

VZTAH MOTILITY A INVAZIVITY TRANSFORMOVANÝCH BUNĚK – MODEL H2-K/V-JUN FIBROSARKOMOVÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍ

RELATIONSHIP BETWEEN MOTILITY AND INVASIVENESS OF TRANSFORMED CELLS – A MODEL OF H2-K/V-JUN FIBROSARCOMA-DERIVED CELL LINES

PEYCHL J.#, HATINA J.*, REISCHIG J.*, ČERVINKA M.#

#UNIVERSITA KARLOVA, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ, ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOLOGIE
A GENETIKY

*UNIVERSITA KARLOVA, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Souhrn: Východiska: Invazivita nádorů představuje jeden z klíčových momentů metastatického procesu. Vlastní schopnost či neschopnost invaze je výslednicí několika dílčích fenotypů, zejména motility nádorových buněk a jejich schopnosti proteolytické degradace tkáňových bariér (bazální membrána, extracelulární matrix). Jednou z možností jak objasnit vztah komplexního invazivního fenotypu a jednotlivých dílčích fenotypů je vyjít z definované série nádorových buněčných linií vykazujících polymorfismus v uvedených fenotypových charakteristikách. **Typ studie:** Vyšli jsme z fibrosarkomu H2-K/v-jun transgenní myši a rozsáhlou manipulací v tkáňové kultuře jsme vytvořili sérii nádorových buněčných linií lišících se ve stupni vyjádření invazivního a motilitního fenotypu. **Metody a výsledky:** K odvození jednotlivých buněčných linií jsme využili kombinaci tří experimentálních strategií. 1. Buněčná heterogenita vstupního nádorového vzorku umožnila odvození základních buněčných linií JUN-1, -2 a -3. 2. Spontánní transformace v kontinuální kultuře umožnila rozlišit sublinie odvozené z buněčných linií JUN-1 a JUN-2. 3. Stablní transfekce expresního vektoru pro onkogen *c-fos* dala vznik klonům u různých sublinií JUN-1 a JUN-2. Všechny buněčné linie, sublinie a klony byly fenotypicky charakterizovány jednak na úrovni invazivity testem invaze do Matrigelu, jednak na úrovni motility testem hojení rány *in vitro*. **Závěry:** H2-K/v-jun série fibrosarkomových buněčných linií představuje experimentální nástroj pro studium nádorové motility a invazivity, a to jak ve vzájemné závislosti v rámci komplexního invazivního fenotypu, tak i navzájem nezávisle, a jako taková představuje vhodný vstup do dalších projektů zaměřených na molekulární analýzu nádorové invazivity.

Klíčová slova: nádorové buněčné linie, invazivita, motilita

Summary: Backgrounds: Tumour invasiveness represents one of the key points in the metastatic process. The ability of invasion or a lack thereof result from interplay of several intermediate phenotypes, like cellular motility or an ability of proteolytic degradation of tissue barriers (basement membrane, extracellular matrix). One of the possibilities how to define a relationship between the invasiveness as a complex phenotype and the respective intermediate phenotypes is to analyze a defined tumour cell line series, with a relevant phenotypic polymorphism among individual cell lines. **Design:** We used a fibrosarcoma developed in the H2-K/v-jun transgenic mouse and by means of an extensive manipulation in tissue culture we generated a series of cell lines polymorphic in the expression of the invasive and motile phenotype. **Methods and Results:** In establishing the series, three chief principles were exploited. 1. Cellular heterogeneity within the original tumour sample was used to derive the founder cell lines JUN-1, -2, and -3. 2. Spontaneous transformation upon continuous culture made it possible to distinguish sublines derived from the cell lines JUN-1 and JUN-2. 3. Stable transfection of an expression vector for the *c-fos* oncogene gave rise to an array of clones from individual JUN-1- and JUN-2- derived sublines. All the cell lines, sublines, and stably transfected clones were characterized in terms of invasiveness, by means of the Matrigel invasion assay, and as to the motility, by means of the *in vitro* wound healing assay. **Conclusions:** The complete series of H2-K/v-jun fibrosarcoma-derived cell lines enables to regard invasiveness and motility either as integral parts of a common phenotype, or independently of each other. As such, the series provides a convenient input into studies aimed at molecular characterization of invasive phenotype.

