

# Zastosowanie technologii macierzy ekspresyjnych, proteomicznych oraz tkankowych w badaniach nad onkogenezą u ssaków\*)

BARTOSZ KEMPISTY, PIOTR ZAWIERUCHA, HANNA PIOTROWSKA\*, MICHAŁ NOWICKI

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego II UM, ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań

\*Katedra Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego UM, ul. Dojazd 30, 60-631 Poznań

Kempisty B., Zawierucha P., Piotrowska H., Nowicki M.

## Technology based on expression microarrays, proteomic microarrays and tissue microarrays in mammalian oncogenesis research

### Summary

Technological progress in the past few years has made it possible to apply techniques based on microarrays in the analyses of cancerogenesis. These techniques can be divided into several groups according to the scale of research: (1) gene expression analysis, (2) protein analysis, (3) tissue research. The gene expression analysis makes it possible to compare the levels of gene activity in cancer tissue with those in reference tissue, and to evaluate the progression of cancer and its reaction to treatment. The analysis of proteins provides information on their functional and structural characteristics, and throws light on the protein-ligand interaction and the relations between the presence or absence of certain proteins in specific physiological states. Tissue microarrays are applied to analyze cancer markers and to identify DNA, RNA and proteins.

This article presents selected aspects of microarray research and discusses the molecular aspects of cancerogenesis in dogs, referring to several types of genes associated with cancers.

**Keywords:** tissue assay, dogs, BCRP1, gene expression analysis

Badania nad nowotworami skupiają się głównie nad lepszym poznaniem procesu kancerogenezy szczególnie w odniesieniu do różnorodności biologicznej (molekularnej i morfologicznej) chorób nowotworowych. Mikromacierze opierające się na badaniu transkryptomu wydają się techniką, która pozwala na dokładną analizę tego procesu. Mimo że analiza transkryptomowa stanowi jedynie jedną z wielu części charakteryzujących fenotyp nowotworu, znajduje ona szerokie zastosowanie w badaniach nad prawidłową lub zaburzoną fizjologią komórek wchodzących na szlak transformacji nowotworowej. W poniższym opracowaniu przedstawiono badania oparte na technologii mikromacierzy oraz możliwości ich zastosowania w badaniach nad onkogenezą u ssaków.

### Analiza wzoru ekspresji genów w nowotworach

Badania wykorzystujące analizę mikromacierzy składają się z czterech strategii: (1) analizy porównaw-

czej transkryptomu tkanki nowotworowej w stosunku do tkanki kontrolnej (nieobjętej procesem nowotworowym). Analizy tego typu przeprowadza się w celu identyfikacji różnic i/lub podobieństw fenotypowych tkanek poddanych badaniu, (2) ocenie profilu transkryptomowego tkanki nowotworowej o różnym stopniu zaawansowania i rozwoju choroby nowotworowej, w celu określenia stopnia progresji guza, (3) analizie różnych próbek tego samego guza w celu opracowania i porównania ze sobą różnych podgrup. Badania tego typu przeprowadza się w celu dokonania molekularnej analizy różnicowej tej samej tkanki nowotworowej w odniesieniu do histologicznego fenotypu oraz ocenie stanu guza po zastosowaniu różnych metod terapii (4). Zastosowanie mikromacierzy w celu opracowania wymienionych koncepcji pozwala na określenie profilu molekularnego genów, które ulegają obniżonej ekspresji, jak i tych charakteryzujących się nadekspresją w danej tkance nowotworowej. W ten sposób otrzymuje się swoisty molekularny „fingerprint” danego typu guza. Połączenie doświadczeń klinicznych z badaniami molekularnymi pozwala na opracowanie pełnej diagnostyki określonego typu nowo-

\*) Publikacja jest częścią projektu „CAOM – Centrum archiwizacji obrazów morfologicznych”, współfinansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego z programu „Innowacyjna gospodarka 2007-2013”. Hasło programu: „Inwestujemy w twoją przyszłość”.

tworu oraz wskazuje na możliwości zastosowania potencjalnych metod terapeutycznych.

