

**Mitochondrialna i jądrowa genomika w nowotworach sutka psów
(*Canis lupus familiaris*)**

**Mitochondrial and nuclear genomics in canine mammary tumours
(*Canis lupus familiaris*)**

mgr inż. Magdalena Marta Surdyka

Autoreferat pracy doktorskiej

Doctoral thesis

Promotor:

Prof. dr hab. Brygida Ślaska

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Promotor pomocniczy

Dr inż. Artur Gurgul

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy

Recenzenci:

Prof. dr hab. Urszula Czarnik

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Prof. dr hab. n. med. Jarosław Dudka

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 2018

Spis treści

Wykaz publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej:.....	3
Streszczenie	7
Summary	8
Wstęp.....	9
Cel pracy	12
Materiał i metody	13
Omówienie wyników	16
Analizy genomu mitochondrialnego	16
Analizy genomu jądrowego.....	19
Analiza asocjacji	22
Podsumowanie i wnioski.....	25
Piśmiennictwo	26

Wykaz publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej:

Surdyka, M., & Slaska, B. (2017). Defect of the mitochondrial DNA hypervariable region as a risk factor for canine mammary tumour. *Veterinary and comparative oncology*, 15(3), 820-828. DOI: 10.1111/vco.12224

Liczba punktów w roku publikacji: MNiSW = 45; IF`2017 = 2,270

Indywidualny wkład pracy w publikację – 80%: koncepcja pracy, opracowanie założeń metodycznych, realizacja badań laboratoryjnych, gromadzenie danych, analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach.

Surdyka, M., & Slaska, B. (2017). Defect in *ND2, COX2, ATP6* and *COX3* mitochondrial genes as a risk factor for canine mammary tumour. *Veterinary and comparative oncology*, 15(3), 1062-1072. DOI: 10.1111/vco.12247

Liczba punktów w roku publikacji: MNiSW = 45; IF`2017 = 2,270

Indywidualny wkład pracy w publikację – 80%: koncepcja pracy, opracowanie założeń metodycznych, realizacja badań laboratoryjnych, gromadzenie danych, analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach.

Surdyka, M., Gurgul, A., Slaska B., Pawlina K., Szmatoła T., Bugno-Poniewierska M., Smiech A., & Kasperek, K. 2018 (in press). Characterisation of genome-wide structural aberrations in canine mammary tumours using SNP genotyping assay. *Polish Journal of Veterinary Science*.

Liczba punktów w roku publikacji: MNiSW = 20; IF`2017 = 0,839

Indywidualny wkład pracy w publikację – 55%: koncepcja pracy, opracowanie założeń metodycznych, realizacja badań laboratoryjnych, gromadzenie danych, analiza i opracowanie wyników, sformułowanie wniosków, redagowanie manuskryptu, korekta po recenzjach.

Łączna liczba punktów MNiSW* = 110

IF (Impact factor) ** = 5,379

Udział w publikacjach = 72%

* Wykaz czasopism naukowych MNiSW

** Web of Science™ – Journal Citation Reports®

Streszczenie

Mitochondrialna i jądrowa genomika w nowotworach sutka psów (*Canis lupus familiaris*)

Celem pracy było określenie defektu genomu mitochondrialnego i jądrowego w nowotworach sutka psów z wykorzystaniem technik z zakresu genomiki oraz ustalenie związku tychże defektów z procesem transformacji nowotworowej. Realizacja założonego celu wymagała identyfikacji mutacji w regionie hiperzmiennym i wybranych genach genomu mitochondrialnego oraz analizy zmian liczby kopii i utraty heterozygotyczności w genomie jądrowym w nowotworach sutka psów i określenie ich związku z procesem transformacji nowotworowej i cechami fenotypowymi psów. Badaniami objęto łącznie 35 psów, u których zdiagnozowano nowotwór sutka, gromadząc jednocześnie informacje o ich cechach fenotypowych. Przeprowadzono analizy molekularne genomu mitochondrialnego i jądrowego tkanek kontrolnych i nowotworowych psów z wykorzystaniem technik z zakresu genomiki oraz wykonano analizy bioinformatyczne i statystyczne. Wyniki wskazują, że zaburzenia strukturalne w genomie mitochondrialnym i jądrowym, występujące w postaci polimorfizmów, mutacji, heteroplazmii, zmiany liczby kopii oraz utraty heterozygotyczności mogą być związane z nowotworami sutka psów. Odnotowano, po raz pierwszy w piśmiennictwie, heteroplazmię długości pętli D, która może być mutacją typu *hotspot* w nowotworach sutka psów. Na podstawie analizy wielkoskalowej genomu określono dominację amplifikacji nad delecjami oraz ich dwukrotnie większą wielkość. Ponadto stwierdzono reorganizacje strukturalne w postaci zmiany liczby kopii i utraty heterozygotyczności w komórkach germinalnych, do których doszło w obrębie genów *ZFPM2*, *EBAG9*, *AQP1* i *MSTN*. Wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy zaburzeniami strukturalnymi w mitochondrialnym i jądrowym DNA a wielkością i wiekiem psów chorych na nowotwór sutka, które mogą być czynnikami prognostycznymi tego typu nowotworu u psów. Stopień złośliwości nowotworu nie miał istotnego związku z zaburzeniami genomu mitochondrialnego, ale miał istotny związek z częstością występowania aberracji strukturalnych w genomie jądrowym psów z nowotworami sutka. Podsumowując, wyniki wskazują na istotny związek zaburzeń w genomie mitochondrialnym oraz jądrowym z nowotworami sutka psów i stanowią solidną podstawę do zrozumienia mechanizmów molekularnych w nich zachodzących.

Słowa kluczowe: mtDNA, nDNA, mutacje, aberracje strukturalne, nowotwór, pies

Summary

Mitochondrial and nuclear genomics in canine mammary tumours (*Canis lupus familiaris*)

The aim of the study was to identify the defect of the mitochondrial and nuclear genome in canine mammary tumours using genomics techniques and determine the relationship of these defects with the process of neoplastic transformation.. The accomplishment of the aim required identification of mutations in the hypervariable region and selected genes of the mitochondrial genome as well as analysis of the copy number variation and loss of heterozygosity in the nuclear genome in canine mammary tumours and determination of their relationship with the neoplastic transformation process and dog phenotypic traits. In total, tissue samples from 35 dogs with diagnosed canine mammary tumours were analysed. The molecular analyses of mitochondrial and nuclear genome of the control and tumour tissues of dogs were performed using genomics techniques. Bioinformatic and statistical analyses were also carried out. The results indicate that structural aberrations in the mitochondrial and nuclear genome, occurring as polymorphisms, mutations, heteroplasmy, copy number variation, and loss of heterozygosity may be associated with canine mammary tumours. For the first time in the literature, length heteroplasmy has been noted in the D-loop, which may be a hotspot mutation of mammary tumours of dogs. On the basis of the large-scale genome analysis, the dominance of amplification over deletions and their twice as long length was determined. Furthermore, structural reorganisations such as copy number variations and loss of heterozygosity in germ cells in genes ZFPM2, EBAG9, AQP1 and MSTN were found. A statistically significant relationship was found between structural aberrations in mitochondrial and nuclear DNA and the size and age of dogs with mammary tumour, which may be prognostic factors of this type of cancer in dogs. The degree of mammary tumours were not significantly correlated with the disorders in the mitochondrial genome, but had a significant impact on the frequency of structural aberrations in the nuclear genome of dogs with mammary tumours. In summary, the results indicate a significant relationship of disorders in the mitochondrial and nuclear genome with mammary tumours and provide a solid basis for understanding the molecular mechanisms involved in them.

