



WYDZIAŁ
NAUK O ZWIERZĘTACH
I BIOGOSPODARKI

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Dyscyplina: Zootechnika i rybactwo

mgr Krzysztof Aleksander Kowal

Rozprawa doktorska

**Genomika mitochondrialna nowotworów złośliwych gruczołu
mlekowego u psów (*Canis lupus familiaris*)**

**Mitochondrial genomics of canine malignant mammary gland tumours
(*Canis lupus familiaris*)**

Rozprawa doktorska wykonana w Instytucie Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej
Promotor: Prof. dr hab. Brygida Ślaska

Praca doktorska powstała w ramach grantu badawczego Narodowego Centrum Nauki w Polsce, nr: 2019/35/B/NZ5/00775 pt.: „Identyfikacja i funkcjonalna charakterystyka mutacji mtDNA w nowotworach złośliwych gruczołu mlekowego u psów na podstawie badań genomicznych, epigenomicznych i proteomicznych”.

Lublin, 2023

*Składam serdeczne podziękowania
Prof. dr hab. Brygidzie Ślaskiej
za wszelkie wsparcie oraz opiekę merytoryczną
w trakcie spełniania mojego marzenia
jakim od zawsze była praca naukowa.*

Niniejszą pracę doktorską dedykuję swojej żonie Małgorzacie.

Oświadczenie promotora pracy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 27.03.2023 r.

Podpis promotora pracy *Brigida Juske*

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data 27.03.2023 r.

Podpis autora pracy *Krzysztof Kowal*

Spis treści

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu	6
Streszczenie	7
Summary	9
Wstęp.....	11
Hipotezy badawcze	15
Cel pracy	15
Materiał i metody	16
Materiał biologiczny i ocena histopatologiczna	16
Sekwencjonowanie NGS	17
Analizy bioinformatyczne	17
Omówienie wyników	19
Resekwencjonowanie genomu mtDNA psa z rakiem cewkowo-brodawkowatym o stopniu złośliwości G2	19
Resekwencjonowanie genomów mtDNA psów z guzami gruczołu mlekowego o stopniu złośliwości G1	21
Analiza porównawcza genu <i>MTTL1</i> u człowieka oraz genu <i>tRNA-Leu (UUR)</i> u psa.....	24
Dyskusja	26
Podsumowanie i wnioski.....	30
Bibliografia.....	32
Wykaz skrótów i akronimów	36
Wykaz skrótów genów w genomie mitochondrialnym	37
Oświadczenia współautorów (Załącznik nr 1)	38
Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej (Załącznik nr 2)	39

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu (zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych)

Krzysztof Kowal, Brygida Ślaska, Adam Bownik, Beata Horecka, Jan Gawor, Anna Śmiech, Angelika Tkaczyk. **Analysis of mitochondrial genome from labrador (*Canis lupus familiaris*) with mammary gland tumour reveals novel mutations and polymorphisms.** Ann. Anim. Sci. 2019 Vol. 19 Issue 3 s. 619-632, il., bibliogr. sum. DOI: [10.2478/aoas-2019-0027](https://doi.org/10.2478/aoas-2019-0027)

Liczba punktów w roku publikacji: MEiN = 100; IF' 2019 = 1,572

Indywidualny wkład pracy w publikację – 60%: Udział w koncepcji pracy, opis i interpretacja wyników badań, przeprowadzenie analiz bioinformatycznych, redagowanie manuskryptu, udział w korekcie po recenzjach.

Krzysztof Kowal, Angelika Tkaczyk-Wlizło, Mariusz Pierzchała, Jan Gawor, Brygida Ślaska. **Molecular differences in mitochondrial DNA genomes of dogs with malignant mammary tumours.** Vet. Comp. Oncol. 2022 Vol. 20 Issue 1 s. 256-264, DOI: [10.1111/vco.12772](https://doi.org/10.1111/vco.12772)

Liczba punktów w roku publikacji: MEiN = 200; IF' 2021 = 2,385

Indywidualny wkład pracy w publikację – 60%: Udział w koncepcji pracy, udział w opracowaniu założeń metodycznych, wykonanie analiz laboratoryjnych, opis i interpretacja wyników badań, przeprowadzenie analiz bioinformatycznych, redagowanie manuskryptu, udział w korekcie po recenzjach.

Krzysztof Kowal, Angelika Tkaczyk-Wlizło, Mariusz Pierzchała, Brygida Ślaska. **Evaluation of the *tRNA-Leu (UUR)* gene haplotype profile observed in canine mammary gland tumours based on comparative analysis with the *MT-TL1* human gene.** Ann. Anim. Sci. 2022 Volume 22 Issue 3 s. 915 - 922, il., bibliogr. sum. DOI: [10.2478/aoas-2022-0009](https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0009)

Liczba punktów w roku publikacji: MEiN = 140; IF' 2021 = 2,667

Indywidualny wkład pracy w publikację – 70%: Koncepcja pracy, opracowanie założeń metodycznych, wykonanie analiz laboratoryjnych, opis i interpretacja wyników badań, przeprowadzenie analiz bioinformatycznych, redagowanie manuskryptu, udział w korekcie po recenzjach.

Łączna liczba punktów MEiN = 440

Sumaryczny Impact Factor = 6,62

Udział w publikacjach = 63%

Streszczenie

Celem pracy było poszukiwanie powiązań procesu transformacji nowotworowej w złośliwych nowotworach gruczołu mlekowego psa z czynnikami o potencjalnym znaczeniu prognostycznym z wykorzystaniem identyfikacji defektów w całym genomie mitochondrialnym psa metodą *Next Generation Sequencing* oraz przy użyciu narzędzi bioinformatycznych. Od czternastu psów z nowotworem złośliwym gruczołu mlekowego pobrano fragment tkanki nowotworowej oraz krew obwodową. Dokonano oceny histopatologicznej guzów zgodnie z obowiązującymi standardami WHO (*World Health Organisation*) i klasyfikacją złośliwości (Goldschmidt et al., 2011). Wyizolowane DNA poddano sekwencjonowaniu NGS i uzyskano sekwencje o co najmniej 100-krotnym pokryciu. Uzyskane sekwencje poddano analizom bioinformatycznym w celu określenia charakteru zmian oraz ich wpływu na geny zakodowane w mitochondrialnym DNA.

Po raz pierwszy zidentyfikowano polimorfizmy, mutacje oraz heteroplazmię w całym genomie mitochondrialnym psa (16.727 par zasad, 37 genów i obszar niekodujący). Zidentyfikowano 557 zmian w mitochondrialnym DNA u 13 psów z nowotworami złośliwymi gruczołu mlekowego o stopniu złośliwości G1 oraz 47 zmian u psa z nowotworem o stopniu złośliwości G2. Najwięcej mutacji oraz heteroplazmii wykryto w obszarze VNTR (*variable number of tandem repeats*). Zmiany występowały w 12 z 13 genów kodujących białka. W przeważającej większości miały charakter synonimiczny, bądź nonsynonimiczny o niskim stopniu szkodliwości. Najwięcej polimorfizmów zaobserwowano w genie *COXI*, zaś jedynym genem białkowym, w którym nie zaobserwowano mutacji i polimorfizmów był gen *ATP8*, co świadczy o jego wysokim konserwatyźmie genetycznym. Polimorfizmy występujące we wszystkich badanych próbach wystąpiły w genach: *tRNA-Leu (UUR)* (m.2678_2679insG), *COXI* (m.5367C>T, m.5444T>C, m.6065A>G), *ATP6* (m.8368C>T), *COX3* (m.8807G>A), *ND4L* (m.9911_9912insTG), *ND5* (m.13299T>A) oraz w regionie niekodującym (m.15814C>T). Wykazano, iż efektem polimorfizmu 13594G>A była niesynonimiczna zmiana p.Gly606Glu w białku ND5 oraz synonimiczna zmiana p.Thr172= w białku ND6. Polimorfizm m.2683G>A korespondował z pozycją m.3243A>G wskazywaną jako mutacja przyczynowa zespołu MELAS (*mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes*) oraz związaną z wieloma typami nowotworów u człowieka. Stwierdzone różnice na poziomie molekularnym w obszarze pętli D między dwoma guzami tego samego typu histopatologicznego występujące jednocześnie u jednego psa mogą wskazywać, że ten obszar odgrywa ważną rolę w procesie transformacji nowotworowej. Mutacje w obszarze zmiennej

liczby powtórzeń tandemowych miały głównie charakter heteroplazmii i mogły przyczyniać się do destabilizacji genetycznej komórek nowotworowych.

Słowa kluczowe: pies, mtDNA, mutacje, nowotwory

Summary

The aim of the study was to search for the defects in the entire mitochondrial genome of dogs with malignant tumours of the mammary gland using the *Next Generation Sequencing* (NGS) method and bioinformatics tools and to assess their association with the neoplastic transformation process. From fourteen dogs with malignant tumours of the mammary gland, a tumour tissue and peripheral blood were collected. The histopathological evaluation of the tumours was performed in accordance with the current WHO (*World Health Organisation*) standards and the classification of malignancy (Goldschmidt i in., 2011). The isolated DNA was subjected to NGS sequencing and sequences with at least 100-fold overlap were obtained. The obtained sequences were subjected to bioinformatics analyses in order to determine the nature of the changes and their impact on the genes encoded in the mitochondrial DNA.

For the first time, polymorphisms, mutations and heteroplasmy were identified in the entire mitochondrial DNA genome of the dog (16,727 base pairs, 37 genes + the entire non-coding region). A total of 557 changes in mitochondrial DNA were identified in 13 dogs with mammary gland tumours of G1 malignancy grade and 47 changes in a dog with mammary gland tumour of G2 malignancy grade. Most mutations and heteroplasmy were detected in the VNTR (*variable number of tandem repeats*) area. Mutations in this region are believed to be responsible for the instability of the cancer cell genome. Changes occurred in 12 of the 13 protein-coding genes. In the vast majority, they were synonymous or non-synonymous with a low degree of harmfulness. The greatest number of polymorphisms was observed in the *COX1* gene, and the only protein gene in which no mutations and polymorphisms were observed was the *ATP8* gene, which proves its high genetic conservatism. Polymorphisms occurring in all samples occurred in the following genes: *tRNA-Leu (UUR)* (m.2678_2679insG), *COX1* (m.5367C>T, m.5444T>C, m.6065A>G), *ATP6* (m.8368C>T), *COX3* (m.8807G>A), *ND4L* (m.9911_9912insTG), *ND5* (m.13299T>A) and non-coding region (m.15814C>T). It was shown that the effect of the 13594G>A polymorphism was a non-synonymous change of p.Gly606Glu in the ND5 protein and a synonymous change of p.Thr172= in the ND6 protein. The m.2683G>A polymorphism corresponded to the m.3243A>G position responsible for the MELAS (*mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes*) syndrome in humans and associated with many human cancers. The differences found at the molecular level in the D-loop area between two tumours of the same histopathological type occurring simultaneously in one dog may indicate that this area plays an important role in the process of malignant transformation. Mutations in the area of a variable number of tandem

repeats were mainly heteroplasmy and could contribute to the genetic destabilization of cancer cells.

Key words: dog, mtDNA, mutations, tumour

Wstęp

W ostatnich latach zwiększyła się liczba zachorowań na nowotwory wśród zwierząt towarzyszących człowiekowi, zwłaszcza wśród psów. Wzrasta również poziom empatii wobec zwierząt zamieszkujących gospodarstwa domowe. Rozwój społeczeństwa ludzkiego doprowadził do humanizacji psów i są one obecnie często uważane za członków rodziny (Elies i Schauder, 2018). Świadomość krótszej długości życia czworonogów w porównaniu z długością ludzkiego życia sprawia, że właściciele psów oczekują bardziej zaawansowanej opieki zdrowotnej i inwestycji większych środków na technologie diagnostyczne i pionierskie terapie, takie jak te stosowane u ludzi. Długość życia psów, a także odsetek śmiertelności w starszym wieku jest związany z masą ciała zwierzęcia. Zaobserwowano również tendencję do dłuższego życia u psów o większej różnorodności genetycznej. Czas życia psów umierających na raka przebiega według tych samych wzorców, jednakże duże rozmiary znacznie zwiększały proporcjonalną śmiertelność w następstwie choroby nowotworowej. Natomiast jak dotąd nie wykryto znaczącego sygnału dla obniżonej śmiertelności z powodu raka wraz ze wzrostem różnorodności (Kraus i in., 2023). Biorąc pod uwagę fakt, że psy żyją w środowisku człowieka, są narażone na podobne czynniki ryzyka, stąd etiologia i patogeneza nowotworów u psów jest podobna do nowotworów u ludzi (Switonski i in., 2004; Khanna i in., 2006; Pinho i in., 2012; Ślaska i in., 2013).

Psy chorują na raka skóry 35 razy częściej niż ludzie. Czterokrotnie częściej chorują one na raka sutka, osiem razy częściej na raka kości i dwa razy częściej na białaczkę w porównaniu z człowiekiem (Cullen i in., 2008). Wśród obserwowanych nowotworów najczęściej występującym jest guz gruczołu mlekowego u suk, który stanowi od 50 do 70% wszystkich diagnozowanych typów nowotworów, stąd też jest jednym z najważniejszych rodzajów nowotworów u psów (Dobson, 2013; Kumar i Parashar, 2020). Dbając o dobrostan i witalność psów, hodowcy dążą do zmniejszenia częstości występowania chorób i defektów u różnych ras. Stale rosnąca liczba badań i publikacji dotyczących molekularnego podłoża nowotworów psów dostarcza dowodów na rozwój onkologii zwierząt towarzyszących (Rivera i in., 2009). Przy stale rosnącej zachorowalności na nowotwory, zwiększają się również oczekiwania właścicieli i hodowców psów wobec szybkiej i precyzyjnej diagnostyki nowotworów oraz skutecznych metod ich leczenia.

Jak dotąd, najwięcej doniesień dotyczących molekularnych podstaw nowotworzenia u psów dotyczyło jądrowego DNA (*nuclear DNA*, nDNA). W odniesieniu do genomowych czynników warunkujących osteosarkomy u psów, zidentyfikowano kilka mutacji lub zmiany

liczby kopii w genach *TP53* (24–75%), *RBI* (29–61%), *PTEN* (42%) i *MYC* (40 %) (Gardner i in., 2019). Nadekspresję genu *MYC*, a w konsekwencji aberrację liczby kopii, można również zaobserwować zarówno w chłoniakach człowieka, jak i psa (Xavier i in., 2020). Warianty genetyczne wariantu genu *BRCA2* u psa obejmowały polimorfizmy pojedynczych nukleotydów, insercje i delecje. Badania Thumser-Henner i in. (2020) wykazały, że poziom ekspresji genu *BRCA2* jest obniżony w próbach gruczołów nowotworowych, co sugeruje, że niska ekspresja *BRCA2* przyczynia się do rozwoju guza gruczołu mlekowego u psów (Thumser-Henner i in., 2020). Badania jądrowego DNA wskazują, że u psów w naturalny sposób rozwijają się te same nowotwory, co u ludzi. Dlatego też uważa się, że są one odpowiednimi zwierzętami modelowymi do analizy zmian molekularnych obserwowanych podczas rozwoju choroby u człowieka (Switonski i in., 2004; Ślaska i in., 2013; Tkaczyk-Wlizło i in., 2022).

Mitochondria, które mają własny mechanizm transkrypcyjny, odgrywają ważną rolę m.in. w kontrolowaniu funkcji jądrowych komórki poprzez wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT), modulację poziomu wapnia i kontrolę przepływu metabolitów drobnocząsteczkowych lub regulację apoptozy. Najważniejszą rolą mitochondriów jest produkcja ok. 90% energii komórkowej w postaci adenozyntrifosforanu (ATP) poprzez łańcuch transportowy elektronów i fosforylację oksydacyjną (DiMauro i Schon, 2003). Wielozadaniowość mitochondriów i powiązane sygnały mitochondrialne mają wpływ na tysiące genów powiązanych z różnymi funkcjami komórkowymi. W rezultacie mutacje genomu mitochondrialnego mogą również powodować przeprogramowanie transkrypcji w jądrze komórkowym poprzez upośledzenie funkcji mitochondriów (Picard i in., 2016). W związku z tym mutacje w mtDNA mogą zaburzać homeostazę komórkową.

Nowotwory to grupa chorób związanych z niestabilnością genomu. Niekontrolowany, nieprawidłowy wzrost komórek powoduje zmiany w ich metabolizmie energetycznym. W niektórych typach tkanek nowotwór rozwija się wielokrotnie częściej niż w innych. Jak dotąd nie została wyjaśniona przyczyna tego zjawiska (Tomasetti i Vogelstein, 2015). Rola mitochondriów w procesie nowotworowym u człowieka została określona w 1932 roku, kiedy Otto Warburg opisał zjawisko glikolizy zachodzące w komórkach nowotworowych, pomimo obecności tlenu (Spencer i Stanton, 2019). Czarnecka i in. (2010) oraz Grzybowska-Szatkowska i Ślaska (2012) wykazali, że mutacje w ludzkich genach mitochondrialnych, ściśle związane z komórkowym metabolizmem tlenu, mogą być zaangażowane w transformację nowotworową komórek. Aberracje metaboliczne w nowotworach, związane z dysfunkcją mitochondriów, są powiązane z: potencjałem proliferacyjnym, upośledzoną apoptozą, zwiększonym anabolizmem i zmniejszoną autofagią (Loureiro i in., 2017). Najbardziej

narażone na negatywne skutki mutacji punktowych mtDNA są tkanki o wysokiej aktywności metabolicznej, ponieważ w komórkach budujących te narządy występuje wiele mitochondriów (DiMauro i Schon, 2003). Dotychczasowe analizy mitochondriów prowadzone podczas kancerogenezy potwierdziły ich udział w rozwoju choroby z powodu podwyższonego poziomu wolnych rodników tlenowych, niedotlenienia i zmian w sygnałach apoptozy (Kozakiewicz i in., 2021).

Pierwsze doniesienia dotyczące zmian w mitochondrialnym DNA w nowotworach złośliwych u psów opracował zespół Murgia i in. (2006). W badaniach Bertagnolli i in. (2009) wykryto, iż najwięcej zmian o charakterze tranzycji występowało w niekodującym obszarze pętli D (D-loop, *displacement loop*) m.in. mutacja m.15814C>T, heteroplazmia m.15955C/T, bądź delecje m.15931delA i m.15938delG. Występowanie mutacji somatycznych w mtDNA potwierdziły również badania Ślaskiej i in. (2014). Ponadto, zmiany w pętli D mtDNA były związane z występowaniem nowotworów głowy i szyi u psów (Ślaska i in., 2014). Wykazano również, że częstość występowania mutacji i polimorfizmów w tkankach o wysokiej aktywności metabolicznej może być większa, co z kolei może powodować uszkodzenia łańcucha transportu elektronów i fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS, *oxidative phosphorylation*). Zaburzenia łańcucha oddechowego mogą prowadzić do wzrostu reaktywnych form tlenu, co może wywołać zmiany w jądrowym DNA (Brandon i in., 2006; Ślaska i in., 2013). Nie jest wykluczone, że większa częstość występowania raka u psów jest związana z uszkodzeniami mitochondrialnego DNA. Surdyka i Ślaska (2017) wskazały na istotny statystycznie związek pomiędzy występowaniem mutacji a wielkością i wiekiem psów. W nowotworach gruczołu mlekowego w sekwencji mitochondrialnej pętli D zostało zidentyfikowanych 26 polimorfizmów i 5 mutacji (Surdyka i Ślaska, 2017a). Po raz pierwszy wykryto heteroplazmię długości pętli D u psów z nowotworami gruczołu mlekowego. Stopień złośliwości nie miał wpływu na obecność zmian nukleotydowych.

Poza zmianami w obszarze niekodującym mtDNA, badane były również geny kodujące białka mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Ślaska i in. (2014) stwierdzili, że zmiany heteroplazmatyczne występowały w genach *ND1* i *CYTB* w *epithelioma glandulae sebacei* oraz w *CYTB* w *lymphoma centroblasticum*. Stwierdzili oni również wpływ niektórych alleli (*COXI*: m.5855C>T, *ND1*: m.3196T>C, m.2962C>T, *CYTB*: m.14930T>C) na funkcjonowanie białek, a tym samym na ich potencjalną rolę w kancerogenezie (Ślaska i in., 2014). W wyniku analiz mutacji w genach mitochondrialnych *ND2*, *COX2*, *ATP6* i *COX3* zidentyfikowano 28 polimorfizmów i 11 mutacji w guzach gruczołu mlekowego u psów (Surdyka i Ślaska, 2017b). Jedną ze zmian była heteroplazmia we krwi, a dwie z mutacji spowodowały zmiany

niesynonimiczne w sekwencjach białkowych: p.Asn117Ser i p.Ala184Thr. Niektóre z tych zmian mogą sugerować, że są to mutacje typu „hotspot” w guzach gruczołu mlekowego u psów (Surdyka i Ślaska, 2017b). Śmiech i in. (2019) przeanalizowali guzy z komórek tucznych stwierdzone u różnych ras psów i wykazali występowanie heteroplazmii w pozycjach: m.14780C/T i m.14634C/T genu *CYTB*. Zidentyfikowane mutacje w mtDNA w zależności od typu nowotworu miały głównie charakter substytucji genach *CYTB* lub *ND1*, *ND2*, *ND4* (Ślaska i in., 2020).

Uważa się, że mutacje mtDNA powodujące choroby często występują w genach tRNA (Baranowska i in., 2009). Mutacje warunkujące m.in. czuciową neuropatię z ataksją (Baranowska i in., 2009) czy podostrą martwiczą encefalopatię (Baiker i in., 2009) zostały określone w genach tRNA. Zmiany w genie *MT-TL1* odpowiedzialnym za syntezę tRNA-Leu (UUR) u człowieka mają związek z nowotworem jelita grubego (Lorenc i in., 2003), raka płuc, czy gruczolakiem kwasochłonnym nerki (Meierhofer i in., 2006; Mayr i in., 2008). W przypadku chorób nowotworowych psów, jak dotąd badania genów kodujących tRNA nie były prowadzone.

Na Wyspach Kanaryjskich nastąpił wzrost odsetka pacjentów, u których występowały mnogie guzy gruczołu mlekowego z 19,6% w 2003 r. do 43,0% w 2020 r. (Rodríguez i in., 2022). Wyniki badań Rebhun i Thamm (2010) wykazały stosunkowo wysoką częstość występowania wtórnych nowotworów złośliwych u psów z nowotworami wewnątrzwydzielniczymi, wątrobowokomórkowymi i wewnątrzczaszkowymi (Rebhun i Thamm, 2010). Brak jest jednak informacji o zmianach zachodzących w genomie mitochondrialnym w różnych tkankach nowotworowych występujących w tym samym czasie, bądź w czasie przerzutu lub wznowy nowotworu.

Informacje na temat związku mutacji w różnych genach mtDNA z różnymi typami nowotworów u człowieka oraz brak danych dotyczących większości genów mitochondrialnego DNA (*ND3*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*, *COX2*, *MTTF*, *MTTV*, *MTTL1*, *MTTI*, *MTTQ*, *MTTM*, *MTTW*, *MTTA*, *MTTN*, *MTTC*, *MTTY*, *MTTS1*, *MTTD*, *MTTK*, *MTTG*, *MTTR*, *MTTH*, *MTTS2*, *MTTL2*, *MTTE*, *MTTT*, *MTTP*, *RNR1*, *RNR2*) przede wszystkim kodujących tRNA, jak również brak informacji o efekcie tych zmian w mtDNA w transformacji nowotworowej u psów skłonił mnie do zbadania i rozwiązania tego problemu badawczego.

Hipotezy badawcze

W rozprawie doktorskiej postanowiono zweryfikować następujące hipotezy badawcze pozwalające na rozwiązanie problemu badawczego:

- Defekty (mutacje, polimorfizmy, heteroplazmia) mitochondrialnego DNA w tkankach nowotworu gruczołu mlekowego u psów występują w całym genomie mitochondrialnym, w tym w genach kodujących białko oraz w genach kodujących cząsteczki tRNA i rRNA;
- Mutacje, polimorfizmy i/lub heteroplazmia w mtDNA są związane z transformacją nowotworową u psa;
- Zmiany w mitochondrialnym DNA przyczyniają się do destabilizacji homeostazy komórek i związane są z procesem kancerogenezy.

Cel pracy

Celem pracy było poszukiwanie powiązań procesu transformacji nowotworowej w złośliwych nowotworach gruczołu mlekowego psa z czynnikami o potencjalnym znaczeniu prognostycznym z wykorzystaniem identyfikacji defektów w całym genomie mitochondrialnym psa metodą *Next Generation Sequencing* oraz przy użyciu narzędzi bioinformatycznych.

Material i metody

Material biologiczny i ocena histopatologiczna

Badaniami objęto łącznie 14 psów, u których zdiagnozowano nowotwory złośliwe gruczołu mlekowego (Tabela 1). U jednego psa wykryto dwa guzy gruczołu mlekowego tego samego typu histopatologicznego. Psy były w wieku 6-14 lat. Żaden pies nie przyjmował radioterapii ani chemioterapii. Badania zostały zatwierdzone przez II Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie (uchwała nr 6/2013).

Od wszystkich psów pobrano próby nowotworów oraz krew obwodową. Krew pobrano do sterylnych próbek z antykoagulantem K₃EDTA. Próby nowotworów były poddawane analizie histopatologicznej mającej na celu określenie typu nowotworu oraz stopnia jego złośliwości. Mikroskopowa analiza guzów została przeprowadzona zgodnie z histologiczną klasyfikacją WHO (Hendrick, 1998). W celu określenia stopnia złośliwości guzów gruczołu mlekowego posłużono się 3-stopniową skalą zgodnie z metodyką Goldschmidt i in. (2011). W celu rozróżnienia stopnia starzenia się psów różnych ras i rozmiarów, wiek metrykalny przeliczono na porównywalny wiek człowieka zgodnie z metodologią zaproponowaną przez Wang i in. (2020). Wielkość psów ustalono na podstawie masy ciała oraz standardów ras psów wskazanych przez *American Kennel Club* (<https://www.akc.org/>)

Tabela 1. Charakterystyka psów i nowotworów uwzględnionych w dysertacji.

Lp.	Numer próby	Pies				Nowotwór	
		Rasa	Wielkość*	Płeć**	Wiek	Wiek w latach człowieka	Typ nowotworu
1.	S22	labrador retriever	L	F	9	61	<i>carcinoma tubulo-papillare G2</i>
2.	S2	chart włoski	S	F	9	52	<i>carcinoma complexus G1</i>
3.	S11	pies nierasowy	S	F	10	56	<i>carcinoma complexus G1</i>
4.	S17	golden retriever	L	M	10	66	<i>carcinoma complexus G1</i>
5.	S21	jamnik	S	F	10	56	<i>carcinoma complexus G1</i>
6.	S29	sznaucer średni	M	F	11	65	<i>carcinoma complexus G1</i>
7.	B131	polski owczarek nizinny	M	F	13	74	<i>carcinoma complexus G1***</i>
8.	S6	pies nierasowy	S	F	9	52	<i>carcinoma tubulo-papillare G1</i>
9.	S7	ratler	S	F	14	72	<i>carcinoma tubulo-papillare G1</i>
10.	S19	husky syberyjski	L	F	9	61	<i>carcinoma tubulo-papillare G1</i>
11.	S23	owczarek niemiecki	L	F	14	88	<i>carcinoma tubulo-papillare G1</i>
12.	S26	yorkshire terrier	S	F	5	36	<i>carcinoma tubulo-papillare G1</i>
13.	S35	owczarek niemiecki	L	F	7	50	<i>carcinoma tubulo-papillare G1</i>
14.	S27	polski owczarek nizinny	M	F	13	74	<i>carcinoma planoepitheliale keratodes G1</i>

* - S - psy małe <9kg, M - psy średnie od 9,5kg do 22,5kg, L - psy duże od 23kg do 45kg, **M - samiec, F - samica, *** - pies miał zdiagnozowane dwa guzy gruczołu mlekowego tego samego typu

Sekwencjonowanie NGS

DNA z nowotworowych tkanek pooperacyjnych, stanowiących odpad medyczny, oraz z krwi obwodowej wyizolowano przy użyciu zestawu DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). Próby DNA były ocenione jakościowo w 1% żelu agarozowym oraz ilościowo metodą spektrofotometryczną. Amplifikację całego mtDNA wykonano przy użyciu dwóch par starterów zgodnie z metodologią Imes i in. (2012). Reakcje łańcuchowej polimerazy (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wykonano przy użyciu odczynników zestawu KAPA HiFi PCR (KAPA Biosystems, Wilmington, USA). Produkty PCR zostały rozdzielone w 0,7% żelu agarozowym oraz ocenione ilościowo metodą fluorymetryczną (Qubit 3.0, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA).

