

## MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE BUNĚČNÉ IMORTALIZACE A JEJÍ VZTAH KE KARCINOGENEZI

### MOLECULAR BIOLOGY OF CELLULAR IMMORTALIZATION AND ITS RELATIONSHIP TO CARCINOGENESIS

HATINA J., REISCHIG J.

UNIVERSITA KARLOVA, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI, ÚSTAV BIOLOGIE

**Souhrn:** Buněčná immortalizace představuje multistupňový proces, při němž buňky získávají neomezený proliferativní potenciál. Immortalizovaný fenotyp je vlastní nádorovým buňkám a nádorovým buněčnými liniemi, zatímco normální somatické buňky, primární buněčné kultury či dočasné buněčné linie vstupují po určité době aktivní proliferace do proliferativně inaktivního stádia – senescence. Senescence je charakterizována aktivací tumorových supresorových proteinů p53 a p16<sup>INK4a</sup>, inhibicí aktivace kináz buněčného cyklu, hypofosforylací pRb a trvalou inhibicí E2F-transkripčních faktorů, v důsledku čehož nejsou exprimovány geny, jejichž proteinové produkty jsou nutné pro vstup do S-fáze. Okamžik senescence je pravděpodobně determinován dvěma souběžnými procesy – postupným zkracováním telomer s každým buněčným dělením a postupnou demethylací genomu. Senescence může být překonána mutagenézí, genovou manipulací či infekcí DNA-tumorovými viry, během následující proliferativní vlny pokračuje ovšem dále zkracování telomer a proliferace končí rozsáhlou smrtí buněk – krizí. Část buněčné populace je ovšem schopna aktivovat telomery udržující enzymatickou mašinérii (nejčastěji ve formě enzymu telomerázy), krizi spontánně překonat a nabýt immortalizovaného fenotypu. Immortalizace představuje recesivní fenotyp, vzniklý postupným vyřazením obou kopií genů pro mediátory senescence a krize. Vedle této tzv. replikativní senescence může totožný fenotyp vzniknout i před proděláním daného počtu buněčných dělení, např. aktivací *ras*-onkogenu na normálním genetickém pozadí. Existuje dostatek důkazů, že tato tzv. předčasná senescence, jakož i řádná replikativní senescence, představují přirozené protitumorové bariéry. Aktivovaný *ras* je ovšem schopen obejít tuto senescentní bariéru kooperací s dalším buněčným onkogénem – *myc*. Aktivace *myc*-onkogenu ovšem nadto vede i k překonání krize aktivací exprese genu pro katalytickou podjednotku telomerázy, jakož i k řadě dalších důsledků ve prospěch nádorového fenotypu. Telomeráza sama představuje slibný terč protinádorové terapie, její řízená aktivace by naproti tomu mohla být důležitá v případech buněčné terapie.

**Klíčová slova:** primární buněčná kultura, replikativní senescence, immortalizace, telomery, telomeráza, p53, p16<sup>INK4a</sup>, *ras*, *myc*

**Summary:** Cellular immortalization represents a multistep process, during which cells acquire indefinite proliferation potential. The immortalized phenotype is typical to tumour cells and tumour-derived cell lines, whereas normal somatic cells, primary cultures and finite cell lines enter after a period of active proliferation into a state of proliferation arrest termed senescence. The senescence is characterized by activation of tumour suppressor proteins p53 and p16<sup>INK4a</sup>, inhibition of cyclin-dependent kinases activation, by pRb hypophosphorylation and constant inactivation of E2F transcription factors. Consequently, genes encoding for proteins, which are crucial for entry into S-phase, are not expressed. The point of senescence seems to be determined by two parallel processes – a gradual shortening of telomeres upon each cell division and a progressive demethylation of the genome. Mutagenesis, infection by DNA-tumour viruses or transfection with their oncogenes entail a bypass of senescence and allow for additional proliferation beyond the senescence point. Shortening of telomeres continues during this prolonged proliferation period, however, and proliferation terminates in culture crisis, which is typified by extensive cell death. A part of the cellular population might, nevertheless, activate a telomere maintenance mechanism (most frequently telomerase) and those cells spontaneously recover from crisis and become immortal. Immortality represents a recessive phenotype, which is conditioned by a gradual assembly of mutation hits targeting both copies of senescence- or crisis-mediating genes. Besides this replicative senescence, essentially the same phenotype could be induced prematurely (i.e. before passing the number of cell divisions, which would trigger the replicative senescence), e.g. by dominant gain-of-function activating mutations in the *ras*-oncogene on an otherwise normal genetic background. This premature senescence, as well as the replicative senescence for its own sake, could be this viewed as natural tumour suppressor barriers. Activated *ras* is able to bypass this proliferation block by cooperating with additional cellular oncogene – *myc*. However, the activation of *myc* leads in addition to the bypass of crisis, by means of activating transcription of the gene encoding the telomerase catalytic subunit, as well as to multiple additional consequences along the tumour progression pathway. The telomerase is often regarded as a promising target of anti-tumour therapy, its regulated expression on the other side represents a possibly important point in cell-based therapeutic applications.

**Key words:** primary cell culture, replicative senescence, immortalization, telomeres, telomerase, p53, p16<sup>INK4a</sup>, *ras*, *myc*

Normální lidské somatické buňky jsou schopny prodělat jen omezený, předem daný počet buněčných dělení, zatímco buňky nádorů jsou schopné nekonečné proliferace. Existuje řada důkazů, svědčících ve prospěch tvrzení, že buněčná immortalizace tvoří důležitý stupeň v kaskádě multistupňové karcino-

geneze. Například schopnost odvodit immortalizovanou buněčnou linii byla negativně korelována s prognózou v případě nemalobuněčné rakoviny plic (1), byla nalezena dobrá korelace mezi tumorigení a immortalizační schopností jednotlivých kmenů lidského papiloma viru (2, 3) a na modelu kolorektál-

ní karcinogeneze se podařilo prokázat, že buněčné linie odvozené od malých adenomů (průměr menší než 1 cm) mají zpravidla dočasný charakter, zatímco u velkých adenomů (průměr větší než 2 cm) je daleko větší pravděpodobnost ustavení imortalizované buněčné linie (4, 5). Existují sice buněčné linie, které jsou imortalizované, ale nikoli tumorigenní; klasickým příkladem je slavná linie NIH 3T3 embryonálních myších fibroblastů, ale v tomto případě jediná další genetická změna, t.j. transfekce jediným aktivovaným onkogenem, vede k plně tumorigennímu fenotypu. Této schopnosti NIH 3T3-fibroblastů bylo ostatně hojně využito ke klonování aktivovaných onkogenů z klinických nádorů. Imortalizovaná kultura, není-li přímo tumorigenní, tedy stojí podstatně blíže plně tumorigennímu fenotypu než normální buňka (6, 7).

Buněčná imortalizace je sama o sobě dosti komplexním procesem a mezi imortalizovanou a normální buňkou stojí několik proliferačních bariér, které se musí postupně zhroutit, aby buňka získala neomezený proliferační potenciál. Toto téma představuje v současnosti velice živou oblast nádorové biologie a jeho jednotlivé dílčí aspekty již byly na stránkách tohoto časopisu shrnuty - samostatně byla např. shrnuta úloha mdm2-onkoproteinu v regulaci aktivity tumorového supresorového proteinu p53 (8), úloha telomerázy (9) jakož i funkce inhibitoru buněčného cyklu p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup> (10). Záměrem tohoto článku je načrtnout jakýsi obecný rámec biologie buněčné imortalizace, se zvláštním důrazem na první a zdá se i základní proliferační bariéru, kterou musí nádorová buňka na cestě k imortalizaci překonat, t.j. senescenci.

### Senescence a krize - dvě základní proliferační bariéry

Již před více než 35 lety Hayflick zjistil, že dočasné buněčné linie lidských fetálních fibroblastů jsou i v optimálních podmínkách kultivace *in vitro* schopny prodělat jen omezený, předem daný počet dělení (počet buněčných dělení se udává aproximativně jako počet zdvojení populace buněčné kultury - population doubling, zkráceně PD, a na uvedeném modelu fetálních fibroblastů činí tento proliferační strop 60 PD) a poté proliferace neodvratně končí procesem zvaným senescence (též známá jako M1-stádium, což je odvozeno od mortality-1) (11, 12, 13). Při kultivaci normálních lidských buněk postihuje senescence celou kulturu a v podstatě není možno zaznamenat, že by se určitá, byť nepatrná část buněk tomuto procesu spontánně vyhnula. Senescence nemá co do činění s buněčnou smrtí - naopak (je třeba se nenechat zmást trochu nešťastným označením mortality-1). Buňky zůstávají živé a jejich buněčný cyklus se ireverzibilně zablokuje v G1-fázi - buňky nejsou schopny vstoupit do S-fáze ani v odpověď na mitogeny, např. sérum, což je možno kvantifikovat v podobě velmi nízké inkorporace bromdeoxyuridinu (BrdU). Buňky nabývají typické rozpláclé morfologie, dochází zde ke změně expresního profilu genů - některé geny jsou trvale reprimovány, jiné aktivovány, a buňky nabývají rezistenci vůči programované buněčné smrti - apoptóze. Byl objeven rovněž typický marker senescentních buněk -  $\beta$ -galaktosidáza aktivní při pH 6 (tzv. SA- $\beta$ -gal - senescence-associated  $\beta$ -galaktosidáza). Hodinami, které buňkám vymezí okamžik vstupu do senescence, je přitom skutečně počet buněčných dělení, nikoli reálná doba kultivace. Rovněž kryoprezervace nijak nemění tyto vnitřní buněčné hodiny a buňky po rozmrazení začínají přesně v tom okamžiku, v jakém byly zamrazeny. Buňky jsou tedy vybaveny určitými vnitřními hodinami, které, odbije-li konečný, předem vyměřený počet PD, trvale a ireverzibilně zablokují další proliferaci (13, 14, 15).

Již v polovině 60. let se přišlo na způsob, jak lze senescenci obejít - totiž infekcí některými DNA-nádorovými viry, jako je SV40, lidské papilomaviry (HPV), nebo, v případě B-lymfocytů, virus Epsteinova a Baarové (EBV). Později, s rozvinutím metodiky transfekce se přišlo na to, že postačí buňky transfektovat onkogeny uvedených virů, t.j. tzv. velkým T antigenem viru SV40 či E6 a E7 onkogeny lidského papilomaviru 16 (14, 16, 17). Uve-

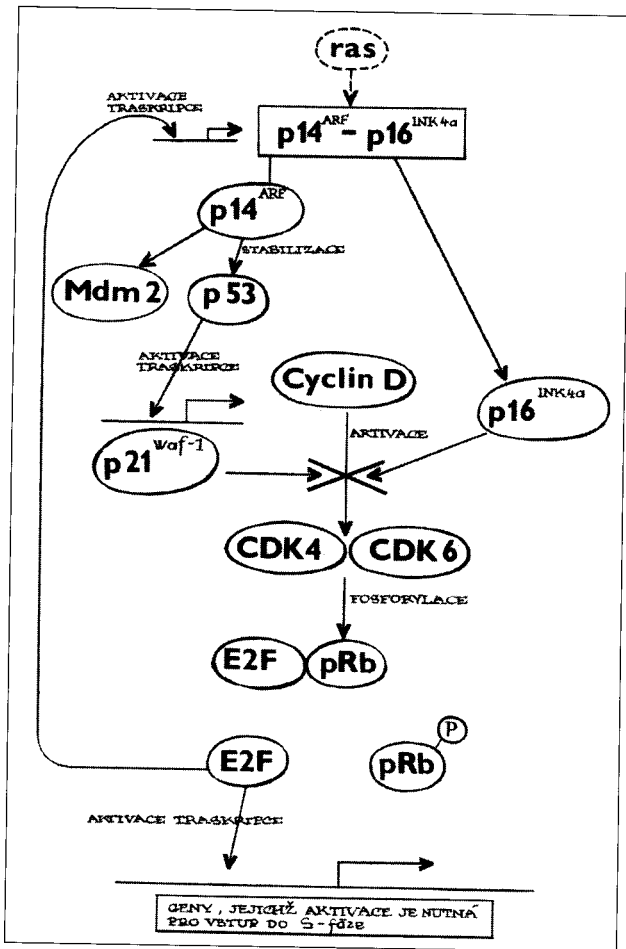
dená infence či transfekce má za následek další vlnu buněčné proliferace v rozsahu 20 - 60 PD (podle buněčného typu a použitého viru) a poté buňky vstupují do nové fáze proliferační zástavy, která je známá jako krize či M2 (mortality-2). Krize je provázána rozsáhlou smrtí buněk, pravděpodobně apoptotického charakteru, ovšem při vysoké úrovni mitotické aktivity (vysoká úroveň inkorporace BrdU). Buňky v krizi rovněž exprimují SA- $\beta$ -gal (18, 19). Krize ovšem není z hlediska osudu buněčné kultury natolik fatálním stádiem jako senescence, poněvadž určité části buněčné populace se může podařit krizi překonat, po určité době proliferačního klidu znovu začít aktivně proliferovat a tentokrát už provždy. Překonání krize má tedy charakter imortalizace a buněčná kultura, která překonala krizi, nabývá schopnosti nekonečné proliferace. Frekvence této spontánní imortalizace není u lidských fibroblastů (jakožto klasického modelu) příliš velká a pohybuje se v rozmezí  $10^{-5}$  až  $10^{-9}$  (14), u jiných buněčných typů, např. epitelálních buněk, může být ovšem o hodně vyšší či dokonce i tak vysoká, že krize nemusí být vůbec patrná a hlavní proliferační bariérou zůstává senescence. Ta je ovšem u epitelálních buněk dvoufázová: jednotlivé stupně se označují jako M0 - selekce a M1 - vlastní senescence, přičemž každý z nich má jiný molekulární základ (20). Karyotyp imortalizované kultury má všechny znaky transformované kultury, t.j. je aneuploidní a heteroploidní, imortalizovaná kultura ovšem ještě nemusí být tumorigenní (6).

### Molekulární biologie replikativní senescence

Jak je již uvedeno výše, senescence představuje trvalé zablokování buněčného cyklu v G1-fázi; buňky nejsou schopny replikovat DNA ani v odpověď na mitogenní stimulační například sérum. Vstup do S-fáze buněčného cyklu je podmíněn expresí specifických genů, kódujících enzymatické aktivity nutné pro replikaci DNA včetně DNA-polymeráz, a exprese těchto genů je kontrolována na úrovni jejich transkripce rodinou transkripčních faktorů E2F. V G1-fázi je exprese těchto genů nezávislá a E2F faktory jsou v souladu s tím inaktivovány interakcí s proteiny retinoblastomové rodiny (pRb); tato interakce je podmíněna hypofosforylovaným stavem pRb. V normálním průběhu buněčného cyklu je v pozdní G1-fázi pRb fosforylován kinázami buněčného cyklu CDK-4 a CDK-6 aktivovanými cyklinem D, popř. CDK-2 aktivovanou cyklinem E - fosforylovaný pRb ztrácí schopnost interakce s E2F, ten je uvolněn a spouští transkripci genů, jejichž proteinové produkty jsou nutné pro vstup do S-fáze (21). Senescentní buňky ovšem tuto fosforylační reakci nejsou schopny provést, pRb je tudíž trvale hypofosforylován a v trvalé interakci s E2F. Tohoto bloku je dosaženo aktivací syntézy dvou inhibitorů kináz buněčného cyklu - p16<sup>INK4a</sup> (specifita pro CDK4 a CDK6) a p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup> (široké spektrum inaktivovaných CDK); p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>-gen je přímo aktivován tumorovým supresorovým proteinem p53 (22). p53 protein je v senescentních buňkách stabilizován a vykazuje zvýšenou transkripčně-aktivaci aktivitu (15). Ke stabilizaci p53 dochází působením proteinu p14<sup>ARF</sup> (myší homolog nese označení p19<sup>ARF</sup>), jehož gen sdílí část kódující sekvence - 2. a 3. exon - s p16<sup>INK4a</sup>-genem, má ovšem svůj vlastní promotor a 1. exon a vzhledem k použití jiného čtecího rámce (ARF v označení znamená alternativní reading frame) neexistuje na aminokyselinové úrovni žádná podobnost mezi p14<sup>ARF</sup> a p16<sup>INK4a</sup> (23). p14<sup>ARF</sup> stabilizuje p53 protein vstupem do přirozené negativní regulace p53 prostřednictvím onkoproteinu mdm2. Mdm2 interaguje s p53 a výsledkem této interakce je zřejmý export komplexu mdm2-p53 z jádra do cytoplazmy a zde proteolytická degradace; mdm2-gen je přitom rovněž přímo transkripčně aktivován p53-proteinem. p14<sup>ARF</sup> je schopen současné interakce s mdm2 i p53 a ruší destabilizační funkci mdm2 (8, 24). p16<sup>INK4a</sup>-lokus obsahuje ještě jeden gen, a to p15<sup>INK4b</sup>, blíže homologní p16<sup>INK4a</sup>, jehož proteinový produkt je i funkčně analogický a tedy rovněž schopný inhibovat aktivaci CDK4 a CDK6 cyklinem D; nezdá se ovšem, že by p15<sup>INK4b</sup> byl aktivován v průběhu řad-

né replikativní senescence (23). p53 zřejmě reguluje senescenci ještě dalšími cestami nezávislými na p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>. Jedním z kandidátů je vazebný protein inzulinu-podobných růstových faktorů - 3 (IGFBP-3), který inaktivuje přímou vazbou tyto růstové faktory a tím blokuje jejich mitogenní působení (24). Samotný p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup> je schopen kontroly buněčné proliferace ještě dalším mechanismem, a to inhibiční interakcí s proteinem PCNA (proliferating cell nuclear antigen), který působí jako kofaktor DNA-polymerázy - důsledkem uvedené interakce je přímá inhibice replikace DNA (25). Obě funkce p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>, tj. inhibice cyklin-dependentních kináz a inhibice PCNA, jsou přitom neneseny různými doménami p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>-proteinu. Inhibice CDK přísluší N-terminální části, zatímco vazba PCNA je vlastní C-terminální doméně. V experimentálním systému jsou obě domény schopny nezávisle inhibovat buněčnou proliferaci, inhibiční účinek N-terminální domény zaměřené proti CDK se ukazuje jako výraznější (26,27).