Key words: mtDNA, nDNA, mutations, structural aberrations, tumour, dog

Wstęp

Pies (*Canis lupus familiaris*) to częsty lokator wielu gospodarstw domowych, nie dziwi więc fakt rosnącego zainteresowania właścicieli i hodowców psów szybką diagnozą i skutecznym leczeniem ich chorób. Mechanizmy naturalnej ewolucji oraz rygorystyczne programy hodowlane doprowadziły do skrajnej różnorodności fenotypowej przyczyniając się jednocześnie do zwiększenia liczby chorób dziedzicznych psów, których na chwilę obecną opisano 719. W przypadku 420 zaburzeń występujących u psów udowodniono genetyczne podobieństwo pomiędzy jednostkami chorobowymi psa i człowieka w tym nowotworami, chorobami serca czy zaburzeniami neurologicznymi.¹

Nowotwór gruczołu sutkowego psów jest heterogenną chorobą o złożonym podłożu, jednak wiedza na temat genetycznych czynników ryzyka wpływających na ten nowotwór jest nadal niewystarczająca. Wiadomo jednak, że guzy gruczołu sutkowego są drugim pod względem częstości nowotworem psów i najczęściej występującym nowotworem wśród suk, stanowiąc 52% wszystkich diagnozowanych u nich guzów. Dodatkowo w ponad 80% przypadków nowotwory sutka są zmianami złośliwymi. Podobna sytuacja obserwowana jest w przypadku nowotworów piersi u kobiet, u których rak piersi jest drugą najczęstszą przyczyną zgonów.² Odnotowana skłonność rasowa chorób nowotworowych psów³ sugeruje duże znaczenie elementu genetycznego w transformacji nowotworowej a identyfikacja genetycznych czynników ryzyka może być pomocna w prewencji i leczeniu tego typu schorzeń oraz daje możliwość testowania nowych strategii terapeutycznych.

Najnowsze badania na ogół skupiają się na poznaniu podstawowej biologii nowotworów psów, jak również zdolności nowotworów do tworzenia przerzutów. Jednak równie ważne wydaje się być poznanie czynników ryzyka rozwoju chorób nowotworowych oraz czynników prognostycznych, które mogą wskazywać na przewidywany przebieg choroby i jej rokowanie. Światowa Organizacja Zdrowia (*The World Health Organization – WHO*) przedstawiła histologiczną klasyfikację nowotworów sutka psa, jednak brakuje w niej niektórych kluczowych elementów prognostycznych, które rozważane są w histologicznej klasyfikacji nowotwór piersi u kobiet. Uzupełnienie brakujących informacji na temat biomarkerów prognostycznych nowotworów sutka psów i przeklasyfikowanie aktualnego stanu wiedzy może znacznie ulepszyć strategie terapeutyczne stosowane w leczeniu psów. Wyniki dotychczasowych analiz asocjacyjnych wskazują, że stopień złośliwości nowotworu jest wiarygodnym wskaźnikiem

prognostycznym nowotworów sutka psów, a klasyfikacja histologiczna jest pomocna we wskazaniu właściwego leczenia tego typu nowotworu.⁴ Udowodniono również, że rasa i/lub wielkość ciała psów może być czynnikiem predysponującym do wystąpienia nowotworu. Rekomendowane jest więc jednocześnie uwzględnienie wielkości i wieku psów.⁵ Wyniki badań wykazują również, że tak jak u kobiet ryzyko wystąpienia nowotworu sutka u psów rośnie wraz z wiekiem. Nowotwory te w zależności od rasy rzadko występują przed piątym rokiem życia psa a ryzyko ich wystąpienia znacznie wzrasta między 8 a 13 rokiem życia.^{4,6}

Cechą charakterystyczną komórek nowotworowych jest duża zmienność ich genomowego DNA, zmiany dotyczą zarówno genomu mitochondrialnego, jak i jądrowego i obejmują nie tylko mutacje punktowe, czy małe delecje lub insercje, ale także duże aberracje strukturalne czy ploidie chromosomów.

Obecność licznych mutacji somatycznych w mitochondrialnym DNA została udokumentowana w ludzkich komórkach nowotworowych.⁷ Mutacje zidentyfikowane zostały zarówno w niekodującym hiperzmiennym regionie, czyli pętli D, szczególnie narażonej na powstawanie mutacji,⁸ jak i w genach kodujących białka, w tym w genie kodującym 2. podjednostkę dehydrogenazy NADH (*ND2*), genie kodującym 2. i 3. podjednostkę oksydazy cytochromu c (*COX2*, *COX3*) oraz genie kodującym 6. podjednostkę syntazy ATP (*ATP6*). Ze względu na fakt, że wspomniane geny odpowiedzialne są za kodowanie polipeptydów będących elementami I, IV i V kompleksu systemu fosforylacji oksydacyjnej, szczególną uwagę należy zwrócić na zaburzenia w nich występujące. Ponieważ, na co wskazuje dotychczasowy stan wiedzy, mogą one mieć ścisły związek z metabolizmem tlenowym komórki, a ten z kolei bez wątpienia ma związek z jej przekształceniem w komórkę nowotworową. Jednak dokładna rola i mechanizm mutacji mtDNA w transformacji nowotworowej pozostaje nieznana. Stan wiedzy z zakresu onkogenomiki mitochondrialnej człowieka jest dość bogaty. Niestety nie można tego samego stwierdzić w odniesieniu do medycyny weterynaryjnej a w szczególności chorób nowotworowych występujących u najczęstszych pacjentów klinik weterynaryjnych, jakimi są psy. Nadal bez odpowiedzi pozostaje pytanie, czy zmiany zaistniałe w sekwencji mtDNA są przyczyną czy skutkiem transformacji nowotworowej. Brak jest raportów na temat identyfikacji mutacji i polimorfizmów w mtDNA u psów ze zdiagnozowanym nowotworem sutka. Badania podłoża genetycznego tego schorzenia są istotne ze względu na możliwość ich wykorzystania w diagnostyce weterynaryjnej.

W badaniu podłoża genetycznego nowotworów sutka psów, należy również zwrócić uwagę na aberracje w nDNA. Przypuszcza się, że pojawiają się one w trakcie procesu ewolucji komórki zdrowej w komórkę nowotworową, promującej genom guza, który zapewnia lepszy wzrost i przeżywalność nowotworu względem innych komórek. Analizy wielkoskalowe genomu stały się narzędziem wykorzystywanym do identyfikacji aberracji genomowych w ludzkich komórkach nowotworowych, w tym także w przypadku nowotworów piersi.⁹ Podobne podejście zaczyna być realizowane również w onkogenomice zwierząt.^{10,11} Zmiana liczby kopii (*Copy number variation*, CNV) i utrata heterozygotyczności (*Loss of heterozygosity*, LOH) to dwa typy niestabilności genetycznej związane z nowotworami. CNVs definiowane są jako segmenty DNA o wielkości ≥ 1 kpz, w których obserwuje się relatywne zwiększenie lub zmniejszenie liczby kopii w porównywanych genomach.¹² LOH jest częstym zaburzeniem genetycznym obserwowanym w nowotworach na różnych etapach ich rozwoju, powstającym wskutek utraty fragmentu materiału genetycznego przez zdrową, heterozygotyczną komórkę i przekształcenie części lub całości jej genomu w homozygotyczną formę nowotworową.¹³ CNVs będące utratą lub zyskiem liczby kopii, jak też LOHs występujące jako niestabilność alleliczna, czy neutralna pod względem liczby kopii utrata heterozygotyczności, mogą skutkować inaktywacją genów supresorowych nowotworu, albo aktywacją onkogenów, co z kolei może przyczynić się do niekontrolowanego wzrostu i rozsiewu nowotworu. Zatem identyfikacja CNVs i LOHs w próbach nowotworowych jest niezbędna do zrozumienia podłoża genetycznego nowotworów, procesu ich inicjacji, progresji i różnicowania się.