Użyto około 1ng mieszaniny matryc PCR DNA i skonstruowano bibliotekę typu „shotgun Illumina” przy użyciu zestawu Nextera XT (Illumina, San Diego, USA) zgodnie z instrukcjami producenta. Próbę biblioteki zsekwencjonowano na sekwenatorze Illumina MiSeq przy użyciu zestawu 600 cykli (v3) w trybie sparowanych końców, ukierunkowanego na pokrycie sekwencji co najmniej 100-krotne. Odczyty sekwencji filtrowano według jakości, a pozostałe adaptory usunięto za pomocą narzędzia fastp (Chen i in., 2018). Oczyszczone odczyty sekwencjonowania zmapowano na sekwencję referencyjną psa mtDNA (numer dostępu GenBank: U96639.2) przy użyciu BWA Aligner (H. Li, 2013), a generowanie konsensusu dla każdej próby przeprowadzono przy użyciu SAMtools i BCFtools (Danecek i in., 2021). Statystyki pokrycia sekwencjonowania obliczono za pomocą narzędzia mosdepth (<https://github.com/brentp/mosdepth>).

Analizy bioinformatyczne

Uzyskane sekwencje nukleotydowe poddano analizom bioinformatycznym w celu określenia miejsc mutacji i polimorfizmów w obrębie analizowanego genomu mtDNA w tkance nowotworowej i krwi (Unipro UGENE (v. 34.0)) (Okonechnikov i in., 2012). Różnice w sekwencjach nukleotydowych określono przez porównanie ich z sekwencją referencyjną (Kim i in., 1998). Polimorfizmy to różnice zidentyfikowane w guzie i krwi tego samego psa w porównaniu z sekwencją referencyjną. Mutacja została określona jako różnica w mtDNA między tkanką nowotworową a krwią tego samego psa.

Analizy bioinformatyczne przeprowadzono z wykorzystaniem różnych narzędzi. Serwer ExPASy (Gasteiger i in., 2005) został wykorzystany do scharakteryzowania takich parametrów fizykochemicznych, jak teoretyczny punkt izoelektryczny, wskaźnik niestabilności, indeks alifatyczny i ogólny wskaźnik hydrofobiczności. SOPMA została

wykorzystana do obliczenia drugorzędowych cech strukturalnych sekwencji białek mitochondrialnych. W celu przewidzenia efektu zmian niesynonimicznych na sekwencję aminokwasową białek algorytm SIFT (*sorting intolerant from tolerant*) został wykorzystany do obliczenia znormalizowanego prawdopodobieństwa dla wszystkich możliwych podstawień z wyrównania sekwencji. Przewiduje się, że pozycje o znormalizowanym prawdopodobieństwie mniejszym niż 0,05 będą szkodliwe, pozycje większe lub równe 0,05 będą tolerowane (Ng i Henikoff, 2003). Strukturę cząsteczek tRNA przewidziano w tRNAscan-SE Search Server (Lowe i Chan, 2016). Prawdopodobieństwo szkodliwych mutacji, tj. funkcjonalnego efektu niesynonimicznego pojedynczych polimorfizmów nukleotydowych (*single nucleotide polymorphism*, SNP) kodujących białka, określono za pomocą systemu klasyfikacji Panther (Tang i Thomas, 2016). Dopasowanie sekwencji referencyjnych psa i człowieka dla wszystkich genów mitochondrialnych oddzielnie przeprowadzono za pomocą narzędzia Unipro uGene, algorytmem CLUSTALW. Jeśli pozycje w genach człowieka i psa były zgodne, postrzegano je jako odpowiadające sobie i identyczne. Haplotypy psów określono na podstawie analizy porównawczej przy użyciu narzędzia BLAST. Sekwencja próby i sekwencja ze 100% homologią z bazy GenBank miały ten sam haplotyp. Do opisu wariantów sekwencji występujących w DNA i białkach zastosowano nomenklaturę HGVS (*Human Genome Variation Society*) (den Dunnen i in., 2016).

Omówienie wyników

Resekwencjonowanie genomu mtDNA psa z rakiem cewkowo-brodawkowatym o stopniu złośliwości G2

Po raz pierwszy w światowej literaturze dokonano resekwencjonowania genomu mitochondrialnego psa z nowotworem złośliwym gruczołu mlekowego z wykorzystaniem technologii *Next Generation Sequencing*. W genomie wykryto zmiany w 10 z 13 genów kodujących białka oraz w genach kodujących 16s rRNA, tRNA-Leu (UUR) i tRNA-Arg. Ogółem zidentyfikowano 32 polimorfizmy, z czego aż 10 znajdowało się w obszarze niekodującym (*non-coding region*, NCR) mtDNA oraz 15 mutacji, z czego aż 14 miało charakter heteroplazmii. Mutacje somatyczne były zlokalizowane głównie w NCR, a dokładniej w obszarze sekwencji repetytywnej VNTR (*variable number of tandem repeats*). Jedna mutacja o charakterze synonimicznym była zlokalizowana w genie *ND4* (Tabela 2).

Tabela 2. Lista mutacji zidentyfikowanych w genomie mitochondrialnym labradora ze zdiagnozowanym rakiem cewkowo-brodawkowatym G2 gruczołu mlekowego.

Gen/ Region	Sekwencja referencyjna NC_002008.4	Mutacja zidentyfikowana we krwi	Mutacja zidentyfikowana w guzie	Zmiana aminokwasu (dla genów białkowych)	Zmiana w kodonie	
NCR	<i>ND4</i>	m.11028T	m.11028T/C*	m.11028T>C	p.Cys276=	TGT→TGC
		m.16168A	m.16168A	m.16168A/G*	–	–
		m.16178A	m.16178A	m.16178A/G*	–	–
		m.16188G	m.16188G	m.16188G/A*	–	–
		m.16198G	m.16198A	m.16198G/A*	–	–
		m.16218G	m.16218G	m.16218G>A	–	–
		m.16228G	m.16228G	m.16228G/A*	–	–
		m.16238G	m.16238G>A	m.16238G/A*	–	–
		m.16278G	m.16278G/A*	m.16278G	–	–
		m.16288A	m.16288A/G*	m.16288A	–	–
		m.16328G	m.16328G/A*	m.16328G	–	–
		m.16338G	m.16338G/A*	m.16338G>A	–	–
		m.16358A	m.16358A	m.16358A/G*	–	–
		m.16368G	m.16368G/A*	m.16368G>A	–	–
		m.16388A	m.16388A/G*	m.16388A>G	–	–

* pozycje heteroplazmatyczne

Heteroplazmię w komórkach nowotworowych zidentyfikowano w siedmiu pozycjach w hiperzmiennym regionie mtDNA (m.16168A/G, m.16178A/G, m.16188G/A, m.16198G/A, m.16228G/A, m.16238G/A, m.16358A/G), natomiast heteroplazmię we krwi wykryto w

sześciu pozycjach NCR (m.16278G/A, m.16288A/G, m.16328G/A, m.16338G/A, m.16368G/A, m.16388A/G) oraz w genie *ND4* (m.11028T/C) (Tabela 2). Cztery polimorfizmy miały charakter niesynonimiczny: m.7593T>C (p.Met187Thr, COX2), m.8807G>A (p.Cys55Tyr, COX3), m.9911A>G (p.Met1Val, ND4L) oraz m.13299T>A (p.Ser508Thr, ND5). Wykryto również trzy polimorfizmy długości: m.2678_2679insG (*TRNL1*), m.9910_9911insAT (*TRNR*) oraz m.16660_16661insCC. Zmiany w cząsteczkach tRNA były zlokalizowane odpowiednio na ramieniu DHU (dihydrourydynowym) oraz na pętli akceptorowej (Tabela 3).

Tabela 3. Lista polimorfizmów zidentyfikowanych w genomie mitochondrialnym labradora ze zdiagnozowanym rakiem cewkowo-brodawkowatym G2 gruczołu mlekowego.

Gen / Region	Sekwencja referencyjna NC_002008.4	Polimorfizm	Zmiana aminokwasu (dla genów kodujących białko)	Zmiana w kodonie
<i>16S rRNA</i>	m.1351A	m.1351A>G	–	–
<i>TRNL1</i>	m.2678_2679	m.2678_2679insG	–	–
	m.2683G	m.2683G>A	–	–
<i>ND1</i>	m.2962C	m.2962C>T	p.Ile72=	ATC→ATT
	m.3196T	m.3196T>C	p.Leu150=	CTT→CTC
<i>ND2</i>	m.4940T	m.4940T>C	p.Leu343=	CTA→TTA
<i>COX1</i>	m.5367C	m.5367C>T	p.Leu7=	CTG→TTG
	m.5444T	m.5444T>C	p.Ala32=	GCT→GCC
	m.6065A	m.6065A>G	p.Gly239=	GGA→GGG
	m.6401C	m.6401C>T	p.Gly351=	GGC→GGT
	m.6554T	m.6554T>C	p.Gly402=	GGT→GGC
<i>COX2</i>	m.7593T	m.7593T>C	p.Met187Thr	ATA→ACA
<i>ATP6</i>	m.8281T	m.8281T>C	p.Ile106=	ATT→ATC
	m.8368C	m.8368C>T	p.Leu135=	CTC→CTT
<i>COX3</i>	m.8807G	m.8807G>A	p.Cys55Tyr	TGC→TAC
<i>TRNR</i>	m.9910_9911	m.9910_9911insAT	–	–
<i>ND4L</i>	m.9911A	m.9911A>G	p.Met1Val	ATG→GTG
<i>ND4</i>	m.10611A	m.10611A>T	p.Gly137=	GGA→GGT
	m.10992G	m.10992G>A	p.Leu264=	TTG→TTA
<i>ND5</i>	m.13299T	m.13299T>A	p.Ser508Thr	TCA→ACA
<i>CYB</i>	m.14977T	m.14977T>C	p.Pro265=	CCT→CCC
	m.15214G	m.15214G>A	p.Glu344=	GAG→GAA

Kontynuacja Tabeli 3.

Gen / Region	Sekwencja referencyjna NC_002008.4	Polimorfizm	Zmiana aminokwasu (dla genów białkowych)	Zmiana w kodonie
NCR	m.15620T	m.15620T>C	–	–
	m.15627A	m.15627A>G	–	–
	m.15639T	m.15639T>A	–	–
	m.15814C	m.15814C>T	–	–
	m.16148A	m.16148A>G	–	–
	m.16158A	m.16158A/G	–	–
	m.16398A	m.16398A>G	–	–
	m.16418A	m.16418A>G	–	–
	m.16660_16661	m.16660_16661insCC	–	–
	m.16672C	m.16672C>T	–	–

Resekwencjonowanie genomów mtDNA psów z guzami gruczołu mlekowego o stopniu złośliwości G1

W wyniku analiz całych genomów mitochondrialnych występujących w dwóch grupach psów: z rakiem złożonym gruczołu mlekowego G1 (*carcinoma complexus*) i z rakiem cewkowo-brodawkowatym G1 (*carcinoma tubulo-papillare*) oraz u osobnika z rakiem płaskonabłonkowym G1 (*carcinoma planoepitheliale*) zidentyfikowano w sumie 383 SNP, 32 polimorfizmy długości typu indel, 4 mutacje, 137 heteroplazmii oraz 1 mutację typu indel. Sumaryczna liczba zmian wyniosła 557. Co najmniej 26% wszystkich polimorfizmów występowało w obszarze niekodującym, a 96% wszystkich pozycji, w których odnotowano heteroplazmię występowało w obszarze VNTR NCR. Polimorfizmy typu indel występowały przede wszystkim w genie *ND4L* oraz *TRNL1*. Najwięcej polimorfizmów w genach kodujących, podobnie jak w przypadku psa z guzem G2 występowało w genie *COX1* (56/557). Jedynym genem, w którym nie zaobserwowano mutacji i polimorfizmów był gen *ATP8*. Zmiany zostały zidentyfikowane w obu genach kodujących rRNA, jednak z przewagą w genie 16s rRNA. Charakterystyczne dla wszystkich przeanalizowanych prób były polimorfizmy w genach: *TRNL1*: m.2678_2679insG, *COX1*: m.5367C>T, m.5444T>C, m.6065A>G, *ATP6*: m.8368C>T, *ND4L*: m.9911_9912insTG, *COX3*: m.8807G>A, *ND5*: m.13299T>A oraz w regionie niekodującym: m.15814C>T. Spośród nich, trzy miały charakter niesynonimiczny (m.9911_9912insTG, m.8807G>A oraz m.13299T>A) i prowadziły do zmiany aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym (odpowiednio: p.Met1Val, p.Cys55Tyr, p.Ser508Thr), zaś zmiana p.Met1Val miała szkodliwy efekt na białko ND4L zgodnie z klasyfikacją SIFT.

Wśród psów ze zdiagnozowanym rakiem cewkowo-brodawkowatym gruczołu mlekowego G1 zidentyfikowano 16 polimorfizmów, z czego cztery występowały w genie *COX1* (Tabela 4).

Tabela 4. Lista polimorfizmów występujących u psów z guzami gruczołu mlekowego.

Gen	Sekwencja referencyjna NC_002008.4	Zidentyfikowany wariant	Zmiana aminokwasu / region w strukturze tRNA	Wynik SIFT dla zmian niesynonimicznych
polimorfizmy zidentyfikowane u wszystkich psów z rakiem gruczołu mlekowego				
<i>tRNA-Leu^(UUR)</i>	m.2678	m.2678_2679insG	między pętlą akceptorową a DHU	-
<i>COX1</i>	m.5367C	m.5367C>T	p.Leu7=	-
<i>COX1</i>	m.5444T	m.5444T>C	p.Ala32=	-
<i>COX1</i>	m.6065A	m.6065A>G	p.Gly239=	-
<i>ATP6</i>	m.8368C	m.8368C>T	p.Leu135=	-
<i>ND4L</i>	m.9911_9912	m.9911_9912insTG*	p.Met1Val	szkodliwa w niskim stopniu (0)
<i>COX3</i>	m.8807G	m.8807G>A	p.Cys55Tyr	tolerowana w niskim stopniu (1)
<i>ND5</i>	m.13299T	m.13299T>A	p.Ser508Thr	tolerowana w niskim stopniu (1)
NCR	m.15814C	m.15814C>T	-	-
polimorfizmy zidentyfikowane u psów z rakiem cewkowo-brodawkowatym G1				
<i>COX1</i>	m.5906A	m.5906A>G	p.Trp186=	-
<i>COX1</i>	m.6302A	m.6302A>G	p.Val318=	-
<i>COX1</i>	m.6683T	m.6683T>C	p.Asp445=	-
<i>COX1</i>	m.6762A	m.6762A>G	p.Ile472=	-
<i>COX2</i>	m.7383A	m.7383A>G	p.Asn117=	-
<i>ATP6</i>	m.8242G	m.8242G>A	p.Thr93=	-
<i>ATP6</i>	m.8303A	m.8303A>G	p.Ile114Val	tolerowana (0,38)
<i>tRNA-Arg</i>	m.9896T	m.9896T>C	pętla TψC	-
<i>ND4</i>	m.11334A	m.11334A>G	p.Glu378=	-
<i>tRNA-Ser^(AGY)</i>	m.11657C	m.11657C>A	między pętlą akceptorową a antykodonową	-
<i>ND5</i>	m.11813A	m.11813A>G	p.Leu12=	-
<i>ND5</i>	m.11869T	m.11869T>C	p.Leu31Pro	tolerowana (0,21)
<i>CYB</i>	m.14534G	m.14534G>A	p.Ile188Val	tolerowana (0,1)
NCR	m.15475T	m.15475T>C	-	-
NCR	m.15750C	m.15750C>T	-	-
VNTR	m.16278G	m.16278G/A**	-	-
polimorfizmy zidentyfikowane u psów z rakiem złożonym G1				
<i>ND1</i>	m.3247T	m.3247T>C	p.Ile167=	-
<i>COX1</i>	m.6821C	m.6821C>T	p.Asn497=	-
<i>COX2</i>	m.7189T	m.7189T>C	p.His52=	-
<i>COX3</i>	m.8772T	m.8772T>C	p.Leu43=	-
<i>ND4</i>	m.10698T	m.10698T>C	p.Tyr166=	-
<i>ND6</i>	m.13762T	m.13762T>C	p.Val115=	-
<i>CYB</i>	m.14474G	m.14474G>A	p.Val98Met	szkodliwa w niskim stopniu (0)
polimorfizmy zidentyfikowane u psa z rakiem płaskonablonkowym G1				
<i>ND2</i>	m.3975T	m.3975T>C	p.Met21Thr	tolerowana (0,08)
<i>ND2</i>	m.4303A	m.4303A>G	p.Leu159=	-

* zmiana ramki odczytu z 1 na 3, ** heteroplazmia

W przypadku psów z rakiem złożonym G1 polimorfizmy występowały wyłącznie w obrębie genów kodujących białka. Sześć na siedem zmian miało charakter synonimiczny, zaś zmiana niesynonimiczna m.14474G>A warunkowała szkodliwą zmianę p.Val98Met w sekwencji białka cytochromu B. Dwa polimorfizmy wystąpiły jedynie u psa z rakiem płaskonabłonkowym G1. Oba wystąpiły w genie *ND2* m.3975T>C i m.4303A>G, z czego pierwszy wariant powodował niesynonimiczną zmianę p.Met21Thr (Tabela 4).

Zidentyfikowano sześć zmian w 27 próbach, z czego trzy o charakterze heteroplazmii. Jedna z nich, m.8617G>A, została zidentyfikowana w próbce krwi psa z rakiem cewkowo-brodawkowatym. Ten wariant miał charakter synonimiczny p.Val218= w białku ATP6. W próbce guza tego samego psa stwierdzono heteroplazmię m.13056A/G w genie *ND5*. Ten wariant heteroplazmatyczny doprowadził do tolerowanej zmiany p.Met427Val w sekwencji białka ND5. U 9-letniego psa rasy husky syberyjski z rakiem cewkowo-brodawkowatym zidentyfikowano mutację m.10589T>C w sekwencji genu *ND4*. Wariant doprowadził do szkodliwej niesynonimicznej zmiany p.Leu130Pro w sekwencji białka ND4. U psów z guzami złożonymi G1 wykryto jedną mutację m.15931delA (NCR) i dwa warianty heteroplazmatyczne: m.9470G/A (tRNA-Gly) i m.16328G/A (VNTR, NCR) (Tabela 5).

Tabela 5. Lista mutacji występujących u psów z guzami gruczołu mlekowego.

Pies*	Gen	Sekwencja referencyjna	Zidentyfikowany wariant	Zmiana aminokwasu / region w strukturze tRNA	Wynik SIFT dla zmian niesynonimicznych
mutacje i heteroplazmia zidentyfikowane u psów z rakiem cewkowo-brodawkowatym G1					
S23K	<i>ATP6</i>	m.8617G	m.8617G>A	p.Val218=	-
S19G	<i>ND4</i>	m.10589T	m.10589T>C	p.Leu130Pro	szkodliwa (0)
S23G	<i>ND5</i>	m.13056A	m.13056A/G**	p.Met427Val	tolerowana (0,18)
mutacje i heteroplazmia zidentyfikowane u psów z rakiem złożonym G1					
S2G	<i>tRNA-Gly</i>	m.9470G	m.9470G/A**	pętla zmienna	-
S29G	NCR	m.15930	m.15931delA	-	-
S29G	VNTR	m.16328G	m.16328G/A**	-	-

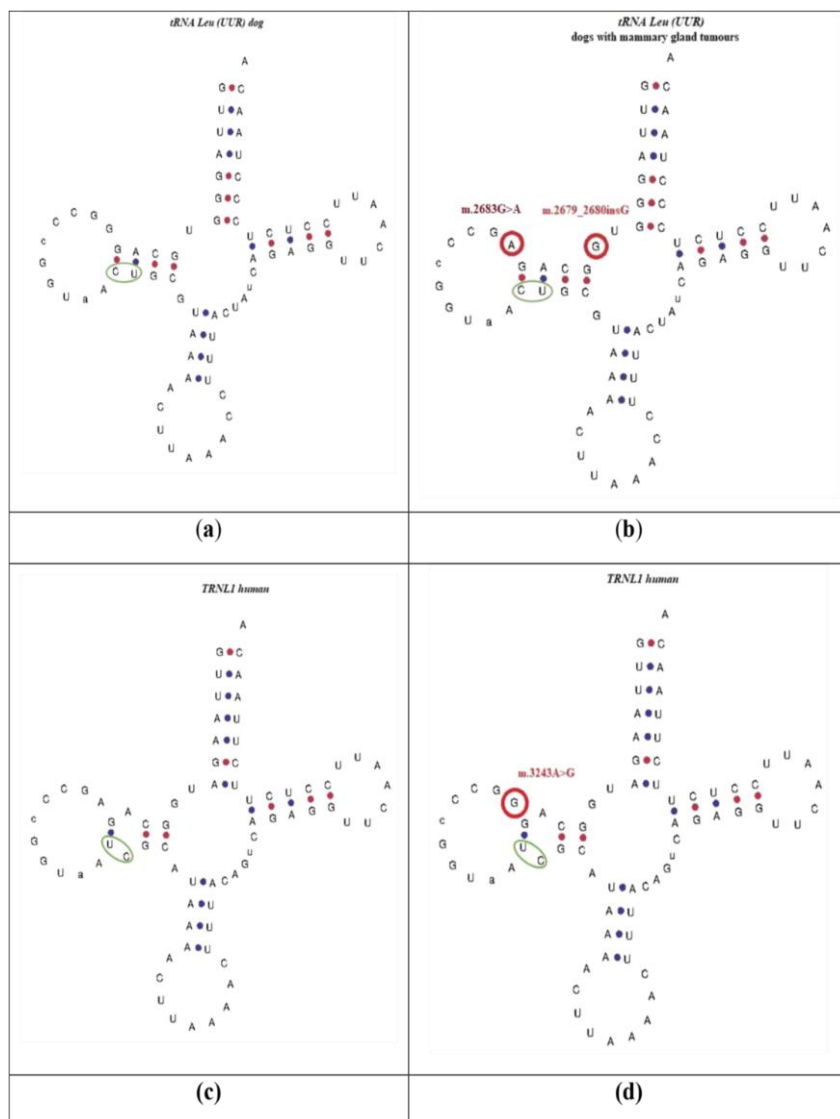
*K – zmiany zidentyfikowane we krwi, G – zmiany zidentyfikowane w guzie, ** – heteroplazmia

Spośród zidentyfikowanych polimorfizmów, jedna zmiana – m.13594G>A – wystąpiła w regionie obejmującym dwa geny: *ND5* na nici ciężkiej oraz *ND6* na nici lekkiej. Polimorfizm zaobserwowano zarówno u psa z rakiem cewkowo-brodawkowatym jak i rakiem złożonym. Efektem tej zmiany była zmiana p.Gly606Glu niesynonimiczna w białku ND5 oraz synonimiczna zmiana p.Thr172= w białku ND6.

Najwyższy wskaźnik heteroplazmii zaobserwowano w regionie VNTR obszaru niekodującego. Zaobserwowano delecję 10 nukleotydów (nt) powtórzenia VNTR u 10-letniego psa nierasowego z rakiem złożonym. Ten polimorfizm długości wykryto wyłącznie we krwi i tkance nowotworowej tego psa. Warto zauważyć, że najwyższy odsetek heteroplazmii zaobserwowano w próbach raka złożonego w porównaniu z innymi typami guzów. Ponadto najniższą liczbę heteroplazmii zaobserwowano dla próby psa z rakiem płaskonabłonkowym. Należy podkreślić, że w regionie VNTR największe różnice wykryto między krwią a tkanką nowotworową u tego samego osobnika. Różnice w obszarze VNTR pozwalały również na rozróżnienie dwóch guzów złożonych G1 występujących w tym samym czasie u jednego osobnika.

Analiza porównawcza genu *MTTL1* u człowieka oraz genu *tRNA-Leu (UUR)* u psa

Ogólna analiza porównawcza genu *MTTL1* u ludzi i genu *tRNA-Leu (UUR)* u psów wykazała, że stopień homologii między tymi genami przyjmował wartości między 84% a 87%. Psy z dwoma polimorfizmami: m.2678_2679insG i m.2683G>A (haplotyp 1) miały wyższą wartość homologii w porównaniu z ludzką sekwencją referencyjną dla tego genu (87%), podczas gdy psy z tylko jednym polimorfizmem: m.2678_2679insG (haplotyp 2) miały wartość homologii na poziomie 85%. W przypadku sekwencji referencyjnej psa z bazy GenBank wartość homologii wynosiła 84% (Ryc. 1).



Ryc. 1. Struktury tRNA-Leu (UUR) psa i MT-TL1 człowieka uzyskane w programie tRNA-scan: **(a)** Przewidywana struktura tRNA-Leu (UUR) psa (sekwencja referencyjna); **(b)** Przewidywana struktura tRNA-Leu (UUR) psa (analizowana sekwencja mtDNA u psów z haplotypem 1.); **(c)** Przewidywana struktura genu *MT-TL1* człowieka (sekwencja referencyjna) **(d)** Przewidywana struktura genu *MT-TL1* człowieka ze zmianą m.3243A>G.

Polimorfizm m.2678_2679insG zaobserwowano w 27 z 27 sekwencji, podczas gdy m.2683G>A wykryto w 18 z 27 sekwencji (ryc. 1). Haplotyp 1 zaobserwowano u dziewięciu z 13 psów (69%), podczas gdy haplotyp 2 zaobserwowano u czterech z 13 psów (31%). Żadna z analizowanych prób od psów ze złośliwymi nowotworami gruczołu mlekowego nie miała tego samego haplotypu, co sekwencja referencyjna psa. Wszystkie zmiany były homoplazmatyczne. Haplotyp 1 był jednakowo obecny u psów ze wszystkimi badanymi typami guzów gruczołu

mlekowego. Nie zidentyfikowano mutacji ani w próbach krwi, ani w próbach tkanki nowotworowej.

Warto zauważyć, że polimorfizm m.2683G>A występujący u psa odpowiadał pozycji m.3243 w genomie człowieka. Mutacja w pozycji m.3243A>G jest uznawana za szkodliwą zmianę obserwowaną u 80% pacjentów z zespołem MELAS. Przeanalizowano również drugorzędową strukturę cząsteczki psa (sekwencja referencyjna) i człowieka (sekwencja referencyjna) tRNA-Leu (UUR), reprezentatywnej cząsteczki tRNA-Leu (UUR) u psów z haplotypem 1 oraz reprezentatywnej cząsteczki tRNA-Leu (UUR) człowieka ze zmianą m.3423A>G (Ryc. 1d). Zaobserwowane zmiany były zlokalizowane między ramieniem DHU a ramieniem akceptorowym (m.2678_2679insG) oraz w pętli DHU (m.2683G>A). Zmiany m.3423A>G i m.2683G>A znajdowały się w tej samej pozycji w pętli DHU. Jednak substytucja miała przeciwny kierunek u psów. Warto zauważyć, że lokalizacja guaniny w tej pozycji w tym regionie w cząsteczce człowieka jest uważana za prawidłową. Należy jednak zwrócić uwagę, że struktura tRNA-Leu (UUR) u psów z nowotworem różniła się od cząsteczek referencyjnych. Co ciekawe, cząsteczka tRNA-Leu (UUR) u człowieka okazała się bardziej niestabilna z powodu substytucji TC>CT w pozycjach m.3253 i m.3254 (pozycje 2693 i 2694 w genomie psa) (Ryc. 1 – zielone kółka).