Analizy transkryptomu oparte na mikromacierzach pozwalają na badanie zmian molekularnych zachodzących w tkance nowotworowej. Identyfikowane różnice w profilu ekspresji genów odzwierciedlają fenotyp histologiczny danego guza oraz tworzą tym samym genetyczną mapę „molekularnego fenotypu” tkanki objętej procesem nowotworowym. Przykładem takiej analizy było porównanie profilu ekspresyjnego w komórkach mezotelialnych z profilem komórek mezotelioma (26). Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały zróżnicowaną ekspresję genów: odpowiedzialnych za oporność na związki chemiczne stosowane w terapii oraz czynniki fizyczne, genów regulujących migrację komórek, genów, których produkty białkowe regulują stabilność makrocząsteczek w komórce oraz genów odpowiedzialnych za podziały komórkowe i adhezję. Sugeruje się, że zmiana ekspresji wymienionych genów jest czynnikiem warunkującym transformację nowotworową komórek mezotelialnych (26).

Badania kinetyczne obejmujące analizę różnych stadiów rozwoju nowotworu, od inicjacji do metastazy, wykazały zmianę profilu ekspresyjnego genów, które zostały określone jako markery stadium rozwojowego guza. Przykładem tego są badania nad białczkowymi komórkami typu B (33). Analizy te, uwzględniające różne stadia progresji choroby, odkryły nowe markery mRNA związane z formą (stadium rozwoju choroby) oraz stopniem przeżywalności. Obniżona ekspresja mRNA interleukiny 1 (IL-1-beta), IL-8 oraz EGR1 (early growth response protein-1) związana była z późnym stadium rozwoju choroby. Ponadto, niska ekspresja mRNA L-selektyny, integryny-beta-2, IL-1-beta, IL-8, EGR1 oraz wysoka ekspresja genu TCL1 wskazywały na niską przeżywalność chorych. Sugeruje się, że wykorzystanie tych markerów związanych ze stopniem rozwoju nowotworu może stanowić nowe, ważne narzędzie wczesnej diagnostyki białczek.

### **Macierze białkowe**

Proteomika jest kolejną po transkryptomice dziedziną skupiającą się wokół analiz postgenomowych. Badanie proteomu wynika z analiz ekspresji genów, które w dużej mierze odpowiadają za fenotyp komórki. Podobnie jak w przypadku badań nad transkryptomem, analiza proteomu dotyczy zarówno jakościowych, jak i ilościowych zmian w profilu ekspresji genów w stanach patologicznych, którymi objęte są komórki wchodzące na szlak transformacji nowotworowej. Jednakże wnikliwa i skomplikowana analiza zmian profilu białkowego dostarcza informacji na temat funkcji genów, odzwierciedlając jednocześnie poziom regulacji posttranskrypcyjnej. Proteomika obejmuje trzy główne kierunki badań: charakterystykę białek (ich identyfikację, określenie stopnia mody-

fikacji i funkcji), określenie interakcji białko–ligand oraz badanie zróżnicowanego profilu ekspresji białek w odniesieniu do stanów fizjologicznych i patologicznych komórek lub odpowiedzi na działanie substancji toksycznych dla komórek. Badania nad proteomem rozpoczęły się w momencie wykorzystania po raz pierwszy dwukierunkowej elektroforezy białek połączonej ze spektrometrią masową. Obecnie badania te przybrały postać mikromacierzy białkowych, które mogą stanowić istotny element w diagnostyce wielu chorób, zarówno u ludzi, jak i zwierząt.

Istnieją dwa rodzaje mikromacierzy białkowych, opartych na „naturze biologicznej” cząsteczek poddanych analizie. Pierwszą z nich są mikromacierze białkowe lub mikromacierze białek wiążących inne cząsteczki (DNA, RNA, przeciwciała lub inne ligandy). Analizy te określono jako macierze funkcji białek (16). W macierzach funkcjonalnych duża ilość białka jest nakrapiana na stałą matrycę w określonej lokalizacji oraz badana jest zarówno aktywność biochemiczna danego białka, jak i międzycząsteczkowa interakcja. Drugim rodzajem macierzy białkowych jest macierz wykrywająca białka. Macierz ta składa się z kolekcji ligandów białkowych, które tworzą tzw. podpis białkowy, opisując jednocześnie stan fizjologiczny komórki.