Key words: tumour cell culture, invasiveness, motility

Úvod

Rozhodující část mortality v souvislosti s nádorovými onemocněními připadá na vrub metastatické kapacity nádorových buněk v pokročilých fázích nádorové transformace. Samotná metastatická kaskáda zahrnuje přesně sladěný sled několika událostí. Na samotném počátku musí být buňka schopna opustit primární nádor a současnou destrukcí tkáňových bariér (bazální membrána, extracelulární matrix) a aktivní lokomoce dosáhnout krevní nebo lymfatické kapiláry. Tato počáteční invaze a lokomoce plynule přechází v intravazaci do krevního nebo lymfatického řečiště, která je opět provázena destruk-

cí bazální membrány endotelu. Nádorová buňka pak musí být schopna na určitém místě z krevního nebo lymfatického oběhu vystoupit a znovu zahájit proliferaci na sekundárním místě. Toto je klasický průběh metastatické kaskády (1,2).

V naší práci se soustředíme na samotný počátek celého metastatického procesu, tj. nádorovou motilitu a invazivitu. Ukazuje se, že vztah mezi oběma těmito procesy bývá nezdědká obtížné definovat. V řadě prací jsou pojmy „migration“, „motility“, „movement“ a „invasion“ užívány v zásadě synonymně. Je jasné, že invazivní buňka musí být zároveň motilitní, zároveň ovšem také platí, že samotná schopnost motility ještě nevysti-

huje celý rozsah vlastností charakterizujících invazivní fenotyp. Nedílnou součástí invazivního fenotypu je schopnost proteolytické destrukce biologických bariér (2,3). V naší práci proto nazýváme na nádorovou invazivitu jako na jakýsi zastrešující a komplexní fenotyp, který je možné rozložit do přinejmenším dvou dílčích intermediárních fenotypů . schopnosti aktivního pohybu (motility) a schopnosti proteolytického útoku vůči bazální membráně a extracelulární matrix.

Jednou z možností, jak studovat a na molekulární úrovni charakterizovat různé aspekty transformovaného fenotypu včetně motility a invazivity je odvodit určitou definovanou sestavu nádorových buněčných linií, pokrývající co nejširší část vývoje a progresu nádoru. Existuje několik strategií odvození takové uspořádané série buněčných linií. Je například možné odvodit buněčné linie z různých stádií vývoje nádoru (např. primárního nádoru a metastázy) u téhož pacienta (4). Je samozřejmě také možné využít principu nádorové heterogenity a odvodit několik buněčných linií reprezentujících různé etapy nádorové progresu z jediného nádoru (5). Jinou strategií je odvodit v první fázi z daného nádoru jedinou buněčnou linii a sérii buněčných linií kryjících určitou část nádorové progresu odvodit různými postupy *in vitro* transformace této výchozí buněčné linie. Tato transformace může probíhat spontánně při dlouhodobé nepřetržité kultivaci, nebo může být specificky směřována např. mutagenézí, genovou manipulací či opakovaným převedením do stavu nádoru *in vivo* ve vhodném zvířecím hostiteli. Příkladem takto vytvořených komplexních sérií nádorových buněčných linií jsou lidské série MCF-10a HMT-3522 nádoru prsu (6,7), série krysích buněčných linií odvozených ze spontánního karcinomu prostaty (Dunning rat prostatic carcinoma series) (8) nebo QRSP-série myších fibrosarkomových linií (9).

Cíl práce

Cílem naší práce bylo odvození nové původní série buněčných linií, a to původu fibrosarkomu vytvářejícího se v reakci na hluboké poranění u H2-K/v-jun transgenní myši (10). Jednotlivé buněčné linie byly odvozeny kombinací shora naznačených experimentálních strategií. Základní linie (JUN-1, -2 a -3) odrážejí vstupní nádorovou heterogenitu. Další sublinie byly odvozeny kontinuální kultivací a stabilní transfekcí kooperujícího onkogenu. Jednotlivé buněčné linie a sublinie byly charakterizovány z hlediska motility a invazivity, což nám umožnilo přesněji vymezit podíl intermediárních fenotypů na komplexním invazivním fenotypu.