Dyskusja

Wyniki badań w niniejszej dysertacji wykazały, iż 31% wszystkich opisanych polimorfizmów w genomie mitochondrialnym psa z rakiem cewkowo-brodawkowatym G2 i ponad 93% mutacji występowało w obszarze niekodującym. Z kolei wyniki analiz genomów mitochondrialnych psów z guzami gruczołu mlekowego o złośliwości G1 zweryfikowały hipotezę z poprzedniego badania, iż najczęściej zmian występowało w NCR (26% polimorfizmów oraz 96% wszystkich zidentyfikowanych pozycji heteroplazmatycznych). W dotychczasowej literaturze światowej pojawiały się doniesienia o polimorfizmach w pętli D u psów z nowotworami, m.in. m.15620T>C, m.15627A>G, m.15639T>C (Ślaska i in., 2014; Surdyka i Ślaska, 2017a) oraz m.15814C>T (Śmiech i in., 2016; Surdyka i Ślaska, 2017a). Warto podkreślić, że termin „pętla D” oraz „NCR” stosuje się wymiennie w literaturze na określenie niekodującego fragmentu mtDNA (Nicholls i Minczuk, 2014).

Pętla D stanowi konstrukcję trzeciorzędową DNA o długości około 650 nt (Nicholls i Minczuk, 2014) natomiast cały region niekodujący mtDNA u psa wynosi 1270 nt. Ta

dotatkowa nić określana jest jako 7S DNA, w oparciu o jej właściwości sedymentacyjne. Stabilne struktury pętli D wydają się być cechą mtDNA człowieka i wielu zwierząt, w tym królików, krów i żab z rodzaju *Xenopus* (Annex i Williams, 1990). Jak dotąd nie określono położenia pętli D w genomie mitochondrialnym psa, w przeciwieństwie do mitochondrialnego DNA u człowieka. Zatem przedmiotem dotychczasowych badań nie był cały region niekodujący, lecz tylko jego fragmenty. Swoistym *novum* w niniejszej dysertacji była analiza całego genomu mitochondrialnego, w tym całego regionu niekodującego, co w przyszłości może pozwolić na określenie położenia pętli D w genomie mitochondrialnym psa.

Wynikiem analiz było odkrycie wysokiej liczby mutacji o charakterze heteroplazmii w obszarze VNTR pętli D obejmujący region 16130 – 16430 nt mtDNA. Mutacje w regionie VNTR występowały zarówno w próbach krwi psa z rakiem cewkowo-brodawkowatym G2, jak również u psów z rakiem gruczołu mlekowego G1. Różnice w wariantach motywu VNTR występowały między próbami w guzie i we krwi w porównaniu z sekwencją referencyjną jak również pozwoliły na rozróżnienie dwóch guzów tego samego typu u psa z rakiem złożonym G1. Po raz pierwszy w literaturze światowej opisano różnice na poziomie molekularnym między dwoma guzami tego samego typu histopatologicznego występujące jednocześnie u jednego psa. Ostatnie badania wykazały możliwy związek między zmienną liczbą VNTR a zwiększonym ryzykiem raka piersi u kobiet (Bakhtiari i in., 2021). Może to wskazywać, że pomimo swojego niekodującego charakteru, ten obszar odgrywa ważną rolę w procesie transformacji nowotworowej i jest związany z niestabilnością genetyczną komórek nowotworowych.

Analizy *in silico* ujawniły, że w mitochondrialnym regionie VNTR psów może istnieć wyspa CpG o długości 313 pz (par zasad) w pozycjach 16137- 16449 (%GC = 0,40) (Kowal i in., 2020), która w pewnych okolicznościach może być metylowana lub demetylowana. Poziom mitochondrialnego stresu oksydacyjnego może prowadzić do demetylacji mtDNA (Xu i in., 2017; Yu i in., 2017; Sanyal i in., 2018), dlatego nie można wykluczyć, że zmiany w regionie VNTR obserwowane w guzach gruczołu mlekowego mogą indukować modyfikacje epigenetyczne w mitochondrialnej wyspie CpG. Hipoteza ta powinna być jednak zweryfikowana empirycznie.

Uważa się, że mutacje i polimorfizmy w mtDNA, jak również liczba kopii mtDNA, są związane z różnymi typami nowotworów u człowieka (Domínguez-de-la-Cruz i in., 2020). Zwiększoną liczbę kopii mtDNA zidentyfikowano w komórkach gruczolakoraka endometrium (Wang i in., 2005), raku trzustki (Lynch i in., 2011) oraz w raku płaskonabłonkowym przełyku (Lin i in., 2012). Natomiast zmniejszoną liczbę kopii mtDNA zidentyfikowano w raku płuc

(Lin i in., 2008), raku jelita grubego (Huang i in., 2014), raku żołądka (Sun i in., 2014) i raku piersi (Bai i in., 2011). Według mojej wiedzy brak jest informacji dotyczących liczby kopii mtDNA w tkankach nowotworowych psów. Podobieństwa między rakiem piersi u człowieka a rakiem gruczołu mlekowego u psów wskazują na prawdopodobne zmniejszenie zawartości mtDNA w komórkach nowotworowych psów, jednak hipoteza ta wymaga odpowiedniego zbadania eksperymentalnego. Potencjalna deplecja liczby kopii mtDNA mogłaby wskazywać zatem na ogólny spadek liczby mutacji w genomach mitochondrialnych oraz niewielką liczbę zmian o charakterze szkodliwym. Zmiany, które zaobserwowano w przypadku psów z nowotworami złośliwymi gruczołu mlekowego miały charakter synonimicznych polimorfizmów bądź niesynonimicznych polimorfizmów o łagodnym efekcie fenotypowym. Wśród tych zmian, u wszystkich badanych osobników w przeprowadzonych badaniach występowały następujące polimorfizmy: *tRNA-Leu (UUR)* (m.2678_2679insG), *COX1* (m.5367C>T, m.5444T>C, m.6065A>G), *ATP6* (m.8368C>T), *COX3* (m.8807G>A), *ND4L* (m.9911_9912insTG), *ND5* (m.13299T>A) oraz w regionie niekodującym (m.15814C>T). Ze względu jednak na ich występowanie zarówno we krwi, jak i w tkankach nowotworowych, utrudnione jest jednoznaczne wskazanie ich jako przyczynę bądź efekt kancerogenezy u psów z nowotworami złośliwymi gruczołu mlekowego. Ponadto, zmiany w pozycjach: m.5367C>T oraz m.15814C>T zostały określone jako najbardziej informatywne SNP w genetyce sądowej ze względu na ich wysoką częstość występowania w populacji (Webb i Allard, 2009a, 2009b).

Mutacje zidentyfikowane w analizowanych próbach guzów gruczołu mlekowego występowały w pojedynczych genach u niektórych osobników. Jedynie zmiana m.10589T>C (*ND4*) wywołała u psa rasy husky syberyjski szkodliwą zmianę niesynonimiczną p.Leu130Pro w tym białku. Defekty genetyczne skutkujące dysfunkcyjnym łańcuchem transportu elektronów generują nadmierny poziom mitochondrialnych reaktywnych form tlenu (mtRFT) (Lagouge i Larsson, 2013). W warunkach fizjologicznych i we wczesnych stadiach choroby mitochondria wytwarzają umiarkowane poziomy mtRFT, które są korzystne dla wzrostu i przeżycia komórek. Jednak w miarę pogarszania się dysfunkcji mitochondriów poziomy mtRFT mogą przekraczać tolerowany próg i stać się śmiertelne dla komórek nowotworowych (Galadari i in., 2017; Inigo i Chandra, 2022). Zwiększona aktywność mitochondriów wymagana przez komórki nowotworowe prowadzi do zwiększonej produkcji mtRFT. Powoduje to podwyższony poziom uszkodzeń oksydacyjnych i mutacji mtDNA, co prowadzi do dysfunkcji mitochondriów. Nie można zatem wykluczyć, że wiele zmian w mtDNA spowodowało zbyt duże uszkodzenia komórek nowotworowych, w związku z czym zostały one wyeliminowane; dlatego nie obserwuje się znaczących mutacji w mitogenomach guza w

analizowanych nowotworach złośliwych. Gilkerson i in. (2012) dowiedli, że wadliwe mitochondria wykazywały zwiększoną mitofagię. Kiedy mutacja prowadzi do zmniejszenia potencjału błony mitochondrialnej (depolaryzacja mitochondriów), powoduje zmianę fenotypową, w wyniku czego mitochondria tracą zdolność do normalnego funkcjonowania. W konsekwencji mitochondria nie mogą ponownie połączyć się z siecią mitochondrialną po rozszczepieniu i ulegają destrukcji (Twig i Shirihai, 2011).

Dotychczas w literaturze światowej nie opisano zmian w nowotworach złośliwych psów w mitochondrialnych genach tRNA. Geny tRNA są kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania łańcucha oddechowego i dla całego organizmu. Jedną z często obserwowanych mutacji (m.3243A>G) w genie *MT-TL1* (UUR) u człowieka powoduje zespół MELAS (Bulduk i in., 2020). Region otaczający pozycję m.3243 jest etiologicznym hotspotem mutacji u ludzi (Moraes i in., 1993). Lorenc i in. (2003) przeanalizowali zmiany mtDNA w różnych próbach raka, porównując je z normalnymi kontrolami tkanek i zidentyfikowali mutację m.3243A>G w próbie raka okrężnicy i m.3244G>A w raku płuc. Podobną mutację zaobserwowali Mayr i in. (2008) oraz Meierhofer i in. (2006) w badaniach onkocytozy nerki (Meierhofer i in., 2006; Mayr i in., 2008). Najnowsze odkrycia przedstawione przez Lin i in. (2019) wykazały obecność m.3243A>G w raku brodawkowatym tarczycy. Ponadto, przewiduje się, że ten nukleotyd będzie miał trzeciorzędową interakcję z nukleotydami w pozycjach 8, 14 i 21 (Helm i in., 2000). Nie można zatem wykluczyć, że polimorfizm m.2683G>A u psa, korespondujący z mutacją m.3243A>G u człowieka odgrywa znaczącą rolę w progresji lub proliferacji raka w złośliwych nowotworach gruczołu mlekowego u psów.

Podsumowanie i wnioski

W wyniku przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Po raz pierwszy wykorzystano technologię *Next Generation Sequencing* w analizie zmian w całych genomach mitochondrialnych psów z nowotworami złośliwymi gruczołu mlekowego, co pozwoliło na określenie związku polimorfizmów, mutacji i heteroplazmii w mitochondrialnym DNA z transformacją nowotworową.
2. U psów z guzami gruczołu mlekowego zidentyfikowano 604 zmiany molekularne, które mogą być związane z procesem nowotworzenia, w tym 6 mutacji oraz 151 heteroplazmii, które są przyczyną lub skutkiem procesu kancerogenezy. Jedynym genem, w którym nie zaobserwowano mutacji i polimorfizmów był gen *ATP8*, co świadczy o jego wysokim konserwatyźmie genetycznym.
3. Polimorfizmy i mutacje wykryto w 12 z 13 genów kodujących białka mitochondrialne, jednak ich efekt fenotypowy miał przeważnie łagodny charakter, co może wskazywać, że genomy mitochondrialne ze szkodliwymi mutacjami w nowotworach gruczołu mlekowego, jak również we krwi są efektywnie eliminowane.
4. Polimorfizm m.9911_9912insTG o niesynonimicznym charakterze (p.Met1Val) występujący u wszystkich psów z guzami gruczołu mlekowego typu G1, miał szkodliwy wpływ na białko ND4L, co może być potencjalnym czynnikiem destabilizującym łańcuch oddechowy związanym z procesem kancerogenezy u psów.
5. Wykazano, iż efektem polimorfizmu 13594G>A była niesynonimiczna zmiana p.Gly606Glu w białku ND5 oraz synonimiczna zmiana p.Thr172= w białku ND6, co świadczy o tym, że zmiany punktowe w mitochondrialnym DNA mogą mieć wpływ na więcej niż jeden gen.
6. Wykazano, iż polimorfizm m.2683G>A w *tRNA-Leu (UUR)* psa korespondował z pozycją m.3243A>G u człowieka, związaną z zespołem MELAS i z wieloma typami nowotworów. Nie można zatem wykluczyć, że odgrywa on rolę w progresji lub proliferacji złośliwych nowotworów gruczołu mlekowego u psów.
7. Regionem charakteryzującym się najwyższym poziomem mutacji oraz heteroplazmii w genomach mitochondrialnych psów ze złośliwym guzem gruczołu mlekowego był obszar zmiennej liczby powtórzeń tandemowych regionu niekodującego, który w przyszłości może być brany pod uwagę w typowaniu biomarkerów kancerogenezy u psów.

8. Stwierdzone różnice na poziomie molekularnym w obszarze pętli D między dwoma guzami tego samego typu histopatologicznego występujące jednocześnie u jednego psa mogą wskazywać, że pomimo swojego niekodującego charakteru, ten obszar odgrywa ważną rolę w procesie transformacji nowotworowej i może być związany z niestabilnością genetyczną komórek nowotworowych.

Bibliografia

- Annex B. H., Williams R. S., 1990, *Mitochondrial DNA structure and expression in specialized subtypes of mammalian striated muscle.*, Molecular and cellular biology, 10, nr 11: 5671-8.
- Bai R. K., Chang J., Yeh K. T., Lou M. A., Lu J. F., Tan D. J., ... Wong L. J. C., 2011, *Mitochondrial DNA content varies with pathological characteristics of breast cancer*, Journal of Oncology,.
- Baiker K., Hofmann S., Fischer A., Gödde T., Medl S., Schmahl W., ... Matiassek K., 2009, *Leigh-like subacute necrotising encephalopathy in Yorkshire Terriers: Neuropathological characterisation, respiratory chain activities and mitochondrial DNA*, Acta Neuropathologica, 118, nr 5: 697-709.
- Bakhtiari M., Park J., Ding Y.-C., Shleizer-Burko S., Neuhausen S. L., Halldórsson B. V., ... Bafna V., 2021, *Variable number tandem repeats mediate the expression of proximal genes.*, Nature communications, 12, nr 1: 2075.
- Baranowska I., Jäderlund K. H., Nennesmo I., Holmqvist E., Heidrich N., Larsson N.-G., ... Andersson L., 2009, *Sensory Ataxic Neuropathy in Golden Retriever Dogs Is Caused by a Deletion in the Mitochondrial tRNATyr Gene*, PLOS Genetics, 5, nr 5: e1000499.
- Bertagnolli A. C., Soares P., van Asch B., Amorim A., Cirnes L., Máximo V., Cassali G. D., 2009, *An assessment of the clonality of the components of canine mixed mammary tumours by mitochondrial DNA analysis*, Veterinary Journal, 182, nr 2: 269-274.
- Brandon M., Baldi P., Wallace D. C., 2006, *Mitochondrial mutations in cancer*, Oncogene, 25, nr 34: 4647-4662.
- Bulduk B. K., Kiliç H. B., Bekircan-Kurt C. E., Haliloğlu G., Erdem Özdamar S., Topaloğlu H., Kocaefe Y. Ç., 2020, *A Novel Amplification-Refractory Mutation System-PCR Strategy to Screen MT-TL1 Pathogenic Variants in Patient Repositories*, Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 24, nr 3: 165-170.
- Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J., 2018, *fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor*, Bioinformatics, 34, nr 17: i884-i890.
- Cullen J. M., Page R., Misdorp W., 2008, *An Overview of Cancer Pathogenesis, Diagnosis, and Management, Tumors in Domestic Animals*, Ames, Iowa, USA: 1-44, <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470376928.ch1>.
- Czarnecka A. M., Krawczyk T., Zdrożny M., Lubiński J., Arnold R. S., Kukwa W., ... Petros J. A., 2010, *Mitochondrial NADH-dehydrogenase subunit 3 (ND3) polymorphism (A10398G) and sporadic breast cancer in Poland*, Breast Cancer Research and Treatment, 121, nr 2: 511-518.
- Danecek P., Bonfield J. K., Liddle J., Marshall J., Ohan V., Pollard M. O., ... Li H., 2021, *Twelve years of SAMtools and BCFtools*, GigaScience, 10, nr 2: 1-4.
- den Dunnen J. T., Dalgleish R., Maglott D. R., Hart R. K., Greenblatt M. S., McGowan-Jordan J., ... Taschner P. E. M., 2016, *HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update*, Human Mutation, 37, nr 6: 564-569.
- DiMauro S., Schon E. A., 2003, *Mitochondrial respiratory-chain diseases*, New England Journal of Medicine,.
- Dobson J. M., 2013, *Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs*, ISRN Veterinary Science, 2013, nr ID 941275: 1-23.
- Domínguez-de-la-Cruz E., Muñoz M. de L., Pérez-Muñoz A., García-Hernández N., Moctezuma-Meza C., Hinojosa-Cruz J. C., 2020, *Reduced mitochondrial DNA copy number is associated with the haplogroup, and some clinical features of breast cancer in Mexican patients*, Gene, 761: 145047.
- Elies C., Schauder S., 2018, *La relation de l'homme au chien familial : symptôme de sa dynamique psychique ?*, Topique, n° 142, nr 1: 53-67.
- Galadari S., Rahman A., Pallichankandy S., Thayyullathil F., 2017, *Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?*, Free radical biology & medicine, 104: 144-164.
- Gardner H. L., Sivaprakasam K., Briones N., Zismann V., Perdigonos N., Drenner K., ... Hendricks W. P. D., 2019, *Canine osteosarcoma genome sequencing identifies recurrent mutations in DMD and the histone methyltransferase gene SETD2*, Communications Biology 2019 2:1, 2, nr 1: 1-13.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A., 2005, *The Proteomics Protocols Handbook*, The Proteomics Protocols Handbook, : 571-608.
- Gilkerson R. W., De vries R. L. A., Lebot P., Wikstrom J. D., Torgykes E., Shirihai O. S., ... Schon E. A., 2012, *Mitochondrial autophagy in cells with mtDNA mutations results from synergistic loss of*

- transmembrane potential and mTORC1 inhibition*, Human Molecular Genetics, 21, nr 5: 978-990.
- Goldschmidt M. H., Peña L., Rasotto R., Zappulli V., 2011, *Classification and grading of canine mammary tumors*, Veterinary Pathology, 48, nr 1: 117-131.
- Grzybowska-Szatowska L., Slaska B., 2012, *Polymorphisms in genes encoding mt-tRNA in female breast cancer in Poland*, Mitochondrial DNA, 23, nr 2: 106-111.
- Helm M., Brulé H., Friede D., Giegé R., Pütz D., Florentz C., 2000, *Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs.*, RNA (New York, N.Y.), 6, nr 10: 1356-79.
- Hendrick M., 1998, *Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals*, Armed Forces Inst. of Pathology, 2: 28-29.
- Huang B., Gao Y.-T., Shu X.-O., Wen W., Yang G., Li G., ... Cai Q., 2014, *Association of Leukocyte Mitochondrial DNA Copy Number with Colorectal Cancer Risk: Results from the Shanghai Women's Health Study*, Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 23, nr 11: 2357-2365.
- Imes D. L., Wictum E. J., Allard M. W., Sacks B. N., 2012, *Identification of single nucleotide polymorphisms within the mtDNA genome of the domestic dog to discriminate individuals with common HVI haplotypes*, Forensic Science International: Genetics, 6, nr 5: 630-639.
- Inigo J. R., Chandra D., 2022, *The mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt}): shielding against toxicity to mitochondria in cancer*, Journal of Hematology & Oncology, 15: 98.
- Khanna C., Lindblad-Toh K., Vail D., London C., Bergman P., Barber L., ... Withrow S., 2006, *The dog as a cancer model*, Nature Biotechnology, .
- Kim K. S., Lee S. E., Jeong H. W., Ha J. H., 1998, *The Complete Nucleotide Sequence of the Domestic Dog (Canis familiaris) Mitochondrial Genome*, Molecular Phylogenetics and Evolution, 10, nr 2: 210-220.
- Kowal K., Tkaczyk A., Ząbek T., Pierzchała M., Ślaska B., 2020, *Comparative Analysis of CpG Sites and Islands Distributed in Mitochondrial DNA of Model Organisms*, Animals, 10, nr 4: 665.
- Kozakiewicz P., Grzybowska-Szatowska L., Ciesielka M., Rzymowska J., 2021, *The Role of Mitochondria in Carcinogenesis*, International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 5100, 22, nr 10: 5100.
- Kraus C., Snyder-Mackler N., Promislow D. E. L., 2023, *How size and genetic diversity shape lifespan across breeds of purebred dogs*, GeroScience, 45, nr 2: 627-643.
- Kumar P., Parashar M. C., 2020, *Occurrence of mammary tumour in dogs.*, Journal of Agricultural Research Advances, 2, nr 2: 29-32.
- Lagouge M., Larsson N. G., 2013, *The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing*, Journal of internal medicine, 273, nr 6: 529-543.
- Li H., 2013, *Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM*, .
- Li Y., Xu W., Sun C., Lin J., Qu J., Cao J., ... Yang L., 2019, *Reversible Dilation of Cerebral Macrovascular Changes in MELAS Episodes*, Clinical Neuroradiology, 29, nr 2: 321-329.
- Lin C.-S., Lee H.-T., Lee S.-Y., Shen Y.-A., Wang L.-S., Chen Y.-J., Wei Y.-H., 2012, *High Mitochondrial DNA Copy Number and Bioenergetic Function Are Associated with Tumor Invasion of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines*, International Journal of Molecular Sciences 2012, Vol. 13, Pages 11228-11246, 13, nr 9: 11228-11246.
- Lin C.-S., Wang L.-S., Tsai C.-M., Wei Y.-H., 2008, *Low copy number and low oxidative damage of mitochondrial DNA are associated with tumor progression in lung cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy*, Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery, 7, nr 6: 954-958.
- Lorenc A., Bryk J., Golik P., Kupryjańczyk J., Ostrowski J., Pronicki M., ... Bartnik E., 2003, *Homoplasmic MELAS A3243G mtDNA mutation in a colon cancer sample*, Mitochondrion, 3, nr 2: 119-124.
- Loureiro R., Mesquita K. A., Magalhães-Novais S., Oliveira P. J., Vega-Naredo I., 2017, *Mitochondrial biology in cancer stem cells*, Seminars in Cancer Biology, 47, nr October 2016: 18-28.
- Lowe T. M., Chan P. P., 2016, *tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes*, Nucleic acids research, 44, nr W1: W54-W57.
- Lynch S. M., Weinstein S. J., Virtamo J., Lan Q., Liu C.-S., Cheng W.-L., ... Stolzenberg-Solomon R. Z., 2011, *Mitochondrial DNA Copy Number and Pancreatic Cancer in the Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study*, Cancer Prevention Research, 4, nr 11: 1912-1919.
- Mayr J. A., Meierhofer D., Zimmermann F., Feichtinger R., Kögler C., Ratschek M., ... Kofler B., 2008, *Loss of complex I due to mitochondrial DNA mutations in renal oncocytoma*, Clinical Cancer

- Research, 14, nr 8: 2270-2275.
- Meierhofer D., Mayr J. A., Fink K., Schmeller N., Kofler B., Sperl W., 2006, *Mitochondrial DNA mutations in renal cell carcinomas revealed no general impact on energy metabolism*, British Journal of Cancer, 94, nr 2: 268-274.
- Moraes C. T., Ciacci F., Bonilla E., Jansen C., Hirano M., Rao N., ... DiMauro S., 1993, *Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis: Is the tRNA^{Leu}(UUR) gene an etiologic hot spot?*, Journal of Clinical Investigation, 92, nr 6: 2906-2915.
- Murgia C., Pritchard J. K., Kim S. Y., Fassati A., Weiss R. A., 2006, *Clonal Origin and Evolution of a Transmissible Cancer*, Cell, 126, nr 3: 477-487.
- Ng P. C., Henikoff S., 2003, *SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function.*, Nucleic acids research, 31, nr 13: 3812-4.
- Nicholls T. J., Minczuk M., 2014, *In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA*, Experimental Gerontology, 56: 175-181.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., Varlamov A., Vaskin Y., Efremov I., ... Tleukenov T., 2012, *Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit*, Bioinformatics, 28, nr 8: 1166-1167.
- Picard M., Wallace D. C., Burrelle Y., 2016, *The rise of mitochondria in medicine*, Mitochondrion, 30: 105-116.
- Pinho S. S., Carvalho S., Cabral J., Reis C. A., Gärtner F., 2012, *Canine tumors: A spontaneous animal model of human carcinogenesis*, Translational Research, 159, nr 3: 165-172.
- Rebhun R. B., Thamm D. H., 2010, *Multiple distinct malignancies in dogs: 53 cases*, Journal of the American Animal Hospital Association, 46, nr 1: 20-30.
- Rivera P., Melin M., Biagi T., Fall T., Häggström J., Lindblad-Toh K., Von Euler H., 2009, *Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2*, Molecular Biology, Pathobiology, and Genetics, 69, nr 22: 8770-8774.
- Rodríguez J., Santana Á., Herráez P., Killick D. R., de los Monteros A. E., 2022, *Epidemiology of canine mammary tumours on the Canary Archipelago in Spain*, BMC Veterinary Research, 18, nr 1: 268.
- Sanyal T., Bhattacharjee P., Bhattacharjee S., Bhattacharjee P., 2018, *Hypomethylation of mitochondrial D-loop and ND6 with increased mitochondrial DNA copy number in the arsenic-exposed population*, Toxicology, 408: 54-61.
- Ślaska B., Grzybowska-Szatowska L., Bugno-Poniewierska M., Surdyka M., Śmiech A., 2013, *Nuclear and mitochondrial DNA mutation in human and canine tumors*, Medycyna Weterynaryjna, 69, nr 4: 195-202.
- Ślaska B., Śmiech A., Bownik A., Kowal K., Tkaczyk A., Pierzchała M., Dudka J., 2020, *Defect in mitochondrial NADH-dehydrogenase genes in canine mast cell tumours*, : 1-29.
- Ślaska B., Surdyka M., Brodzki A., Nisztuk S., Gurgul A., Bugno-Poniewierska M., ... Orzelski M., 2014, *Mitochondrial D-loop mutations can be detected in sporadic malignant tumours in dogs*, Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 58, nr 4: 631-637.
- Śmiech A., Łopuszyński W., Ślaska B., Bulak K., Jasik A., 2019, *Occurrence and distribution of canine cutaneous mast cell tumour characteristics among predisposed breeds*, Journal of Veterinary Research (Poland), 63, nr 1: 141-148.
- Śmiech A., Ślaska B., Surdyka M., Grzybowska-Szatowska L., Łopuszyński W., Róžańska D., 2016, *Identification of additional mitochondrial DNA mutations in canine mast cell tumours*, Acta veterinaria Scandinavica, 58, nr 1: 28.
- Spencer N. Y., Stanton R. C., 2019, *The Warburg Effect, Lactate, and Nearly a Century of Trying to Cure Cancer*, Seminars in Nephrology, 39, nr 4: 380-393.
- Sun Y., Gu J., Ajani J. A., Chang D. W., Wu X., Stroehlein J. R., 2014, *Genetic and intermediate phenotypic susceptibility markers of gastric cancer in Hispanic Americans: A case-control study*, Cancer, 120, nr 19: 3040-3048.
- Surdyka M., Ślaska B., 2017a, *Defect of the mitochondrial DNA hypervariable region as a risk factor for canine mammary tumour*, Veterinary and Comparative Oncology, 15, nr 3: 820-828.
- Surdyka M., Ślaska B., 2017b, *Defect in ND2, COX2, ATP6 and COX3 mitochondrial genes as a risk factor for canine mammary tumour*, Veterinary and Comparative Oncology, 15, nr 3: 1062-1072.
- Switonski M., Szczerbal I., Nowacka J., 2004, *The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics*, Journal of Applied Genetics, 45, nr 2: 195-214.
- Tang H., Thomas P. D., 2016, *PANTHER-PSEP: Predicting disease-causing genetic variants using*

- position-specific evolutionary preservation*, *Bioinformatics*, 32, nr 14: 2230-2232.
- Thumser-Henner P., Nytko K. J., Rohrer Bley C., 2020, *Mutations of BRCA2 in canine mammary tumors and their targeting potential in clinical therapy*, *BMC veterinary research*, 16, nr 1.
- Tkaczyk-Wliziło A., Kowal K., Slaska B., 2022, *Mitochondrial DNA alterations in the domestic dog (*Canis lupus familiaris*) and their association with development of diseases: A review*, .
- Tomasetti C., Vogelstein B., 2015, *Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions*, *Science*, 347, nr 6217: 78-81.
- Twig G., Shirihai O. S., 2011, *The Interplay Between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy*, <https://home.liebertpub.com/ars>, 14, nr 10: 1939-1951.
- Wang T., Ma J., Hogan A. N., Bannasch D. L., Ostrander E. A., Correspondence T. I., 2020, *Quantitative Translation of Dog-to-Human Aging by Conserved Remodeling of the DNA Methylome*, *Cell Systems*, 11: 176-185.e6.
- Wang Y., Liu V. W. S., Xue W. C., Tsang P. C. K., Cheung A. N. Y., Ngan H. Y. S., 2005, *The increase of mitochondrial DNA content in endometrial adenocarcinoma cells: A quantitative study using laser-captured microdissected tissues*, *Gynecologic Oncology*, 98, nr 1: 104-110.
- Webb K. M., Allard M. W., 2009a, *Identification of Forensically Informative SNPs in the Domestic Dog Mitochondrial Control Region*, *Journal of Forensic Sciences*, 54, nr 2: 289-304.
- Webb K. M., Allard M. W., 2009b, *Mitochondrial genome DNA analysis of the domestic dog: identifying informative SNPs outside of the control region.*, *Journal of forensic sciences*, 54, nr 2: 275-88.
- Xavier P. L. P., Müller S., Fukumasu H., 2020, *Epigenetic Mechanisms in Canine Cancer*, *Frontiers in Oncology*, 10: 2353.
- Xu Y., Li H., Hedmer M., Hossain M. B., Tinnerberg H., Broberg K., Albin M., 2017, *Occupational exposure to particles and mitochondrial DNA - relevance for blood pressure*, *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 16, nr 1.
- Yu D., Du Z., Pian L., Li T., Wen X., Li W., ... Hu J. F., 2017, *Mitochondrial DNA hypomethylation is a biomarker associated with induced senescence in human fetal heart mesenchymal stem cells*, *Stem Cells International*, 2017.

