

Received: 2007.08.16
Accepted: 2007.10.09
Published: 2007.10.26

Genetycznie zmodyfikowane myszy jako modele do badań w onkologii

Genetically engineered mice: mouse models for cancer research

Hanna Szymańska

Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych

Streszczenie

Możliwość manipulacji w genomie myszy pozwala na stworzenie szczepów myszy zmodyfikowanych genetycznie, u których rozwija się wiele nowotworów podobnych pod względem morfologii, histopatologii, fenotypu i genotypu do nowotworów powstających u człowieka. Genetycznie zmodyfikowane myszy GEM (genetically engineered mice) otrzymywane są przez: wprowadzenie do ich genomu obcego DNA i przypadkowej integracji tego transgeny w genomie – myszy transgeniczne; inaktywacji wybranego genu – myszy knock-out; celowane wprowadzenie transgeny w wybrane *locus* – myszy knock-in. Inaktywacja genu może być swoista tkankowo (conditional knock-out mouse) lub usunięcie aktywności danego genu może dotyczyć wszystkich tkanek (constitutional knock-out mouse). Modele myszy humanizowanych i modele myszy knock down są bardziej wyrafinowanymi modelami myszy GEM. Humanizacja mysich modeli polega na zamianie genu mysiego jego ludzkim odpowiednikiem. U myszy knock down zastosowano mechanizm wyłączenia ekspresji genu w wyniku degradacji jego mRNA przez regulatorowe RNA. U myszy zmodyfikowanych genetycznie zmiany te muszą być dziedziczne. Nowotwory rozwijające się u myszy GEM znalazły zastosowanie w:

- analizowaniu roli genów biorących udział w procesie nowotworzenia,
- analizowaniu przedklinicznych stadiów nowotworowych,
- ocenie roli mikrośrodowiska w rozwoju nowotworu,
- ocenie standardowych terapii przeciwnowotworowych,
- testowaniu nowych leków i terapii eksperymentalnych oraz przydatności markerów nowotworowych.

Modele nowotworów powstające u myszy GEM są zatwierdzone przez Mouse Models of Human Cancer Consortium. Najwięcej modeli GEM utworzono dla nowotworów gruczołu młecznego, jelita cienkiego i okrężnicy. Istotne dla badań są modele GEM nowotworów trzustki i gruczołu krokowego. Modele nowotworów mózgu, jajnika, szyjki macicy i skóry znajdują się we wczesnej fazie badań.

Słowa kluczowe: myszy genetycznie zmodyfikowane • mysie modele nowotworów

Summary

Genetically engineered mice (GEM) have been extensively used to model human cancer. Mouse models mimic the morphology, histopathology, phenotype, and genotype of the corresponding cancer in humans. GEM mice are created by random integration of a transgene into the genome,

which results in gene overexpression (transgenic mice); gene deletion (knock-out mice); or targeted insertion of the transgene in a selected locus (knock-in mice). Knock-out may be constitutive, i.e. total inactivation of the gene of interest in any cell, or conditional, i.e. tissue-specific inactivation of the gene. Gene knock-down (RNAi) and humanization of the mouse are more sophisticated models of GEM mice. RNA interference (RNAi) is a mechanism in which double-stranded RNAs inhibits the respective gene expression by inducing degradation of its mRNA. Humanization is based on replacing a mouse gene by its human counterpart. The alterations in genes in GEM have to be heritable. The opportunities provided by employing GEM cancer models are: analysis of the role of specific cancer genes and modifier genes, evaluation of conventional cancer therapies and new drugs, identification of cancer markers of tumor growth, analysis of the influence of the tumor's microenvironment on tumor formation, and the definition of the pre-clinical, discrete steps of tumorigenesis. The validation of mouse models of human cancer is the task of the MMHCC (Mouse Models of Human Cancer Consortium). The GEM models of breast, pancreatic, intestinal and colon, and prostate cancer are the most actively explored. In contrast, the models of brain tumors and ovary, cervical, and skin cancer are in the early stage of investigation.

Key words: genetically engineered mice • mouse models of human cancer

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11413.pdf

Word count: 3087

Tables: –

Figures: –

References: 44

Adres autorki: dr Hanna Szymańska, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych, Roentgena 5, 02-781 Warszawa; e-mail hanszym@yahoo.com

Pamięci Pani Profesor Aliny Czarnomskiej

WSTĘP

Nowotwory rozwijające się spontanicznie u myszy od dawna były wykorzystywane jako modele chorób nowotworowych u człowieka. Manipulacje w genomie myszy stwarzają nowe możliwości tworzenia mysich modeli nowotworów rozwijających się u człowieka. Modele te mają przewagę nad liniami komórek nowotworowych, ponieważ nowotwór rozwija się w konkretnym mikrośrodowisku i jest poddany oddziaływaniu układu immunologicznego. Konieczność tworzenia mysich modeli nowotworów fenotypowo i genotypowo podobnych do nowotworów rozwijających się u człowieka wynika z tego, że w rozwoju nowotworów u tych dwóch gatunków wprawdzie istnieją podobieństwa, ale występują też zasadnicze różnice [34].

Metabolizm u myszy jest znacznie szybszy niż u człowieka, co jest związane z powstawaniem większej liczby wolnych rodników u myszy i zwiększoną wrażliwością na rozwój nowotworów związanych z wiekiem. Ponadto, system naprawy DNA u myszy jest mniej wydajny, stąd szybsze tempo gromadzenia mutacji. Wiele karcynogenów jest inaczej aktywowanych lub neutralizowanych u myszy niż u człowieka [4].

