

AKTIVITA TELOMERAZY VE TKANI BENIGNICH A MALIGNICH NADORU PRSU

TELOMERASE ACTIVITY IN BENIGN AND MALIGNANT BREAST TUMORS

ŠIMIEKOVÁ M., *PEČEN L., NEKULOVA M., VAGUNDOVA M., VERMOUSEK I., VALIK D., VONDRAEEK V., PAEOVSKÝ Z., ČERNOCH M.

MASARYKUV ONKOLOGICKÝ USTAV BRNO
*USTAV INFORMATIKY AV ČR PRAHA

Souhrn: Východiska: Zkracování telomer (specifických struktur na koncích chromozomů) na určitou délku může dát buňce signál k zastavení dělení s následnou buněčnou smrtí. Ribonukleoproteinový enzym telomeraza je klíčová složka, která je schopna udržet délku telomer a tím zaručit buňkám nesmrtnost. Cílem naší práce je zhodnotit kvantitativní metodu stanovení aktivity telomerázy (TeloTAAG Telomerase PCR-ELISA) pro odlišení benigní a maligní tkáně prsu a korelovat výsledky s tradičními prognostickými indikátory a vývojem onemocnění. Metody, výsledky: Telomeraza byla vyšetřena ve tkáních 27 fibrocystických a dysplastických lézí, 27 fibroadenomů a fylloidních nádorů a 154 karcinomů. Relativní aktivita telomerázy se v těchto tkáních významně lišila, nejvyšší aktivita byla nalezena ve tkáni karcinomů. Senzitivita tohoto stanovení u maligních mamárních nádorů je 73 % při 93 % specifitě u skupiny benigních mamárních nádorů. Ukazuje se, že telomeraza je prognostickým faktorem nezávislým na klasických prognostických faktorech pT, pN, ER a PR, protože jsme nenalezli významné korelace mezi aktivitou telomerázy a velikostí nádoru, postižením mízních uzlin a koncentrací steroidních receptorů. Vyšší aktivitu telomerázy vykazují nádory více dediferencované a nádory nemocných, u nichž ve sledovaném období došlo k progresi onemocnění. Závěr: Metoda kvantitativní analýzy aktivity telomerázy je vhodná k odlišení maligního charakteru z minimálního vzorku tkáně mléčné žlázy. Vyšší aktivita telomerázy je asociována s agresivnějším fenotypem nádoru.

Klíčová slova: telomeraza, kvantitativní analýza, karcinom prsu, benigní tkáň prsu, korelace s klinicko-patologickými údaji

Summary: Backgrounds: Shortening of telomeres (specialized structures at the ends of chromosomes) beyond a certain length may signal a cell to stop division and to enter cell death. A ribonucleoprotein enzyme, telomerase, is a key component in maintaining telomere length and is responsible for continuous cell growth. The aim of our work was to measure the levels of telomerase expression in primary breast cancers and benign breast lesions by means of a quantitative method (Telo TAAG Telomerase PCR ELISA) and correlate telomerase activities with traditional prognostic indicators and disease outcome. Methods, results: We analyzed telomerase activity in fibrocystic and dysplastic tissues (N= 27), fibroadenomas and phylloid tumors (N= 27) and breast carcinomas (N=154). Relative telomerase activity differed significantly in these tissues. The highest activity was found in breast cancer. Clinical sensitivity of telomerase activity determination for malignant tissues was 73% at 93% specificity in comparison with benign mammary tumors. The telomerase activity seems to be an independent prognostic factor in relation to pT, pN, ER, PR, because tumor size, positive axillary lymph nodes, and steroid receptor levels did not correlate with telomerase activity. The trend of higher telomerase is characteristic for less differentiated tumors and tumors of patients with disease progression. Conclusions: Quantitative determination of telomerase activity is useful for distinguishing benign and malignant tissue in minimal specimens of tumors. The higher activity is associated with more aggressive malignant phenotype.