Wykaz skrótów i akronimów

- Ala – *alanine*, alanina
- AKC – *American Kennel Club*
- Asn – *asparagine*, asparagina
- ATP – adenozyntrofosforan
- DHU – dihydrourydyna
- HGVS - *Human Genome Variation Society*
- MELAS – *Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*, miopatia mitochondrialna, encefalopatia, kwasica mleczanowa, występowanie incydentów podobnych do udarów)
- mtDNA – *mitochondrial DNA*, mitochondrialny DNA
- MYC* – *proto-oncogene, bHLH transcription factor* – gen kodujący jądrową fosfoproteinę biorącą udział w podziałach komórkowych oraz apoptozie.
- NCR – *non-coding region*, region niekodujący
- nDNA – *nuclear DNA*, jądrowy DNA
- NGS – *Next Generation Sequencing*, Sekwencjonowanie Następnej Generacji
- nt – *nucleotide*, nukleotyd
- OXPHOS – *Oxidative phosphorylation*, fosforylacja oksydacyjna
- PCR – *Polymerase Chain Reaction*, Reakcja Łańcuchowa Polimerazy
- Pętla D – *displacement loop*, D-loop
- PTEN* – *phosphatase and tensin homolog*– gen kodujący fosfatazę, gen supresorowy
- pz – par zasad
- RBI* – gen kodujący białko supresorowe pRb (retinoblastoma protein)
- RFT – reaktywne formy tlenu
- mtRTF – mitochondrialne reaktywne formy tlenu
- Ser – *serine*, seryna
- SIFT – *sorting intolerant from tolerant*
- SNP – *single nucleotide polymorphisms*, polimorfizmy pojedynczych nukleotudów
- Thr – *threonine*, treonina
- TP53* – gen kodujący białko p53 – czynnik transkrypcyjny o własnościach supresora nowotworowego.
- VNTR – *variable number of tandem repeats*, zmienna liczba powtórzeń tandemowych
- WHO – *World Health Organisation*, Światowa Organizacja Zdrowia

Wykaz skrótów genów w genomie mitochondrialnym

Symbol	Synonim	Opis
<i>MT-TY</i>	<i>MTTY, TRNY</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA tyrozyny
<i>MT-TW</i>	<i>MTTW, TRNW</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA tryptofanu
<i>MT-TV</i>	<i>MTTV, TRNV</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA waliny
<i>MT-TT</i>	<i>MTTT, TRNT</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA treoniny
<i>MT-TS2</i>	<i>MTTS2, TRNS2</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA seryny 2 (AGY)
<i>MT-TS1</i>	<i>MTTS1, TRNS1</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA seryny 1 (UCN)
<i>MT-TR</i>	<i>MTRR, TRNR</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA argininy
<i>MT-TQ</i>	<i>MTTQ, TRNQ</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA glutaminy
<i>MT-TP</i>	<i>MTPP, TRNP</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA proliny
<i>MT-TN</i>	<i>MTTN, TRNN</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA asparaginy
<i>MT-TM</i>	<i>MTTM, TRNM</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA metioniny
<i>MT-TL2</i>	<i>MTTL2, TRNL2</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA leucyny 2 (CUN)
<i>MT-TL1</i>	<i>MTTL1, TRNL1</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA leucyny 1 (UUR)
<i>MT-TK</i>	<i>MTTK, TRNK</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA lizyny
<i>MT-TI</i>	<i>MTTI, TRNI</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA izoleucyny
<i>MT-TH</i>	<i>MTHH, TRNH</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA histydyny
<i>MT-TG</i>	<i>MTTG, TRNG</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA glicyny
<i>MT-TF</i>	<i>TRNF</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA fenyloalaniny
<i>MT-TE</i>	<i>MTTE, TRNE</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA kwasu glutaminowego
<i>MT-TD</i>	<i>MTTD, TRND</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA kwasu asparaginowego
<i>MT-TA</i>	<i>MTTA, TRNA</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA alaniny
<i>MT-RNR2</i>	<i>MTRNR2, RNR2</i>	gen kodujący mitochondrialne 16S RNA
<i>MT-RNR1</i>	<i>MTRNR1, RNR1</i>	gen kodujący mitochondrialne 12S RNA
<i>MT-ND6</i>	<i>MTND6, ND6</i>	dehydrogenaza NADH podjednostka 6
<i>MT-ND5</i>	<i>MTND5, ND5</i>	dehydrogenaza NADH podjednostka 5
<i>MT-ND4L</i>	<i>MTND4L, ND4L</i>	dehydrogenaza NADH podjednostka 4L
<i>MT-ND4</i>	<i>MTND4, ND4</i>	dehydrogenaza NADH podjednostka 4
<i>MT-ND3</i>	<i>MTND3, ND3</i>	dehydrogenaza NADH podjednostka 3
<i>MT-ND2</i>	<i>MTND2, ND2</i>	dehydrogenaza NADH podjednostka 2
<i>MT-ND1</i>	<i>MTND1, ND1</i>	dehydrogenaza NADH podjednostka 1
<i>MT-CYB</i>	<i>MTCYB, CYTB</i>	cytochrom b
<i>MT-CO3</i>	<i>COIII, MTCO3, COX3</i>	oksydaza cytochromowa podjednostka III
<i>MT-CO2</i>	<i>COII, MTCO2, COX2</i>	oksydaza cytochromowa podjednostka II
<i>MT-CO1</i>	<i>COI, MTCO1, COX1</i>	oksydaza cytochromowa podjednostka I
<i>MT-TC</i>	<i>MTTC, TRNC</i>	gen kodujący mitochondrialne tRNA cysteiny
<i>MT-ATP8</i>	<i>ATPase8, MTATP8, ATP8</i>	Syntaza ATP F0 podjednostka 8
<i>MT-ATP6</i>	<i>ATPase6, MTATP6, ATP6</i>	Syntaza ATP F0 podjednostka 6

Oświadczenia współautorów (Załącznik nr 1)

Prof. dr hab. Brygida Ślaska

Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Analysis of mitochondrial genome from labrador (*Canis lupus familiaris*) with mammary gland tumour reveals novel mutations and polymorphisms**. Krzysztof Kowal, Brygida Ślaska, Adam Bownik, Beata Horecka, Jan Gawor, Anna Śmiech, Angelika Tkaczyk. Ann. Anim. Sci. 2019 Vol. 19 Issue 3 s. 619-632, il., bibliogr. Sum. DOI: 10.2478/aoas-2019-0027

wynosił 15% i polegał na udziale w koncepcji pracy, opracowaniu założeń metodycznych, konsultacji interpretacji wyników i udziale w redagowaniu manuskryptu.

Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Molecular differences in mitochondrial DNA genomes of dogs with malignant mammary tumours**. Krzysztof Kowal, Angelika Tkaczyk-Wliziło, Mariusz Pierzchała, Jan Gawor, Brygida Ślaska. Vet. Comp. Oncol. 2022 Vol. 20 Issue 1 s. 256-264, DOI: 10.1111/vco.12772

wynosił 15% i polegał na udziale w koncepcji pracy, konsultacji interpretacji wyników i udziale w redagowaniu manuskryptu.

Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Evaluation of the *tRNA-Leu (UUR)* gene haplotype profile observed in canine mammary gland tumours based on comparative analysis with the *MT-TL1* human gene**. Krzysztof Kowal, Angelika Tkaczyk-Wliziło, Mariusz Pierzchała, Brygida Ślaska. Ann. Anim. Sci. 2022 Volume 22 Issue 3 s. 915 - 922, il., bibliogr. sum. DOI: 10.2478/aoas-2022-0009

wynosił 15% i polegał na udziale w koncepcji pracy, konsultacji interpretacji wyników i udziale w redagowaniu manuskryptu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie ww. publikacji w opracowaniu pt. „**Genomika mitochondrialna nowotworów złośliwych gruczołu mlekowego u psów (*Canis lupus familiaris*)**” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr. Krzysztofa Kowala

Lublin, dn. 24.03.2023r.

(podpis współautora)

Dr Angelika Tkaczyk-Wlizło

Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Analysis of mitochondrial genome from labrador (*Canis lupus familiaris*) with mammary gland tumour reveals novel mutations and polymorphisms**. Krzysztof Kowal, Brygida Ślaska, Adam Bownik, Beata Horecka, Jan Gawor, Anna Śmiech, Angelika Tkaczyk. Ann. Anim. Sci. 2019 Vol. 19 Issue 3 s. 619-632, il., bibliogr. Sum. DOI: 10.2478/aoas-2019-0027

wynosił 5% i polegał na weryfikacji uzyskanych wyników analiz.

Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Molecular differences in mitochondrial DNA genomes of dogs with malignant mammary tumours**. Krzysztof Kowal, Angelika Tkaczyk-Wlizło, Mariusz Pierzchała, Jan Gawor, Brygida Ślaska. Vet. Comp. Oncol. 2022 Vol. 20 Issue 1 s. 256-264, DOI: 10.1111/vco.12772

wynosił 15% i polegał na weryfikacji uzyskanych wyników analiz i udziale w redagowaniu manuskryptu.

Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Evaluation of the *tRNA-Leu (UUR)* gene haplotype profile observed in canine mammary gland tumours based on comparative analysis with the *MT-TL1* human gene**. Krzysztof Kowal, Angelika Tkaczyk-Wlizło, Mariusz Pierzchała, Brygida Ślaska. Ann. Anim. Sci. 2022 Volume 22 Issue 3 s. 915 - 922, il., bibliogr. sum. DOI: 10.2478/aoas-2022-0009

wynosił 10% i polegał na weryfikacji uzyskanych wyników analiz.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie ww. publikacji w opracowaniu pt. „**Genomika mitochondrialna nowotworów złośliwych gruczołu mlekowego u psów (*Canis lupus familiaris*)**” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr. Krzysztofa Kowala

Lublin, dn. 24.03.2023r.


.....
(podpis współautora)

Prof. dr hab. Mariusz Pierzchała

Zakład Genomiki i Bioróżnorodności

Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk

ul. Postępu 36A, Jastrzębiec

05-552 Magdalenka

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Molecular differences in mitochondrial DNA genomes of dogs with malignant mammary tumours**. Krzysztof Kowal, Angelika Tkaczyk-Wlizło, Mariusz Pierzchała, Jan Gawor, Brygida Ślaska. *Vet. Comp. Oncol.* 2022 Vol. 20 Issue 1 s. 256-264, DOI: 10.1111/vco.12772


wynosił 5% i polegał na konsultacji wyników analiz bioinformatycznych.

Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Evaluation of the *tRNA-Leu (UUR)* gene haplotype profile observed in canine mammary gland tumours based on comparative analysis with the *MT-TL1* human gene**. Krzysztof Kowal, Angelika Tkaczyk-Wlizło, Mariusz Pierzchała, Brygida Ślaska. *Ann. Anim. Sci.* 2022 Volume 22 Issue 3 s. 915 - 922, il., bibliogr. sum. DOI: 10.2478/aoas-2022-0009

wynosił 5% i polegał na konsultacji wyników analiz bioinformatycznych.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie ww. publikacji w opracowaniu pt. „**Genomika mitochondrialna nowotworów złośliwych gruczołu mlekowego u psów (*Canis lupus familiaris*)**” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr. Krzysztofa Kowala

Jastrzębiec, dn. 24.03.2023


.....
(podpis współautora)

Mgr Jan Gawor

Środowiskowa Pracownia Sekwencjonowania i Syntezy DNA

Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk

ul. Pawińskiego 5A

02-106 Warszawa

Rada Dyscypliny

Zootechnika i Rybactwo

Uniwersytetu Przyrodniczego

w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Analysis of mitochondrial genome from labrador (*Canis lupus familiaris*) with mammary gland tumour reveals novel mutations and polymorphisms**. Krzysztof Kowal, Brygida Ślaska, Adam Bownik, Beata Horecka, Jan Gawor, Anna Śmiech, Angelika Tkaczyk. Ann. Anim. Sci. 2019 Vol. 19 Issue 3 s. 619-632, il., bibliogr. Sum. DOI: 10.2478/aoas-2019-0027

wynosił 5% i polegał na udziale w analizach laboratoryjnych

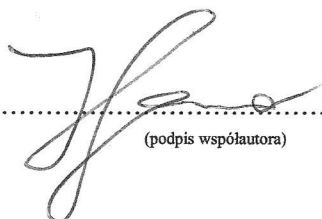
Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Molecular differences in mitochondrial DNA genomes of dogs with malignant mammary tumours**. Krzysztof Kowal, Angelika Tkaczyk-Wlizło, Mariusz Pierzchała, Jan Gawor, Brygida Ślaska. Vet. Comp. Oncol. 2022 Vol. 20 Issue 1 s. 256-264, DOI: 10.1111/vco.12772

wynosił 5% i polegał na udziale w analizach laboratoryjnych

Wyrażam zgodę na wykorzystanie ww. publikacji w opracowaniu pt. „**Genomika mitochondrialna nowotworów złośliwych gruczołu mlekowego u psów (*Canis lupus familiaris*)**” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr. Krzysztofa Kowala

Warszawa, dn.

25.03.2023


.....
(podpis współautora)

dr hab. Anna Śmiech, prof. uczelni
Katedra Patomorfologii i Weterynarii Sądowej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Głęboka 30
20-612 Lublin

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Analysis of mitochondrial genome from labrador (*Canis lupus familiaris*) with mammary gland tumour reveals novel mutations and polymorphisms**. Krzysztof Kowal, Brygida Ślaska, Adam Bownik, Beata Horecka, Jan Gawor, Anna Śmiech, Angelika Tkaczyk. Ann. Anim. Sci. 2019 Vol. 19 Issue 3 s. 619-632, il., bibliogr. Sum. DOI: 10.2478/aoas-2019-0027

wynosił 5% i polegał na analizie histopatologicznej nowotworu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie ww. publikacji w opracowaniu pt. „**Genomika mitochondrialna nowotworów złośliwych gruczołu mlekowego u psów (*Canis lupus familiaris*)**” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr. Krzysztofa Kowala

Lublin, dn.

24.03.2023



(podpis współautora)

dr hab. Adam Bownik, prof. uczelni
Katedra Hydrobiologii i Ochrony Ekosystemów
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. B. Dobrzańskiego 37
20-262 Lublin

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Analysis of mitochondrial genome from labrador (*Canis lupus familiaris*) with mammary gland tumour reveals novel mutations and polymorphisms**. Krzysztof Kowal, Brygida Ślaska, Adam Bownik, Beata Horecka, Jan Gawor, Anna Śmiech, Angelika Tkaczyk. Ann. Anim. Sci. 2019 Vol. 19 Issue 3 s. 619-632, il., bibliogr. Sum. DOI: 10.2478/aoas-2019-0027

wynosił 5% i polegał na korekcie manuskryptu.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie ww. publikacji w opracowaniu pt. „**Genomika mitochondrialna nowotworów złośliwych gruczołu mlekowego u psów *Canis lupus familiaris***” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr. Krzysztofa Kowala

Lublin, dn. 20.02.2013

Adam Bownik
(podpis współautora)

dr Beata Horecka

Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Akademicka 13

20-950 Lublin

**Rada Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Oświadczam, że mój udział w publikacji: **Analysis of mitochondrial genome from labrador (*Canis lupus familiaris*) with mammary gland tumour reveals novel mutations and polymorphisms**. Krzysztof Kowal, Brygida Ślaska, Adam Bownik, Beata Horecka, Jan Gawor, Anna Śmiech, Angelika Tkaczyk. Ann. Anim. Sci. 2019 Vol. 19 Issue 3 s. 619-632, il., bibliogr. Sum. DOI: 10.2478/aoas-2019-0027

wynosił 5% i polegał na konsultacji uzyskanych wyników badań sekwencji białkowych

Wyrażam zgodę na wykorzystanie ww. publikacji w opracowaniu pt. „**Genomika mitochondrialna nowotworów złośliwych gruczołu mlekowego u psów (*Canis lupus familiaris*)**” stanowiącym rozprawę doktorską Pana mgr. Krzysztofa Kowala

Lublin, dn. 24.03.2023r

Beata Horecka
(podpis współautora)

Publikacje wchodzące w skład pracy doktorskiej (Załącznik nr 2)



ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL GENOME FROM LABRADOR (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*) WITH MAMMARY GLAND TUMOUR REVEALS NOVEL MUTATIONS AND POLYMORPHISMS

Krzysztof Kowal¹, Brygida Ślaska^{1*}, Adam Bownik¹, Beata Horecka¹, Jan Gawor², Anna Śmiech³,
Angelika Tkaczyk¹

¹Institute of Biological Bases of Animal Production, Faculty of Biology, Animal Sciences
and Bioeconomy, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

²Laboratory of DNA Sequencing and Oligonucleotide Synthesis, Institute of Biochemistry
and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Pawińskiego 5a, 02-106 Warsaw, Poland

³Sub-Department of Clinical Diagnostic and Veterinary Dermatology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612, Lublin, Poland

*Corresponding author: brygida.slaska@up.lublin.pl

Abstract

The aim of the study was to find associations between the process of neoplastic transformation and mtDNA mutations/polymorphisms, i.e. factors with potential prognostic significance, and to determine their impact on the biochemical properties, as well as structural, and functional properties of proteins. Blood and neoplastic tissue samples were collected from a 9-year-old Labrador dog with a diagnosed malignant mammary tumour. Next-generation genome sequencing (NGS) of the entire mitochondrial genome was performed using Illumina technology, and bioinformatics analyses were carried out. This is the first report demonstrating the application of NGS in the analysis of the canine mtDNA genome in neoplastic disease. The proposed strategy is innovative and promising. For the first time in the literature, the sequence of 29 genes was analysed to determine their association with the prevalence of tumour. In total, 32 polymorphic loci and 15 mutations were identified. For the first time, as many as 24 polymorphisms and all the mutations have been described to be associated with the neoplastic process in dogs. Most polymorphisms/mutations were found in the D-loop (31% of the polymorphisms and 93% of the mutations) and the *COX1* gene sequence (16% of the polymorphisms). Blood or cancer heteroplasmy was noted in 93% of the mutations. Four of the 18 polymorphisms detected in the protein-coding genes were non-synonymous polymorphisms that have not been described in the literature so far (m.T7593C in *COX2*, m.G8807A in *COX3*, m.A9911G in *ND4L*, and m.T13299A in *ND5*) but resulted in changes in amino acids in proteins. These mutations and polymorphisms can affect mitochondrial functions and may be a result of cell adaptation to the changes in the environment occurring during carcinogenesis. The replacement of “wild type” mtDNA by a mutated molecule may be an important phenomenon accompanying carcinogenesis.

Key words: tumour, dog, mtDNA, mutations, NGS

The role of mitochondria in the malignant process in humans was determined already over 70 years ago when, in 1956, Otto Warburg described the glycolysis phenomenon occurring in cancer cells despite the presence of oxygen. The high level of glycolysis in the presence of oxygen (called the Warburg effect) results from genetic or epigenetic changes and is characteristic of most cancers. Metabolic changes such as elevated levels of glycolysis and increased glucose consumption play an important role in the process of malignant transformation, increase the aggressiveness and invasiveness of tumours, and act as antiapoptotic factors (Grzybowska-Szatkowska and Slaska, 2012).

Mitochondrial DNA (mtDNA) is characterised by a ten-fold higher mutagenicity rate than its nuclear counterpart. It is associated with e.g. a high concentration of free oxygen radicals generated in the oxidative phosphorylation process. DNA strands that are not covered with histone proteins are especially susceptible to the action of reactive oxygen species, which also contribute to an increase in the frequency of mutations. A relationship has been found between mutations in human mtDNA in the tumour initiation and progression phases supporting the genetic instability of the cell and disrupting its repair functions (Bai et al., 2009; Grzybowska-Szatkowska and Slaska, 2012; Ślaska et al., 2013).

The length of the mtDNA molecule of *Canis lupus familiaris* was found to be 16,728 bp, having a 1270 bp-long control region including 30 tandem repeats of a 10-nt motif between conserved sequence block (CSB) I and II. 37 genes are encoded in the mitochondrial genome (Kim et al., 1998). 28 CG nucleotide-rich genes are encoded on the heavy strand (H), including 10 genes encoding respiratory chain proteins, 2 ATPase genes, 14 tRNA genes, and 2 rRNA genes. The other tRNA genes and the *NADH6* gene are encoded on the H-strand so that the L-strand gives the sense reading frames (Kim et al., 1998).

Although the mitochondrial genome sequence was described at the end of the 20th century, the association of mtDNA mutations with neoplastic transformation in dogs was investigated much later. However, it was noted that the aetiology of many diseases, including tumours, is similar at the molecular level in both dogs and humans (Ślaska et al., 2013). Investigations of the association of mitochondrial DNA mutations with the development of human cancers are focused on both coding and non-coding gene regions (Grzybowska-Szatkowska and Slaska, 2012). Somatic mtDNA mutations have been reported to be associated with neoplastic transformation in dogs as well (Slaska et al., 2014, 2015; Ślaska et al., 2014, 2016; Śmiech et al., 2016, 2019; Surdyka and Slaska, 2017 a, b), but most mutations have been described in the non-coding region of the mtDNA D-loop. The research of coding genes in canine mtDNA has been limited to only a few genes (Ślaska et al., 2015; Ślaska et al., 2016; Surdyka and Slaska, 2017 b; Śmiech et al., 2019). A vast majority of mtDNA genes were not analysed in those studies. To date, the world literature does not provide information about mutations and polymorphisms in the entire mitochondrial genome associated with neoplastic transformation in dogs. Given the clonal nature of mtDNA and the high copy number, mtDNA mutations can serve as a new effective molecular biomarker for detection of canine tumours. It is plausible that determination of the mtDNA defect may be useful in the diagnosis and detection of tumours.

The aim of the study was to determine the association of the neoplastic transformation process with mtDNA mutations/polymorphisms, i.e. factors with potential prognostic importance, and to identify their impact on the biochemical properties, structure, and function of proteins. Another objective was to detect regions in the entire mitochondrial genome that are particularly susceptible to the occurrence of mutations and polymorphisms in canine mammary tumours.

Material and methods

Animals

The analyses were carried out on tissue samples collected from a 9-year-old Labrador dog with diagnosed mammary tumour (tubulopapillary carcinoma, G2). The dog received neither hormone therapy nor chemotherapy. DNA extracted from post-operative cancer tissue and blood of the examined dog was analysed.

Laboratory procedures

DNA was isolated with the use of an automated nucleic acid extraction system – QIACube (Qiagen, Hilden, Germany). The DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) was used for DNA extraction from mammary gland tumour tissue and blood. The DNA sample was assessed qualitatively by electrophoretic separation in agarose gel and qualitatively (BioPhotometer spectrophotometer; Eppendorf, Hamburg, Germany). The mammary gland tumour tissue sample was placed in a sterile container. Blood was sampled into sterile test-glasses with the K₂EDTA anticoagulant (dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid) (Medlab, Raszyn, Poland). In order to determine the histological types of the analysed mammary gland tumour tissue, a section was sampled from surgically removed tumour for histopathological analysis. The mammary gland tumour tissue was fixed in buffered formalin, embedded in paraffin blocks, and routinely stained with H&E and toluidine blue. Microscopic assessment of the tumour was performed. The malignancy degree of the mammary gland tumour was assessed using the 3-grade scale of malignancy, i.e. a sum of point values assigned to histomorphological traits according to Goldschmidt et al. (2011).

Mitochondrial DNA was selectively amplified on the total genomic DNA using two pairs of primers: F1418 and R11041, ~9,5kb PCR product, and 9190F and R2382, ~9,8kb PCR product (Imes et al., 2012). These two long-range PCR amplicons fully covered the mitochondrial genome sequence. PCR reactions were carried out using KAPA HiFi PCR Kit reagents (KAPA Biosystems, Wilmington, USA). After amplification, the PCR products were analysed in agarose gel and purified using Ampure XP magnetic beads (Beckman Coulter, Brea, USA). The quantity of DNA was measured using a Qubit 2.0 fluorimeter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Both PCR products were diluted to the desired concentration and pooled in an equimolar ratio. Such a DNA mixture was next used in library preparation.

Mitochondrial DNA (mtDNA) was sequenced in the DNA Sequencing and Oligonucleotide Synthesis Laboratory (oligo.pl) at the Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Science. Approximately 1 µg of the PCR DNA template mix was mechanically sheared by nebulization and Illumina shotgun library was constructed using a TruSeq PCR-Free Kit (Illumina, San Diego, CA) following manufacturer's instructions. The library sample was sequenced on an Illumina MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA) using a 600-cycle kit (v3) in paired-end mode. The sequence reads were filtered by quality using the FastX toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) and assembled into contigs with the use of the Newbler v.3.0 GS De Novo Assembler (Roche, USA). Contig alignments were investigated using Seqman software from Lasergene package (DNASTar, USA). The remaining gaps were closed by PCR and confirmed by Sanger capillary sequencing.

Bioinformatics analysis

The nucleotide sequences obtained were subjected to bioinformatics analyses (Altschul et al., 1997; Huang and Madan, 1999) in order to determine mutation and polymorphic sites within the analysed mtDNA genome in the neoplasm tissue (DNA Baser Sequence Assembler v3.2 (2012), Unipro UGENE (v. 1.26.3.), and MEGA (v. 7.0.26)). The nucleotide sequence in the neoplasm tissue and in the blood was compared to the reference sequence (GenBank accession NC_002008; Kim et al., 1998). The analysis of mutations in mt-tRNA genes and their influence on the tRNA structure was conducted in tRNAscan-SE 2.0 (Lowe and Chan, 2016).

The probability of deleterious mutations, i.e. a functional effect of the non-synonymous protein-coding SNP, was determined using the Panther Classification System (Tang and Thomas, 2016). It predicts disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation. The ExPASy Server (Gasteiger et al., 2005) was used to characterise such physicochemical parameters as the theoretical isoelectric point (pI), instability index, aliphatic index, and grand average hydropathy (GRAVY). SOPMA was used for calculating the secondary structural features of the antioxidant protein sequences considered. Trans Membrane prediction using the Hidden Markov Model (TMHMM) was used for predicting transmembrane helices based on the Hidden Markov Model (Combet et al., 2000).

The investigations consisted in analyses of tubulo-papillary carcinoma, as this is one of the most prevalent canine mammary tumours diagnosed in Poland (Łopuszyński et al., 2010; Szczubiał and Łopuszyński, 2011).

Results

The Illumina sequencing yielded 19 182 raw paired reads for the tumour sample and 11 862 raw reads for the blood sample (Table 1). After quality trimming following sequencing adaptor removal, 16 164 paired reads and 9 671 988 nucleotides of sequence data remained for the tumour sample. In the case of the blood sample, 10 273 paired reads and 6 152 592 nucleotides of the sequencing data passed the

quality filters (Table 1). Mitochondrial genome assembly using the Newbler program generated a single circular contig with the size of 16642 bp in both cases. 580X sequencing coverage was generated for the tumour sample and 365X genome coverage was obtained for the blood sample sequentially (Table 1).