Proteomika jest obecnie szeroko wykorzystywanym narzędziem w badaniach nad nowotworami, mimo że w piśmiennictwie nadal jest na ten temat niewiele informacji. Połączenie mikromacierzy białkowych ze spektrometrią masową wydaje się istotnym uzupełnieniem badań nad profilem ekspresyjnym genów. Dane literaturowe odnoszące się do badań nad nowotworami u człowieka wskazują na możliwość wykorzystania mikromacierzy białkowych (w postaci chipa białkowego) w diagnostyce nowotworów prostaty, jajników, głowy i szyi. Wyniki tych badań wykazały istnienie markerów białkowych odgrywających istotną rolę w indukcji oraz progresji wskazanych typów nowotworów. Opracowane biomarkery tworzą swoisty molekularny „fingerprint”, który może być wykorzystywany jako jedno z podstawowych narzędzi diagnostycznych w chorobach nowotworowych u ludzi oraz zwierząt. W badaniach nad nowotworem prostaty wykorzystano takie podejście, analizując profil białkowy komórek nowotworowych (24). Wyniki wykazały wysoką korelację progresji choroby ze wzrostem stopnia ufosforylowania kinazy Akt oraz obniżeniem fosforylacji kinazy ERK (extracellular signal – regulated kinase) oraz zahamowaniem szlaku apoptotycznego w komórkach nowotworowych.

Podobnie jak w przypadku technologii opartej na mikromacierzach DNA oraz RNA, mikromacierze białkowe zyskują coraz większe zainteresowanie, głównie ze względu na możliwość ich powszechnego stosowania w wielu chorobach, w tym głównie w nowotworach ludzi i zwierząt (36).

## Macierze tkankowe

Mikromacierze DNA, RNA oraz białkowe są z powodzeniem wykorzystywane przy poszukiwaniach markerów genetycznych związanych z indukcją i progresją nowotworów. Nowym narzędziem badawczym znajdującym szerokie zastosowanie w diagnostyce, prognozowaniu oraz możliwościach terapeutycznych są macierze tkankowe. System macierzy tkankowych składa się z wielu małych, cylindrycznych skrawków (o średnicy od 600  $\mu\text{m}$  do 2 mm i grubości 5  $\mu\text{m}$ ) pochodzących z tkanek zatopionych w formalinie i następnie naniesionych na szklane płytki. Typowa macierz tkankowa składa się z kilkudziesięciu do kilkuset skrawków. Macierze tkankowe stanowią ważne narzędzie badawcze w analizach markerów nowotworowych oraz są elementem łączącym wiedzę naukową z praktyką kliniczną (2, 5, 13, 20, 28). W celu dokładnego przedstawienia nie tylko charakterystyki molekularnej (identyfikacja markerów) danego typu nowotworu, ale i właściwego prognozowania czy zasugerowania kierunków terapeutycznych, niezbędne jest połączenie mikromacierzy DNA, RNA oraz białkowych z macierzami tkankowymi. Najnowsze badania wykorzystujące wymienione techniki sugerują możliwość wykrywania wielu zmian molekularnych zachodzących w komórkach podczas transformacji nowotworowej. Ważnym elementem macierzy tkankowych jest także możliwość uzyskania tzw. podpisu białkowego, charakterystycznego dla danego typu nowotworu w danym stadium rozwoju. Tak więc nadrzędnym celem wykorzystania macierzy tkankowych jest identyfikacja całego „programu ekspresyjnego” (wielokierunkowa analiza DNA, RNA, białek) w panelu próbek, ujętych w dużej skali (17). Słabą stroną tej techniki jest analiza tylko jednego fragmentu skrawka, dlatego też jedno z głównych pytań, na które należy odpowiedzieć brzmi: „w jakim aspekcie analiza tylko jednego skrawka może być miarodajnym wskaźnikiem dla całego guza?”. Macierze tkankowe wykorzystano do badania 38 próbek pochodzących z raka gruczołu piersiowego pod kątem ekspresji trzech antygenów: receptora estrogenowego, receptora progesteronu oraz Her2/neu (4). Uzyskane wyniki były bardzo podobne w przypadku analizy całego skrawka z dwóch odmiennych próbek guza. Podobne wyniki uzyskano analizując za pomocą tej techniki nowotwory pęcherza moczowego (23). Przy pomocy macierzy tkankowych można także zidentyfikować ekspresję danego białka *in situ*.