Metody

Vstupní nádorový vzorek

H2-K/v-jun transgenní myši byly laskavě poskytnuty Dr. Martinem Breitmanem (Samuel Lunenfeld Research Institute, University of Ontario, Kanada). U této transgenní myši se v reakci na hluboké poranění, jako je biopsie ocasu, vytváří lokálně invazivní nemetastazující fibrosarkom (10). Buněčné linie JUN-1 a JUN-2 byly odvozeny z téhož fibrosarkomu vyvíjejícího se po dobu 7 měsíců od biopsie ocasu, buněčná linie JUN-3 byla odvozena z následujícího fibrosarkomu téže transgenní myši, jenž se vyvíjel po dobu 11 měsíců.

Plasmidy

CMV-*c-fos* expresní vektor byl laskavě poskytnut Dr. Charlese Vinsonem (National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda U.S.A.) (11), pSTneoB vektor byl laskavě poskytnut Dr. Petrem Dráberem (Ústav molekulární genetiky AV ČR v Praze) (12). Plasmidy byly purifikovány systémem Nucleobond Plasmid Purification Kit fy Clontech, podle pokynů udaných výrobcem.

Základní buněčná kultura

Nádor byl mechanicky rozmělněn na kousky o přibližné velikosti 1 mm³, které byly přímo naneseny na dno kultivační mis-

ky. Kultivace byla prováděna v médiu DMEM (Sigma) doplněném fetálním telecím sérem (Sigma) na výslednou koncentraci 10 % a antibiotiky penicilinem (výsledně 100 U/ml) a streptomycinem (výsledně 100 µg /ml) (BioWhittaker). Všechny buněčné linie byly odvozeny z primární nádorové kultury odpíchnutím izolovaně rostoucí kolonie žlutou mikropipetovou špičkou pod inverzním mikroskopem po předchozí krátkodobé trypsinizaci příslušné kolonie.

Odvození stabilně transfektovaných klonů

Stabilně transfektované klony nesoucí CMV-*c-fos* expresní vektor byly odvozeny z linie JUN-1 po 40 buněčných generacích v kultuře (population doubling –PD) a 200 PD a z buněčné linie JUN-2 po 200 PD kontinuální kultury. Transfekce byla provedena kalcium-fosfátovou precipitační metodou prostřednictvím systému CalPhos Transfection Kit fy Clontech, podle pokynů výrobce. Subkonfluentní buněčná kultura na 100 mm- kultivační misce byla přítomně transfektována směsí 10 µg CMV-*c-fos* a 1 µg pSTneoB. Selektce byla provedena kultivačním médiem doplněným antibiotikem G418 (Sigma) ve výsledné koncentraci 500 µg/ml. Odvození individuálních stabilně transfektovaných klonů bylo provedeno totožně jako izolace původních linií z primární nádorové kultury.

Test motility

Buněčná motilita byla analyzována jako tzv. test hojení rány *in vitro* (*in vitro* wound healing assay). Podstatou je mechanické narušení konfluentní buněčné kultury, čímž dochází k uvolnění kontaktní inhibice pohybu a buňky na okrajích rány mohou migrovat do uvolněného prostoru. Průběh této migrace je pozorován v pravidelných časových intervalech a fotograficky zaznamenáván. Vyhodnocení buněčné motility bylo provedeno po 11 hodinách hojení rány, a to přiřazením dané buněčné linie, sublinie či klonu do jedné z následujících kategorií : –: žádná aktivita +: sporadická aktivita undulujících membrán (ruffling) na okrajích rány ++: uniformní aktivita undulujících membrán (ruffling) na okrajích rány +++: sporadický pohyb buněk do prostoru rány ++++: uniformní pohyb buněk do prostoru rány spojený se změnou jejich uspořádání do polohy kolmé k ose rány (viz Tabulka 1.).

Test invazivity

Invazivita byla analyzována prostřednictvím testu invaze do Matrigelu (BD BioCoat Matrigel Invasion chamber – Becton Dickinson), podle pokynů udaných výrobcem. Test vychází z modifikované Boydenovy komůrky, jejíž horní a dolní kompartment je oddělen membránou s mikropóry o průměru 8 µm. Tato membrána je pokryta vrstvou Matrigelu, který slouží jako model extracelulární matrix či bazální membrány (13). Buňky se nanášejí v jednobuněčné suspenzi do horního kompartmentu a mají-li invazivní schopnost, jsou schopny překonat vrstvu Matrigelu, projít mikropóry membrány a adherovat na její opačné straně. Zde jsou pak fixovány, obarveny a kvantifikovány. V našem případě byla kvantifikace provedena přímým počítáním invadujících buněk pod inverzním mikroskopem, přičemž jako vyjádření invazivity jsme použili součet invadujících buněk z pěti náhodně vybraných optických polí inverzního mikroskopu, s použitím 15-krát zvětšujícího objektivu. Každá linie, sublinie či klon byly analyzovány v triplikátu.

