

Linie ludzkich spontanicznie immortalizowanych limfocytów T – nowy model do badań mechanizmów powstawania nowotworów układu chłonnego

Jan Konrad Siwicki

Uzyskiwanie przez komórki zdolności do nieograniczonego wzrostu (tzw. immortalizacja) jest krytycznie ważnym etapem rozwoju nowotworów, ponieważ wtedy mogą nagromadzać się zmiany w materiale genetycznym, które warunkują osiągnięcie pełni fenotypu nowotworowego. W niniejszej pracy scharakteryzowano modele komórkowe stosowane w badaniach procesu immortalizacji ludzkich komórek, zwracając uwagę na najistotniejsze ograniczenia tych układów badawczych, które wynikają ze sposobu uzyskiwania immortalizowanych populacji komórek, a także związane są z tkankową swoistością procesów przelamywania ograniczeń programu starzenia podziałowego. Przedstawiono następnie własny, nowy model badania procesu immortalizacji, który obejmuje sześć spontanicznie immortalizowanych linii limfoblastów T, wyprowadzonych za pomocą własnego systemu długotrwałej hodowli limfocytów T w obecności interleukiny 2 (IL-2). Dwie linie pochodzą z normalnej śledziony, a cztery pozostałe uzyskano z krwi obwodowej pacjentów z zespołem Nijmegen (NBS), recesywnie dziedzicznej choroby, która charakteryzuje się m.in. bardzo silną predyspozycją do rozwoju nowotworów układu chłonnego. Analiza profilu DNA wykluczyła krzyżowe zanieczyszczenie tych immortalizowanych linii i potwierdziła, że pochodzą one od różnych osób. Celem przedstawionych w dalszej części tej rozprawy badań własnych była analiza morfologii, zmian molekularnych oraz cytogenetycznych, które towarzyszyły spontanicznej immortalizacji komórek wspomnianych linii limfocytów T. Nasze badania pokazały, że komórki wszystkich immortalizowanych linii, które pochodzą od pacjentów z zespołem NBS intensywnie barwią się na obecność CD30, zarówno w obszarze błony komórkowej, jak i w okolicy aparatu Golgi'ego oraz ujawniają inne cechy typowe dla anaplastycznego chłoniaka z dużych komórek, takie jak: silna ekspresja CD25, obfita cytoplazma z ziarnistościami oraz nerkowate lub podkowiaste jądra i/lub wiele jąder. W jednej z tych linii stwierdziliśmy obecność podgrupy komórek z jądrową ekspresją białka kinazy chłoniaka anaplastycznego (ALK) oraz ze znacząco zwiększoną liczbą kopii genu ALK, ale bez jakichkolwiek jego rearanżacji. Ponadto, zaobserwowaliśmy, że komórki dwóch spośród tych czterech linii utraciły część, a komórki jednej linii - większość markerów typowych dla limfocytów T, a więc ujawniły cechę typową dla chłoniaka z obwodowych komórek T. Zaobserwowaliśmy także, że spontaniczna immortalizacja komórek opisywanych linii była związana ze stabilizacją długości telomerów, wysoką ekspresją telomerazy oraz z zaburzoną regulacją cyklu komórkowego. Nasze badania wykazały w szczególności, że spontanicznie immortalizowane linie limfocytów T od pacjentów z zespołem NBS, w przeciwieństwie do immortalizowanych linii komórek T z prawidłowym genem NBS1, mają osłabiony punkt kontrolujący przejście z fazy G1 do S po napromienieniu komórek, ale jednocześnie niektóre z tych linii nie wykazują w tych warunkach wyraźnych zaburzeń nagromadzania się TP53 oraz p21(WAF1/CIP1), za co prawdopodobnie odpowiedzialny jest podwyższony poziom ekspresji c-MYC w komórkach tych linii. Zarówno pierwotne, jak i immortalizowane komórki T od pacjentów z NBS (z wyjątkiem jednej linii) ujawniły defekt punktu kontrolnego wewnątrz fazy S oraz punktu kontrolującego przejście z fazy G2 do M. W niektórych spontanicznie immortalizowanych liniach stwierdziliśmy współwystępowanie wysokiej ekspresji cząsteczki p16(INK4a) z obecnością ufosforylowanej formy cząsteczki RB, przy jednocześnie zwiększonej ekspresji CDK4, cykliny D2, c-MYC lub cykliny E, co sugeruje, że hamowanie cyklu komórkowego na granicy G1/S przez p16(INK4a) zostało przewyżczone (przełamane) poprzez zwiększoną ekspresję pozytywnych regulatorów cyklu komórkowego podczas uzyskiwania przez komórki tych linii nieograniczonego potencjału wzrostowego. Analiza cytogenetyczna wykazała ponadto, że w tych immortalizowanych liniach komórek T wystąpiły wspólne zmiany cytogenetyczne w postaci zwielokrotnienia materiału pochodzącego z chromosomu 2 (obszar 2p13-24), chromosomu 8 (obszar 8q21-24) oraz chromosomu 3 (obszar 3q26-29), co sugeruje obecność w tych obszarach genów, których zwiększona ekspresja ma istotny udział w immortalizacji limfocytów T. Przedstawiony w tym opracowaniu własny, nowy model obejmujący spontanicznie immortalizowane linie limfocytów T, które ujawniają fenotyp charakterystyczny dla komórek chłoniaka, rozszerza możliwości analizy mechanizmów odpowiedzialnych za immortalizację limfocytów oraz rozwój nowotworów układu chłonnego, co może być istotne dla opracowania nowych metod diagnostycznych i strategii leczenia nowotworów.

Spontaneously immortalized human T cell lines – a new model for the studies on lymphoma development

Acquisition of an unlimited proliferative potential (cell immortalization) is thought to be an essential step in tumour development and progression since uncontrolled, additional cell divisions may allow accumulation of genetic changes, necessary to develop a malignant and metastatic phenotype. In this paper the in vitro models for studying the mechanisms of human cell immortalization are described, with a special emphasis on the limitations of such approaches, i.e. impact of an inducing factor used for immortalization and tissue specificity requirements. A new, original culture model of spontaneously immortalized human T cell lines is also presented. Six T cell lines have been established following mitogen stimulation and subsequent growth in the presence of Interleukin 2 (IL-2). Two of these cell lines derive from normal spleen and the other four from the peripheral blood of four patients with Nijmegen Breakage Syndrome (NBS), a recessive disorder characterized by a very high incidence of lymphoma. The aim of the studies presented here was to analyse morphological, as well as molecular and cytogenetic changes associated with spontaneous immortalization. We found that the cells from all immortal NBS-derived T cell lines showed strong membrane and the Golgi region expression of CD30, and other features characteristic of anaplastic large cell lymphoma (ALCL), i.e. overexpression of CD25, abundant cytoplasm and kidney-shaped and/or multiple nuclei. A subpopulation of cells of one of these lines, displayed nuclear staining for anaplastic lymphoma kinase (ALK) antigen with multiple copies of ALK, but without ALK gene rearrangements. In addition, the cells from three immortal T cell lines displayed a loss of pan T-cell antigens, a typical feature of peripheral T-cell lymphoma (PTCL). We observed that spontaneous immortalization of the T cell lines described here was associated with telomere length stabilization, high telomerase activity and deregulated expression of cell cycle checkpoint molecules. In particular, we found that the four immortal T cell lines derived from NBS patients, contrary to two spontaneously immortalized T cell lines derived from normal spleen, showed an attenuated radiation-induced G1/S checkpoint, yet, with presumably normal TP53/p21(WAF1/CIP1) pathway, apparently due to c-MYC up regulation. Three immortal NBS-derived T cell lines showed an impaired intra-S checkpoint, as evidenced by radioresistant DNA synthesis (RDS). All four immortal T cell lines derived from NBS patients showed defective G2/M checkpoint. We observed that in some spontaneously immortalized T cell lines strong p16(INK4a) expression and wild-type pattern of phosphorylated RB form coincided with increased expressions of CDK4, cyclin D2, c-MYC or cyclin E, suggesting that growth inhibitory activity of p16(INK4a) was bypassed during the process of cell immortalization by enhanced expression of the positive cell cycle regulatory molecules. The cytogenetic analysis showed that the spontaneously immortalized T cell lines developed several common chromosomal abnormalities, including the acquisition of copy number gains involving chromosomal regions: 2p13-24, 8q21-24 and 3q26-29, suggesting that the regions harbor a gene (or genes) important for T cell immortalization. The presented here new in vitro model of spontaneously immortalized T cell lines with phenotypes typical of lymphoma can be a valuable tool for studying mechanisms of lymphocyte immortalization and for developing more efficient and safer therapy strategies.

Słowa kluczowe: karcynogeneza, spontaniczna immortalizacja, limfocyty T, interleukina 2, punkty kontrolne cyklu komórkowego, zespół Nijmegen, NBSI, chłoniak, aberracje chromosomalne

Key words: carcinogenesis, spontaneous immortalization, T lymphocytes, Interleukin 2, cell cycle checkpoints, Nijmegen Breakage Syndrome, NBSI, lymphoma, chromosomal aberrations

Spis treści:

Streszczenie	114
1. Wstęp	118
2. Modele badania poza ustrojem immortalizacji ludzkich komórek	119
A. Ekspozycja na karcynogenne związki chemiczne i/lub promieniowanie jonizujące	119
B. Infekcja wirusami lub transfekcja genami wirusowymi	119
C. Wymuszona ekspresja onkogenów	120
D. Wymuszenie ekspresji telomerazy poprzez wprowadzenie genu <i>hTERT</i> , który koduje katalityczną podjednostkę telomerazy	120
E. Wyciszenie ekspresji genu <i>14-3-3sigma</i>	121
F. Linie komórek spontanicznie immortalizowanych	121
3. Własny model spontanicznie immortalizowanych linii ludzkich limfocytów T zależnych od interleukiny 2 (IL-2)	121
A. Analiza fenotypu powierzchniowego oraz morfologii komórek spontanicznie immortalizowanych linii limfocytów T	123
B. Badanie skuteczności działania punktów kontrolnych cyklu komórkowego	124
C. Analiza ekspresji regulatorów przejścia z fazy G1 do S	124
D. Analiza cytogenetyczna	125
4. Podsumowanie wyników własnych badań	127
5. Podziękowanie	128
6. Piśmiennictwo	128

Alfabetyczny wykaz skrótów stosowanych w pracy:

ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i> – kinaza chłoniaka anaplastycznego,
ALT	<i>alternative lengthening of telomeres</i> – alternatywny system stabilizacji telomerów,
AT	<i>ataxia telangiectasia</i> – zespół ataksja teleangiektazja,
ATL	<i>adult T-cell leukaemia</i> – białaczka T-komórkowa dorosłych,
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i> – porównawcza hybrydyzacja genomów,
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i> – wirus Epsteina-Barra,
EBV/LCL	<i>Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines</i> – linie limfocytów B immortalizowane wirusem EBV,
FISH	<i>fluorescence in-situ hybridization</i> – fluoroscencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>
HHV	<i>human herpesvirus</i> – wirus opryszczki pospolitej,
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> – wirus zespołu nabytego niedoboru odporności
HPV	<i>human papilloma virus</i> – wirus brodawczaka ludzkiego,
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i> – katalityczna podjednostka ludzkiej telomerazy,
HTLV	<i>human T-cell leukemia virus type 1</i> lub <i>human T-cell lymphotropic virus type 1</i> – wirus ludzkiej białaczki z komórek T lub ludzki wirus T-limfotropowy,
IL-2	<i>Interleukin 2</i> – interleukina 2,
LT	<i>large T antigen</i> – duży antygen T,
NBS	<i>Nijmegen Breakage Syndrome</i> – zespół Nijmegen,
RDS	<i>radioresistant DNA synthesis</i> – synteza DNA oporna na promieniowanie,
SISS-T	<i>soluble immune suppressor of T cell proliferation</i> – rozpuszczalny czynnik hamujący proliferację limfocytów T,
ST	<i>small t antigen</i> – mały antygen T,
STR	<i>short tandem repeats</i> – krótkie, mikrosatelitarne (polimorficzne) sekwencje DNA,
SV40	<i>Simian virus 40</i> – wirus SV40,
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i> – lektyna z kielków pszenicy,
4-NQO	<i>4-nitroquinoline 1-oxide</i> – 1-tlenek 4-nitrochinoliny,

1. Wstęp

Komórki normalne przekształcają się w nowotworowe na skutek stopniowego nagromadzenia się zmian w materiale genetycznym, w tym mutacji genowych, nieprawidłowości struktury i liczby chromosomów oraz zaburzeń epigenetycznych, które prowadzą do zmienionej ekspresji różnych genów [1, 2]. Pojawiają się wówczas między innymi zaburzenia mechanizmów regulujących podziały komórek, które polegają zwłaszcza na nieskutecznym działaniu lub zanikaniu tak zwanych punktów kontrolujących przechodzenie przez kolejne fazy cyklu komórkowego [3]. Są to zabezpieczenia, które między innymi zapobiegają dalszemu podziałom komórek z uszkodzonym materiałem genetycznym. Ten właśnie etap jest krytycznie ważny dla nagromadzenia się i utrwalenia powstałych mutacji oraz nieprawidłowości w chromosomach, a także dla dalszego namnażania się zmienionych komórek, które mogą następnie uzyskać zdolność dokonywania inwazji normalnych tkanek i tworzenia przerzutów w odległych miejscach organizmu. Normalne komórki somatyczne ulegają tylko ograniczonej liczbie podziałów, ponieważ podlegają kontroli ze strony programu starzenia podziałowego [4]. Stąd też przełamanie ograniczeń tego programu i uzyskanie przez komórki zdolności do nieograniczonego namnażania się (tzw. immortalizacja) jest krytycznie ważnym etapem procesu rozwoju nowotworów [5].

W procesach starzenia podziałowego oraz w rozwoju nowotworów istotną rolę odgrywają telomery – wyspecjalizowane struktury umiejscowione na końcach chromosomów oraz telomeraza – enzym zdolny do syntezy telomerów. Telomery są odcinkami DNA o powtarzającej się sekwencji TTAGGG, które wraz ze specyficznymi białkami tworzą złożony kompleks chroniący końce chromosomów przed ich rozpoznawaniem jako pęknięć podwójnej nici DNA oraz zapobiegają ich fuzji lub nieuprawnionej rekombinacji [6]. Komórki somatyczne, z wyjątkiem niektórych komórek z tkanek ulegających samoodnowie, nie posiadają aktywności telomerazy – szczególnego rodzaju odwrotnej transkryptazy, która dobudowuje telomerowe sekwencje DNA na końcach chromosomów, używając swojej własnej matrycy RNA [7]. Dlatego też, w normalnych komórkach telomery skracają się stopniowo podczas każdego podziału wskutek niekompletnej replikacji końcowego odcinka chromosomalnego DNA [6]. Krytyczne zmniejszenie się długości telomerów jest sygnałem dla włączenia się programu starzenia podziałowego, głównie z udziałem szlaków zależnych od *TP53*, które inicjują zahamowanie wzrostu i/lub wymieranie komórek [8, 9]. Szereg danych wskazuje na istnienie także innych, niezależnych od skracania się telomerów składowych procesu starzenia podziałowego, które indukowane są na przykład szokiem tlenowym i związane są ze szlakami *p16(INK4a)/RB* [10]. W blisko 90% nowotworów złośliwych stwierdzono aktywność telomerazy, która poprzez stabilizację długości telomerów zapewnia komórkom zdolność do nieograniczonego wzrostu [7]. Ostatnie dane sugerują, że telomeraza może odgrywać także inne, niezwiązane z telomerami role, które mię-

dzy innymi polegają na działaniu antyapoptotycznym, na indukowaniu mobilizacji oraz pobudzaniu proliferacji komórek macierzystych naskórka lub na wspomaganiu procesu transformacji nowotworowej [11, 12]. W części immortalizowanych linii komórkowych i w części nowotworów stwierdzono brak aktywności telomerazy oraz obecność alternatywnego systemu stabilizacji telomerów (*alternative lengthening of telomeres – ALT*) [13].

W ślad za wcześniejszą obserwacją, że zdolność do nieograniczonego wzrostu komórek jest cechą recesywną [14] przeprowadzono analizę hybryd pomiędzy komórkami z różnych immortalizowanych linii i podzielono je na 4, tak zwane, grupy komplementacyjne (A, B, C i D) [15]. Dalsze badania, które polegały na wprowadzaniu do komórek linii immortalizowanych określonych chromosomów lub ich fragmentów pokazały, że w komplementacyjnych grupach B, C i D najczęściej zmutowane są geny zlokalizowane odpowiednio w obszarach: 4q22-q23, 1q oraz 7q31 [16-18]. W kolejnych badaniach wykazano, że grupa komplementacyjna D jest niejednorodna, ponieważ zawiera linie, których immortalizacja uwarunkowana jest kilku odrębnymi zmianami genetycznymi [19]. Ponadto, Sasaki i wsp. zaobserwowali, że dwa różne normalne chromosomy mogą indukować proces starzenia podziałowego w tej samej linii raka błony śluzowej macicy, dostarczając tym samym niezależnego dowodu istnienia wielu szlaków, które mogą inicjować ten proces [20]. Następnie potwierdzono, że zależnie od typu tkanki geny odpowiedzialne za kontrolę programu starzenia podziałowego obecne są w różnych chromosomach, na przykład w chromosomie 6q w fibroblastach [21, 22], a w chromosomach: 3p oraz 10p w komórkach nabłonkowych [23-25]. Stwierdzono także, że w niektórych spośród tych chromosomów mogą znajdować się geny kodujące czynniki hamujące aktywność telomerazy, na przykład w chromosomach: 3p, 5p oraz 10p [26-29].

Znalezienie różnic pomiędzy komórkami normalnymi i zdolnymi do nieograniczonego wzrostu ma istotne znaczenie dla opracowania nowych, metod diagnostycznych oraz nowych strategii leczenia nowotworów. Badania w tym zakresie prowadzone są przeważnie z użyciem modeli komórkowych, które w różnym stopniu odzwierciedlają proces uzyskiwania przez komórki zdolności do nieograniczonego wzrostu podczas powstawania nowotworu.

2. Modele badania poza ustrojem immortalizacji ludzkich komórek

A. Ekspozycja na karcynogenne związki chemiczne i/lub promieniowanie jonizujące

Po wielokrotnej ekspozycji *in vitro* ludzkich fibroblastów na 1-tlenek 4-nitrochinoliny (4-NQO) lub na promieniowanie jonizujące uzyskano 3 immortalizowane linie: SUSM-1, KMST-6 oraz OUMS-24F [30-32]. Badania z użyciem tych linii wykazały, że immortalizacja ludzkich fibroblastów jest procesem wieloetapowym, podczas którego ważną rolę odgrywa mutacja genu *TP53*, zmiany ekspresji innych regulatorów cyklu komórkowego – w tym *CDK2*, *CDK4* lub *c-MYC* – oraz utrata lub inaktywacja genu(ów) znajdujących się w chromosomie 6 (31-33). Ponadto badania te pokazały, że immortalizacja jest krytycznym, wstępnym warunkiem procesu pełnej transformacji nowotworowej *in vitro* [31].

Szczególny przypadek immortalizacji wywołanej promieniowaniem jonizującym dotyczy wyprowadzenia linii fibroblastów skóry pochodzących od osoby, która przeżyła wybuch bomby atomowej w Nagasaki [34]. Komórki tej linii wykazały utratę heterozygotyczności genu *TP53*, a także bardzo wydłużone telomery, co sugeruje obecność alternatywnego systemu stabilizacji telomerów.

B. Infekcja wirusami lub transfekcja genami wirusowymi

Zakażenie niektórymi wirusami onkogennymi lub transfekcja ich genami może pobudzać proliferację normalnych ludzkich komórek i prowadzić do ich immortalizacji. Można w ten sposób uzyskać linie fibroblastów immortalizowane wirusem SV40 (*Simian virus 40*), linie limfocytów B immortalizowane wirusem EBV (*Epstein-Barr virus*), linie limfocytów T immortalizowane wirusami: HTLV-I lub HTLV-II, to znaczy wirusami z ludzkiej białaczki z komórek T typu I lub II, (*human T-cell leukemia virus type 1* lub *human T-cell lymphotropic virus type 1*) albo wirusem *Herpesvirus saimiri*, linie komórek nabłonka immortalizowane wirusami brodawczaka ludzkiego: HPV-16, HPV-18 (*human papilloma virus*) lub SV40 oraz linie komórek śródbłonka naczyniowego immortalizowane wirusem SV40 lub wirusem opryszczki pospolitej, HHV (*human herpesvirus*).

Maksymalna liczba podziałów fibroblastów ulega znacznemu zwiększeniu po zakażeniu tych komórek wirusem SV40 lub po transfekcji jego genami kodującymi tzw. duży antygen T (*large T antigen, LT*) – który inaktywuje m.in. białka z grupy supresorów wzrostu nowotworowego: TP53 i RB oraz p107 i p130 [35], a także tzw. mały antygen T (*small t antigen, ST*), posiadający zdolność hamowania aktywności cząsteczek z rodziny białkowej fosfatazy PP2A [36]. Zaobserwowano, że wzrost przeżywającej większości tak zmienionych komórek ulega jednak zahamowaniu po dodatkowych 20-30 podziałach,

przy czym tylko nieliczne klony ulegają immortalizacji z częstością około 10^{-7} [37]. Warto zauważyć, że immortalizacja wirusem SV40 wyraźnie modyfikuje reakcję na promieniowanie jonizujące fibroblastów pochodzących od chorych z zespołem *ataxia telangiectasia* (AT), nie zmieniając jednak w podobny sposób fibroblastów normalnych [38, 39]. Podobnie, białko T wirusa SV40 znacznie silniej indukuje proces endoreduplikacji w fibroblastach osób z zespołem Nijmegen (*Nijmegen Breakage Syndrome*) (NBS), niż w fibroblastach od osób zdrowych [40]. Tak więc, zmiany wywołane przez wirusa SV40 w immortalizowanych fibroblastach mogą być uwarunkowane także przez genotyp tych komórek, co może utrudniać właściwą interpretację danych doświadczalnych.

