

DANUTA ROŻYŃKOWA

*Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej w Lublinie
Radziwiłłowska 11, 20-950 Lublin*PERSPEKTYWY GENETYCZNYCH BADAŃ NOWOTWORÓW — ODKRYCIA
I WIZJE

W słowie „nowotwór” wyraża się fakt powstania nowego, odmiennego rodzaju komórek z pojedynczej, zdrowej komórki danego osobnika. Ewolucja i onkogeneza mają wiele wspólnego i te dwa procesy przeplatają się wzajemnie prawdopodobnie od zarania życia — pisze JEAN DE GROUCHY (1991). Ewolucja chromosomów w filogenezie naczelnych i wielu gatunków ssaków została potwierdzona porównawczymi „mapami” chromosomów (KLINGER 1963, LEJEUNE i współaut. 1973, YUNIS i PARKASH 1982). Z drugiej strony wiadomo, że ewolucji klonalnej komórek nowotworowych towarzyszą rearanżacje chromosomów. Jak dalece odbiega genom nowotworu od macierzystego, postaram się zilustrować badaniami cytogenetycznymi, molekularnymi i doświadczalnymi.

Proces nowotworowy jest wieloetapowy. Model ewolucji klonalnej jest różny dla różnych nowotworów tkankowo-swoistych i ściśle związany z regulacjami metabolicznymi danego klonu komórkowego. Jednak z reguły dotyczą one zmian genów regulujących replikację DNA i podział komórki lub procesy różnicowania. Są to mechanizmy leżące u podstaw rozwoju w szerokim tego słowa znaczeniu, przy czym, jeśli różnicowanie jest czymś przeciwnym do podziału komórki zwierzęcej, to niekontrolowane podziały komórkowe lub akumulacja komórek z uszkodzonym DNA sygnalizują nieobecność cząsteczek „na straży” znaczących punktów kontrolnych komórki (LANE 1992). Z obliczeń wynika, że częstość somatycznych rearanżacji DNA jest na ogół bardzo wysoka, sięgając prawie kilku na sto mitoz, lecz częstość mitoz prowadzących do nowotworu wynosi tylko jedną na bilion, choć, co prawda, u co piątego osobnika. Większość mutacji jest usuwana przez system naprawczy DNA, a komórki z dużą zmianą genetyczną giną.

W zmutowanej komórce, by stała się nowotworową, muszą zajść dodatkowe zmiany: unieśmiertelnienie, przemieszczenie i następnie mutacje w miejscach genomu ważnych dla regulacji procesów komórkowych, na przykład w protoonkogenie, genie regulującym jego aktywność albo genie przeciwnowotworowym (WEINBERG 1985). Nie znamy jeszcze całego zestawu tych genów. Dla orientacji przedstawiam ich kategorie za KORSMEYER'EM (1992) w tabeli 1.

Tabela 1

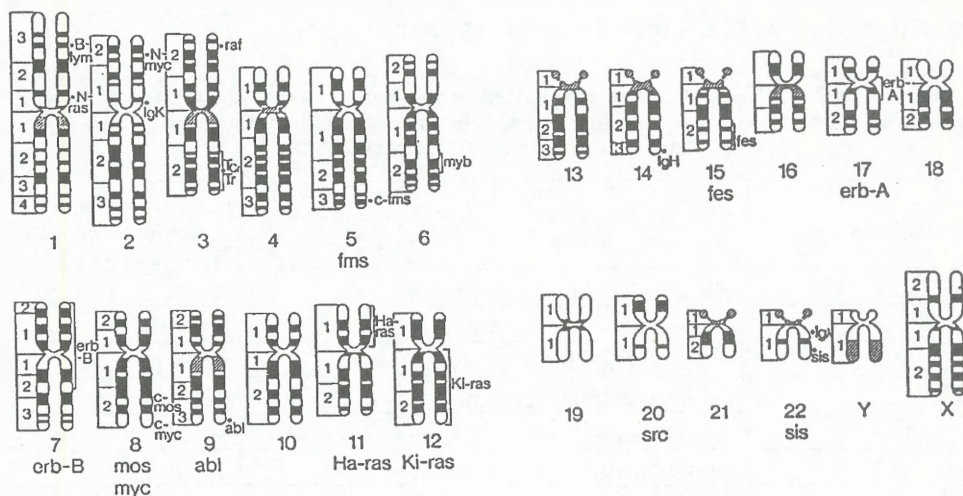
Kategorie komórkowych onkogenów i ich wpływu na wzrost nowotworów
(według S. J. KORSMEYERA 1992)

Kategoria I:	Geny kodujące czynniki wzrostu i proliferacji Czynniki transkrypcji lub ogniwa transdukcji sygnałów Przykładowo: MYC, RAS, ABL Decyduje zwiększenie funkcji
Kategoria II:	Geny supresji nowotworów-przeciwnowotworowe Hamowanie wzrostu i proliferacji Przykładowo: Rb, p53 Decyduje utrata funkcji
Kategoria III:	Geny programowej śmierci komórki A. Uchylające programowaną śmierć BCL-2 B. Geny „drogi ku śmierci” p53 Decyduje utrata funkcji

TRANSLOKACJE CHROMOSOMÓW W HEMATOLOGII

Badając pod mikroskopem chromosomy komórek nowotworowych znajdujemy wiele zmian: braki lub nadatki, wzajemne translokacje dwóch różnych chromosomów, delecje częściowe, a czasem figurki bardzo małych fragmentów chromosomowych (ang. double minutes) lub region chromosomu barwiący się jednolicie, tak zwane HSR (ang. homogeneously staining region). Uważa się je za cytologiczne efekty amplifikacji genów. Dzięki dużemu postępowi barwień i metod synchronizacji hodowli obserwator może oceniać wzory prążkowe identyfikujące poszczególne pary chromosomów i może opisywać nieprzypadkowe ich zmiany w przebiegu nowotworu. Oddzielone translokowane nadatki można poddać analizie molekularnej by identyfikować geny, które leżą w krytycznych fragmentach i które przez zmianę pozycji przyczyniają się do złośliwego wzrostu (CORY 1987). Chromosomowa lokalizacja wielu protoonkogenów (ryc. 1) i dowody na nieprzypadkowość anomalii chromosomowej pozwoliły rozwinąć fascynujące scenariusze zdarzeń, które mogą stanowić preludium nowotworowej transformacji i dalej klonalnej selekcji (porównaj ROŻYŃKOWA i RUPNIEWSKA 1989).

Oryginalną zmianą chromosomową w nowotworach hemo- i limfopoetycznych jest w wielu przypadkach translokacja. Jej wynikiem może być efekt pozycji przez deregulację jakiegoś genu z powodu nowego sąsiedztwa lub utworzenia nowego produktu genowego. Przykładem jest chłoniak Burkitt'a i przewlekła białaczka szpikowa. Chłoniak Burkitt'a występuje często w dzieciństwie u ludzi żyjących w tropikalnych obszarach Afryki. Zmiany chromosomowe w komórkach guza są dobrze poznane, mianowicie 90% chorych ma wzajemną translokację w obrębie chromosomów 8 i 14, a reszta — translokację chromosomów 8 i 2 lub 8 i 22, co zapisuje się t/8;14/ /q24;q31/, t/2;14/ /p12;q24/ i t/14;22/ /q31;q11/ (ryc. 2B). W miejscach złamań poprzedzających translokację chromosomy 14,2 i 22 noszą geny strukturalne immunoglobulin, mianowicie łańcucha ciężkiego i łańcuchów lekkich odpowiednio kappa i lambda. Komórkowy



Ryc. 1. Kartotyp człowieka z zaznaczeniem pozycji niektórych komórkowych onkogenów.

ekwiwalent wirusowego *v-myc* czyli *c-myc* jest zlokalizowany w chromosomie 8, długim q24. Okazało się, że punkt złamania we wszystkich trzech translokacjach jest wewnątrz genu *c-myc*. Jego egzony są przemieszczane do miejsca skupiającego geny *Ig* (CROCE i NOWELL 1986, DALLA-FAVERA i współaut. 1982). Taką zmianę zauważono także w dużej liczbie chłoniaków u myszy, gdzie translokacja dokonuje się między chromosomami 12 i 15, które noszą gen *Ig* i *c-myc* odpowiednio (ADAMS i współaut. 1983).

W innym nowotworze, mianowicie chłoniaku gruczolowym, rozwijającym się z centroblastów i centrocytów — ośrodków rozmnażania grudek chłonnych, wykryto inny onkogen, nie mający wirusowego homologu, nazywany *BCL-2* (ang. B-cell lymphoma/leukemia) (TSUJIMOTO i współaut. 1985). Temu chłoniakowi towarzyszy translokacja genu *BCL-2* z punktu złamania w chromosomie 18 do jednoczesnego miejsca złamania w chromosomie 14,2 lub 22, która podobnie jak poprzednio gen *myc* zestawia tym razem gen *BCL-2* z elementem regulatorowym genu strukturalnego (KOCKI i ROŻYŃKOWA 1991). Cały szereg późniejszych doświadczeń scharakteryzował ten gen jako najciekawszy regulator programowanej śmierci komórek (KORSMEYER 1992, ROŻYŃKOWA 1994).

Geny strukturalne immunoglobulin w limfocytach pre-B, dojrzewających do plazmacytów wydzielających przeciwciała, z natury swej podlegają serii przekształceń, jak rekombinacje, wycinania RNA, mutacje i podobne, zapewniające dużą różnorodność swoistych przeciwciał. Można przypuszczać, że przemieszczenie onkogenu *myc* do „rojowiska” genetycznej aktywności i jego amplifikacja odgrywa znaczną rolę w patogenezie guza Burkitt'a przez nadmierną nie regulowaną ekspresję. Produkt protoonkogenów rodziny *MYC* jest czynnikiem transkrypcji, wiążąc w sposób swoisty sekwencję zasad CACGTG w DNA odnośnego genu przez domenę transaktywacyjną TAD (ang. transactivation domain) usytuowaną w końcu aminowym. Ta domena białkowa wiąże także produkt genu

retinoblastoma pRb. W efekcie transaktywacji przez *c-MYC* komórka z fazy spoczynkowej przechodzi do ożywionej replikacji.

Tabela 2

Nazewnictwo, pochodzenie i pozycja w chromosomach człowieka niektórych onkogenów, izolowanych na podstawie homologii z wirusowymi onkogenami lub testem transfekcji DNA; (zmodyfikowane według MALCOLM 1984)

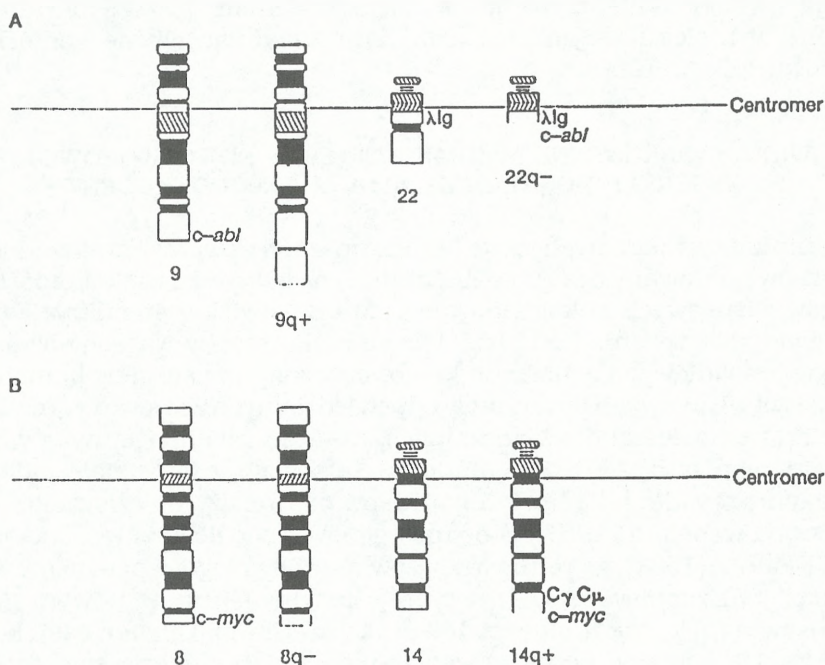
Skrót nazwy	Wykryty jako v-onc w genomie wirusa:	Zwierzę noszące nowotwór	Lokalizacja chromosomowa u człowieka <i>c-onc</i>
<i>src</i>	mięsaka Rous'a	Kurczę	20q13
<i>fes</i>	mięsaka	Kot	15q26.1
<i>abl</i>	białaczki Abelsona	Mysz	9q34.1
<i>fms</i>	mięsaka McDonough	Kot	5q34
<i>erb B</i>	erytroblastozy	Kurczę	7pter-q12
<i>erb A</i>	erytroblastozy	Kurczę	17p11-q22
<i>mos</i>	mięsaka Moloney'a	Mysz	8q22
<i>raf</i>	mięsaka 3611	Mysz	3p25
<i>Ha-ras</i>	mięsaka Harvey'a	Mysz	11p15
<i>Ki-ras</i>	mięsaka Kirstena	Szczur	12p12
<i>myc</i>	myelocytomatozy MC29	Kurczę	8q24
<i>myb</i>	myeloblastozy BA3-A	Kurczę	6q21-24
<i>fos</i>	mięsaka kości FBJ	Mysz	14q21-31
<i>sis</i>	mięsaka	Małpa włenista	22q13.1

Użyte skróty*: p — ramię krótkie chromosomu, q — ramię długie chromosomu oraz kolejność prążków i podprążków liczonych od centromeru.

Sama translokacja chromosomowa nie jest jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za powstanie nowotworu. Badania epidemiologiczne przemawiają za dodatkowymi zjawiskami. Jednym jest zakażenie pierwotniakiem malarii (*Plasmodium falciparum*), stwarzające przewlekłą stymulację antygenową u mieszkańców tropikalnej Afryki. Guz Burkitt'a może jednak sporadycznie występować w jakiegokolwiek części świata i główną rolę w unieśmiertelnianiu komórek B odgrywa zakażenie wirusem Epstein-Barr, który jest wirusem DNA z rodziny opryszczki, *herpetoviridae* (EPSTEIN i ACHONG 1983). Wirus ten jest zdolny do unieśmiertelniania limfocytów B przy udziale antygeny EBNA-1 (ang. Epstein-Barr virus nuclear antigen). Można przyjąć, że w takiej komórce preneoplastycznej dodatkowe zdarzenie translokacji chromosomowej wraz z nadmierną ekspresją genu *c-myc* zaburza proces dojrzewania i różnicowania limfocytów B, zwłaszcza, że przewlekła stymulacja malarią obniża liczbę współpracujących regulatorowych limfocytów T. Rolę tego czynnika w krajach Europy i Ameryki może spełniać wirus HIV (DOUGLAS i współaut. 1980, BIRX i współaut. 1986).

Przewlekła białaczka szpikowa jest następnym nowotworem, w którym zmiana chromosomów towarzyszy klinicznym objawom ekspansji nowotworowego klonu komórek. Schorzenie charakteryzuje się długą fazą przewlekłą z zaburzeniem granulopetycznej czynności szpiku, lecz w której komórką dominującą

w krwi obwodowej jest jeszcze ciągle dojrzały granulocyt lub jeden z jego bezpośrednich prekursorów. W jakimkolwiek czasie fazy przedbiałaczkowej stan pacjenta może przejść w przełom blastyczny, cechujący się obecnością niedoj-



Ryc. 2. Translokacje chromosomowe.

A. Wymienne przemieszczenie *c-abl* z chromosomu 9 do miejsc złamań w chromosomie 22 i utworzenie małego chromosomu Philadelphia. B. Jedna z translokacji w guzie Burkitt'a, w której *c-myc* zostaje przemieszczony w okolice genu strukturalnego ciężkiego łańcucha immunoglobuliny.

rzałych postaci komórkowych we krwi obwodowej. Chorzy z przewlekłą białaczką szpikową mają szczególną aberrację chromosomową w komórkach niedojrzewających, nawet w przewlekłej fazie choroby, mianowicie mały chromosom nazwany Ph' od pierwszej litery miasta Philadelphia, gdzie został wykryty przez Nowell'a (NOWELL i HUNGERFORD 1960) (rys. 2A). Ten mały chromosom jest wynikiem translokacji, jaka zaszła między chromosomem 9 a 22 z punktami złamań w dystalnych okolicach długich ramion jednego i drugiego chromosomu. Potem okazało się, że w tej translokacji onkogen *c-ABL* z miejsca 9q34 przemieszcza się do regionu 22q11 zwanego *BCR* (ang. break cluster regio). Fuzja locus *BCR-ABL* stwarza nowy gen fuzyjny, który koduje nowy produkt o aktywności kinazy tyrozynowej, większy i aktywniejszy niż *c-ABL*. Działa on w procesach sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i jest zdolny do transformacji *in vitro* komórek macierzystych hemopoetycznych (MCLAUGHLIN i współaut. 1987). Odcinek genomu człowieka składający się z sekwencji cDNA *BCR-ABL* był pierwszą sondą używaną do diagnozowania nowotworu. W ten sposób analizy kariotypów zostały dopełnione analizą molekularną genu, co ma decydujące znaczenie w ocenie skuteczności terapii.

Chłoniak Burkitt'a, chłoniak grudkowy i przewlekła białaczka szpikowa ilustrowały te zaburzenia, w których komórkowe onkogeny zmieniły swe chromosomowe terytorium. W wielu innych postaciach białaczek i chłoniaków występują swoiste i nieprzypadkowe miejsca złamań, jeszcze nie do końca wyjaśnione w molekularnym znaczeniu tam znajdujących się komórkowych onkogenów (ROWLEY 1990).

WIRUSY ONKOGENNE W TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ U ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH A PROTOONKOGENY

Wspomniane w niepełnych jeszcze scenariuszach nowotworów przemieszczalne komórkowe onkogeny *c-MYC* i *c-ABL* (tab. 2) są jednymi z wielu komórkowych homologów wirusowych onkogenów *v-onc*. Może największym odkryciem ostatnich lat było stwierdzenie Bishopa i Varmusa, laureatów Nagrody Nobla roku 1989, że w prawidłowych genomach kręgowców znajdują się geny homologiczne do *v-onc*, czyli wirusowych onkogenów odpowiedzialnych za nowotworową transformację tkanek zwierząt doświadczalnych, zakażonych onkogennymi wirusami (STEHELIN i współaut. 1976). Komórkowe onkogeny *c-onc* znaleziono potem w genomach wszystkich badanych gatunków od drożdży do człowieka (GATEFF 1978, JACOB i współaut. 1987). Stosunek genów *c-onc* do genów *v-onc* objaśnia hipoteza BISHOPA (1981), że retrowirusy zawłaszczyły niegdyś pewne prawidłowe geny *Eukaryota* zachowane w rozwoju ewolucyjnym i że w nowym genomie retrowirusów nabyły one zdolności do indukcji złośliwej transformacji komórek gospodarza. Dla samych wirusów są one nieprzydatne. Pierwszym całkowicie scharakteryzowanym retrowirusem był wirus mięsaka Rous'a, powodujący mięsaki u kurcząt za sprawą *v-src*.

Retrowirusy mogą powodować pierwszy etap transformacji komórek nie tylko przez te niezwykle „zawłaszczone” i zmienione geny *v-onc*. Innym mechanizmem jest integracja wirusowego genomu do genomu gospodarza i zmiana poziomu ekspresji przyległych genów. Wirus RNA po wejściu do komórki przepisuje RNA w DNA za pomocą odwrotnej transkryptazy i ten transkrypt jest następnie włączony (insercja) do DNA gospodarza (BISHOP 1984).

Komórkowe onkogeny kodują białka o fundamentalnym znaczeniu w życiu komórki. Są to enzymy fosforylacji białek, glikoproteidy błon komórkowych z funkcją receptorową, czynniki wzrostowe, białka wiążące DNA i regulujące transkrypcję (WEINBERG 1985). Zmienione onkogeny, wyrażające zwiększoną aktywność nawet w pojedynczej kopii w jakimkolwiek punkcie kaskady przekazywania sygnałów, zostały uznane za onkogeny dominujące. Różne są przejawy aktywacji onkogenów: we wzmożonej syntezie czynników wzrostowych, wzmożonej syntezie receptorów czynników wzrostowych, syntezie receptorów o zwiększonym powinowactwie, zmianie transdukcji sygnałów po związaniu na receptorze, wreszcie w pojawieniu się zmienionych nadczynnych kinaz tyrozynowych, czyli tyrozyno-specyficznych enzymów fosforylujących (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1992). Nadmierna ekspresja tych ostatnich może doprowadzić do wzmożonej proliferacji nawet bez interakcji czynnika wzrostowego. Ostatnim decydującym

przejawem roli *c-onc* jest regulacja transkrypcji przez ich produkty. Przykładem jest heterodimer *fos-jun* lub *myc-max* (MORGENBESSER i DEPINHO 1994).

DELECJE JEDNOGENOWE W NOWOTWORACH — KONCEPCJA ANTYONKOGENÓW

Odminną kategorią genów, odgrywających znamienne rolę w nowotworach, są geny supresorowe, zwane też przeciwnowotworowymi lub antyonkogenami (STANBRIDGE 1970). To właśnie brak produktów tych genów w komórce sprawia, że utracona została kontrola wzrostu, co może być początkiem „wejścia na nowotworową ścieżkę” (tab. 3). Antyonkogeny zostały określone genami recesywnymi, z czego wynika, że w komórce nowotworowej są zmutowane lub utracone obydwa allele i że pierwszym ważnym zdarzeniem jest mutacja jednego z pary genów a drugim — decydującym — wypadnięcie funkcji drugiego genu z tej samej pary, czyli utrata heterozygotyczności. Produkty białkowe prawidłowych alleli genów supresorowych kodują negatywne sygnały wzrostu, czyli takie, w efekcie

Tabela 3

Loci genów przeciwnowotworowych w chromosomach człowieka (zmodyfikowane według LEVINE (1993) oraz KINZLER i VOGELSTEINA (1993))

Nowotwór	Chromosom	Gen przeciwnowotworowy
Siatkówczak (retinoblastoma), kostniakomięsak	13q14	<i>Rb</i>
Guz Wilms'a (nefroblastoma), mięsak prążkowanokomórkowy mięsakowy	11p13	<i>WT-1</i>
Głojak wielopostaciowy (astrocytoma)	17p13	<i>p53</i>
Rak piersi	13p14 17p13 17q. 1	<i>Rb</i> <i>p53</i> <i>BRCA1, BRCA2</i>
Drobnokomórkowy rak płuc	13q14 17p13 3p	<i>Rb</i> <i>p53</i> <i>RB</i>
Rodzinna polipowatość gruczolakowata	5q21	<i>APC</i>
Rak jelita grubego	17p13 18q21	<i>p53</i> <i>MCC, DCC</i>
Neurofibromatoza	1p, 14q 17q	nle znane <i>NF-1</i>
Oponiak	22q	<i>NF-2</i>
Neuroblastoma	1p, 2p, 17	<i>N-MYC</i> i nle znane
MEN-1 — zespół układu dokrewnego	11q	nle znany
MEN-2 — zespół nowotworów układu dokrewnego	10	nle znany

których nastąpi zatrzymanie cyklu komórkowego, ostateczne różnicowanie, albo fizjologiczna, programowana śmierć komórki (GREEN 1988, HORST 1993).

Istnienie genów przeciwnowotworowych zaproponowali HARRIS i współaut. (1969) i KNUDSON (1971) w toku dwóch linii badań: hybrydów somatycznych komórek nowotworowych z prawidłowymi *in vitro* oraz dziedzicznie uwarunkowanych nowotworów embrionalnych.

Grupie HARRIS'A (1969) udało się mianowicie wykazać przed 25 laty, że jeśli zhybrydować przez fuzję jąder komórkowych komórki nowotworowe z nienowotworowymi, to komórki hybrydy nie mają cechy wzrostu nowotworowego. Jednakże w wyniku segregacji genetycznej tych rekombinantów oraz utraty losowej różnych chromosomów dochodziło do reekspresji złośliwego wzrostu. Przyjęto więc roboczo, że istnieją loci genowe zdolne do supresji wzrostu, ponieważ ich brak lub recesywna mutacja uniemożliwiają wejście w prawidłowy program różnicowania lub śmierci z powodu stałej ekspresji toru mitogennego.

Pierwsze badania grupy KNUDSONA (1971) dotyczyły nowotworów embrionalnych. O ile poprzednio omawiane aberracje chromosomów w chorobach nowotworowych układu krwiotwórczego mają swoiste znaczenie nie tylko w diagnostyce, ale i w prognozowaniu klinicznym, to dotychczasowe obserwacje guzów litych nie pozwalają na jednoznaczne określenie ich roli w prognozowaniu klinicznym (LIMON i MITELMAN 1994). Wyjątkiem są rodzinne nowotwory, w których czasem można dostrzec mikrodelecję: w siatkówczaku zarodkowym (retinoblastoma) w segmencie 14 podcentromerowo w chromosomie 13, w guzie nerki Wilms'a (nephroblastoma) w segmencie 13 krótkiego ramienia chromosomu 11, w neuroblastoma — delecję w krótkim ramieniu chromosomu 2 (CAVENEY i współaut. 1986, KINZLER i VOGELSTEIN 1993). Te miejsca zwróciły uwagę na identyfikację utraconych alleli.

Guz nerki Wilms'a i siatkówczak złośliwy mają wiele podobieństw. Obydwa są nowotworami wieku dziecięcego i chociaż większość zdarza się sporadycznie, obydwie nowotwory mogą przejawiać zwiększoną częstość w niektórych rodzinach. Cytogenetyczne a potem molekularne badania tych nowotworów doprowadziły do hipotezy, że chodzi tu o brak lub inaktywację mutacyjną pewnych genów zdolnych do supresji wzrostu i kontroli różnicowania. Utrata jednego z alleli może być dziedziczona w linii zarodkowej, a mutacja drugiego allelu może zdarzyć się w linii somatycznej. Analizą cytogenetyczną pary 13 i polimorfizmu restrykcyjnego fragmentów DNA udało się zidentyfikować mechanizmy odpowiedzialne za eliminację prawidłowych alleli genów supresorowych (CAVENEY i współaut. 1983). Jest nim mitotyczny brak rozdziału (non disjunction) pary chromosomów 13 lub mitotyczna rekombinacja z utratą części chromosomu 13. Efekty tych mechanizmów można potwierdzić monosomią 13 w jednych komórkach i parą chromosomów 13 z brakiem allelu *Rb*. Wykrycie genu siatkówczaka (*rb*) przyczyniło się do epokowych odkryć w regulacji cyklu komórkowego (HORST 1992).

Gen *Rb* (nieobecny w retinoblastoma) i gen *Wt* (nieobecny w guzie nerki Wilms'a) były prototypami antyonkogenów. Tkanką specyficzną dla pierwszego jest siatkówka, a dla drugiego — mezonefros i listewka płciowa. Białkowe produkty tych genów okazały się białkami regulatorowymi transkrypcji. Ekspresja genu *Wt* w prawidłowej tkance w okresie embrionalnym, analizowana *in situ*,

miała miejsce w mezenchymie, pęcherzyku nerki, nabłonku kłębków i mezonefros a także w płodowych gonadach. Sonda molekularna genu supresorowego Wilms'a udowodniła, że ma on określoną rolę w rozwoju nerki oraz rozległą (plejotropową) rolę w mezenchymie i nabłonku. Jest najprawdopodobniej genem rozwoju funkcji filtracji w nerce, tej funkcji, która rozwija się wcześniej w ewolucji kręgowców (PRITCHARD-JONES i współaut. 1990). Udowodniono także rolę supresorową tego genu wobec nowotworowego wzrostu. Mianowicie za pomocą strategii przeniesienia mikrojąder komórkowych udało się przekazać normalny chromosom 11 do linii komórkowej pochodzącej z guza Wilms'a i po wszczepieniu podskórnie myszy bezgraniczej udowodnić, że komórki te straciły zdolność do tworzenia nowotworu (WEISSMAN i współaut. 1987).

W następnych latach wykryto szereg dalszych genów przeciwnowotworowych i ich produkty. Gen kodujący białko p53, określane też jako białko Tp53 (ang. tumor protein) ma niezwykłą historię i znaczenie (LEVINE 1993). Początkowo sądzono, że chodzi o aktywny onkogen zmutowany, a nie o inaktywację antyonkogeny. Obecnie wiadomo, że w tym genie może być ponad 350 niezależnych mutacji punktowych w regionach szczególnie wrażliwych (hot spots). Odpowiadają one pięciu domenom białka Tp53, szczególnie wiernie zachowanym w przebiegu ewolucji (DE FROMENTEL i SOUSSI 1992, LEVINE i współaut. 1991, BERBEĆ 1994). Utrata funkcji tego genu towarzyszy progresji różnych nowotworów (tab. 3).

BADANIA NOWOTWORÓW U MYSZY TRANSGENICZNYCH

Następnym etapem badań stał się model myszy transgeniczných. Dlatego przedstawię niektóre doświadczenia, w których strategie genowe wymuszające stałą ekspresję jednych genów lub powodujące inaktywację innych, wpływają decydująco na rozwój nowotworu.

Większość znanych onkogenów, antyonkogenów i czynników wzrostowych zostało poddanych analizie w systemie transgenicznym celem weryfikacji ich onkogennej potencjału *in vivo*. Rozwinięto wysoce użyteczne i unikatowe strategie, które dostarczają nowego wglądu w patogenezę nowotworów, a jednocześnie mogą wpłynąć na zmianę lub utrzymanie naszych wyobrażeń o ich rozwoju.

Strategia transgeniczna posługuje się wprowadzeniem obecnego DNA na stałe do komórek linii zarodkowej myszy. Dzięki homologicznej rekombinacji między egzo- i endogennymi sekwencjami DNA zmiany genetyczne powstają w ściśle określonych miejscach i pozostają na stałe. Obejmują one dwie duże kategorie: mutacje dominujące, polegające na zwiększeniu czynności genu (dominant gain-of-function) i mutacje recesywne typu nonsensowego, uniemożliwiające tworzenie produktu genu. Pierwszy typ zmian uzyskuje się przez mikroinjekcję do zarodkowych komórek wielopotencjalnych, tak zwanego transgenu, czyli konstruktu złożonego z onkogeny, enhancera lub promotora i odpowiedniego wektora. „Wymazanie” genu, czyli drugi typ zmian, prowadzący do inaktywacji genów, odbywa się techniką celowego modyfikowania genomu (gene targeting, porównaj HETMAN 1993). W tym celu izolowane komórki zarod-

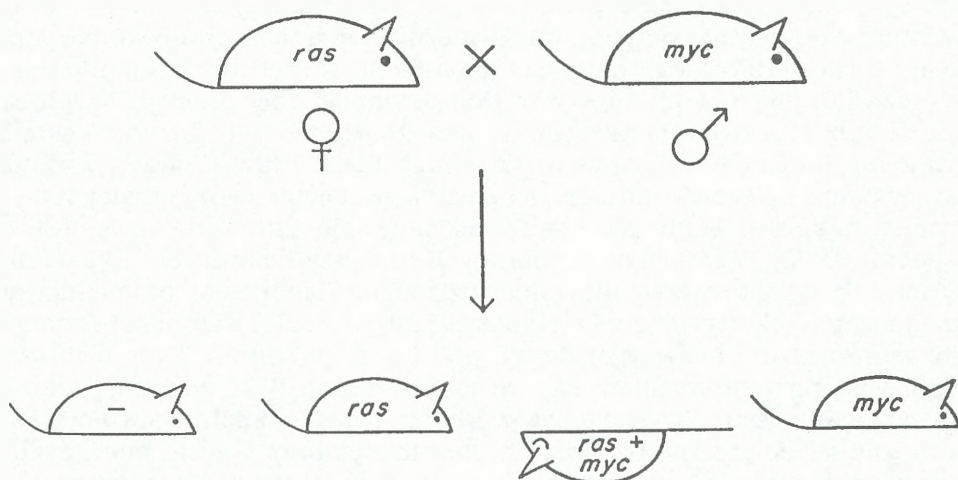
kowe macierzyste hoduje się *in vitro* i modyfikuje ich genom, na przykład, przez zastąpienie sekwencji genu *p53* od 2. do 6. egzonu genem odporności neomycynowej (*neo*). Wyselekcjonowane klony komórek z nieaktywnym genem *p53* są następnie wprowadzone do blastocysty, gdzie odbywa się kolonizacja zmodyfikowanych komórek i dalszy rozwój płodów, zachowujących zmianę genomu w linii zarodkowej. Takie myszy heterozygotyczne poddaje się reprodukcji międzymieszańcowej a ich potomstwo, sprawdzone pod względem obecności dzikiego allelu, na przykład *p53*, lub jego braku (homozygota prawidłowego allelu, heterozygota, homozygota nieczynnego allelu) stanowi dawców komórek do dalszych badań, na przykład tymocytów czy fibroblastów.

Sekwencje mysiego *c-myc* umieszczono w konstrukcie pod kontrolą enhancera genu strukturalnego *IgH*, w skrócie *E/myc*. Była to imitacja sytuacji w guzie Burkitt'a z translokacją chromosomową 8;14, o której była mowa w poprzedniej części artykułu. Stan preneoplastyczny cechował się deregulacją cyklu komórkowego i zaburzeniem różnicowania. Populacja limfocytów pre-B górowała nad dojrzałymi limfocytami B. Mimo ekspresji wszystkich antygenów różnicowania łącznie z ekspresją genów *RAG-1* i *RAG-2* (ang. recombinase activating genes), czynność limfocytów B u tych myszy była jednak nieco upośledzona w porównaniu z myszami kontrolnymi. Przejawiało się to w reakcjach na mitogeny, w wydzielaniu przeciwciał, odpowiedzi na T-zależne i T-niezależne antygeny. Po różnym okresie latencji, trwającym od 3–18 tygodni u myszy *E-myc* rozwinęły się chłoniaki pre-B i B limfocytowe o dużej złośliwości. Natomiast chłoniaki T-komórkowe rozwinęły się w warunkach, gdy zmieniono promotor *E* na *Thy-1* (thymic-grasiczy). Były to właściwe grasiczaki złożone z proliferujących tymocytów i jeszcze bardziej ekspansywnych komórek epitelialnych (MORGENBESSER i DEPINHO 1994). Jeśli konstrukt zawierał ludzki gen *c-myc* i promotor mysiego genu zgodności tkankowej H-2K to występowały zaburzenia proliferacji i różnicowania, ale nie doszło do złośliwej transformacji komórek. To doświadczenie poinformowało dodatkowo, że chociaż *c-myc* może być potencjalnym onkogenem, to okres latencji i klonalność komórek guza zależy od innych czynników.

Próbowano zidentyfikować geny synergistyczne z *c-myc*. W chłoniaku, wywołanym u myszy transgenicznego przez konstrukt *E-myc* zaobserwowano żywe pobudzenie białek wiążących GTP, kodowanych przez geny rodziny *ras*. Białka G, wiążące i hydrolizujące nukleotydy guaninowe, stanowią uniwersalny łącznik w transmisji sygnałów z receptorów błonowych na ich efekторы. Celem identyfikacji przyczyn, przyspieszających rozwój chłoniaków, wprowadzono dodatkowo pewne onkogeny przez zakażenie wirusami onkogennymi lub drogą meiotycznej rekombinacji przez krzyżówki z innymi transgenicznymi osobnikami. Okazało się, że synergistycznymi z *c-myc* są geny *H-ras*, *raf*, *pim-1*, *bcl-2* (ryc. 3). Wszystkie łączy lokalizacja cytoplazmatyczna z tym, że białko *H-ras* ma aktywność kinazy tyrozynowej a produkty *raf* i *pim* mają aktywność kinaz seryno-treoninowych. Produkt ostatniego genu jest czynnikiem przeżycia (tab. 1).

Do badań w systemie transgenicznym posłużono się także konstruktami *N-myc* i *L-myc*, których amplifikację i nadmierną ekspresję stwierdzono w neuroblastoma (*N-myc*) i raku drobnokomórkowym płuc (*L-myc*). Konstrukty *E-N-myc*, wprowadzone do linii zarodkowej myszy, przyczyniły się do rozwoju chłoniaków B-komórkowych, które dojrzewały do plazmocytozy. Natomiast

konstrukty *E-L-myc* przyczyniły się do szybkiego rozwoju grasiczaków T-komórkowych, a w miarę starzenia zwierząt — do guzów złożonych z myelomonocytów. Ten ostatni wynik jest o tyle ciekawy, że w patogenezie białaczki myelomonocytowej u człowieka znaczącą rolę przypisuje się ekspresji deregulowanego *L-myc*.



Ryc. 3. Schemat onkogenezy w systemie transgenicznym u podwójnej heterozygoty dominujących deregulowanych onkogenów.

Myszy transgeniczne poddano też doświadczeniu w odwrotnej wersji, gdy transgenami były zmutowane geny *H-ras*, *SV40-T* antygen lub transformujący czynnik wzrostowy TGF alfa a w utkaniu wynikłych ogniskowych raków badano ekspresję *c-myc*. Wyniki tych doświadczeń nie tylko potwierdziły współdziałanie tych genów w złośliwej transformacji komórek wątrobowych, ale i potwierdziły oczekiwania, że w rozwoju nowotworu działa kilka mutacji.

Dalszy ciąg badań u myszy transgenicznych dotyczy skutków inaktywacji genu *p53* oraz nadmiernej ekspresji genu *bcl-2*. Pierwszy promuje programowaną śmierć, a drugi jest jej inhibitorem. McDONNELL i współpracownicy (1989) wprowadzili konstrukt, w którym ludzki gen *BCL-2* został umieszczony pod kontrolą enhancera *Ig* (genu strukturalnego ciężkiego łańcucha immunoglobuliny), imitując tym translokację w chłoniaku grudkowym u człowieka: t / 14; 18 / (McDONNELL i współaut. 1989). U tych myszy transgenicznych nadmierna ekspresja *BCL-2* była w komórkach śledziony i grasicy, a z łagodnej poliklonalnej proliferacji centrocytów wywiązała się selektywna ekspansja małych, spoczynkowych limfocytów B o immunofenotypie IgM/IgD. Komórki te gromadziły się czasowo w fazie G0 i G1 cyklu komórkowego, pozostały jednak zdolne do aktywacji i syntezy DNA. Jednakże w miarę upływu czasu zmiany komórkowe przerodziły się w rozrost złośliwych chłoniaków, co jasno ilustrowało bliski stosunek między supresją apoptozy a rozwojem nowotworu. W przebiegu cytogenetycznych i molekularnych zmian tych chłoniaków złośliwych znaleziono również translokację aktywującą *c-myc*. W związku z tą obserwacją wyhodowano myszy transgeniczne z krzyżówki *Elg-Bcl-2* x *Elg-myc* i udowodniono genetyczne

uzupełnienie się tych dwu onkogenów. U podwójnie transgenicznych potomków rozwinęła się szybko nisko zróżnicowana postać białaczki z hemopoetycznych komórek macierzystych. Z tego wynika, że onkogenny potencjał wzmacnia się przy kombinacji takich zdarzeń genetycznych, z których pierwsze przez deregulację *bcl-2* stwarza korzyść przeżycia, a drugie przez pozytywną stymulację wzrostu aktywnym onkogenem *myc* narusza równowagę proliferacji.

Ostatnie obserwacje dotyczą transgenicznych myszy ze zmutowanym genem *p53* (mutacja „zerowa” warunkująca brak funkcji). Nowotwory o utkaniu mięsaków rozwijały się u tych myszy w tkance limfoidalnej grasicy, w płucach i w kościach. Z licznych opracowań wynika, że *p53* jest nieodzownym składnikiem w mechanizmie wykonawczym apoptozy (LANE 1992). Clarke i współpracownicy badali zależność indukcji apoptozy w tymocytach kory grasicy u myszy od stałej ekspresji genu *p53*, wprowadzonego do linii zarodkowej (CLARKE i współaut. 1993). W tymocytach, pobranych od myszy-homozygot dzikiego allelu *p53* doszło do apoptozy w wyniku takich działań na komórki, jak promieniowanie jonizujące, glukokortykosterydy, etopozyd i estry forbolu. Natomiast w tymocytach pobranych od homozygot delecji *p53* (mutacja „zerowa”) nie było oznak apoptozy ani po napromieniowaniu ani po etopozydzie. W komórkach pochodzących od heterozygot *p53* efekt był pośredni. LOWE i współpracownicy (1993) prowadzili systematyczne badania fibroblastów embrionalnych, pobranych od myszy transgenicznych, poddanych działaniu genotoksycznych substancji używanych jako chemioterapeutyki: 5-fluorouracyl, etopozyd, adramiacyna i promieniowanie jonizujące. Fibroblasty były homo- lub heterozygotyczne pod względem prawidłowego „dzikiego” i zmutowanego allelu. Badania ekspresji mRNA-*p53* wykazały prawidłową, częściową lub utraconą ekspresję genu, zależnie od genotypu *p53*. Autorzy doszli do przekonania, że *p53* wywiera znaczący i zależny od dawki genu wpływ na apoptozę, jeśli czynnik indukcyjny powoduje uszkodzenie nici DNA. Jest to także dowód, że prawidłowa funkcja genu *p53* polega między innymi na blokowaniu podziału komórek z uszkodzonym DNA.

PODSUMOWANIE

Skrótowy przegląd wybranych analiz cytogenetycznych, nawiązujących do nich badań molekularnych DNA i białek, a także doświadczeń metodą inżynierii genetycznej jest dosyć selektywnym obrazem przeobrażeń, jakie dostrzegamy w komórkach nowotworowych. Jeśli bowiem pierwsze (chromosomy) widzi się w całym komplecie, drugie (geny i białka) są wysoce wybiórcze (tylko niektóre albo jeden gen). Cytogenetyk analizuje kariotypy realne pojedynczych komórek, które nie muszą reprezentować całej populacji, za to może wskazać drogi klonalnej ewolucji. Molekularne podejście (poza hybrydyzacją *in situ*) może „uśrednić” genom komórki nowotworowej i „zgubić” heterogenność komórek nowotworowych.

Patogenne konsekwencje przynajmniej niektórych zrównoważonych translokacji i delecji chromosomów mogą być jeszcze bardziej skomplikowane niż prosta w zasadzie aktywacja onkogenów lub utrata antyonkogenów. Polisomie lub

poliploidie nie zostały jeszcze zadawalająco wyjaśnione na poziomie genów (HEIM 1992).

Nie ujmując nic pracownikom klonującym geny trzeba przyznać, że analiza cytogenetyczna była kluczem do molekularnej cytogenetyki dwóch głównych kategorii rearanżacji: nieprzypadkowych translokacji (około 70 w komórkach nowotworowych człowieka) i stałych delecji. Znajomość usytuowania miejsca złamania była punktem wyjścia do selekcji genów, używanych potem jako molekularne sondy tych rearanżacji. Jednakże próżek chromosomowy zawiera około 5 milionów par zasad i szansa odkrycia rearanżacji metodą Southerna w różnych guzach litych jest niewielka. Wyjątek stanowią białaczki i chłoniaki, ponieważ istotne sondy genowe w tych schorzeniach, zawierające geny immunoglobulin, pozwoliły sklonować DNA istotne dla kilkudziesięciu rearanżacji (ROWLEY 1990).

Wydaje się, że optymalnym dla pełnego rozeznania działaniem jest kontynuowanie badań zarówno metodami cytogenetycznymi, jak i analizami na poziomie DNA. Implikacje praktyczne tych badań, zwłaszcza w predyspozycjach ujawniających się zachorowaniami rodzinnymi w predyspozycjach „promocyjnych” (chodzi o fazę promocji nowotworu) zostały omówione w artykule J. STEFFENA (1993). Na zakończenie chciałabym podkreślić, że nowe dane biologii molekularnej zmuszają do przemyślenia dotychczasowych koncepcji i definicji w obrębie patologii nowotworów. Pragnę też wyrazić pogląd, że badania cytogenetyczne i molekularne uzupełniają, ale nie zastępują patomorfologii w dziedzinie diagnostyki nowotworów. Istota badań genetycznych polega bowiem na wykryciu nie znanych przedtem mechanizmów odpowiedzialnych za deregulację kontroli transkrypcyjnej i autonomii wzrostu komórek.

PERSPECTIVES IN CANCER GENETIC RESEARCH — DISCOVERIES AND VISIONS

Summary

The review refers to the current progress in the studies on of genetic changes that occur within the cancer cell and are critically involved in the transformation of a normal to a malignant cell. The considerations are limited to:

- those changes that have been detected by analyzing the karyotypic pattern of human cancer cells found in leukemia and lymphoma,
- two large classes of genes that are subject to somatic mutations — 1, oncogenes whose existence was revealed by the study of animal retroviruses, and 2, antioncogenes which were revealed by the study of hereditary cancer in man.

A new approach to studying the role of the above mentioned genes in the initiation and progression of induced tumors in transgenic mice is also presented.

LITERATURA

- ADAMS J. M., GERONDAKIS S., WEBB E. L. M., CORY S., 1983. *Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin gene locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas*. Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 1982–1986.
- ADAMS J. M., HARRIS A. W., PINKERT C. A., CORCORAN L. M., ALEXANDER W. S., CORY S., PALMITER R. D., BRINSTER R. L., 1985. *The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancer induces malignancy in transgenic mice*. Nature, 318, 533–538.

- BERBEĆ H., 1994. *Gen p53 człowieka*. Post. Biochem., 40, 6–11.
- BISHOP J. M., 1981. *Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes*. Cell, 23, 5–7.
- BISHOP J. M., 1984. *Viruses, genes and cancer. The Harvey Lectures*. Series 78, 137–171.
- BIRX D., REDFIELD R. R., TOSATO G., 1986. *Defective regulation of Epstein Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS related disorders*. N. Engl. J. Med., 314, 874–879.
- CAVENEY W. R., DRYJA T. P., PHILLIPS R. A., 1983. *Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma*. Nature, 305, 779–785.
- CAVENEY W. K., KOUFOS A., HANSEN M. F., 1986. *Recessive mutant genes predisposing to human cancer*. Mutation Res., 168, 3–14.
- CLARKE A. R., PURDIE C. A., HARRISON D. J., MORRIS R. G., BIRD C. C., HOSPER M. L., WYLLIE A. H., 1993. *Thymocyte apoptosis induced by p-53-dependent and independent pathways*. Nature, 362, 849–852.
- CORY S., 1987. *Activation of cellular oncogenes in hemopoietic cells by chromosomal translocation*. Adv. Canc. Res., 47, 189–234.
- CROCE G., NOWELL P., 1986. *Molecular genetics of human B cell neoplasia*. Adv. Immunol. 38, 245–274.
- DALLA-FAVERA R., BREGNI M., ERICKSON J., PATTERSON D., GALLO R. C., CROCE C. M., 1982. *Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 7824–7827.
- DE GROUCHY J., 1981. *The malignant primate*. Ann. Génét. 34, 137–142.
- DOUGLAS E. C., MAGRATH I. T., LEE E. C., WHANG-PENG J., 1980. *Cytogenetic studies in non-Africa Burkitt lymphoma*. Blood 55, 148–155.
- EPSTEIN M. A., ACHONG B. G., 1983. *The relationship of the EBV virus to Burkitt's lymphoma W: The Epstein-Barr Virus*. Red. M. A. EPSTEIN, B. G. ACHONG, Berlin, Springer Verlag, 322–327.
- DE FROMENTEL, SOUSSI T., 1992. *TP53 tumor suppressing gene: a model for investigating human mutagenesis*. Genes, Chromosomes Cancer, 4, 1–15.
- GATEFF E., 1978. *Malignant neoplasms of genetic origin in Drosophila Melanogaster*. Science 200, 1448–1459.
- GREEN A. R., 1988. *Recessive mechanisms of malignancy*. Br. J. Cancer, 58, 11–12.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1992. *Regulacja cyklu komórkowego — historii i komplikacji ciągu dalszy*. Post. Biochem., 38, 98–107.
- HARRIS H., MILLER D. J., KLEIN G., WORST P., TACHIBANA T., 1969. *Suppression of malignancy by cell fusion*. 223, 363–368.
- HEIM S., 1992. *Is cancer cytogenetics reducible to the molecular genetics of cancer cells*. Genes, Chromosomes, Cancer, 5, 188–196.
- HETMAN M., 1993. *Celowe modyfikowanie genomu ssaków*. Post. Biol. Kom. 20, 217–238.
- HORST A., 1992. *Geny przeciwnowotworowe jako czynniki regulatorowe wzrostu i różnicowania komórek*. Post. Biol. Kom., 19, 3–22.
- HORST A., 1993. *Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego*. Post. Biol. Kom., 20, 311–330.
- JACOB L., OPPER M., METZROTH B., PHANNAVONG B., MECHLER B., 1987. *Structure of the I/2/g1 gene of Drosophila and delimitation of its tumor suppressor domain*. Cell, 50, 215–250.
- KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1993. *A gene for neurofibromatosis 2*. Nature, 363, 495–496.
- KLINGER H. P., 1963. *The somatic chromosomes of some primates*. Cytogenetics, 2, 140–151.
- KNUDSON A. G., 1971. *Mutation and cancer. Statistical study of retinoblastoma*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68, 820–823.
- KOCKI J., ROŻYŃKOWA D., 1991. *Gen bcl-2 w patofizjologii limfocytów B*. Post. Biol. Kom., 18, 169–182.
- KORMSEYER S. J., 1992. *Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death*. Blood, 80, 879–886.
- LANE O. P., 1992. *p53, guardian of the genome*. Nature, 358, 15–16.
- LEJEUNE J., DUTRILLAUX B., RETHORE M. C., PRIEUR M., 1993. *Comparaison de la structure fine des chromatides d'Homo sapiens et de Pan troglodytes*. Chromosoma, 43, 423–444.
- LEVINE A. J., 1993. *The tumor suppressor genes*. Annu. Rev. Biochem., 62, 623–651.
- LEVINE A. J., MOMAND J., FINLAY C. H., 1991. *The p53 tumor suppressor gene*. Nature, 351, 453–456.
- LIMON J., MITELMAN F., 1994. *Znaczenie aberracji chromosomowych w łitych guzach nowotworowych człowieka*. Polish J. Pathol., 45, 1–16.
- LOWE S. W., SCHMITT E. M., SMITH S. W., OSBORNE B. A., JACKS T., 1993. *p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes*. Nature, 362, 847–852.

- MALCOLM S., 1984. *Chromosome Rearrangements and Cancer*. W: *Molecular Medicine*, vol. 1. Red. A. D. B. MALCOLM, IRL Press 1984.
- McDONNELL T. J., DEANE N., PLATT F. M., NUNEZ G., JAEGER U., McKEARN J. P., KORSMEYER S. J., 1989. *bcl-2*-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, 57, 79–88.
- McLAUGHLIN J., CHIANESE E., WITTE O. N., 1987. *In vitro* transformation of immature hematopoietic cells by the p210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 84, 6558–6562.
- MERLINO G., 1994. *Regulatory imbalances in cell proliferation and cell death during oncogenesis in transgenic mice*. *Cancer Biology*, 5, 13–20.
- MORGENDESSER S. D., DEPINHO R. A., 1994. *Use of transgenic mice to study myc family gene function in normal mammalian development and in cancer*. *Cancer Biology*, 5, 21–36.
- NOWELL P. C., HUNGERFORD D. A., 1960. *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukaemia*. *Science*, 132, 1497–1499.
- PRITCHARD-JONES K., FLEMING S., DAVIDSON D., BICKMORE W., PARTEOUS D., GOSDEN C., BARD J., BUCKLER A., PELLETIER J., HOUSMAN D., VAN DEYINGEN V., HASTIC N., 1990. *The candidate Wilms' Tumor gene is involved in genitourinary development*. *Nature*, 346, 194–197.
- ROWLEY J. D., 1990. *Molecular cytogenetics: Rosetta Stone for understanding cancer —Twenty ninth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture*. *Cancer Res.*, 50, 3816–3825.
- ROŻYŃKOWA D., RUPNIEWSKA Z. M., 1989. *Wieloletowa patogeneza chłoniaków*. *Post. Biol. Kom.*, 16, 225–267.
- ROŻYŃKOWA D., w druku (1994). *Genetyczne regulacje apoptozy, programowej śmierci komórki*. *Post. Biol. Kom.*
- SAGER R., 1986. *Genetic Suppression in tumor formation: a new frontier in cancer research*. *Can. Res.*, 46, 1573–1580.
- STANBRIDGE E. J., 1970. *Supression of malignancy in human cells*. *Nature*, 260, 17–20.
- STEHELIN D., VARMUS H., BISHOP M., VOGT P., 1976. *DNA related to the transforming gene/s/ of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA*. *Nature*, 260, 170–173.
- STEFFEN J., 1933. *Postępy w badaniach nad dziedzicznymi predyspozycjami do rozwoju nowotworów złośliwych*. *Nowotwory*, 43, 279–297.
- TSUJIMOTO Y., COSSMAN J., JAFFE E., CROCE C. M., 1985. *Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma*. *Science*, 228, 1440–1443.
- WEINBERG R. A., 1985. *The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus*. *Science*, 230, 770–776.
- WEINBERG R. A., 1989. *Oncogenes, antioncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis*. *Cancer Res.*, 49, 3713–3721.
- WEISSMAN B. E., SAXON P. J., PASQUALE S. R., JONES G. R., GEISER A. G., STANBRIDGE E. J., 1987. *Introduction of normal human chromosome 11 into a Wilms' tumor cell line controls its tumorigenic expression*. *Science*, 136, 175–180.
- YUNIS, PARKASH O., 1982. *The origin of man: A chromosomal pictorial legacy*. *Science*, 215, 1525–1530.