Brak bezpośredniego wskazania, jakie zaburzenia strukturalne w genomie mitochondrialnym i jądrowym mogą mieć związek z nowotworem sutka psów, skłoniło mnie do podjęcia tej tematyki badawczej w niniejszej pracy doktorskiej.

Cel pracy

Celem pracy było określenie defektu genomu mitochondrialnego i jądrowego w nowotworach sutka psów z wykorzystaniem technik z zakresu genomiki oraz ustalenie związku tychże defektów z procesem transformacji nowotworowej.

Realizacja założonego celu wymagała identyfikacji mutacji w regionie hiperzmiennym i wybranych genach genomu mitochondrialnego oraz analizy zmian liczby kopii i utraty heterozygotyczności w genomie jądrowym w nowotworach sutka psów i określenie ich związku z procesem transformacji nowotworowej i cechami fenotypowymi psów.

Material i metody

Badaniami objęto łącznie 35 psów różnych ras, u których zdiagnozowano nowotwór sutka. Dla każdego osobnika zgromadzono informację na temat specyfikacji rasowej, płci i wieku psów oraz typu nowotworu i stopnia jego złośliwości. Psy nie zostały poddane hormonoterapii ani chemioterapii. W analizach genomu mitochondrialnego uwzględniono DNA wyizolowane z pooperacyjnych tkanek nowotworowych (n=31), tkanek zdrowych (n=31) oraz krwi (n=31), w analizach genomu jądrowego wykorzystano materiał genetyczny pozyskany z tkanek nowotworowych (n=24) i tkanek zdrowych (n=24) psów z grupy objętej badaniami.

Materiał biologiczny pobrano do sterylnych probówek z antykoagulantem z K₂EDTA i sterylnych pojemników. Przed izolacją z każdego chirurgicznie usuniętego guza pobrano skrawki do analizy histopatologicznej, mającej na celu określenie typów histologicznych badanych tkanek. Mikroskopowa analiza guzów została przeprowadzona zgodnie z histologiczną klasyfikacją WHO. Stopień złośliwości nowotworów oceniono za pomocą trzystopniowej skali.^{14,15}

Do izolacji DNA wykorzystano komercyjny zestaw – *DNeasy Blood and Tissue Kit* (*Qiagen*, Hilden, Niemcy). Wyizolowany materiał genetyczny poddano ocenie jakościowej (elektroforeza w żelu agarozowym) oraz ocenie ilościowej (spektrofotometr *BioPhotometer Eppendorf*, Hamburg, Niemcy). Kolejne etapy analiz prowadzone były dwutorowo.

Analizę wybranych fragmentów genomu mitochondrialnego przeprowadzono techniką łańcuchowej reakcji polimerazy DNA (PCR) w termocyklerze *Labocycler* (*Sensoquest Biomedical*). Startery wykorzystane w analizach zostały zaprojektowane z wykorzystaniem Primer-BLAST¹⁶ lub zaczerpnięte z piśmiennictwa.¹⁷ Profil temperaturowo-czasowy reakcji dla poszczególnych fragmentów ustalono eksperymentalnie.

Produkty reakcji PCR zwizualizowano w 2% żelu agarozowym. Amplikony oczyszczono, a następnie zsekwencjonowano z wykorzystaniem *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystem*, USA) w *GeneAmp PCR system 9700* (*Applied Biosystem*, USA) zgodnie ze standardowym protokołem producenta.

Amplikony zostały poddane analizom, których celem było określenie miejsc występowania mutacji i polimorfizmów w obrębie analizowanych fragmentów mtDNA, w każdej z tkanek poszczególnych osobników (*DNA Baser Sequence Assembler v4* (2013); *MEGA v 6.06* (2014); *Chromas v2.1.1* (2012)). Sekwencję nukleotydowe pętli D i genów objętych analizami (*ND2*, *COX2*, *ATP6*, *COX3*), wszystkich analizowanych prób porównano z sekwencją referencyjną

(*GenBank accession No.* U96639).¹⁸ W przypadku mutacji sekwencja referencyjna posłużyła tylko ustaleniu pozycji nukleotydowych, a mutacje wytypowano porównując sekwencje krwi i tkanki z guzem z sekwencją tkanki zdrowej.¹³ Dla opisanie różnic między wszystkimi pobranymi rodzajami tkanek a sekwencją referencyjną użyto określenia polimorfizm.

Analizy statystyczne przeprowadzono uwzględniając: stopień złośliwości (G1, G2, G3), wielkość ciała (małe, średnie, duże)¹⁵ oraz wiek psów dużych (7-8 i 12-13 lat). Prawdopodobieństwo wystąpienia SNP z uwzględnieniem założonego podziału obliczono przy pomocy testu dokładnego Fishera ($p \leq 0,05$). Zbiory danych posłużyły również do przeprowadzenia analiz asocjacyjnych z wykorzystaniem uogólnionego modelu liniowego (*Generalized linear model*; GLM) za pomocą programu SAS 9.4 ($p \leq 0,05$).

Prawdopodobieństwo wystąpienia efektu funkcjonalnego białka spowodowane substytucją aminokwasową oszacowano przy pomocy narzędzia *Panther Classification System*. Do oceny właściwości fizyko-chemicznych białek wykorzystano serwer *Expasy's ProtParam*.¹⁹ Metodą SOPMA²⁰ (*self-optimized prediction method*) została wykorzystana do przewidzenia struktury drugorzędowej sekwencji białkowych, zaś w przewidywaniu helis transmembranowych posłużono się Modelem Markowa (TMHMM).²¹

Analizy genomu jądrowego przeprowadzono techniką wysokowydajnych mikromacierzy powalających na genotypownie SNP (*Single nucleotide polymorphism*; polimorfizmy pojedynczych nukleotydów). Próbki DNA poddano genotypowaniu z użyciem mikromacierzy zawierającej sondy dla 170.000 SNP o znanych pozycjach w sekwencji referencyjnej *CanFam2.0*, w tym 1.547 niepolimorficznych sond dedykowanych tylko do analizy CNV. SNP były rozmieszczone w genomie ze średnią gęstością ok. 70 SNP na 1 milion par zasad (Mpz). Otrzymane w wyniku skanowania macierzy dane zostały ocenione pod kątem parametrów jakościowych takich jak: *rate and log R ratio standard deviation*. Aberracje zostały wykryte przy użyciu oprogramowania dedykowanego dla danych nowotworowych - *OncosNP*²². Umożliwia ono wykrycie zmienności liczby kopii i utraty heterozygotyczności w próbkach guzów na podstawie danych z mikromacierzy SNP i identyfikuje aberracje charakterystyczne wyłącznie dla próbek nowotworowych, traktując dane dla tkanki zdrowej jako tło. Dalsze analizy, takie jak sprawdzenie regionów nakładających się, łączenie segmentów i statystykę przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Plink (v1.07).²³