Nowotwory u myszy powstają głównie z tkanek pochodzenia mezenchymalnego (tkanka łączna, limfatyczna, naczynia krwionośne) co prowadzi do rozwoju chłoniaków (lymphoma) i mięsaków (sarcoma). U człowieka większość nowotworów powstaje z tkanek pochodzenia ektodermal-

nego i prowadzi do rozwoju raka (carcinoma). Ponadto telomeraza w większości mysich komórek pozostaje aktywna, odwrotnie niż u człowieka, co pozwala komórkom myszy łatwiej osiągnąć nieśmiertelność, choć wydaje się, że zwiększona aktywność telomerazy niekoniecznie sprzyja zwiększonej karcynogenezie [4].

U myszy niektóre nowotwory w ogóle nie powstają spontanicznie, np. nowotwory prostaty (stercza) [34].

Pierwszymi modelami nowotworów człowieka były nowotwory rozwijające się spontanicznie u myszy, które miały wbudowane w genom wirusowe DNA lub RNA. Niektóre z tych modeli nadal służą do badań nad nowotworami człowieka, np. myszy AKR z wbudowanymi w genom retrowirusami. U prawie 80% myszy AKR rozwijają się prekursorowe chłoniaki/białaczki T odpowiadające prekursorowym chłoniakom z komórek T u dzieci [36].

Nowa generacja mysich modeli nowotworów człowieka to nowotwory rozwijające się u myszy zmodyfikowanych genetycznie GEM (genetically engineered mice). Jednocześnie z modelami GEM używane są też inne modele nowotworów. W badaniach podstawowych w onkologii wykorzystuje się modele uzyskane poprzez wszczepianie myszom z niedoborami immunologicznymi, komórek nowotworowych pobranych bezpośrednio z nowotworów człowieka lub z linii komórkowych wyprowadzonych z komórek nowotworowych człowieka (xenografts models). Komórki nowotworowe mogą być wszczepiane podskórnie (ectopic) lub do tkanek i narządów, które są naturalnym miejscem rozwoju guza (orthotopic models) [5].



Myszy zmodyfikowane genetycznie otrzymywane są poprzez:

- wprowadzenie do ich genomu obcego DNA i przypadkowej integracji tego transgenu w genomie [6, 43],
- inaktywacji na poziomie DNA określonego genu – myszy knock-out [6],
- celowane wprowadzenie transgenu w wybrane *locus* – myszy knock-in [13].

Inaktywacja genu (knock-out mouse) może być swoista tkankowo i dotyczyć jednej lub kilku tkanek (conditional knock-out mouse) lub może polegać na całkowitym usunięciu aktywności danego genu ze wszystkich tkanek (constitutional knock-out mouse) [5,43].

Bardziej wyrafinowanymi modelami myszy GEM są: myszy humanizowane i myszy knock down. Humanizacja mysich modeli polega na zamianie genu mysiego jego ludzkim odpowiednikiem. Z kolei u myszy knock down zastosowano mechanizm hamowania ekspresji odpowiedniego genu przez RNAi oraz indukowanie degradacji jego mRNA [40]. Modele te są otrzymywane tylko przez niewiele profesjonalnych firm zajmujących się tworzeniem myszy GEM.

U myszy zmodyfikowanych genetycznie zmiany te muszą być dziedziczne. Myszy zmodyfikowane genetycznie utworzone jako modele nowotworów człowieka charakteryzują się przynajmniej jedną z podanych cech:

- zblizoną wrażliwością na powstanie nowotworów,
- podobną molekularną drogą rozwoju nowotworów,
- zblizonymi stadiami przedklinicznymi w procesie rozwoju nowotworów,
- podobną współzależnością genetyczną –podobnym współdziałaniem genów w rozwoju nowotworu [13].

Należy zaznaczyć, że modele nowotworów rozwijających się u myszy genetycznie zmienionych są jedynie zblizone do nowotworów rozwijających się u człowieka, ale nigdy nie są z nimi identyczne [3,43]. Powoduje to konieczność tworzenia wielu różnych modeli, umożliwiających szczegółową analizę patologii i biologii nowotworu. W przypadku nowotworu gruczołu mlecznego stworzono około 100 modeli [11].

Niekiedy uzyskanie pożądaných podobieństw jest niemożliwe, np. retinoblastoma (siatkówczak). Nie udało się uzyskać mysiego modelu retinoblastomy, który miałby tę samą molekularną drogę rozwoju, co retinoblastoma człowieka. U myszy bowiem nie wystarczy jedynie mutacja w genie Rb, jak to jest w przypadku człowieka, ale niezbędna jest jeszcze dodatkowa mutacja w genach supresorowych powiązanych z genem Rb. Jednak nawet tak istotne różnice i tak nieprecyzyjny model retinoblastoma u myszy GEM, może służyć do badań nad tym nowotworem [25].

Trudności z uzyskaniem idealnych mysich modeli nowotworów człowieka mogą wynikać również z tego, że genetyczne manipulacje w genomie myszy będą jedynie wzmacniać patologiczny proces nowotworowy normalnie rozwijającego się u myszy tła, a nie generować go *de novo* [5].