Key words: telomerase, quantitative analysis, benign and malignant tumors, correlation with clinical and pathological data

Úvod

Stárnutí somatických buněk je způsobeno postupným zkracováním specifických zakončení chromozomů – telomer - při každém mitotickém dělení. Při určité minimální délce telomer se buňka už dále nedělí a umírá. Nádorové a zárodečné buňky nemají tento replikační limit díky ribonukleoproteinu telomeráze. Tento enzym – reverzní transkriptáza - je schopen udržovat telomery v dostatečné délce přidávkem druhově specifických sekvencí DNA (pro lidské telomery je to sled bází TTAGGG). Tím zajišťuje telomeraza nádorovým a zárodečným buňkám nesmrtnost (1-3).

Bylo prokázáno, že telomeraza je exprimována až v 90 % lidských nádorů, zatímco v normálních somatických buňkách je obvykle nedetekovatelná (4). Telomeraza se tedy zdá být nadějná jako obecný marker malignity, jehož vyšetření lze provádět z neinvazivních odběrů např. v buňkách získaných

výplachem tělních dutin, v buňkách uvolněných do moče, eventuálně v odběrech s limitovaným množstvím tkáně. Dosavadní postupy stanovení aktivity telomerázy užívají totiž PCR amplifikaci telomerázového produktu, metoda tedy vyžaduje minimální množství vzorku (5). Vývoj detekce amplifikovaného produktu vedl od metod původně kvalitativních k metodám kvantifikace aktivity telomerázy. Při těchto postupech se však v určitém procentu nádorových vzorků vyskytuje negativní interference inhibitorů Taq polymerázy při PCR (6). **Cílem naší práce** bylo vyšetřit aktivitu telomerázy za užití kvantitativní metody jejího stanovení v extraktech benigní a maligní tkáně prsu a získané výsledky zhodnotit ve vztahu k dostupným klinicko-patologickým údajům.

Pacienti, metody

V období 1998 – 2000 jsme vyšetřili průběžně tkáň nádorů

prsu operovaných v našem ústavu, a to 27 fibrocystických a dysplastických lézí, 22 fibroadenomů a benigních fyloidních nádorů a 101 karcinomů prsu. Retrospektivně bylo analyzováno 53 karcinomů a 5 fibroadenomů a fyloidních nádorů, jejichž tkáň byly uloženy od operace v r.1990-1995 při -80°C . V souboru karcinomů prsu bylo 51 % invazivních duktálních karcinomů, 16 % lobulárních karcinomů a 33 % nádorů jiného typu. Patomorfologická charakterizace nádorů byla provedena dle WHO kritérií. Nemocné byly léčeny a sledovány v našem ústavu podle standardních postupů.

Telomeráza byla vyšetřována metodou TeloTAAG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} (Roche) (5). Uvedená kvantitativní ELISA srovnává výsledný signál (=fotometricky měřenou absorbancí) produktu po působení telomerázy amplifikovaného polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) se signálem získaným amplifikací vnitřního standardu v přítomnosti nádorového extraktu. Dojde-li k výraznému snížení absorbance obou alikvótů reakcí, je to důkazem přítomnosti inhibitoru v extraktu nádoru a výsledek je nehodnotitelný. V celkovém počtu vyšetřených vzorků jsme pozorovali inhibici této reakce jen u vzorků karcinomu, a to v 6 ze celkového počtu 154 vyšetřených (tj. asi ve 4 % případů). Tyto vzorky nelze použitou metodikou analyzovat a byly ze souboru vyloučeny. Analytická charakteristika metody (7) odpovídá komplexnosti postupu molekulárně-biologických technik.

Relativní telomerázová aktivita (RTA) byla přepočtena na aktivitu standardního materiálu s definovanou koncentrací syntetického telomerázového produktu (7) a normalizována na jednotnou optimální koncentraci bílkoviny ve vzorku. Bílkovina v extraktu tkáň byla stanovena Bradfordovým činidlem v přítomnosti extrakčního pufru (8).