Miejsca potencjalnie najbardziej narażone na powstawanie aberracji liczby kopii wytypowano zakładając, że pokrywają one od 1 do 10% długości chromosomu, a ich liczba była

większa niż 10. Częstości aberracji dla poszczególnych grup (stopień złośliwości, wielkość ciała, wiek psów) obliczono jako średnia częstość aberracji w poszczególnych regionach genomu. Analizy asocjacyjne przeprowadzono w systemie *case-control* dla zmiennych: stopień złośliwości, wielkość ciała i wiek psów sklasyfikowanych jako duże. Identyfikacja i analiza funkcjonalna genów zlokalizowanych w obrębie zidentyfikowanych CNVs i LOHs została przeprowadzona za pomocą narzędzia internetowego *UCSC Genome Browser*.²⁴ Zidentyfikowane geny przeanalizowano pod kątem funkcji kodowanych przez nie białek i procesów biologicznych wykorzystując do tego system klasyfikacji PANTHER.^{25,26}

Badanie zostało zatwierdzone przez II Lokalną Komisję Etyczną w zakresie doświadczeń na zwierzętach w Lublinie (Uchwała nr 6/2013).

Omówienie wyników

Wyniki wieloletnich analiz genomów mitochondrialnego i jądrowego, wskazują na związek zaburzeń w nich występujących z procesem transformacji nowotworowej. Jednakże różnorodność obserwowanych zmian i niejednokrotnie sprzeczne wyniki badań sprawiają, że opinie na temat klinicznego znaczenia defektów w obu genomach w nowotworach są zadziwiająco rozbieżne i wymagają uzupełnienia i usystematyzowania. Tematyka podjęta w niniejszej pracy jest nowatorską próbą zbadania zaburzeń w genomie mitochondrialnym i jądrowym psów chorych na nowotwór sutka.

Analizy genomu mitochondrialnego

Dotychczasowy stan wiedzy w temacie zaburzeń w genomie mitochondrialnym wskazuje, że mogą one zmieniać funkcje łańcucha transportu elektronów i promować powstawanie reaktywnych form tlenu (*Reactive oxygen species*, ROS), które z kolei w jeszcze większym stopniu uszkadzają strukturę mtDNA. Dodatkowo produkcja ROS może powodować uszkodzenia genomu jądrowego i prowadzić do inicjacji i promocji nowotworu.^{27,28} Brak jest natomiast doniesień dotyczących zaburzeń w genomie mitochondrialnym psów chorych na nowotwór sutka. Jedyne nieliczne raporty donoszą o polimorfizmach w hiperzmiennym fragmencie mtDNA, w nowotworach złośliwych głowy, szyi i kończyn.²⁹

Pionierskie wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, wskazują na obecność licznych polimorfizmów i kilku mutacji w pętli D i czterech fragmentach genów tj. *ND2*, *COX2*, *ATP6*, *COX3*. W sekwencji hiperzmiennego regionu mtDNA zidentyfikowano 26 miejsc polimorficznych, wśród których 24 zmiany miały charakter jednonukleotydowych substytucji (tranzycji lub transwersji). Ponadto wystąpiła pojedyncza insercja guaniny i delecja cytozyny. Najwyższą frekwencję polimorfizmów (94%) odnotowano w pozycji m.15814. We wszystkich czterech fragmentach genów odnotowano łącznie 28 zmian polimorficznych, w tym 27 substytucji i jedną delecję (m.8313delA), której frekwencja wyniosła 100%.

W dostępnej literaturze brak jest doniesień na temat polimorfizmów w sekwencji mitochondrialnej pętli D, oraz genach *ND2*, *COX2*, *ATP6*, *COX3* w nowotworach sutka psów. Prawdopodobnie, wynika to z faktu, że zmiany o charakterze polimorfizmów zazwyczaj wiązane są z procesem ewolucji, jednak – biorąc pod uwagę duże tempo zmian sekwencji genomu

mitochondrialnego oraz ich mnogość – rozróżnienie, które z nich mają charakter neutralny, a które patogeny jest trudne.

We wszystkich analizowanych fragmentach mtDNA zidentyfikowano łącznie 16 zmian o charakterze mutacji, będących jednonukleotydowymi substytucjami (Tab. 1). W pętli D zidentyfikowano 5 mutacji we krwi jednego osobnika, które spowodowały zmianę w jego przynależności do haplotypu z A18 na A17. Pozostałe mutacje zidentyfikowane zostały w fragmentach genów *COX2*, *ATP6*, *COX3* i obserwowane były zarówno w guzie jaki i krwi (Tab. 1). W dziewięciu przypadkach spowodowały synonimiczną zmianę aminokwasów, w pozostałych dwóch tj. m.7383T/C (*COX2*), m.9193C/T (*COX3*) doszło do niesynonimicznej zmiany aminokwasów asparaginy na serynę (N117S) i alaniny na treoninę (A184T).

Mutacje w sekwencji mtDNA są przedmiotem badań w kontekście ludzkich nowotworów, jednak w odniesieniu do nowotworów sutka psów dotychczas nie odnotowano podobnych raportów. Z wyników badań prowadzonych na ludzkich nowotworach piersi wynika, że mutacje zarówno w pętli D, jak i w genach kodujących białko, najczęściej w genach *ND2*, *ND5*, *ATP6*, *ATP8*, *CYTB* czy *COX3*, mają związek z transformacją nowotworową.^{30,31} Autorzy, uwzględniając zarówno obecność jak i liczbę mutacji w mtDNA, stwierdzili, że pacjenci z dwoma lub większą liczbą mutacji w mtDNA mają znacznie gorszy wskaźnik przeżycia niż ci bez mutacji lub z jedną mutacją.³¹ W przypadku badań własnych, dalsza obserwacja rozwoju choroby mogłaby pomóc stwierdzić, czy mutacje w genomie mitochondrialnym psów z nowotworem sutka miały wpływ na parametry kliniczne i wskaźnik przeżycia.

Ocena możliwego szkodliwego wpływu niesynonimicznych zmian aminokwasów, wykazała brak ich znaczącego wpływu na wartość takich parametrów jak: punkt izoelektryczny, indeks alifatyczny, GRAVY (hydrofobowość białka), stabilność białka. Niewielkie zmiany w wartości tych parametrów wskazują, że zmiany aminokwasowe wywołane mutacjami nie mają niekorzystnego wpływu na białko oraz łańcuch transportu elektronów. Analizy pozwoliły również stwierdzić, że niesynonimiczne zmiany aminokwasów (N117S, A184T) nie wywarły wpływu, ani na strukturę drugorzędową kodowanych przez nie białek, ani na ilość sekwencji transmembranowych.