ZASTOSOWANIA MYSICH MODELI NOWOTWORÓW ROZWIJAJĄCYCH SIĘ U CZŁOWIEKA

Modele nowotworów powstające u myszy genetycznie zmodyfikowanych stosowane są w następujących badaniach:

1) Analizie roli swoistych genów biorących udział w powstawaniu odpowiednich typów nowotworów [18].

U myszy GEM istnieje możliwość zwiększenia ekspresji lub wyciszenia danego genu albo fuzji genów i badania wpływu tych zmian na rozwój nowotworu;

2) Analizie genów modyfikatorów (modifier genes) [18].

Myszy GEM są w tym wypadku niezastąpione. W przeciwieństwie do człowieka myszy zmodyfikowane genetycznie mają homogenne tło genetyczne, co nie tylko ułatwia identyfikację genów modyfikatorów, ale również ocenę ich wpływu na przebieg kliniczny choroby nowotworowej. Wiele tego typu genów zostało zidentyfikowanych w nowotworach płuc i jelita grubego rozwijających się u myszy GEM.

3) Szczegółowej analizie przedklinicznych stadiów nowotworu [18].

Tego typu badania mają duże znaczenie w wypadku nowotworów, które u człowieka wykrywane są dopiero w stadium zaawansowanym np. nowotwory mózgu. Rolą mysich modeli używanych do badań nad stadiami przedklinicznymi nowotworów jest zastąpienie ludzi w tych obserwacjach, dlatego modele te powinny możliwie najdokładniej odzwierciedlać choroby nowotworowe człowieka i charakteryzować się następującymi cechami:

- zmiany genetyczne powinny ujawniać się w nowotworze lub dodatkowo w tkance związanej z nowotworem, pozostawiając niezmienny genotyp (wild-type genotype) w pozostałych komórkach [5];
- obraz histopatologiczny nowotworu powstałego u myszy GEM powinien być jak najbardziej zblizony do odpowiadającego mu nowotworu człowieka;
- zmiany genetyczne powinny odpowiadać analogicznym zmianom w nowotworach u człowieka.

4) Ocenie roli mikrośrodowiska w rozwoju nowotworu [14,18].

Przykładem skutecznego zastosowania odpowiednich modeli GEM jest wyjaśnienie roli jaką odgrywa utrata ekspresji genu receptora TGF- β w fibroblastach będących mikrośrodowiskiem, w którym rozwija się guz przewodowy gruczołu mlecznego u człowieka.

5) Ocenie standardowych terapii przeciwnowotworowych [18].

U myszy GEM utworzono modele nowotworów naśladujących nowotwór mózgu (astrocytoma) oraz nowotwór trzustki, które idealnie odpowiadają na terapie stosowane u ludzi. W czasie stosowania terapii przeciwnowotworowej w mysich modelach można ustalać, która z nich ma największe znaczenie: hamowanie rozrostu komórek nowotworowych, zwiększenie apoptozy, hamowanie powstawania naczyń krwionośnych w guzie (angiogenezy) czy martwica komórek nowotworowych. Możliwe jest również przesłedzenie przyczyn niepowodzeń terapii np. w przypadku oporności komórek nowotworowych na leki.

6) Testowaniu nowych leków i eksperymentalnych programów leczenia[38].

Potrzebę stosowania modeli GEM do testowania terapii eksperymentalnych określa się nowym terminem: „uwiarygodnianie” (credentialing) [1]. Oznacza on potwierdzenie na modelu GEM terapii stosowanej już eksperymentalnie u ludzi. Użyteczność takich modeli jest oczywista, gdy terapia okazuje się efektywna w równym stopniu u myszy GEM jak i u człowieka. Jeżeli rezultaty są różne, przeprowadzenie takich badań ma również sens, ponieważ pozwala ocenić na ile dany model jest użyteczny w stosowaniu danej terapii. Tego typu wykorzystanie modeli GEM opisano w badaniach nad nowotworami trzustki, np. gruczolakorakiem przewodowym (pancreatic ductal adenocarcinoma) [33].

Modele myszy GEM, zwłaszcza najnowszej generacji, są niezastąpione przy ocenie klinicznej nowych terapii. Wybór istniejącego modelu lub tworzenie nowych modeli GEM jest w tym wypadku szczególnie ważne. Wiele testowanych terapii, skutecznych na mysich modelach GEM, okazywało się nieprzydatnych w leczeniu przeciwnowotworowym u człowieka. Przytaczanym w literaturze niepowodzeniem klinicznym w leczeniu przeciwnowotworowym człowieka była próba przeniesienia rezultatów uzyskanych na myszach transgenicznych MMTV-v-Hras, na których uzyskano znaczną regresję guzów gruczołu mlekowego i nowotworów ślinianek po zastosowaniu inhibitora farnesyltransferazy [24,27,29,35,43]. Wyniki uzyskane na myszach GEM mogą zatem zawodzić przy próbach wdrożenia ich do kliniki (off-target therapy) [18].

IDENTYFIKACJA I OCENA PRZYDATNOŚCI MARKERÓW NOWOTWOROWYCH

Badania w tej dziedzinie znajdują się we wczesnej fazie rozwoju. Modele mysie znalazły zastosowanie w badaniach nad ustalaniem biomarkerów nowotworów gruczołu krokowego u myszy GEM [44] i nowotworów gruczołu mlekowego. Na modelach GEM wykazano rolę osteopontyny jako potencjalnego biomarkera w procesie przerzutowania [10].

