruczołu sutkowego suki powodowanym podawaniem progesteronu oraz w nowotworach gruczołu sutkowego, w porównaniu do zdrowej tkanki. Analiza profilu transkryptomicznego przerośniętego gruczołu i gruczołu podlegającego transformacji nowotworowej wykazała zmienioną ekspresję genów zaangażowanych w tak ważne procesy, jak: rozwój guza, proliferacja i adhezja, przy czym w przerośniętej tkance dominowała zwiększona ekspresja głównie genów związanych z utrzymaniem homeostazy komórki. Rozregulowanie tych procesów może prowadzić do powstania nowotworu. Spośród 13 genów znacznie różniących się ekspresją wyróżniono geny o zwiększonej ekspresji, które stymulują proliferację lub hamują apoptozę, a także geny o zmniejszonej ekspresji, do których należały geny hamujące wzrost. A zatem profil transkryptomiczny w przerośniętej tkance wskazuje na zwiększoną ekspresję genów zaangażowanych w proliferację stymulowaną gestagenami, a zmiany w ekspresji genów związanych z czynnikami transkrypcyjnymi i genów zaangażowanych w podtrzymanie integralności DNA mogą wskazywać na wczesną transformację nowotworową. Wnioski, jakie nasuwają się po wnikliwej analizie listy genów, to działanie kancerogenne gestagenów podawanych przez długi okres. Analiza szlaków komórkowych ujawniła wiele genów, których produkty zaangażowane są w szlak integrynowy, a także Wnt. Spośród tych genów charakterystyczny jest czynnik PCNA, dobrze znany marker proliferacji, którego nadekspresja występuje u kobiet przyjmujących hormonalną terapię zastępczą (estrogeny lub progesteron + estrogeny). Profil transkryptomiczny nowotworów gruczołu sutkowego wskazuje na nadekspresję genów związanych z procesem przemiany nowotworu łagodnego w złośliwy (komponenty cytoszkieletu) oraz wielu genów związanych z proliferacją, a także szlakiem Wnt.

Thomson i wsp. (18) przeprowadzili analizę ekspresji genów 16 guzów mózgu u psów przy użyciu mikromacierzy DNA. Do badanych guzów należały: oponiaki, glejaki, wyściółczaki i brodawczaki spłotu naczyńiówkowego. Badania te wykazały, że geny o zwiększonej ekspresji w wymienionych nowotworach odpowiadają genom charakteryzującym się nadekspresją w nowotworach mózgu u ludzi, co świadczy o podobnych mechanizmach nowotworzenia u ludzi i zwierząt. Autorzy wykazali, że komórki transformowane nowotworowo u psów, na poziomie molekularnym podlegają takim samym zmianom, jak ko-

mórki nowotworowe u ludzi. Wyniki te pozwoliły także na określenie kilku charakterystycznych genów, związanych z powstawaniem guza oraz z jego rozwojem.

Badanie biologicznej roli genów jest celem funkcjonalnej genomiki. W zakresie badań medycznych wiedza ta jest podstawą zrozumienia genetycznego uwarunkowania chorób. Wysoki stopień zaawansowania technologicznego, czego efektem jest wynalezienie mikromacierzy DNA, umożliwia szeroką analizę ekspresji genów w badanych próbkach materiału biologicznego. Ponieważ metoda ta jest stosunkowo nowa, genom psa został zsekwencjonowany zaledwie 3 lata temu, a dostęp do mikromacierzy specyficznych dla gatunku *Canis familiaris* jest ograniczony (komercyjnie dostępne mikromacierze pojawiły się na rynku dopiero kilka miesięcy temu), do tej pory przeprowadzono niewiele badań i określono profil transkryptomiczny niewielu typów nowotworów. Istnieje kilka prac dotyczących zastosowania mikromacierzy DNA w weterynarii klinicznej, głównie w zakresie badania kardiomiopatii u psów, atopowego zapalenia skóry czy chorób wątroby. Duża liczba badań przeprowadzona z zastosowaniem tej metody w onkologii medycznej i ich obiecujące wyniki pozwalają prognozować postępujący rozwój weterynaryjnej onkogenomiki w kolejnych latach. Jednoczesna ocena ekspresji wielu tysięcy genów możliwa dzięki metodzie mikromacierzy DNA stwarza dużą szansę odpowiedzi na kluczowe pytania dotyczące molekularnej diagnostyki i skutecznej terapii onkologicznej.