Do niedawna uważano, że zmiany synonimiczne czyli tzn. *silent* SNPs, ze względu na fakt, iż nie powodują zmiany aminokwasowej – nie wpływają na strukturę i funkcjonalność białek, są więc dla organizmu neutralne. Jednak aktualny stan wiedzy pozwala twierdzić, że synonimiczne zamiany nukleotydu mogą prowadzić do syntezy produktu białkowego o tej samej sekwencji

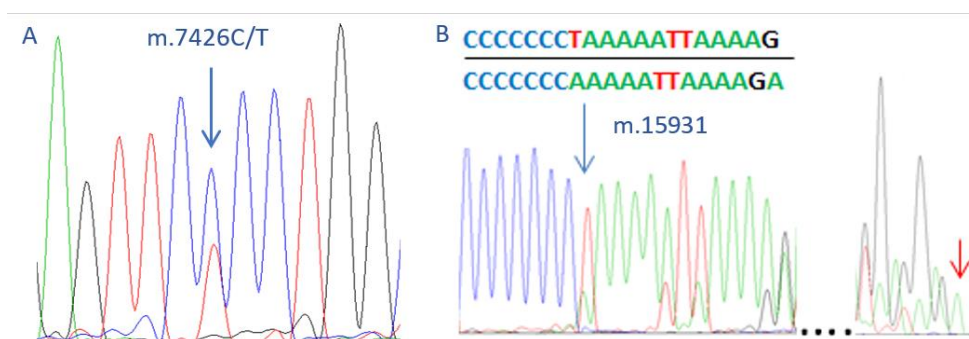
aminokwasów, lecz różnych właściwościach strukturalnych i funkcjonalnych.²³ Obecność takich zmian może oddziaływać na składanie mRNA, na stabilność i strukturę transkryptów, a także na procesy związane z transkrypcją i obróbką potranslacyjną.²⁵ Zatem *silent* SNPs nie powinny być pomijane w określaniu prawdopodobieństwa rozwoju różnych chorób i być brane pod uwagę w spersonalizowanych programach leczenia. Prawdopodobne jest więc, że zaburzenia zarówno o charakterze polimorfizmów, jak i mutacji w pętli D i genach *ND2*, *COX2*, *ATP6*, *COX3* nie były neutralne dla rozwoju nowotworu sutka psów objętych badaniem.

Tabela 1. Mutacje w genomie mitochondrialnym psów z nowotworem sutka

Numer osobnika	Typ nowotworu	Sekwencja tkanki zdrowej	Sekwencja tkanki z guzem	Sekwencja krwi	Zmiana aminokwasu/haplotypu
Pętla D					
63	Rak cewkowo-brodawkowaty	m.15475A	m.15475A	m.15475G	A18→A17
		m.15627T	m.15627T	m.15627C	
		m.15639A	m.15639A	m.1563TA	
		m.15750G	m.15750G	m.15750A	
		m.16025A	m.16025A	m.16025G	
COX2					
63	Rak cewkowo-brodawkowaty	m.7383T	m.7383T	m.7383C	p.N117S
		m.7426T	m.7426T	m.7426C/T (heteroplazmia)	p.G131G
ATP6					
38	Rak cewkowo-brodawkowaty	m.8101T	m.8101C	m.8101C	p.Q46Q
		m.8221G	m.8221T	m.8221T	p.G86G
		m.8225G	m.8225A	m.8225A	p.L88L
		m.8242C	m.8242T	m.8242T	p.T93T
		m.8323C	m.8323T	m.8323T	p.K120K
63	Rak cewkowo-brodawkowaty	m.8242C	m.8242C	m.8242T	p.T93T
		m.8281A	m.8281A	m.8281G	p.I106I
123	Kostniakomięsak	m.8323T	m.8323C	m.8323C	p.K120K
COX3					
63	Rak cewkowo-brodawkowaty	m.9193C	m.9193T	m.9193T	p.A184T

Poza licznymi polimorfizmami i kilkunastoma mutacjami obserwowanymi w mtDNA osobników objętych badaniami, zidentyfikowano również heteroplazmię. Heteroplazmia obserwowana wyłącznie w genomie mitochondrialnym może mieć dwojaką postać. Może polegać na punktowej substytucji pojedynczego nukleotydu, wówczas ma postać heteroplazmii SNP. Zjawisko takie zaobserwowano w pozycji m.7426 genu *COX2*, gdzie we krwi jednego z osobników

jednocześnie obecna była cytozyna i tymina (Rys. 1A). Drugi typ heteroplazmii to heteroplazmia długości, którą obserwowano w pętli D w pozycji m.15931_delT (Rys. 1B). Doszło tu do delecji tyminy i dalszej równoległej replikacji dwóch wariantów sekwencji pętli D, czyli wariantu dominującego i wariantu z heteroplazmią. Zjawisko to obserwowane po raz pierwszy u psów wystąpiło w 100% analizowanych sekwencji pętli D. O ile heteroplazmia SNP uważana jest za zjawisko rzadkie, o tyle heteroplazmia długości jest dość często odnotowywana w genomie mitochondrialnym, a jej przyczyn uparuje się w poślizgu polimerazy DNA podczas replikacji, w wyniku czego dochodzi do współistnienia w mitochondrium, komórce lub tkance dwóch lub więcej wariantów długości mtDNA. Zjawisko to jest często obserwowane w regionie kontrolnym mtDNA, czego potwierdzeniem są wyniki otrzymane w niniejszej pracy doktorskiej. U psów heteroplazmia długości zidentyfikowana została na odcinku kodującym polyT w pozycji od m.16661 do m.16674.³² Mimo braku związku heteroplazmii z typem tkanki, ten rodzaj polimorfizmu obserwowany ze 100% frekwencją, potencjalnie może być markerem nowotworu sutka psów. Być może warto poświęcić więcej uwagi hiperzmiennemu regionowi mtDNA w kontekście nowotworów sutka psów.



Rysunek 1. Heteroplazmia SNP w pozycji m.7426 genu *COX2* (A), heteroplazmia długości w pozycji m.15931_delT pętli D (B).

Analizy genomu jądrowego

Zmiana liczby kopii i utrata heterozygotyczności, stanowiąc jedno ze źródeł różnorodności genetycznej, stały się przedmiotem intensywnych badań współczesnej onkogenomiki. W przypadku nowotworów utrata heterozygotyczności jest częstszym zjawiskiem niż aberracje liczby kopii, ponieważ powoduje nieodwracalną utratę jednego z rodzicielskich alleli. Natomiast zyski liczby kopii (amplifikacje) często są nietrwałe, ponieważ poddawane są procesowi selekcji

negatywnej. Analizy mikromacierzy wykorzystane są w badaniach z zakresu onkogenomiki do określenia lokalizacji CNVs i LOHs w całym genomie.³³ Nowatorskie podejście zaproponowane w niniejszej pracy doktorskiej przybliża do poznania aberracji strukturalnych specyficznych dla nowotworów sutka psów.