Toto je tedy obecné schéma proliferativního bloku replikativní senescence (obr. 1) a odtud je na bíle dni, jak mohou onko-



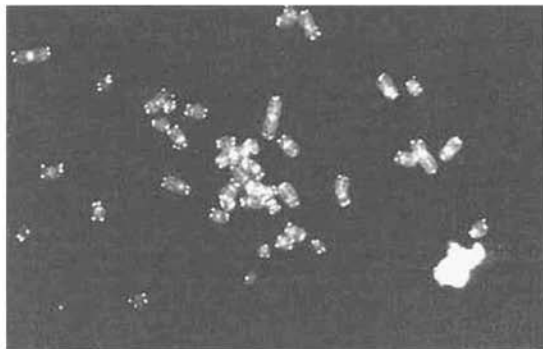
**Obr. 1.** Schema replikativního bloku uplatňujícího se v senescenci. Senescence je spuštěna aktivací tumorových supresorových proteinů p53 a p16<sup>INK4a</sup>. Alternativní produkt p16<sup>INK4a</sup>-lokusu - p14<sup>ARF</sup> - přitom stabilizuje p53-protein zrušením destabilizační funkce mdm2-onkoproteinu. Aktivovaný p53 spouští transkripci p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>- genu, p16<sup>INK4a</sup> a p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup> - proteiny inhibují aktivaci cyklin-dependentních kináz. Ty v důsledku toho nejsou schopny fosforylovat tumorové supresorové proteiny rodiny pRb. pRb zůstává v trvalém komplexu s transkripčními faktory E2F-rodiny, které tudíž nejsou k dispozici pro transkripci genů, kódujících proteiny nezbytné pro vstup do S-fáze buněčného cyklu. Konečným efektem je tedy zablokování buněčného cyklu v G1-fázi. Tento replikativní blok je sám aktivován jako následek vyčerpání povolené replikační kapacity dané buňky, nebo rovněž před dovršením povoleného počtu buněčných dělení - v tomto případě může být senescence spuštěna aktivací některých onkogenů, například *ras*.

proteiny DNA-tumorových virů tento blok prorazit. Podstatou jejich onkogenního účinku je totiž vyvážení buněčných tumorových supresorových proteinů do nefunkčních komplexů a jejich směřování k degradaci - T-antigen SV40 přitom současně váže p53 a pRb. E6-onkoprotein HPV16 inaktivuje p53 a E7 podobně inaktivuje pRb (14, 15).

Zbývá odpovědět na otázku, jak je tento proliferativní blok aktivován po prodělání určitého předem naprogramovaného počtu buněčných dělení. Zdá se, že zde současně působí dva mechanismy - postupující eroze telomer s každým buněčným dělením a postupující demethylace genomu (28). Zkrácením telomer je zřejmě výsledkem dvou procesů - neschopnosti DNA-polymerázy opožďujícího se řetězce úplně replikovat templát (tzv. end-replication problem) - proces, který byl poprvé hypoteticky načrtnut ruským genetikem Olovnikovem na začátku 70.let bez jediného experimentu, jak na to vzpomíná sám Hayflick (13), a k tomu dále přistupuje předpokládané působení 5'-3' - exonukleázy (29, 30). Délka telomer individuálních lidských chromozomů může být kvantifikována metodikou *in situ* hybridizace, za použití fluorescenčně značené sondy odpovídající multiplikované telomerové repetici (obr. 2). Úbytek DNA připadající na jedno buněčné dělení byl takto v době velmi nedávné poměrně přesně změřen a dosahuje délky 50 - 200 párů bazí (pb), přičemž různé hodnoty v tomto rozmezí byly získány pro různé individuální chromozomy (31). Zkrácení telomer na určitou kritickou úroveň zřejmě působí jako určitý signál poškození DNA, který aktivuje p53; jaká je ovšem podoba tohoto signálu zůstává zatím nejasná - zda to je přímo zkrácení telomer nebo neschopnost zkrácených telomer zaujmout typickou sekundární strukturu (tzv. t-loop) apod. (32). Rovněž je jasné, že neexistuje naprosto jednoznačný vztah mezi délkou telomery jednotlivých individuálních chromozomů a spuštěním senescence - u některých chromozomů může být tolerován i větší úbytek telomer, u jiných ne - není to tedy rozhodně tak, že by první krátká telomera spouštěla senescenci (31). Ničemné postavení p53 jakožto senzora destrukce telomer lze pokládat za prokázané - byla vytvořena mutantní linie myši, u nichž je vyřazena telomerázová enzymatická aktivita cílenou mutací v genu kódujícím telomerázovou RNA; tyto myši vykazují patologické poškození u tkání vyžadujících vysokou úroveň proliferace buněk, které je ovšem výrazně zmírněno překřížením této mutace na pozadí bez funkčního p53-genu (33). Ať už je mechanismus aktivace p53 jakýkoli, další průběh se zdá být jasný. Aktivovaný p53 spouští transkripci genu p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>, jehož proteinový produkt zablokuje buněčný cyklus inhibicí G1-kináz a PCNA, popř. genu pro IGFBP-3, který zablokuje mitogenní aktivitu okolí buňky. p53 je přitom stabilizován p14<sup>ARF</sup> a jeho transkripční aktivita může být zvýšena transkripčním kofaktorem p33<sup>ING1</sup> (24).

Demethylace genomu postupuje možná jako nezávislý souběžný proces registrace proliferativní historie a jeho cílem je pravděpodobně p16<sup>INK4a</sup>, jehož promotor je velmi citlivý ke změnám v metylaci DNA (34). Názorný příklad této citlivosti poskytuje kultivace epiteliálních buněk mléčné žlázy, u nichž na rozdíl od shora uvedeného fibroblastového modelu, probíhá senescence dvoufázově - první fáze (po 10 - 20 PD) se označuje jako selekce čili M0, za ní pak následuje (po dalších 10 - 20 PD) vlastní senescence čili M1. Selekcí může být překonána buď transfekcí HPV E7-onkogenem (ale nikoli E6) nebo spontánně - buňky, které spontánně překonaly selekci hypermetylovaly p16<sup>INK4a</sup>-promotor a úplně utlumily expresi genu. Senescence (M1) je pak závislá výlučně na p53 a je překonána transfekcí HPV E6-onkogenem (20).

Postupující demethylace genomu má efekt přesně opačný, t.zn. dochází k aktivaci (derepresi) p16<sup>INK4a</sup>; navíc se zjistilo, že tento protein i jeho mRNA jsou velmi stabilní a mohou se tak "pasivně" hromadit v buňce s postupující proliferací. Pointa je totožná jako u aktivace p53, tj. inaktivace CDK4 a CDK6 inhibice fosforylace pRb a zablokování buněčného cyklu

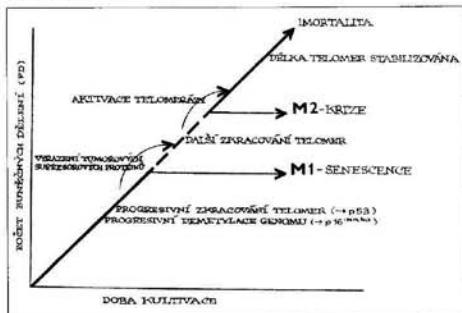


**Obr. 2.** Preparát metafázických chromozomů buněk kostní dřeně člověka hybridizovaných *in situ* oligonukleotidem odpovídajícím jedné kopii telomerního repetice. Vlastní chromozomy jsou barveny propidiumjodidem, telomery jsou vizualizovány prostřednictvím FITC. Mikroskop Olympus Fluoview, zvětšení 1450 x.

v G1-fázi (14). Sled jednotlivých procesů *in vitro* imortalizace schematicky zachycuje obrázek 3.

Je velmi obtížné, ne-li nemožné, z dílčích experimentů kategorizovat jednotlivé molekulární mediátory senescence podle důležitosti. Například byla popsána kultivace dospělých fibroblastů od dárců postiženého Li-Fraumeni syndromem (germinální mutace v *p53*-genu), která končí normálním senescenčním blokem po asi 40 PD, ten však může být spontánně překonán mutací v jediné funkční kopii *p53*-genu doprovázené ztrátou heterozygotnosti (loss of heterozygosity – LOH), aby posléze umožnil další proliferaci vlnu o délce 32–35 PD, která ovšem opět končí ve stavu připomínající senescenci (35). Pokud během této dodatečné proliferace dochází i k vyřazení *p16<sup>INK4a</sup>* děleci obou kopií genu, prodlužuje se tato dodatečná proliferací perioda přibližně na 55 PD a končí krizí,

**Obr. 3.** *In vitro* imortalizace primární buněčné kultury. Během kultivace primární buněčné kultury dochází k postupnému zkracování telomer s každým buněčným dělením a k postupující demethylaci buněčného genomu. Výsledkem obou těchto procesů je vstup buněčné kultury do stádia senescence, při němž se zastavuje veškerá další proliferace. Senescenci lze ovšem obejít vyřazením jejích molekulárních mediátorů – tumorových supresorových proteinů, například transkripcí onkogenu DNA-tumorových virů. Důsledkem této manipulace je další pokračování buněčné proliferace, během níž ovšem rovněž pokračuje postupné zkracování telomer, a to až do stádia, kdy zkrácené telomery již nejsou schopny plnit svoji vlastní biologickou funkci ochrany chromozomových konců. Dostává se krize kultury, jejíž charakteristickým znakem je rozsáhlá vlna buněčné smrti. Nezbytnou podmínkou další proliferace je stabilizace telomer aktivací speciální enzymatické mašinerie, nejčastěji telomerázy. Výsledná kultura je imortalizovaná a je schopna časově neomezené proliferace.



shodně s kultivací Li-Fraumeni fibroblastů, který ovšem končí přímo krizí, a to při perzistentně zvýšené expresi hladiny *p16<sup>INK4a</sup>* (18, 37). Tento výsledek je možné interpretovat tak, že primární úlohu zablokování buněčného cyklu v senescenci hraje *p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>*, proti tomu ovšem stojí pozorování, že *p16<sup>INK4a</sup>* je mutován v celé řadě nádorů, zatímco mutagenéze u *p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>* genu prakticky zaznamenána nebyla – přijmeme-li model senescence jako tumorové supresorové bariéry (viz dále), ukazuje toto srovnání na primární úlohu *p16<sup>INK4a</sup>* (34, 38). Závěrem je proto možno shrnout, že senescence je výsledkem jakéhosi vyváženého systému blokujícího buněčný cyklus, přičemž každá ze složek plní svou úlohu a lze těžko některou z nich vyřaditova na úkor druhé. Rovněž lze jen obtížně kvantitativně (tj. co do rozsahu poskytnutého dodatečného proliferacího prostoru) porovnávat různé nezávislé studie, které na různých konkrétních buněčných liniích manipulují s jednotlivými mediátory senescence.

Podává-li se buňce mutagenézi, virovou infekcí či genovou manipulací překonat senescenční bariéru, pokračuje po celou dobu dodatečné proliferace dále destrukce telomer (28) (kterou lze ovšem buňka nemůže zaznamenat a adekvátně na ni reagovat), až do okamžiku, kdy telomery nejsou dále schopny zastávat svou vlastní biologickou funkci – tj. ochranu konců chromozomu a jejich stabilizaci; výsledná chromozomální nestabilita v podobě chromozomálních fúzí a přestavb je pravděpodobně vlastní příčinou vlny buněčné smrti charakterizující krizi. Buňky, kterým se podaří překonat a dosáhnout imortalizace, aktivují během krize mechanismus stabilizace telomer, asi v 85% případů v podobě aktivace enzymu telomerázy (14, 15, 30). Tento scénář zároveň poskytuje vysvětlení pro pozorování, že většina imortalizovaných nádorových buněčných linií má telomery podstatně kratší než odpovídající normální buňky. U určitých buněčných typů, jako jsou epitelální buňky mléčné žlázy a keratinocyty, vede infekce HPV 16 či transfekce E6- a E7-onkogenu nejen k překonání senescence, ale krize u nich vůbec nemusí být patrná a překonání senescence má charakter imortalizace (20). Bylo zjištěno, že v těchto buněčných typech také nikoli například ve fibroblastech) je E6-onkogen, kromě inaktivace *p53*-proteinu, rovněž schopen aktivovat telomerázu. Toto pozorování může být klinicky významné u HPV-indukovaných nádorů, jako je karcinom děložního krčku (39).

#### Genetika buněčné imortalizace

Důležitým prvkem na cestě dešifrování molekulární podstaty imortalizace bylo poznání, že imortalizovaný fenotyp vstui-

puje jako recesivní v experimentech typu somatické hybridizace - produkt buněčné fúze mezi dočasnou a immortalizovanou buněčnou kulturou přejímá smrtelný fenotyp dočasné kultury a podléhá senescenci a krizi (40, 41). Rovněž produkt buněčné fúze mezi dvěma immortalizovanými lidskými buněčnými liniemi je ovšem často schopen pouze dočasné proliferace a poté vstupuje do senescence. Systematickou somatickou hybridizací vybraných lidských immortalizovaných buněčných linií byly definovány čtyři tzv. komplementační skupiny immortalizace, označené jako A, B, C a D; pouze produkt fúze linií náležejících do téže komplementační skupiny přejímá rodičovský immortalizovaný charakter, což prokazuje, že buněčné linie téže komplementační skupiny mutovaly v procesu immortalizace totožnou sadu genů (42, 43). Rovněž produkt fúze immortalizované telomerázy exprimující buněčné linie s dočasnou buněčnou linií ztrácí telomerázovou aktivitu (44). Immortalizovaný fenotyp je podle všeho výsledkem multistupňové mutagenese typu ztráty funkce (loss-of-function). Jinými slovy, existují dominantní senescenci a krizi spouštějící geny a alely a k překonání těchto dvou proliferčních bariér je nutné vyřazení obou kopií příslušných genů na obou homologních chromozomech. Část produktů těchto genů působí jako negativní regulátory buněčného cyklu, jiná část působí jako represory telomerázy (45, 46).

Ztráta funkce příslušných negativních regulátorů immortalizace je přitom zapotřebí konstitutivně, t.j. po celou dobu proliferace immortalizované kultury - zanesení funkčních kopií *p53* a *p16<sup>INK4a</sup>* genů do immortalizovaných fibroblastů (původu Li-Fraumeni rodin) vrací tyto buněčné linie na samý počátek a znovu nastartuje replikativní senescenci. Podobně použití teplotně senzitivní mutanty SV40 velkého T-antigenu umožňuje při permissivní teplotě immortalizovat lidské fibroblasty (t.j. obejít senescenci a selektovat buňky překonávající krizi), při zvýšení teploty kultivace takto immortalizované linie velmi rychle opět vstupují do senescence (14, 28). Jednou z příčin tohoto chování může být skutečnost, že immortalizované buněčné kultury mají zpravidla kratší (byť stabilizované) telomery, a tudíž je u nich trvale přítomen signál poškození DNA spouštějící senescenci - je-li do těchto buněk ještě dodatečně vnesen i příjemce tohoto signálu (*p53*), objevuje se pak senescence jako logický důsledek. Možnou praktickou aplikací je pak genová terapie nádorů transferem genů kódujících molekulární mediátory senescence, jako je *p16<sup>INK4a</sup>* (47).

Uvedený princip, t.j. že restaurování jediné genetické změny z celé multistupňové kaskády vedoucí k immortalizovanému fenotypu tento fenotyp ruší a obnovuje senescenci, byl využit i experimentálně k mapování nových genů senescence a immortalizace metodou transferu individuálních chromozomů (microcell-mediated chromosome transfer). Podstatou této metody je buněčná fúze mezi studovanou immortalizovanou buněčnou linií a hybridní buněčnou kulturou, nesoucí na pozadí myšičího genomu (buněčná linie A9) vždy jediný konkrétní lidský chromozom značený selekčním markerem (obvykle *Neo<sup>r</sup>*-gen). Nese-li tento chromozom gen spojený se senescencí či krizí, který je homozygotně mutačně vyřazen u použité immortalizované buněčné linie, dostaví se vzápětí po fúzi senescence nebo krize. Část hybridních klonů se ovšem vždy vrací k původnímu immortalizovanému fenotypu a u těchto revertantů zpravidla dochází k delecí menšího či většího úseku daného vneseného chromozomu. Jednotlivé klony revertantů jsou proto podrobeny mapovací analýze na retenci či ztrátu jednotlivých genetických markerů analyzovaného chromozomu a tímto způsobem je stanovena tzv. minimální deletovaná oblast, tj. nejmenší průnik delecí všech analyzovaných klonů revertantů. Takto lze zpravidla poměrně přesně zmapovat pozici hledaného genu, řádově s přesností megabází DNA. Následující jasně mapování sleduje v podstatě obecnou metodiku pozičního klonování genů, tj. vytvoření fyzikální mapy dané oblasti v podobě uspořádané sestavy fragmentů DNA v podobě YAC- (yeast arteficial chromosome) či BAC- (bacterial

arteficial chromosome) klonů (které lze rovněž funkčně otestovat zavedením do dané immortalizované buněčné linie, metodika je ovšem složitější), selekce exprimovaných oblastí (EST - expressed sequence tagg), kandidátních genů atd. V uvedeném experimentálním systému lze senescenci indukovat velmi rychle (po 5 až 9 PD), naproti tomu v případě represoru telomerázy dochází k indukci krize až po postupné destrukci telomer, která nastává až po 20 - 40 PD (48).

Alternativní metodika byla zcela převzata z molekulární genetiky nádorů a spočívá v hledání oblastí, na jednotlivých předem vytypovaných chromozomech, popř. i na úrovni celého genomu, vykazujících konzistentní ztrátu heterozygotnosti (LOH), což je charakteristický znak lokalizace tumorového supresorového genu. Za modelový systém můžeme pokládat výše zmíněnou kultivaci fibroblastů jedinců postižených Li-Fraumeni syndromem (35). Jiný systém vycházející z klasického modelu analyzoval chování fibroblastů immortalizovaných po transfekci T-antigenem SV40. Senescence je zde překonána blokováním *p53*- a *pRb*-proteinů transfektovaným virovým onkoproteinem, ale ukazuje se, že k immortalizaci je vedle aktivace telomerázy nutná ještě genetická změna na úrovni *6q26-27* (49). Jiný vhodný systém představuje baterie buněčných linií odvozených z nádorů hlavy a krku (SCCHN) - z těchto nádorů se podařilo ustavit buněčné linie v různém stupni "immortalizační dráhy" (t.j. presenescentní, jejichž kultivace končí senescencí, postsenescentní, jejichž kultivace končí krizí, i immortalizované) a tyto linie takto tvoří velmi výhodný vstup celogenomové srovnávací analýzy na ztrátu heterozygotnosti dostupných genetických markerů, které v případě LOH označují polohu zasaženého tumorového supresorového genu (50).

Touto metodikou mohly být přiřazeny chromozomy pro jednotlivé komplementační skupiny (A - chr. 6, B - chr. 4, C - chr. 1 a D - chr. 7) a v různých liniích byla senescence korelována s transferem lidských chromozomů 2, 3, 11, 13, 16 a 18 (28, 45, 48, 51). Gen pro senescenci komplementační skupiny B byl již klonován (*MORF4*-gen), zdá se ovšem jisté, že další geny na chromozomu 4 je třeba ještě vyklonovat, poněvadž samotný *MORF4*- gen indukuje senescenci až po 20 - 30 PD, na rozdíl od intaktního chromozomu 4, který po transferu indukuje senescenci už po 5-10 PD, a navíc u části buněčných linií přiřazených do komplementační skupiny B je *MORF4* zcela neúčinný (52, 53). V brzké budoucnosti se dá rovněž očekávat vyklonování genu pro komplementační skupinu D (*SEND*-gen na chromozomu 7q31) (46). Gen pro represor telomerázy byl mapován na chromozomu 3 do oblastí 3p21.3-22 a 3p12-21.1 (54). Molekulární podstata senescence a immortalizace může být odhalena ještě z úplně jiné strany. Jak senescence, tak i immortalizace jsou totiž charakterizovány změnou expresního profilu genů ve srovnání s normálními buňkami téhož typu (55). Tyto diferencovaně exprimované geny je pak možné izolovat speciálními metodikami jako je analýza typu "differential display" (56, 57), subtrakční klonování (58) či analýza typu "DNA-microarrays" (59).