Výsledky

Ze dvou fibrosarkomů indukovaných u jedné a téže transgenní myši se podařilo celkem odvodit tři buněčné linie JUN-1, JUN-2 a JUN-3. Analýza motility a invazivity byla provedena po 100 PD v kontinuální kultuře a odhalila značné rozdíly v obou těchto charakteristikách. Buněčná linie JUN-2 byla málo motilní a neinvazivní, buněčná linie JUN-3 byla naopak velmi motilní a invazivní a u linie JUN-1 byla motilita a invazivita intermediární mezi oběma zbylými vyhraněnými buněčnými liniemi.

Tabulka 1: Korelace motility a invazivity v sérii fibrosarkomových buněčných linií odvozených z H2-K/v-jun transgenní myši*.

Buněčná linie	Motilita	Invazivita
JUN1(40)	+	52±10
JUN1(100)	+++	599±125
JUN1(200)	++++	4659±403
JUN2(40)	-	130±27
JUN2(200)	+++	244±36
JUN3(100)	++++	300±210
JUN1(40)fos1	+++	166±23
JUN1(40)fos2	-	109±64
JUN1(40)fos4	++++	308±102
JUN1(200)fos4	-	1747±133
JUN1(200)fos6	+	1946±109
JUN1(200)fos8	++	2175±279
JUN2(200)fos3	++++	772±152
JUN2(200)fos4	+++	231±25
JUN2(200)fos7	++	93±13
JUN2(200)fos10	-	91±27

*JUN-1, -2 a -3 představují základní klonální fibrosarkomové buněčné linie, číslo v závorce udává počet buněčných generací v tkáňové kultuře a fos1 až fos10 označuje konkrétní stabilně transfektované klony nesoucí CMC-*c-fos* expresní vektor. Úroveň motility byla analyzována prostřednictvím testu hojení rány in vitro 11 hodin po zavedení rány do konfluentního buněčné kultury, přičemž jsme rozlišili pět úrovní: -: žádná aktivita +: sporadická aktivita undulujících membrán (ruffling) na okrajích rány ++: uniformní aktivita undulujících membrán (ruffling) na okrajích rány +++: sporadický pohyb buněk do prostoru rány ++++: uniformní pohyb buněk do prostoru rány spojený se změnou jejich uspořádání do polohy kolmé k ose rány. Invazivita byla analyzována jako test invaze do Matrigelu. Kvantifikace představuje součet invadujících buněk z pěti náhodně vybraných optických polí inverzního mikroskopu, s použitím 15-krát zvětšujícího objektivu. Každá buněčná linie či klon byly analyzovány v triplicátu a invazivita je vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka.

Buněčná linie JUN-1 byla ovšem předmětem intenzivní transformace v průběhu kontinuální kultury. Byla-li analyzována po 40 PD v kultuře, vykazovala nízkou motilitu a byla neinvazivní, srovnatelná s linií JUN-2(PD100). Naopak po 200 PD se linie JUN-1 ukázala jako intenzivně motilitní a invazivní, srovnatelná s buňkami JUN-3(PD100). Principiálně podobný fenotypový posun byl u buněk linie JUN-2 s ohledem na buněčnou motilitu, která se po 200 PD v nepetržité kultuře zřetelně zvýšila, buňky ovšem stále zůstaly neschopny invaze do Matrigelu.

Ze sublinií JUN-1(PD40), JUN-1(PD200) a JUN-2(PD200) jsme odvodili sadu stabilně transformovaných klonů nesoucích expresní vektor kódující onkoprotein *c-fos*; původní buněčné linie byly odvozeny z transgenní myši exprimující onkogen *v-jun* pod kontrolou promotoru genu hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy *H2-K^b* (10), přičemž rodiny onkoproteinů *jun* a *fos* heterodimerizují – vzniklé komplexy se označují jako AP-1 a působí jako transkripční faktory (14). Zajímalo nás proto, do jaké míry se změni stupeň transformace fibrosarkomových buněčných linií řízenou nadměrnou expresí kooperujícího onkogenu.