Mysie modele nowotworów człowieka, zarówno rozwijające się u myszy GEM, jak i powstające w danym szczepie spontanicznie lub w wyniku indukcji, zyskują wiarygodność po przejściu procesu oceny (walidacji) dokonywanego przez wybitnych patologów skupionych wokół programu MMHCC (Mouse Models of Human Cancer Consortium), zorganizowanego i funkcjonującego pod auspicjami amerykańskiego Narodowego Instytutu Raka (NCI). W raportach publikowanych przez MMHCC charakteryzowane są mysie modele nowotworów człowieka (por. np. [8,16]).

Publikowana jest zazwyczaj lista wszystkich lub wybranych modeli GEM odnoszących się do nowotworów w danym narządzie [8,9,16]

ZASTOSOWANIE MYSICH MODELI NOWOTWORÓW ROZWIJAJĄCYCH SIĘ W POSZCZEGÓLNYCH NARZĄDACH

Modele nowotworów gruczołu mlekowego rozwijające się u myszy GEM [8,12,21]

Anatomia i histologia gruczołu mlekowego człowieka i myszy są zasadniczo odmienne. U człowieka zraziki tkanki gruczołowej są umieszczone luźno w tkance łącznej. U myszy tkanka gruczołowa jest umieszczona w warstwie

tłuszczu, a tkanka łączna występuje w ograniczonej ilości. Różnice w anatomii i histologii gruczołu mlekowego u tych dwóch gatunków powodują, że nowotwory gruczołu mlekowego, powstałe spontanicznie u myszy niektórych szczepów wsobnych (myszy te są naturalnie zakażone wirusem wirus MMTV – mouse mammary tumor virus), różnią się wyglądem histopatologicznym od nowotworów piersi u człowieka. Nowotwory gruczołu mlekowego rozwijające się u myszy GEM można podzielić na 3 grupy:

- nowotwory histopatologicznie podobne do nowotworów rozwijających się spontanicznie u myszy,
- nowotwory histopatologicznie odmienne zarówno od rozwiniętych spontanicznie u myszy jak i u człowieka (unikalne dla myszy GEM),
- nowotwory podobne do nowotworów człowieka [8,11].

W patologii człowieka nowotwory gruczołu mlekowego są podzielone według stopni złośliwości. Mysie modele nowotworów gruczołu mlekowego u myszy GEM pozwalają osiągnąć wyższy stopień złośliwości guza niż nowotwory powstające spontanicznie u myszy non-GEM. Wyższy stopień złośliwości nie jest jednak u myszy powiązany z wyższym potencjałem przerzutowania [11].

Należy również zwrócić uwagę na kilka istotnych różnic pomiędzy modelami nowotworu gruczołu mlekowego u myszy GEM, a tymi nowotworami u ludzi:

- modele nowotworów gruczołu mlekowego u myszy GEM to nowotwory hormononiezależne, których komórki nie mają receptora estrogenowego. Odpowiadają one hormononiezależnym nowotworom piersi u człowieka (około 50%) [11],
- przerzuty nowotworów gruczołu mlekowego u myszy występują prawie wyłącznie w płucach, odmiennie niż w przypadkach nowotworów piersi u człowieka [8],
- u myszy nie występuje zwłóknienie jako odpowiedź organizmu na rozwijający się nowotwór [8].

U niektórych myszy GEM (myszy transgeniczne) do osiągnięcia odpowiednio wysokiego poziomu ekspresji transgenu, powodującego rozwój nowotworu gruczołu mlekowego potrzebna jest dodatkowa stymulacja hormonalna. Można ją uzyskać np. utrzymując samice stale w stadium rozrodu [8].

Badania nowotworów gruczołu mlekowego u myszy koncentrują się głównie na dwóch drogach indukcji nowotworu poprzez ekspresję protoonkogenów Wnt i erbB2 [7,8,26]. U myszy transgenicznych ze szczepu SJL, zmiany w genie Wnt.1 powodują rozwój raka przewodowego [26]. Morfologia nowotworów u myszy GEM z różnymi mutacjami w genie erbB2 jest najbardziej zbliżona do nowotworów gruczołu mlekowego u ludzi i odpowiada rakowi zrazikowemu [8].

W badaniach stosowany jest również model nowotworu gruczołu mlekowego rozwijający się u myszy transgenicznych PyV-mT (polyoma virus middle T). Model ten stosowany jest do badań stadiów przednowotworowych w gruczole mlekowym [28].

Wyhodowano także myszy transgeniczne C(3)1, które mogą służyć zarówno jako model nowotworu gruczołu krokowego, jak i nowotworów gruczołu mlekowego. Na modelu tym



przetestowano wiele terapii przeciwnowotworowych, co znalazło przełożenie na podobne wyniki u ludzi [23,41].

Mysie modele nowotworów jelita cienkiego i okrężnicy rozwijające się u myszy GEM [16,17,41]

W zależności od mutacji modele nowotworów jelita u myszy GEM można podzielić na następujące grupy:

- modele zawierające zmiany na szlaku przekazywania sygnału Wnt [42],
- modele ze zmianami w genach systemu naprawczego [17],
- modele ze zmianami na szlaku przekazywania sygnału TGF β (tumor growth factor β) [17],
- modele nowotworów jelita u myszy GEM z niedoborami immunologicznymi. Wymieniane są tu myszy knock-out IL-10, IL-2, TCR α używane jako modele zapalenia jelita grubego, które w konsekwencji prowadzi do rozwoju gruczolakoraka (adenocarcinoma) [17],
- inne modele myszy knock-out niemieszczące się w powyższych grupach: Cdx2^{-/-}, Stk11 (znany również jako Lkb1^{+/-}), Muc2^{-/-}.