### Replikativní senescence jako bariéra nádorové transformace

Pojetí replikativní senescence jako přirozené protitumorové bariéry vychází z několika pozorování. Za prvé, tytéž geny, jejichž proteinové produkty zprostředkovávají trvalé zablkování další proliferace v senescenci, patří mezi nejčastěji mutované tumorové supresorové geny v klinických nádorech. Každému z nich přísluší v případě germinální mutace specifický syndrom dědičné nádorové predispozice: *p53* - Li-Fraumeni syndrom se širokým spektrem nádorů, *pRb* - rodinný retinoblastom, *p16<sup>INK4a</sup>* - rodinným melanom (14); velmi vzácně se vyskytující forma rodinného melanomu je rovněž kodována specifickou mutací v *CDK 4*- genu, která propůjčuje insenzitivitu vůči inhibici aktivace cyklinem D ze strany *p16<sup>INK4a</sup>* (38). *p53*, *p16<sup>INK4a</sup>* a v řadě případů současně i *p14<sup>ARF</sup>* patří rovněž mezi nejčastěji mutované tumorové supresorové

geny u spontánních nádorů, rovněž často pozorovanou alternativou mutace je u  $p16^{INK4a}$  zrušení exprese hypermetylační promotoru. I když se mutace v  $pRb$  u spontánních nádorů vyskytují méně často, jejich výskyt se striktně vylučuje s mutacemi v  $p16^{INK4a}$ , což potvrzuje ekvivalenost dopadu obou mutací; často se proto hovoří o  $p16^{INK4a}/pRb$  - tumorové supresorové dráze (38, 60).

Druhé pozorování ve prospěch nutnosti proražení bariéry replikativní senescence v procesu tumorigeneze vychází z toho, že z nádorů lze bez nutnosti další mutagenese či genové manipulace odvodit, podle konkrétního typu snadněji či obtížněji, immortalizované buněčné linie. To svědčí o tom, že většina nádorů postoupila během nádorové progresy ještě dál - až k překonání krize a k immortalizaci. Třebaže lze vždy vznést námitku, že k immortalizaci může dojít až v procesu *in vitro* kultivace, skoro 90% podíl nádorů, které vykazují telomerázovou aktivitu, dosti pádne hovoří ve prospěch immortalizace jako součásti karcinogeneze *in vivo* (61, 62). Dokonce v některých případech nenahraditelnost nádoru jakožto vylučného možného zdroje pro odvození permanentních buněčných linií vedla k produkci transgenických myší, u nichž byla tumorigeneze cíleně směřována do žadaného specializovaného buněčného typu - velmi se v tomto ohledu osvědčil T-antigen viru SV40 pod kontrolou tkáňové či buněčně specifických promotorů (63). Existuje vlastně nějaký koncepční důvod, proč by z hlediska nádorové buňky vyvstávala nutnost překonání proliferčních bariér senescence a krize a následně immortalizace? Čistě teoreticky ne - prostor oněch 50 PD představuje více než dostatečnou proliferční kapacitu pro vytvoření smrtelného nádoru. Je třeba ovšem vzít v úvahu, že celý proces multistupňové karcinogeneze vedoucí ke konečnému, plně malignímu, metastatickému a vůči terapii rezistentnímu fenotypu vyžaduje řadu genetických změn, které se asemblují procesem náhodné mutagenese a následné selekce, což je proces neefektivní, při němž dochází k velkým buněčným ztrátám. Z tohoto pohledu je pravděpodobně zapotřebí daleko větší proliferční kapacity než kolik vymezuje senescentní bariéra (61, 64). Navíc oněch 50 PD bylo odvozeno pro fibroblasty a předpokládá se či bylo prokázáno, že u řady jiných buněčných typů může senescence nastávat podstatně dříve. Zjistilo se rovněž, že u některých buněčných typů je senescence funkcí stádia diferenciace; diferencované tyroidní folikulární buňky podléhají dvěma časným proliferčním bariérám, z nichž první je  $pRb$ -závislá, t.j. překonatelná E7-onkogenem HPV, ale  $p16^{INK4a}$ -nezávislá, mechanismus druhé není znám. Dediferenciace ovšem ruší tyto bariéry a jejich výsledkem jsou buňky, které se s ohledem na senescenci blíží fibroblastům, t.j.  $p53$ - a  $pRb$ -závislá senescence nastává okolo 40 PD (62). Je téměř zbytečné dodávat, že dediferenciace je součástí morfologie řady nádorů. Je ovšem nutné dodat, že existují příklady nádorů, z nichž byly izolovány pre-senescentní buněčné linie (například šupinatý karcinom hlavy a krku - SSCHN). Dokonce se podařilo izolovat jednu linii, která sice mutovala  $p53$ - a  $p16^{INK4a}$ -geny, dostatečně ovšem neaktivovala telomerázu, a její kultivace *in vitro* končí krizí (50).

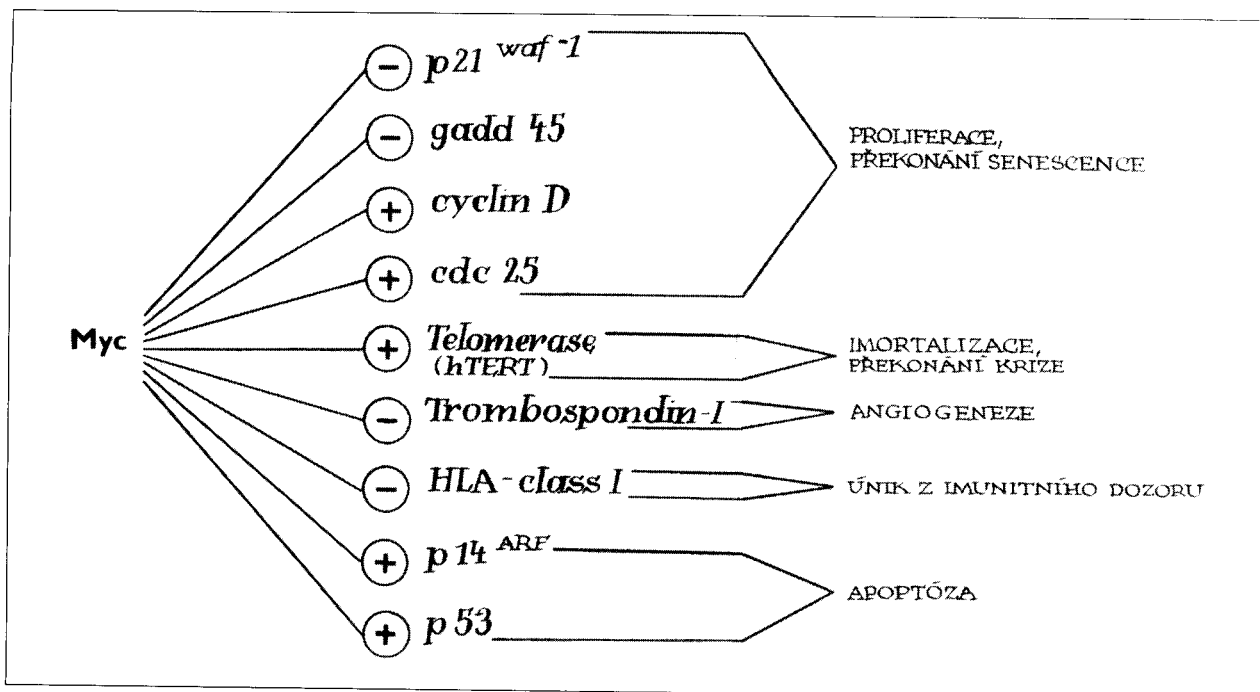
### Předčasná senescence

V době velmi nedávné se zjistilo, že postavení senescence jako protinádorové bariéry může nabývat mnohem aktivnější podoby. Překvapující výsledek byl získán při studiu důsledků ektopické exprese jednoho z nejdůležitějších onkogenů - *ras*. Geny pro malé GTP-vazebné proteiny *ras* (*Ha-ras*, *Ki-ras* a *N-ras*) patří mezi vůbec nejčastější cíle mutagenese v klinických nádorech, přičemž typických dopadem takové mutace je rozvrácení normální regulace aktivity proteinu (65). V uvedeném experimentu se ovšem zjistilo, že aktivovaný *ras*-onkogen v normálních buňkách nejen že nepůsobí onkogenně, ale přímo zastavuje proliferaci za stavu, který nese všechny atributy senescence - tj. buňky nabývají typickou rozplácitou morfologií, zůstávají živé, ale nejsou schopny další proliferace ani po

stimulaci sérem, stimulace sérem nevede k indukci *c-fos* faktoru a buňky exprimují typické markery senescence - se senescencí asociovanou  $\beta$ -galaktosidázovou aktivitu (SA  $\beta$ -Gal) a inhibitor aktivátoru plasminogenu typu I (PAI-I) (66). Dochází k aktivaci molekulárních mediátorů senescence -  $p53$ ,  $p14^{ARF}$ ,  $p21^{waf-1/cip-1/sdi-1}$ ,  $p16^{INK4a}$  a v tomto případě i  $p15^{INK4b}$  (obr. 1) (66, 67). K totožnému efektu dochází i aktivací downstream-efektorů *ras* ve směru mitogen-aktivované kinázové kaskády, tj. raf a MAPK (68, 69). Tento fenotyp je evolučně konzervovaný, minimálně mezi myší, krysou a člověkem. Toto pozorování poskytuje vysvětlení pro nutnost současné aktivace onkogenů a inaktivace tumorových supresorových genů v procesu multistupňové karcinogeneze - aktivovaný *ras* může působit proliferačně jen tehdy, dojde-li k aktivací mutaci na pozadí mutačního vyřazení tumorových supresorových genů. Otázkou zatím zůstává, do jaké míry je *ras*-indukovaná senescence reverzibilní. Ve shora uvedených pracích byl aktivovaný *ras* do buněk zaveden vroděných infekcí, přičemž expresní hladina mutovaného *ras* dosahovala více než desetinásobku endogenní exprese. Za těchto podmínek je vyvolaný senescentní fenotyp ireverzibilní, tj. jestliže po vyvolání senescence dojde následně k vyřazení lokusu tumorových supresorových genů, nevolně to senescentní blok (66, 68). Ačkoli se obecně tvrdí, že senescence znamená ireverzibilní zablokování buněčného cyklu, ukazuje se, že v řadě případů to tak docela být nemusí - například při kultivaci Li-Fraumeni fibroblastů dochází vždy k zástavě proliferace v souladu se senescentní bariérou a až v průběhu této zástavy dochází k vyřazení druhé kopie *p53*- genu (LOH), což se u malé části buněk projeví jako zotavení se z proliferční zástavy (35). Je tudíž docela dobře možné a bylo by i logické očekávat, že za reálných podmínek *in vivo* vede aktivací *ras*-mutace k zástavě proliferace, ovšem buňka je schopna v tomto senescenci podobném stavu čekat měsíce a třeba i roky (což může být usnadněno rezistencí senescentních buněk vůči apoptóze), nedojde-li k mutačnímu vyřazení tumorových supresorových genů, a v tom případě znovu zahájí proliferaci, nyní již ve směru nádorové transformace (70).

### Myc

Již od začátku 80. let je známo, že *ras* není schopen sám transformovat primární myší fibroblasty a že potřebuje kooperaci některého z onkogenů DNA-tumorových virů či vyřazení tumorových supresorových proteinů jiným způsobem, např. použitím dominantních negativních konstruktů (vysvětlení bylo právě podáno). Existuje zde ovšem jedna výjimka, kdy je efektivní kooperace schopen jiný buněčný onkogen, a to právě *myc* (71). *Myc* tedy představuje zcela vyjimečnou onkogenní rodinu (*c-myc*, *L-myc*, *N-myc*); funkčně se jedná o jaderné transkripční faktory, které v heterodimerické podobě v komplexu s proteinem zvaným max regulují expresi sady efektorových genů nesoucích ve svých regulačních oblastech příslušnou rozpoznávací vazebnou sekvenci (snad ve všech případech genů přímo regulovaných *myc*/max dimerem se jedná o downstream-regulační sekvence, které nejsou lokalizovány v promotoru jako obvykle, nýbrž uvnitř genu, zpravidla v prvním intronu). *Myc* je také v tom neobvyklý, že dokáže jak aktivovat, tak i reprimovat expresi cílových genů; obecně se dá ovšem říci, že *myc* působí jako transkripční aktivátor, celý protein je ovšem výrazně slabším aktivátorem, než chimerické konstrukty transaktivací domény *myc* a nějaké jiné DNA-vazebné domény (např. kvasničného faktoru GAL-4), z čehož se usuzuje, že se někde uvnitř *myc* proteinu nachází negativní regulační doména zeslabující sílu transaktivace (72). *Myc*-faktory obecně působí jako proliferaci-stimulující proteiny, v průběhu diferenciace, kdy dochází k přirozenému omezení proliferace buněk, je *myc* vystřídán skupinou faktorů *mad* (funkční entitou jsou tedy *mad*/max heterodimery); *mad*-faktory přitom působí jako aktivní transkripční represory (73).



**Obr. 4.** Důsledky aktivace *myc*-onkogenu během nádorové progresse. Myc působí jako transkripční faktor, který je schopen jak aktivace (+), tak i represe (-) cílových genů. Důsledkem jsou změny v úrovni exprese řady genů působících během celé dráhy karcinogeneze.

*Myc*-onkogeny patří spolu s *ras* k nejčastěji mutovaným buněčným onkogenům; na rozdíl od *ras* zde ovšem převážná část mutací postihuje expresi a jejím výsledkem je tedy neregulovaná vysoká exprese sekvenčně nezměněného onkogenu, například jako důsledek chromozomální translokace do blízkosti aktivního transkripčního enhanceru nebo genové amplifikace (65). Onkogenní účinek *myc*-faktoru se odvíjí po celé dráze nádorové progresse (obr. 4), včetně překonání přirozených proliferčních bariér senescence a krize. Myc reprimuje expresi genů pro p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup> (74) a jiný inhibitor postupu buněčným cyklem gadd45 (75), naopak aktivuje expresi fosfatázy buněčného cyklu (nutné pro aktivaci cyklin-dependentních kináz) cdc25 (76) a cyklinu D (74) (čím vyšší je exprese cyklinu D, tím lze očekávat relativní utlumení efektu p16<sup>INK4a</sup>). Tím vším *myc* bezprostředně podporuje proliferaci a přispívá k překonání senescentní bariéry. Myc ovšem stejnou měrou přispívá i k překonání krize, neboť bezprostředně aktivuje expresi genu pro katalytickou podjednotku telomerázy (30, 77, 78) (maď tuto expresi naopak reprimuje - 79). Onkogenní působení *myc*-faktoru se ovšem odvíjí i na dalších úrovních nádorové progresse; *myc* bezprostředně podporuje nádorovou angiogenezi repressí exprese jednoho s inhibitorů angiogeneze, trombospondinu - I (80), a rovněž může přispět k úniku z imunitního dozoru repressí exprese *HLA*-genů I. třídy (81). Je přitom zajímavé, že nejméně ve třech případech přímo reprimovaných genů (p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>, gadd45, *tsp-1*) se jedná o geny přímo aktivované tumorovým supresorovým proteinem p53 (24); vzájemná transkripční interference p53 a *myc* by představovala nepochybně velmi zajímavý vědecký projekt.

Vztah *myc* a p53 není ovšem vyhraněně negativní, naopak. Myc stojí vůči p53 v podobném vztahu jako *ras*, ovšem nikoli vzhledem k senescenci, nýbrž vzhledem k apoptóze. Myc je totiž vedle svých dalších efektů rovněž schopen indukovat apoptózu, zejména v odpověď na protichůdné mitogenní signály (v experimentech nejčastěji simulované tak, že nadměrná ektopická exprese *myc* je kombinována s kultivací buněk bez přítomnosti séra - 72). Myc-indukovaná apoptóza je zprostředkována a plně závislá na p53; *myc* bezprostředně aktivuje expresi p53-genu jakož i p14<sup>ARF</sup> (82). Odtud pochází další

seleční tlak na eliminaci p53- a p14<sup>ARF</sup>-p16<sup>INK4a</sup>- lokusů. Jedná se tedy o mechanismus velmi analogický předčasné senescenci indukované *ras* - protichůdná mitogenní signalizace (např. amplifikace *myc*-onkogenu bez současné mitogenní signalizace růstovými faktory v prostředí) normálně indukuje rychlou apoptózu, avšak na pozadí nulovém pro p53-gen je buňkou interpretována jako čistě mitogenní signál (70).

Jestliže se p53 přímo účastní jak senescence, tak apoptózy, přičemž oba dva procesy představují sice ekvivalentní, nicméně navzájem neslučitelné protinádorové bariéry, co rozhoduje o tom, kterým směrem má p53 regulovat buněčnou odpověď? Tato otázka zůstává dosud nezodpovězena, zdá se, že odpověď buňky je výslednicí řady faktorů, jako je např. buněčný typ, buněčný kontext, celkové hormonální prostředí atp. (24).

### Telomeráza

Překonání krize a imortalizace je v ~85% případů spojeno či dokonce podmíněno aktivací enzymu telomeráza - jak již bylo výše naznačeno, tato aktivace může být buď přímá, jako je tomu v případě amplifikace *myc*-onkogenu, nebo se může jednat spíše o derepresi, kterou musíme mít na mysli v případě chromozomálních přestaveb zahrnujících oblast 3p nesoucí represor telomerázy. Klinické důsledky aktivace telomerázy jsou předmětem četných přehledných článků (9, 83, 84, 85) a na tomto místě se proto omezíme pouze na dva aspekty dotýkající se bezprostředně našeho tématu, t.j. postavení senescence v procesu tumorigenní transformace. Za prvé, telomeráza je pokládána za velmi slibný cíl protinádorové terapie. Argumentuje se přitom jednak výraznou tkáňovou specificitou exprese telomerázy - telomeráza je ve většině somatických tkání reprimována, k expresi dochází v buňkách germinální linie a v tzv. kmenových buňkách, včetně hematopoetických, a v některých na proliferaci náročných buněčných typech, jako jsou aktivované lymfocyty. Z hlediska specificity by proto inhibitory telomeráz neměly vykazovat vyšší obecnou toxicitu než např. cytostatika. Druhým argumentem ve prospěch vyvoje těchto léků je pozorování, že většina nádorů nese, i přes telomerázovou aktivitu, kratší telomery než odpovídající somatické buňky. Bylo předloženo několik možných vysvětlení tohoto pozorování - je možné, že je to důsledek pozdní akti-

vace telomerázy při překonání krize, je ovšem také možné, že nádor vzniká z kmenové buňky, která exprimuje telomerázu, ovšem na úrovni nedostatečné pro udržení délky telomer za podmínek intenzivní proliferace. Efektivita enzymu je ovšem negativně korelována s délkou telomery; je tudíž možné, že telomerázová aktivita v kmenové buňce nestačí zabránit destrukci původní délky telomery, je ovšem dostatečná pro stabilizaci zkrácené telomery ve výsledném nádoru (62, 84). Ať už je příčina zkrácených telomer nalézáných ve většině nádorů jakákoli, uvažuje se v tom smyslu, že inhibice telomerázy by vzhledem ke kratším telomerám mohla vést u nádoru podstatně dříve k proliferacímu arestu než u kmenových buněk. Téměř vždy ovšem tyto úvahy zapomínají vzít v potaz skutečnost (85), že důsledky inhibice telomerázy v nádorové a kmenové buňce budou principiálně odchylné. U kmenové buňky bude výsledkem inhibice telomerázy senescence, kterou spustí signál poškození DNA po kritickém zkrácení délky telomer. Naproti tomu nádorové buňky v naprosté většině případů již překonaly senescenční bariéru v průběhu nádorové progresu vyřazením molekulárních mediátorů senescence a inhibice telomerázy zde může vést k jedinému myslitelnému důsledku - krizi. Jinými slovy, nádorová buňka disponuje dodatečným povoleným proliferacímu prostorem ve srovnání

s kmenovou buňkou. Dá se proto očekávat, že inhibitory telomerázy bude nutné aplikovat individuálně, po stanovení délky telomer daného nádoru a kmenových buněk daného pacienta.