### Aspekty molekularne wybranych typów nowotworów u psów

Dotychczas wiele spośród nowotworów występujących u psów zostało dobrze scharakteryzowanych na poziomie molekularnym. Niektóre z nich cechuje duża homologia w stosunku do procesów kancerogennych zachodzących u ludzi. Dobrym przykładem takiej

zbieżności jest rak sutka, nowotwór najczęściej występujący u psów, stanowiący 42% wszystkich nowotworów oraz 82% nowotworów rozwijających się w narządach rozrodczych (7, 21). Badania wskazują na ważny udział białka RAD51 w etiopatogenezie tego typu nowotworu (15).

RAD51 należy do grupy białek odpowiedzialnych za naprawę nici DNA, uszkodzonej na drodze działania czynników egzogennych. Naprawa uszkodzeń zachodzi w procesie rekombinacji homologicznej (homologous recombination, HR), gdzie jedna z nici stanowi matrycę do syntezy naprawczej. Czynnikiem wyzwalamym cały proces jest samo uszkodzenie nici indukujące tworzenie kompleksów Rad51. W procesie kancerogenezy, jak i podczas konstytutywnej nadekspresji zaobserwowano spontaniczne formowanie kompleksów Rad51. Z tego powodu zaproponowano użycie Rad51 jako prognostycznego markera raka sutka, ponieważ zarówno jego nadekspresja, jak i obniżona ekspresja stanowią złe rokowanie dla pacjenta. Bezpośrednim induktorem ekspresji Rad51 są dobrze opisane w kontekście nowotworu sutka białka BRCA1 oraz BRCA2 także odpowiedzialne za procesy naprawcze. Bezpośrednią kontrolę ekspresji Rad 51 przypisuje się BRCA2, który odpowiada za kontrolę rekombinazy Rad51, natomiast BRCA1 pełni rolę sygnałną podczas uszkodzenia DNA. Zmiany ekspresji BRCA1 i jego wpływ na nowotworzenie wykazano w wielu badaniach. Oba białka uczestniczą w procesie rekombinacji homologicznej, zwłaszcza w fazie S/G2 cyklu komórkowego, gdzie preferowany jest ten mechanizm naprawczy. Wykazano bezpośredni związek pomiędzy brakiem BRCA1 podczas podziału komórkowego a aktywacją kaskady naprawczej opartej o niehomologiczne łączenie końców (nonhomologous end joining, NHEJ). NHEJ jest bardziej podatna na błędy, w wyniku czego może dojść do znacznego nagromadzenia aberracji chromosomowych mogących być przyczyną nowotworzenia.

Badanie nadekspresji genu COX2 wykazało silny związek z występowaniem dużej liczby nowotworów, w tym nowotworu sutka (14). Gen ten koduje enzym cyklooksygenazę 2 odpowiedzialną za biosyntezę prostoglandyny H i pełni rolę inicjatora onkogenezy. Cyklooksygenaza 2 nie występuje w normalnych komórkach, a do aktywatorów ekspresji tego genu zaliczyć można: czynniki wzrostu, czynniki prozapalne oraz promotory onkogenezy. Wykazano wzrost ekspresji COX2 zarówno w nowotworach łagodnych, jak i złośliwych, odpowiednio, o 24% i 56% (8). Korelację taką potwierdzono także histologicznie (12). Gen ten można zatem traktować jako marker prognostyczny, przy czym im większa będzie jego ekspresja, tym gorsze rokowanie.