Piśmiennictwo

1. Badowska-Kozakiewicz A., Dolka I., Malicka E., Rodo A., Skrzypczak M., Sobczak-Filipiak M.: Retrospektywna ocena występowania nowotworów gruczołu mlekowego u psów w latach 1996-2006. *Życie Wet.* 2007, 82, 472-476.
2. Ertel A., Verghese A., Byers S. W., Ochs M., Tozeren A.: Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Mol. Cancer* 2006, 5, 55.
3. Gebre-Medhin M., Kindblom L. G., Wennbo H., Tornell J., Meis-Kindblom J. M.: Growth Hormone Receptor Is Expressed in Human Breast Cancer. *Am. J. Pathol.* 2001, 158, 1217-1229.
4. Jessen B. A., Mullins J. S., de Peyster A., Stevens G. J.: Assessment of Hepatocytes and Liver Slices as in Vitro Test Systems to Predict in Vivo Gene Expression. *Tox. Sci.* 2003, 75, 208-222.
5. Król M., Pawłowski K. M., Skierski J., Rao N. A. S., Hellen E., Mol J. A., Motyl T.: Transcriptomic profile of two canine mammary cancer cell lines with different proliferative and anti-apoptotic potential. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008 (w druku).
6. Malicka E., Piusiński W., Sendek H., Bielecki W., Osińska B., Lenartowicz-Kubrat Z.: Nowotwory psów stwierdzone w badaniach anatomopatologicznych w latach 1985-1993. *Medycyna Wet.* 1996, 2, 141-147.
7. Melmed S., Ho K., Klibanski A., Reichlin S., Thorner M.: Clinical review 75: recent advances in pathogenesis, diagnosis, and management of acromegaly. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995, 80, 3395-3402.
8. Nabarro J. D.: Acromegaly. *Clin. Endocrinol.* 1987, 26, 481-512.
9. Ng S. T., Zhou J., Adesanya O. O., Wang J., LeRoith D., Bondy C. A.: Growth hormone treatment induces mammary gland hyperplasia in aging primates. *Nat. Med.* 1997, 3, 1141-1144.
10. Pawłowski K. M., Król M., Majewska A., Badowska-Kozakiewicz A., Mol J. A., Malicka E., Motyl T.: Comparison of cellular and tissue transcriptomic profiles in canine mammary tumor. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008 (w druku).
11. Perkins E. J., Xin Guan W. B., Ang C. Y., Wolfinger R. D., Chu T. M., Meyer S. A., Inouye L. S.: Comparison of transcriptional responses in liver tissue and primary hepatocyte cell cultures after exposure to hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine BMC. *Bioinformatics* 2006, 7 (Suppl 4), 22.
12. Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslen L. A., Fluge O., Pergemenschikov A., Williams C., Zhu S. X., Lonning P. E., Borresen-Dale A. L., Brown P. O., Botstein D.: Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000, 406, 747-752.
13. Rao N. A. S., van Wolferen M. E., Bhatti S. F. M., Król M., Holstege F. C., Mol J. A.: Gene expression profiles of progestin-induced canine mammary hyperplasia and spontaneous mammary tumors. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008 (in press).
14. Rao N. A. S., van Wolferen M. E., van den Ham R., van Leenen D., Groot Koerkamp M. J. A., Holstege F. C. P., Mol J. A.: cDNA microarray profiles of canine mammary tumor cell lines reveal deregulated pathways pertaining to their phenotype. *Anim. Gen.* 2008, 39, 333-345.
15. Shan L., He M., Yu M., Qiu C., Lee N. H., Liu E., Snyderwine E. G.: cDNA microarray profiling of rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 2002, 23, 1561-1568.
16. Sobczak-Filipiak M., Malicka E.: Estrogen receptors in canine mammary gland tumours. *Pol. J. Vet. Sci.* 2005, 5, 1-5.
17. Sorlie T., Perou C. M., Tibshirani R.: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 10869-10874.
18. Thomson S. A. M., Kennerly E., Nolby J. R., Mickelson D. E., Hoffmann P. J., Dickinson G., Gibson, Breen M.: Microarray Analysis of Differentially Expressed Genes of Primary Tumors in the Canine Central Nervous System. *Vet. Pathol.* 2005, 42, 550-558.
19. Withrow S. J., MacEwen: *Small Animal Clinical Oncology*. Saunders W. B. Company. Wyd. 3, UK 2000, 455-489.
20. Xiao Z., Mehta Rajendra G., Lantvit D. D., Coschigano K. T., Kopchick J. J., Green J. E., Hedayat S., Christov K. T., Ray V. H., Unterman T. G., Swanson S. M.: Inhibition of estrogen-independent mammary carcinogenesis by disruption of growth hormone signaling. *Carcinogenesis* 2007, 28, 143-150.

Adres autora: prof. dr hab. Tomasz Motyl, Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: tomasz_motyl@sggw.pl