Stanovení steroidních receptorů bylo prováděno do roku 1998 ligand-saturační analýzou (9), diskriminační hranice byla 10 fmol/mg proteinu. Od r. 1999 používáme ELISA techniku (ER, PgR EIA Monoclonal, ABBOTT), cut-off je 15 fmol/mg proteinu.

Vzhledem k negaussovskému rozložení hodnot aktivity telomerázy byl na porovnání mezi různými skupinami dat použit neparametrický nepárový Wilcoxonův test. Analýza homogenity souborů vyšetřených bezprostředně i po delší době úschovy tkáň byla provedena také dalšími neparametrickými testy (viz tab.1). Korelace mezi aktivitou telomerázy a dalšími parametry byla hodnocena pomocí Spearmanova pořadového korelačního koeficientu. Diskriminační hranice mezi benigními a maligními nádory byla stanovena jako 90 % kvantil aktivity telomerázy ve skupině benigních fyloidních nádorů a fibroadenomů. Pravděpodobnost bezpříznakového přežití byla stanovena metodou dle Kaplan-Meiera, porovnání funkcí přežití bylo provedeno Wilcoxonovým testem. Pro statistickou analýzu dat jsme použili program S.A.S (S.A.S. Corp., verze 6.12 Carry USA).

Výsledky

Srovnáním aktivity telomerázy ve skupině invazivních duktálních karcinomů, odebraných v letech 1990-1995 a 1998-2000 jsme ověřili, že neexistuje signifikantní diference mezi oběma skupinami (tab.1). Pro další analýzu byly proto oba soubory sloučeny.

Tab.1. Srovnání aktivity telomerázy v invazivních duktálních karcinomech prsu vyšetřených retrospektivně a prospektivně

SOUBOR	N	RTA ^a			p ^d
		MEDIAN	Q1 ^b	Q3 ^c	
1990-1995	33	1,199	0,470	2,380	NS
1998-2000	46	1,327	0,716	2,005	

^a RTA: relativní aktivita telomerázy, ^b dolní kvartil (25 % kvantil), ^c horní kvartil (75 % kvantil), ^d pro hodnocení signifikance užity testy: Wilcoxon, mediánový, Kruskal-Wallis, Van der Waerden, Kolgomorov-Smirnov, Cramer-von Mises a Kniper

Tab. 2. Srovnání aktivity telomerázy v benigní a maligní tkáni prsu

TKAO	N	RTA ^a			p ^d
		MEDIAN	Q1 ^b	Q3 ^c	
Fibrocystické a dysplastické léze	27	0,007	0,000	0,075	0,0001
Fibroadenomy, fyloidní nádory	27	0,050	0,005	0,233	
Karcinomy	154	1,148	0,420	2,320	

a,b,c, viz tab.1, ^d signifikace dle Wilcoxonova testu

Tab. 3. Aktivita telomerázy ve vztahu ke stupni diferenciace karcinomů prsu

GRADING	N	RTA ^a			p ^d
		MEDIAN	Q1 ^b	Q3 ^c	
1 + 2	42	1,155	0,410	1,901	0,0316
3	35	1,769	0,810	2,457	

a,b,c,d viz tab.2

Tab. 4. Relativní telomerázová aktivita v nádorech dvou skupin nemocných ve vztahu k progresi onemocnění

PŘEŽITI	N	RTA ^a			p ^d
		MEDIAN	Q1 ^b	Q3 ^c	
bez progresie	32	0,805	0,278	2,335	NS
s progresí	20	1,454	0,376	2,288	

a,b,c,d : viz tab.2.