Analizy wielkoskalowe genomów psów objętych badaniami pozwoliły na identyfikację 1765 unikalnych CNVs, 2799 germinalnych LOHs i 586 somatycznych LOHs. W analizowanych tkankach guza częstość występowania indywidualnych CNVs mieściła się w zakresie od 4% do 33%, dla germinalnych LOHs (G-LOHs) wahała się od 4,2% do 20,8%, zaś dla somatycznych LOHs (S-LOHs) była w zakresie od 4,2% do 33,3%. Wyniki analiz pozwalają stwierdzić, że we wszystkich analizowanych wariantach doświadczenia zmiany o charakterze amplifikacji były dłuższe i częstsze niż delecje. Przewagę zdarzeń o charakterze amplifikacji nad delecjami, zarówno co do ilości, jak i długości obserwowano w ludzkich nowotworach, w tym w nowotworach sutka i piersi.³⁴ Istnieją raporty donoszące o wysokiej frekwencji amplifikacji pewnych regionów chromosomów u pacjentek chorych na nowotwór piersi.³⁵ Często regiony te określane są jako „gorące miejsca” (*Hotspots*) transformacji nowotworowej. Pochodzenie i utrwalenie się takich regionów w genomie jest wciąż niejasne. Przypuszczalnie jednak do pierwszych rearanżacji genomu, prowadzących do amplifikacji, dochodzi już na początku procesu nowotworzenia, stąd też liczne i rozległe zmiany amplifikacyjne mogą kumulować się w stosunkowo długim czasie, prowadząc do ich utrwalenia się w genomie komórek nowotworowych, a w konsekwencji uznania ich za miejsca odgrywające istotną rolę w transformacji nowotworowej.

Obserwowana w badaniach własnych znaczna przewaga w ilości amplifikacji nad delecjami, oraz ich dwukrotnie większa długość może świadczyć o większym wpływie tego typu zmian na genom, bądź mniejszej wykrywalności zmian o charakterze delecji. Wysoce prawdopodobne jest również, że przewaga zdarzeń o charakterze amplifikacji nad delecjami jest efektem transformacji komórki zdrowej w komórkę nowotworową. Udowodniono, że amplifikacja genów jest typowym zaburzeniem genetycznym w przypadku nowotworów, a wiele onkogenów zostało zidentyfikowanych w regionach genomu, w których doszło do amplifikacji.

Sekwencje genomu jądrowego, które zasługują na szczególną uwagę, to tak zwane miejsca łamliwe chromosomów (*Chromosomal fragile sites*), czy miejsca na chromosomach, które wykazują tendencje do tworzenia przewężeń i „złamań” gdy komórka narażona jest na stres replikacyjny. W ludzkim genomie zidentyfikowano ponad 100 takich miejsc. Miejsca te charakteryzuje duża heterogenność, a ich długość w ludzkim genomie waha się od 0,3 do 9 Mbp.

Regiony takie zidentyfikowane zostały w różnych typach nowotworów³⁶ i kandydują na regiony, które przez swoją podatność na przełamania mogą inicjować amplifikację fragmentów DNA.

W niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy wskazano regiony w nDNA psów chorych na nowotwór sutka, potencjalnie najbardziej wrażliwe na pęknięcia nici DNA lub błędy replikacji, łącznie wytypowano 16 takich regionów (o wysokiej częstości CNVs), 36 częstych regionów G-LOHs i 3 regiony o podwyższonej częstości występowania S-LOHs. Ponadto, dla każdego analizowanego wariantu wyznaczono unikalne regiony nakładające się tzn. (*Overlaps*). Wśród wszystkich zidentyfikowanych CNVs odnotowano 41 regionów nakładających się (CNVRs), wśród germinalnych LOHs zidentyfikowano 68 takich regionów (G-LOHRs), dla wariantu somatycznej utraty heterozygotyczności wyznaczono 37 regionów *overlaps* (S-LOHRs). Największą średnią długość miały regiony S-LOHRs i wynosiła ona 58,22 Mpz, CNVRs miały średnią wielkość 51,75 Mpz, najkrótsze były regiony G-LOHRs, a ich średnia długość wynosiła 30,83 Mpz. Analiza dystrybucji CNVRs, G-LOHRs i S-LOHRs przeprowadzona dla pojedynczych chromosomów wykazała, że największe pokrycie sekwencji przez aberracje odnotowano na chromosomie 1. i dotyczyło wszystkich analizowanych typów aberracji.

Brak raportów dotyczących analiz wielkoskalowych genomów psów chorych na nowotwór sutka, oraz odmienne podejście metodyczne w nielicznych analizach mikromacierzy prowadzonych na innych gatunkach sprawia, że porównanie wyników własnych do tych otrzymanych przez inne grupy badawcze jest trudne. Utrudnienie stanowi też fakt, że zidentyfikowane CNVRs w zdecydowanej większości stanowią bardzo długie regiony kumulujące w sobie, większość lub wszystkie CNVs obserwowane na danym chromosomie. Wielkość regionów zmiennych zaobserwowanych przez inne grupy badawcze była znacznie krótsza, a ich ilość większa, mimo mniejszej wyjściowej liczby CNVs. Obecność 88 regionów CNVRs, zajmujących w sumie 22,45 Mpz sekwencji genomu psa obserwował Gurgul i wsp.¹⁰ Również w tym przypadku pokrycie chromosomu przez regiony CNVRs było niewielkie w porównaniu do CNVRs zidentyfikowanych w niniejszej pracy. Dużą zaletą analiz przeprowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej było wykorzystanie wysokowydajnego narzędzia obliczeniowego, dedykowanego próbom nowotworowym, czyli oprogramowania *OncoSNP*, które pozwoliło na identyfikację aberracji strukturalnych specyficznych wyłącznie dla tkanek nowotworowych, sprawiając tym samym, że wyniki otrzymane w pracy doktorskiej są pionierskie w skali światowej.

Analiza genów występujących w obrębie CNVRs, G-LOHRs i S-LOHRs wykazała, że najwięcej genów zidentyfikowano w przypadku somatycznych LOHRs (n=28.225). W pozostałych dwóch wariantach zawartość genów była porównywalna i wynosiła 27.685 dla CNVR, 27.504 dla G-LOHRs. Szczególną uwagę zwrócono na geny występujące w obrębie rejonów potencjalnie bardziej narażonych na aberracje we wszystkich analizowanych wariantach. Dla wariantu CNV wytypowano łącznie 17 genów kodujących białka i microRNA, dla aberracji G-LOH 37 genów, a dla S-LOH były to 4 geny. Jak wynika z dostępnych danych literaturowych, spośród wszystkich genów, nieprawidłowości strukturalne w czterech z nich, tj. w *ZFPM2*, *EBAG9*, *AQP1* i *MSTN* mają wpływ na zaburzenia biologicznych funkcji komórki powszechnie związanych z transformacją nowotworową. Produkty białkowe wszystkich wyżej wymienionych genów wiązane są z zaburzeniami w kontrolowanej śmierci komórki u psów, homeostazy czy odpowiedzi na stres. W badaniach asocjacyjnych całego genomu psów rasy springer spaniel angielski zidentyfikowano kilka genów potencjalnie powiązanych z nowotworami sutka, był to m.in. gen *CDK5RAP2*, który zaangażowany jest w regulację cyklu komórkowego.²

Analiza asocjacji

Ze względu na częste występowanie nowotworów gruczołu sutkowego u psów, czynniki ryzyka związane ze zwiększonym występowaniem tego typu nowotworu budzą spore zainteresowanie naukowców już od ponad 40 lat. Większą częstość występowania nowotworu gruczołu sutkowego stwierdzono po 5 roku życia, a maksymalnie między 9 a 11 rokiem życia psa. Nowotwory sutka są rzadko wykrywane u psów w wieku poniżej 2 lat. Wykazano również, że większe ryzyko wystąpienia tego typu nowotworu obserwuje się u psów dużych niż małych, a za najmniej narażone rasy uznano boksera, psa nierasowego i chihuahua, czyli rasy zaliczane do małych lub średnich.³⁷ Analizy asocjacyjne prowadzone są też w kontekście stopnia złośliwości nowotworu. Histologiczna klasyfikacja nowotworów sutka u psów mówi o trzech stopniach złośliwości: I, II, III. Wykazano różnice w przeżywalności psów z różnym stopniem złośliwości nowotworu. U psów z nowotworem gruczołu sutkowego o III stopniu złośliwości przeżywalność była gorsza niż w przypadku I i II stopnia złośliwości. Wyższy stopień złośliwości wiązał się też z gorszym rokowaniem i większą zdolnością do przerzutów.^{38,39} Obserwacje te potwierdzają najnowsze analizy prowadzone technikami biologii molekularnej oraz testy statystyczne.