Table 1. Summary of mitochondrial DNA sequencing results

Sample	Reads count		Sequencing data yield (nt)	mtDNA genome coverage
	Raw reads	Filtered reads		
Blood	11 862	10 273	6 152 592	580x
Tumor	19 182	16 164	9 671 988	365x

Polymorphisms and/or mutations were detected in 10 of the 13 protein-coding mtDNA genes in the Labrador dog diagnosed with tubulopapillary carcinoma. They were also noted in the *16S rRNA* gene and in two genes encoding mt-tRNA (*TRNL1* (coding tRNA-Leu1), *TRNR* (coding tRNA-Arg)). The highest number of mutations/polymorphisms was recorded in the non-coding region of the D-loop (Tables 2 and 3). There were no mutations and polymorphisms in three protein-coding genes (*ATP8*, *NADH3*, *NADH6*), the *12S rRNA*-encoding gene, and 20 tRNA-encoding genes. A majority of the mutations and polymorphisms were substitutions, while insertions were detected in three mtDNA positions (Tables 2 and 3).

The presence of polymorphisms in relation to the canine reference sequence was detected in 32 positions of mitochondrial DNA (Table 2), and the highest number was noted in the D-loop (10 polymorphic sites) and in the *COX1* gene sequence (5 polymorphisms). Four of the 18 polymorphisms present in the protein-coding genes were non-synonymous polymorphisms resulting in alterations in the protein amino acids (Table 2). Polymorphism m.T7593C in the *COX2* gene resulted in substitution of methionine with threonine (p.M187T) in the COX2 protein. The substitution of cysteine with tyrosine (p.C55Y) in the COX3 protein was caused by the m.G8807A polymorphism. In turn, the m.A9911G polymorphism led to substitution of methionine with valine (p.M1V) in the ND4L protein. The m. T13299A polymorphism contributed to substitution of serine with threonine (p.S508T) in the ND5 protein (Table 2). There were also three insertion-type length polymorphisms, i.e. two in genes encoding mt-tRNA (*TRNL1* (coding tRNA-Leu1) (UUR) – m.2678_2679insG and *TRNR* (coding tRNA-Arg) – m.9910_9911insAT), and one in the D-loop (m.16660_16661insCC). The changes were located in the D-arm and loop in the *TRNL1* gene and in the acceptor stem region in the *TRNR* gene.

Somatic mutations were detected in 15 positions of the mitochondrial genome, with 14 identified as transition mutations in the hypervariable mtDNA region (Table 3). Additionally, there was a non-synonymous mutation in position m.11028 in the *ND4* gene sequence (Table 3).

Nearly all the identified mutations were heteroplasmic. Blood or cancer heteroplasmy was noted in 14 of the 15 mutations. Cancer heteroplasmy was identified in seven positions in the hypervariable mtDNA region (m.16168A/G, m.16178A/G, m.16188A/G, m.16198A/G, m.16228A/G, m.16238A/G, m.16358A/G), whereas blood heteroplasmy was detected in six positions of the D-loop (m.16278A/G,

m.16288A/G, m.16328A/G, m.16338A/G, m.16368A/G, m.16388A/G) and in gene *ND4* (m.11028C/T) (Table 3).

Table 2. Polymorphisms in the mitochondrial genome in the reference sequence, blood, and tumour tissue of the Labrador dog with tubulopapillary carcinoma

Gene	Position in reference sequence (1..16727)	Reference sequence NC_002008	Sequences in blood	Sequences in tumour cells	Amino acid change	Position of the changed nucleotide in the codon
<i>16S rRNA</i>	1091..2670	m.1351A	m.A1351G	m.A1351G	–	–
<i>TRNL1</i>	2671..2744	m.2678_2679	m.2678.1G	m.2678.1G	–	–
		m.2683G	m.G2683A	m.G2683A	–	–
<i>ND1</i>	2747..3703	m.2962C	m.C2962T	m.C2962T	p.I72I	ATC→ATT
		m.3196T*	m.T3196C	m.T3196C	p.L150L	CTT→CTC
<i>ND2</i>	3914..4957	m.4940T	m.T4940C	m.T4940C	p.L343L	CTA→TTA
<i>COX1</i>	5349..6893	m.5367C	m.C5367T	m.C5367T	p.L7L	CTG→TTG
		m.5444T	m.T5444C	m.T5444C	p.A32A	GCT→GCC
		m.6065A	m.A6065G	m.A6065G	p.G239G	GGA→GGG
		m.6401C	m.C6401T	m.C6401T	p.G351G	GGC→GGT
<i>COX2</i>	7034..7717	m.6554T	m.T6554C	m.T6554C	p.G402G	GGT→GGC
		m.7593T	m.T7593C	m.T7593C	p.M187T	ATA→ACA
<i>ATP6</i>	7964..8644	m.8281T*	m.T8281C	m.T8281C	p.I106I	ATT→ATC
		m.8368C	m.C8368T	m.C8368T	p.L135L	CTC→CTT
<i>COX3</i>	8644..9427	m.8807G	m.G8807A	m.G8807A	p.C55Y	TGC→TAC
<i>TRNR</i>	9842..9910	m.9910_9911	m.9910.2AT	m.9910.2AT	–	–
<i>ND4L</i>	9911..10207	m.9911A	m.A9911G	m.A9911G	p.M1V	ATG→GTG
<i>ND4</i>	10201..11578	m.10611A	m.A10611T	m.A10611T	p.G137G	GGA→GGT
		m.10992G*	m.G10992A	m.G10992A	p.L264L	TTG→TTA
<i>ND5</i>	11778..13598	m.13299T	m.T13299A	m.T13299A	p.S508T	TCA→ACA
<i>CYB</i>	14183..15322	m.14977T*	m.T14977C	m.T14977C	p.P265P	CCT→CCC
		m.15214G	m.G15214A	m.G15214A	p.E344E	GAG→GAA
<i>D-loop</i>	15458..16727	m.15620T*	m.T15620C	m.T15620C	–	–
		m.15627A*	m.A15627G	m.A15627G	–	–
		m.15639T*	m.T15639A	m.T15639A	–	–
		m.15814C*	m.C15814T	m.C15814T	–	–
		m.16148A	m.A16148G	m.A16148G	–	–
		m.16158A	m.A16158A/G	m.A16158A/G	–	–
		m.16398A	m.A16398G	m.A16398G	–	–
		m.16418A	m.A16418G	m.A16418G	–	–
		m.16660_16661	m.16660.2CC	m.16660.2CC	–	–
		m.16672C	m.C16672T	m.C16672T	–	–

*mtDNA position described in literature reports of canine tumours.

Table 3. Mutations in the mitochondrial genome between blood and tumour tissue of the Labrador dog with tubulopapillary carcinoma

Gene/Region	Reference sequence NC_002008 (1..16727)	Sequences in blood	Sequences in tumour cells	Amino acid change	Position of the changed nucleotide in the codon
<i>ND4</i>	m.11028T	m.11028C/T*	m.11028C	p.C276C	TGT→TGC
<i>D-loop</i>	m.16168A	m.16168A	m.16168A/G*	–	–
	m.16178A	m.16178A	m.16178A/G*	–	–
	m.16188G	m.16188G	m.16188A/G*	–	–
	m.16198G	m.16198A	m.16198A/G*	–	–
	m.16218G	m.16218G	m.16218A	–	–
	m.16228G	m.16228G	m.16228A/G*	–	–
	m.16238G	m.16238A	m.16238A/G*	–	–
	m.16278G	m.16278A/G*	m.16278G	–	–
	m.16288A	m.16288A/G*	m.16288A	–	–
	m.16328G	m.16328A/G*	m.16328G	–	–
	m.16338G	m.16338A/G*	m.16338A	–	–
	m.16358A	m.16358A	m.16358A/G*	–	–
	m.16368G	m.16368A/G*	m.16368A	–	–
	m.16388A	m.16388A/G*	m.16388G	–	–

*Heteroplasmy.

In the region from 16130 to 16430 bp of the D-loop, there is a 10-nucleotide tandem repeat motif (5'-GTACACGT(A/G)C-3'). In the case of tubulopapillary carcinoma, this motif exhibits greater variation than that of the reference sequence (Table 4). Among the 30 tandem repeats, 12 were found to retain the 5'-GTACACGTAC-3' motif in the blood and 11 retained the motif in the tumour tissue. The same numbers of 5'-GTACACGTGC-3' repeats were observed in both the blood and tumour, and these numbers were lower than in the reference sequence. In the case of tubulopapillary carcinoma, there was also an increased number of motifs, in which the 5'-GTACACGTA/GC-3' read indicates heteroplasmy.

Table 4. Variation in the number of tandem repeat motifs between the reference sequence, blood, and tumour tissue sampled from the canine mammary tumour

	Number of 10-nucleotide motifs in the VNTR region		
	5'-GTACACGTAC-3'	5'-GTACACGTGC-3'	5'-GTACACGTA/GC-3'
Reference sequence	16/30	14/30	0/30
Sequences in blood	12/30	11/30	7/30
Sequences in tumour cells	11/30	11/30	8/30

The analyses carried out to determine the deleterious effect of the polymorphisms, i.e. a functional effect of the non-synonymous protein-coding SNP determined using

the Panther Classification System in the case of the substitution of methionine with valine (p.M1V) in the ND4L protein indicate that a substitution of a single amino acid in the protein has a probably damaging impact on its function. The analyses carried out to determine the deleterious effect of substitutions p.M187T in the COX2 protein, p.C55Y in the COX3 protein, and p.S508T in the ND5 protein indicated that the substitutions were more likely not to disrupt protein function.

In the case of the amino acid substitution p.M1V in the ND4L protein, the instability index value indicates a transition in the stability of the protein from unstable in the reference sequence to stable (Table 5) at the m.A9911G mutation in the *ND4L* gene sequence (Table 2). No significant differences were noted in the case of the other protein properties in the non-synonymous protein-coding SNP of the *COX2*, *COX3*, and *ND5* genes of the dog with tubulopapillary carcinoma (Table 5). Secondary structure elements are presented in Table 6. The results revealed that the random coil dominated in the secondary structure of the COX2 protein (p.M187T), followed by the alpha helix, extended strand, and beta turns. The alpha helix dominated in the secondary structure of the COX3 (p.C55Y), ND4L (p.M1V), and ND5 (p.S508T) proteins, followed by the random coil, extended strand, and beta turns. There was only a slight decrease in the percentage proportion of the compact alpha helix structure in the case of the p.M1V substitution (73.47%) relative to normal protein (83.67%) and thus an increase in the percentage of the random coil and extended strand structures (Table 6).

Table 5. Comparison of protein properties in non-synonymous protein-coding SNP in the canine tumour calculated by the ExPASy Server

Protein	Amino acid change	Theoretical pI (Isoelectric point)	Aliphatic index	Instability index	Grand average of hydropathicity (GRAVY)
COX2	p.M187T	4.62	109.91	36.97 (stable protein)	0.285
	Normal	4.62	109.91	36.64 (stable protein)	0.296
COX3	p.C55Y	6.44	93.37	20.87 (stable protein)	0.444
	Normal	6.44	93.37	19.67 (stable protein)	0.459
ND4L	p.M1V	5.27	143.16	38.74 (stable protein)	1.326
	Normal	5.27	140.20	43.22 (unstable protein)	1.302
ND5	p.S508T	9.28	109.95	31.07 (stable protein)	0.591
	Normal	9.28	109.95	31.51 (stable protein)	0.591

The results indicate that the non-synonymous mutations resulting in changes in the amino acids (p.M187T, p.C55Y, p.M1V, p.S508T) in the tubulopapillary carcinoma tissue did not influence the number of transmembrane sequences (Table 7). The values of the expected number of amino acids in transmembrane helices (Exp number of AAs in TMHs) of the COX3, ND4L, and ND5 proteins, which substantially exceeded the threshold value (18), suggest that they are very likely to be transmembrane proteins or serve as signal peptides. The expected number of amino acids in transmembrane helices in the first 60 amino acids of the protein (Exp number, first

60 AAs) was comparable to that for normal protein and COX2, COX3, ND4L, and ND5 proteins with amino acid changes (Table 7).

Table 6. Secondary structure elements calculated by SOPMA

Secondary structure	COX2		COX3		ND4L		ND5	
	p.M187T	normal	p.C55Y	normal	p.M1V	normal	p.S508T	normal
Alpha helix (%)	29.96	31.72	50.19	50.96	73.47	83.67	55.12	55.61
310 helix (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Pi helix (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Beta bridge (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Extended strand (%)	23.35	24.23	17.24	15.71	9.18	7.14	13.53	13.04
Beta turn (%)	5.73	3.52	5.75	6.90	2.04	2.04	3.63	3.14
Bend region (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Random coil (%)	40.97	40.53	26.82	26.44	15.31	7.14	27.72	28.22
Ambiguous states (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Other states (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Table 7. Prediction of transmembrane helices in genes using the Hidden Markov Model (TMHMM)

	Protein name/ Amino acid change	Length (aa)	Transmembrane sequences	Exp number of AAs in TMHs	Exp number, first 60 AAs
COX2	p.M187T	183	1	22.55	22.34
	normal	183	1	22.59	22.34
COX3	p.C55Y	217	4	102.82	21.78
	normal	217	4	102.82	21.78
ND4L	p.M1V	98	3	62.86	41.82
	normal	98	3	62.77	41.82
ND5	p.S508T	562	12	270.60	20.94
	normal	562	12	270.62	20.94

Discussion

Investigations of the association of mitochondrial DNA with neoplastic transformation in dogs have been conducted for only a few years. They are partly focused on the non-coding region of the mitochondrial genome, i.e. the D-loop, in which numerous mutations and polymorphisms associated with canine tumours have been detected (Ślaska et al., 2014; Ślaska et al., 2014; Śmiech et al., 2016; Surdyka and Ślaska 2017 a). The present study demonstrated 31% of all described polymorphisms and over 93% of mutations in the D-loop (mtDNA nucleotide position 15458..16727) in the dog with mammary tumour (Tables 2 and 3). This may indicate that, despite its non-coding character, the D-loop plays an important role in the neoplastic transfor-

mation process. This thesis is confirmed by the results obtained in this study (Tables 2 and 3) and literature data (Ślaska et al., 2014; Slaska et al., 2014; Śmiech et al., 2016; Surdyka and Slaska, 2017 a).

Four of the ten polymorphisms in the D-loop (Table 2) have already been shown in the literature to be associated with the neoplastic process in dogs. They were detected in mtDNA positions m.15620, m.15627, m.15639 (Slaska et al., 2014 ; Ślaska et al., 2014; Surdyka and Slaska, 2017 a), and m.15814 (Śmiech et al., 2016; Surdyka and Slaska, 2017 a) (Table 2). This may imply a predilection of dogs with tumour diseases to carry a D-loop defect. The other polymorphisms in positions m.16148, m.16158, m.16398, m.16418, m.16660_16661, and m.16672 (Table 2) have been identified here for the first time, probably due to the fact that the D-loop region starting from position 16148 bp of mtDNA has not been investigated in relation to canine tumours so far.

None of the mutations detected in tubulopapillary carcinoma (Table 3) has been described in the literature as a mutation associated with the neoplastic process in dogs. Considering the non-coding mtDNA region, this may be associated with the fact that the D-loop region has not been investigated in the literature. The present study describes for the first time a non-synonymous mutation in the *ND4* gene in the form of blood heteroplasmy (m.11028C/T) (Table 3). Mutations in the *ND4* gene in tumours diagnosed in German Shepherd dogs were presented by Ślaska et al. (2016); however, the mutation at position m.11028 was not reported.

Blood heteroplasmy was noted in six positions in the D-loop mutations, whereas tumour heteroplasmy was detected in seven D-loop positions (Table 3). It should be emphasised that blood or tumour heteroplasmy was detected in almost 93% of the mutations identified in the D-loop.

As in the study conducted by Surdyka and Slaska (2017 a), we observed length heteroplasmy in the Polyc-polyT-Polyc stretch in position m.16660.2CC (Table 2). It is possible that the accumulation and conservation of numerous SNPs in the genome have an impact on the progression and/or development of canine mammary cancer, since SNP in the D-loop region may induce ROS generation and contribute to neoplastic transformation, as shown by other authors (Brandon et al., 2006). Length heteroplasmy is a common phenomenon in the mitochondrial genome. This may indicate a potential use of the heteroplasmy phenomenon in the diagnostics of canine tumours.

Noteworthy, the mutations in the D-loop were present only in the 220 bp fragment (position 16168-16388 bp of mtDNA), which accounts for merely 17% of its length (Table 3). This analysed fragment is located entirely within the 16130-16430 bp region of the D-loop comprising motif 5'-GTACACGTA/GC-3' in the hyper-variable VNTR region (Kim et al., 1998; Webb and Allard, 2009), in which there were differences between the analysed sequences present in the tumour, blood, and reference sequence associated with the frequency of the motif variants and heteroplasmy (Table 4). Heteroplasmy can be hereditary when two versions of the mitochondrial genome are inherited from the mother (Nisztuk-Pacek et al., 2019). It can also be associated with the emergence of *de novo* mutations, e.g. in tumour tissue (Slaska et al., 2014; Ślaska et al., 2014; Śmiech et al., 2016; Surdyka and Slaska,

2017 a). As shown by the available literature, this region has not been analysed to date with regard to the association of mutations with the neoplastic process in dogs. Yet, this issue should be further investigated with great attention, given its potential prognostic significance. This assumption is reasonable, since the mtDNA D-loop is responsible for the process of replication, transcription, and organisation of the mitochondrial genome. The available data suggest that mutations in this region may impair the function of the electron transport chain, thereby leading to generation of increased levels of reactive oxygen species, which damage the DNA structure. Additionally, excess levels of reactive oxygen species can lead to nuclear DNA damage and, consequently, tumour development (Brandon et al., 2006; Dement et al., 2007; Grzybowska-Szatkowska and Slaska, 2012).

The present study demonstrated yet undescribed numerous polymorphisms in the mtDNA coding regions associated with the neoplastic process in dogs. Among the 13 mtDNA coding genes, the following have been described to date: *ND1*, *ND2*, *ND4*, *COX1*, *COX2*, *COX3*, *ATP6*, and *CYB* (Slaska et al., 2015; Ślaska et al., 2016; Surdyka and Slaska, 2017 b; Śmiech et al., 2019). However, only four canine tumour-related polymorphisms of the 22 polymorphisms detected in the present investigations (Table 2) were described in the studies mentioned above. These included polymorphisms in the *ND1* gene in position m.3196 of mtDNA (Slaska et al., 2015), in position m.8281 of the *ATP6* gene (Surdyka and Slaska, 2017 b), in position m.10992 of the *ND4* gene (Ślaska et al., 2016), and in position m.14977 in the *CYB* gene (Śmiech et al., 2019). This indicates that 18 new polymorphisms related to the neoplastic process in dogs have been detected in the present study (Table 2).

Noteworthy are the four yet undescribed non-synonymous polymorphisms (m.T7593C in *COX2*, m.G8807A in *COX3*, m.A9911G in *ND4L*, and m.T13299A in *ND5*) detected in the protein-coding genes (Table 2), due to their potential adverse effects on the function of proteins. The analysis of the main protein parameters (Tables 5–7), except for the ND4L protein, did not reveal significant differences in the values of parameters between the analysed sequences, which indicates that the substitutions are more likely not to disrupt protein function. It is probable that although there was no significant effect of the amino acid changes in positions p.M187T, p.C55Y, and p.S508T induced by mutations on genes *COX2*, *COX3* and *ND5*, respectively, on the protein function, the total effect of the accompanying polymorphisms may have contributed to neoplastic transformation. Therefore, genes *COX2*, *COX3*, *NDL4*, and *ND5* should be subjected to further analyses.

The change in the ND4L protein (p.M1V) associated with the non-synonymous polymorphism in the *ND4L* gene and described in the literature for the first time is puzzling. *In silico* analyses have demonstrated that the difference in one position of the amino acid sequence compared with the reference sequence has a positive effect on protein stability, i.e. the change transforms an unstable protein before the mutation into a stable one after the mutation (Table 5). This can be verified by the theory proposed by Guruprasad et al. (1990), who argue that protein instability is caused by the presence of certain dipeptides in the protein structure. This study showed a mutation that resulted in a change in the amino acid sequence p.M1V. Another amino acid in the peptide sequence is serine. The instability value is 44.94 for di-

peptide MS and 1.0 for VS (Guruprasad et al., 1990), which explains the increase in the stability of the ND4L structure. In the case of neoplastic transformation, the mutation results in transition into the stable structure of the ND4L protein. However, the analyses carried out to determine the functional effect of the non-synonymous protein-coding SNP, in the case of substitution of methionine with valine (p.M1V) in the ND4L protein, indicate probability that a substitution of a single amino acid in the protein has a probably detrimental impact on its function.

The sequence of 29 genes was analysed for the first time to assess their association with the occurrence of tumours. 13 genes out of this number exhibited polymorphisms (Table 2). Additionally, many polymorphisms in coding genes were detected and ascribed a role in the neoplastic process in dogs for the first time (Table 2). Their greatest number, i.e. 5 yet undescribed polymorphisms, was detected in the *COXI* gene (Table 2). The literature provides data on two synonymous polymorphisms in the *COXI* gene associated with canine tumours (Slaska et al., 2015); yet, none of them has been found in this study. Given the high number of the tumour-associated polymorphisms of the *COXI* gene presented in this study and in the literature, continuation of the research of the *COXI* gene in terms of typing tumour markers in dogs is advisable.

To date, mutations and polymorphisms in mt-RNA genes have not been analysed in association with canine tumours. The present study demonstrated two insertion-type length polymorphisms in two mt-tRNA-coding genes (*TRNL1* (coding tRNA-Leu1) and *TRNR* (coding tRNA-Arg)) out of 22 mt-tRNA-coding genes (Table 2). *In silico* analyses indicate changes in the D-arm and loop of the *TRNL1* gene and in the acceptor stem region of the *TRNR* gene. The results of studies conducted by McFarland et al. (2004) have shown that pathogenic mutations of mt-RNA genes in humans are more often located at conservative sites and stem structures and tend to disrupt Watson–Crick (WC) nucleotide pairing in stems. In the analysed material, there was an insertion within the terminal fragment of the *TRNR* gene, which may exert a negative effect on the formation of the aminoacyl-tRNA synthase complex. Polymorphisms in the structure of the tRNA-Leu molecule probably do not impair its function (Panwar and Raghava, 2014; Lowe and Chan, 2016). It is unlikely that genes for tRNA are ‘hot spots’ for canine mammary tumours; however, it cannot be excluded that, through their impact on the secondary and tertiary tRNA structure, polymorphisms may cause mitochondrial dysfunction.

In this study, 32 polymorphic loci and 15 mutations were identified. As many as 24 polymorphisms and all the mutations have been described to be associated with neoplastic transformation in dogs. The presence of a large number of polymorphisms and heteroplasmic mutations in the D-loop may indicate that, despite its non-coding nature, the D-loop plays a vital role in the neoplastic transformation process. Mutations in tumours may indicate genetic instability of mtDNA, which may also be involved in carcinogenesis.

Ethics approval

The study was approved by the II Local Ethical Commission for animal experiments in Lublin, Poland (resolution number 6/2013).

References

- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389–3402.
- Bai Y., Lu J., Sharma K.L. (2009). Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis. *Cell Res.*, 19: 802–815.
- Brandon M., Baldi P.A., Wallace D.C. (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*, 25: 4647–4662.
- Combet C., Blanchet C., Geourjon C., Deleage G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.*, 25: 147–150.
- Dement G.A., Maloney S.C., Reeves R. (2007). Nuclear HMGA1 nonhistone chromatin proteins directly influence mitochondrial transcription, maintenance, and function. *Exp. Cell Res.*, 313: 77–87.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In: *The proteomics protocols handbook*. Humana Press, pp. 571–607.
- Goldschmidt M., Peña L., Rasotto R., Zappulli V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.*, 48: 117–131.
- Grzybowska-Szatowska L., Ślaska B. (2012). Mitochondrial DNA and carcinogenesis (review). *Mol. Med. Rep.*, 6: 923–930.
- Guruprasad K., Reddy B.B., Pandit M.W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng. Des. Sel.*, 4: 155–161.
- Huang X., Madan A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, 9: 868–877.
- Imes D.L., Wictum E.J., Allard M.W., Sacks B.N. (2012). Identification of single nucleotide polymorphisms within the mtDNA genome of the domestic dog to discriminate individuals with common HVI haplotypes. *Forensic Sci. Int.-Gen.*, 6: 630–639.
- Kim S.K., Lee S.E., Jeong H., Ha J.H. (1998). The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 10: 210–220.
- Lowe T.M., Chan P.P. (2016). tRNAscan-SE on-line: search and contextual analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Res.*, 44: W54–57.
- Łopuszyński W., Szcubiak M., Komsta R. (2010). Prognostic status of p53 protein accumulation in canine malignant mammary tumors. *B. Vet. I. Pulawy*, 54: 105–111.
- McFarland R., Elson J.L., Talyor R.W., Howell N., Turnbull D.M. (2004). Assigning pathogenicity to mitochondrial tRNA mutations: when ‘definitely maybe’ is not good enough. *Genome Anal.*, 20: P591–596.
- Nisztuk-Pacek S., Ślaska B., Grzybowska-Szatowska L., Babicz M. (2019). Paternal leakage of mitochondrial DNA in the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides* Gray 1834). *Ann. Anim. Sci.*, 19: 61–69.
- Panwar B., Raghava G.P.S. (2014). Prediction of uridine modifications in tRNA sequences. *BMC Bioinformatics*, 15: 326.
- Ślaska B., Grzybowska-Szatowska L., Surdyka M., Nisztuk S., Rozanska D., Rozanski P., Smiech A., Orzelski M. (2014). Mitochondrial D-loop mutations and polymorphisms are connected with canine malignant cancers. *Mitochondr. DNA*, 25: 238–243.
- Ślaska B., Grzybowska-Szatowska L., Nisztuk S., Surdyka M., Rozanska D. (2015). Mitochondrial DNA polymorphism in genes encoding ND1, COI and CYTB in canine malignant cancers. *Mitochondr. DNA*, 26: 452–458.
- Surdyka M., Ślaska B. (2017 a). Defect of the mitochondrial DNA hypervariable region as a risk factor for canine mammary tumor. *Vet. Comp. Oncol.*, 15: 820–828.
- Surdyka M., Ślaska B. (2017 b). Defect in ND2, COX2, ATP6, and COX3 mitochondrial genes as a risk factor for canine mammary tumor. *Vet. Comp. Oncol.*, 15: 1062–1072.
- Szcubiak M., Łopuszyński W. (2011). Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet. Comp. Oncol.*, 9: 296–303.

- Ślaska B., Grzybowska-Szatowska L., Bugno-Poniewierska M., Surdyka M., Śmiech A. (2013). Nuclear and mitochondrial DNA mutation in human and canine tumors. *Med. Weter.*, 69: 195–202.
- Ślaska B., Surdyka M., Brodzki A., Nisztuk S., Gurgul A., Bugno-Poniewierska M., Śmiech A., Różańska D., Orzelski M. (2014). Mitochondrial D-loop mutations can be detected in sporadic malignant tumors in dogs. *B. Vet. I. Pulawy*, 631–637.
- Ślaska B., Grzybowska-Szatowska L., Bugno-Poniewierska M., Gurgul A., Śmiech A., Różańska D., Dudka J. (2016). Relevance of molecular changes in the *ND4* gene in German Shepherd dog tumors. *Pol. J. Vet. Sci.*, 19: 461–469.
- Śmiech A., Ślaska B., Bownik A., Grzybowska-Szatowska L., Dudka J., Łopuszyński W. (2019). Heteroplasmic mutations and polymorphisms in the *Cyb* gene of mitochondrial DNA in canine mast cell tumors. *In Vivo*, 33: 57–63.
- Śmiech A., Ślaska B., Surdyka M., Grzybowska-Szatowska L., Łopuszyński W., Różańska D. (2016). Identification of additional mitochondrial DNA mutations in canine mast cell tumors. *Acta Vet. Scand.*, 58: 28.
- Tang H., Thomas P.D. (2016). PANTHER-PSEP: predicting disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation. *Bioinformatics*, 32: 2230–2232.
- Webb K.M., Allard M.W. (2009). Identification of forensically informative SNPs in the domestic dog mitochondrial control region. *J. Forensic Sci.*, 54: 289–303.