Tab.5. Hladiny steroidních receptorů v karcinomech prsu stanovených v našem souboru metodou ligand-vazebné analýzy (1990-1998) a ELISA technikou (1999-2000)

ANALÝZA	N	ER		PR		p ^a
		Medián	>cut-off	Medián	>cut-off	
ligand-vazebná metoda	76	11,7	53 %	7,01	41 %	0,0001
ELISA	78	43,3	64 %	35,2	60 %	

^a signifikance dle Wilcoxonova testu

Dysplastická tkáň prsu vykazuje aktivitu telomerázy na hranici detekčního limitu (tab.2). Telomerázová aktivita fibroadenomů a fyloidních tumorů je výrazně vyšší, nejvyšší aktivita byla zjištěna pro skupinu karcinomů. Wilcoxonův test prokazuje vysokou signifikanci rozdílu rozložení hodnot (tab.2, $p < 0.0001$). Diskriminační hranici mezi maligní a benigní tkání jsme stanovili jako 90 % kvantil aktivity telomerázy benigních fyloidních nádorů (RTA = 0.459). Za těchto podmínek dosahuje klinická senzitivita telomerázy pro karcinomy 73 % při specifitě 93 %, vztaženo na skupinu nemaligních tumorů. Skutečně nulovou hodnotu RTA jsme našli pouze ve 3 % maligních nádorů.

Mezi jednotlivými histologickými podtypy karcinomů jsme nezjistili signifikantní diferenci, RTA byla nevýrazně vyšší ve skupině invazivních duktálních karcinomů. Senzitivita stanovení se však lišila – pro duktální karcinomy dosahovala 79 %, pro lobulární 72 % a ostatní nádory 65 %. Průměrná aktivita telomerázy ve 3 karcinomech in situ (2 lobulární, 1 duktální) se pohybovala na hranici cut-off. Přibližně 13 % nádorů z našeho souboru (především vyšetřeno v letech 1998-2000) bylo bi- nebo multifokálního typu. RTA souboru monofokálních nádorů se nelišila od skupiny nádorů s více ložisky v jednom prsu. V nejpočetnější histologické podskupině

invazivních duktálních karcinomů jsme zhodnotili *RTA ve vztahu k diferenciacímu stupni* (tab. 3). Aktivita telomerázy vykazuje trend zvýšených hodnot s rostoucí dediferenciací nádoru. *Homogenita stanovení telomerázy* v individuálním nádoru byla ověřena opakovaným stanovením z jednoho řezu (variační koeficient se pohyboval do 30 %). Telomeráza v invazivním duktálním karcinomu T3 stanovená ve třech různých řezech vykazovala větší variační koeficient - 71 %. Tato vysoká variabilita odpovídá morfologické charakterizaci hodnocené v těsném sousedství odběru tkáně pro telomerázu a koreluje s obsahem nádorových buněk v preparátu. Podíl nádorových buněk (asi 80, 20 a 25 %) v těchto různých odběrech koreloval s aktivitou telomerázy (odpovídající RTA byla 2,630; 0,716 a 0,901).

Progresi onemocnění ve vztahu k RTA jsme hodnotili pouze v retrospektivní části souboru (tab.4). I když je ve skupině nemocných s progresí aktivita telomerázy vyšší, nedosahuje signifikantních hodnot. Významnost tohoto rozdílu bude zhodnocena ve větším souboru nemocných.

Ve skupině karcinomů prsu jsme neprokázali vzájemnou korelaci mezi *hladinou RTA a velikostí nádoru, postižením mléčných uzlin a oběma receptory steroidních hormonů*. Trend nepřímé asociace telomerázy a ER a PR byl nalezen pro skupinu nádorů vyšetřených v prospektivní části studie. Stanovení receptorů provedených v tomto období bylo provedeno ELISA technikou, výsledky tohoto stanovení se signifikantně liší od stanovení ligand-vazebnou metodou jak vlastní velikostí hladin obou receptorů, tak i procentem pozitivních nádorů (tab.5). Statisticky významných hladin dosahuje nepřímá korelace RTA s bezpříznakovým přežitím ($r_s = -0,5068$, $p < 0,0226$, $N = 20$), tentýž (statisticky neprůkazný) trend sleduje i celkové přežití ($N = 15$).

Diskuse

Expres telomerázy v přibližně 90 % maligních nádorů staví metodu jejího stanovení do popředí zájmu nejen pro možnosti diagnostiky, ale i terapie nádorů (10). S využitím PCR-amplifikace produktu telomerázové může být nyní tento ribonukleoprotein detekován s vysokou citlivostí, i když jeho hladina ve tkáni je velice nízká. Dřívější metody umožňovaly pouze kvalitativní testování aktivity telomerázy, a to za užití autoradiografie s detekcí radioaktivně značeného produktu. Kvantitativní stanovení *TeloTAAG PCR ELISA* má proti těmto metodám především přednost postupu bez radioaktivního značení vzorku. Společná amplifikace a následná specifická hybridizace vnitřního standardu v přítomnosti extraktu vzorku může upozornit na interferující látky v nádorovém extraktu, vedoucí k falešně negativním výsledům (6). I když má tato metoda svoje omezení (nízké procento vzorků nelze stanovit vzhledem k interferenci vzorku s amplifikační PCR reakcí), umožňuje kvantitativní vyšetření s reprodukovatelností odpovídající několikastupňové analýze (7). Stabilita telomerázy po dobu minimálně 10 let byla potvrzena i v dalších studiích, které byly prováděny na souborech nádorů uložených v nádorové bance (11,12).

V našem souboru bylo zpracováno celkem 208 vzorků. Falešná negativita vlivem interference při PCR byla prokázána ve 4 % případů. Ve skupině karcinomů bylo nalezeno 27 % nádorů, jejichž aktivita telomerázy se pohybovala pod naší určenou diskriminační hranicí maligních a benigních hodnot. Naopak, 7 % případů benigních fyloidních nádorů nebo dysplastických tkání především odebraných v sousedství karcinomu vykazovalo vyšší aktivitu než byla určená cut-off. Tyto zvýšené hodnoty se však obvykle pohybovaly těsně nad diskriminační hranicí. Výsledky hodnocení našeho souboru mammárních nádorů odpovídají dosud publikovaným závěrům studií užívajících jiné kvalitativní metody průkazu telomerázy (11-18).

Příčina nízké nebo nulové aktivity telomerázy v určitém podílu nádorů prsu (5 – 20 %) je dosud neobjasněna. Jedna z možných

vysvětlení je heterogenita nádoru nebo degradace telomerázy ve vzorku. Bylo ověřeno, že při užití korekce měřené aktivity na nádorovou celularitu bylo nalezeno asi 1 % případů, kde v analyzovaném vzorku nebyla rRNA jako míra buněčnosti prokázána (11). Zjištěná heterogenita stanovení telomerázy v objemném nádoru odpovídá výsledkům vyšetření mnoha dalších parametrů, např. steroidních receptorů. Ve srovnání s vyšetřením na řezu tkáně se může jevit za určitých okolností analýza extraktu většího množství nádorového vzorku výhodou – charakterizuje spíše reprezentativní vzorek nádoru. Pečlivá histologická konfirmace nádoru a mikrodisekce pro analýzu aktivity telomerázy však mohou snížit negativitu maligních nádorů na 5 % (14).

Přes intenzivní studie zabývající se mechanismem ovlivnění exprese katalytické subjednotky telomerázy (hTERT), která je limitující determinantou telomerázové aktivity, není dosud jasné, zda některé maligní tumory nemohou mít skutečně její expresi blokovánou. Příčinou této inhibice by mohla být buď nepřítomnost pozitivně působících transkripčních faktorů, nebo naopak přítomnost aktivních represorů hTERT transkripcie (15).

Vztah telomerázy k histologickému podtypu nádoru nebyl jednoznačně prokázán, i když trend vyšších hodnot u invazivního duktálního karcinomu byl, podobně jako v našem souboru, nalezen (12). Telomeráza nevykazovala podle dřívějších studií provedených buď kvalitativní nebo semikvantitativní metodou korelaci s velikostí nádoru, postižením axilárních mízních uzlin a stupněm diferenciacie nádoru (11,16,17), i když přímý vztah ke gradingu byl také prokázán (12). V našem souboru jsme zvýšené hodnoty aktivity telomerázy s rostoucím stupněm dediferenciacie našli.

Nízká, spíše nulová aktivita telomerázy v benigních postiženích mléčné žlázy byla již dříve v malém procentu případů dokumentována (18,19). Užitou metodou jsme ověřili, že v mléčné žláze s dysplastickými změnami vyazuje telomeráza obvykle aktivitu na úrovni detekčního limitu použité metody. Přítomnost aktivní telomerázy v malém podílu vzorků koreluje pravděpodobně s přítomností drobných oblastí proliferace, což potvrzuje rovněž nálezy určitého podílu buněk této tkáně v S-fázi (19), obzvláště u mladých žen. Rovněž mammární kmenové buňky, které se diferencují buď v epiteliální nebo myoepiteliální buňky, mohou působit tuto slabou pozitivitu (19). O něco vyšší hladiny telomerázové aktivity dosahují fibroadenomy a fyloidní nádory, obzvláště maligního typu (18,20,21). Karcinomy in situ jsou poměrně často pozitivní (22).

Nedávno byly publikovány nové poznatky o vlivu estrogenu a progesteronu na regulaci telomerázy v cílové tkáni. Oba hormony se podílejí na transaktivaci vlastní katalytické podjednotky telomerázy (hTERT) (23,24). In vitro bylo prokázáno, že zatímco estrogen telomerázu aktivuje, dlouhodobý efekt progesteronu působí inhibičně proti estrogen-indukované aktivaci hTERT exprese (23,24). Ve tkáni primárních karcinomů prsu nebyla obvykle korelace telomerázy s ER a PR prokázána (16,25,26). V našem souboru jsme sice našli mezi těmito parametry (za užití ELISA techniky stanovení steroidních hormonů) náznak nepřímé korelace, podobně jako další autoři za užití ligand-vazebné analýzy (11). V obou souborech však nebyl vztah těchto parametrů statisticky výrazný. Vzájemné vztahy mezi mechanismy exprese steroidních receptorů a aktivitou telomerázy in vivo systémech je třeba ověřit na větších souborech.

Práce hodnotící prognostický význam telomerázy nejsou uzavřeny, je však zřejmé, že její vyšší aktivita koreluje s horší prognózou (11, 12), jak také naznačuje náš soubor nemocných. Přes určité omezení (PCR inhibice v malém procentu vzorků) je metoda kvantitativního stanovení aktivity telomerázy vhodná pro průkaz maligního fenotypu tkáně mléčné žlázy. Přestože je výsledný projev telomerázy ovlivněn dalšími ne přesně prostudovanými faktory (k nim patří délka telomer,

regulační proteiny, vlastní exprese katalytické podjednotky hTERT apod.), jeví se užití tohoto enzymu v některých oblastech onkologie významné. Vhodnost testování telomerázy v materiálu získaném odběrem tenkou jehlou v případech suspektního karcinomu prsu byla potvrzena mnoha studiemi (15,27-29). Význam využití stanovení telomerázy či jejích složek pro hodnocení minimálních či neinvazivních odběrů, při stanovení chemoresistence nádorů (30), při monitorování aktivity v séru (31) a při užití anti-telomerázové terapie bude pravděpodobně zhodnocen v blízké budoucnosti. Na modelu kvasinek byly nedávno popsány alternativní cesty udržování délky telomer (ALT) nezávislé na aktivitě telomerázy,

v nichž hraje roli jejich rekombinace. Přestože v procesu zachování délky telomer je v lidském nádorovém materiálu přisuzována dominantní role telomeráze (32), průběžně je studován i význam těchto i dalších mechanismů (33).