V předchozím textu jsme se již dotkli i druhého aspektu, který bychom rádi zmínili. Jedná se o případy tzv. buněčné terapie, v nejjednodušší podobě na příkladu transplantace kostní dřeně či přímo hematopoetických kmenových buněk. Taková transplantace je spojena s expanzí čili masivní proliferací transplantované buněčné populace, která i přes telomerázovou aktivitu kmenových buněk vede k destrukci telomer a "zestárnutí" transplantátu (86). V takových případech by bylo velmi výhodné umět telomerázovou aktivitu zvýšit. Rovněž zde je na místě opatrný přístup. Třebaže telomeráza není sama o sobě onkogenem, poněvadž nespouští buněčnou proliferaci, pouze ji umožňuje, telomeráza je schopna s onkogeny v procesu nádorové transformace kooperovat (87). Zjistilo se rovněž, že immortalizace ektopickou expresí katalytické podjednotky telomerázy neznámým způsobem aktivuje *myc*-onkogen (88), se zhora podrobně specifikovanými možnými důsledky. Dá se proto předpokládat, že praktickému uplatnění "řízené" exprese telomerázy v buněčných transplantátech musí ještě předcházet základní experimentální práce.

## Literatura

1. Stevenson H., Gazdar A.F., Phelps R., Linnoila R.L., Ihde D.C., Ghosh B., Walsh T., Woods E.L., O'Connell T., Makuch R., Kramer B.S., Mulshine J.L.: Tumor cell lines establishment *in vitro*: An independent prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Ann Intern Med.* 113, 1990, 764-770.
2. Pecoraro G., Morgan D., Defendi V.: Differential effects of human papillomavirus type 6, 16 and 18 DNAs on immortalization and transformation of human cervical epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 86, 1989, 563-567.
3. Woodworth C.D., Doniger J., DiPaolo J.A.: Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *J.Virol.* 63, 1989, 159-164.
4. Paraskeva C., Corfield A.P., Harper S., Hague A., Audeant K., Williams A.C.: Colorectal carcinogenesis: Sequential steps in the *in vitro* immortalization and transformation of human colonic epithelial cells (Review). *Anticanc. Res.* 10, 1990, 1189-2000.
5. Williams A.C., Hague A., Manning A.M., van der Stappen J.W., Paraskeva C.: *In vitro* models of human colorectal cancer. *Canc. Surv.* 16, 1993, 15-29.
6. Freshney R.L.: The transformed phenotype. In: *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques*, 3rd ed. (R.L.Freshney ed.) Wiley-Liss 1994, s.231-241.
7. Park M.: Oncogenes: Genetic abnormalities of cell growth. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th ed. (C.R.Scriver, A.L.Beaudet, W.S.Sly, D.Valle, J.B.Stansbury, J.B.Wyngaarden, D.S.Fredrickson eds.) McGraw-Hill Inc. 1995, s.589-611.
8. Trbušek M., Vojtěšek B.: Protein MDM-2 a nádorová onemocnění. *Klin.onkol.* 11, 1998, 144-146.
9. Šimičková M., Cernoch M.: Význam stanovení aktivity telomerázy v onkologii. *Klin.onkol.* 12, 1999, 73-77.
10. Pospíšilová Š., Vojtěšek B.: Protein p21<sup>WAF1</sup> a jeho úloha v regulaci buněčného cyklu. *Klin.onkol.* 13, 2000, 13-16.
11. Hayflick L., Moorhead P.S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp.Cell Res.* 25, 1961, 585-621.
12. Hayflick L.: The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp.Cell Res.* 37, 1965, 614-636.
13. Hayflick L.: Une brève histoire de la découverte de la mortalité et de l'immortalité cellulaire et de son influence sur nos conceptions concernant le vieillissement et le cancer. *Path.Biol.* 47, 1999, 1094-1104.
14. Duncan E.L., Reddel R.R.: Genetic changes associated with immortalization. A review. *Biochemistry (Moscow)*, 11, 1997, 1263-1274.
15. Gire V., Wynford-Thomas D.: La sénescence dans les cellules humaines: un obstacle au développement tumoral. *Médecine/Sciences*. 15, 1999, 1096-1104.
16. Girardi A.J., Jensen F.C., Koprowski H.: SV40-induced transformation of human diploid cells: crisis and recovery. *J.Cell.Comp.Physiol.* 65, 1965, 69-84.
17. Sugimoto M., Ide T., Goto M., Furuichi Y.: Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *Mechan.Ageing Devel.* 107, 1999, 51-60.
18. Wei W., Sedivy J.M.: Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. *Exp.Cell Res.* 253, 1999, 519-522.
19. Bond J.A., Houghton M.F., Rowson J.M., Smith P.J., Gire V., Wynford-Thomas D., Wyllie F.S.: Control of replicative life span in human cells: Barriers to clonal expansion intermediate between M1 senescence and M2 crisis. *Mol.Cell.Biol.* 19, 1999, 3103-3114.
20. Kiyono T., Foster S.A., Koop J.L., McDougall J.K., Galloway D.A., Klingelhuiz A.J.: Both Rb/p16<sup>INK4a</sup> inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*. 396, 1998, 84-88.
21. Johnson D.G., Walker C.L.: Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 39, 1999, 295-312.
22. Band V.: The role of retinoblastoma and p53 tumor suppressor pathways in human mammary epithelial cell immortalization (Review). *Int.J.Oncol.* 12, 1998, 499-507.
23. Haber D.A.: Splicing into senescence: The curious case of p16 and p19<sup>ARF</sup>. *Cell*, 91, 1997, 555-558.
24. Ryan K.M., Vousden K.H.: Regulation of cell growth and death by p53. In: *Signaling networks and cell cycle control: The molecular basis of cancer and other diseases*. (J.S.Gutkind ed.) Humana Press Inc 1999, s. 411-427.
25. Waga S., Hannon G.J., Beach D., Stillman B.: The p21 inhibitor of cyclin dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 369, 1994, 574-578.
26. Chen J., Jackson P.K., Kirschner M.W., Dutta A.: Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*. 374, 1995, 386-388.
27. Luo Y., Hurwitz J., Massagué J.: Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21<sup>Cip1</sup>. *Nature*. 375, 1995, 159-161.
28. Reddel R.R.: A reassessment of the telomere hypothesis of senescence. *BioEssays*, 20, 1998, 977-984.
29. Chiu C.-P., Harley C.B.: Replicative senescence and cell immortality: The role of telomeres and telomerase. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 214, 1997, 99-106.
30. Cerni C.: Telomeres, telomerase and *myc*. An update. *Mutation Res.* 462, 2000, 31-47.
31. Martens U.M., Chavez E.A., Poon S.S.S., Chmoo C., Lansdorf P.M.: Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp.Cell Res.* 256, 2000, 291-299.
32. Vaziri H., Benchimol S.: Alternative pathways for the extension of cellular life span: inactivation of p53/pRb and expression of telomerase. *Oncogene*, 18, 1999, 7676-7680.
33. Chin L., Artandi S.E., Shen Q., Tam A., Lee S.-I., Gottlieb G.J., Greider C.W., DePinho R.A.: p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell*, 97, 1999, 527-538.
34. Young J., Smith J.R.: Epigenetic aspects of cellular senescence. *Exp.Gerontol.* 35, 2000, 23-32.
35. Rogan E.M., Bryan T.M., Hukku B., Maclean K., Chang A.C., Moy E.L., Englezou A., Warnford S.G., Dalla-Pozza I., Reddel R.R.: Alterations in p53 and p16<sup>INK4a</sup> expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol.Cell.Biol.* 15, 1995, 4745-4753.
36. Noble J.R., Rogan E.M., Neumann A.A., Maclean K., Bryan T.M., Reddel R.R.: Association of extended *in vitro* proliferative potential with loss of p16<sup>INK4a</sup> expression. *Oncogene*, 13, 1996, 1259-1268.
37. Brown J.P., Wei W., Sedivy J.M.: Bypass of senescence after disruption of p21<sup>Cip1/WAF1</sup> gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*. 277, 1997, 831-834.