Received: 24 I 2019

Accepted: 26 III 2019

Molecular differences in mitochondrial DNA genomes of dogs with malignant mammary tumours

Krzysztof Kowal¹ | Angelika Tkaczyk-Wlizło¹ | Mariusz Pierzchała² |
Jan Gawor³ | Brygida Ślaska¹ 

¹Institute of Biological Bases of Animal Production, University of Life Sciences in Lublin, Lublin, Poland

²Department of Genomics and Biodiversity, Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec, Poland

³DNA Sequencing and Synthesis Facility, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

Correspondence

Brygida Ślaska, Institute of Biological Bases of Animal Production, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13 St., Lublin 20-950, Poland.
Email: brygida.slaska@up.lublin.pl

Funding information

National Science Centre in Poland, Grant/Award Number: 2019/35/B/NZ5/00775; Doctoral School of the University of Life Sciences in Lublin, Grant/Award Number: SzD/6/ZiR/2020

Abstract

The aim of this study was to determine molecular defects in mitochondrial DNA (mtDNA) with the use of large-scale genome analysis in malignant canine mammary gland tumours and indicate whether these changes were linked with the carcinogenesis process. With the use of the NGS technology, we sequenced 27 samples of mtDNA isolated from blood and tumours obtained from 13 dogs with mammary gland tumours. The total number of mutations and polymorphisms in the analysed mitochondrial genomes was 557. We identified 383 single nucleotide polymorphisms (SNP), 32 indels (or length polymorphisms), 4 mutations, 137 heteroplasmic positions and 1 indel mutation. The highest variability (132 changes) was observed in the variable number of tandem repeats (VNTR) region. The heteroplasmy rate in VNTR varied among individuals and even between two tumours in one organism. Our previous study resulted in determination of a probable CpG island in this region, thus it is not excluded that these changes might alter mtDNA methylation. Only the *ATP8* gene was not affected by any polymorphisms or mutations, whereas the *COX1* gene had the highest number of polymorphisms from all protein-coding genes. One change m.13594G>A was detected in a region spanning two genes: *ND5* and *ND6*, from which a deleterious effect was observed for the *ND5* protein. Molecular changes were frequently observed in the TΨC loop, which is thought to interact with ribosomal RNA.

KEYWORDS

dog, mammary gland tumours, mtDNA genome, mutations, SNP

1 | INTRODUCTION

Breast cancer is the most common malignancy in women and the mammary gland is a common site for tumour development in bitches.^{1,2} Mammary tumours are the second most common canine cancers with a high incidence in female dogs, accounting for 52% of all diagnosed tumours, and they are malignant in over 80% of cases.² The identification of variability in the mitochondrial DNA (mtDNA) sequence in dogs with diagnosed mammary tumours was presented in several reports.^{3–5} Kowal et al. described 32 polymorphisms and 15 mutations in the entire mitochondrial genome of a dog with mammary tumour. These mutations and polymorphisms may affect the

functioning of mitochondria and may indicate cell adaptation to the environmental changes occurring in the carcinogenesis process. In a study conducted by Surdyka and Slaska, mutations and polymorphisms in *ND2* (Mitochondrially Encoded NADH Dehydrogenase 2), *COX2* (Cytochrome C Oxidase Subunit II), *ATP6* (Mitochondrially Encoded ATP Synthase Membrane Subunit 6) and *COX3* (Cytochrome C Oxidase Subunit III) mitochondrial genes in canine mammary tumour were identified. Some of the changes described there may imply that these are the hotspots of canine mammary tumour. Moreover, Surdyka and Slaska indicated a statistically significant association between the presence of mutations and the size and age of dogs. Although there are a few reports about damage to mtDNA in

mammary gland tumours, no comparative analysis of mutations in the entire mtDNA genome occurring in different types of mammary cancer with the same grade has been done before.

The prognostic evaluation of mammary cancer is based on several factors such as tumour size, lymph node status, radiographic evidence of distant metastases, vascular invasion and clinical examination of the tumour in accordance with the World Health Organization (WHO) guidelines.^{6–8} Adjuvant therapies, such as chemotherapy or radiotherapy, are often administered in canine patients. However, there is very limited information on their efficacy. Thus, the only effective treatment is surgical removal of the affected glands and local lymph nodes.⁹ There are several ways of determination of the grade of canine mammary gland tumours; many of them are based on the findings of human medicine, as canine mammary carcinomas are valid models for the study of breast cancer in women.^{2,10,11}

The aim of this study was to determine molecular defects caused by mutations in mtDNA with the use of large-scale genome analysis in malignant canine mammary gland tumours and indicate whether these changes were linked with the carcinogenesis process. In addition, the deleterious effects of molecular alterations have been described to find out whether they might be used as potential diagnostic biomarkers.

2 | MATERIALS AND METHODS

We analysed 27 the entire mitochondrial genomes: 13 genomes obtained from blood and 14 genomes from tumour tissues. Blood and tumour samples were obtained from each of six dogs diagnosed with

tubulopapillary carcinoma (TPC), six dogs with carcinoma complexus (CC) and one dog with squamous cell carcinoma/carcinoma planoepitheliale keratodes (CPK) (Table 1). One of the dogs (B131) had two CC tumours examined at the same time, which we indicated as tumour samples B131G1 and B131G2. In order to distinguish differences in the ageing rate of breeds of different sizes, the actual dog's age was counted as comparable human age according to the methodology presented in Wang et al.¹² Blood was sampled into sterile test-glasses with the K2EDTA anticoagulant. The tumour tissue samples were placed in a sterile container and subjected to histopathology analysis. The samples were fixed in buffered formalin, pH = 7.2, processed routinely, embedded in paraffin wax, sectioned into 4- μ m thick fragments and stained with haematoxylin-eosin and toluidine blue. Microscopic classification was performed in accordance with the WHO histological classification.¹³ Criteria for histologic malignant grade according to Peña et al. was applied, that is, a sum of point values assigned to histomorphological traits: tubule formation nuclear pleomorphism and mitoses per 10 HPF (high-power field). The degree of mammary tumour malignancy was assessed using the three-grade scale (GI—low, GII—intermediate, GIII—high grade of malignancy).^{8,14} The analysis of the changes between different mammary gland tumours was performed solely for the tumour tissues with the same malignancy degree (GI). The malignancy degree of all tumour tissues was estimated as GI.

DNA extraction from post-operative tumour tissues and blood samples from dogs with diagnosed different mammary gland tumours was performed with the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA samples were assessed quantitatively and qualitatively by electrophoretic separation in 1% agarose gel and

TABLE 1 Information on the dog's haplotypes based on the comparison with the sequences stored in GenBank

Number	Breed/crossbreed	Tumour	Size	Metrical age	Comparable human age	Haplogroup	Haplotype	Accession Number (GenBank)
S2	Italian Sighthound	CC	S	9	52	A1	A1a1	KU291092.1
S11	Crossbreed	CC	S	10	56	B2	B1a1f1a	KF926378.1
S17	Golden Retriever	CC	L	10	66	A1	A1b1a1	KU291087.1
S21	Dachshund	CC	S	10	56	A1	A1a1a15	KU291056.1
S29	Medium Schnauzer	CC	M	11	65	A1	A1a1a15	KU291056.1
B131	Polish Lowland Sheepdog	CC	M	13	74	A1	A1a1a2	KU291013.1
	Polish Lowland Sheepdog	CC	M	13	74	A1	A1a1a2	KU291013.1
S6	Crossbreed	TPC	S	9	52	A1	A1a1	KU291092.1
S7	Prague Ratter	TPC	S	14	72	B1	B1a1f1a	KF907307.1
S19	Siberian Husky	TPC	L	9	61	A1	A1a1	KU291092.1
S23	German Shepherd	TPC	L	14	88	A1	A1a1a1a1a	KU290670.1
S26	Yorkshire Terrier	TPC	S	5	36	A1	A1a1	KU291092.1
S35	German Shepherd	TPC	L	7	50	A2	A1b3b2	KU290934.1
S27	Polish Lowland Sheepdog	CPK	M	13	74	A1	A1b1a1b	KM061573.1

Abbreviations: CC, carcinoma complexus; CPK, carcinoma planoepitheliale keratodes; TPC, tubulopapillary carcinoma.

spectrophotometrically (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). Selective amplification of mtDNA was performed on the total genomic DNA using two pairs of primers: F1418 (5'-AAGCCTAACGAGCCTGGTG-3') and R11041 (5'-CTGTTTGACGGAGACAGATAG-3'), ~9,5 kb PCR product, and 9190F (5'-GAGACATCTTTACAATCTCCG-3') and R2382 (5'-GGATTGCGCTGTATCCCTA-3'), ~9,8 kb PCR product.¹⁵ Full coverage of mtDNA was obtained after amplification of two long-range PCR products. PCR reactions were carried out using KAPA HiFi PCR Kit reagents (KAPA Biosystems, Wilmington, NC). The PCR products were analysed subsequently in 0.7% agarose gel and purified using Ampure XP magnetic beads (Beckman Coulter, Brea, CA). DNA quantification analysis was held using a Qubit 3.0 fluorimeter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Both PCR products were diluted to the 1 ng concentration and pooled in an equimolar ratio. Such a DNA mixture was next used in library preparation.

Mitochondrial DNA was sequenced in the DNA Sequencing and Synthesis Facility (oligo.pl) at the Institute of Biochemistry and Biophysics PAS. Approximately 1 ng of the PCR DNA template mix was used as an input and an Illumina shotgun library was constructed using the NextEra XT Kit (Illumina, San Diego, CA) following manufacturer's instructions. The library sample was sequenced on an Illumina MiSeq sequencer using a 600-cycle kit (v3) in a paired-end mode targeting at least 100× coverage. The detailed information about sequencing data generated on the Illumina MiSeq sequencer is presented in Table S9. The sequence reads were filtered by quality and remaining adaptors were removed using the fastp tool.¹⁶ Cleaned sequencing reads were mapped to the dog mtDNA reference sequence (GenBank accession number: U96639.2) using the BWA aligner¹⁷ and consensus generation for each sample was done using SAMtools and BCFtools.¹⁸ Sequencing coverage statistics were calculated using the mosdepth tool.¹⁹

The nucleotide sequences obtained were subjected to bioinformatics analyses in order to determine mutation and polymorphic sites within the analysed mtDNA genome in the tumour tissue (Unipro UGENE v. 34.0).²⁰ The differences in the nucleotide sequence were determined by comparison of the analysed sequences with the reference sequence.²¹ The polymorphisms involved changes occurring in tumour and blood cells from the same dog in comparison with the reference sequence. A mutation was identified as a change characteristic for mtDNA from tumour cells but not present in mtDNA from the blood sample.

The probability of deleterious mutations, that is, a functional effect of the non-synonymous protein-coding single nucleotide polymorphism (SNP), was determined using the Panther Classification System.²² This tool predicts disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation. The ExPASy Server,²³ was used to characterise such physicochemical parameters as the theoretical isoelectric point, instability index, aliphatic index and grand average hydropathy. Secondary structure prediction method (SOPMA) was used for calculation of the secondary structural features of antioxidant protein sequences. In order to predict whether an amino acid substitution is deleterious, the sorting intolerant from tolerant algorithm was used.²⁴ The structure of tRNA molecules was predicted in

the tRNAscan-SE Search Server.²⁵ The dogs' haplotypes were determined by the comparative analysis with the use of the BLAST tool.²⁶ The sample sequence and the sequence with 100% homology from GenBank shared the same haplotype.

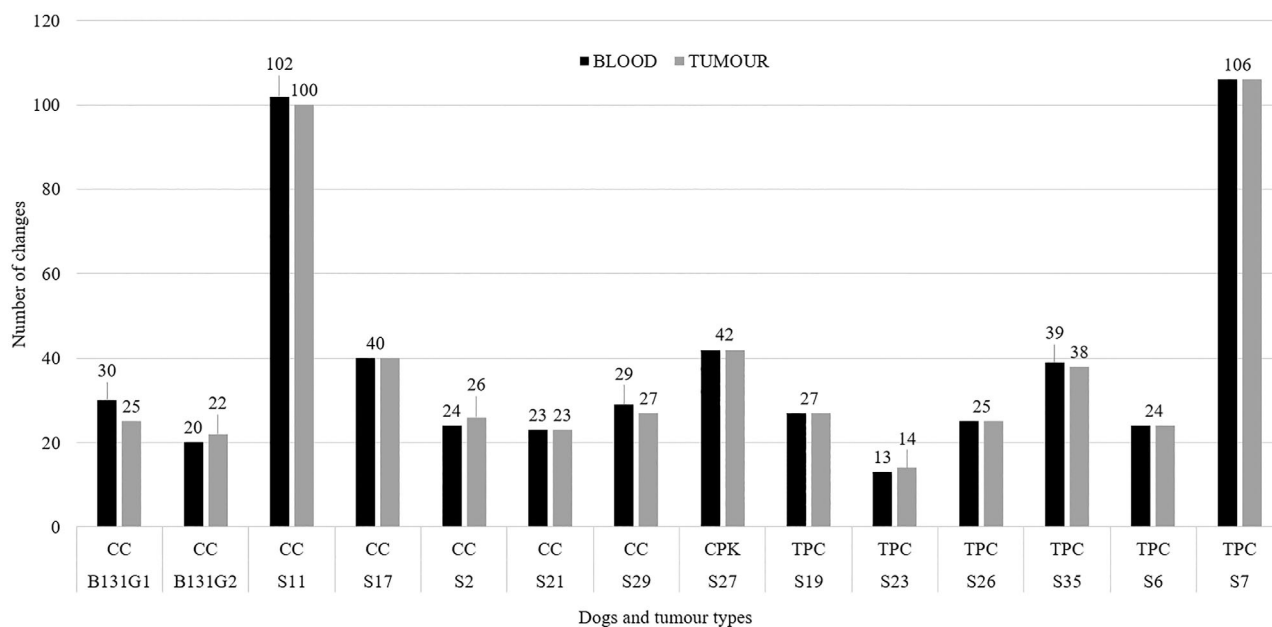
The Human Genome Variation Society (HGVS) nomenclature was used for description of variants of sequences found in the DNA and proteins.²⁷ Heteroplasmy was indicated with * in each table in Supporting Information.

3 | RESULTS

The analysis of the entire mitochondrial genome sequences revealed in total 383 SNP, 32 indels (or length polymorphisms), 4 mutations, 137 heteroplasmic positions and 1 indel mutation. The total number of changes in all analysed mitochondrial genomes was 557. The list of the changes is presented in Tables S1 and S2. Approximately 26% of all polymorphisms were observed in the non-coding D-loop region, whereas 96% of all heteroplasmic positions were detected in a specific part of the D-loop—the variable number of tandem repeats (VNTR) region. Indels were predominantly observed in two genes: *ND4L* (Mitochondrially Encoded NADH: Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 4L) and *tRNA-Leu^(UUR)*. The highest number of polymorphisms in protein-coding genes was observed in *COX1* (56), *ATP6* (38) and *COX3* (30); however, the mutations were observed solely in the *ATP6* and *ND4* genes. It is worth noting that the protein-coding *ATP8* gene was not affected by any polymorphisms or mutations. In this research, polymorphisms were observed in 7 out of 22 tRNA genes, and heteroplasmy was detected in one tRNA gene. Polymorphisms were more often observed in the 16s *rRNA* gene than in the 12s *rRNA* gene. The highest prevalence of changes in the mtDNA was observed in a 10-year-old crossbreed with CC and a 14-year-old ratter with TPC (Scheme 1). In two out of seven dogs with CC and in four out of six dogs with TPC as well as in a dog with CPK, the number of changes did not differ between the tumour and blood samples. In a 13-year-old Polish lowland sheepdog with two tumours, there were differences in the number of changes in the CC tumour samples.

We found 9 polymorphisms present in all 27 examined samples of tumours and blood. Moreover, the changes in the *ND4L*, *COX3* and *ND5* genes were non-synonymous and caused changes in protein amino acids: p.Met1Val, p.Cys55Tyr, p.Ser508Thr, in contrast to the *COX1* (m.5367C>T, m.5444T>C and m.6065A>G) and *ATP6* (m.8368C>T) variants, which were synonymous. Only p.Met1Val had a deleterious low-confidence effect on the protein structure (Table S3).

In TPC tumours, we identified in total 16 polymorphisms in 6 dogs, from which 10 were observed in a 7-year-old German shepherd. These polymorphisms were exclusively observed in this type of mammary gland tumour, although not in every diagnosed dog. Among 16 polymorphisms, 4 were observed in the *COX1* gene. Two of the 22 tRNA genes were changed: m.9896T>C (*tRNA-Arg*) and m.11657C>A (*tRNA-Ser^(AGY)*). These variants led to modifications in the TψC loop and in the position not assigned to any tRNA domain of these tRNA molecules, respectively. Three variants



SCHEME 1 Number of changes observed in samples from each dog. CC, carcinoma complexus; CPK, carcinoma planoepitheliale keratodes; TPC, tubulo-papillary carcinoma

m.8303A>Gm.11869T>C, m.14534G>A, caused non-synonymous changes in proteins p.Ile114Val (*ATP6*), p.Leu31Pro (*ND5*) and p.Ile188Val (*CYB*—Mitochondrially Encoded Cytochrome B). These changes did not provoke deleterious effects. The following variants were found in the non-coding region: m.15475T>C, m.15750C>T and m.16278G/A (Tables S3 and S4).

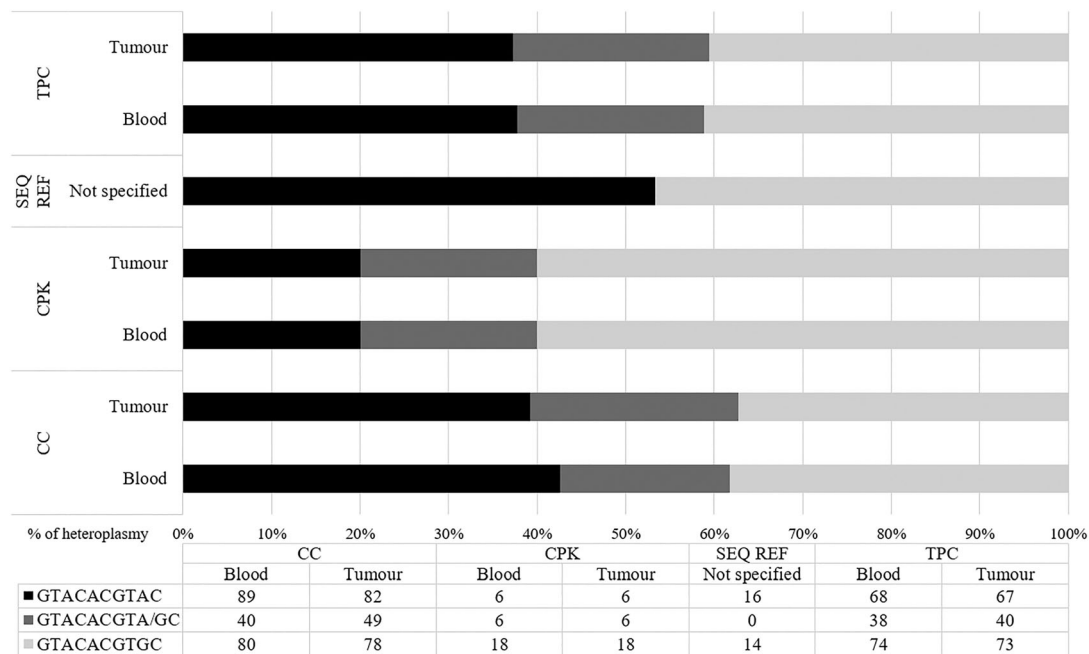
Polymorphisms limited exclusively to some dogs with CC tumours were found at seven positions. The polymorphisms were found only in protein-coding genes, and most of them (six out of seven) were synonymous. Only variant m.14474G>A caused a non-synonymous, deleterious low-confidence change in the amino acid sequence: p.Val98Met in the *CYB* protein. Noteworthy, variant m.13762T>C was identified for a gene (*ND6*) encoded on complement strand. Only two polymorphisms distinguished a 13-year-old Polish Lowland Sheepdog with CPK from the other dogs. Both variants were identified in the *ND2* gene: m.3975T>C and m.4303A>G. The first variant p.Met21Thr led to tolerated non-synonymous change in the *ND2* protein sequence (Table S3).

We identified 4 mutations in a total of 27 samples. One of them, that is, m.8617G>A was identified in a blood sample of a dog with TPC tumour. This variant was a synonymous p.Val218 = in *ATP6* protein. In the tumour sample from the same dog, heteroplasmy m.13056A/G was found in the *ND5* gene. This heteroplasmic variant led to tolerated p.Met427Val protein change in the *ND5* protein sequence. An m.10589T>C mutation in the *ND4* gene sequence was identified in a 9-year-old Syberian Husky with TPC tumour. The variant led to a deleterious non-synonymous change p.Leu130Pro. One mutation m.15930_15931ins.A (D-loop) and two heteroplasmic variants: m.9470G/A (*tRNA-Gly*) and m.16328G/A (D-loop, VNTR) were detected in dogs with CC tumours (Tables S1, S2 and S4).

In Table S5, we presented changes in protein profiles based on data from Prot Param. Non-synonymous variants led to changes in 8 out of 13 proteins. P.Cys55Tyr (*COX3*) and p.Met1Val (*ND4L*) were the most frequent changes observed in every cancer type. The p.Met1Val variant changed protein properties from unstable to stable according to the instability index. The other amino acid variants did not interfere in protein properties. Moreover, we verified mitochondrial protein structures with the SOMPA algorithm. Mainly alpha helix-like structures characteristic for mitochondrial proteins were not affected significantly by the non-synonymous changes occurring in the amino acid sequences. The exception is the p.Met1Val change, whose deleterious effect caused an increase in random coil structures forming *ND4L* in all of the analysed sequences, in contrast to the normal protein sequence.

We identified 17 SNPs and 2 indels in mt-tRNA and mt-rRNA genes. In total, seven SNPs and indels were found in the *16S rRNA* gene; four of them were detected in samples from a 14-year-old ratter and a 10-year-old crossbreed (Table S7). Mt-tRNA variants were found in 8 of 22 mt-tRNA genes. The main location of these variants in the mt-tRNA structure was the TΨC loop. Interestingly, three changes were found in regions that are not assigned to any tRNA domain, but they were localised between the acceptor stem and the DHU stem (m.2679_2680insG, *tRNA-Leu^(UUR)*), between the DHU stem and the anticodon stem (m.15435G>A, *tRNA-Pro*), or between the acceptor stem and the anticodon stem (m.11657C>A, *tRNA-Ser^(AGY)*).

The highest heteroplasmy rate was observed in the VNTR region of the D-loop. A comparison of three VNTR variants: GTACACGTA/GC, GTACACGTGC and GTACACGTAC is presented in Scheme 2. We observed a 10 bp deletion of the VNTR repeat in a 10-year-old



SCHEME 2 Variation of the frequency in the number of tandem repeat motifs (5'-GTACACGTA/GC-3') between the reference sequence and tumour tissue sampled from canine mammary tumours. CC, carcinoma complexus; CPK, carcinoma planoepitheliale keratodes; Seq Ref, reference sequence NC_002008.4 from GenBank; TPC, tubulo-papillary carcinoma

crossbreed with CC. This length polymorphism was detected uniquely in the blood and tumour tissue of this dog. It is worth noting that the highest heteroplasmy rate was observed in the CC tumour samples, compared with the other types of tumours. Moreover, the lowest heteroplasmy rate was observed for the CPK sample (6). It should be emphasised that, in the VNTR region, the highest differences were detected between blood and tumour tissue in the same individual (Table S8).

4 | DISCUSSION

Canine malignancies have been established as strong comparative models for the human disease due to their spontaneous development and frequency.^{1,28,29} Breast cancer is the most common malignancy in women, and the mammary gland is a common site for tumour development in female dogs.¹ Many mtDNA mutations determining human neoplasia and carcinogenesis have been described to date. It is assumed that these mutations are involved in neoplastic transformation via changes in cellular energy levels, enhancement of oxidative stress and modulation of apoptosis.^{2,30,31} Moreover, the mtDNA content in human cancers appears to be highly variable. Reduced mtDNA content compared with tumour-adjacent tissue has been described in different human tumour types, for example, breast cancer.³² Mambo et al. and Fan et al. described a decrease in the mtDNA copy number in breast cancers as well.^{33,34} Somatic mtDNA variants are frequently observed in primary breast tumours ($\pm 70\%$ of cases).³⁵⁻³⁷ They are mostly single-nucleotide variants. These variants are distributed along the entire mtDNA, showing large heterogeneity, and are acquired

independently of the three major mutational processes shaping the nDNA in breast tumours.³⁸ Based on the results of this research and our previous results,³ the main differences observed in the mammary gland tumours in the dogs were SNP spread throughout the entire mtDNA genome with the highest occurrence in the D-loop region.

The most frequently observed SNPs and indels: m.2678_2679insG (*tRNA-Leu^(UUR)*), m.5367C>T (*COX1*), m.5444T>C (*COX1*), m.6065A>G (*COX1*), m.8368C>T (*ATP6*), m.8807G>A (*COX3*), m.9911_9912insTG (*ND4L*), m.13299T>A (*ND5*) and m.15814C>T (D-loop) (Tables S1 and S3) were reported in the study Kowal et al.³ It is worth noting that, among these nine variants, only m.9911_9912insTG (*ND4L*) had a deleterious effect, whereas the non-synonymous changes caused by m.8807G>A and m.13299T>A had a tolerated effect on protein. The frequently observed variants in the *COX1* gene did not affect the protein structure. Nonetheless, it cannot be excluded that polymorphisms in tRNA and the D-loop region increase susceptibility to cancer formation and/or progression. In addition, the plausible effect of several polymorphisms observed in the rRNA sequences was not estimated. Thus, additional analysis is advisable.

The SNPs and indels observed in the TPC and CC samples were rather individual polymorphisms, whose frequency did not exceed 16% (polymorphisms were observed in one out of six individuals), whereas the number of polymorphisms detected in CPK was limited to only one examined individual (Table S3).

The analysis of the main physicochemical protein parameters did not reveal significant differences in their values between the blood and the tumour tissue (Table S5). It is probable that the mtDNA proteins retained their function despite the occurrence of mutations and polymorphisms. However, the mutations observed in m.10589T>C

(ND4) and m.13056A/G (ND5) were consequently estimated as deleterious and tolerated. These mutations were not observed in previous studies on ND2 and ND4 functioning in mast cell tumours.³⁹ Somatic mutations in the mtDNA of primary tumours, only in a minor proportion (<1%) overlap with mutations associated with mitochondrial disease and are thus known to affect mitochondrial function.³⁵ Therefore, it is possible that these mutations that occurred in mtDNA isolated from the TPC tumours and had a mild effect on proteins, were the side effects of oxidative stress and were not eliminated due to the lack of their deleterious effect. Elimination of damaged mtDNA in response to oxidative stress has been described.⁴⁰ Thus, there might be a putative link between the elimination of damaged molecules after severe oxidative stress and the absence of deleterious mutations in mtDNA in tumour samples. Moreover, samples with mtDNA indels contained much higher quantities of mtDNA than unmutated samples in humans.³² The same effect was not found when only single nucleotide variants were examined. These results suggest that the presence of inactivating mtDNA mutations may induce increased mtDNA replication, probably as a response to inadequate mitochondrial energy production.³² In addition, a human tumour specimen commonly contains not only tumour cells but also other cells such as surrounding epithelial cells or immune cells infiltrating the tumour.⁴¹ It is not excluded that the comparable heterogeneity of tumour and tumour-adjacent tissue might be observed in canine tumours, as there are many similarities between human breast cancers and canine mammary gland tumours. Thus, it is difficult to pinpoint the truly tumour-specific mtDNA variants, because of the potential 'founder effect' and the exact source of the new mtDNA variants.⁴¹

The secondary structure elements calculated by SOPMA (Table S6) did not exhibit changes in the percentage of the individual components of the secondary structure. The analysis of the secondary structure revealed that the α -helix was dominant among the secondary structure elements, followed by random coils, extended strands and β -turns for the sequences. The dominance of coiled regions indicates a high level of conservation and stability of the protein structure.⁴² The protein structure was comparable to the results reported by Ślaska et al. in the case of mast cell tumours.³⁹

Two thirds of disease-causing mtDNA mutations occur in tRNA genes, which constitute only approximately 9% of the mitochondrial genome. This suggests that tRNA genes are 'hotspots' for mitochondrial mutation.⁴³ The tRNA mutations are typically heteroplasmic and affect mitochondrial translation, thereby causing reduced expression of all mtDNA-encoded proteins. However, impaired translation and respiratory chain deficiency will only occur if the level of mutated mtDNA exceeds a certain threshold. The occurrence of polymorphisms in the dogs with mammary gland tumours was observed in 8 of 22 mt-tRNA genes. The main location of SNPs in the mt-tRNA structure was the central loop, the T Ψ C loop, unassigned positions and the DHU loop. It should be emphasised that a tertiary interaction between bases 8, 14 and 21 of mt-tRNA-Leu,⁴⁴ may be disrupted in the formation of the 3D structure by m.2678_2679insG, which is located in position 8_9 between the acceptor stem and the DHU

stem. In humans, pathogenic mutations are normally seen as heteroplasmic variants, that is, there is a mixture of wild type and mutant mtDNA.^{45–47} MtDNA mutations do not exhibit a clinical phenotype until they are present in the majority of mtDNA molecules within cells. Thus, the occurrence of heteroplasmic variant m.9470G/A in the tRNA-Gly gene reported in the tumour sample from the dog with CC might be a pathogenic change, yet the clinical phenotype linked with the carcinogenesis process should be confirmed by additional research conducted on a larger cohort.