Poděkování. Autoři děkují paní L. Andřlové a H. Kvapilové za pečlivou technickou pomoc, a dalším pracovníkům MOU, především oddělení patologie a chirurgie, za poskytnutí definovaného klinického materiálu.

Práce byla provedena s podporou grantu MZ ČR M/17-3 a výzkumného záměru MZ 00020980501.

Literatura

1. Shay J. W., Wright W.: Telomerase activity in human cancer. *Current Opinion in Oncol.* 8, 1996, 66-71.
2. Breslow R., Shay J. W., Gazdar A. F., Srivastava S.: Telomerase and early detection of cancer: A National Cancer Institute workshop. *J. Nat. Cancer Inst.* 89, 1997, 618-623.
3. Hayflick L.: The illusion of cell immortality. *Br. J. Cancer* 83, 2000, 841-846.
4. Vasef M. A., Ross J. S., Cohen M. B.: Telomerase activity in human solid tumors. Diagnostic utility and clinical applications. *Am. J. Clin. Pathol.* 112 (Suppl.1), 1999, 68-75.
5. Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L. C., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., Shay J. W.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 1994, 2011-2015.
6. Wu Y. Y., Hruszkewycz A. M., Delgado R. M., Yang A., Vormeyer A. O., Moon Y. W., Weil R. J., Zhuang Z., Remaley A. T.: Limitations on the quantitative determination of telomerase activity by electrophoresis and ELISA based TRAP. *Clin. Chim. Acta* 293, 2000, 199-212.
7. Šimičková M., Pecen L., Nekulová M., Vagundová M., Pačovský Z., Černoch M.: Quantitative determination of telomerase activity in benign and malignant breast tumors. *Neoplasma*, zasláno do tisku.
8. Stoscheck Ch.: Increase uniformity in the response of the Coomassie Blue G protein assay to different proteins. *Anal. Biochem.* 184, 1990, 111-116.
9. Lang B. A., Černoch M., Vermousek I., Šimičková M., Stratil P., Rejthar A., Hlávková J., Sakalová J., Celý J.: Complex biochemical analysis of human breast tumor tissue. *Neoplasma* 36, 1989, 61-69.
10. Dome J. S., Look A. T.: Three molecular determinants of malignant conversion and their potential as therapeutic targets. *Current Opinion in Oncol.* 11, 1999, 58-67.
11. Clark G. M., Osborne C. K., Levitt D., Wu F., Kim N. W.: Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 1997, 1874-1881.
12. Mokbel K., Parris C. N., Radbourne R., Ghilchik M., Newbold R. F.: Telomerase activity and prognosis in breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 25, 1999, 269-272.
13. Šimičková M., Černoch M.: Význam stanovení aktivity telomerázy v onkologii. *Klin. onkologie* 12, 1999, 73-77.
14. Carey I., Hedican C. A., Henderson G. S., Umbricht C. B., Dome J. S., Varon D., Sukumar S.: Careful histological confirmation and microdissection reveal telomerase activity in otherwise telomerase-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 4, 1998, 435-440.
15. Kyo S., Takakura M., Taira T., Kanaya T., Itoh H., Yutsudo M., Ariga H., Inoue M.: Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucl. Acid Res.* 28, 2000, 669-677.
16. Bodnarek A. K., Sabin A., Brenner A. J., Johnston D. A., Aldaz C. M.: Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: Positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin. Cancer Res.* 3, 1997, 11-16.
17. Tsao J. L., Zhao Y., Lukas J., Yang X., Shah A., Press, M., Shibata D.: Telomerase activity in normal and neoplastic breast. *Clin. Cancer Res.* 3, 1997, 627-631.
18. Hiyama E., Gollahon L., Kataoka T., Kuroi K., Yokoyama T., Gazdar A. F., Hiyama K., Piatyszek M. A., Shay J. W.: Telomerase activity in human breast tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1996, 116-122.