Wymienione mysie modele nowotworów rozwijające się u myszy GEM, używane są również w badaniu progresji zmian patologicznych prowadzących do rozwoju nowotworów jelita [17].

Mysie modele nowotworów płuc rozwijające się u myszy GEM [16,32]

Badania prowadzone nad nowotworami płuc rozwijającymi się u myszy genetycznie zmodyfikowanych dostarczają danych pozwalających na uzupełnienie i zbliżenie klasyfikacji nowotworów u człowieka i myszy. Pierwsze modele nowotworów płuc u myszy transgenicznych związane były z ekspresją onkogenów: SV40Large T antigen, c-myc, H-ras, K-ras pod kontrolą promotora np. CC10 (Clara cell-specific 10-kDa protein). U większości modeli GEM rozwijające się nowotwory są podobne histopatologicznie do nowotworów rozwijających się spontanicznie lub indukowanych chemicznie u myszy.

Nowszą grupę modeli GEM stanowią myszy z inaktywowanymi w płucach genami p53 i Rb1. Rozwijające się u nich nowotwory mogą być dogodnymi modelami do badań nad drobnokomórkowym rakiem płuc u człowieka.

Niewątpliwie duże znaczenie ma uzyskanie myszy zmodyfikowanych genetycznie, u których rozwijają się nowotwory zawierające markery neuroendokrynne. Tego typu nowotwory nie powstają u myszy po indukcji chemicznej, ani nie rozwijają się spontanicznie. Ich znaczenie jest niekwestionowane, ponieważ są odpowiednikiem 10–20% gruczolakoraków (adenocarcinoma) płuc z tym markerem u ludzi [32].

Mysie modele nowotworów jajnika rozwijające się u myszy GEM

U kobiet po okresie menopauzy wzrasta liczba zachorowań na raka jajnika. Jest to związane z podwyższonym poziomem FSH i hormonu luteinizującego LH jako konsekwencji obniżania poziomu estrogenów. Dotąd uzyskano

kilka modeli myszy transgenicznych, które charakteryzują zwiększoną sekrecją hormonu LH prowadząca do rozwoju nowotworów. W większości są to nowotwory wywodzące się ze zrębu jajnika lub sznurów płciowych. Ważniejszym zadaniem jest uzyskanie modeli genetycznie zmodyfikowanych myszy, u których rozwijają się nowotwory wywodzące się z nabłonka (raki). Uzyskanie takich modeli byłoby niezwykle ważne ponieważ 90% nowotworów jajnika u kobiet stanowią właśnie raki. Tworzenie tego typu modeli znajduje się dopiero w fazie eksperymentowania, chociaż u myszy GEM z inaktywowanymi genami p53 i Rb1 uzyskano już modele nowotworów jajnika wywodzące się z komórek nabłonkowych.

Mysie modele nowotworów mózgu rozwijające się u myszy GEM [15,19]

Nowotwory mózgu są u ludzi wykrywane w stadium zaawansowanym i niewiele wiadomo o związanych z nimi zmianach przedklinicznych.

Dlatego od modeli GEM nowotworów mózgu oczekuje się, że:

- okażą się pomocne w wyjaśnieniu zmian przednowotworowych,
- pozwolą wyjaśnić z jakich komórek się wywodzą nowotwory mózgu: (komórek macierzystych, niedojrzałych komórek progenitorowych, czy zróżnicowanych astrocytów) [19],
- będą pomocne w badaniach nad znaczeniem mikrośrodowiska mózgu dla rozwoju nowotworu. Badania takie prowadzone są obecnie przez kilka zespołów. Modelem myszy GEM dla tych badań jest model genetycznie uwarunkowanego zespołu chorobowego u człowieka (neurofibromatosis typ 1), w przebiegu którego dochodzi do rozwoju nowotworów ośrodkowego układu nerwowego [19],
- pomogą w badaniach nad genetycznie uwarunkowaną wrażliwością na rozwój danego typu nowotworu mózgu. Na modelu GEM wykazano, że myszy Nf-1^{+/-} i p53^{+/-} w zależności od szczepów różnią się wrażliwością na rozwój nowotworów mózgu [37].

Mysie modele egzokrynych i endokrynych nowotworów trzustki rozwijające się u myszy GEM [16,22]

W literaturze wymieniane są modele naśladujące egzokryne nowotwory trzustki u człowieka, głównie przewodowego gruczolakoraka (ductal adenocarcinoma) i nowotwory endokryne rozwijające się z komórek wysepek Langerhansa (np. insulinoma).

Największym problemem w otrzymaniu myszy GEM jako modelu nowotworów egzokrynych trzustki okazał się brak promotora swoistego dla komórek trzustki. Znanym modelem tego typu nowotworu są myszy transgeniczne El-1Tag, uzyskane z użyciem promotora El-1 (elastase-1 promoter).

Endokryne nowotwory trzustki powstające u myszy są histologicznie podobne do analogicznych nowotworów rozwijających się u człowieka. Najczęściej wymienianym w literaturze modelem są myszy transgeniczne, które otrzymano z użyciem wirusa SV40 (onkogen simian virus 40), powiązanego z promotorem genu insuliny.