Mutations and polymorphisms in mtDNA as well as the mtDNA copy number have been reported to be associated with different types of human cancers.⁴⁸ Increased number of mtDNA copy has been identified in endometrial adenocarcinoma cells,⁴⁹ pancreatic cancer⁵⁰ and in oesophageal squamous cell carcinoma as well.⁵¹ In contrast, decreased mtDNA copy numbers have also been identified in lung cancer,⁵² colorectal cancer,⁵³ gastric cancer⁵⁴ and breast cancer.⁵⁵ In a small number of tumour types (adrenocortical carcinoma, chromophobe renal cell carcinoma and low-grade glioma), low mtDNA content was associated with decreased survival rates.⁵⁶ Whereas some cancers (chronic lymphocytic leukaemia, hepatocellular carcinoma, pancreatic adenocarcinoma and melanoma) displayed trends for increasing or decreasing mtDNA content with tumour stage, suggesting a potential clinical significance to mtDNA copy number. However, completed depletion of mtDNA (termed ρ 0) is generally incompatible with tumorigenesis, based on experimental results from xenograft models in numerous cancer types, suggesting a near universal requirement for mtDNA in cancer.⁵⁶ According to our knowledge, there is no information regarding the level of mtDNA copy number in cancer tissues of dogs. The similarities between breast cancer in human and mammary gland tumours in dogs suggest probable decrease of mtDNA content in dogs cancer cells, however the hypothesis should be properly investigated experimentally.

Besides the association of mutations in several mtDNA protein-coding genes a defect was detected in the canine tumours in the non-coding region (D-loop)^{4,5,57,58} especially in the VNTR region. The possible mechanism seems to be related to the fact that SNPs and VNTRs found in mtDNA may make the mtDNA genome unstable and more susceptible to other DNA damage and generation of greater amounts of reactive oxygen species (ROS). ROS can induce oxidative stress, which probably influences the transcription and translation of the mitochondrial multi-enzyme complexes of the respiratory chain and leads to mitochondrial oxidative phosphorylation dysfunction.⁵⁹ VNTRs are thought to have arisen due to slippages during DNA replication or as a consequence of unequal crossing-over, and due to the repetitive nature of the sequence have allowed further increases/decreases in the number of repeats resulting in the polymorphisms observed.⁶⁰ The tandem repeats in animals and plants have been reported to be involved in mtDNA stability by insertion and deletion of the repeat array.⁶¹ Thus, it is not excluded that the decreased number of repetitive elements in one of the examined dogs might be a result of such slippage during replication. The in silico analyses revealed that there might be a 313 bp-long CpG island at the positions 16 137...16 449 (%GC = 0.40) in the canine mitochondrial VNTR

region, which in some circumstances might be methylated or demethylated.⁶² A high level of mitochondrial oxidative stress can lead to mtDNA demethylation^{63–65}; therefore, it cannot be excluded that changes in the VNTR region observed in mammary gland tumours might induce epigenetic modifications in the mitochondrial CpG island. The molecular landscape (383 SNP, 32 indels/length polymorphisms, 4 mutations, 137 heteroplasmic positions and 1 indel mutation) of the changes in the mtDNA presents a wide range of alterations identified in almost every protein-coding gene, in two rRNA-coding genes, in 8 of 22 tRNA genes, and in the non-coding region.

5 | CONCLUSIONS

There were no specific changes that allowed distinguishing the mammary gland cancer type, however the overall polymorphic landscape of mtDNA varied between individuals with different cancers. Nevertheless, the presence of two *carcinoma complexis* tumours in one dog in the same tissue might suggest the influence of polymorphisms in mtDNA on the carcinogenesis process. This is the first literature report of mutations and polymorphisms in the mtDNA genome observed in TPC, CC and CPK mammary gland tumours. Moreover, to the best of our knowledge, the molecular differences between two tumour samples obtained from one dog have never been described. Interesting alterations in the VNTR region between the individuals and even between the two tumours obtained from one dog were observed leading to the hypothesis that these changes could induce the CpG island methylation; however, further analysis is necessary. The analysis revealed that most of the variants had an effect on tRNA TΨC loop structures responsible for the interaction with rRNA, thus it cannot be excluded that these changes directly disrupt translation processes; however, this should be estimated in further research. The vast majority of the changes in the protein-coding genes were silent mutations.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that supports the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

ORCID

Brygida Ślaska  <https://orcid.org/0000-0003-3933-2400>

REFERENCES

- Grzybowska-Szatowska L, Ślaska B. Polymorphisms in genes encoding mt-tRNA in female breast cancer in Poland. *Mitochondrial DNA*. 2012;23(2):106–111. <https://doi.org/10.3109/19401736.2012.660925>
- Ślaska B, Grzybowska-Szatowska L, Bugno-Poniewierska M, Surdyka M, Śmiech A. Nuclear and mitochondrial DNA mutation in human and canine tumors. *Med Weter*. 2013;69(4):195–202.
- Kowal K, Ślaska B, Bownik A, et al. Analysis of mitochondrial genome from Labrador (*Canis lupus familiaris*) with mammary gland tumour reveals novel mutations and polymorphisms. *Anim Sci*. 2019;19(3):619–632. <https://doi.org/10.2478/aoas-2019-0027>
- Surdyka M, Ślaska B. Defect of the mitochondrial DNA hypervariable region as a risk factor for canine mammary tumour. *Vet Comp Oncol*. 2017;15(3):820–828. <https://doi.org/10.1111/vco.12224>
- Surdyka M, Ślaska B. Defect in ND2, COX2, ATP6 and COX3 mitochondrial genes as a risk factor for canine mammary tumour. *Vet Comp Oncol*. 2017;15(3):1062–1072. <https://doi.org/10.1111/vco.12247>
- Santos AA, Lopes CC, Ribeiro JR, et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Vet Res*. 2013;9(1):1. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-1>
- Salas Y, Márquez A, Díaz 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127381>
- Goldschmidt MH, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 2011;48(1):117–131. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>
- Estrela Lima A, Costa Neto J, Pontes Oriá A, et al. Clinical pathological study of mammary tumors in female dogs from the Veterinary Hospital of UFBA Bahia, Brazil. *Brazilian J Vet Pathol*. 2014;7(2):126–130.
- Raposo TP, Arias-Pulido H, Chaher N, et al. Comparative aspects of canine and human inflammatory breast cancer. *Semin Oncol*. 2017;44(4):288–300. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2017.10.012>
- Nguyen F, Peña L, Ibsch C, et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;167(3):635–648. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4548-2>
- Wang T, Ma J, Hogan AN, et al. Quantitative translation of dog-to-human aging by conserved remodeling of the DNA methylome. *Cell Syst*. 2020;11(2):176–185.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2020.06.006>
- Hendrick M. Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. *Armed Forces Inst Pathol*. 1998;2:28–29.
- Clemente M, Pérez-Alenza MD, Illera JC, Peña L. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol*. 2010;47(2):265–274. <https://doi.org/10.1177/0300985809353167>
- Imes DL, Wictim EJ, Allard MW, Sacks BN. Identification of single nucleotide polymorphisms within the mtDNA genome of the domestic dog to discriminate individuals with common HVI haplotypes. *Forensic Sci Int Genet*. 2012;6(5):630–639. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.02.004>
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018;34(17):i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Li H. Aligning Sequence Reads, Clone Sequences and Assembly Contigs with BWA-MEM; 2013. <http://arxiv.org/abs/1303.3997>. Accessed May 21, 2021.
- Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*. 2021;10(2):1–4. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
- GitHub—brentp/mosdepth: fast BAM/CRAM depth calculation for WGS, exome, or targeted sequencing. <https://github.com/brentp/mosdepth>. Accessed August 23, 2021.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- 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(2):210-220. <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0513>
22. Tang H, Thomas PD. PANTHER-PSEP: predicting disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation. *Bioinformatics.* 2016;32(14):2230-2232. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw222>
 23. Gasteiger E. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research.* 2003;31(13):3784-3788. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>
 24. Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M, Ng PC. SIFT missense predictions for genomes. *Nat Protoc.* 2016;11(1):1-9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.123>
 25. Lowe TM, Chan PP. tRNAscan-SE on-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W54-W57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw413>
 26. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
 27. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat.* 2016;37(6):564-569. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
 28. Dobson JM. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *Vet Sci.* 2013;2013:1-23. <https://doi.org/10.1155/2013/941275>
 29. Stacey SN, Manolescu A, Sulem P, et al. Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Genet.* 2007;39(7):865-869. <https://doi.org/10.1038/ng2064>
 30. Slaska B, Grzybowska-Szatowska L, Surdyka M, et al. Mitochondrial D-loop mutations and polymorphisms are connected with canine malignant cancers. *Mitochondrial DNA.* 2014;25(3):238-243. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.792054>
 31. Grzybowska-Szatowska L, Ślaska B. Mitochondrial NADH dehydrogenase polymorphisms are associated with breast cancer in Poland. *J Appl Genet.* 2014;55(2):173-181. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0190-9>
 32. Reznik E, Miller ML, Şenbabaoğlu Y, et al. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife.* 2016;5:e10769. <https://doi.org/10.7554/eLife.10769>
 33. Mambo E, Chatterjee A, Xing M, et al. Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer. *Int J Cancer.* 2005;116(6):920-924. <https://doi.org/10.1002/ijc.21110>
 34. Fan AXC, Radpour R, Haghighi MM, et al. Mitochondrial DNA content in paired normal and cancerous breast tissue samples from patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(8):983-989. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0533-9>
 35. Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, et al. Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Elife.* 2014;3:e02935. <https://doi.org/10.7554/eLife.02935>
 36. Stewart JB, Alaei-Mahabadi B, Sabarinathan R, et al. Simultaneous DNA and RNA mapping of somatic mitochondrial mutations across diverse human cancers. *PLoS Genet.* 2015;11(6):e1005333. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005333>
 37. McMahon S, Laframboise T. Mutational patterns in the breast cancer mitochondrial genome, with clinical correlates. *Carcinogenesis.* 2014;35(5):1046-1054. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu012>
 38. Weerts MJA, Timmermans EC, van de Stolpe A, et al. Tumor-specific mitochondrial DNA variants are rarely detected in cell-free DNA. *Neoplasia.* 2018;20(7):687-696. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.05.003>
 39. Ślaska B, Śmiech A, Bownik A, et al. Defect in mitochondrial NADH-dehydrogenase genes in canine mast cell tumours. *Ann Anim Sci.* 2020;20:1-29. <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0027>
 40. Shokolenko I, Venediktova N, Bochkareva A, Wilson GI, Alexeyev MF. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(8):2539-2548. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp100>
 41. Weerts MJA, Sleijfer S, Martens JWM. The role of mitochondrial DNA in breast tumors. *Drug Discov Today.* 2019;24(5):1202-1208. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.019>
 42. Neelamathi E, Bagyalakshmi SA, Kannan R. Insilico prediction of structure and functional aspects of a hypothetical protein of Neurospora Crassa. *J Cell Tissue Res.* 2009;9(3):1889-1894.
 43. Scaglia F, Wong L. Human mitochondrial transfer RNAs: role of pathogenic mutation in disease. *Muscle Nerve.* 2008;37:150-171.
 44. Queen RA, Steyn JS, Lord P, Elson JL. Mitochondrial DNA sequence context in the penetrance of mitochondrial t-RNA mutations: a study across multiple lineages with diagnostic implications. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187862>
 45. Tuppen HAL, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2010;1797(2):113-128. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.09.005>
 46. Yarham JW, Elson JL, Blakely EL, Mcfarland R, Taylor RW. Mitochondrial tRNA mutations and disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2010;1(2):304-324. <https://doi.org/10.1002/wrna.27>
 47. Elson JL, Andrews RM, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Analysis of European mtDNAs for recombination. *Am J Hum Genet.* 2001;68(1):145-153. <https://doi.org/10.1086/316938>
 48. Domínguez-de-la-Cruz E, Muñoz M, Pérez-Muñoz A, García-Hernández N, Moctezuma-Meza C, Hinojosa-Cruz JC. Reduced mitochondrial DNA copy number is associated with the haplogroup, and some clinical features of breast cancer in Mexican patients. *Gene.* 2020;761:145047. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2020.145047>
 49. Wang Y, Liu VWS, Xue WC, Tsang PCK, Cheung ANY, Ngan HYS. The increase of mitochondrial DNA content in endometrial adenocarcinoma cells: a quantitative study using laser-captured microdissected tissues. *Gynecol Oncol.* 2005;98(1):104-110. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.04.015>
 50. Lynch SM, Weinstein SJ, Virtamo J, et al. Mitochondrial DNA copy number and pancreatic cancer in the alpha-tocopherol beta-carotene cancer prevention study. *Cancer Prev Res.* 2011;4(11):1912-1919. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0002>
 51. Lin C-S, Lee H-T, Lee S-Y, et al. High mitochondrial DNA copy number and bioenergetic function are associated with tumor invasion of esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Mol Sci.* 2012;13:11228-11246. <https://doi.org/10.3390/IJMS130911228>
 52. Lin C-S, Wang L-S, Tsai C-M, Wei Y-H. Low copy number and low oxidative damage of mitochondrial DNA are associated with tumor progression in lung cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2008;7(6):954-958. <https://doi.org/10.1510/ICVTS.2008.177006>
 53. Huang B, Gao Y-T, Shu X-O, et al. Association of leukocyte mitochondrial DNA copy number with colorectal cancer risk: results from the Shanghai Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Prev Biomarkers.* 2014;23(11):2357-2365. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0297>
 54. Sun Y, Gu J, Ajani JA, Chang DW, Wu X, Strohlein JR. Genetic and intermediate phenotypic susceptibility markers of gastric cancer in Hispanic Americans: a case-control study. *Cancer.* 2014;120(19):3040-3048. <https://doi.org/10.1002/CNCR.28792>
 55. Bai RK, Chang J, Yeh KT, et al. Mitochondrial DNA content varies with pathological characteristics of breast cancer. *J Oncol.* 2011;2011:1-10. <https://doi.org/10.1155/2011/496189>
 56. Tasdogan A, McFadden DG, Mishra P. Mitochondrial DNA haplotypes as genetic modifiers of cancer. *Trend Cancer.* 2020;6(12):1044-1058. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2020.08.004>
 57. Slaska B, Surdyka M, Brodzki A, et al. Mitochondrial D-loop mutations can be detected in sporadic malignant tumours in dogs. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2014;58(4):631-637. <https://doi.org/10.2478/bvip-2014-0096>

58. Śmiech A, Ślaska B, Surdyka M, Grzybowska-Szatkowska L, Łopuszyński W, Różańska D. Identification of additional mitochondrial DNA mutations in canine mast cell tumours. *Acta Vet Scand.* 2016;58(1):28. <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0210-y>
59. Ping HZ, Wang Y, Wei MW, Wei ZX, Qiao J, Fang ZQ. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) and variable number tandem repeats (VNTRs) in mtDNA D-loop and CO II-tRNA Lys intergenic region with PCOS. *J Reprod Contracept.* 2011;22(3):129-138. [https://doi.org/10.1016/S1001-7844\(12\)60008-X](https://doi.org/10.1016/S1001-7844(12)60008-X)
60. Schlötterer C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nat Rev Genet.* 2004;5(1):63-69. <https://doi.org/10.1038/nrg1249>
61. Kim S, Song Y, Ha B, et al. Variable number tandem repeats in the mitochondrial DNA of *Lentinula edodes*. *Genes.* 2019;10(7):542. <https://doi.org/10.3390/genes10070542>
62. Kowal K, Tkaczyk A, Ząbek T, Pierzchała M, Ślaska B. Comparative analysis of CpG sites and islands distributed in mitochondrial DNA of model organisms. *Animals.* 2020;10(4):665. <https://doi.org/10.3390/ani10040665>
63. Xu Y, Li H, Hedmer M, et al. Occupational exposure to particles and mitochondrial DNA—relevance for blood pressure. *Environ Heal A Glob Access Sci Source.* 2017;16(1). <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0234-4>
64. Yu D, Du Z, Pian L, et al. Mitochondrial DNA hypomethylation is a biomarker associated with induced senescence in human fetal heart mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int.* 2017;2017:1-12. <https://doi.org/10.1155/2017/1764549>
65. Sanyal T, Bhattacharjee P, Bhattacharjee S, Bhattacharjee P. Hypomethylation of mitochondrial D-loop and ND6 with increased mitochondrial DNA copy number in the arsenic-exposed population. *Toxicology.* 2018;408:54-61. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.06.012>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Kowal K, Tkaczyk-Wliziło A, Pierzchała M, Gawor J, Ślaska B. Molecular differences in mitochondrial DNA genomes of dogs with malignant mammary tumours. *Vet Comp Oncol.* 2021;1-9. doi: 10.1111/vco.12772



EVALUATION OF THE *TRNA-LEU (UUR)* GENE HAPLOTYPE PROFILE OBSERVED IN CANINE MAMMARY GLAND TUMOURS BASED ON COMPARATIVE ANALYSIS WITH THE *MT-TL1* HUMAN GENE*

Krzysztof Kowal¹, Angelika Tkaczyk-Wlizło¹, Mariusz Pierzchała², Brygida Ślaska^{1*}

¹Faculty of Animal Sciences and Bioeconomy, Institute of Biological Bases of Animal Production, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

²Department of Genomics and Biodiversity, Institute of Genetics and Animal Biotechnology, Polish Academy of Sciences, Jastrzębiec, Poland

*Corresponding author: brygida.slaska@up.lublin.pl

Abstract

The aetiology and pathogenesis of many canine tumours are likely to be similar to cancers found in humans. This study aimed to evaluate a plausible link between changes in the *tRNA-Leu (UUR)* gene and the carcinogenesis process in dogs with mammary gland tumours. The whole mitochondrial DNA (mtDNA) isolated from blood and tumour tissues of 13 dogs with malignant mammary gland tumours was sequenced. The present work is the first report showing that some polymorphisms might occur at the corresponding positions in the human and canine mtDNA genome, which in turn may provoke similar deleterious effects. The homology between the human *MT-TL1* and canine *tRNA-Leu (UUR)* genes was 84%. After resequencing of the whole mitochondrial DNA genome with the use of the NGS technology, two polymorphisms in two haplotypes were identified: m.2683G>A (observed in 18 out of 27 samples) and m.2678_2679insG (27 out of 27 samples). The m.2683G>A polymorphism corresponded to a deleterious change at m.3243A>G, which is linked with MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes) syndrome and with different types of cancers in humans as well. The comparative analysis of *MT-TL1* and *tRNA-Leu (UUR)* led us to hypothesise that the m.2678_2679insG and m.2683G>A polymorphisms might influence the dog's condition and might be linked with tumourigenesis, as observed in humans.

Key words: polymorphisms, mtDNA, mammary gland tumours, MELAS

Canine malignancies have been established as strong comparative models for human cancers due to their spontaneous development and frequency (Stacey et al., 2007; Grzybowska-Szatkowska and Ślaska, 2012; Dobson, 2013). The human mitochondrial DNA genome (mtDNA) is a 16,569 base pair (bp) covalently closed circular molecule containing 13 genes for polypeptides, 2 genes for rRNAs, and 22 genes for tRNAs, whereas canine mtDNA contains the same genes but is 16,727 bp long (Wallace, 2014; Young and Copeland, 2016; Wheeler et al., 2019). The difference between the canine and human mtDNA genomes is the 30 tandem repeats of the 10-nt motif between conserved sequence blocks (CSB) I and II localised in the canine displacement loop (D-loop) region (Tkaczyk et al., 2020). Although the canine mitochondrial genome sequence was described at the end of the 20th century, the association of mtDNA mutations with neoplastic transformation in dogs has not been investigated profoundly to date (Kowal et al., 2019). As in studies of human cancers, the association of mitochondrial DNA mutations with cancer development included both coding

and non-coding genes of mtDNA regions (Grzybowska-Szatkowska and Ślaska, 2012).

Although functional mitochondria are necessary for cancer cell growth and tumourigenesis, numerous mtDNA mutations and reduced mtDNA copy numbers altering OXPHOS (oxidative phosphorylation) have been reported to be common in cancers (Larman et al., 2012; Wallace, 2012; Singh et al., 2017 a, b). Different modifications of mitochondrial functions have been observed in human and canine cancer biology, including shifts in energy production, disruption of apoptosis signalling, an increase in mtDNA mutations, and altered antioxidant activity and reactive oxygen species production (Ślaska et al., 2013; Singh et al., 2017 c; Surdyka and Ślaska, 2017). There are several regions of mitochondrial DNA that have preserved its conservative character in many organisms, e.g. *CYB*, *COI*, and *12s rRNA*, and are widely used as barcodes for identification purposes (Hebert et al., 2010; Kowal et al., 2020). The information about functional regions in human mtDNA is stored in the Mitomap database (Lott et al., 2013); however, as far as we know,

*This research was funded by the National Science Centre in Poland, grant number 2019/35/B/NZ5/00775 and financed by the Doctoral School of the University of Life Sciences in Lublin, grant number SzD/6/ZiR/2020.

there is no similar database of canine mtDNA, except for the Mamit-tRNA database for comparison of tRNA genes (Helm et al., 2000). The specific information about the exact localisation of similar functional regions in canine mtDNA is limited and regards mainly the structure and changes in the D-loop (Pereira et al., 2004) for forensic purposes. This paper reports the polymorphisms in two haplotypes in the canine mtDNA *tRNA-Leu (UUR)* gene detected in a large-scale analysis of the mtDNA genome from dogs with mammary gland tumours.

The aim of this study was to present a plausible link between changes in two *tRNA-Leu (UUR)* gene haplotypes and the carcinogenesis process in dogs with mammary gland tumours, taking into account the comparative analysis of human *MT-TL1* and canine *tRNA-Leu (UUR)* in order to find similarities.

Material and methods

We analysed 27 entire mitochondrial genomes. DNA was isolated from thirteen blood samples (n=13) and fourteen post-operative tumour tissues (n=14) obtained from thirteen dogs (one dog had two mammary gland tumours) (Table 1). The dogs obtained neither chemotherapy nor radiotherapy. The tumour tissue sample was placed in a sterile container, and blood was sampled into sterile test-glasses with an anticoagulant. Histopathology analysis of the tumour tissue samples was performed. The malignancy degree of the mammary gland tumour was assessed using the 3-grade scale of malignancy, i.e. a sum of point values assigned to histomorphological traits according to Goldschmidt et al. (2011). The DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used to extract DNA from tumour tissue and blood. DNA samples were assessed quantitatively and qualitatively by spectrophotometric measurement (DeNovix NanoDrop™ Alternative, DS-11) and electrophoretic separation in agarose gel. Selective amplification of mitochondrial DNA was held on the total genomic DNA using two pairs of primers obtained from the literature: F1418 and R11041, ~9,5kb PCR product, 9190F and R2382, ~9,8kb PCR product (Imes et al., 2012). The library preparation

and NGS sequencing on an Illumina MiSeq sequencer was performed according to the methodology proposed by Kowal et al. (2019). Full coverage of mitochondrial DNA was obtained after amplification of two long-range PCR products. PCR reactions were carried out using KAPA HiFi PCR Kit reagents (KAPA Biosystems, Wilmington, USA). Mitochondrial DNA was sequenced in the DNA Sequencing and Synthesis Facility (oligo.pl) at the Institute of Biochemistry and Biophysics PAS. Approximately 1 ng of the PCR DNA template mix was used as an input and an Illumina shotgun library was constructed using the Nextera XT Kit (Illumina, San Diego, CA) following manufacturer's instructions. The library sample was sequenced on an Illumina MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA) using a 600-cycle kit (v3) in a paired-end mode targeting at least 100x coverage. The data obtained after NGS sequencing was stored in NCBI BioProject number PRJNA679417. The sequence reads were filtered by quality and the remaining adaptors were removed using the fastp tool (Chen et al., 2018). Although the whole mitochondrial DNA sequences were obtained, we focused only on an analysis of the *tRNA-Leu (UUR)* gene in this article. The sequences of mtDNA from the blood and tumour were analysed with the use of bioinformatics programs (Unipro UGENE (v.34.0) (Okonechnikov et al., 2012)). The differences in the nucleotide sequence were determined by comparison of the analysed sequences with the reference sequence (GenBank accession No. U96639) (Kim et al., 1998). The comparative analysis of the human and canine *tRNA-Leu (UUR)* genes was carried out in the UGENE program by building an alignment of human and dog reference sequence fragments (human Revised Cambridge Reference Sequence GenBank – rCRS – accession No. NC_012920.1). The mtDNA *tRNA-Leu (UUR)* genes obtained after sequencing were aligned with CLUSTAL O and MAFFT algorithms in order to obtain the highest similarity between the sequences. The secondary structure of the *MT-TL1* gene was determined using the tRNA-scan program (Lowe and Chan, 2016). The HGVS (Human Genome Variation Society) (2016) nomenclature was used for the description of variants of sequences found in the mtDNA (den Dunnen et al., 2016).

Table 1. Data on dogs with sequenced mitochondrial genomes

Laboratory dog number	Breed/Crossbreed	Sample number	Tumour	Age (years)	
1	2	3	4	5	6
S2	Italian Sighthound	S2K S2G	blood tumour	CC	9
S11	Crossbreed	S11K S11G	blood tumour	CC	10
S17	Golden Retriever	S17K S17G	blood tumour	CC	10
S21	Dachshund	S21K S21G	blood tumour	CC	10

Table 1 – contd.

1	2	3	4	5	6
S29	Medium Schnauzer	S29K S29G	blood tumour	CC	11
B131	Polish Lowland Sheepdog	B131K B131G1 B131G2	blood tumour 1 tumour 2	CC	13
S6	Crossbreed	S6K S6G	blood tumour	TPC	9
S7	Prague Ratter	S7K S7G	blood tumour	TPC	14
S19	Siberian Husky	S19K S19G	blood tumour	TPC	9
S23	German Shepherd	S23K S23G	blood tumour	TPC	14
S26	Yorkshire Terrier	S26K S26G	blood tumour	TPC	5
S35	German Shepherd	S35K S35G	blood tumour	TPC	7
S27	Polish Lowland Sheepdog	S27K S27G	blood tumour	CPK	13

CC – carcinoma complexus, TPC – tubulo-papillary carcinoma, CPK – carcinoma planoepitheliale keratodes.

Results

The overall comparative analysis of the human *MT-TL1* gene and the canine *tRNA-Leu (UUR)* gene revealed that the homology rate ranged between 84 and 87%. Dogs with both polymorphisms: m.2678_2679insG and m.2683G>A (haplotype 1) had a higher homology rate compared with the rCRS (87%), whereas dogs with only one polymorphism: m.2678_2679insG (haplotype 2) had a homology rate of 85%. In case of the canine reference sequence from the GenBank database, the homology rate was 84%. Among the two reference sequences, the differences were observed in the following positions (numbering in accordance with rCRS sequence): m.3234, m.3236, m.3239, m.3243, m.3253, m.3254, m.3257, m.3269, m.3276, m.3277, m.3297, and m.3299. The m.2678_2679insG polymorphism was observed in 27 out of the 27 sequences, whereas m.2683G>A was detected in 18 out of the 27 sequences (Figure 1). Haplotype 1 was observed in nine out of the 13 dogs (69%), whereas haplotype 2 was observed in four out of the 13 dogs (31%). None of the analysed samples from the dogs with malignant mammary tumours had the same haplotype as the reference sequence from the GenBank database. All changes were homoplasmic. Haplotype 1 was present equally in dogs with all examined types of mammary gland tumours. We found no mutations in either the blood or the tumour tissue samples.