W niniejszej pracy wykorzystując zgromadzone dane przeprowadzono analizę asocjacji dla wybranych fragmentów genomu mitochondrialnego oraz zmian liczby kopii i utraty

heterozygotyczności w genomie jądrowym w układzie *case-control*: stopień złośliwości, rozmiar ciała i wiek psów zaliczanych do dużych.

Analiza statystyczna przeprowadzona w niniejszej pracy wykazała, że przy poziomie istotności <5% stopień złośliwości nowotworu nie ma wpływu na występowanie polimorfizmów w sekwencji pętli D oraz genach *ND2*, *COX2*, *ATP6*, *COX3*. Analiza związku aberracji strukturalnych ze stopniem złośliwości nowotworu wykazała, że miejsca genomu o istotnie wyższej częstości występowania CNVs ($P \leq 0,05$) znajdowały się na chromosomie 12, 15, 16 i 33. Biorąc pod uwagę analizę związku częstości germinalnych LOHs ze stopniem złośliwości nowotworu, wykazano, że statystycznie istotne różnice w częstości występowania G-LOHs ($P \leq 0,05$) zidentyfikowano dla zmian rozlokowanych aż na 32 chromosomach. Podobnych obserwacji dokonano w przypadku S-LOHs. We wszystkich analizowanych wariantach wykazano, że największe różnice w częstości aberracji występują u psów z nowotworem o drugim (G2) lub trzecim (G3) stopniu złośliwości. Prawidłowość obserwowana w przypadku związku aberracji strukturalnych ze stopniem złośliwości nowotworu potwierdziła dotychczasowe obserwacje histopatologiczne.³⁹ Jest więc prawdopodobne, że pewne aberracje strukturalne pojawiają się dopiero w nowotworach o wyższym stopniu złośliwości, bądź są przyczyną wzrostu złośliwości nowotworu sutka u psów.

Dalsza analiza wykazała, że statystycznie istotny związek występował między rozmiarem psów a polimorfizmami w pozycjach m.15475, m.15620, m.15627 i m.15750 pętli D oraz m.7382 genu *COX2*. Wykorzystując procedurę GLM stwierdzono, że polimorfizmy i mutacje w pozycjach m.15435, m.15627 i m.15814 pętli D i m.8242C/T genu *ATP6*, statystycznie częściej występowały w grupie psów dużych niż małych i średnich. Z kolei w pozycjach nukleotydów m.15475, m.15639 i m.15025, częstotliwość SNP była istotnie wyższa u psów dużych niż średnich. Podobnych obserwacji dokonano w przypadku analizy statystycznej przeprowadzonej dla aberracji strukturalnych w genomie jądrowym. Wykazano statystycznie istotne różnice w częstości 34 CNVs, 353 G-LOHs i nielicznych S-LOHs u psów o różnej wielkości ciała. Frekwencja występowania aberracji typu CNVs i G-LOHs była wyższa u psów sklasyfikowanych jako duże, niż u psów średniej wielkości. W przypadku S-LOHs istotne statystycznie różnice częściej obserwowane były w grupie psów dużych lub średniej wielkości ciała niż u psów małych.

Badania psów ze zdiagnozowanym nowotworem sutka, prowadzone na przestrzeni dziesięciu lat (2002-2012), wskazują, że przy analizach asocjacyjnych związku wieku psów z wystąpieniem nowotworu, warto wziąć pod uwagę również wielkość psów.⁵ Jak wskazują wyniki

wspomnianych analiz, w grupie psów zaliczanych do dużych, najwięcej nowotworów sutka wystąpiło u osobników najstarszych, w wieku 9-12 lat.⁵ Badania własne wskazują, że prawdopodobieństwo wystąpienia polimorfizmu w pozycji m.8242C/T (*ATP6*) było istotnie wyższe u psów w wieku 12-13 lat niż w wieku 7-8 lat. Analiza uwzględniająca podział na dwie grupy wiekowe pozwoliła na identyfikację 40 miejsc w genomie jądrowym wykazujących statystycznie istotne różnice ($P \leq 0,05$) we frekwencji występowania CNVs w dwóch grupach wiekowych psów dużych. Częstość występowania tych aberracji była wyższa u psów w grupie wiekowej 7-8 lat. Również w przypadku germinalnych LOHs wyższa frekwencja istotnych zmian występowała w tej samej grupie wiekowej. W przypadku wariantu S-LOH frekwencja tego typu aberracji w dwóch grupach wiekowych nie wykazała obecności istotnych różnic w frekwencji S-LOHs pomiędzy poszczególnymi grupami. Obserwowana zależność jest zrozumiała ze względu na fakt, iż średnia długość życia psów ras dużych jest stosunkowo krótka i często nie przekracza 10 lat. W związku z tym wiek 7-8 lat dla psów dużych jest wiekiem, który można określić jako podeszły, a obserwacje poczynione w niniejszej pracy są zbliżone do obserwacji poczynionych przez innych autorów.

Podsumowanie i wnioski

1. Zaburzenia strukturalne w genomie mitochondrialnym i jądrowym, występujące w postaci polimorfizmów, mutacji, heteroplazmii, zmiany liczby kopii (CNV) oraz utraty heterozygotyczności (LOH), mogą być związane z nowotworami sutka psów.
2. Odnotowana po raz pierwszy heteroplazmia długości pętli D (15931_delT), występująca ze 100% frekwencją, może wskazywać na fakt, że jest to mutacja typu *hotspot* nowotworów sutka psów.
3. Analizy wielkoskalowe genomu wykazały dominację amplifikacji nad delecjami, w szczególności w obrębie miejsc łamliwych chromosomów, oraz ich dwukrotnie większą długość, co wskazuje, że amplifikacje są typowymi zaburzeniami genetycznymi w przypadku nowotworów sutka psów.
4. Reorganizacje strukturalne w postaci zmiany liczby kopii oraz utraty heterozygotyczności w komórkach germinalnych, do których doszło w obrębie czterech genów (*ZFPM2*, *EBAG9*, *AQPI* i *MSTN*), mogą mieć wpływ na zaburzenia biologicznych funkcji komórek w procesie transformacji nowotworowej.
5. Wykazana statystycznie istotna zależność pomiędzy zaburzeniami strukturalnymi w mitochondrialnym i jądrowym DNA a wielkością i wiekiem psów chorych na nowotwór sutka pozwala twierdzić, że mogą to być czynniki prognostyczne tego typu nowotworu u psów.
6. Stopień złośliwości nowotworu nie miał istotnego związku z zaburzeniami genomu mitochondrialnego, ale miał istotny wpływ na częstość występowania aberracji strukturalnych w genomie jądrowym psów z nowotworami sutka, przy czym liczba aberracji prawdopodobnie wynika z histologicznej progresji nowotworu.