Mysie modele nowotworów gruczołu krokowego rozwijające się u myszy GEM [8,39]

Anatomia prostaty u myszy, podobnie jak w wypadku gruczołu mlekowego, różni się od anatomii tego narządu u człowieka. U mężczyzny prostata jest umieszczona w tkance mięśniowej z luźno ułożoną otoczką, u myszy zraziki prostaty są rozsiane w tkance mięśniowej. W wielu modelach myszy GEM rozwijają się nowotwory lub złośliwe rozrosty. U niektórych modeli GEM mimo szybkiego rozrostu *in situ* nie dochodzi do rozwoju progresywnego nowotworu. Powszechnie stosowanym w badaniach modelem nowotworu prostaty są myszy GEM C3(I), będące również modelem nowotworu gruczołu mlekowego. Inne często wymieniane w literaturze modele nowotworu prostaty u myszy GEM to TRAMP i LADY [8]. U myszy TRAMP nowotworowy rozrost szybko przechodzi w stadium inwazyjne. W modelu LADY natomiast, rozrost nowotworowy długo jest ograniczony do stadium *in situ* i charakteryzuje się późną transformacją do nowotworu złośliwego, rzadko też daje przerzuty.

Mysie modele nowotworów szyjki macicy rozwijające się u myszy GEM [8]

W literaturze wymieniany jest jeden model GEM nowotworu szyjki macicy. Są to myszy transgeniczne K14.HPV16, u których region HPV znalazł się pod kontrolą promotora, którym jest ludzka keratyna-14 (human keratin-14). Myszy te muszą jednak być karmione dużymi dawkami estradiolu aby nowotwór rozwinął się u nich ze stadium dysplazji, poprzez carcinoma *in situ*, do stadium raka inwazyjnego.

Mysie modele nowotworów skóry rozwijające się u myszy GEM [9]

Myszy transgeniczne uzyskane jako modele nowotworów skóry wykazują zwykle predyspozycje do rozwoju tego typu nowotworów, ale powstanie nowotworu wymaga jeszcze dodatkowej indukcji chemicznej lub promieniami UV. Najwięcej badań nad tworzeniem nowych modeli myszy GEM dotyczy dwóch nowotworów; czerniaka (melanoma) i raka kolczystokomórkowego skóry (squamous cell carcinoma, łac. carcinoma spinocellulare).

Mysie modele chłoniaków rozwijające się u myszy GEM [2,30]

Chłoniaki niejednokrotnie nie były bezpośrednim celem, dla którego tworzono modele myszy GEM. Wystąpiły w tych modelach niejako dodatkowo, bowiem u myszy często dochodzi do rozwoju spontanicznych chłoniaków.

W przypadku tworzenia modeli chłoniaków u myszy GEM bardzo ważne jest zatem porównanie i określenie typu (T lub B) i podtypu chłoniaka występującego u myszy szczepu tła. Modele GEM chłoniaków pozwalają na określenie modulującego wpływu szczepu tła. Dotyczy to zwłaszcza modeli GEM, gdzie szczepem tła są myszy ze szczepów wsobnych SJL, BALB/c i w mniejszym stopniu C57BL/6. Modele GEM poszerzają zakres chłoniaków rozwijających się spontanicznie np. o chłoniaki z komórek NK (T natural killer cell lymphoma) rozwijające się spontanicznie jedynie u myszy transgenicznych IL-15 [30]. Do badań nad chłoniakami używane są myszy GEM mające transgeny *c-myc*, *Abl*, *N-ras*, *Bcl-2*; ponadto na modelach chłoniaków u myszy GEM badane są szlaki sygnałowe apoptozy nie związane z rodziną białek *Bcl-2*. [2].

Mysie modele nowotworów wątroby rozwijające się u myszy GEM [31]

Nowotwory wątroby rozwijające się spontanicznie i indukowane chemicznie wykazują u myszy duże podobieństwo do nowotworów wątroby powstających u człowieka, choć różnią się wywołującymi je czynnikami. Dotychczas prowadzone badania nie wyjaśniają jednak molekularnej patogeny nowotworów wątroby. Nowe szanse stwarzają myszy transgeniczne używane jako modele do badań nad karcynogenezą komórek wątroby, wykazujące nadekspresję genów *Myc*, *Tgfa*, *E2f1* i *H-ras1*. Otrzymano również modele myszy knock-out, które znalazły zastosowanie w badaniach nad wpływem wyselekcjonowanych genów supresorowych na karcynogenezę komórek wątrobowych.

ZAKOŃCZENIE

Onkologia wkroczyła w erę celowanych terapii przeciwnowotworowych i zastosowania badań translacyjnych. Powoduje to coraz częściej konieczność odwołania się do nowych modeli nowotworów rozwijających się u myszy. Myszy zmodyfikowane genetycznie mogą teoretycznie dostarczyć nieograniczoną liczbę modeli, które znajdą szerokie zastosowanie w badaniach nad nowotworami z zastosowaniem technik genetyki molekularnej. Korzystanie z istniejących już licznych i wzajemnie komplementarnych modeli nowotworów u myszy GEM oraz tworzenie nowych modeli, pozwoli na testowanie terapii przeciwnowotworowych i stworzy możliwość wprowadzenia tych wyników badań do kliniki.