Výsledek získaný u stabilně transfektovaných klonů JUN-1(PD40) a JUN-2(PD200) v podstatě odpovídal očekávání, tj. alespoň u některých z klonů došlo ke zvýšení úrovně motility a invazivity, přičemž ve všech případech byla zachována dokonalá korelace mezi motilitou a invazivitou.

Výsledky získané u stabilně transfektovaných klonů JUN-1(PD200) byly přesně opačné. Překvapivě zde došlo k výraznému snížení celkové úrovně motility a invazivity, mezi jed-

notlivými stabilně transfektovanými klony ovšem i nadále existovala dokonalá korelace mezi motilitou a invazivitou.

Kvantifikaci úrovně motility a invazivity všech analyzovaných buněčných linií a klonů udává Tabulka 1.

Diskuse

V tomto článku referujeme o odvození série myších fibrosarkomových buněčných linií a jejich fenotypové charakterizaci z hlediska motility a invazivity. Bližší srovnání jednotlivých linií a klonů odhaluje několik zajímavých skutečností.

Na prvním místě je z našich výsledků patrné, že efekt řízené exprese kooperujícího onkogenu kriticky závisí na příjemcovské buněčné linii. Zatímco u nízké motilitních a neinvazivních sublinií dochází alespoň u určitých klonů k vyjádření motilitního a invazivního fenotypu, u silně motilitní a invazivní buněčné sublinie JUN-1(PD200) je výsledek přesně opačný – všechny stabilně transfektované klony mají charakter revertantů, s velmi výrazně sníženou motilitou a s invazivitou sníženou na zhruba polovinu.

Srovnání úrovně motility a invazivity jednotlivých sublinií a klonů nám dále umožňuje blíže pochopit vztah mezi těmito dvěma fenotypy. Především je patrné, že v rámci každé logické série sublinií a klonů (tj. buněčná linie JUN-1 v průběhu kontinuální kultury a jednotlivé sady *c-fos*-stabilních transfektantů) zde existuje dokonalá korelace mezi úrovní motility a invazivity – neinvazivnější klony jsou také nejvíce motilitní a obráceně. Toto pozorování je v souladu s limitním postavením motility v determinaci komplexního invazivního fenotypu (15). Zcela jiný obraz nám vyvstává při srovnání úrovní motility a invazivity mezi jednotlivými logickými skupinami sublinií a klonů. Za povšimnutí v tomto ohledu především stojí skupina *c-fos* – stabilně transfektovaných klonů sublinie JUN-1(PD200). Fenotypická reverze pozorovaná u těchto klonů má charakter dramatického snížení úrovně motility, přece však zůstává reziduální invazivita vysoko nad úrovní neinvazivnější motilitních klonů odvozených ze sublinií JUN-1(PD40) a JUN-2(PD200). Zdá se tedy, že každá příjemcovská buněčná sublinie použitá pro transfekci má určité dané „genetické pozadí“, které spoludeterminuje celkovou úroveň invazivity společně s motilitou. Logickým kandidátem tohoto „genetického pozadí“ je proteolytická aktivita buněk destrující Matrigelovou bariéru v průběhu testu invazivity (3, 15, 16). Kvantifikace této proteolytické aktivity představuje tedy bezesporu prioritní krok v další charakterizaci H2-K/v-jun fibrosarkomových buněčných linií.

Závěr

V práci prezentovaná série myších fibrosarkomových buněčných linií umožňuje analyzovat buněčnou motilitu a invazivitu jak společně jako části jednotného invazivního fenotypu (srovnání v rámci jednotlivých skupin sublinií a stabilně transfektovaných klonů), tak i odděleně jako nezávislé fenotypy (srovnání mezi jednotlivými skupinami stabilně transfektovaných klonů). V této podobě představuje zde prezentovaná série nádorových buněčných linií výhodný výchozí model pro zahájení do projektů zaměřených na molekulární analýzu motility a invazivity.

Poděkování: Děkujeme Dr. Martinu Breitanovi za laskavé poskytnutí H2-K/v-jun transgenní myší linie, Dr. Charlesu Vinsonovi za CMV-*c-fos* expresní vektor a Dr. Petru Dráberovi za pSTneoB plasmid. Práce na tomto projektu byla podpořena grantem 301/01/P059 Grantové agentury České republiky a výzkumnými záměry MSM 111500002 a MSM 111400003 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Literatura

1. Hatina J. – Genetika rakoviny. In J.Hatina, B.Sykes: Lékařská genetika. Problémy a přístupy. Academia, Praha 1999, str. 195-225.
2. Sherbet G.V., Lakshmi M.S. – The Genetics of Cancer. Genes Associated with Cancer Invasion, Metastasis and Cell Proliferation. Academic Press, San Diego 1997.
3. Staff A.C. – An introduction to cell migration and invasion. Scand. J.Clin.Lab.Invest. 61:257-268, 2001.
4. Hewitt R.E., McMarlin A., Kleiner D., Wersto R., Martin P., Tsoskas M., Stamp G.W.H., Stetler-Stevenson W.G. - Validation of a model of colon cancer progression. J.Pathol 192: 446-454, 2000.
5. Geldof A.A., Versteegh R.T., van Mourik J.C., Rooimans M.A., Arwert F., Hermesen M.A.J.A., Schadee-Eestermans I.L., van Dongen G.A.M.S., van der Valk P., van der Poest Clement E.H., Lips P., Teule G.J.J. - Clonally related but phenotypically divergent human cancer cell lines derived from a single follicular thyroid cancer recurrence (TT2609). Thyroid 11: 909-917, 2001.
6. Briand P, Lykkesfeldt A.E. - An in vitro model of human breast carcinogenesis: Epigenetic aspects. Breast Cancer Res.Treatment 65: 179-187, 2001.
7. Pauley R.J., Soule H.D., Tait L., Miller F.R., Wolman S.R., Dawson P.J., Heppner G.H. - The MCF10 family of spontaneously immortalized human breast epithelial cell lines: Models of neoplastic progression. Eur.J.Cancer Prevention 2(Suppl 3): 67-76, 1993.
8. Isaacs J.T., Isaacs W.B., Feitz W.B., Scheres J. - Establishment and characterization of seven Dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of prostate cancers. Prostate 9: 261-281, 1986.
9. Kobayashi T., Okada F., Fujii N., Tomita N., Ito S., Tazawa H., Aoyama T., Ki Choi S., Shibata T., Fujita H., Hosokawa M. - Thymosin-β4 regulates motility and metastasis of malignant mouse fibrosarcoma cells. Am.J.Pathol. 160: 869-882, 2002.
10. Schuh A.C., Keating S.J., Monteclaro F.S., Vogt P.K., Breitman M.L. - Obligatory wounding requirement for tumorigenesis in *v-jun* transgenic mice. Nature, 346: 756-760, 1990.
11. Rutberg S.E., Saez E., Lo S., Jang S.I., Markova N., Spiegelman B.M., Yuspa S.H. – Opposing activities of c-Fos and Fra-2 on AP-1 regulated transcriptional activity in mouse keratinocytes induced to differentiate by calcium and phorbol esters. Oncogene 15:1337-1346, 1997.
12. Katoh K., Takahashi Y., Hayashi S., Kondoh H. - Improved mammalian vectors for high expression of G418 resistance. Cell Struct.Funct. 12: 575-580, 1987.
13. Albin A., Iwamoto Y., Kleinman H.K., Martin G.R., Aaronson S.A., Kozlowski J.M., McEwan R.N. – A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumour cells. Cancer Res. 47: 3239-3245, 1987.
14. Göttlicher M., Rahmsdorf H.J., Herrlich P. - The AP-1 family of transcription factors: Multi-level control of activity. In Papavassiliou AG (ed.): Transcription Factors in Eukaryotes. Springer, Heidelberg 1997, str. 67-93.
15. Wells A. - Tumor invasion: Role of growth factor-induced cell motility. Adv.Cancer Res. 78: 31-101, 2000.
16. Holubec L. Jr., Topolčan O., Píknér R. – Biologická aktivita u kolo-rektálního karcinomu. Čas.Lék.čes. 141: 508-512, 2002.