Badania nad białkiem TP53 wykazały wpływ mutacji genu kodującego to białko na rozwój wielu nowotworów, w tym nowotworu piersi u ludzi (27). Udział

białka TP53 w represji nowotworowej jest cechą niemal uniwersalną dla dowolnego typu nowotworu u ludzi. Wykazano również jego udział w patogenezie nowotworowej u psów (6). Jako czynnik transkrypcyjny TP53 indukuje zmiany w ekspresji genów prowadzące do apoptozy, starzenia lub wstrzymania podziałów komórki. Mechanizmy te niwelują uszkodzenia komórki oraz działają antyonkogennie (18). Mutacje linii zarodkowych w obrębie genu TP53 są przyczyną zespołu Li-Fraumeniego, charakteryzującego się większą podatnością na procesy nowotworowe. Badania sekwencyjne wykazały 74% udział mutacji typu zamiana sensu w domenie wiążącej DNA białka TP53 (25). Około 30% spośród tych mutacji dotyczy jednego z sześciu funkcjonalnych kodonów współtworzących domenę wiążącą (3). Obiecującą strategią przeciwdziałania procesom nowotworzenia jest reaktywacja szlaku TP53. Obecnie wiele związków chemicznych o potencjalnym działaniu regulującym poziom białka TP53 znajduje się w fazie testów klinicznych (1).

Innym silnym proonkogenem jest antygen RCAS1 (receptor – binding cancer antygen expressed on SiSo cells) (32). Rola tego czynnika polega na współdziałaniu z domniemanym receptorem limfocytów T oraz B, co prowadzi do ograniczenia wzrostu komórek eksponujących receptory. Dodatkowo RCAS1 powoduje apoptozę tych komórek poprzez aktywację kaspazy-3 oraz zakłócenie mitochondrialnego potencjału błonowego (19, 22). Wykazano obecność tego czynnika w osoczu krwi, gdzie jego aktywność odpowiada aktywności błonowej (30, 31). Ponadto stwierdzono podwyższone stężenie formy osoczowej RCAS1 (sRCAS1) u pacjentów, u których występuje nowotwór głowy lub szyi (34, 35). W patogenezie nowotworowej RCAS1 umożliwia komórkom nowotworowym uniknięcie odpowiedzi ze strony układu odpornościowego oraz wytwarza ich tolerancję immunologiczną. Sugeruje się również udział tego antygenu w procesach remodelingu mikrośrodowiska nowotworu, gdzie wpływa on na ekspresję VEGF, cytokiny zaangażowanej w proces angiogenezy w przypadku raka szyjki macicy (9, 10, 29).

Wymienione białka w znaczącym stopniu biorą udział w procesach modulujących nowotworzenie, jednak na cały proces składa się wiele determinantów genowych (11).

### Podsumowanie

Wykorzystanie mikromacierzy DNA, RNA, białkowych oraz macierzy tkankowych stanowi obecnie najnowsze narzędzie w funkcjonalnej analizie wybranych chorób, w tym szczególnie nowotworów. Z uwagi na wysokie koszty wykonania badania te są w szerokim aspekcie stosowane u ludzi, natomiast w dalszym ciągu stanowią małą część diagnostyki u zwierząt. Wykonuje się je głównie w celu poznania przyczyn in-

dukcji onkogenezy, stopnia progresji nowotworu oraz możliwości zastosowania różnych metod terapii.

Z uwagi na powszechne występowanie chorób nowotworowych u psów coraz częściej wskazuje się na możliwość wykorzystania tego gatunku ssaków, jako modelu doświadczalnego w badaniach biomedycznych. Wielu spośród autorów wskazuje na duże podobieństwo molekularne oraz histologiczne nowotworów u psów, dlatego też analizy oparte na mikromacierzach będą w przyszłości wykonywane u tych zwierząt.

### Piśmiennictwo

1. Brown C. J., Lain S., Verma C. S., Fersht A. R., Lane D. P.: Awaking guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat. Rev. Cancer* 2009, 9, 862-873.
2. Bubendorf L., Kononen J., Koivisto P., Schraml P., Moch H., Gasser T. C., Willi N., Mihatsch M. J., Sauter G., Kallioniemi O. P.: Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res.* 1999, 59, 803-806.
3. Bullock A. N., Fersht A. R.: Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer* 2001, 1, 68-76.
4. Camp R. L., Chernet L. A., Rimm D. L.: Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab. Invest.* 2000, 80, 1943-1949.
5. Chaib H., Rubin M. A., Mucci N. R., Taylor J. M. G., Day M. L., Rhim J. S., Macoska J. A.: Activated in prostate cancer: a PDZ domain-containing protein highly expressed in human primary prostate tumors. *Cancer Res.* 2001, 61, 2390-2394.
6. Chu L. L., Rutteman G. R., Kong J. M., Ghahremani M., Schmeing M., Misdorp W., van Garderen E., Pelletier J.: Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998, 50, 11-25.
7. Cotchin F.: Further observations on neoplasia in dogs with particular reference to site of origin and malignancy. *Br. Vet. J.* 1954, 110, 218.
8. Doré M., Lanthier I., Sirois J.: Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 2003, 40, 207-212.
9. Dutsch-Wicherek M.: RCAS1, MT, and Vimetin as Potential Markers of Tumor Microenvironment Remodeling. *Am. J. of Reprod. Immunol.* 2010, 63, 181-188.
10. Dutsch-Wicherek M., Wicherek L.: The association of RCAS1 serum concentration with the reversibility or irreversibility of the process of immune cytotoxic activity restriction during normal menstrual cycle, cancer relapse, and surgical treatment for various types of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008, 59, 266-275.
11. Easton D. F., Deffenbaugh A. M., Pruss D., Frye C., Wenstrup R. J., Allen-Brady K., Tavtigian S. V., Monteiro A. N., Iversen E. S., Couch F. J., Goldgar D. E.: A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the BRCA1 and BRCA2 breast cancer-predisposition genes. *Am. J. Hum. Genet.* 2007, 81, 873-883.
12. Heller D. A., Clifford C. A., Goldschmidt M. H., Holt D. E., Shofer F. S., Smith A., Sorenmo K. U.: Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Vet. Pathol.* 2005, 42, 776-780.
13. Horvath L., Henshall S.: The application of tissue microarrays to cancer research. *Pathology* 2001, 33, 125-129.
14. Kleiter M., Malarkey D. E., Ruslander D. E., Thrall D. E.: Expression of cyclooxygenase-2 in canine epithelial nasal tumors. *Vet. Radiol. Ultrasound* 2004, 45, 255-260.
15. Klopffleisch R., Schütze M., Gruber A. D.: RAD51 protein expression is increased in canine mammary carcinomas. *Vet. Pathol.* 2010, 47, 98-101.
16. Kodadek T.: Protein microarrays: Prospects and problems. *Chem. Biol.* 2001, 5, 40-45.
17. Lassus H., Laitinen M. P., Anttonen M., Heikinheimo M., Aaltonen L. A., Ritvos O., Butzow R.: Comparison of serous and mucinous ovarian carcinomas: Distinct pattern of allelic loss at distal 8p and expression of transcription factor GATA-4. *Lab. Invest.* 2001, 81, 517-526.
18. Levine A. J., Oren M.: The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Rev.* 2009, 9, 749-758.
19. Matsushima T., Nakashima M., Oshima K., Abe Y., Nishimura J., Nawata H., Watanabe T., Muta K.: Receptor binding cancer antigen expressed on SiSo cells, a novel regulator of apoptosis erythroid progenitor cells. *Blood* 2001, 15, 131-321.