PODZIĘKOWANIE

Autorka dziękuje za krytyczne przejście tekstu dr hab. Elżbiecie Wirth-Dzięciołowskiej.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abate-Shen C.: A new generation of mouse models of cancer for translational research. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 5274–5276
- [2] Adams J.M., Harris A.W., Strasser A., Adams J.M., Ogilvy S., Cory S.: Transgenic models of lymphoid neoplasia and development of a pan-hematopoietic vector. *Oncogene*, 1999; 18: 5268–5277
- [3] Balmain A.: Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models. *Review. Cell*, 2002; 108: 145–152
- [4] Balmain A., Harris C.C.: Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 371–377
- [5] Becher O.J., Holland E.C.: Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer Res.*, 2006; 66: 3355–3358
- [6] Bishop J.: *Transgenic Mammals*. Longman, Harlow 1999
- [7] Borowsky A.D.: Mammary pathology of the genetically engineered mouse. *Breast Cancer Res.*, 2003; 5(Suppl 1): 11. <http://breast-cancer-research.com/content/5/S1/11> (17.02.2007)
- [8] Borowsky A.D., Galvez J.J., Munn R.J., Cardiff R.D.: Comparative pathology of mouse models of human cancers. *Comp. Med.*, 2003; 53: 248–258



- [9] Borowsky A.D., Munn R.J., Galvez J.J., Cardiff R.D., Ward J.M., Morse H.C. III, Kogan S.C., Aldape K.D., Louis D.N., Bosenberg M.W.: Mouse models of human cancers (part 3). *Comp. Med.*, 2004; 54: 258–270
- [10] Cardiff R.: Oncogenes, progression and biomarkers. http://www.cbcrp.org/RESEARCH/PageGrant.asp?grant_id=1579 (17.02.2007)
- [11] Cardiff R.D., Anver M.R., Gusterson B.A., Hennighausen L., Jensen R.A., Merino M.J., Rehm S., Russo J., Tavassoli F.A., Wakefield L.M., Ward J.M., Green J.E.: The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene*, 2000; 21: 968–988
- [12] Cardiff R.D., Bern H.A., Faulkin L.J., Daniel C.W., Smith G.H., Young L.J., Medina D., Gardner M.B., Wellings S.R., Shyamala G., Guzman R.C., Rajkumar L., Yang J., Thordarson G., Nandi S., MacLeod C.L., Oshima R.G., Man A.K., Sawai E.T., Gregg J.P., Cheung A.T., Lau D.H.: Contributions of mouse biology to breast cancer research. *Comp. Med.*, 2002; 52: 12–31
- [13] Carver B.S., Pandolfi P.P.: Mouse modeling in oncologic preclinical and translational research. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 5305–5311
- [14] Degenhardt K., White E.: A mouse model system to genetically dissect the molecular mechanisms regulating tumorigenesis. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 5296–5304
- [15] Fomchenko E.I., Holland E.C.: Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 5288–5297
- [16] Galvez J.J., Cardiff R.D., Munn R.J., Borowsky A.D.: Mouse models of human cancers (Part 2). *Comp. Med.*, 2004; 54: 13–15
- [17] Gastrointestinal cancer models. The Gastrointestinal Cancer Organ Site Committee. Daston M. (edit.) http://emice.nci.nih.gov/emice/mouse_models/organ_models/gastro_models (18.02.2007)
- [18] Gutmann D.H., Hunter-Schaedle K., Shannon K.M.: Harnessing preclinical mouse models to inform human clinical cancer trials. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 847–852
- [19] Gutmann D.H., Maher E.A., Van Dyke T.: Mouse models of human cancers consortium workshop on nervous system tumors. *Cancer Res.*, 2006; 66: 10–13
- [20] Hazelton Bailey D., Connolly D.C., Vanderhyden B., Garson K., Hamilton T.C.: Ovarian cancer models. http://emice.nci.nih.gov/emice/mouse_models/organ_models/ovarian_models (24.02.2007)
- [21] Hennighausen L.: Mouse models for breast cancer. *Oncogene*, 2000; 19: 966–967
- [22] Hruban R.H., Adsay N.V., Albores-Saavedra J., Anver M.R., Biankin A.V., Boivin G.P., Furth E.E., Furukawa T., Klein A., Klimstra D.S., Klöppel G., Lauwers G.Y., Longnecker D.S., Lüttes J., Maitra A., Offerhaus G.J.A., Pérez-Gallego L., Redston M., Tuveson D.A.: Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: Consensus report and recommendations. *Cancer Res.*, 2006; 66: 95–106
- [23] Huh J.I., Calvo A., Stafford J., Cheung M., Kumar R., Philp D., Kleinman H.K., Green J.E.: Inhibition of VEGF receptors significantly impairs mammary cancer growth in C3(1)/Tag transgenic mice through antiangiogenic and non-antiangiogenic mechanisms. *Oncogene*, 2005; 24: 790–800
- [24] Kohl N.E., Omer C.A., Conner M.W., Anthony N.J., Davide J.P., Desolms S.J., Giuliani E.A., Gomez R.P., Graham S.L., Hamilton K., Handt L.K., Hartman G.D., Koblan K.S., Kral A.M., Miller P.J., Mosser S.D., O'Neill T.J., Rands E., Schaber M.D., Gibbs J.B., Oliff A.: Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nat. Med.*, 1995; 1: 792–797
- [25] Lee J.S., Grisham J.W., Thorgeirsson S.S.: Comparative functional genomics for identifying models of human cancer. *Carcinogenesis*, 2005; 26: 1013–1020