38. Huschtscha L.I., Reddel R.R.: p16<sup>INK4a</sup> and the control of cellular proliferative life span. *Carcinogenesis*, 20, 1999, 921-926.
39. Greider C.W.: Telomerase activation - one step on the road to cancer? *Trends Genet.*, 15, 1999, 109-112.
40. Muggleton-Harris A., DeSimone D.: Replicative potential of various fusion products between WI-38 and SV40 transformed WI-38 cells and their components. *Somat.Cell Genet.*, 6, 1980, 689-698.
41. Pereira-Smith O.M., Smith J.R.: The phenotype of low proliferative potential is dominant in hybrids of normal human fibroblasts. *Somat.Cell Genet.*, 8, 1982, 731-742.
42. Pereira-Smith O.M., Smith J.R.: Evidence for the recessive nature of cellular immortality. *Science*, 221, 1983, 964-966.
43. Pereira-Smith O.M., Smith J.R.: Genetic analysis of indefinite division in human cells: identification of four complementation groups. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 85, 1988, 6042-6046.
44. Shay J.W.: Toward identifying a cellular determinant of telomerase repression. *J.Natl.Canc.Inst.*, 91, 1999, 4-6.
45. Ran Q., Pereira-Smith M.: Genetic approaches to the study of replicative senescence. *Exp.Gerontol.*, 35, 2000, 7-13.
46. Black D.M.: Characterization of a multi-tissue tumour suppressor and senescence gene. *Br.J.Cancer*, 80 (Suppl 1), 1999, 42-45.
47. Steiner M.S., Zhang Y., Farooq F., Lerner J., Wang Y., Lu Y.: Adenoviral vector containing wild-type p16 suppresses prostate cancer growth and prolongs survival by inducing cell senescence. *Canc.Gene Therap.*, 7, 2000, 360-372.
48. Tanaka H., Horikawa W., Kugoh H., Shimizu M., Barrett J.C., Oshimura M.: Telomerase-independent senescence of human immortal cells induced by microcell-mediated chromosome transfer. *Mol.Carcinogen.*, 25, 1999, 249-255.
49. Banga S.S., Kim S., Hubbard K., Dasgupta T., Jha K.K., Patsialis P., Hauptschein R., Gamberi B., Dalla-Favera R., Kraemer P., Ozer H.L.: SEN6, a locus for SV40-mediated immortalization of human cells, maps to 6q26-27. *Oncogene*, 14, 1997, 313-321.
50. Loughran O., Clark L.J., Bond J., Baker A., Berry I.J., Edington K.G., Ly I.-S., Simmons R., Haw R., Black D.M., Newbold R.F., Parkinson E.K.: Evidence for the inactivation of multiple replicative lifespan genes in immortal human squamous cell carcinoma keratinocytes. *Oncogene*, 14, 1997, 1955-1964.
51. Reddy D.E., Sandhu A.K., DeRiel J.K., Athwal R.S., Kaur G.P.: Identification of a gene at 16q24.3 that restores cellular senescence in immortal mammary tumor cells. *Oncogene*, 18, 1999, 5100-5107.
52. Bertram M.J., Bérubé N.G., Hang-Swanson X., Ran Q., Leung J.K., Bryce S., Spurgers K., Bick R.J., Baldini A., Ning Y., Clark L.J., Parkinson E.K., Barrett J.C., Smith J.R., Pereira-Smith O.M.: Identification of a gene that reverses the immortal phenotype of a subset of cells and is a member of a novel family of transcription factor-like genes. *Mol.Cell.Biol.*, 19, 1999, 1479-1485.
53. Bryce S.D., Forsyth N.R., Fitzsimmons S.A., Clark L.J., Bertram M.J., Cuthbert A.P., Newbold R.F., Pereira-Smith O.M., Parkinson E.K.: Genetic and functional analyses exclude Mortality Factor 4 (MORF4) as a keratinocyte senescence gene. *Canc.Res.*, 59, 1999, 2038-2040.
54. Cuthbert A.P., Bond J., Trott D.A., Gill S., Broni J., Marriot A., Khoudoli G., Parkinson E.K., Cooper C.S., Newbold R.F.: Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *J.Natl.Canc.Inst.*, 91, 1999, 37-45.
55. Wheaton K., Atadja P., Riabowol K.: Regulation of transcription factor activity during cellular aging. *Biochem.Cell Biol.*, 74, 1996, 523-534.
56. Da Silva L.D.C.G., Hu Y.F., Russo I.H., Ao X., Salicioni A.M., Yang X., Rosso J.: S100P calcium-binding protein overexpression is associated with immortalization of human breast epithelial cells *in vitro* and early stages of breast cancer development *in vivo*. *Int.J.Oncol.*, 16, 2000, 231-240.
57. Schonning B., Bévort M., Mikkelsen S., Andresen M., Thomsen P., Leffers H., Norrild B.: Human papillomavirus type 16 E7-regulated genes: regulation of S100P and ADP/ATP carrier protein genes identified by differential-display technology. *J.Gen.Virol.*, 81, 2000, 1009-1015.
58. Grillari J., Hohenwarter O., Grabherr R.M., Katinger H.: Subtractive hybridization of mRNA from early passage and senescent endothelial cells. *Exp.Gerontol.*, 35, 2000, 187-197.
59. Shelton D.N., Chang E., Whittier P.S., Choi D., Funk W.D.: Microarray analysis of replicative senescence. *Curr.Biol.*, 9, 1999, 939-945.
60. Sharpless N.E., DePinho R.A.: The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr.Opin.Gen.Devel.*, 9, 1999, 22-30.
61. Reddel R.R.: The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21, 2000, 477-484.
62. Wynford-Thomas D.: Cellular senescence and cancer. *J.Pathol.*, 187, 1999, 100-111.
63. Briand P., Kahn A., Vandewalle A.: Targeted oncogenesis: A powerful method to derive renal cell lines. *Kidney Intern.*, 47, 1995, 388-394.
64. Namba M., Tsuji T.: Early events during neoplastic transformation of human cells *in vitro*: Genetic and biological aspects of immortalization. In: *Molecular Pathology of Early Cancer*. (S.Srivastava ed.) IOS Press, 1999, s.27-38.
65. Perkins A.S., Stern D.F.: Molecular biology of cancer: Oncogenes. In: *Cancer: Principles Practice of Oncology*, 5<sup>th</sup> ed. (V.T.deVita Jr., S.Hellman, S.A.Rosenberg eds.) Lippincott-Raven Publ., 1997, s.79-102.
66. Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W.: Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. *Cell*, 88, 1997, 593-602.
67. Malumbres M., De Castro I.P., Hernández M.L., Jiménez M., Corral F., Pellicer A.: Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15<sup>INK4b</sup>. *Mol.Cell.Biol.*, 20, 2000, 2915-2925.
68. Zhu J., Woods D., McMahon M., Bishop J.M.: Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic raf. *Genes Devel.*, 12, 1998, 2997-3007.
69. Lin A.W., Barradas M., Stone J.C., van Aelst L., Serrano M., Lowe S.W.: Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Devel.*, 12, 1998, 3008-3019.
70. Weinberg R.A.: The cat and mouse games that genes, viruses, and cells play. *Cell*, 88, 1997, 573-575.
71. Lüand H., Parada L.F., Weinberg R.A.: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, 304, 1983, 596-602.
72. Lscher B., Austen M., Sommer A., Hillenhaus S., Henriksson M.: Transcriptional regulation by the myc-max-mad network. In *Transcription Factors in Eukaryotes* (A.G.Papavassiliou ed.) Springer 1997, s.235-251.
73. McArthur G.A., Laherty C.D., Quéva C., Hurlin P.J., Loo L., James L., Grandori C., Gallant P., Shio Y., Hokanson W.C., Bush A.C., Cheng P.F., Lawrence Q.A., Pulverer B., Koskinen P.J., Foley K.P., Ayer D.E., Eisenman R.N.: The mad protein family links transcriptional repression to cell differentiation. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, 63, 1998, 423-433.
74. Collier H.A., Grandori C., Tamayo P., Colbert T., Lander E.S., Eisenman R.N., Golub T.R.: Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that myc regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 97, 2000, 3260-3265.
75. Marhin W.W., Chen S., Faecchini L.M., Fornace Jr. A.J., Penn L.Z.: Myc represses the growth arrest gene gadd45. *Oncogene*, 14, 1997, 2825-2834.
76. Galaktionov K., Chen X., Beach D.: Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*, 382, 1996, 511-517.
77. Wang J., Xie L.Y., Allan S., Beach D., Hannon G.J.: Myc activates telomerase. *Genes Devel.*, 12, 1998, 1769-1774.
78. Greenberg R.A., OHagan R.C., Deng H., Xiao Q., Hann S.R., Adams R.R., Lichtsteiner S., Chin L., Morin G.B., DePinho R.A.: Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene*, 18, 1999, 1219-1226.
79. Oh S., Song Y.-H., Yim J., Kim T.K.: Identification of mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene*, 19, 2000, 1485-1490.
80. Ngo C.V., Gee M., Akhtar N., Yu D., Volpert O., Auerbach R., Thomas-Tikhonenko A.: An *in vivo* function for the transforming myc protein: elicitation of the angiogenic phenotype. *Cell Growth Differentiat.*, 11, 2000, 201-210.
81. Israël A., Kourilsky P.: Regulation of MHC class I gene expression. In: *HLA and MHC: Genes, Molecules and Function*. (M.Browning, A.Michael eds.) BIOS Scient.Publ., 1996, s.139-157.
82. Zindy F., Eisen C.M., Randle D.H., Kamijo T., Cleveland J.L., Sherr C.J., Roussel M.F.: Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Devel.*, 12, 1998, 2424-2433.
83. Davis A.J., Siu L.L.: Telomerase: Therapeutic potential in cancer. *Canc.Investig.*, 18, 2000, 269-277.
84. Krupp G., Klapper W., Parwaresch R.: Cell proliferation, carcinogenesis and diverse mechanisms of telomerase regulation. *Cell.Mol.Life Sci.*, 57, 2000, 464-486.
85. Urquidí V., Tarín D., Goodison S.: Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis. *Annu.Rev.Med.*, 51, 2000, 65-79.
86. Wynn R.F., Cross M.A., Hutton C., Will A.M., Lashford L.S., Dexter T.M., Testa N.G.: Accelerated telomere shortening in young recipients of allogeneic bone-marrow transplants. *Lancet*, 351, 1998, 178-181.
87. Hahn W.C., Counter C.M., Lundberg A.S., Beijersbergen R.J., Brooks M.W., Weinberg R.A.: Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400, 1999, 464-468.
88. Wang J., Hannon G.J., Beach D.H.: Risky immortalization by telomerase. *Nature*, 405, 2000, 755-756.