It is worth noting that the m.2683G>A polymorphism corresponded to the human position m.3243. The

mutation at the m.3243A>G position is recognised as a deleterious alteration observed in 80% of patients with MELAS syndrome. We also analysed the secondary structure of molecule of canine (reference sequence) and human (reference sequence) tRNA-Leu (UUR), a representative molecule of tRNA-Leu (UUR) in dogs with haplotype 1, and a representative molecule of human tRNA Leu with the m.3423A>G alteration (Figure 2). The observed alterations did not influence the secondary structure of tRNA, as they were localised between the D-arm and the acceptor stem (m.2678_2679insG) and in the DHU loop (m.2683G>A). The m.3423A>G and m.2683G>A alterations were situated at the same position in the DHU loop. However, the polymorphic transition had opposite directions in the dogs. It is worth noticing that the localisation of guanine at this position in this region in the human molecule is considered normal. However, it should be noted that the structure of *tRNA-Leu (UUR)* in the dogs with tumour differed from the reference molecules. Interestingly, the human *tRNA-Leu (UUR)* molecule appeared to be more unstable due to the TC>CT transition at positions m.3253 and m.3254 (2693 and 2694 positions in the dog genome) (Figure 2 – green circles).

Interestingly, the *MT-TER* sequence is localised in the same region as the *MT-TL1* gene. *MT-TER* is a 28bp-long transcription terminator area spanning the end of *RNR2* (16s rRNA-coding gene) and *MT-TL1* in human mtDNA (Christianson et al., 1988).

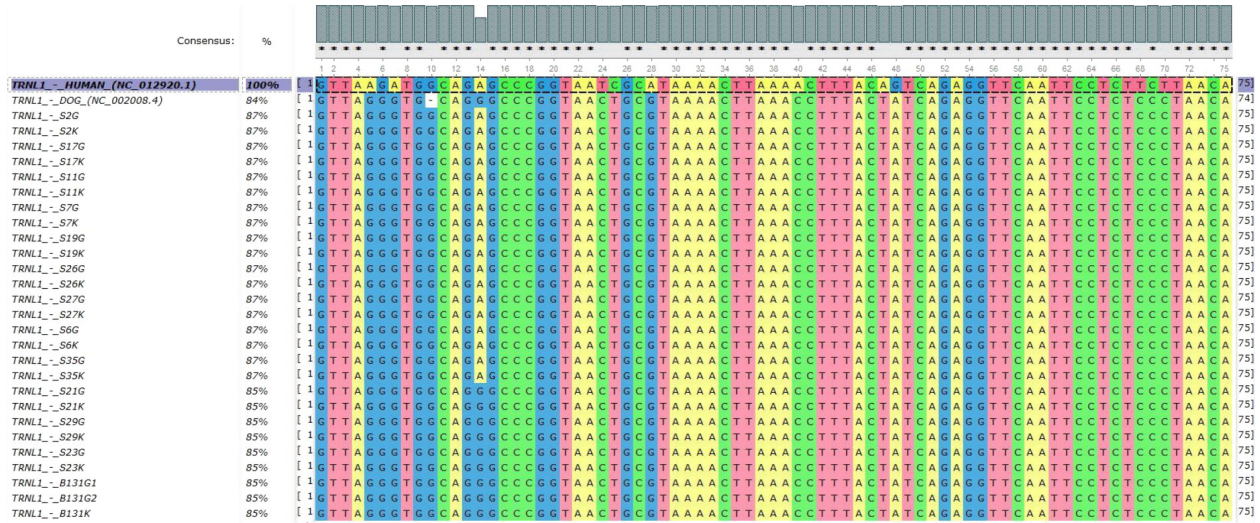


Figure 1. Comparative analysis of *tRNA-Leu (UUR)* and *MT-TL1* genes performed in the Unipro uGene program (Okonechnikov et al., 2012). The reference and examined sequences were aligned with the use of the Clustal O algorithm

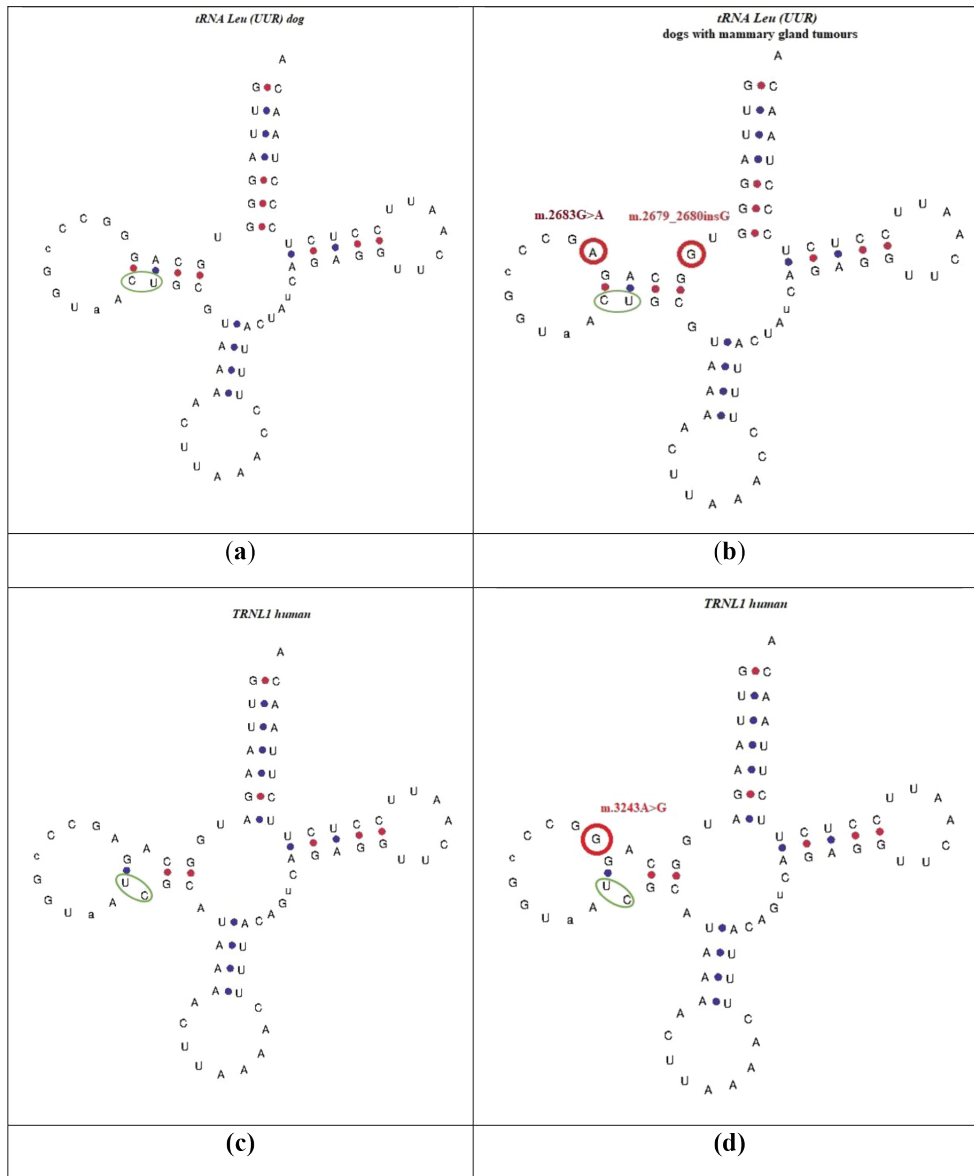


Figure 2. Structures of canine *tRNA-Leu (UUR)* human *MT-TL1* obtained from tRNA-scan: (a) Predicted structure of canine *tRNA-Leu (UUR)* (reference sequence); (b) Predicted structure of canine *tRNA-Leu (UUR)* (analysed mtDNA sequence in dogs with haplotype 1); (c) Predicted structure of human *MT-TL1* (reference sequence) (d) Predicted structure of human *MT-TL1* gene with the m.3243A>G alteration

Discussion

The dog has become a promising model for studying human genetic diseases, including cancers, hence the increased interest in canine genomics (Stacey et al., 2007; Slaska et al., 2014 a). In comparison to humans, dogs are affected by specific types of cancers more frequently: 35 times more often by skin cancer, four times more often by mammary gland cancer, eight times more often by bone cancer, and twice more often by leukaemia (Cullen et al., 2008). Mammary tumours are the second most common canine cancers with a high incidence in female dogs, accounting for 52% of all diagnosed tumours, and over 80% of them are malignant (Ślaska et al., 2013).

To date, most research of alterations in canine mtDNA has been focused on the hypervariable D-loop. The variability in the mtDNA D-loop sequence in dogs with diagnosed mammary tumours was identified in several reports (Grzybowska-Szatkowska and Ślaska, 2014; Slaska et al., 2014 b; Surdyka and Slaska, 2017; Kowal et al., 2019). The D-loop region is responsible for transcription, replication, and organisation of the mitochondrial genome. The single nucleotide polymorphism (SNP) in this region may alter the functions of the electron transport chain and promote the generation of reactive oxygen species, which in turn damage the DNA structure (Brandon et al., 2006; Slaska et al., 2014 b). Kowal et al. (2019) noted the highest rate of heteroplasmy in the VNTR (variable number tandem repeat) region localised in the canine D-loop. Moreover, in the same study, the occurrence of both polymorphisms – m.2679_2680insG and m.2683A>G – was confirmed in the analysis of changes in the whole mtDNA genome obtained from a 9-year-old Labrador with mammary tumour (tubulo-papillary carcinoma) (Kowal et al., 2019).

The knowledge of changes in the mitochondrial DNA in mammary gland tumours is insufficient, and no comparative analysis between the human and canine mtDNA sequences has been done before. Based on the comparative analysis of the human and canine mitochondrial DNA genome, it can be stated that the observed polymorphisms might affect *tRNA-Leu (UUR)* and cause pathological changes in the dog's organism or even lead to carcinogenesis. It is worth noticing that the *tRNA-Leu (UUR)* gene is responsible for transporting one of the most frequently used amino acids in the mitochondrial protein structure. Mitochondrially encoded proteins are mostly hydrophobic (Brandon et al., 2006). Therefore, it is not surprising that the tRNA transporting hydrophobic amino acids are the most evolutionarily conserved. The changes in the tRNA-Leu (UUR) structure were found between the D-arm and the acceptor stem and in the DHU loop. Determining whether these variants are pathogenic is critical, but confirmation of the effect of the variants on mitochondrial function may be challenging (Bulduk et al., 2020). Sonney et al. (2017) used available databases of the alignment of benign and pathogenic

variants between diverse tRNAs, structural information, and comparative genomics to predict the impact of all possible single-base variants and deletions (Bulduk et al., 2020). The highest pathogenicity is mainly observed in the D-stem and Anticodon loops, but it should be emphasised that the disruptions in the D-loops might also affect the tertiary structure of tRNA.

The tRNA genes are crucial for the proper functioning of the OXPHOS chain and for the whole organism. One of the frequently observed mutations (m.3243A>G) in the *MT-TL1* gene in humans causes mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS syndrome) (Bulduk et al., 2020). MELAS syndrome is a multi-organ disease with broad manifestations, including stroke-like episodes, dementia, epilepsy, lactic acidemia, myopathy, recurrent headaches, hearing impairment, diabetes, and short stature (El-Hattab et al., 2015). The most common mutation associated with MELAS syndrome is the m.3243A>G mutation in the *MT-TL1* gene encoding the mitochondrial *tRNA-Leu (UUR)* gene. Over 80% of MELAS patients carry the m.3243A>G mutation in the mitochondrial genome (Rahman et al., 2009). The m.3243A>G mutation results in impaired mitochondrial translation and protein synthesis, including the mitochondrial electron transport chain complex subunits, leading to impaired mitochondrial energy production. The inability of dysfunctional mitochondria to generate sufficient energy to meet the needs of various organs results in the multi-organ dysfunction observed in MELAS syndrome (El-Hattab et al., 2015). Even though these symptoms are typical for patients diagnosed with MELAS syndrome, it cannot be confirmed that the same effect would be observed in dogs. The dogs taken to this study were diagnosed with malignant mammary gland tumours; moreover, the direction of the polymorphism is reversed (G>A instead of A>G) as in the MELAS case. However, it should be emphasised that lactic acidosis might appear as a significant biomarker provoked by a genetic alteration in the canine *tRNA-Leu (UUR)* gene. Reprogramming of biochemical pathways is a hallmark of cancer cells, and the generation of lactic acid from glucose/glutamine represents one of the consequences of such metabolic alterations (Brown and Ganapathy, 2020). Cancer cells export lactic acid out to prevent intracellular acidification, thereby not only increasing lactate levels but also contributing to an acidic pH value in the extracellular milieu. Lactate and protons in the tumour microenvironment are not innocuous bystander metabolites, but have special roles in promoting tumour-cell proliferation and growth (Brown and Ganapathy, 2020). Queen et al. (2017) suggest a plausible role of the m.3253 and m.3254 variants, which may stabilise the DHU stem and suppress the deleterious effect of the m.3243A>G change (Queen et al., 2017). It is yet unclear whether the same compensatory effect is observed in the reversed change in dogs with the m.2863G>A polymorphism. Although the polymorphism was not observed either in the tumour samples or even in the heteroplasmy

state, it cannot be excluded that it provokes tRNA molecule instability.

The region surrounding m.3243 is an etiologic hotspot for mutations in humans (Moraes et al., 1993). Lorenec et al. (2003) analysed mtDNA variations in various cancer samples by comparing them with normal tissue controls and identified the m.3243A>G mutation in a colon cancer sample and m.3244G>A in lung cancer. A similar mutation was observed by Mayr et al. (2008) and Meierhofer et al. (2006) in studies of renal cell oncocyoma (Meierhofer et al., 2006; Mayr et al., 2008). The latest findings presented by Xu et al. (2019) revealed the presence of m.3243A>G in a non-invasive encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma. Thus, it cannot be excluded that m.2683A>G plays a significant role in cancer progression or proliferation in canine malignant mammary gland tumours. However, this hypothesis should be supported by further research conducted on a larger cohort.

The functional *MT-TER* region localised in 3229–3256 bp spans the *MT-RNR1* and *MT-TL1* genes in human mtDNA (Christianson et al., 1986, 1988; Kruse et al., 1989; Hyvärinen et al., 2007). The *MT-TER* region was recognised as a plausible termination transcription region in mitochondrial DNA. Transcription and replication of mtDNA have been regarded as interlinked processes. The primer for initiation of DNA replication has been assumed to be a product of transcription by the mitochondrial RNA polymerase. However, there is no consensus concerning the mechanism by which 3' ends are generated for extension by DNA polymerase, variously proposed to be RNA processing by endonuclease MRP or protein-independent termination at one of the conserved sequence blocks of the non-coding region (NCR) (Hyvärinen et al., 2007). Mitochondrial transcription termination factors (MTERFs) regulate mitochondrial gene transcription and metabolism in numerous types of cells (Sun et al., 2019). Termination at the 3' end of rDNA is brought about by a transcription termination factor mTERF (Christianson et al., 1988; Fernández-Silva et al., 2003), which has also been proposed to interact with the RNA polymerase in initiation site selection (Martin et al., 2005). However, the mechanism of termination of heavy strand promoter (HSP) transcription is still unclear. It was previously suggested that mitochondrial termination factor 1 (MTERF1) bends the mtDNA connecting the HSP1 promoter site and its apparent *tRNA-Leu (UUR)* termination site. MTERF1 would then induce transcription termination through base flipping and DNA unwinding. This model was originally proposed to explain the 50-fold higher abundance of mitochondrial rRNAs. However, more recent evidence contradicts this hypothesis (D'Souza and Minczuk, 2018). Yet, it should be emphasised that the *MT-TER* region in humans has a high homology rate compared with the corresponding canine mtDNA region (unpublished data – 79% comparing human and canine reference sequences and 86% comparing the human reference sequence and the

sequence obtained from dogs with mammary gland tumours with two *tRNA-Leu (UUR)* polymorphisms). It is worth underlining that changes in this region might alter mitochondrial DNA transcription and replication in dogs, leading to disruptions that may provoke cancer progression and proliferation.

Conclusions

The comparative analysis of the human and canine mtDNA genome revealed a high homology rate (84–87%) in the *MT-TL1* gene. The presence of the canine polymorphism m.2683G>A corresponded to the human m.3243A>G deleterious alteration, which is frequently diagnosed in MELAS syndrome patients. Moreover, such an alteration in humans has frequently been linked with different types of cancers, i.e. colon cancer, renal cell oncocyoma, and papillary thyroid carcinoma. Thus, it cannot be excluded that the presence of the polymorphisms in canine *tRNA-Leu (UUR)* might be linked with mammary gland tumours. It is also worth mentioning that the polymorphisms are located in the plausible *MT-TER* region in dogs responsible for transcription termination. However, the association of these two polymorphisms with the carcinogenesis process cannot be clearly confirmed. The authors emphasise that this research is based on bioinformatics analysis, and a further experiment based on additional canine cancer samples should be carried on for full confirmation of the hypothesis and to evaluate the rate of association of the identified mitochondrial mutation with the occurrence of mammary gland tumours or other cancers in dogs.

Ethics approval

The study was approved by the II Local Ethical Commission for animal experiments in Lublin, Poland (resolution number 6/2013).

References

- Brandon M., Baldi P., Wallace D.C. (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*, 25: 4647–4662.
- Brown T.P., Ganapathy V. (2020). Lactate/GPR81 signaling and proton motive force in cancer: Role in angiogenesis, immune escape, nutrition, and Warburg phenomenon. *Pharmacol. Ther.*, 206: 107451.
- Bulduk B.K., Kiliç H.B., Bekircan-Kurt C.E., Haliloğlu G., Erdem Özdamar S., Topaloğlu H., Kocaefe Y.Ç. (2020). A novel amplification-refractory mutation system-PCR strategy to screen *MT-TL1* pathogenic variants in patient repositories. *Gen. Test. Mol. Biomark.*, 24: 165–170.
- Chen S., Zhou Y., Chen Y., Gu J. (2018). Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34: i884–i890.
- Christianson T.W., Clayton D.A. (1986). *In vitro* transcription of human mitochondrial DNA: Accurate termination requires a region of DNA sequence that can function bidirectionally. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83: 6277–6281.
- Christianson T.W., Clayton D.A. (1988). A tridecamer DNA sequence supports human mitochondrial RNA 3'-end formation *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 4502–4509.
- Cullen J.M., Page R., Misdorp W. (2008). An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management. *Tum. Domest. Anim.*, Iowa State Press, Ames, Iowa, USA, pp. 1–44.

- D'Souza A.R., Minczuk M. (2018). Mitochondrial transcription and translation: Overview. *Essays Biochem.*, 62: 309–320.
- den Dunnen J.T., Dalgleish R., Maglott D.R., Hart R.K., Greenblatt M.S., McGowan-Jordan J., Roux A.F., Smith T., Antonarakis S.E., Taschner P.E.M. (2016). HGVS Recommendations for the description of sequence variants: 2016 Update. *Human Mut.*, 37: 564–569.
- Dobson J.M. (2013). Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet. Sci.*, 2013: 941275.
- El-Hattab A.W., Adesina A.M., Jones J., Scaglia F. (2015). MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol. Genet. Metab.*, 116: 4–12.
- Fernández-Silva P., Enriquez J.A., Montoya J. (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp. Physiol.*, 88: 41–56.
- Goldschmidt M.H., Peña L., Rasotto R., Zappulli V. (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet. Pathol.*, 48: 117–131.
- Grzybowska-Szatowska L., Ślaska B. (2012). Polymorphisms in genes encoding mt-tRNA in female breast cancer in Poland. *Mitochondrial DNA*, 23: 106–111.
- Grzybowska-Szatowska L., Ślaska B. (2014). Mitochondrial NADH dehydrogenase polymorphisms are associated with breast cancer in Poland. *J. Appl. Genet.*, 55: 173–181.
- Hebert P.D.N., Dewaard J.R., Landry J.F. (2010). DNA barcodes for 1/1000 of the animal Kingdom. *Biol. Lett.*, 6: 359–362.
- Helm M., Brulé H., Friede D., Giegé R., Pütz D., Florentz C. (2000). Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA*, 6: 1356–1379.
- Hyvärinen A.K., Pohjoismäki J.L.O., Reyes A., Wanrooij S., Yasukawa T., Karhunen P.J., Spelbrink J.N., Holt I.J., Jacobs H.T. (2007). The mitochondrial transcription termination factor mTERF modulates replication pausing in human mitochondrial DNA. *Nuc. Acids Res.*, 35: 6458–6474.
- Imes D.L., Wictum E.J., Allard M.W., Sacks B.N. (2012). Identification of single nucleotide polymorphisms within the mtDNA genome of the domestic dog to discriminate individuals with common HVI haplotypes. *Foren. Sci. Int. Genet.*, 6: 630–639.
- Kim K.S., Lee S.E., Jeong H.W., Ha J.H. (1998). The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 10: 210–220.
- Kowal K., Ślaska B., Bownik A., Horecka B., Gawor J., Śmiech A., Tkaczyk A. (2019). Analysis of mitochondrial genome from Labrador (*Canis lupus familiaris*) with mammary gland tumour reveals novel mutations and polymorphisms. *Ann. Anim. Sci.*, 19: 619–632.
- Kowal K., Tkaczyk A., Pierzchała M., Bownik A., Ślaska B. (2020). Identification of mitochondrial DNA (NUMTs) in the nuclear genome of *Daphnia magna*. *Int. J. Mol. Sci.*, 21.
- Kruse B., Narasimhan N., Attardi G. (1989). Termination of transcription in human mitochondria: Identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell*, 58: 391–397.
- Larman T.C., DePalma S.R., Hadjipanayis A.G., Protopopov A., Zhang J., Gabriel S.B., Chin L., Seidman C.E., Kucherlapati R., Seidman J.G. (2012). Spectrum of somatic mitochondrial mutations in five cancers. *Proc. National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 14087–14091.
- Lorenc A., Bryk J., Golik P., Kupryjańczyk J., Ostrowski J., Pronicki M., Semczuk A., Szolkowska M., Bartnik E. (2003). Homoplasmic MELAS A3243G mtDNA mutation in a colon cancer sample. *Mitochondrion*, 3: 119–124.
- Lott M.T., Leipzig J.N., Derbeneva O., Michael Xie H., Chalkia D., Sarmady M., Procaccio V., Wallace D.C. (2013). MtDNA variation and analysis using Mitomap and Mitomaster. *Curr. Prot. Bioinf.*, 44.
- Lowe T.M., Chan P.P. (2016). tRNA^{Asn}-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Res.*, 44: W54–W57.
- Martin M., Cho J., Cesare A.J., Griffith J.D., Attardi G. (2005). Termination factor-mediated DNA loop between termination and initiation sites drives mitochondrial rRNA synthesis. *Cell*, 123: 1227–1240.
- Mayr J.A., Meierhofer D., Zimmermann F., Feichtinger R., Kögler C., Ratschek M., Schmeller N., Sperl W., Kofler B. (2008). Loss of complex I due to mitochondrial DNA mutations in renal oncocyoma. *Clin. Canc. Res.*, 14: 2270–2275.
- Meierhofer D., Mayr J.A., Fink K., Schmeller N., Kofler B., Sperl W. (2006). Mitochondrial DNA mutations in renal cell carcinomas revealed no general impact on energy metabolism. *Brit. J. Cancer*, 94: 268–274.
- Moraes C.T., Ciacci F., Bonilla E., Jansen C., Hirano M., Rao N., Lovelace R.E., Rowland L.P., Schon E.A., DiMauro S. (1993). Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis: Is the tRNA^{Leu}(UUR) gene an etiologic hot spot? *J. Clin. Invest.*, 92: 2906–2915.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., Varlamov A., Vaskin Y., Efremov I., German Grehov O.G., Kandrov D., Rasputin K., Syabro M., Tleukenov T. (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28: 1166–1167.
- Pereira L., Van Asch B., Amorim A. (2004). Standardisation of nomenclature for dog mtDNA D-loop: A prerequisite for launching a *Canis familiaris* database. *Forensic Sci. Int.*, 141: 99–108.
- Queen R.A., Steyn J.S., Lord P., Elson J.L. (2017). Mitochondrial DNA sequence context in the penetrance of mitochondrial t-RNA mutations: A study across multiple lineages with diagnostic implications. *PLoS ONE*, 12.
- Rahman S., Hanna M.G. (2009). Diagnosis and therapy in neuromuscular disorders: Diagnosis and new treatments in mitochondrial diseases. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 80.
- Singh B., Modica-Napolitano J.S., Singh K.K. (2017 a). Defining the momiome: Promiscuous information transfer by mobile mitochondria and the mitochondrial genome. *Semin. Cancer Biol.*, 47: 1–17.
- Singh K.K., Modica-Napolitano J.S. (2017 b). Special issue: Mitochondria in cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 47: 4–6.
- Singh K.K., Choudhury A.R., Tiwari H.K. (2017 c). Numtogenesis as a mechanism for development of cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 47: 101–109.
- Ślaska B., Grzybowska-Szatowska L., Bugno-Poniewierska M., Surdyka M., Śmiech A. (2013). Nuclear and mitochondrial DNA mutation in human and canine tumors. *Med. Weter.*, 69: 195–202.
- Ślaska B., Surdyka M., Brodzki A., Nisztuk S., Gurgul A., Bugno-Poniewierska M., Miech A., Rońska D., Orzelski M. (2014 a). Mitochondrial D-loop mutations can be detected in sporadic malignant tumours in dogs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 58: 631–637.
- Ślaska B., Grzybowska-Szatowska L., Surdyka M., Nisztuk S., Rońska D., Rozanski P., Śmiech A., Orzelski M. (2014 b). Mitochondrial D-loop mutations and polymorphisms are connected with canine malignant cancers. *Mitochondr. DNA*, 25: 238–243.
- Sonney S., Leipzig J., Lott M.T., Zhang S., Procaccio V., Wallace D.C., Sondheimer N. (2017). Predicting the pathogenicity of novel variants in mitochondrial tRNA with MitoTIP. *PLoS Comput. Biol.*, 13.
- Stacey S.N., Manolescu A., Sulem P., Rafnar T., Gudmundsson J., Gudjonsson S.A., Masson G., Jakobsdottir M., Thorlacius S., Helgason A., Aben K.K., Strobbe L.J., Albers-Akkers M.T., Swinkels D.W., Henderson B.E., Kolonel L.N., Le Marchand L., Millastre E., Andres R., et al. (2007). Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat. Genet.*, 39: 865–869.
- Sun S., Wu C., Yang C., Chen J., Wang X., Nan Y., Huang Z., Ma L. (2019). Prognostic roles of mitochondrial transcription termination factors in non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.*, 18: 3453–3462.
- Surdyka M., Ślaska B. (2017). Defect of the mitochondrial DNA hypervariable region as a risk factor for canine mammary tumour. *Vet. Comp. Oncol.*, 15: 820–828.
- Tkaczyk A., Kowal K., Ślaska B. (2020). Mitochondrial D-loop informative SNPs in identification of dog's breed. *Med. Weter.*, 76: 6394–2020.
- Wallace D.C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 12: 685–698.
- Wallace K.B. (2014). Drug-induced mitochondrial neuropathy in children: A conceptual framework for critical windows of development. *J. Child Neurol. SAGE Publ. Inc.*, 29: 1241–1248.

- Wheeler J.H., Young C.K.J., Young M.J. (2019). Analysis of human mitochondrial DNA content by southern blotting and nonradioactive probe hybridization. *Curr. Prot. Toxicol.*, 80.
- Xu B., Reznik E., Tuttle R.M., Knauf J., Fagin J.A., Katabi N., Dogan S., Aleynick N., Seshan V., Middha S., Enepekides D., Casadei G.P., Solaroli E., Tallini G., Ghossein R., Ganly I. (2019). Outcome and molecular characteristics of non-invasive encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma with oncocytic features. *Endocrine*, 64: 97–108.
- Young M.J., Copeland W.C. (2016). Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 38: 52–62.

Received: 11 VI 2021
Accepted: 13 XII 2021