Piśmiennictwo

1. Omia.angis.org.au/home/ [Internet]. The University of Sydney: The Association; c2015 [updated 24 Oct 2015; cited 25 Oct 2015]. Available from: <http://omia.angis.org.au/home/>.
2. Melin M, Riviera P, Arendt M, Elvers I, Murén E, Gustafson U, Starkey , Borge KS, Lingaas F, Häggström J, Saellström S, Rönnberg H, Lindblad-Toh K. Genome-wide analysis identifies germ-line risk factors associated with canine mammary tumours. *PLoS Genet.*, 2016;12(5):e1006029.
3. Dobson JM. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. *ISRN Vet Sci.*, 2013; 941275.
4. Seixas F, Palmeira C, Pires MA, Bento MJ, Lopes C. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. *Vet J.*, 2011; 187(1):65-71.
5. Salas Y, Marquez A, Diaz D, Romero L. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: a growing animal health problem. *PLoS One*, 2015; 10(5):e0127381.
6. Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jerónimo C, Milanezi F, Schmitt, FC. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res.*, 2005; 11(16):5869-5877.
7. Czarnecka AM, Golik P, Bartnik E. Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *J Appl Genet.*, 2006; 47(1):67-78.
8. Rahmani B, Azimi C, Omranipour R, Raoofian R, Zendehdel K, Saeed-Rad S, Heidari M. Mutation screening in the mitochondrial D-loop region of tumoral and non-tumoral breast cancer in Iranian patients. *Acta Med Iran.*, 2012; 50(7):447-53.
9. Krepischi AC, Achatz MI, Santos EM, Costa SS, Lisboa BC, Brentani H, Santos TM, Gonçalves A, Nóbrega AF, Pearson PL, Vianna-Morgante AM, Carraro DM, Brentani RR, Rosenberg C. Germline DNA copy number variation in familial and early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 2012; 14(1):R24.
10. Gurgul A, Żukowski K, Ślaska B, Semik E, Pawlina K, Ząbek T, Jasielczuk I, Bugno-Poniewierska, M. General assessment of copy number variation in normal and tumor tissues of the domestic dog (*Canis lupus familiaris*). *J Appl Genet.*, 2014; 55(3):353-363.
11. Pawlina-Tyszko K, Gurgul A, Bugno-Poniewierska M, Klukowska-Rötzler J, Koch C, Mählmann K. P6041 Microarray analysis of genomic aberrations of horse sarcoids. *J Anim Sci.*, 2016; 94(supplement4):169-169.
12. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genetics.*, 2006; 7(2):85-97.
13. Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature.*, 1983; 305(779784):3134.
14. Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore JH and Walder EJ. Histological Classification of Mesenchymal Tumours of Skin and Soft Tissues of Domestic Animals, WHO International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals. Second Series, Volume 2. Washington, DC, *Armed Forces Institute of Pathology*, 1998; 28–29.
15. Misdorp W. Tumours of the mammary gland. In: *Tumours in Domestic Animals*. 4th edn., DJ Meuten Ed, Ames IA, Iowa State Press, 2002; 575–606, 764.
16. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S and Madden T. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012; 13:134.

17. van Asch B, Albarran C, Alonso A, Angulo R, Alves C, et al. Forensic analysis of dog (*Canis lupus familiaris*) mitochondrial DNA sequences: An inter-laboratory study of the GEP-ISFG working group. *Forensic Sci Int-Gen.*, 2009; 4:49–54.
18. Kim KS, Lee SE, Jeong HW, Ha JH. The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1998;10:210–220.
19. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud SE, Wilkins MR, Appel RD, et al. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server.*, Humana Press, 2005; 571–607.
20. Geourjon C, Deleage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comp Appl in the Biosci.*, 1995; 11: 681–684.
21. Krogh A, Larsson B, Von Heijne G and Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a Hidden Markov Model: application to complete genomes. *Journal Mol Biol.*, 2001; 305:567–580.
22. Yau C, (2013) OncoSNP-SEQ: a statistical approach for the identification of somatic copy number alterations from next-generation sequencing of cancer genomes. *Bioinformatics*, 29: 2482-2484.
23. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Sham PC, PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.*, 2007; 81:559–575.
24. UCSC Genome Browser: Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.*, 2002;12(6):996-1006.
25. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, Diemer K, Muruganujan A, Narechania A. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.*, 2003; 13:2129-2141.
26. PANTHER – Protein Classification System, <http://www.pantherdb.org> 2017 [dostęp 10.03.2016].
27. Idelchik MDPS, Begley U, Begley TJ, Melendez JA. Mitochondrial ROS control of cancer. *Semin Cancer Biol.*, 2017; 47:57-66.
28. Viale A, Corti D, Draetta GF. Tumors and Mitochondrial Respiration: A Neglected Connection. *Cancer Res.*, 2015; 75(18):3685-3686.
29. Ślaska B, Surdyka M, Brodzki A, Nisztuk S, Gurgul A, Bugno-Poniewierska M. Mitochondrial D-loop mutations can be detected in sporadic malignant tumours in dogs. *Bull Vet Inst Pulawy.*, 2014; 58(4):631-7.
30. Tseng LM, Yin PH, Yang CW, Tsai YF, Hsu CY, Chi CW, Lee HC. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human breast cancers. *Genes, Chromosomes and Canc.*, 2011; 50(10), 800-811.
31. Kuo SJ, Chen M, Ma GC, Chen ST, Chang SP, Lin WY, Liu CS. Number of somatic mutations in the mitochondrial D-loop region indicates poor prognosis in breast cancer, independent of TP53 mutation. *Cancer Genetics and Cytogen.*, 2010; 201(2), 94-101.
32. Verscheure S., Backeljau T, Desmyter S. Length heteroplasmy of the polyC-polyT-polyC stretch in the dog mtDNA control region. *Int J Legal Med.*, 2014; 1-9.
33. Abkevich V, Timms KM, Hennessy BT, Potter J, Carey MS, Meyer LA, Tran TV. Patterns of genomic loss of heterozygosity predict homologous recombination repair defects in epithelial ovarian cancer. *Brit J Cancer.*, 2012; 107(10):1776-1782.
34. O'Hagan RC, Chang S, Maser RS, Mohan R, Artandi SE, Chin L, DePinho RA. Telomere dysfunction provokes regional amplification and deletion in cancer genomes. *Cancer Cell.*, 2002; 2(2):149-155.

35. Orsetti B, Courjal F, Cuny M, Rodriguez C, Theillet C. 17q21-q25 aberrations in breast cancer: combined allelotyping and CGH analysis reveals 5 regions of allelic imbalance among which two correspond to DNA amplification. *Oncogene.*, 1999; 18:6262–6270.
36. Glover TW, Arlt MF, Casper AM, Durkin SG. Mechanisms of common fragile site instability. *Hum Mol Genet.*, 2005; 14(suppl 2), R197-R205.
37. Zatloukal J., Lorenzova J., Tichý F., Nečas A., Kecova, H., Kohout P. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Vet Brno.*, 2005; 74(1), 103-109.
38. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol.*, 2005; 133(4):246-252.
39. Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998–2002). *JAVMA-J Am Vet Med.*, 2005; 227(10):1625-1629.