20. Miettinen H. E., Jarvinen T. A., Kellner U., Kauraniemi P., Parwaresch R., Rantala I., Kalimo H., Paljärvi L., Isola J., Haapasalo H.: High topoisomerase II $\alpha$  expression associates with high proliferation rate and poor prognosis in oligodendrogliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2000, 26, 504-512.
21. Moulton J. E.: Tumors of the mammary gland, [w:] Moulton J. E. (ed): *Tumors in Domestic Animals*. University of California Press, Berkeley 1990, 3, 518-552.
22. Nakashima M., Sonoda K., Watanabe T.: Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat. Med.* 1999, 5, 928-942.
23. Nocito A., Bubendorf L., Tinner E. M., Süess K., Wagner U., Forster T., Kononen J., Fijan A., Bruderer J., Schmid U., Ackermann D., Maurer R., Alund G., Knönagel H., Rist M., Anabitar M., Hering F., Hardmeier T., Schoenenberger A. J., Flury R., Jäger P., Fehr J. L., Schraml P., Moch H., Mihatsch M. J., Gasser T., Sauter G.: Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J. Pathol.* 2001, 194, 349-357.
24. Paweletz C. P., Charboneau L., Bichsel V. E., Simone N. L., Chen T., Gillespie J. W., Emmert-Buck M. R., Roth M. J., Petricoin III E. F., Liotta L. A.: Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* 2001, 20, 1981-1989.
25. Petitjean A., Mathe E., Kato S., Ishioka C., Tavtigian S. V., Hainaut P., Olivier M.: Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent development in the ARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 2007, 28, 622-629.
26. Rihn B. H., Mohr S., McDowell S. A., Binet S., Loubinoux J., Galateau F., Keith G., Leikauf G. D.: Differential gene expression in mesothelioma. *FEBS Lett.* 2000, 480, 495-510.
27. Rousseau J., Têtu B., Caron D., Malenfant P., Cattaruzzi P., Audette M., Doillon C., Tremblay J. P., Guérette B.: RCAS1 is associated with ductal breast cancer progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 293, 1544-1549.
28. Schraml P., Kononen J., Bubendorf L., Moch H., Bissig H., Nocito A., Mihatsch M. J., Kallioniemi O. P., Sauter G.: Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin. Cancer Res.* 1999, 5, 1966-1975.
29. Sonoda K., Miyamoto S., Akashima M., Wake N.: The biological role of the unique molecule RCAS1: a bioactive marker that induces connective tissue remodeling and lymphocyte apoptosis. *Front. Biosci.* 2008, 13, 1106-1116.
30. Sonoda K., Miyamoto S., Hirakawa T., Yagi H., Yotsumoto F., Nakashima M., Watanabe T., Nakano H.: Clinical significance of RCAS1 as a biomarker of uterine cancer. *Gynecol. Oncol.* 2006, 103, 924-931.
31. Sonoda K., Miyamoto S., Hirakawa T., Yagi H., Yotsumoto F., Nakashima M., Watanabe T., Nakano H.: Invasive potency related to RCAS1 expression in uterine cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 2005, 99, 189-198.
32. Sonoda K., Nakashima M., Kaku T., Kamura T., Nakano H., Watanabe T.: A novel tumor-associated antigen expressed in human uterine and ovarian carcinomas. *Cancer* 1996, 77, 1501-1509.
33. Stratowa C., Löffler G., Lichter P., Stilgenbauer S., Haberl P., Schweifer N., Döhner H., Wilgenbus K. K.: CDNA microarray gene expression analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia proposes potential new prognostic markers involved in lymphocyte trafficking. *Int. J. Cancer* 2001, 91, 474-480.
34. Wicherek L.: Alternations in RCAS1 serum concentration levels during menstrual cycle in patients with uterine leiomyoma and lack of analogical changes in adenomyosis. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2009, 67, 195-201.
35. Wicherek L.: Alternations in RCAS1 serum concentration levels during the normal menstrual cycle and lack of analogical changes in ovarian endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008, 59, 535-544.
36. Xu R., Gan X., Fang Y., Zheng S., Dong Q.: A simple, rapid, and sensitive integrated protein microarray for simultaneous detection of multiple antigens and antibodies of five human hepatitis viruses (HBV, HCV, HDV, HEV, and HGV). *Anal. Biochem.* 2007, 362, 69-75.

**Adres autora: dr Bartosz Kempisty, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań;  
e-mail: etok@op.pl**