Immortalizacja różnych typów komórek nabłonkowych możliwa jest po ich zakażeniu wirusem HPV albo po transfekcji genami tego wirusa, kodującymi białka: E6 i/lub E7. Badania z użyciem tego modelu komórkowego koncentrują się przede wszystkim na poznawaniu, w jaki sposób obie wirusowe onkoproteiny przełamują ograniczenia programu starzenia podziałowego poprzez inaktywację szlaków, związanych przede wszystkim z *TP53*, *RB* oraz z różnymi inhibitorami kinaz zależnych od cyklin [41-43], a także poprzez indukowanie wysokiej aktywności telomerazy [44]. Badania tych linii umożliwiły ponadto identyfikowanie zmian chromosomowych towarzyszących immortalizacji komórek nabłonkowych. W wyniku tych badań ustalono na przykład, że utrata materiału genetycznego z chromosomów: 3p, 10p lub zwielokrotnienie materiału genetycznego w chromosomie 20q występują zarówno w komórkach immortalizowanych *in vitro*, jak i w komórkach raka szyjki macicy, raka piersi, raka jajnika oraz raka pęcherza [23, 24, 45, 46].

Linie limfocytów B immortalizowane wirusem EBV (*EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines*) (EBV/LCL) są od wielu lat powszechnie stosowane w badaniach *in vitro*, jednak dopiero niedawno wykazano, że w większości przypadków nie są one obdarzone nieograniczonym potencjałem wzrostowym. Komórki z takich linii mają zazwyczaj normalny kariotyp, zaś wobec braku lub niskiej aktywności telomerazy ich telomery ulegają sukcesywnemu skracaniu po kolejnych podziałach, co prowadzi do kryzysu wzrostu po 150-180 podziałach [47]. Tylko nieliczne klony komórek przełamują ten kryzys i ulegają dalej rzeczywistej immortalizacji z częstością, która jest zbliżona do obserwowanej w liniach fibroblastów zakażonych wirusem SV40. Te prawdziwie immortalizowane limfocyty B charakteryzują się wysoką aktywnością telomerazy, aneuploidią i innymi zmianami, w tym: obniżoną ekspresją p16(INK4a)/RB, mutacjami w genie *TP53* oraz odmienną wrażliwością na niektóre cytostatyki [48-51]. Autorzy większości badań nie określają „statusu immortalizacji” stosowanych przez siebie linii EBV/LCL, co może być przyczyną uzyskiwania rozbieżnych danych, na przykład podczas badań mechanizmów regulacji cyklu komórkowego.

Analiza linii ludzkich limfocytów T CD4+ immortalizowanych za pomocą transfekcji genem *Tax* wirusa HTLV-I umożliwiła poznanie zaburzeń regulacji cyklu

komórkowego oraz różnych szlaków wewnątrzkomórkowych w przebiegu infekcji tym wirusem, które prowadzą do rozwoju białaczki z komórek T dorosłych (*adult T cell leukemia*) (ATL) [52]. Stwierdzono, że białko Tax odgrywa kluczową rolę w procesie immortalizacji limfocytów T zakażonych wirusem HTLV-I, ponieważ sprzyja aktywacji i rozplemowi tych komórek, między innymi pobudzając ekspresję genu dla interleukiny 2 (*hIL-2*) oraz jej receptora, inaktywując TP53, blokując funkcjonalnie p16(INK4a) i zmniejszając poziom ekspresji p27(Kip1), tym samym zwiększając aktywność kompleksów CDK4/cyklina D oraz CDK2/cyklina E, a także zwiększając ekspresję cykliny D2 [53-56]. Stąd też zaskakujące wydają się ostatnie dane Gabet i wsp., którzy pokazali, że Tax hamuje transkrypcję genu katalitycznej podjednostki telomerazy (*human telomerase reverse transcriptase*) (*hTERT*) oraz aktywność telomerazy w limfocytach T [57]. Zgodnie z hipotezą przedstawioną przez autorów tego raportu białko Tax we wczesnej fazie rozwoju białaczki ATL inaktywuje w aktywnie proliferujących komórkach białko TP53 oraz blokuje ekspresję *hTERT* oraz aktywność telomerazy, tym samym sprzyjając szybszemu skracaniu się telomerów i ich trwałej dysfunkcji, która powoduje stopniowe nagromadzenie się aberracji chromosomowych. W dalszym etapie, na skutek kolejnych mutacji m.in. w *TP53*, może wystąpić utrwalona inaktywacja tego genu, zaś niższy poziom ekspresji Tax sprzyja reaktywacji telomerazy i, w rezultacie, przywróceniu funkcjonalnej integralności telomerów i stabilizacji ich długości, doprowadzając do pojawienia się pełnego obrazu choroby.

Zakażenie wirusem *Herpesvirus saimiri* indukuje u niektórych gatunków małp bardzo agresywne chłoniaki z komórek T [58]. Wirus ten posiada jednocześnie zdolność immortalizacji normalnych ludzkich limfocytów T, które zachowują jednak wiele wyjściowych cech macierzystej populacji, takich jak na przykład zdolność odpowiedzi na swoisty antygen lub nieswoiste mitogeny poprzez szlaki pobudzenia typowe dla normalnej komórki T [59]. Linie komórek T immortalizowane wirusem *Herpesvirus saimiri* różnią się jednak od swej macierzystej populacji między innymi pod względem zwiększonej reaktywności na związanie CD2 [58, 60], zaburzonej ekspresji kinazy PTK Lyn [61], czy też przesunięciem profilu syntezy cytokin w kierunku typowym dla podgrupy Th1 [62]. Immortalizacja z użyciem *H. saimiri* ułatwiła także namnożenie i funkcjonalną analizę bardzo małej liczbie subpopulacji komórek T – limfocytów T gamma/delta [63]. Linie immortalizowane *H. saimiri* są ponadto podatne na infekcję wirusem zespołu nabytego niedoboru odporności typu I lub II (*human immunodeficiency virus*) (HIV-1 lub HIV-2), co bardzo ułatwia namnażanie tych wirusów, w tym zwłaszcza szczepów o słabej zdolności do replikacji [64].

C. Wymuszona ekspresja onkogenów

Opisano kilka immortalizowanych linii ludzkich fibroblastów lub komórek nabłonkowych, które uzyskano po transfekcji genami: *c-MYC* lub *v-MYC* [65-67], *cykliny*

A2 albo *CDK1* [68]. Analiza linii komórek nabłonka z gruczołu krokowego immortalizowanych za pomocą wymuszonej ekspresji *c-MYC* potwierdziła kluczową rolę zwiększonej ekspresji tego onkogenu w rozwoju nowotworu tego narządu [69].

Wcześniejsze dane pokazały także, że wymuszenie ekspresji genu *Bmi1*, kodującego białko z grupy polycomb, które działa jako transkrypcyjny represor szeregu genów mających udział w rozwoju nowotworów [70], powoduje jedynie wydłużenie okresu życia podziałowego ludzkich fibroblastów [71], natomiast w późniejszych badaniach wykazano, że można uzyskać immortalizowane linie ludzkich komórek nabłonkowych poprzez wymuszenie ekspresji *Bmi1* [72, 73].

Nieprawidłowa ekspresja białek z grupy ID, które zawierają motyw helisa-pętla-helisa (*helix-loop-helix*) ma istotny udział w procesie nowotworzenia poprzez stymulowanie proliferacji komórek, hamowanie różnicowania oraz indukowanie neoangiogenezy [74]. Opisano uzyskanie immortalizowanej linii keratynocytów po wymuszonej ekspresji genu *Id-1* i zaobserwowano w tej populacji komórek indukcję aktywności telomerazy oraz zaburzenia szlaków kontrolowanych przez *TP53* oraz *RB* [75]. Kolejna próba zastosowania tego podejścia przez inny zespół umożliwiła jedynie wydłużenie życia podziałowego keratynocytów [76].

D. Wymuszenie ekspresji telomerazy poprzez wprowadzenie genu *hTERT*, który koduje katalityczną podjednostkę telomerazy

Wprowadzenie do normalnych komórek różnych tkanek genu *hTERT* umożliwia znaczne wydłużenie życia podziałowego komórek, a w niektórych przypadkach ich immortalizację [77, 78]. Stwierdzono przy tym, że uzyskanie w ten sposób immortalizowanych linii komórek wymagało, prócz wymuszenia ekspresji telomerazy, także wystąpienia lub jednoczesnego wprowadzenia (poprzez wymuszenie ekspresji) dodatkowych zmian genetycznych, takich jak inaktywacja szlaku *p16/RB* lub wyciszenie genu *TP53* [79-85] albo wprowadzenie genu *Bmi1* [86-89]. W niektórych badaniach podkreśla się, że w komórkach takich immortalizowanych linii brak jest zmian typowych dla nowotworów złośliwych, zaś kariotyp tych komórek nawet po długotrwałym namnażaniu pozostaje normalny [90-92]. Inni autorzy zaobserwowali jednak, że immortalizacja ludzkich komórek nabłonkowych z gruczołu sutkowego za pomocą wymuszonej ekspresji *hTERT* wiąże się z podwyższoną ekspresją *c-MYC*, a więc zmianą, która występuje w komórkach wielu różnych nowotworów złośliwych [93]. Co więcej, wykazano że wymuszona ekspresja telomerazy indukuje w komórkach pojawienie się także innych cech typowych dla nowotworów złośliwych [94-97], niestabilność chromosomalną w limfocytach T CD4+ [98], a nawet może prowadzić do pełnej transformacji nowotworowej [99, 100]. Spostrzeżenia te wyraźnie wskazują, że terapia z użyciem komórek z wymuszoną

ekspresją telomerazy wiąże się z realnym zagrożeniem pojawienia się nowotworu.

E. Wyciszenie ekspresji genu *14-3-3sigma*

Gen *14-3-3sigma* jest negatywnym regulatorem cyklu komórkowego, który uczestniczy w działaniu punktów kontrolujących przejście z fazy G1 do S oraz z G2 do M [101]. Transaktywacja przez *TP53* w następstwie uszkodzenia DNA ma charakter sprzężenia zwrotnego, ponieważ zwiększony poziom białka *14-3-3sigma* powoduje stabilizację cząsteczki *TP53* [102]. Zwiększona ekspresja białka *14-3-3sigma* powoduje jednocześnie zahamowanie aktywności kinazy białkowej B/Akt, co w konsekwencji powoduje stabilizację *p27(Kip1)* poprzez powstrzymanie degradacji tego białka [103, 104]. W komórkach wielu nowotworów złośliwych pochodzenia nabłonkowego zaobserwowano zmniejszony poziom lub brak ekspresji genu *14-3-3sigma* [105]. Zahamowanie ekspresji *14-3-3sigma* poprzez wprowadzenie do komórek keratynocytów skóry sekwencji typu anty-sens pozwoliło uzyskać immortalizowane linie komórek, w których procesy różnicowania uległy zablokowaniu, a jednocześnie program starzenia podziałowego został przełamany poprzez inaktywację genu *p16(INK4a)* oraz reekspresję telomerazy [106]. Stosując to samo podejście wyprowadzono immortalizowaną linię macierzystych komórek keratynocytów włosów [107].

Warto zauważyć, że immortalizacja komórek poprzez wyciszenie ekspresji genu *14-3-3sigma* możliwa jest jedynie w przypadku komórek nabłonkowych, które ujawniają ekspresję tego genu, podczas gdy w komórkach innych tkanek, na przykład w fibroblastach lub limfocytach, gen *14-3-3sigma* jest wyciszony na poziomie epigenetycznym (108).

F. Linie komórek spontanicznie immortalizowanych

Komórki człowieka, w przeciwieństwie do komórek myszy i innych gryzoni bardzo rzadko ulegają spontanicznej immortalizacji poza ustrojem [109]. Znacznie dłuższy okres życia osobniczego człowieka oraz życia podziałowego komórek ludzkich *in vitro*, stwarza większe, niż w przypadku myszy ryzyko wystąpienia i nagromadzenie się zmian genetycznych, które mogą prowadzić do rozwoju nowotworu. Stąd też, jak się wydaje, genom człowieka jest znacznie lepiej niż mysz zabezpieczony przed uszkodzeniem materiału genetycznego. Ponadto, znacznie szybszy metabolizm komórek myszy bardziej sprzyja uszkodzeniom DNA spowodowanym m.in. przez mechanizmy oksydacyjne.

W Tabeli I podsumowano najlepiej udokumentowane badania opisujące uzyskanie linii ludzkich komórek, które spontanicznie uzyskały zdolność do nieograniczonego wzrostu poza ustrojem. Wątro zwrócić uwagę na to, że materiałem wyjściowym dla znacznej części tego typu linii była wprawdzie zdrowa tkanka, niemniej pochodząca od osoby z nowotworem złośliwym lub z wyraźną

predyspozycją do jego rozwoju. Wskazuje to, że komórki od osób z wrodzonymi zmianami genetycznymi, które predysponują do wystąpienia nowotworu są znacznie bardziej podatne na spontaniczną immortalizację poza ustrojem. Stąd też można przypuszczać, że także pozostałe przypadki spontanicznej immortalizacji ludzkich komórek wiążą się z jakimiś wyjściowymi, niezdefiniowanymi jeszcze zmianami genetycznymi, które osłabiają rygor programu starzenia podziałowego.

3. Własny model spontanicznie immortalizowanych linii ludzkich limfocytów T zależnych od IL-2

Ludzkie limfocyty T po pobudzeniu swoistym antygenem lub za pomocą różnych mitogenów nieswoistych mogą ulegać tylko ograniczonej liczbie podziałów podczas namnażania poza ustrojem w obecności IL-2 [136]. Pobudzenie spoczynkowych limfocytów T powoduje przejściowy wzrost ekspresji receptora dla IL-2, stąd też podtrzymanie podziałów w hodowlach limfocytów T wymaga okresowej restymulacji tych komórek pierwotnym bodźcem w obecności tak zwanych komórek „feeder” [137]. W opracowanym przeze mnie systemie namnażania limfocytów T w obecności IL-2 bodźcem pierwotnym jest WGA (*Wheat Germ Agglutinin*), lektyna pochodząca z kielków pszenicy, którą pierwotnie postrzegano, jako niemitogenną [138]. WGA posiada kilka interesujących właściwości, które zdecydowały o jej wyborze jako pierwotnego bodźca, inicjującego wzrost komórek T w opisywanym systemie hodowli. WGA – podobnie jak dwie najczęściej stosowane mitogenne lektyny – PHA lub ConA – łączy się w większości z tymi samymi glikoproteinami na powierzchni limfocytów T [139], przy czym może je pobudzać do produkcji IL-2 dodatkowo także poprzez inne struktury, niż kompleks receptora dla antygeny [140]. Jednocześnie, WGA może hamować proliferację komórek T, blokując odpowiedź tych komórek na IL-2 poprzez wiązanie się z receptorem dla tego czynnika wzrostowego, nie wpływając przy tym na produkcję IL-2 [141, 142]. Co więcej, stwierdzono, że WGA i czynnik hamujący proliferację limfocytów T (*soluble suppressor of T cell proliferation*) (SISS-T) współzawodniczą w łączeniu się z tą samą strukturą na powierzchni tych komórek [143]. Warto zauważyć przy tym, że blokada receptora dla IL-2 hamuje powstawanie nieswoistych supresorowych komórek T *in vitro* [144]. Wszystkie te powyższe spostrzeżenia wyraźnie wskazują, że WGA może skutecznie pobudzać limfocyty T poprzez wiele szlaków, inicjując przy tym produkcję IL-2, a jednocześnie blokować receptor dla tego czynnika na niektórych komórkach T, w tym supresorowych. Może właśnie dlatego podtrzymanie długotrwałego wzrostu w tym systemie hodowli nie wymaga używania jakichkolwiek komórek typu „feeder”, zaś restymulacja limfocytów T polega jedynie na ich okresowej ekspozycji na nadsącze z nad komórek jednojądrzastych aktywowanych WGA lub ekspozycji na same mitogeny, to

Tab. I. Spontaniczna immortalizacja ludzkich komórek poza ustrojem

Tkanka	Nazwa linii	Stan zdrowia dawcy komórek	Miejsce pobrania komórek	Piśmiennictwo
Fibroblasty:				
	XP29 MA	Xeroderma pigmentosum	skóra	(110)
	VIP-F:T	czerniak	skóra	(111)
	GM2995	Xeroderma pigmentosum	skóra	(112)
	MDAH172	zespół Li-Fraumeni	skóra	(113)
	MDAH174	guzy tkanek miękkich		
	MDAH041			
	MDAH087			
	MDAH170-1			
	MDAH170-3			
	MDAH120-1			
	III-CF	zespół Li-Fraumeni rak sutka	fibroblasty zrębu z biopsji guza nowotworu	(114)
	C26Ci	rodzinna polipowatość jelita grubego	fibroblasty zrębu z biopsji tkanki jelita grubego	(115)
Komórki nabłonkowe:				
	HMT-3522	dysplazja sutka	fragment tkanki piersi	(116)
	NM1	osoba zdrowa	napletek	(117)
	HaCaT	czerniak	skóra	(118)
	HME50	zespół Li-Fraumeni rak sutka	biopsja tkanki zdrowej obok guza	(119)
	MCF-10	dysplazja sutka	fragment tkanki piersi	(120)
	MCF-12	dysplazja, rak sutka	fragment zdrowej tkanki piersi	(121)
	SIK	osoba zdrowa	napletek	(122)
	HPAM1	osoba zdrowa	gruczoł ślinianki	(123)
	HPAF1			
	NIKS	osoba zdrowa	napletek	(124)
	IOBA-NHC	osoba zdrowa	biopsja spojówki	(125)
	ARPE-19	osoba zdrowa	gałka oczna po anukleacji	(126)
Hepatocyty:				
	HHY41	osoby zdrowe	fragment tkanki wątroby	(127, 128)
	HH29			
	HH01			
	HH02			
	HH09			
	HH25			
Komórki gleju (komórki Muller'a)	MIO-M1	osoba zdrowa, dawca rogówki	gałka oczna po anukleacji	(129)
Komórki śródbłonna	C11STH	?	?	(130)
Komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej	TMC	osoby zdrowe	fragment tkanki tłuszczowej	(131)
Limfocyty T:				
	–	atopowe zapalenie skóry	biopsja skóry	(132)
	Line 4, Line 5	osoba zdrowa	śledziona	(133)
	S4, S7, S9	zespół Nijmegen	krew obwodowa	(134)
	S3/R			(135)

znaczy WGA lub WGA łącznie z PHA [145, 146]. Brak konieczności stosowania komórek „feeder” w istotny sposób ułatwia procedurę namnażania limfocytów T, a także zmniejsza ryzyko zakażenia podczas hodowli. Ponadto analiza na poziomie molekularnym próbek limfoblastów T zbieranych po namnażaniu w takich warunkach ułatwiona jest poprzez brak zanieczyszczenia komórkami „feeder”.

Wykorzystując opisany powyżej system hodowli wyprowadziłem 6 linii ludzkich limfoblastów T, które spontanicznie uzyskały zdolność do nieograniczonego wzrostu, a więc uległy spontanicznej immortalizacji. Dwie linie (Linia 4 oraz Linia 5) pochodzą z normalnej śledziony, którą usunięto z powodu urazu jamy brzusznej [133]. Cztery pozostałe linie (S3R, S4, S7 oraz S9), uzyskałem z krwi obwodowej czterech pacjentów z zespołem NBS [134, 135]. NBS jest recesywnie dziedziczną chorobą, która charakteryzuje się m.in. niestabilnością chromosomową oraz bardzo silną predyspozycją do rozwoju nowotworów układu chłonnego [147]. Przeprowadzona przez nas rozszerzona analiza potencjału wzrostowego *in vitro* limfocytów T pochodzących od pacjentów z zespołem NBS, którzy są homozygotycznymi nosicielami najczęściej występującej, tzw. „słowiańskiej” mutacji 657del5 genu *NBS1*, wykazała spontaniczną immortalizację limfocytów T pochodzących od czterech spośród ośmiu badanych pacjentów. Zaobserwowaliśmy ponadto wyraźnie większą, w porównaniu normalnymi limfocytami T, maksymalną liczbę podziałów komórek T jednego pacjenta z zespołem NBS oraz jednego heterozygotycznego nosiciela mutacji 657del5 [135]. Nasze dane pokazały, że na skutek mutacji 657del5 genu *NBS1* w limfocytach T dochodzi do zaburzeń mechanizmów kontrolujących procesy starzenia podziałowego i pojawia się wysoka podatność na spontaniczną immortalizację komórek pochodzących od homozygotycznych nosicieli tej mutacji.

Krzyżowe zanieczyszczenie linii komórkowych stanowi potencjalny i często występujący problem w laboratoriach na całym świecie, ponieważ ocenia się, że w przybliżeniu 17-36% linii powszechnie używanych w badaniach biomedycznych pochodzi bądź od innej osoby, bądź z innego gatunku, niż podaje się w publikacjach, które opisują ich uzyskanie [148-151]. Analiza profilu krótkich, mikrosatelitarnych (polimorficznych) sekwencji DNA (*short tandem repeat*) (STR), potwierdziła, że Linia 4 oraz Linia 5 pochodzą z tej samej, macierzystej populacji jednojądrzastych komórek śledziony, a także wykluczyła krzyżowe zanieczyszczenie immortalizowanych linii S3R, S4, S7 oraz S9, potwierdzając jednocześnie, że te linie pochodzą od różnych osób [135]. Ponadto, analiza rearanżacji genu *TcRγ* wykazała, że Linia 4 i Linia 5 są odrębnymi, monoklonalnymi populacjami komórek (własne, niepublikowane dane).

Zmiany warunkujące uzyskiwanie przez komórki zdolności do nieograniczonego wzrostu są wciąż słabo poznane, a dotychczasowe badania w tym zakresie prowadzone są przede wszystkim z użyciem fibroblastów lub komórek nabłonkowych. Dlatego też celem przedstawionych dalej badań własnych była analiza morfolo-

gii komórek wspomnianych linii limfocytów T, a także zmian molekularnych oraz cytogenetycznych, które towarzyszyły ich spontanicznej immortalizacji. W szczególności badania własne obejmowały: 1) analizę fenotypu powierzchniowego oraz morfologii z użyciem cytometrii przepływowej oraz immunocytochemii, 2) charakterystykę zmian długości telomerów i aktywności telomerazy, 3) analizę skuteczności działania punktów kontrolnych cyklu komórkowego, 4) badanie ekspresji wybranych genów kontrolujących przejście z fazy G1 do S oraz 5) analizę cytogenetyczną, polegającą na standardowym badaniu kariotypu i ploidii, badaniu zwielokrotnienia lub utraty materiału genetycznego za pomocą porównawczej hybrydyzacji genomowej (*comparative genomic hybridization*) (CGH) i ocenie liczby kopii wybranych genów z użyciem techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*Fluorescent In Situ Hybridization*) (FISH).

A. Analiza fenotypu powierzchniowego oraz morfologii komórek spontanicznie immortalizowanych linii limfocytów T

Analiza fenotypu powierzchniowego komórek dwóch spontanicznie immortalizowanych linii pochodzących z normalnej śledziony (Linia 4 oraz Linia 5) pokazała, że populacja Linii 4 już po pierwszych 45 podziałach została zdominowana przez typowe limfoblasty CD3⁺CD4⁺CD8⁻, których fenotyp nie uległ zmianie podczas następnych 100 podziałów [152]. Natomiast podgrupa komórek o fenotypie CD3⁺CD4⁻CD8⁻, które już po pierwszych 15 podziałach stanowiły 26% tej populacji, uzyskała przewagę wzrostową podczas wyprowadzenia Linii 5 [152]. Obie te immortalizowane populacje limfoblastów zachowały ekspresję antygenów CD3 oraz TcRαβ nawet po bardzo długotrwałym namnażaniu (odpowiednio: po 138 i 107 podziałach populacji) [152].

Komórki czterech spontanicznie immortalizowanych linii pochodzących od pacjentów z NBS (linie: S3R, S4, S7 oraz S9) okazały się zdecydowanie odmienne od pierwotnych limfoblastów T tak pod względem fenotypu powierzchniowego, wielkości, jak i morfologii [135]. Analiza fenotypu powierzchniowego pokazała, że komórki dwóch linii (S4 oraz S7) utraciły część, a komórki jednej linii (S3R) większość markerów typowych dla limfocytów T, a więc ujawniły cechę typową dla chłoniaka z obwodowych komórek T [135]. W komórkach wszystkich czterech immortalizowanych linii zaobserwowaliśmy jednocześnie wysoką intensywność barwienia na obecność CD30 zarówno w obszarze błony komórkowej, jak i w okolicy aparatu Golgi'ego, co stanowi charakterystyczną cechę chłoniaka z dużych komórek oraz chłoniaka Hodgkina [135]. Ponadto, stwierdziliśmy, że populacje wszystkich czterech immortalizowanych linii zawierały, w różnych proporcjach, duże komórki z obfitą cytoplazmą, nerkowatym lub podkowiastym jądrem i/lub wieloma jądrami, które przypominały komórki anaplastycznego chłoniaka z dużych komórek. Co więcej, w linii S7 stwierdziliśmy obecność podgrupy komórek,

które w badaniu immunohistochemicznym wykazały jądrową ekspresję białka kinazy chłoniaka anaplastycznego (ALK) (*anaplastic lymphoma kinase*) [135]. Białko ALK jest nieobecne w normalnych komórkach limfoidalnych, natomiast w anaplastycznym chłoniaku z dużych komórek jego ekspresja pojawia się na skutek translokacji pomiędzy genem *ALK* w chromosomie 2p23 oraz innym genem, przy czym najczęściej jest to translokacja t(2;5), która powoduje fuzję genu *ALK* z genem *NMP* (*nucleophosmin gene*) i powstanie chimerycznego białka NMP/ALK [153]. Analiza FISH z dwukolorową sondą typu „split” nie wykazała jakichkolwiek rearanżacji genu *ALK* w komórkach linii S7, przy czym większość komórek ujawniła znacząco zwiększoną liczbę kopii genu *ALK*, na co wskazuje obecność 4, 6 i 10 nierozdzielonych sygnałów, w odpowiednio 9,5%, 63,7% i 0,5% komórek tej populacji [135]. Stąd też wydaje się prawdopodobne, że zwielokrotnienie liczby kopii genu *ALK* w komórkach linii S7 miało swój udział w pojawieniu się ekspresji całej, prawidłowej cząsteczki ALK. Jak dotąd, ekspresja całej cząsteczki ALK została zaobserwowana w podgrupie chłoniaka z dużych komórek B [154] oraz w różnych guzach tkanek miękkich [155].

Badanie z użyciem cytometru przepływowego, w którym analizowaliśmy morfologię komórek na podstawie paramentów rozproszenia światła pokazała, że komórki trzech linii (S3R, S4 i S7) plasują się w obszarze typowym dla mieloblastów i bardziej dojrzałych komórek szpiku lub komórek anaplastycznego chłoniaka z dużych komórek, nie zaś w obszarze właściwym dla normalnych limfoblastów T [135]. Czwarta immortalizowana linia S9 ujawniła morfologię bardziej zbliżoną do normalnych limfoblastów T, biorąc pod uwagę wysoką wartość rozproszenia światła mierzona przez przedni i niższą wartość rozproszenia światła, która jest mierzona przez boczny detektor [135].

B. Badanie skuteczności działania punktów kontrolnych cyklu komórkowego

Wszystkie pochodzące od pacjentów z zespołem NBS spontanicznie immortalizowane linie komórek T ujawniły defekt punktu kontrolnego przejścia z fazy G1 do S (134 oraz własne nieopublikowane dane). Odwrotnie zaś, zarówno pierwotna, macierzysta dla linii S4 populacja limfoblastów T oraz obie spontanicznie immortalizowane linie pochodzące z normalnej śledziony (Linia 4 i Linia 5) ujawniły prawidłowe działanie tego punktu [133, 134]. Może to wskazywać, że immortalizacja komórek pochodzących od chorych z NBS wiąże się z osłabieniem punktu kontrolującego przejście z G1 do S. Potwierdzenie takiej hipotezy mogłoby mieć kliniczne implikacje, ponieważ zaobserwowano, że defekt punktu kontrolnego G1/S uwrażliwia komórki na działanie niektórych cytostatyków [156].

Istnieją rozbieżne dane na temat skuteczności działania punktu kontrolnego G2 do M w napromienionych komórkach, które pochodzą od chorych z NBS. Niektóre

prace opisują prawidłowe działanie tego punktu w pierwotnych fibroblastach, w liniach EBV/LCL oraz w liniach transformowanych wirusem SV40 [157-159], zaś w innych badaniach stwierdzono, że punkt G2/M jest uszkodzony w komórkach linii EBV/LCL oraz w liniach transformowanych wirusem SV40 [160-163]. Wydaje się, że źródłem tych rozbieżności są odmienne parametry dawki promieniowania lub czasu analizy po napromienieniu komórek, które zastosowano w tych układach badawczych. Dane Xu i wsp., [159], którzy za pomocą cytometrii przepływowej analizowali nagromadzenie się komórek na granicy G2/M, wyraźnie wskazują, że populacje komórek z prawidłowym i uszkodzonym punktem G2/M można odróżnić dopiero po napromienieniu dawką wyższą niż 1 Gy oraz w czasie nie krótszym, niż 24 godziny po napromienieniu. W naszych badaniach zastosowaliśmy inną metodę, która pozwala ocenić, w jakim stopniu komórki, będące podczas napromieniania w fazie G2, zdolne są do przejścia do fazy M. Nasze badania jednoznacznie pokazały, że zarówno pierwotne, jak i immortalizowane limfoblasty T pacjentów z NBS (mutacja 657del5) wykazują uszkodzenie punktu kontrolnego G2/M, na co wyraźnie wskazuje znaczący odsetek komórek w fazie M zaobserwowany 2 godziny po napromienieniu (własne nieopublikowane dane).

Skuteczne działanie punktu kontrolnego fazy S polega na krótkotrwałym powstrzymaniu syntezy DNA po uszkodzeniu DNA wywołanym przez ekspozycję komórek na promieniowanie jonizujące [164]. Uszkodzenie mechanizmu kontroli tej fazy cyklu komórkowego, zwane „syntezą DNA oporną na promieniowanie” (*radioresistant DNA synthesis*) (RDS) polega na nieskutecznym zahamowaniu syntezy DNA i jest charakterystyczną cechą fenotypu komórek pacjentów z zespołem AT i NBS [165]. Ciekawe, że jedna z czterech opisywanych tutaj spontanicznie immortalizowanych linii komórek T pochodzących od pacjentów z NBS (linia S3R) ujawniła prawidłowe działanie bloku w obrębie fazy S po napromienieniu (własne, nieopublikowane dane). Girard i wsp. opisali podobnie nietypowo reagujące na napromienienie komórki pierwotnych fibroblastów skóry, które pochodziły od pacjenta z NBS z tą samą mutacją genu *NBS1*, to znaczy delecją pięciu par zasad w pozycji 657 [166]. Najprawdopodobniej odmienne tło genetyczne zdeterminowało nietypowy fenotyp RDS komórek obu tych linii. Warto w tym kontekście zwrócić uwagę na istnienie dwóch równoległych szlaków regulacji punktu kontrolnego wewnątrz fazy S, z których jeden zależny jest od genu *NBS1*, drugi zaś od genu *Chk2* [167].

C. Analiza ekspresji regulatorów przejścia z fazy G1 do S

W normalnych, napromienionych komórkach zahamowanie cyklu komórkowego na granicy przejścia z fazy G1 do S realizowane jest z udziałem *TP53*, głównie poprzez transaktywację *p21(WAF1/CIP1)* [168]. Zaobserwowane przez nas osłabienie działania punktu kontrolnego G1/S we wszystkich czterech immortalizowanych liniach komór-

rek T od chorych z NBS sugerowało zaburzenia procesów nagromadzania się TP53 oraz p21(WAF1/CIP1) w następstwie popromiennych uszkodzeń DNA. Słabe nagromadzanie się p21 w naświetlonych komórkach linii S4 mogło mieć udział w defekcie bloku G1/S, niemniej jednak w liniach: S3R, S7 oraz S9 stwierdziliśmy wyraźne nagromadzanie się p21 po 24 godzinach po napromieniowaniu komórek (134 oraz własne niepublikowane dane). Ciekawe, że w komórkach zwojaka zarodkowego zaobserwowano prawidłową, zależną od TP53 funkcjonalną transaktywację p21(WAF1/CIP1), która współwystępowała z defektem bloku G1/S po napromieniowaniu, wówczas gdy jednocześnie występowała zwiększona ekspresja c-MYC [169]. Zaobserwowano ponadto, że wymuszenie ekspresji genu *c-MYC* w komórkach nabłonka gruczołu sutkowego powoduje osłabienie punktu kontrolnego G1 po napromienieniu komórek [170]. Stąd też możliwe, że podwyższony poziom ekspresji białka c-MYC, który zaobserwowaliśmy w komórkach opisywanych tutaj immortalizowanych linii [133, 134] miał udział w promowaniu przechodzenia komórek do fazy S po ich napromienieniu, przy jednoczesnym nagromadzaniu się p21(WAF1/CIP1).

Pierwotna aktywacja normalnych limfocytów T oraz każda ich restymulacja pierwotnym bodźcem podczas namnażania w obecności IL-2 prowadzi do wzrostu aktywności telomerazy, niemniej nie zapobiega to skracaniu się telomerów i ostatecznemu powstrzymaniu wzrostu komórek [171, 172]. Wcześniejsze badania pokazały, że wymuszenie utrwalonej (ciągłej) ekspresji telomerazy poprzez wprowadzenie do normalnych limfocytów T genu *hTERT* może prowadzić do ich immortalizacji [173]. Kiedy podejmowaliśmy badania, to znaczy w drugiej połowie lat 90-tych, nie było jasne, czy inne zmiany genetyczne, prócz trwałej aktywności telomerazy, są niezbędne dla uzyskania nieograniczonego wzrostu limfocytów T. Nasze dane pokazały, że w spontanicznie immortalizowanych liniach komórek T stabilizacja długości telomerów oraz wysoka aktywność telomerazy współwystępują ze zmienioną ekspresją szeregu cząsteczek regulujących przejście z fazy G1 do S [133, 134]. W szczególności, w aktywnie proliferujących komórkach Linii 4, Linii 5 oraz linii S4 (w fazie wychodzenia z kryzysu wzrostu), stwierdziliśmy współwystępowanie wysokiego poziomu ekspresji p16(INK4a) oraz nieaktywnej, ufosforylowanej formy cząsteczki RB [133, 134]. W komórkach tych linii hamujące oddziaływanie p16(INK4a) zostało najwyraźniej przełamane dzięki zwiększonej ekspresji takich pozytywnych regulatorów cyklu komórkowego, jak: CDK4, cykliny D2, Cykliny E i/lub c-MYC [133, 134]. Warto zauważyć, że krytyczne znaczenie podwyższonej ekspresji CDK4 dla przełamania hamującego oddziaływania szlaku *p16(INK4a)/RB* podczas immortalizacji potwierdziły późniejsze dane Ramirez i wsp., którzy po wymuszeniu ekspresji genów: *CDK4* oraz *hTERT* w komórkach nabłonkowych oskrzeli uzyskali immortalizowane linie komórek z wysokim poziomem ekspresji p16(INK4a) oraz z nieaktywną, ufosforylowaną formą cząsteczki RB [174]. Stąd też można przypuszczać, że zwiększona ekspresja genu

CDK4, która występuje w różnych nowotworach, gdzie jednocześnie występuje prawidłowa ekspresja cząsteczek: RB oraz p16(INK4a) [175-179], ma udział w uzyskiwaniu nieograniczonego potencjału wzrostowego komórek.

Cyklina E, która w kompleksie z CDK2 bierze udział w fosforylacji RB, może zastępować nieaktywne kompleksy cykliny/CDK4-CDK6 [180]. Stąd też, wydaje się, że w taki sposób w komórkach Linii 5, które posiadają prawidłową cząsteczkę RB, mogło dojść do przełamania blokujące oddziaływanie p16(INK4a).

Gen *c-MYC* jest pozytywnym regulatorem ekspresji telomerazy, ponieważ może indukować jej aktywność poprzez transkrypcyjną aktywację genu *hTERT* [181, 182]. Dlatego też, wyraźnie wyższy poziom ekspresji cząsteczki c-MYC, który zaobserwowaliśmy w późniejszej fazie wzrostu pięciu immortalizowanych linii: Linii 4, S4, S7, S9 oraz S3R mógł mieć udział nie tylko w promowaniu proliferacji, ale również w zwiększeniu aktywności telomerazy (133, 134 oraz własne dane nieopublikowane).

W kontekście rozważań na temat zmian genetycznych, które mają udział w reaktywacji telomerazy i/lub stabilizacji telomerów podczas immortalizacji limfocytów T warto wspomnieć o raporcie Maser i wsp., którzy pokazali, że alternatywna transkrypcja genu *NBS1* w limfocytach B transformowanych wirusem EBV, które pochodzą od osób z NBS, prowadzi do powstania dwóch cząsteczek białka o ciężarze cząsteczkowym 26 i 70 kD, zamiast prawidłowego produktu tego genu, to znaczy cząsteczki nibryny o ciężarze 95 kD, przy czym fibroblasty z tą samą mutacją ujawniają obecność tylko formy 26 kD nibryny (183). W naszych badaniach po raz pierwszy wykazaliśmy obecność kadłubowej formy cząsteczki nibryny o c. cz. 70 kD zarówno w pierwotnych, jak i w immortalizowanych limfocytach T z mutacją 657del5 genu *NBS1* [134]. Być może obecność w limfocytach fragmentu białka nibryny o c. cz. 70 kD, jest konieczna dla ich immortalizacji i tym samym warunkuje tkankową swoistość nowotworów występujących u pacjentów z zespołem NBS.

D. Analiza cytogenetyczna

Zaobserwowaliśmy, że w 5 spośród 6 spontanicznie immortalizowanych linii komórek T (Linia 4, Linia 5 oraz linie: S4, S7 i S9) pojawiła się wspólna zmiana w postaci zwielokrotnienia materiału z krótkiego ramienia chromosomu 2 (obszar 2p13-24) [184]. Zmiana ta pojawiła się we wczesnej fazie hodowli i była obecna we wszystkich komórkach tych pięciu immortalizowanych linii, co sugeruje, że zwielokrotnienie materiału genetycznego, który znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 2 miało udział w uzyskiwaniu przez komórki nieograniczonego potencjału wzrostowego.

Zwielokrotnienie materiału z krótkiego ramienia chromosomu 2p pojawia się z dużą częstością w komórkach różnych typów nowotworów, a w tym w ziarnicy złośliwej oraz w chłoniakach niezziarnicznych [185-196]. Ponadto, w chłoniaku niezziarnicznym duplikacja krótkiego ramienia chromosomu 2 wiąże się ze złą prognozą i gor-

szą odpowiedzią na chemioterapię [197, 198]. Ciekawe, że wielokrotnienie materiału genetycznego z obszarów 2p22-25 oraz 8q stwierdzono także w większości przypadków nawracającego, surowiczego raka jajnika [199]. Warto jednocześnie zwrócić uwagę, że wszystkie wprowadzone przez nas linie spontanicznie immortalizowanych komórek T ujawniły bardzo wysoki poziom ekspresji dwóch podjednostek receptora dla IL-2, to znaczy CD25 oraz CD122 [135], a przy tym proliferacja tych komórek w obecności IL-2 nie wymaga jakiegokolwiek restymulacji, co może wskazywać na zaburzenia regulacji ekspresji receptora dla tego czynnika wzrostowego oraz na nieprawidłowości w przekazywaniu sygnałów po związaniu się z IL-2 z receptorem. Podwyższony poziom ekspresji CD25 zaobserwowano w wielu typach nowotworów złośliwych, w białaczkach i chłoniakach, a w tym w anaplastycznym chłoniaku z dużych komórek [200, 201]. W tym kontekście warto zauważyć, że wielokrotnienie materiału genetycznego pochodzącego z krótkiego ramienia chromosomu 2 stwierdzono także w liniach komórek T, pochodzących od chorych z ATL lub z zespołem Sezary [202, 203].

Obszar 2p13-24, który uległ wielokrotnieniu we wszystkich analizowanych przez nas spontanicznie immortalizowanych liniach komórek T, zawiera szereg genów kodujących pozytywne regulatory cyklu komórkowego, takich jak na przykład: *REL* (2p12-13), *c-MYC* (2p24.1), *ALK* (2p23.1), *ID2* (2p25) i *MEIS1* (2p14). Zaobserwowaliśmy wielokrotnienie liczby kopii genów *REL*, *MYCN* i *ALK* w komórkach linii S4 i S7, natomiast w linii S7 stwierdziliśmy – tak jak wcześniej wspomniano – obecność podgrupy komórek, które wykazały ekspresję białka *ALK* [135, 184]. Analiza poziomu ekspresji produktów innych genów z tej grupy pozwoli upewnić się, czy doszło także do zwiększenia się ich ekspresji. Przeprowadzana obecnie analiza różnicowej ekspresji genów, która obejmuje opisywane populacje immortalizowanych oraz macierzystych limfoblastów T, być może ułatwi znalezienie genów odpowiedzialnych za spontaniczną immortalizację tych linii.

Ponadto w późniejszej fazie wzrostu linii: S4, S7 oraz S9 (po ponad 100 podziałach populacji) zaobserwowaliśmy stosując analizę CGH wielokrotnienie materiału obecnego w regionie 8q21-24, przy czym jednocześnie w komórkach tych linii stwierdziliśmy zwiększoną liczbą kopii *c-MYC* w badaniu z użyciem FISH [184]. Zmiany te związane były z wyższym poziomem ekspresji białka *c-MYC* w komórkach wszystkich opisywanych spontanicznie immortalizowanych linii, w tym także w linii S3R (133, 134, 184 oraz własne dane niepublikowane). Zwiększona ekspresja *c-MYC* najwyraźniej dostarczała immortalizowanym komórkom dodatkowej przewagi wzrostowej oraz mogła mieć udział w zwiększeniu aktywności telomerazy, zważywszy na wspomnianą wcześniej zdolność transaktywacji promotora *hTERT* przez *c-MYC*.

Interesujące także wydaje się, że analiza z użyciem techniki CGH wykazała w pięciu spośród sześciu immortalizowanych linii wielokrotnienie materiału obecnego

w chromosomie 3 (obszar 3q26-29) (własne dane niepublikowane).

Ostatnie badania pokazały, że zmiany związane z mikroRNA – krótkimi, niekodującymi cząsteczkami RNA – odgrywają istotną rolę w inicjacji i progresji wielu nowotworów złośliwych [204, 205]. Zaobserwowano, że ponad połowa genów kodujących mikroRNA znajduje się w tych obszarach chromosomów, które są szczególnie podatne na typowe dla nowotworów zmiany chromosomowe, takie jak: wielokrotnienie lub utrata materiału genetycznego, czy też często występujące punkty złamań chromosomów [206]. Zważywszy, że na przykład co najmniej 4 geny mikroRNA znajdują się na krótkim ramieniu chromosomu 2 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) oraz, że mikroRNA umiejscowione w obszarach, które uległy wielokrotnieniu, mogą działać jak onkogeny [207], nie można wykluczyć udziału różnych mikroRNA obecnych w obszarach: 2p13-24, 8q21-24 lub 3q26-29 w uzyskiwaniu przez komórki opisywanych tutaj linii komórek T zdolności do nieograniczonego wzrostu.

Nasze dane wskazują, że podczas wyprowadzania opisywanych tutaj spontanicznie immortalizowanych linii limfocytów T doszło najwyraźniej do klonalnej ekspansji podgrupy komórek, które uzyskały zdolność do nieograniczonego wzrostu, na co wskazuje analiza rearanżacji genu *TcRγ* [134], ewolucja zmian kariotypowych podczas wyprowadzania tych linii [184] oraz coraz bardziej ujednoczony fenotyp powierzchniowy tworzących je komórek podczas hodowli [135]. Nie wiadomo, dlaczego limfocyty T, pochodzące z normalnej śledziony uległy spontanicznej immortalizacji, tworząc Linie 4 oraz Linie 5. Zdecydowana większość przypadków spontanicznej immortalizacji dotyczy komórek pochodzących od osób z nowotworem złośliwym lub z wyraźną predyspozycją do jego rozwoju (Tabela I), stąd też można przypuszczać, że dawca tej śledziony był jednak obciążony jakimiś niezdefiniowanymi zmianami genetycznymi, które prowadzą do zaburzeń programu starzenia podziałowego.

Spontanicznie immortalizowane linie komórek pochodzących od pacjentów z NBS powstały raczej na skutek zmian genetycznych i/lub epigenetycznych, które zaistniały podczas hodowli, nie zaś w rezultacie wzrostu poza ustrojem zmienionych limfocytów T, które już *in vivo* posiadały nieograniczony potencjał wzrostowy. Warto bowiem zauważyć, że u jednego z pacjentów z NBS, rozpoznano chłoniaka limfoblastycznego z limfocytów T dwa lata po pobraniu próbki krwi, z której uzyskaliśmy spontanicznie immortalizowaną linię S4. Komórki tego nowotworu miały jednak zdecydowanie odmienny fenotyp, niż komórki zarówno linii S4, jak i pozostałych immortalizowanych linii pochodzących od trzech innych pacjentów z zespołem NBS [135]. U jednego z nich pacjentów (dawca komórek linii S3R) rozpoznano raka tarczycy 9 lat po pobraniu próbki krwi, drugi (dawca komórek linii S9) zmarł z powodu niewydolności krążenia dwa lata po inicjacji hodowli z jego limfocytów, u trzeciego zaś, jak dotąd, nie stwierdzono żadnego nowotworu.

Nie jest jasne, w jaki sposób mutacja 657del5 genu *NBS1* powoduje zaburzenia, które mogą sprzyjać wyso-

kiej podatności na spontaniczną immortalizację limfocytów T, związaną z klonalną ekspansją atypowych komórek z cechami charakterystycznymi dla chłoniaka z obwodowych komórek T i/lub anaplastycznego chłoniaka z dużych komórek. Zjawisko to może wiązać się z rolą, jaką nibryna – produkt genu *NBS1* – odgrywa w działaniu telomerów, które chronią końce chromosomów przed ich rozpoznaniem, jako pęknięć podwójnej nici DNA oraz zapobiegają ich zniszczeniu, fuzji lub nieuprawnionej rekombinacji [208]. d'Adda di Fagagna i wsp. zaobserwowali ostatnio, że na końcach chromosomów starych podziałowo, nieproliferujących komórek obecnych jest wiele cząsteczek związanych z reagowaniem na podwójne pęknięcia DNA, a tym także i nibryna [209]. Ponadto okazało się, że zahamowanie niektórych kinaz, które uczestniczą w reagowaniu na uszkodzenia DNA, powoduje przywrócenie przechodzenia tych komórek do fazy S [209]. Stąd też w starych podziałowo komórkach osób z NBS inicjacja i utrzymywanie się bloku proliferacji są prawdopodobnie osłabione na skutek niesprawnego działania nibryny, co może sprzyjać wydłużaniu się życia podziałowego komórek i niestabilności chromosomowej, a w rezultacie tworzeniu się i nagromadzeniu zmian niezbędnych dla immortalizacji i dalszych nieprawidłowości prowadzących do pojawienia się atypowych komórek z cechami typowymi dla chłoniaka.

Rozważając inne możliwe molekularne uwarunkowania wysokiej podatności na spontaniczną immortalizację komórek T pochodzących od pacjentów z zespołem NBS warto zauważyć, że limfocyty heterozygotycznych nosicieli mutacji 657del5 genu *NBS1* charakteryzują się zmienioną w porównaniu z limfocytami od osób z prawidłowym genem *NBS1*, ekspresją wielu genów, w tym związanych ze szlakami naprawy DNA, regulacją cyklu komórkowego oraz apoptozy [210]. Oznacza to, że komórki pacjentów z zespołem NBS, którzy są homozygotycznymi nosicielami tej mutacji, obciążone są nie tylko deficytem funkcji genu *NBS1*, ale także posiadają istotnie zmieniony fenotyp ekspresji szeregu genów krytycznych dla kontroli programu starzenia podziałowego w limfocytach T.

4. Podsumowanie wyników własnych badań

1. Wykorzystując własny system inicjowanej mitogenem długotrwałej hodowli ludzkich limfocytów T w obecności interleukiny 2 wyprowadziłem sześć linii ludzkich limfoblastów T, które spontanicznie uzyskały zdolność do nieograniczonego wzrostu. Dwie spośród tych immortalizowanych linii pochodzą z normalnej śledziny, natomiast cztery linie uzyskano z krwi obwodowej czterech pacjentów z zespołem NBS, który charakteryzuje się wysoką częstością występowania nowotworów układu chłonnego. Analiza profilu DNA wykluczyła krzyżowe zanieczyszczenie tych immortalizowanych linii i potwierdziła, że pochodzą one od różnych osób. Stwierdziliśmy wysoką podatność na spontaniczną immortalizację limfocytów T pochodzą-

cych od homozygotycznych nosicieli mutacji 657del5 genu *NBS1* (cztery spośród ośmiu analizowanych przypadków).

2. Nasze badania pokazały, że populacje czterech spontanicznie immortalizowanych linii pochodzących od pacjentów z NBS zawierają atypowe komórki, których wielkość, cechy morfologii oraz fenotypu powierzchniowego są charakterystyczne dla komórek obwodowego chłoniaka z komórek T lub anaplastycznego chłoniaka z dużych komórek. Tylko u jednego z tych czterech pacjentów rozpoznano później (dwa lata po uzyskaniu próbki krwi) chłoniaka limfoblastycznego z limfocytów T, którego fenotyp był jednak zdecydowanie odmienny, niż fenotyp komórek wszystkich czterech immortalizowanych linii, co sugeruje, że uzyskanie przez komórki tych linii nieograniczonego potencjału wzrostowego oraz innych cech fenotypu nowotworowego miało miejsce *in vitro*.
3. Zaobserwowaliśmy, że spontaniczna immortalizacja komórek opisywanych linii była związana ze stabilizacją długości telomerów, wysoką ekspresją telomerazy oraz z zaburzoną regulacją cyklu komórkowego. Nasze badania wykazały w szczególności, że spontanicznie immortalizowane linie limfocytów T od pacjentów z zespołem NBS, w przeciwieństwie do immortalizowanych linii komórek T z prawidłowym genem *NBS1*, mają osłabiony punkt kontrolujący przejście z fazy G1 do S po napromienieniu komórek, ale jednocześnie niektóre z tych linii nie wykazują w tych warunkach wyraźnych zaburzeń nagromadzenia się TP53 oraz p21(WAF1/CIP1), za co prawdopodobnie odpowiedzialny jest podwyższony poziom ekspresji c-MYC w komórkach tych linii. Zarówno pierwotne, jak i immortalizowane komórki T od pacjentów z zespołem NBS (z wyjątkiem jednej linii, S3R) ujawniły defekt punktu kontrolnego wewnątrz fazy S. Wszystkie cztery immortalizowane linie pochodzące od pacjentów z zespołem NBS wykazały uszkodzenie punktu kontrolującego przejście z fazy G2 do M. W niektórych spontanicznie immortalizowanych liniach stwierdziliśmy współwystępowanie wysokiej ekspresji cząsteczki p16(INK4a) z obecnością ufosforylowanej formy cząsteczki RB, przy jednocześnie zwiększonej ekspresji białek: CDK4, cykliny D2, c-MYC lub cykliny E, co sugeruje że hamowanie cyklu komórkowego na granicy G1/S przez p16(INK4a) zostało przewyciężone (przełamane) poprzez zwiększoną ekspresję pozytywnych regulatorów cyklu komórkowego podczas uzyskiwania przez komórki tych linii nieograniczonego potencjału wzrostowego.
4. W naszych badaniach po raz pierwszy wykazaliśmy obecność kadłubowej formy cząsteczki nibryny o c. cz. 70 kD zarówno w pierwotnych, jak i w immortalizowanych limfocytach T homozygotycznych nosicieli mutacji 657del5 genu *NBS1*.

5. Stwierdziłiśmy, że w spontanicznie immortalizowanych liniach komórek T występują wspólne zmiany cytogenetyczne w postaci zwielokrotnienia materiału genetycznego, który pochodzi z:
 - a – chromosomu 2 (obszar 2p13-24) w 5 liniach (Linia 4, Linia 5, S4, S7 oraz S9),
 - b – chromosomu 8 (obszar 8q21-24) w 3 liniach (S4, S7 oraz S9),
 - c – chromosomu 3 (obszar 3q26-29) w czterech liniach (Linia 5, S3R, S4 oraz S9). Spostrzeżenia te sugerują obecność w tych obszarach genów, których ekspresja ma istotny udział w uzyskiwaniu przez limfocyty T zdolności do nieograniczonego wzrostu.
6. Badania procesu uzyskiwania przez komórki zdolności do nieograniczonego wzrostu prowadzone są najczęściej z użyciem fibroblastów lub komórek nabłonkowych, które są immortalizowane poprzez infekcję wirusami lub poprzez wymuszenie ekspresji różnych genów, co wiąże się z wprowadzeniem do komórek szeregu dodatkowych zmian, utrudniających interpretację analiz w tych systemach badawczych. Przedstawiony w tym opracowaniu własny, nowy model obejmujący spontanicznie immortalizowane linie limfocytów T, które posiadają cechy komórek chłoniaka rozszerza możliwości analizy mechanizmów odpowiedzialnych za immortalizację limfocytów oraz rozwój nowotworów układu chłonnego.

5. Podziękowanie

Pragnę złożyć serdeczne podziękowanie Panu Profesorowi Janowi Steffenowi za bardzo cenne krytyczne uwagi podczas opracowywania maszynopisu tej rozprawy.

Dr n. med. Jan Konrad Siwicki
Zakład Immunologii
Centrum Onkologii – Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

6. Piśmiennictwo

1. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10: 789-99.
2. Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 2006; 94: 179-83.
3. Bartek J, Lukas J, Bartkova J. Perspective: defects in cell cycle control and cancer. *J Pathol* 1999; 187: 95-9.
4. Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest* 2004; 113: 8-13.
5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
6. Hug N, Lingner J. Telomere length homeostasis. *Chromosoma* 2006; 115: 413-25.
7. Collins K. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 484-94.
8. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 961-76.
9. Jacobs JJ, de Lange T. p16INK4a as a second effector of the telomere damage pathway. *Cell Cycle* 2005; 4: 1364-8.
10. Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 2004; 23: 2919-33.
11. Blasco MA, Hahn WC. Evolving views of telomerase and cancer. *Trends Cell Biol* 2003; 13: 289-94.
12. Calado RT, Chen J. Telomerase: not just for the elongation of telomeres. *Bioessays* 2006; 28: 109-12.
13. Muntoni A, Reddel RR. The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet* 2005; 14 Spec No. 2: R191-6.
14. Pereira-Smith OM, Smith JR. Evidence for the recessive nature of cellular immortality. *Science* 1983; 221: 964-6.
15. Pereira-Smith OM, Smith JR. Genetic analysis of indefinite division in human cells: identification of four complementation groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 6042-6.
16. Bryce SD, Morrison V, Craig NJ i wsp. A mortality gene(s) for the human adenocarcinoma line HeLa maps to a 130-kb region of human chromosome 4q22-q23. *Neoplasia* 2002; 4: 544-50.
17. Hensler PJ, Annab LA, Barrett JC, Pereira-Smith OM. A gene involved in control of human cellular senescence on human chromosome 1q. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2291-7.
18. Ogata T, Oshimura M, Namba M i wsp. Genetic complementation of the immortal phenotype in group D cell lines by introduction of chromosome 7. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86: 35-40.
19. Moy EL, Duncan EL, Hukku B, Reddel RR. Reassessment of immortalization complementation group D. *Exp Gerontol* 1997; 32: 663-70.
20. Sasaki M, Honda T, Yamada H i wsp. Evidence for multiple pathways to cellular senescence. *Cancer Res* 1994; 54: 6090-3.
21. Sandhu AK, Hubbard K, Kaur GP i wsp. Senescence of immortal human fibroblasts by the introduction of normal human chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5498-502.
22. Kumata M, Shimizu M, Oshimura M i wsp. Induction of cellular senescence in a telomerase negative human immortal fibroblast cell line, LCS-AF1-3, by human chromosome 6. *Int J Oncol* 2002; 21: 851-6.
23. Steenbergen RD, Walboomers JM, Meijer CJ i wsp. Transition of human papillomavirus type 16 and 18 transfected human foreskin keratinocytes towards immortality: activation of telomerase and allele losses at 3p, 10p, 11q and/or 18q. *Oncogene* 1996; 13: 1249-57.
24. Vieten L, Belair CD, Savelieva L i wsp. Minimal deletion of 3p13→14.2 associated with immortalization of human uroepithelial cells. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 39-48.
25. Poignee M, Backsch C, Beer K i wsp. Evidence for a putative senescence gene locus within the chromosomal region 10p14-p15. *Cancer Res* 2001; 61: 7118-21.
26. Mehle C, Lindblom A, Ljungberg B i wsp. Loss of heterozygosity at chromosome 3p correlates with telomerase activity in renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 1998; 13: 289-95.
27. Cuthbert AP, Bond J, Trott DA i wsp. Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 37-45.
28. Kugoh H, Shigenami K, Funaki K i wsp. Human chromosome 5 carries a putative telomerase repressor gene. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 37-47.
29. Miura N, Onuki N, Rathi A i wsp. hTR repressor-related gene on human chromosome 10p15.1. *Br J Cancer* 2001; 85: 1510-4.
30. Bai L, Mihara K, Kondo Y i wsp. Immortalization of normal human fibroblasts by treatment with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Int J Cancer* 1993; 53: 451-6.
31. Namba M, Iijima M, Kondo T i wsp. Immortalization of normal human cells is a multistep process and a rate limiting step of neoplastic transformation of the cells. *Hum Cell* 1993; 6: 253-9.
32. Tsutsui T, Tanaka Y, Matsudo Y i wsp. Extended lifespan and immortalization of human fibroblasts induced by X-ray irradiation. *Mol Carcinog* 1997; 18: 7-18.
33. Iijima M, Mihara K, Kondo T i wsp. Mutation in p53 and de-regulation of p53-related gene expression in three human cell lines immortalized with 4-nitroquinoline 1-oxide or 60Co gamma rays. *Int J Cancer* 1996; 66: 698-702.
34. Honda T, Sadamori N, Oshimura M i wsp. Spontaneous immortalization of cultured skin fibroblasts obtained from a high-dose atomic bomb survivor. *Mutat Res* 1996; 354: 15-26.
35. Ali SH, DeCaprio JA. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 15-23.
36. Arroyo JD, Hahn WC. Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene* 2005; 24: 7746-55.

37. Shay JW, Van Der Haegen BA, Ying Y i wsp. The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res* 1993; 209: 45-52.
38. Duchaud E, Ridet A, Stoppa-Lyonnet D i wsp. Deregulated apoptosis in ataxia telangiectasia: association with clinical stigmata and radiosensitivity. *Cancer Res* 1996; 56: 1400-4.
39. Jorgensen TJ, Russell PS, McRae DA. Radioresistant DNA synthesis in SV40-immortalized ataxia telangiectasia fibroblasts. *Radiat Res* 1995; 143: 219-23.
40. Wu X, Avni D, Chiba T i wsp. SV40 T antigen interacts with Nbs1 to disrupt DNA replication control. *Genes Dev* 2004; 18:305-16.
41. Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002; 89: 213-28.
42. Snijders PJ, Steenbergen RD, Heideman DA i wsp. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol* 2006; 208: 152-64.
43. Jones EE, Wells SI. Cervical cancer and human papillomaviruses: inactivation of retinoblastoma and other tumor suppressor pathways. *Curr Mol Med* 2006; 6: 795-808.
44. James MA, Lee JH, Klingelhutz AJ. HPV16-E6 associated hTERT promoter acetylation is E6AP dependent, increased in later passage cells and enhanced by loss of p300. *Int J Cancer* 2006; 119: 1878-85.
45. Loughran O, Clark LJ, Bond J i wsp. Evidence for the inactivation of multiple replicative lifespan genes in immortal human squamous cell carcinoma keratinocytes. *Oncogene* 1997; 14: 1955-64.
46. Savelieva E, Belair CD, Newton MA i wsp. 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells. *Oncogene* 1997; 14: 551-60.
47. Sugimoto M, Tahara H, Ide T i wsp. Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Res* 2004; 64: 3361-4.
48. Sugimoto M, Ide T, Goto M i wsp. Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *Mech Ageing Dev* 1999; 107: 51-60.
49. Okubo M, Tsurukubo Y, Higaki T i wsp. Clonal chromosomal aberrations accompanied by strong telomerase activity in immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Genet Cytogenet* 2001 ; 129: 30-4.
50. Takahashi T, Kawabe T, Okazaki Y i wsp. In vitro establishment of tumorigenic human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *DNA Cell Biol* 2003; 22: 727-35.
51. Sawada K, Noda K, Nakajima H i wsp. Differential cytotoxicity of anticancer agents in pre- and post-immortal lymphoblastoid cell lines. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1202-7.
52. Gallo RC. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-II. *Oncogene* 2005; 24: 5926-30.
53. Marriott SJ, Trinh D, Brady JN. Activation of interleukin-2 receptor alpha expression by extracellular HTLV-I Tax1 protein: a potential role in HTLV-I pathogenesis. *Oncogene* 1992; 7: 1749-55.
54. Suzuki T, Kitao S, Matsushime H i wsp. HTLV-1 Tax protein interacts with cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4A and counteracts its inhibitory activity towards CDK4. *EMBO J* 1996 ;15: 1607-14.
55. Cereseto A, Washington Parks R, Rivadeneira E i wsp. Limiting amounts of p27Kip1 correlates with constitutive activation of cyclin E-CDK2 complex in HTLV-1-transformed T-cells. *Oncogene* 1999; 18: 2441-50.
56. Santiago F, Clark E, Chong S i wsp. Transcriptional up-regulation of the cyclin D2 gene and acquisition of new cyclin-dependent kinase partners in human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *J Virol* 1999; 73: 9917-27.
57. Gabet AS, Mortreux F, Charneau P i wsp. Inactivation of hTERT transcription by Tax. *Oncogene* 2003; 22: 3734-41.
58. Tsygankov AY. Cell transformation by Herpesvirus saimiri. *J Cell Physiol* 2005 ; 203: 305-18.
59. Mittrucker HW, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B i wsp. Herpes virus saimiri-transformed human T lymphocytes: normal functional phenotype and preserved T cell receptor signalling. *Int Immunol* 1993; 5: 985-90.
60. Mittrucker HW, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B i wsp. CD2-mediated autocrine growth of herpes virus saimiri-transformed human T lymphocytes. *Jpn J Exp Med* 1992; 176: 909-913.
61. Wiese N, Tsygankov AY, Klauenberg U i wsp. Selective activation of T cell kinase p56lck by Herpesvirus saimiri protein tip. *J Biol Chem* 1996; 271: 847-852.
62. De Carli M, Berthold S, Fickenscher H i wsp. Immortalization with herpesvirus saimiri modulates the cytokine secretion profile of established Th1 and Th2 human T cell clones. *J Immunol* 1993; 151: 5022-30.
63. Fickenscher H, Bokel C, Knappe A i wsp. Functional phenotype of transformed human alphabeta and gammadelta T cells determined by different subgroup C strains of herpesvirus saimiri. *J Virol* 1997; 71: 2252-63.
64. Vella C, Zheng NN, Easterbrook P i wsp. Herpesvirus saimiri immortalized human lymphocytes: Novel hosts for analyzing HIV type 1 in vitro neutralization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18: 933-46.
65. Kinsella AR, Fiszler-Maliszewska L, Mitchell EL i wsp. Introduction of the activated N-ras oncogene into human fibroblasts by retroviral vector induces morphological transformation and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1803-9.
66. Mitchell ELD, Kinsella AR. Changes in chromosomes 1 and 6 associated with human cell immortalization. *Int J Oncology* 1997; 10: 977-981.
67. Morgan TL, Yang DJ, Fry DG i wsp. Characteristics of an infinite life span diploid human fibroblast cell strain and a near-diploid strain arising from a clone of cells expressing a transfected v-myc oncogene. *Exp Cell Res* 1991; 197: 125-36.
68. Luo P, Tresini M, Cristofalo V i wsp. Immortalization in a normal foreskin fibroblast culture following transduction of cyclin A2 or cdk1 genes in retroviral vectors. *Exp Cell Res* 2004; 294: 406-19.
69. Gil J, Kerai P, Lleonart M i wsp. Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc. *Cancer Res* 2005; 65: 2179-85.
70. Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:846-56.
71. Itahana K, Zou Y, Itahana Y i wsp. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 389-401.
72. Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ i wsp. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4736-45.
73. Song LB, Zeng MS, Liao WT i wsp. Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer Res* 2006; 66: 6225-32.
74. Perk J, Iavarone A, Benezra R. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 603-14.
75. Alani RM, Hasskarl J, Grace M i wsp. Immortalization of primary human keratinocytes by the helix-loop-helix protein, Id-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9637-41.
76. Nickoloff BJ, Chaturvedi V, Bacon P i wsp. Id-1 delays senescence but does not immortalize keratinocytes. *J Biol Chem* 2000 ; 275: 27501-4.
77. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M i wsp. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-52.
78. Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 1998; 8: 279-82.
79. Kiyono T, Foster SA, Koop JI i wsp. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998; 396: 84-8.
80. Farwell DG, Shera KA, Koop JI i wsp. Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase. *Am J Pathol* 2000; 156: 1537-47.
81. Rheinwald JG, Hahn WC, Ramsey MR i wsp. A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5157-72.
82. Kim H, Farris J, Christman SA i wsp. Events in the immortalizing process of primary human mammary epithelial cells by the catalytic subunit of human telomerase. *Biochem J* 2002; 365: 765-72.
83. Noble JR, Zhong ZH, Neumann AA i wsp. Alterations in the p16(INK4a) and p53 tumor suppressor genes of hTERT-immortalized human fibroblasts. *Oncogene* 2004; 23: 3116-21.
84. