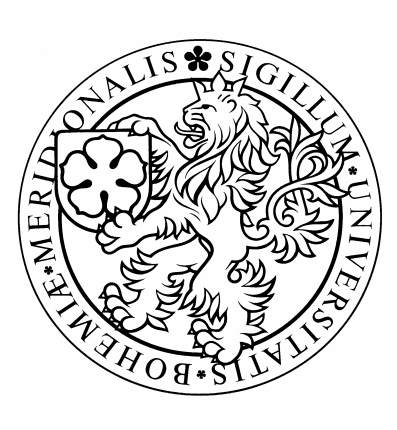


**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**



**Bakalářská diplomová práce**

**Buněčná fúze a kancerogeneze**

**Autor: Hana Maršíková**

**Vedoucí práce: RNDr. Jan Ženka, CSc.**

**2008**

**Maršíková H., 2008:** Buněčná fúze a kancerogeneze [Cell fusion and carcinogenesis. Bc. Thesis, in Czech] – 43 p., Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The origin of cancer remains enigmatic. The object of this study was to find out the impact of BMDCs fusion without any carcinogens on cancer progression. The arising instability of genome could give rise to malignancy.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

.....  
Hana Maršíková

V Českých Budějovicích dne 28.4.2008

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli RNDr. Janu Ženkovi, CSc. za vedení mé práce, hodnotné rady, odbornou pomoc a velké množství trpělivosti. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za poskytnutí prostředků a zázemí v Laboratoři interakcí vektor-hostitel a také celému personálu Oddělení imunologie parazitů Parazitologického ústavu AVČR za pomoc a skvělou přátelskou atmosféru.

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	6
1.1 Rakovina.....	6
1.2 Mutační hypotéza .....	8
1.2.1 Základní postuláty mutační hypotézy .....	8
1.2.1.1 Independence na růstových signálech z okolí .....	8
1.2.1.2 Insensitivita k protirůstovému signálu .....	9
1.2.1.3 Obejití apoptózy .....	9
1.2.1.4 Neomezený replikační potenciál .....	10
1.2.1.5 Angiogeneze .....	11
1.2.1.6 Invaze do tkáně a metastázování .....	12
1.2.2 Sporné body mutační hypotézy .....	13
1.2.2.1 Otázka dědičnosti .....	13
1.2.2.2 Nemutagenní kancerogeny .....	13
1.2.2.3 Dlouhá neoplastická latence .....	14
1.2.2.4 Exaktní korelace mezi rakovinou a aneuploidií .....	14
1.2.2.5 Pre-neoplastická aneuploidie.....	14
1.2.2.6 Specifické chromozomální alterace .....	15
1.2.2.7 Komplexita fenotypů tumorů .....	15
1.2.2.8 Gen pro rakovinu.....	15
1.3 Chromosomální hypotéza kancerogeneze .....	16
1.4 Otázka, z které buňky nádory vznikají.....	16
1.5 BMDCs, MAPCs a VSEL buňky .....	18
<b>2 Cíle práce</b> .....	18
<b>3 Materiál a metody</b> .....	19
3.1 Materiál .....	19
3.2 Metody .....	19
3.2.1 Izolace BMDCs .....	19
3.2.2 Kultivace a proliferace .....	19
3.2.3 Trypsiniace .....	20
3.2.4 Fúze .....	20
3.2.5 Fixace a barvení .....	20

3.2.6 Kontroly životnosti, počet buněk .....	21
3.2.7 Kultivace výsledné suspenze.....	21
3.2.8 Aplikace <i>in vivo</i> .....	21
3.2.9 Sféroidy .....	22
<b>4 Výsledky .....</b>	<b>23</b>
4.1 Izolace a kultivace BMDCs.....	23
4.2 Životnost buněk.....	23
4.3 Optimalizace doby fúze.....	24
4.4 Vlastnosti fúzních produktů <i>in vitro</i> .....	25
4.5 Vlastnosti fúzních produktů <i>in vivo</i> .....	30
4.6 Sféroidy .....	30
<b>5 Diskuze .....</b>	<b>36</b>
<b>6 Závěr.....</b>	<b>38</b>
<b>7 Seznam citované literatury .....</b>	<b>39</b>

# 1. Úvod

## 1.1 Rakovina

Rakovina je jedním z nejčastějších a nejzávažnějších onemocnění lidské populace. V současnosti ve světě trpí touto chorobou přibližně dvacet miliónů lidí a každým rokem dalších deset miliónů přibývá. Ročně na ni zemře přes šest miliónů lidí, je to druhá nejčastější příčina úmrtí hned po kardiovaskulárních onemocněních. Prognózy nejsou nikterak příznivé, čísla mají tendenci neúprosně stoupat.

Jako rakovina se označuje skupina nemocí, které se vyznačují nekontrolovaným buněčným dělením klonálního charakteru. Tento růst vytváří útvar – nádor, není v rovnovážném stavu s organismem a postihuje okolní orgány a tkáně ať už přímo či nepřímo.

Nádory se dělí na benigní a maligní. První skupinou jsou nádory nezhoubné (benigní), které rostou spíše pomalu, bývají opouzdřené, většinou nevrůstají do okolních tkání a sousední struktury častěji jen utlačují. Nejpodstatnější je, že nepronikají do cév krevního nebo mízního řečiště a nezakládají druhotná ložiska – metastázy. Buňky, ze kterých se skládají, nebývají příliš odlišné od těch, z nichž vznikly. Benigní tumory jsou tak jen vzácně hrozbou ohrožení života.

Druhou skupinou, podstatně nepříznivější, jsou nádory zhoubné (maligní). Ty rostou rychle, některé z nich jsou neopouzdřené, ale i u opouzdřených pronikají dříve či později jejich buňky pouzdrem a vrůstají do okolních tkání, které ničí. Takovému šíření říkáme místní šíření nádoru. Brzy potom však agresivní buňky naruší stěny cév a šíří se do organismu cévní a mízní soustavou. Pokud jsou v nějakém místě příznivé podmínky pro jejich další dělení, vznikají metastázy. Šíření zhoubných buněk krevní a mízní cestou se nazývá metastazování.

Většina mortality, kterou má rakovina na svědomí, není výsledkem primárních nádorů, ale právě metastatického rozsevu. Aby mohlo dojít k pomnožení nádorových buněk, musí tyto buňky nejprve proklouznout systémem komplexního imunitního dozoru.

Zhoubné bujení je genetickým onemocněním. Proces onkogeneze na buněčné úrovni je úzce spjat s kontrolou buněčné proliferace, diferenciací a programované smrti buněk (apoptózy). Výše jmenované procesy jsou u vyšších organismů regulovány mnohastupňovými mechanismy, které zahrnují intracelulární a extracelulární kontrolní dráhy. Většina, pokud ne všechny nádorové buňky, obsahuje mnohačetné genetické změny, které pravděpodobně podporují proces tumorigeneze právě poškozováním důležitých kontrolních drah. Iniciací

nádorového procesu se účastní mutace různých genů, zejména genů kódující proteiny signalizačních drah pro buněčnou proliferaci, komponenty cytoskeletu zapojené do udržení kontaktní inhibice, regulátory buněčného cyklu, složky aparátu programované buněčné smrti a proteiny odpovědné za detekci a opravu mutací.

Jako lidská choroba byla rakovina popsána již kolem roku 1600 př.n.l. ve starých písmech Egyptanů. Řecký lékař Hippokrates začal nádory dělit na benigní a maligní. Ohromný pokrok ve výzkumu byl zaznamenán v osmdesátých letech dvacátého století, kdy prezident Amerických států Richard Nixon vyhlásil rakovině válku. Navzdory tomu vznik této choroby dodnes není objasněn. V minulých dvou stoletích bylo predikováno mnoho teorií kancerogeneze, z těch ranějších například hypotéza dráždění, embryonální či parazitická (Pitot, 1986). Z rozvojem experimentální onkologie bylo identifikováno mnoho karcinogenů a molekulární biologie odhalila desítky genů pro onkogeny a tumorové supresory (McBride et al., 1982). Studie vyvinuly tzv. mutační hypotézu, která dominuje v posledních desetiletích (Fearon and Vogelstein, 1990). Přesto ale nevysvětluje mnoho důležitých vlastností rakoviny (Schneider and Kulesz-Martin, 2004). Mutační hypotéza předpokládá, že během maligní transformace buňky dojde k sérii 4-7 mutací. Tato představa je v rozporu s krátkým životem většiny diferencovaných buněk. Řešení tohoto rozporu nabízí recentní teorie účasti kmenových buněk při kancerogenezi, kdy by dlouho žijící kmenové buňky měly akumulovat genetické mutace a stávat se tak zhoubnými buňkami, takže tato hypotéza je úzce spjata s předešlou. Ovšem ani tak se stále neobjasní některé typické vlastnosti tumoru, jako jsou invaze a metastázování.

Mutace jsou poměrně vzácné. Matematické modely poukazují na to, že by musely být více časté, aby spustily maligní transformace (Luebeck and Moolgavkar, 2002). Bylo navrženo, že by některé charakteristické znaky rakoviny mohly být vysvětleny nestabilitou genomu (Hanahan and Weinberg, 2000) danou aneuploidií, která je pozorována u většiny nádorů (Mertens et al., 1997). Aneuploidii je těžké vysvětlit pouze mutační hypotézou (He et al., 2005), logičtější je její chápání jako důsledek primární fúze buněk s následným vyštěpováním chromozomů.

Proto jsme se rozhodli experimentálně vyzkoušet fúzní teorii, kde budou použity pouze zdravé buňky kostní dřene, bez žádných záměrných malignit či mutací.

## **1.2. Mutační hypotéza**

### **1.2.1. Základní postuláty mutační hypotézy**

Mutační hypotéza je v současnosti dominující hypotézou. Rakovinu chápeme jako množinu přibližně sta příbuzných onemocnění, které vznikají v důsledku 4 až 7 následných mutací buněk, není řešena otázka kterých. Pro rakovinu jsou charakteristické níže uvedené vlastnosti (Hanahan et al., 2000):

#### **1.2.1.1 Independence na růstových signálech z okolí**

Normální buňka musí z okolí přijmout mitogenní růstový signál, aby se z klidového stadia aktivovala do proliferačního. Tyto signály jsou do buňky přenášeny transmembránovými receptory. Dosud nebyla pozorována buňka, která by proliferovala bez přítomnosti takovýchto signálů. Naproti tomu nádorové buňky nevykazují přílišnou závislost na exogenních růstových signálech, zřejmě si samy vytvářejí vlastní signály, aby omezily závislost na stimulaci okolní tkáně. Tímto obcházejí významný homeostatický mechanismus. Jsou známy tři molekulární strategie k dosažení autonomie – od změny extracelulárního růstového signálu po změny při transcelulárním přenosu a v intracelulárním oběhu, kde se signál mění v akci. Většina mitogenních růstových faktorů je vyráběna jedním typem buněk a stimuluje proliferaci jiných, jde o tzv. heterotypickou signalizaci. Oproti tomu nádorové buňky mají samy schopnost syntetizovat růstové faktory, ke kterým jsou citlivé. Říká se tomu zpětnovazební smyčka neboli autokrinní regulace. Tím si zajišťují nezávislost na okolí.

U povrchových receptorů, které přenášejí růstové stimulační signály do buněk, dochází v průběhu tumorové patogeneze k deregulaci. U mnoha typů nádorových buněk byla pozorována zvýšená tyrosin-kinázová aktivita. Tím se buňka stane hyperresponsibilní k běžné hladině růstového faktoru, která by za běžných podmínek proliferaci nezpůsobila. Nebo může dojít ke strukturální změně receptoru, jako se tomu děje při ligand-independentní signalizaci, kdy byla prokázána zkrácená forma epidermálního růstového faktoru.

Nádorové buňky také mohou ovlivnit receptory extracelulární matrix a upřednostňovat ty, které přenášejí růstový faktor. Tím je umožněno integrinovým receptorům přenášet do cytoplasmy signály, díky kterým je buňka schopna přejít do aktivního cyklu a být rezistentní vůči apoptóze. Obecně se má za to, že mnoho typů nádorových buněk tvoří růstové signály ve stromálních komponentách buněk tumorové masy.



### 1.2.1.2 Insensitivita k protirůstovému signálu

Ve zdravé tkáni je klidový stav buňky a homeostáze udržován četnými antiproliferativními signály. Ty jsou uloženy v extracelulární matrix a na povrchu přilehlých buněk, přes transmembránové receptory se dostávají do intracelulárního oběhu. Signály mohou zastavit proliferaci dvěma různými mechanismy. Buď jsou buňky udržovány v klidovém stadiu (G<sub>0</sub>), ze kterého se mohou aktivovat, jakmile přestane působit inhibitor proliferace, nebo jsou trvale zbaveny proliferativního potenciálu vyvoláním postmitotického stadia, většinou spojeného se získáním specifických diferenciačních vlastností. Aby se mohla buňka stát nádorovou, nesmí být citlivá vůči těmto signálům. Mnoho způsobů znečitlivujících buňku je spojeno se zastavením buněčného cyklu, zvláště ve stadiu vstupu do G<sub>1</sub> fáze. Buňka přijímá z okolí signály, na jejichž základě proliferuje, přechází do klidového stadia nebo do postmitotické fáze. Antiproliferační signály jsou řízeny proteinem retinoblastoma (pRb), p107 a p130. V hypofosforylovaném stavu pRb zastaví proliferaci změnou nebo blokováním funkce transkripčního faktoru E2F, který kontroluje úroveň exprese genu esenciálního pro progresi buňky z G<sub>1</sub> do S fáze. Zablokováním pRb se uvolní E2F, což umožní proliferaci bez citlivosti k protirůstovým faktorům, které se obvykle v okolí nacházejí, aby zadržely buněčný cyklus v G<sub>1</sub> fázi. Jedním ze známých represorů pRb je i TGFβ.

Buněčná proliferace hodně závisí na obejití cytostatického protirůstového signálu. Tkáň silně potlačuje množení buňky jejím nasměrováním do ireverzibilního postmitotického stadia. Užívá se k tomu různých mechanismů, které ještě nebyly přesně popsány. Je zřejmé, že nádorové buňky užívají mnoho strategií, díky nimž se vyhnou této terminaci. Zatímco komponenta a spojení mezi četnými protirůstovými a diferenciaci indukujícími signály a průběhem buněčného cyklu je zatím nejasné, existence oběhů protirůstových signálů byla prokázána pro nádorové buňky jako nezbytnost pro obejití kontrol.

### 1.2.1.3 Obejití apoptózy

Schopnost rychlé expanze populace nádorových buněk spočívá nejen v ovlivnění proliferace, ale i míry opotřebování buňky. To je většinou regulováno programovanou buněčnou smrtí – apoptózou. Rezistence vůči apoptóze je jednou z hlavních charakteristik nádorových buněk. Jde o děj, kdy během 30 – 120 minut dojde k prasknutí buněčné membrány, cytoplasmatická a jaderná kostra jsou narušeny, cytosol vytlačen, chromozómy degradovány a jádro rozděleno. Nakonec je sraštělé tělo buňky pohlceno okolní buňkou a

zmizí v tkáni během 24 hodin.

Při apoptóze můžeme rozlišovat dvě velké třídy komponent – senzory a efekty. Senzory jsou zodpovědné za monitorování podmínek extracelulárního a intracelulárního prostředí a rozhodnou, zda bude buňka zachována či zemře. Tyto signály reguluje druhá třída komponent, která funguje jako efekty apoptotické smrti. Hlídán bývá i povrch buňky, kde jsou receptory pro faktory přežití a smrti. Intracelulární senzory kontrolují poškození DNA (signalizuje nerovnováhu způsobenou onkogenem), nedostatek faktorů přežití nebo hypoxie. Dále je život buňky také udržován pomocí adherentních signálů typu buňka – buňka, buňka – matrix, při jejichž odstranění dojde též k apoptóze.

Mnoho signálů, které vedou k apoptóze, směřují na mitochondrie, které jsou zodpovědné za proapoptotické signály uvolněné cytochromem C, silným katalyzátorem apoptózy. Například tumor-supresorový protein p53 může spustit apoptózu zvýšenou expresí proapoptotického Bax jako odpověď na zjištění poškození DNA. Bax stimuluje mitochondrie k uvolnění cytochromu C.

Základními efekty apoptózy je řada intracelulárních proteáz zvaných kaspázy. Dvě základní – 8 a 9 – jsou aktivovány receptory smrti (jako jsou FAS a cytochrom C), čímž spustí desítky dalších kaspáz, které provedou programovanou smrt buňky.

Resistence k apoptóze může být řízená různými mechanismy. Nejběžněji se vyskytuje ztráta proapoptotického regulátoru, které lze dosáhnout mutacemi zahrnujícími i tumor-supresorový gen p53. Signály evokované jinými abnormalitami, zahrnující hypoxii a hyperexpresi onkogenu, jsou také směřovány zčásti přes p53 a k apoptóze.

Dnes je již možné odhadnout průběh programované smrti, třebaže ne zcela přesně. Důležité je hlavně to, že mnoho regulačních a efektorových komponent je přítomno v nadbytkovém množství. Na tomto faktu se také nově zakládá vývojová větev terapie tumorů.

#### **1.2.1.4 Neomezený replikační potenciál**

Buňky mají ohraničený replikační potenciál. Každá populace se množí do určitého počtu dělení, potom přestane růst. Tomuto procesu se říká stárnutí. Poté se projeví masivní úhyn. Mnoho typů nádorových buněk je považováno za nesmrtelné. Možná získaly neomezený replikační potenciál během progresu nádoru a je rozhodně důležitá pro maligní růst. Obecně se tvrdí, že v určitém bodě mnohastupňové progresu se vyčerpá povolená hranice dělení a proces může být dokončen pouze tehdy, pokud se poruší mortalitní hranice.

Konce chromozomů (telomery) jsou složeny z několika tisíc 6 bp sekvencí. Při každém replikačním cyklu se jeden konec každého chromozomu zkrátí o 50 – 100 bp. Toto rychlé zkracování má za následek neúplnou replikaci 3' konce chromozomu DNA polymerázou. Nechráněné konce DNA se pak účastní konec - konec chromozomální fúze a dojde ke karyotypické nerovnováze, která většinou nevyhnutelně směřuje buňku na smrt. Telomeráza může dokonce vrátit buňky v neomezeném replikačním potenciálu zpět do normálního cyklu.

Důkazem pro působení telomerázy v tomto mechanismu je, že u myši telomeráza v somatických buňkách za normálních okolností chybí. Po aplikování karcinogenu se však funkce aktivuje a její činnost zvyšuje spolu s rostoucí dávkou karcinogenu. Udržování telomer je tedy jasnou podmínkou průběhu neomezeného dělení.

### **1.2.1.5 Angiogeneze**

Krevním řečištěm se k buňkám dostává tolik potřebný kyslík a živiny. Aby měly buňky dostatek těchto látek, musí být od kapilár uloženy v okruhu 100 μm. Tato blízkost je zajišťována již v průběhu organogeneze koordinovaným růstem cév a parenchymu, když už je jednou tkáň vytvořena, další růst cév je dočasný a pečlivě regulovaný. Zdálo by se, že proliferující buňky v tkáni podporují angiogenezi. Ale opak je pravdou. Dojde k omezení růstu cév, čímž se sníží schopnost expanze.

Mezi signály iniciující angiogenezi řadíme vaskulární endoteliární růstový faktor (VEGF) nebo acidické a bazické fibroblastové růstové faktory (FGF 1/2). Každý se váže na transmembránové tyrosin-kinázové receptory prezentované endotelovými buňkami. Typickým inhibítozem angiogeneze je thrombospondin-1, který se váže na CD36, transmembránový receptor spřažený s intracelulární Src-like tyrosin kinázou. Dnes jsou známy desítky růstu cév indukujících faktorů a přibližně stejný počet inhibičních proteinů.

Také signály integrinů přispívají k regulaci rovnováhy. Opět existují dvě třídy. Jedna udržuje expresi cév v klidovém stadiu a druhá podporuje růst nových kapilár. Extracelulární proteázy jsou fyzicky i funkčně spojeny s proangiogenovými integriny a oba způsoby zvyšují schopnost invaze angiogeneze endotelových buněk.

Zdá se, že schopnost indukce a udržení růstu cév je aktivována v určitém stupni (stupních) tumorigeneze, spíše uprostřed procesu, rozhodně však dříve než je dokončen. Tento poznatek by bylo spolu s efekty angiogenních inhibitorů možné použít pro včasnou

detekci nádorů. Sledovala by se neovaskularizace, která předchází rapidní klonální expanzi spojenou s tvorbou makroskopického tumoru.

Vznik nádorové buňky je způsoben změnou rovnováhy angiogenních indukátorů a vyrovnávacích inhibitorů. Jednou z běžných strategií je změna v genové transkripci. V mnoha případech byla prokázána vyšší hladina VEGF a/nebo FGF vzhledem k okolní tkáni. Nebo může být snížena exprese endogenních inhibitorů, jako jsou thrombospondin-1 nebo  $\beta$ -interferon.

Dalším způsobem regulace je výskyt proteáz, které kontrolují dostupnost angiogenních aktivátorů a inhibitorů. Různé proteázy mohou uvolnit bFGF z extracelulární matrix, kde se plasmin, faktor koagulačního mechanismu, může rozštěpit na angiogenní inhibitor zvaný angiostatin.

#### **1.2.1.6 Invaze do tkáně a metastázování**

Dříve nebo později při zdárném vývoji většiny typů tumorů dojde k uvolnění buněk do okolí, kde se mohou uchytit v přilehlé tkáni nebo putovat tělem na vzdálenější místa, kde se zachytí a vytvoří další kolonii – metastázu. Schopnost invaze a metastázování umožňuje nádorovým buňkám opustit primární tumor a kolonizovat v těle nové místo, kde je dostatek živin a prostoru. V metastázách se vyskytují nejen buňky s rakovinným bujením, ale i zdravé, které byly přitaženy z okolí.

Invaze a metastázování jsou mimořádně komplexní procesy, které ještě nebyly detailně popsány. Oba využívají podobné mechanismy, kde se vyskytují změny fyzického spojení buňky s mikroprostředím a aktivace extracelulárních proteáz.

Několik tříd proteinů, účastnících se na adhezenci povrchů buněk, mohou buňce dát schopnost invaze nebo metastázování. Mezi tyto proteiny řadíme molekuly způsobující adhezi buňky k buňce, kam řadíme imunoglobuliny, cadheriny a integriny, které spojují buňku s extracelulární matrix. Nejčastěji byl pozorován E-cadherin. Je přítomný na epitelových buňkách a zajišťuje přenos protirůstových (ale i jiných) signálů, které pak předává  $\beta$ -cateninům do intracelulárního prostoru. Většina epiteliálních nádorů ztratila funkci E-cadherinů zřejmě mutací genů pro E-cadheriny či  $\beta$ -cateniny, represí transkripce nebo proteolýzou extracelulárních domén cadherinů. U integrinů se musí změnit spektrum  $\alpha$  nebo  $\beta$  podjednotek, aby byla kolonizace úspěšná. Regulací exprese podjednotek je tedy buněčná kultura schopna indukovat nebo inhibovat invazivitu a metastázování.

Druhým hlavním parametrem invaze a metastázování jsou extracelulární proteázy. Matrix-degradující proteázy jsou charakteristicky vázány na povrch buňky, spojují se s transmembránovými doménami, které vážou integriny nebo specifické receptory proteáz. V mnoha případech nejsou tyto proteázy produkovány epitelovými nádorovými buňkami, ale spíše buňkami podpůrné vazivové tkáně a zánětu, které jsou jimi ovlivňovány.

Schopnost invaze a metastázování jsou nyní nejvíce studované oblasti ve výzkumu rakoviny. Při současném vývoji technik bude již brzy možné objasnit expresi a funkční aktivitu proteáz a integrinů, což povede k lepším terapiím.

## **1.2.2 Sporné body mutační hypotézy**

Stále existuje několik hypotéz vzniku rakoviny, přestože je studována již přes sto let. Mezi nejvíce diskutované teorie se řadí mutace, chromozomální alterace nebo epigenetický vliv. V současnosti převažují genově mutační hypotézy, pojímající rakovinu jako „genetické onemocnění“ (Bishop, 1995; Knudson, 2001; Vessey et al., 2000). Tyto hypotézy založené na genech říkají, že nádor vznikne při klonální expanzi buněk, u kterých došlo k nahromadění čtyř až sedmi specifických a komplementárních mutací. Ovšem těmito teoriemi se nedá vysvětlit ještě mnoho vlastností tumorů (Duesberg et al., 2005).

### **1.2.2.1 Otázka dědičnosti**

Obecně se má zato, že buňky živočichů jsou na počátku života bez znaků rakovinného bujení. Výskyt rakoviny však stoupá velmi výrazně s rostoucím věkem, rakovina je nemocí především stáří. To však nikterak nelze vysvětlit genově mutačními teoriemi. Například k rakovině tlustého střeva zřejmě vede 6 mutací (Michor et al., 2005). Pokud potomek získá 3 mutace od matky, 2 od otce, pak je vysoká pravděpodobnost, že se brzy spustí nádorové bujení, neboť v jedné z několika miliard buněk tlustého střeva může dojít i k šesté mutaci. K tomu však nedochází.

### **1.2.2.2 Nemutagenní kancerogeny**

Kancerogeny rozumíme chemické a fyzikální látky, inhibující kancerogenezi. Ty mohou být mutagenní nebo nemutagenní. Mezi nemutagenní řadíme například azbest, dehet, minerální oleje, naftalen, polycyklické aromatické uhlovodíky, dioxin, hormony či ionty některých kovů. Též mnoho činitelů, kteří urychlují kancerogenezi (tumor-promotory), jsou

spíše nemutagenní než mutagenní (krotonový olej, phorbolacetát). Mutační hypotéza nedokáže vysvětlit kancerogenezi způsobenou nemutagenními kancerogeny či promotory.

### **1.2.2.3. Dlouhá neoplastická latence**

Klasická mutační teorie nepředpokládá rychle působící kancerogeny. Navzdory tomu však běžné karcinogeny jsou velmi rychlémi mutageny, jako např. rentgenové záření, UV záření a alkylující činitele. Ale všechny kancerogeny jsou velmi pomalé a způsobí bujení až po velmi dlouhé „neoplastické latenci“. Délka této latence se u hlodavců počítá na měsíce až roky, u lidí na roky až desetiletí. Příkladem za všechny jsou lidé, kteří přežili útok atomovými bombami v roce 1945 a po dvaceti letech se v populaci začaly objevovat nádory. Nebo když bývala v padesátých letech léčena tuberkulóza pomocí rentgenových paprsků, začala se u pacientů po patnácti letech vyskytovat rakovina plic. Rakovinné bujení se tedy vyvíjí pomalu, bez dalších exogenních vlivů. Naproti tomu mutační teorie předpokládá rozvoj kancerogeneze, jakmile je buňka vytavena dostatečné dávce kancerogenu a pro neoplastickou latenci nemá vysvětlení (Cairns, 1978).

### **1.2.2.4. Exaktní korelace mezi rakovinou a aneuploidii**

Aneuploidie je u rakoviny pozorována již od samého začátku výzkumu (Atkin et al., 1966). Vysvětluje abnormální expresi tisíců genů, pozorovanou u nádorových buněk (Aggarwal et al., 2005). Je definována jako ztráta nebo získání celých chromozomů či jejich úseků. Nádorové buňky navíc často obsahují extrachromozomální formy aneuploidních segmentů chromozomů zvané amplikony. Ubikvitární výskyt aneuploidii u rakovin není mutační hypotéza schopna vysvětlit.

### **1.2.2.5. Pre-neoplastická aneuploidie**

Bylo zjištěno, že k aneuploidii dochází již v prekancerózních tkáních (Ai et al., 1999; Balaban et al., 1986; Bocking et al., 1989) hovoříme o pre-neoplastické aneuploidii. Duesberg a spol. (Duesberg et al., 2005) považuje aneuploidii za iniciátor kancerogeneze. Mutační hypotéza jev a význam aneuploidie nedokáže pojmut a vysvětlit.

### **1.2.2.6. Specifické chromozomální alterace**

Navzdory nestabilitě genomu a ohromné heterogenitě nádorových buněk existují i částečně specifické, nenáhodné chromozomální alterace zvané také aneusomie. Jsou spojovány s určitými ději kancerogeneze, jako jsou např. stupeň neoplastické transformace, invazivita, metastázování, rezistence vůči lékům, buněčné morfologie či abnormální metabolismus.

Nádorově-specifické chromosomální alterace vytvářejí specifické fenotypy, které nejsou na mutacích závislé.

### **1.2.2.7. Komplexita fenotypů tumorů**

Specifické fenotypy rakoviny jako jsou abnormální metabolismus, metastázování, schopnost transplantování do heterologního druhu či „nesmrtelnost“ jsou pravděpodobně multigenní, protože všechny souvisí se změněnou expresí tisíců genů a s vysoce neobvyklou koncentrací mnoha proteinů (Aggarwal et al., 2005). Navíc počet centrozómů v aneuploidních rakovinných buňkách je zvýšený až pětkrát (Brinkley et al., 1998).

Takové komplexnosti nádor specifických fenotypů ale nelze dosáhnout nízkou, konvenční mírou genových mutací během poměrně krátkého života organismů.

### **1.2.2.8. Gen pro rakovinu**

V nádorových buňkách byly nalezeny četné genové mutace, které prý způsobují rakovinu. Ale žádné z těchto mutací nejsou nádorově specifické (Boland and Ricciardello, 1999). Nebyl nalezen žádný mutovaný gen ani jejich kombinace, které by přeměňovaly diploidní buňku v nádorovou (Akagi et al., 2003; Duesberg et al., 2004, Harris 2005).

Navzdory predikcím mutační hypotézy dopadl pokus - kdy byly myším uměle vyjmuty hypotetické tumorsupresorové geny a do zárodečné linie vložený domnívaný geny pro rakovinu - tak, že tyto myši žily po několik generací se stejnými nebo jen lehce vyššími sklony k nádorům (Duesberg, 2003).

### **1.3. Chromozomální hypotéza kancerogeneze**

Výše uvedené rozpory v genově – mutační hypotéze kancerogeneze řeší Duesberg a spol. (Duesberg et al., 2005) ve své chromozomální hypotéze kancerogeneze. Jako primární jev spatřuje vznik aneuploidie pod vlivem nejrůznějších kancerogenních stimulů. Jeho hypotéza odpovídá na všechny výše uvedené problémy a vysvětluje i specifitu nádorových fenotypů. Základním východiskem je ubikvitární výskyt aneuploidií v prekancerózních a kancerózních stavech. Nedostatky v mutační hypotéze a elegantní chromozomální hypotéza byly pro naši práci velmi inspirativní s tím, že jsme se pokusili řešit neřešenou otázku mechanismu vzniku aneuploidie. Předpokládáme, že jedním z prvních kroků je buněčná fúze a aneuploidie je pak důsledkem toho, že se labilní tetraploidní genom zbavuje části chromozomů.

### **1.4. Otázka, z které buňky nádory vznikají**

Nádory jsou většinou považovány za produkt klonální expanze jediné transformované buňky. Žádná z uvedených hypotéz tuto otázku neřeší a ani našim cílem nebylo na tuto otázku odpovědět. Nicméně vzhledem k původu buněk, které jsme použili pro naši experimentální práci je nutno tuto problematiku otevřít.

Potřebu řešit otázku buněčného původu rakoviny vyvolává již i samotná mutační hypotéza, neboť ta předpokládá existenci 4 - 7 následných buněčných mutací. To si nelze představit u většiny krátce žijících somatických buněk, pozornost se proto obrací ke kmenovým buňkám. Existence celé řady vlastností, které jsou sice vyjádřeny v různé míře, ale jsou společné rakovinným buňkám (invazivita, metastázování) vyvolává úvahy o možnosti jednotného původu nádorů. V tomto směru zásadní změnu pohledu na původ nádorů přinesla pro nás průvodní práce (Houghton et al., 2004). Práce popisuje u chronické infekce *Helicobacterem* vznik nádoru žaludku z buněk kostní dřeně.

Je známo, že z kostní dřeně migrují buňky (bone marrow derived cells – BMDCs) a tyto buňky se účastní regenerace poškozených tkání, přičemž názory na probíhající mechanismy se různí (Ferrari et al., 1998; Ianus et al., 2003; Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003). Lze předpokládat, že BMDCs se rovněž účastní regenerace tkání



poškozovaných kancerogenními stimuly (chemické, fyzikální, biologické). Namigrované BMDCs pak buď přímo podlehnou působení kancerogenních stimuluů, nebo fúzí s již maligně transformovanými buňkami tkání dle fúzního modelu kancerogeneze (He et al., 2005).

Prokáže-li se, že zmíněná práce (Houghton et al., 2004) , popisující vznik nádoru žaludku z buněk kostní dřeně, není jen výjimkou, pak to zcela může změnit naše chápání rakoviny, neboť by se pak hovořilo o nádoru v tkáni, a ne o nádoru tkáně. Dá se předpokládat, že by to zásadně změnilo i terapeutický přístup k celému problému.

O tom, že buňky kostní dřeně mají dostatečný potenciál ke vzniku nejrůznějších nádorů svědčí práce skupiny, kterou vedl Liu (Liu et al., 2006). Zde byla *in vitro* vyvolána tvorba celé řady nádorů (včetně teratomů), z BMDCs pomocí metylcholanthrenu (MCA).. Tato práce se stala bezprostředním experimentálním východiskem naší studie. Nešlo nám ale o řešení otázek účasti BMDCs v kancerogenezi, ale dali jsme si za úkol zvážit roli buněčných fúzí v procesu kancerogeneze. MCA nemá sám o sobě mutagenní vlastnosti, ale mutageny z něj vznikají působením cytochromu P450 (Wood et al., 1978). Kromě toho však MCA vyvolává fúze (Fortuna et al., 1989). Tento fakt a výše uvedená úvaha o roli buněčných fúzí při vzniku aneuploidií a následné kancerogenezi nás tedy přivedly k myšlence vyzkoušet, jakou roli může hrát v procesech kancerogeneze samotná buněčná fúze a zda vznik labilního genomu vzniklého fúzí navíc silně dediferencovaných buněk by sám o sobě nemohl vést k maligní transformaci.

Rozhodli jsme se indukovat fúze BMDCs pomocí polyethylenglykolu (PEG). Kromě přímého působení jsme se pokusili nejprve připravit sféroidy působením proteáz (Novák and Trnka, 2005; Ženka - v přípravě). Domnívali jsme se, že tento model bude pro buněčné fúze vhodnější, neboť buňky jsou zde v přímém kontaktu, což by mohlo jejich fúzi výrazně usnadnit a zvýšit její výtěžnost. Vzhledem k tomu, že jsou sféroidy používány jako lepší nádorový model než buňky adherované na polystyrénovém dně, měl by tento přístup rovněž blíže dějům probíhajícím při vzniku a rozvoji nádorů.

## 1.5. BMDCs, MAPCs a VSEL buňky

Bone marrow derived cells (BMDCs) jsou zajímavé nejen z hlediska regenerací různých tkání, ale jak vyplývá z výše uvedeného, jsou tyto buňky zajímavé i jako možný zdroj nádorového bujení a solidních tumorů, tedy podstatně širšího rejstříku než jsou leukémie.

BMDCs jsou směsí buněk. V prostředí stromálních buněk zde nalezneme celou řadu důležitých kmenových buněk, jako jsou hematopoetické kmenové buňky, mesenchymální kmenové buňky a endoteliární kmenové buňky. Z hlediska vzniku zmíněných solidních nádorů v jiných tkáních se jeví jako nedůležitější mesenchymální kmenové buňky, neboť ty mají obrovskou plasticitu, jsou schopny diferencovat v buňky nejrůznějších tkání (účast v regeneracích) a je možno zvažovat i jejich patologickou roli v kancerogenezi. Hematopoetické buňky a jejich diferenciatní produkty se kancerogeneze často účastní, ale to je jiná oblast - jedná se o leukémie.

Kromě těchto buněk bylo popsáno, že mezi buňkami kostní dřeně se vyskytují multipotent adult progenitor cells (MAPCs), popsané Reyes a Verfaillie, 2001. Tyto vysoce plastické buňky jsou schopny diferencovat v různé tkáně všech tří vrstev zárodečné linie (Verfaillie et al., 2003). Je tedy zvažován jejich význam pro regenerace poškozených tkání, ale zároveň se nabízí otázka, zda nemohou být rovněž zdrojem nádorového bujení.

Dalším velmi zajímavým buněčným typem nedávno objeveným v kostní dřeni jsou very small embryonic-like (VSEL) buňky (Kucia et al., 2006). Jedná o vysoce dediferenciované buňky s obrovským diferenciatním potenciálem. Tyto 2 – 4  $\mu\text{m}$  velké buňky mají euchromatin, typický pro embryonální kmenové buňky. Je zvažována jejich účast v procesech regenerace i kancerogeneze.

## 2. Cíle práce

Osvojit si techniku přípravy a kultivace buněk kostní dřeně (BMDCs)

Provést s těmito buňkami fúzní experimenty

Vyhodnotit *in vivo* a *in vitro* vlastnosti fúzních produktů a zvážit možnost účasti

## 3. Materiál a metody

### 3.1 Materiál

Byly použity samice myši inbredního kmenu C57BL/6 o váze 19-21 g (10 týdnů staré) dodané firmou Charles River

### 3.2 Metody

#### 3.2.1 Izolace BMDCs

Myši byly usmrceny cervikální dislokací, pečlivě omyty 70% roztokem ethanolu a sterilně přeneseny do flowboxu, kde byly upevněny na pitevní stolek. Odstranila se kůže z oblasti zadních končetin a abdomenu, odstříhla a odškrabala svalovina z kosti stehenní (*femur*) a kosti holenní (*tibia*). Odřezaly se kosti končetin od kostry i samotné od sebe, vylomila kost lýtková a jednotlivé kosti se vkládaly do roztoku RPMI 1640 s antibiotiky, glutaminem, merkaptoethanolem a 10% bovinním fetálním sérem (Sigma). Kostí pak byly jednotlivě vyjímány z roztoku, očištěny od zbytků okolní tkáně. Jehlou injekční stříkačky se rozvolnila kostní dřev v dutině kosti a proudem RPMI 1640 vypláchla do kádinky. Tato heterogenní směs se poté homogenizovala několikerým protažením skrze jehlu injekční stříkačky. Suspenze se přefiltrovala přes sítko, stočila v centrifuze 10 minut při 1000 ot./min (= 150 g), slila, sediment se rozsuspendoval v RPMI, kvantitativně přenesl do kalibrované falkonky a objem doplnil na 12 ml. Každá myš byla pitvána zvlášť a na buňky její kostní dřevě připadla vždy jen jedna falkonka.

#### 3.2.2 Kultivace a proliferace

Buňky byly kultivovány v termostatu při 37°C v atmosféře nasycené vodními parami obsahující 5% CO<sub>2</sub>. Po třech dnech většina adherujících buněk byla naadherována a zbytek byl spolu s neadherujícími buňkami odplaven při výměně média. Médium (RPMI 1640 s antibiotiky, glutaminem, merkaptoethanolem a 10% bovinním fetálním sérem) se poté

měnilo po dvou dnech. Již po jednom týdnu kultivace bylo možné pokračovat s kulturou dále v pokusu.

### **3.2.3 Trypsiniace**

Médium z falkonek se slije a kultivační nádobka se třikrát důsledně promyje dostatečným množstvím PBS. Po posledním slití se přidá 0,5 ml trypsinu a ihned se vylíje, pro dokonalé odstranění případných zbytků média se sérem. Znovu se přilije 0,5 ml trypsinu a nechá trypsinizovat při 37°C po dobu 7 - 8 minut. Zastaví se trypsinizace pomocí média RPMI 1640 se sérem, buňky se sklídí z falkonky do zkumavky a nechají stočit v centrifuze 10 minut při 150 g. Po slití média nastává fáze promývání buněk od séra, kdy se třikrát za sebou provede přidání 10 ml média RPMI 1640 s glutaminem, merkaptoethanolem a antibiotiky (ale bez séra!), centrifugace 10 minut při 150 g a následné slití supernatantu. Těsně před třetím promýváním se odebere 930  $\mu$ l jako kontrola, ze které se určí i životnost a dvojjadernost před fúzí.

### **3.2.4 Fúze**

Směs buněk se dokonale odsaje dosucha, vloží ve zkumavce do vodní lázně o teplotě 37°C, spustí se elektrické míchadlo se skleněnou, vrtulovitě zakončenou tyčinkou a během jedné minuty se za stálého míchání k buňkám přikapá 1 ml vytemperovaného roztoku PEG 1500 (Roche). Pak se buňky míchají další minutu. Potom se za neustálého míchání během deseti minut přikapá 10 ml vytemperovaného média bez séra. A nakonec se směs zcentrifuguje 10 minut při 150 g, rozsuspenduje v 930  $\mu$ l media s 10% FCS, určí počet buněk, dvojjadernost a životnost.

### **3.2.5 Fixace a barvení**

Barví se Giemsa-Romanowski metodou. Z předchozích postupů máme připravené dvě suspenze, jednu s nefúzovanými buňkami a jednu s fúzovanými. Z každého se odebere objem 200  $\mu$ l, zvláště se natáhnou na podložní sklíčka způsobem, jakým se provádí krevní nátěry, a nechají se řádně zaschnout. Potom se skla přelijí methanolem a nechá se pět minut působit. Následně se ponoří do roztoku May-Grünwald na tři minuty, pak do ředěného roztoku May-Grünwald s vodou v poměru 1:1 na jednu minutu a poté do roztoku Giemsa-Romanowski

ředěného s vodou v poměru 1:5 na 15 minut. Nakonec se sklíčka důkladně opláchnou pod tekoucí vodou a nechají oschnout. Preparáty jsou připravené k pozorování anomálií a dvojjadernosti.

### **3.2.6 Kontroly životnosti, počet buněk**

K určení životnosti a počtu buněk se užíla Bürkerova komůrka a trypanová modř (Sigma). Z výsledné suspenze se odebere 20  $\mu$ l, smíchá se s 20  $\mu$ l trypanové modře, čímž dosáhneme ředění 1:1, a naaplikuje se do Bürkerovy komůrky. Počítalo se vždy dvakrát 25 čtverců, z čehož se udělal průměr, a potom se stanovil počet buněk podle vzorce:

$$\text{počet buněk ve 25 polích} * \text{ředění} * 10^4 = \text{počet buněk / ml}$$

Životnost se určila podle procenta živých (tedy neobarvených) buněk v průměru z dvakrát 25 čtverců.

### **3.2.7 Kultivace výsledné suspenze**

Z výsledných suspenzí (fúzaných a kontrolních buněk) se odebere po 700  $\mu$ l a objemy se vloží do 24-jamkové kultivační desky. Ta se uloží do termostatu buňky se kultivují při 37°C a atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>. Kontrolní buňky se ale musí nejdříve zcentrifugovat 10 minut při 150 g, slít a znovu rozsuspendovat v 700  $\mu$ l média, ale tentokrát již se sérem (10% FCS), aby obě suspenze mohly růst ve stejně výhodných podmínkách.

### **3.2.8 Aplikace *in vivo***

U myši byl nejprve oholen pravý bok. V případě, že se testují buňky bezprostředně po fúzi, rozsuspendují se v RPMI 1640 bez séra (stejně jako kontrolní). V případě testování buněk po kultivaci se buňky nejprve trypsinizují a pak promývají třikrát s RPMI 1640 bez séra. Po spočítání a určení životnosti se aplikuje myším s.c. 0,1 ml suspenze buněk v médiu bez séra.

### 3.2.9 Sféroidy

Stanovení aktivity trypsinu: Byla použita metoda vyvinutá Erlangerem et al., 1961 používající jako substrát N-alpha-benzoyl-DL-Arg-p-nitroanilid (BAPNA), produkt firmy Sigma.

Při studiu vzniku sféroidů z BMDCs a studiu vlivu trypsinu na BMDCs v různém prostředí byla prováděna 72 hod kultivace BMDCs (24 000 buněk na jamku 24 jamkové destičky) v RPMI 1640 s antibiotiky (Sigma) v bezsérovém prostředí a prostředí 2, 4, 6 a 8 % FCS, případně 0,3% BSA (Sigma). Na buňky bylo působeno trypsinem o koncentracích v rozmezí  $1 \cdot 10^{-6}$  M až  $1 \cdot 10^{-4}$  M. Byl použit trypsin firmy Sigma o aktivitě 13 500 BAEE jednotek / mg proteinu. Kultivace probíhala v termostatu při 37°C v atmosféře nasycené vodními parami obsahující 5% oxidu uhličitého.

Vyhodnocování buněčné adherence bylo prováděno pomocí invertovaného mikroskopu. Bylo vyhodnocováno procento adherovaných buněk (nejrůznější stádia od přichycení a protažení jedním směrem až po plně adherované vřetenovité buňky). Za neadherované buňky byly počítány pouze kulaté buňky bez jakýchkoli známek adherence.

## 4 Výsledky

### 4.1 Izolace a kultivace BMDCs

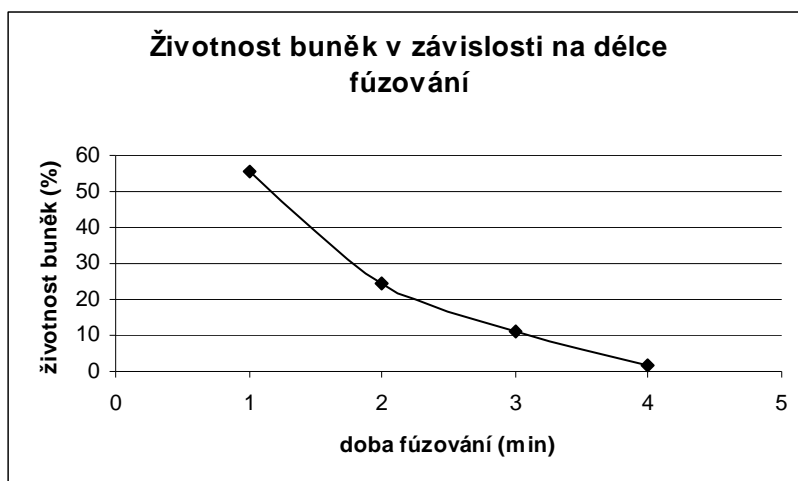
Bone marrow derived cells byly izolovány z myší starších šesti týdnů (Shengkun et al., 2003). Postupovalo se v naprosté sterilitě, převážně podle předepsaného protokolu (Shengkun et al., 2003) s tím rozdílem, že bylo místo média  $\alpha$ -MEM použito RPMI-1640 (Sigma), pak také s jehlou o velikosti 20-gauge se nedalo v některých úsecích kostí příliš dobře manipulovat, mnohem lépe se kostní dřev rozvolňovala s injekční stříkačkou tzv. inzulinou, která má průměr jehly menší. Po rozsuspendování se směs ještě přefiltrovala přes sítko, aby se do kultury nedostaly úlomky kostí a zbytky vaziva. Nakonec se suspenze zcentrifugovala (10 minut při 150 g). Teprve potom se buňky vložily do kultivačních nádob (s RPMI-1640 + 10% bovinní fetální sérum + glutamin + 2-merkapt ethanol + antibiotika) a nechaly adherovat v termostatu při 37°C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>. Po třech dnech byly buňky naadherovány a neadherující buňky byly vymyty při následné výměně média. Po pěti dnech BMDCs adherovaly natolik silně, že se svým tvarem podobaly fibroblastům.

### 4.2 Životnost buněk

Byla sledována a porovnávána životnost buněk před fúzí a po ní. Tím se také zabránilo případnému neúspěchu fúze z důvodu vysoké mortality buněk ještě před zahájením pokusu. Před fúzí podíl kolísal v rozmezí 84,4 – 97,5% a po fúzi životnost dosahovala hodnot 32,1 – 76,8%.

### 4.3 Optimalizace doby fúze

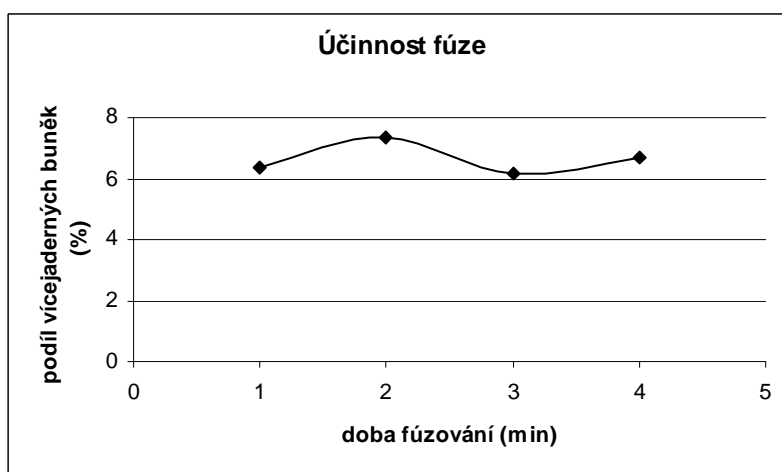
Pro optimalizaci metody se zkušelo nechat buňky fúzovat po dobu 1, 2, 3 a 4 minut po ukončení pomalého přikapávání 1 ml PEG 1500 (Roche) a před začátkem vyředování 10 ml média bez séra. Jako nejefektivnější se ukázala být jedna minuta. Při delší době expozice životnost buněk rapidně klesala (Obr. 1).



Obr. 1 Životnost buněk v závislosti na délce fúzování

Ani účinnost fúze (Kikuchi et al., 2001) se nijak nezvyšovala (Obr.2). Vypočítá se jako:

$$\text{účinnost fúze (\%)} = (\text{počet dvojjaderných příp. vícejad. buněk} / \text{počet všech buněk}) * 100$$



Obr. 2 Účinnost fúze



Účinnost fúze kolísala v rozmezí 6,17 – 7,33 %, z čehož lze vyvodit, že se vzrůstající dobou expozice buněk fúzoru efektivita procesu nijak nevzrůstala, ale právě naopak, vzhledem k mortalitě s rostoucím časem se fúze stávala neúspěšnou.

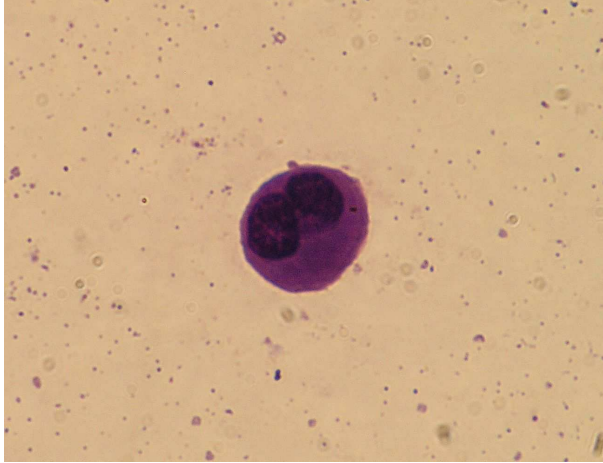
Pro další experimentální práci bylo zvoleno minutové fúzování, které zajistilo vznik dostatečného množství fúzních produktů a dobrou životnost.

#### **4.4 Vlastnosti fúzních produktů *in vitro***

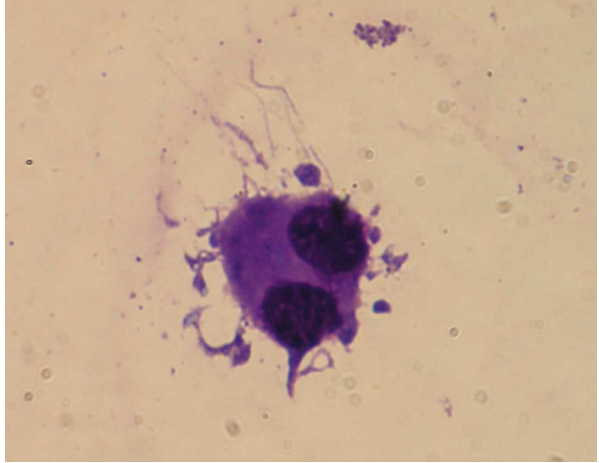
Fúzované buňky byly uloženy na kultivační 24-jamkové desky stejně jako kontrolní BMDCs. Na jednu jamku připadlo vždy cca 120000 buněk s 1 ml RPMI-1610 se sérem, glutaminem, merkaptoethanolem a antibiotiky. Byly pozorovány během inkubace, minimálně po 72 hodin. Za 24 hodin kontroly naadherovaly z cca 30%, u fúzovaných BMDCs nebyla známka adherování. Po 48 hodinách od počátku kultivace byly kontrolní buňky adherované z 60%, část fúzovaných se přichytila na dno jamky, ale tyto buňky postrádaly klasický adherentní tvar. Po třech dnech z BMDCs kontroly adherovalo 97%, zbytek byl odplaven při výměně média. Fúzované BMDCs se uchytily z 15%, přičemž stále zachovávaly svůj neadherovaný tvar.

U fúzních produktů byla sledována vícejadernost bezprostředně po fúzi. Projevila se v cca 6,4% pozorovaných buněk, viz Obr.3.

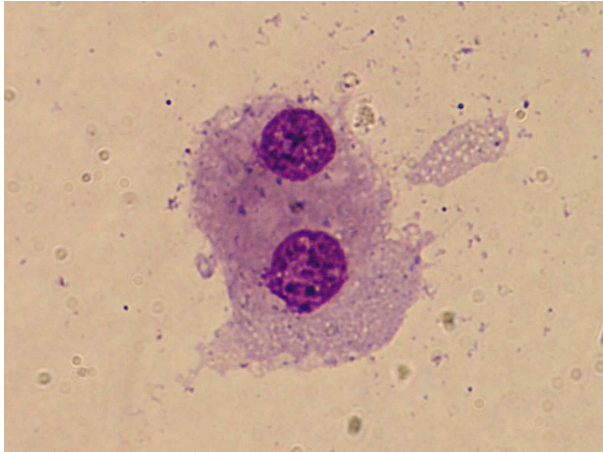
a



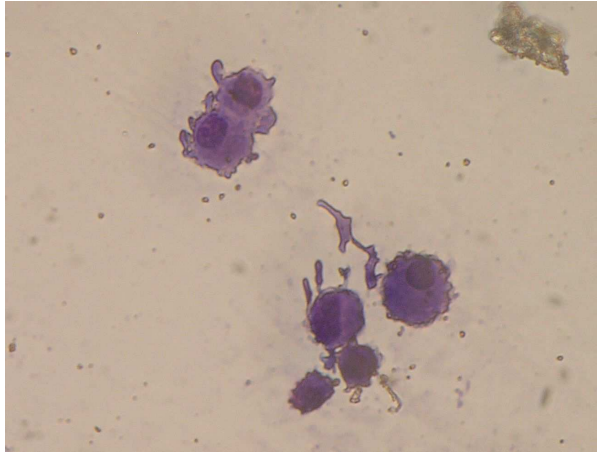
b



c

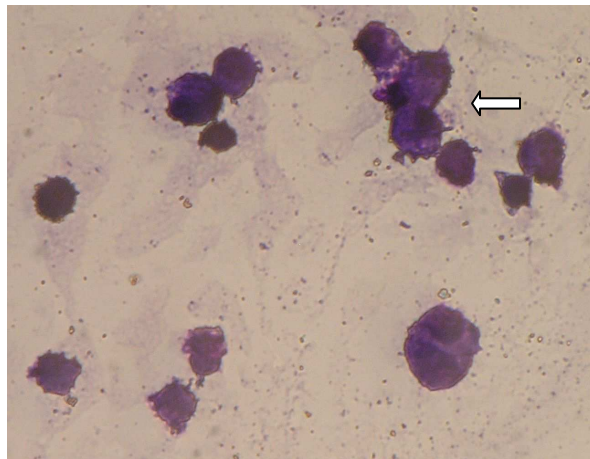


d



*Obr.3 Fúzující buňky. Obrazy a a b jsou zachyceny při zvětšení 400x, obraz c je zvětšen 1000x, obraz d 200x*

Záměrně je používán výraz vícejadernost, protože některé z buněk obsahovaly více než dvě jádra – Obr.4.

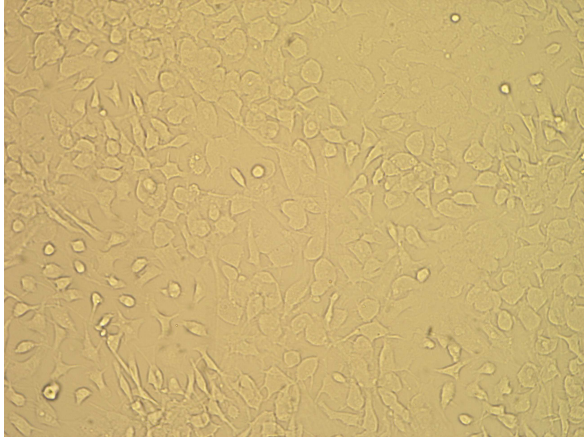


*Obr.4 Vícejaderná fúzující buňka*

V dalším experimentu bylo na jednu jamku 24-jamkové kultivační desky vyseto 550.000 buněk po fúzi. Kontrolní BMDCs kontroly adherovaly podle již dříve zmíněného schématu do tří dnů. U fúzovaných buněk se první den kultivace objevovaly shluky deseti až patnácti buněk, které se později opět rozpustily. Mezi buňkami na dnu jamky se vytvářely prázdné pásy, kde se neuchytila ani jedna buňka. Po několika dnech ale díky úspěšné proliferaci byla tato pole také překryta. Sféroidy (agregáty buněk) jsou používány jako modelové útvary pro studium rakoviny, proto nás samovolné vytvoření shluků velmi zaujalo a vedlo k dalšímu experimentu – viz dále.

V jamkách kultivačních plat se s postupnou proliferací od 9. dne kultivace utvářely a rostly útvary, které jsou v současnosti analyzovány v Laboratoři elektronové mikroskopie a jeví se být buněčného původu. Tyto útvary při výměně média nevymyly, ale při trypsinizaci (provedené 15. den) se naprosto rozpustily a během několika dnů znovu vytvořily. V jamkách kontrolních BMDCs se vyskytovaly jen ojediněle a byly jednoho typu (Obr.5), u fúzovaných buněk docházelo k tvorbě řady útvarů různých forem (Obr.6). Jejich původ není dosud objasněn.

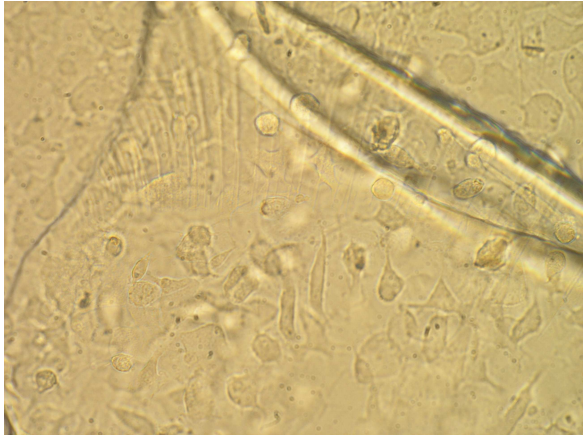
a



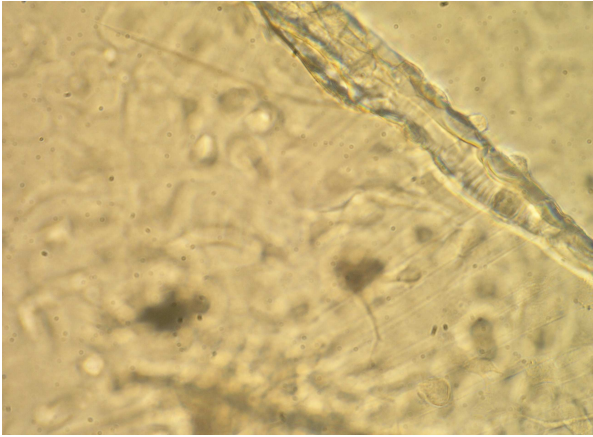
b



c



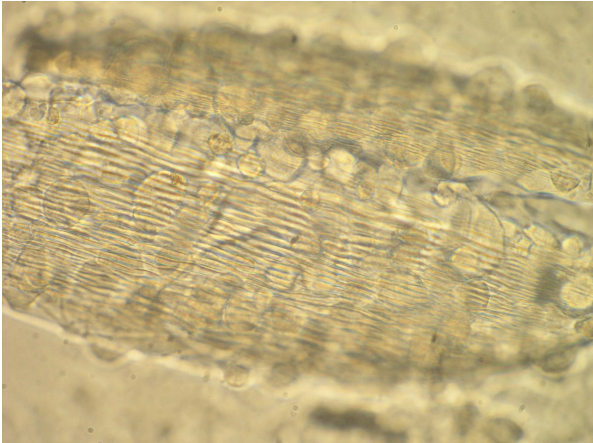
d



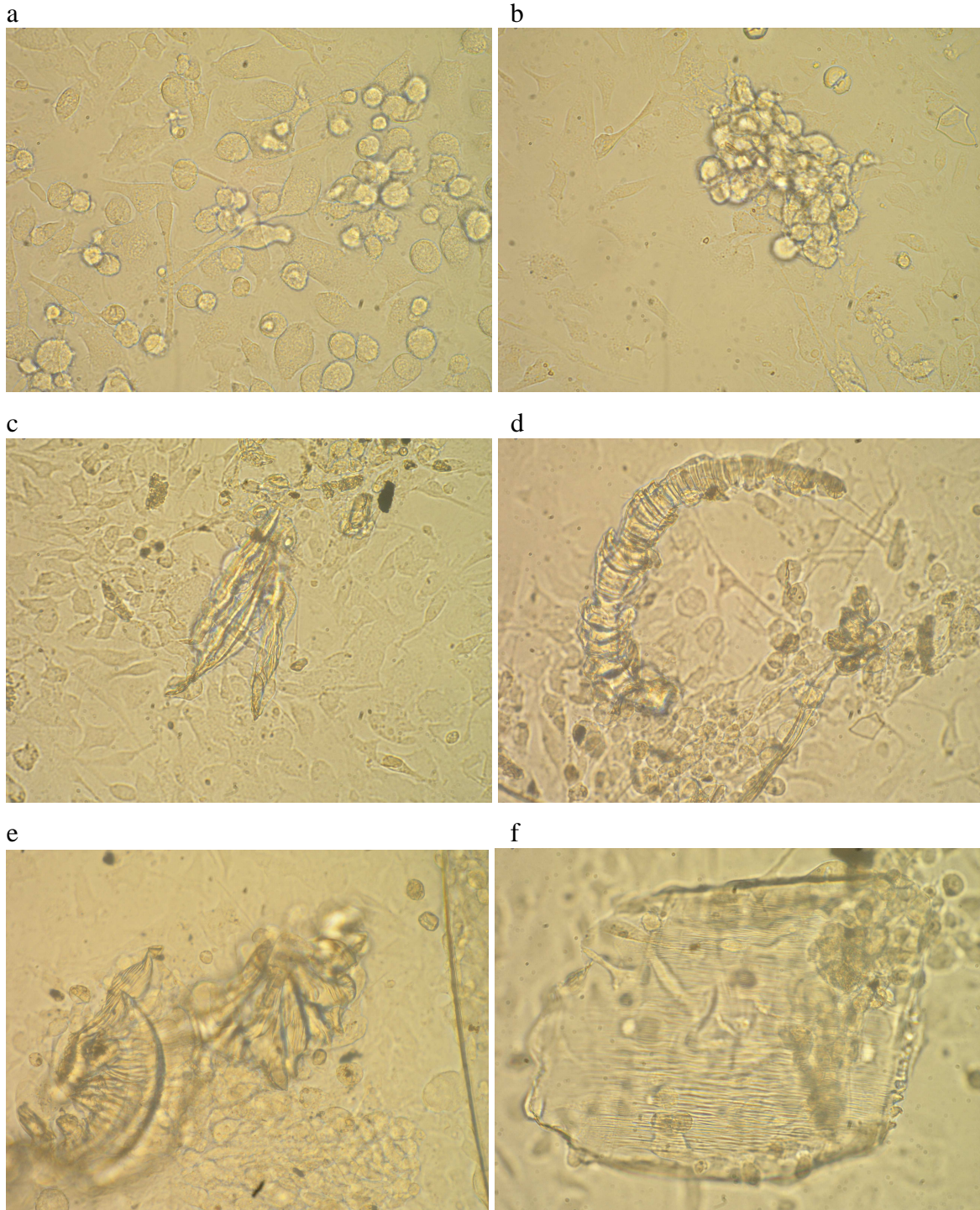
e



f



*Obr.5 Buňky kontroly. Obraz a a b 200x zvětšeno (a bez útvarů),  
obraz c, d a f 400x zvětšeno, obraz e zvětšení 100x*



*Obr.6 Fúzané buňky. Zvětšení – vše 400x, komentář: a - počáteční stav bez útvarů, b - počátek agregace buněk, c, d, e - útvary typické pro fúzané buňky, f - útvar, který se podobal útvaru nalezenému v kontrolních buňkách*

## 4.5 Vlastnosti fúzních produktů *in vivo*

Bezprostředně po fúzi byly buňky rozsuspendované v RPMI bez séra a kontrolní nefúzované buňky aplikovány s.c. myším. Byly provedeny 3 fúzní experimenty. V nich byly fúzované buňky aplikovány celkem 10 myším a kontrolní nefúzované BMDCs 5 myším. Bylo aplikováno 64.000 až 300.000 BMDCs po fúzi/ myš a 300.000 kontrolních, nefúzovaných BMDCs/ myš. Všechny myši byly sledovány po dobu deseti týdnů, nikde přitom nebyl pozorován vznik tumorů, což bylo potvrzeno pitvou.

V dalším experimentu bylo 5 myším aplikováno po 52.000 BMDCs po fúzi a 15 denní kultivaci (výše uvedený experiment, kdy vznikaly útvary uvedené na Obr.5). Životnost těchto trypsinizací získaných buněk činila 32,1%, uvedená aplikovaná dávka v tomto a ostatních experimentech se však pochopitelně týkala buněk živých. Po s.c. aplikaci byly myši sledovány 10 týdnů. Opět nebyl pozorován žádný vznik a vývoj tumorů.

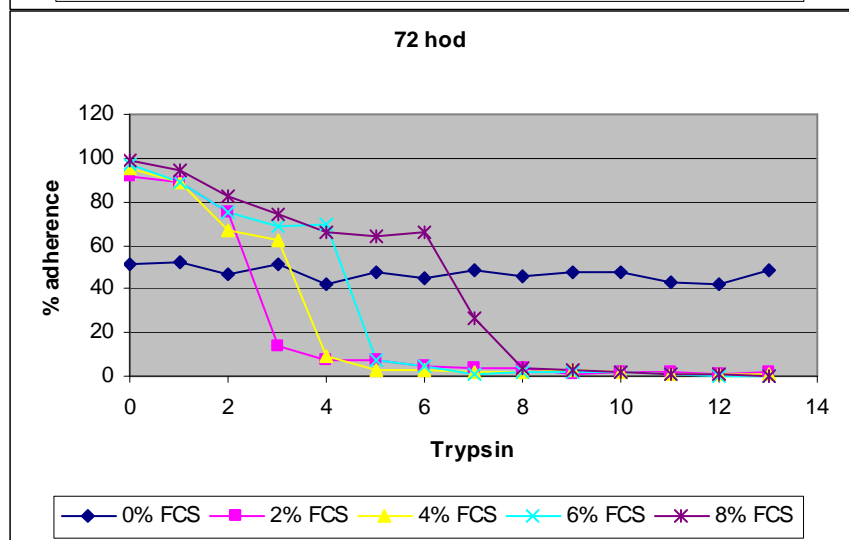
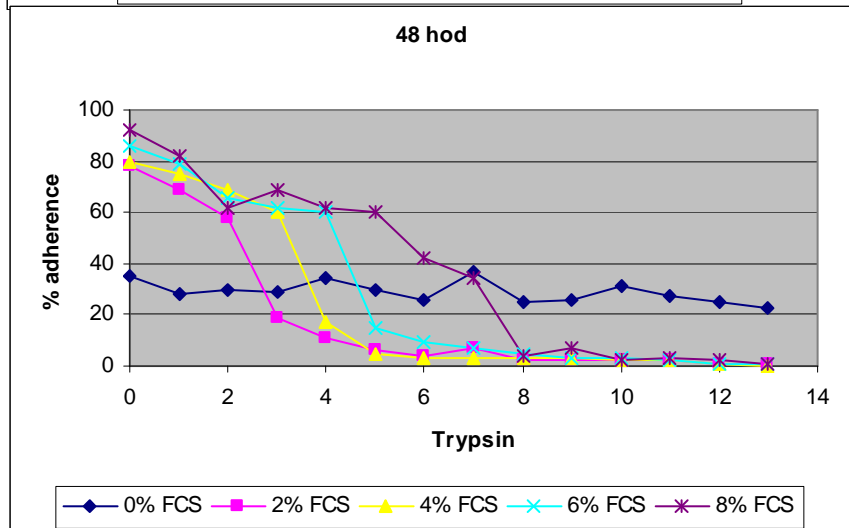
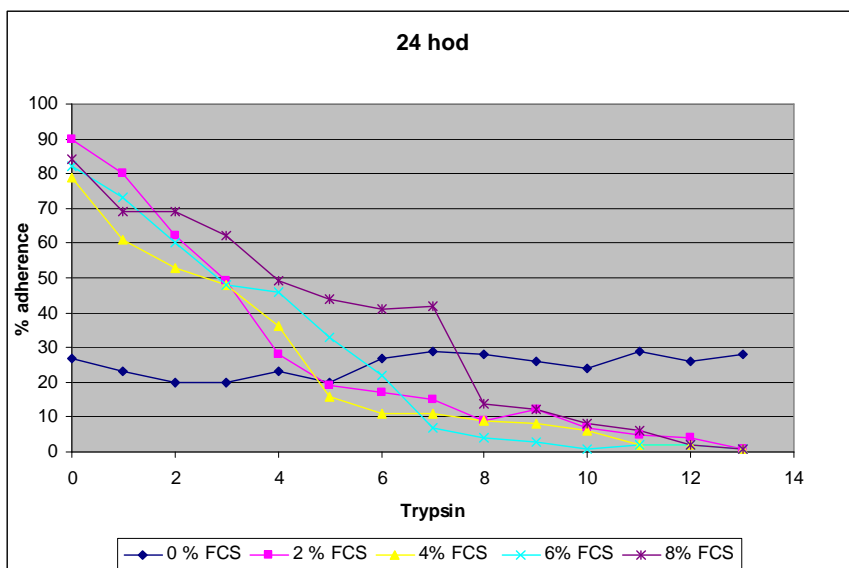
## 4.6 Sféroidy

V bezsérovém prostředí ani  $10^{-4}$  M koncentrace trypsinu nebyla schopna uvolnit adherované buňky, k tvorbě sféroidů tedy nemohlo dojít. Nepoužili jsme EDTA, protože by sice došlo k zrušení adherence, ale další experiment (fúze) by byl přítomností tohoto chelatačního činidla významně ovlivněn.

V sérovém prostředí trypsin v okamžiku, kdy jeho koncentrace překonala inhibiční schopnosti séra, vyvolal výraznou deadherenci buněk. Ta bohužel nevedla ke vzniku sféroidů. Zjistili jsme, že  $10^{-4}$  M trypsin není schopen v bezsérovém prostředí buňky ovlivnit, ale v prostředí séra (ale i 0,3% BSA) i cca  $1 \cdot 10^{-6}$  M trypsin adherenci velmi výrazně ruší. Tato skutečnost nás zaujala. Stejný jev byl pozorován i v případě B16-F10 (Ženka, v přípravě). Použité melanomové buňky však i v bezsérovém prostředí „trypsinizovatelné“ byly, uvolňovaly se, nicméně sérum nebo BSA mělo na tento jev velmi významný zesilující efekt.

Vzhledem k důležitosti pozorovaného jevu (např. pro řešení otázek adherence metastáz) jsme tento jev podrobněji studovali.

Sledovali jsme vliv rostoucích koncentrací trypsinu na adherenci BMDCs v bezsérovém prostředí a v prostředí s 2, 4, 6 a 8 % koncentrací FCS. Rozdíly mezi chováním buněk v různých prostředích postupně narůstaly a nejvýrazněji se projevily po 72 hodinách inkubace (Obr.7).



*Koncentrace trypsinu (osa x) dosahovala těchto hodnot:*

0 - 0 M
1 - $1 \cdot 10^{-6}$ M
2 - $2 \cdot 10^{-6}$ M
3 - $3 \cdot 10^{-6}$ M
4 - $4 \cdot 10^{-6}$ M
5 - $5 \cdot 10^{-6}$ M
6 - $6 \cdot 10^{-6}$ M
7 - $7 \cdot 10^{-6}$ M
8 - $8 \cdot 10^{-6}$ M
9 - $9 \cdot 10^{-6}$ M
10 - $1 \cdot 10^{-5}$ M
11 - $2,5 \cdot 10^{-5}$ M
12 - $5 \cdot 10^{-5}$ M
13 - $1 \cdot 10^{-4}$ M

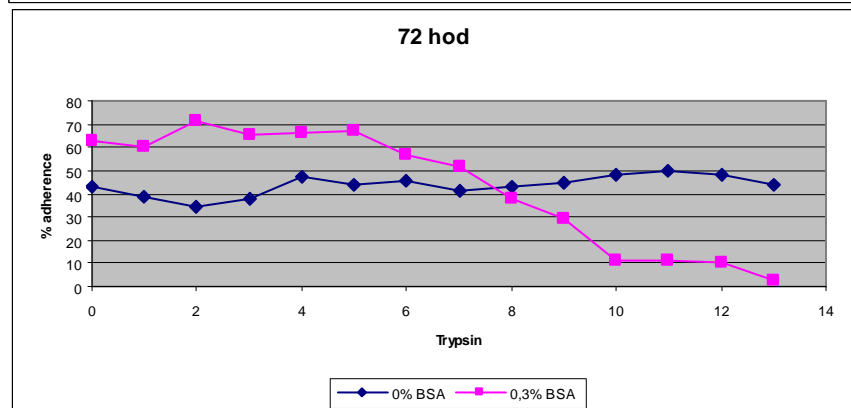
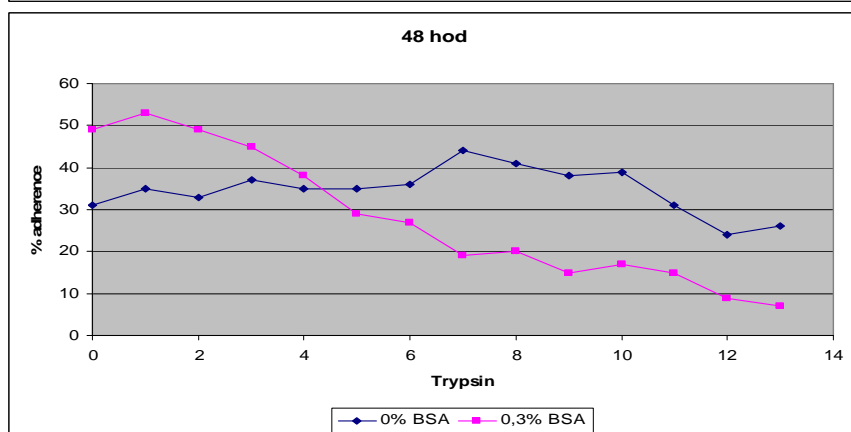
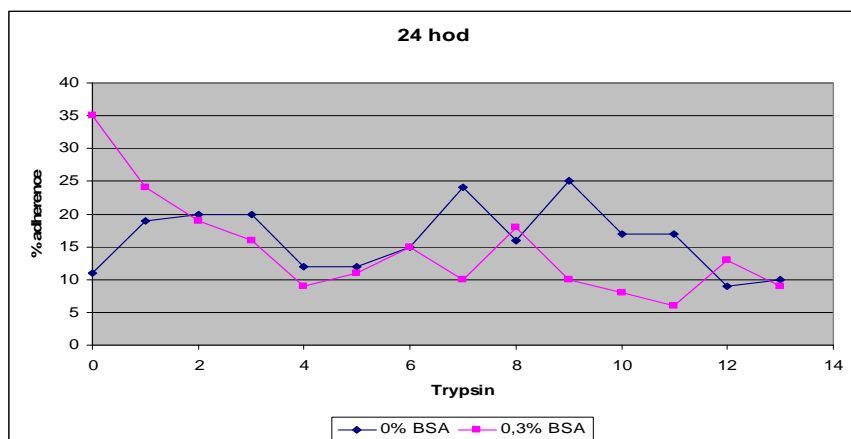
*Obr.7 Vliv různých koncentrací trypsinu na adherenci BMDCs v bezsérovém prostředí a v prostředí s 2,4,6 a 8 % koncentrací FCS. Jednotlivé grafy byly sestaveny ze zjištěných hodnot po 24, 48 a 72 hod inkubaci*



Jak vyplývá z tohoto obrázku, v bezsérovém prostředí nebyla adherence buněk trypsinem ovlivněna. V sérovém prostředí po překonání inhibice dané sérem nepatrný přebytek trypsinu způsobil prudkou deadherenci.

Adherence je zřejmě výrazně závislá na přítomnosti vápník dependentních cadherinů, neboť v nepřítomnosti vápenatých iontů jsou buňky sice obtížně, nicméně trypsinizovatelné směsí, která obsahuje trypsin v relativně nízké koncentraci (používáme směs obsahující 0,02%, tedy  $8 \cdot 10^{-6}$  M trypsin a 0,5 mM EDTA v PBS).

V následujícím experimentu jsme studovali vliv majoritní proteinové složky séra – sérového albuminu. Použili jsme bovinní sérový albumin (BSA). BMDCs jsme vystavili rostoucí koncentraci trypsinu v bezsérovém prostředí a v prostředí 0,3% BSA. Během 72 hodinové inkubace rozdíly mezi skupinami v chování buněk v různých prostředích opět postupně narůstaly (Obr.8).



Koncentrace trypsinu (osa x) dosahovala těchto hodnot:

0 - 0 M

1 -  $1 \cdot 10^{-6}$  M

2 -  $2 \cdot 10^{-6}$  M

3 -  $3 \cdot 10^{-6}$  M

4 -  $4 \cdot 10^{-6}$  M

5 -  $5 \cdot 10^{-6}$  M

6 -  $6 \cdot 10^{-6}$  M

7 -  $7 \cdot 10^{-6}$  M

8 -  $8 \cdot 10^{-6}$  M

9 -  $9 \cdot 10^{-6}$  M

10 -  $1 \cdot 10^{-5}$  M

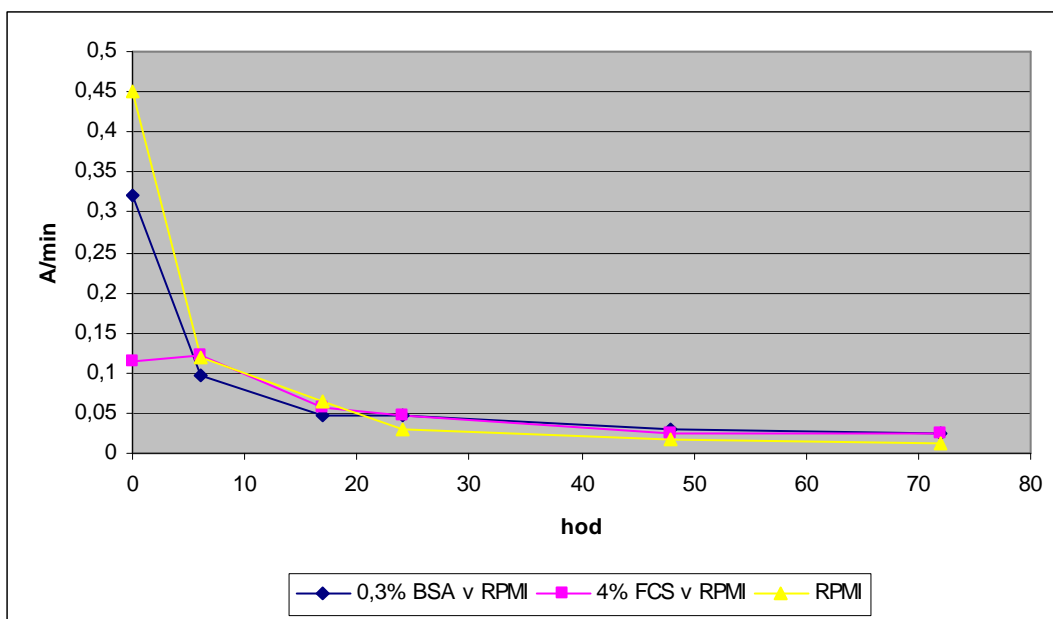
11 -  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M

12 -  $5 \cdot 10^{-5}$  M

13 -  $1 \cdot 10^{-4}$  M

Obr.8 Vliv různých koncentrací trypsinu na adhezenci BMDCs v bezsérovém prostředí a v prostředí BSA o koncentraci 0,3 %. Jednotlivé grafy byly sestaveny ze zjištěných hodnot po 24, 48 a 72 hod inkubaci

Existovala teoretická možnost, že dramatický účín trypsinu v prostředí bílkovin ve srovnání s jeho nepůsobením v bezsérovém prostředí bude možno vysvětlit jeho stabilizací proteiny séra, případně BSA. Byla proto měřena aktivita  $1 \cdot 10^{-5}$  M trypsinu v RPMI 1640, v RPMI 1640 s 0,3% BSA a v RPMI 1640 s 4% FCS při 37°C, tedy za podmínek obou předchozích experimentů. Výsledek stanovení aktivity trypsinu udává Obr.9.



*Obr.9 Aktivita trypsinu při kultivaci v prostředí RPMI 1640, RPMI 1640 s 0,3% BSA a v RPMI 1640 s 4% FCS*

Výsledkem bylo zjištění, že aktivita trypsinu ve všech třech prostředích se zásadně neodlišuje. Největšího rozdílu bylo dosaženo po 72 hodinách, kdy samotný trypsin vykazoval ve srovnání s trypsinem v proteinových prostředích poloviční aktivitu. Nicméně je třeba zdůraznit, že bylo testováno i 10x vyšší množství trypsinu bez vlivu na BMDCs v bezsérovém prostředí a na druhou stranu cca 10x nižší koncentrace dramaticky ovlivnila adharenci v BMDCs v prostředí proteinovém. Stabilizace trypsinu tedy není rozhodující a nevysvětluje popisované jevy.

## 5. Diskuze

Tato práce se zabývá možností účasti fúze buněk při kancerogenezi. Byly izolovány buňky nízké úrovně diferenciaci, účastníci se regenerace organismu a zvažované i z hlediska účasti v kancerogenezi.

My jsme zkoumali, zda u těchto buněk postačí pouhá fúze, bez vlivů kancerogenů (MCA), bez záměrných indukci mutací. Předpokládali jsme, že fúzí vznikne nestabilní genom a že během vyštěpování chromozomů ve snaze přiblížit se opět diploidii by mohlo dojít ke vhodné kombinaci mutací, které by indukovaly kancerogenezi.

Experimentálně byla stanovena vhodná doba fúzování, kdy by byla co nejvyšší účinnost a zároveň co nejnižší mortalita. Bylo zjištěno, že délka fúze na efektivitu vliv nemá, ale rapidně se s rostoucím časem zvyšuje mortalita. Proto byla délka expozice buněk polyethylenglykolu před započítáním postupného vyředování stanovena na jednu minutu, což je i doba, používaná rutinně při přípravě hybridomů.

*In vitro* byly fúzované a nefúzované BMDCs kultivovány a pravidelně pozorovány. V kulturách se objevily neznámé útvary, rozpadající se pod vlivem trypsinizace a znovu se utvářející. Jsou předmětem dalšího zkoumání. Frekvence výskytu a rozmanitost forem byla výrazně vyšší u BMDCs po fúzi než u kontrolních BMDCs, proto se domníváme, že jejich vznik je fúzemi výrazně ovlivněn. Zda se jedná o důsledek vzniku primárně tetraploidního, labilního genomu, postupně segregujícího chromozomy a zda vzniklé útvary svědčí o nastartování maligní transformace, či naopak navození diferenciaci, je předmětem dalšího výzkumu.

Oproti původním představám nebyly v kulturách nalezeny žádné známky klonální expanze. Samotnou fúzi buněk tedy nepovažujeme za dostatečný mechanismus kancerogeneze, přesto nelze popřít, že u transformovaných buněk významnou roli hrát může.

*In vivo* byly buňky injikovány s.c. samicím inbredních myší. Po desetitýdenní inkubaci byly myši usmrceny a prozkoumány. V místě vpichu se nenacházely žádné malignity, stejně jako nebyly pozorovány abnormality v dalších lokalitách (plíce, srdce, játra, ledviny, mozek, slezina, střevo).

*In vitro* ani *in vivo* experimenty neprokázaly tedy možnost, že by pouhou fúzí bone marrow-derived cells mohlo dojít ke vzniku tumoru. Je zřejmé, že je nutná spoluúčast ještě dalších faktorů, např. mutací apod. Základní otázkou je, v jakém vztahu jsou naše výsledky k práci, zabývající se chromozomálním základem vzniku nádorů (Duesberg a spol., 2005),

kteřá byla bezprostředním východiskem naší práce. Námí zjištěné poznatky tuto hypotézu nepodpořily, alespoň ne v dosavadní formě, snad podrobnější analýza vznikajících útvarů přinese podpůrná fakta, nebude-li se jednat naopak o více diferencované útvary. O vyvrácení této hypotézy je rovněž předčasné hovořit, neboť u nádorů ubikvitárně se vyskytující aneuploidie může být výsledkem jiných procesů, než jsme uvažovali my.

Pokus o alternativní způsob účinné přípravy fúzovaných buněk přes buněčné sféroidy jako mezistupeň vedl ke zjištění pozoruhodné rezistentnosti BMDCs k působení trypsinu ale především ke zjištění, že deadherenční účín trypsinu lze velice výrazně stimulovat přítomností proteinů v prostředí. Jak jsme zjistili, k potlačení adherence BMDCs je nutná kombinace proteinového prostředí (FCS, BSA) a trypsinu, byt' této proteázy stačí i malé množství.

Samotný trypsin na BMDCs nepůsobí ani v  $10^{-4}$  M koncentrace. Samotné FCS případně BSA působí opačně, zvyšují adherenci - viz první body křivek (nulový trypsin) na Obr.7 a Obr.8.

Tyto výsledky plně odpovídají našim pozorováním (Ženka, v přípravě), získaným při studiu melanomových buněk B16-F10 s tím, že trypsin byl schopen narušit adherenci melanomových buněk i v bezsérovém prostředí, ale pod vlivem FCS nebo BSA došlo k velmi výraznému zesílení jeho působení. Posun pozorovaných jevů do oblastí nižších koncentrací trypsinu a jejich mohutnější průběh souvisí pravděpodobně s nižším obsahem cadherinů u vysoce metastatických buněk, jako jsou buňky B16-F10 (Novák a Trnka, 2005).

Tento jev by mohl být vysvětlením působení proenzymoterapie založené na trypsinogenu (Novák a Trnka, 2005) resp. na trypsinogenu a chymotrypsinogenu (Kaiserová a Ženka, Kalferstová a Ženka, v přípravě) na nádory a jejich metastázy. K tomu je samozřejmě potřeba, aby se proenzymy aktivovaly v místě nádorů, resp. metastáz. To může být zajištěno mnoha faktory, jedním z nich membránově vázaný kathepsin B (Figarella et al., 1988, Kobayashi et al., 1993), který je schopen trypsinogen aktivovat. Výsledné zesílení lokální proteolytické aktivity, zejména aktivity trypsinu v kombinaci s proteinovým prostředím by výrazným vlivem na inhibici adherence již tak slabě se vázajících nádorových buněk mohlo ovlivnit řadu procesů. Jako jeden z nedůležitějších efektů by bylo možno považovat možnost snížení uchycení metastáz.

## 6. Závěr

- Byla zvládnuta technika izolace a kultivace buněk kostní dřeně (bone marrow-derived cells, BMDCs)
- Byl optimalizován postup fúze BMDCs pomocí polyethylenglykolu
- Po působení polyethylenglykolu se v kulturách BMDCs objevila řada různých útvarů, různorodostí a množstvím se lišících od kultur kontrolních BMDCs. Jejich podstata a možný význam pro kancerogenezi je dále studována
- Možnost vzniku nádorů pouhou fúzí buněk kostní dřeně (bone marrow-derived cells, BMDCs) nebyla prokázána
- Byl zjištěn velmi výrazný stimulační vliv proteinů na schopnost trypsinu rušit buněčnou adherenci. Tento jev by mohl nalézt využití při potlačování úchytu metastáz v krevním řečišti a být vysvětlením účinků proenzymoterapie

## 7 Seznam citované literatury

**AGGARVAL A., LEONG S.H., LEE C., KON O.L., TAN K.** (2005): Wavelet transformations of tumor expression profiles reveals a pervasive genome-wide imprinting of aneuploidy on the cancer transcriptome. *Cancer Res* 65: 186-194.

**AI H., BARRERA J.E., PAN Z., MEYERS A.D., VARELLA-GARCIA M.** (1999): Identification of individuals at high risk for head and neck carcinogenesis using chromosome aneuploidy detected by fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res* 430: 223-232.

**ATKIN N.B. and BAKER M.C.** (1966): Chromosome abnormalities as primary events in human malignant disease: evidence from marker chromosomes. *J Natl Cancer Inst* 36: 539-557.

**BALABAN G.B., HERLYN M., CLARK W.H., NOWWEL P.C.** (1986): Karyotypic evolution in human malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 19: 113-122.

**BISHOP J.M.** (1995): Cancer: the rise of the genetic paradigm. *Genes Dev* 9: 1300-1315.

**BOCKING A. and CHATELAIN R.** (1989): Diagnostic and prodiagnostic value of DNA cytometry in gynecologic cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 11: 177-186.

**BOLAND C.R. and RICCIADELLO L.** (1999): How many mutations does it take to make a tumor?. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14675-14677.

**BRINKLEY B.R. and GOEFERT T.M.** (1998): Supernumerary centrosomes and cancer: Boveri's hypothesis resurrected. *Cell Motil Cytoskeleton* 41: 281-288.

**CAIRNS J.** (1978): *Cancer: Science and Society*. W.H. Freeman, San Francisco.

**DUESBERG P.** (2003): Are cancers dependent on oncogenes or on aneuploidy? *Cancer Genet Cytogenet* 143: 89-91.

**DUESBERG P., FABARIUS A. HEHLMANN R.** (2004): Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life* 56: 65-81.

**DUESBERG P., LI R., FABARIUS A., HEHLMANN R.** (2005): The chromosomal basis of cancer. *Cell Oncol* 27: 293-318.

**ERLANGER B.F., KOKOWSKY N. and COHEN W.** (1961): The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95: 271-278.

**FEARON E.R. and VOGELSTEIN B.** (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.

**FERRARI G., CUSELLA-DE ANGELIS G., COLETTA M., PAOLUCCI E., STORNAIUOLO A., COSSU G., MAVILIO F.** (1998): Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-30.

**FIGARELLA C., MISZCZUK-JAMSKA B. and BARRETT A.J.** (1988): Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. Activation of both human trypsinogen by cathepsin B and spontaneous acid activation of human trypsinogen 1. *Biol Chem* 369: 293-298.

**FORTUNA M.B., DEWEY M.J., FURMANSKI P.** (1989): Cell fusion in tumor development and progression: occurrence of cell fusion in primary methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Int J Cancer* 44: 731-737.

**HANAHAN D. and WEINBERG R.A.** (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

**HARRIS H.** (2005): A long view of fashions in cancer research. *Bioessays* 27: 833-838.

**HE X., TSANG T.C., PIPES B.L., ABLIN R.J., HARRIS D.T.** (2005): A stem cell fusion model of Carcinogenesis. *J Ex Ther Oncol* 5: 101-9.



**HOUGHTON J., STOLCOV C., NOMUTA S., ROGERS A.B., CARLSON J., LI H., CAI H.X., FOX J.G., GOLDENRING J.R., WANG T.C.** (2004): Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306: 1568-1571.

**IANUS A., HOLZ G.G., THEISE N.D., HUSSAIN M.A.** (2003): In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 111: 843-850.

**KIKUCHI T., AKASAKI Y., IRIE M., HOMMA S., ABE T., OHNO T.** (2001): Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunol Immunother* 50: 337-344.

**KNUDSON A.G.** (2001): Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 157-162.

**KOBYASHI H., MOBUHIKO N., SUGIMURA M., SHINOHARA H., OHI H., TERAO T.** (1993): Effect of membrane-associated cathepsin B on their activation of receptor-bound pro-urokinase and subsequent invasion of reconstituted basement membranes. *Biochem Biophys Acta* 1178: 55-62.

**KUCIA M., RECA R., CAMPBELL F.R., ZUBA-SURMA E., MAJKA M., RATAJCZAK J., RATAJCZAK M.Z.** (2006): A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4<sup>+</sup> SSEA-1<sup>+</sup> Oct-4<sup>+</sup> stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 20: 857-869.

**LIU CH., CHEN Z., ZHANG T., LU Y.** (2006): Multiple tumor types may originate from bone marrow-derived cells. *Neoplasia* 8: 716-24.

**LUEBECK E.G. and MOOLGAVKAR S.H.** (2002): Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15095-15100.

**McBRIDE O.W., SWAN D.C., SANTOS E., BARBACID M., TRONICK S.R., AARONSON S.A.** (1982): Localization of the normal allele of T24 human bladder carcinoma oncogene to chromosome 11. *Nature* 300: 773-774.

**MERTENS F., JOHANSSON B., HOGLUND M., MITELMAN F.** (1997): Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 57: 2765-2780.

**MICHOR F., IWASA Y., LENGAUER C., NOWAK M.A.** (2005): Dynamics of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol* 15: 484-495.

**NOVAK J.F. and TRNKA F.** (2005): Proenzyme therapy of cancer. *Anticancer Res* 25: 1157-1178.

**PITOT H.C.** (1986): *Fundamentals of oncology*. New York: Marcel Dekker.

**REYES M. and VERFAILLIE C.M.** (2001): Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann NY Acad Sci* 938: 231-233.

**SCHNEIDER B.L. and KULESZ-MARTIN M.** (2004): Destructive cycles: the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 25: 2033-2044.

**SHENGKUN S., ZIKUAN G., XUREN X., BING L., XIAODAN L., PEI-HSIEN T., NING M.** (2003): Isolation of Mouse Marrow mesenchymal Progenitors by a Novel and Reliable Method. *Stem Cells* 21: 527-535.

**TOLLIVER D.K., ROBBINS L.W.** (1991): Techniques in Karyology: The Bone Marrow Extraction method. *Tested Studies for Laboratory Teaching*: 69-74.

**VASSILOPOUKOS G., WANG P.R. and RUSSELL D.W.** (2003): Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422: 901-4.

**VERFAILLIE C.M., SCHWARTZ R., REYES M., JIANG Y.** (2003): Unexpected potential of adult stem cells. *Ann NY Acad Sci* 996: 231-234.

**VESSEY C.J., NORBURY C.J. and HICKSON I.D.** (2000): Genetic disorders associated with cancer predisposition and genomic instability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 63: 189-221.

**WANG X., WILLENBRING H., AKKARI Y., TORIMARU Y., FOSTER M., AL-DHALIMY M., LAGASSE E., FINEGOLD M., OLSON S., GROMPE M.** (2003): Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422: 897–901.

**WOOD A.W., CHANG R.L., LEVIN W., THOMAS P.E., RYAN D., STOMING T.A., THAKKER D.R., JERINA D.M., CONNEY A.H.** (1978): Metabolic activation of 3-methylcholanthrene and its metabolites to products mutagenic to bacterial and mammalian cells. *Cancer Res* 38: 3398-3404.