19. Villa R., Zaffaroni N., Folini M., Martelli F. G., De Palo G., Daidone M. G., Silvestrini R.: Telomerase activity in benign and malignant breast lesions: A pilot prospective study on fine-needle aspirates. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1998, 537-539.
20. Yashima K., Milchgrub S., Gollahon L. S., Maitra A., Saboorian M. H., Shay J. W., Gazdar A. F.: Telomerase enzyme activity and RNA expression during the multistage pathogenesis of breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 4, 1998, 229-234.
21. Mokbel K., Ghilchik M., Parris C. N., Newbold R. F.: Telomerase activity in phyllodes tumors. *Europ. J. Surg. Oncol.* 25, 1999, 352-355.
22. Shpitz B., Zimlichman S., Zemer R., Bomstein Y., Zehavi T., Liverant S., Bernhim J., Kaufman Z., Klein E., Shapira Y., Klein A.: Telomerase activity in ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res. Treat.* 58, 1999, 65-69.
23. Kyo S., Takakura M., Kanaya T., Zhuo W., Fujimoto K., Nishio Y., Orimo A., Inoue M.: Estrogen activates telomerase. *Cancer Res.* 59, 1999, 5917-5922.
24. Wang Z., Kyo S., Takakura M., Tanaka M., Yatabe N., Maida Y., Fujiwara T., Hayakawa J., Ohmichi M., Koike K., Inoue M.: Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* 60, 2000, 5376-5381.
25. Carey L., Kim N. W., Goodman S., Marks J., Henderson G., Umbricht C. B., Dome J. S., Dooley W., Amshey S. R., Sukumar S.: Telomerase activity and prognosis in primary breast cancers. *J. Clin. Oncol.* 17, 1999, 3075-3081.
26. Rha S. Y., Park K. H., Kim T. S., Yoo N. C., Yang W. I., Roh J. K., Min J. S., Lee K., Kim B. S., Choi J. H., Lim H. Y., Chung H. C.: Changes of telomerase and telomere lengths in paired normal and cancer tissue of breast. *Int. J. Oncol.* 15, 1999, 839-845.
27. Poremba C., Shroyer K. R., Frost M., Diallo R., Fogt F., Schafer K. L., Burger H., Shroyer A. L., Dockhorn-Dworniczak B., Boecker W.: Telomerase is a highly and specific molecular marker in fine-needle aspirates of breast lesions. *J. Clin. Oncol.* 17, 1999, 2020-2026.
28. Naritoku W. Y., Datar R., Li, P., Groshen S. J., Taylor C.R., Immam S. A.: Telomerase activity. Comparison between fine-needle aspiration and biopsy specimens for detection of tumor cells. *Cancer (Cancer Cytopathol.)* 87, 1999, 210-215.
29. Hiyama E., Saeki T., Hiyama K., Takashima S., Shay J.W., Matsuura Y., Yokoyama T.: Telomerase activity as a marker of breast carcinoma in fine-needle aspirated samples. *Cancer (Cancer Cytopathol.)* 90, 2000, 235-238.
30. Faraoni I., Graziani G., Turriziani M., Masci G., Mezzetti M., Testori A., Veronesi U., Bonmassar E.: Suppression of telomerase activity as an indicator of drug-induced cytotoxicity against cancer cells: In vitro studies with fresh human tumor samples. *Labor. Invest* 79, 1999, 993-1005.
31. Chen X. Q., Bonnefoi H., Pelte M. F., Liautey J., Lederrey C., Movarekhi S., Schaefer P., Mulcahy H. E., Stroun M., Anker P.: Telomerase RNA as a detection marker in serum of breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 6, 2000, 3823-3826.
32. Kass-Eisler A., Greider C. V.: Recombination in telomere-length maintenance. *TIMS* 25, 2000, 200-204.
33. Maláska J., Skleničková M., Krejčí K., Fajkusová L., Bajer M., Hrstková H., Fajkus J.: Telomerase activity and expression and telomerase activity in situ in the course of treatment of childhood leukemia. *Blood Cells Mo., Dis.* 20, 2000, 534-539.