- [26] Li Y., Hively W.P., Varmus H.E.: Use of MMTV-Wnt-1 transgenic mice for studying the genetic basis of breast cancer. *Oncogene*, 2000; 21: 1002–1009
- [27] Lobell R.B., Omer C.A., Abrams M.T., Bhimnathwala H.G., Brucker M.J., Buser C.A., Davide J.P., deSolms S.J., Dinsmore C.J., Ellis-Hutchings M.S., Kral A.M., Liu D., Lumma W.C., Machotka S.V., Rands E., Williams T.M., Graham S.L., Hartman G.D., Oliff A.I., Heimbrook D.C., Kohl N.E.: Evaluation of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase inhibitor combinations in preclinical models. *Cancer Res.*, 2001; 61: 8758–8768
- [28] Maglione J.E., McGoldrick E.T., Young L.J., Namba R., Gregg J.P., Liu L., Moghanaki D., Ellies L.G., Borowsky A.D., Cardiff R.D., MacLeod C.L.: Polyomavirus middle T-induced mammary intraepithelial neoplasia outgrowths: Single origin, divergent evolution, and multiple outcomes. *Mol. Cancer Ther.*, 2004; 3: 941–953
- [29] Mahgoub N., Taylor B.R., Gratiot M.: *In vitro* and *in vivo* effects of a farnesyltransferase inhibitor on nf1-deficient hematopoietic cells. *Blood*, 1999; 94: 2469–2476
- [30] Morse H.C. III, Anver M.R., Fredrickson T.N., Haines D.C., Harris A.W., Harris N.L., Jaffe E.S., Kogan S.C., MacLennan I.C., Pattengale P.K., Ward J.M.: Hematopathology subcommittee of the Mouse Models of Human Cancers Consortium: Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice. *Blood*, 2002; 100: 246–258
- [31] Nakau M., Miyoshi H., Seldin M.F., Imamura M., Oshima M., Taketo M.M.: Hepatocellular carcinoma caused by loss of heterozygosity in Lkb1 gene knockout mice. *Cancer Res.*, 2002; 62: 4549–4553
- [32] Nikitin A.Y., Alcaraz A., Anver M.R., Bronson R.T., Cardiff R.D., Dixon D., Fraire A.E., Gabrielson E.W., Gunning W.T., Haines D.C., Kaufman M.H., Linnoila R.I., Maronpot R.R., Rabson A.S., Reddick R.L., Rehm S., Rozengurt N., Schuller H.M., Shmidt E.N., Travis W.D., Ward J.M., Jacks T.: Classification of proliferative pulmonary lesions of the mouse. Recommendations of the Mouse Models of Human Cancers Consortium. *Cancer Res.*, 2004; 64: 2307–2316
- [33] Olive K.P., Tuveson D.A.: The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 5277–5287
- [34] Olle D.: Mouse models in cancer research. http://www.suite101.com/article.cfm/new_cancer_treatments/118883 (19.01.2007)
- [35] Omer C.A., Chen Z., Diehl R.E., Conner M.W., Chen H.Y., Trumbauer M.E., Gopal-Truter S., Seeburger G., Bhimnathwala H., Abrams M.T., Davide J.P., Ellis M.S., Gibbs J.B., Greenberg I., Koblan K.S., Kral A.M., Liu D., Lobell R.B., Miller P.J., Mosser S.D., O'Neill T.J., Rands E., Schaber M.D., Senderak E.T., Oliff A., Kohl N.E.: Mouse mammary tumor virus-Ki-rasB transgenic mice develop mammary carcinomas that can be growth-inhibited by a farnesyl: protein transferase inhibitor. *Cancer Res.*, 2000; 60: 2680–2688
- [36] Pattengale P.K., Taylor C.R.: Experimental models of lymphoproliferative disease. The mouse as a model for human non-Hodgkin's lymphomas and related leukemias. *Am. J. Pathol.* 1983; 113: 237–265
- [37] Reilly K.M., Tuskan R.G., Christy E., Loisel D.A., Ledger J., Bronson R.T., Smith C.D., Tsang S., Munroe D.J., Jacks T.: Susceptibility to astrocytoma in mice mutant for Nf1 and Trp53 is linked to chromosome 11 and subject to epigenetic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 31: 13008–13013
- [38] Schuh J.C.: Trials, tribulations, and trends in tumor modeling in mice. *Toxicol. Pathol.*, 2004; 32(Suppl.1): 53–66
- [39] Shappell S.B., Thomas G.V., Roberts R.L., Herbert R., Ittmann M.M., Rubin M.A., Humphrey P.A., Sundberg J.P., Rozengurt N., Barrios R., Ward J.M., Cardiff R.D.: Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor Meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res.*, 2004; 64: 2270–2305
- [40] Singh M., Johnson L.: Using genetically engineered mouse models of cancer to aid drug development: an industry perspective. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 5312–5328
- [41] Soares C.R., Shibata M.A., Green J.E., Jorcyk C.L.: Development of PIN and prostate adenocarcinoma cell lines: a model system for multistage tumor progression. *Neoplasia*, 2002; 4: 112–120
- [42] Taketo M.M.: Wnt signaling and gastrointestinal tumorigenesis in mouse models. *Oncogene*, 2006; 25: 7522–7530
- [43] Van Dyke T., Jacks T.: Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell*, 2002; 108: 135–144
- [44] Van Huizen I., Wu G., Moussa M., Chin J.L., Fenster A., Laceyfield J.C., Sakai H., Greenberg N.M., Xuan J.W.: Establishment of a serum tumor marker for preclinical trials of mouse prostate cancer models. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 7911–7919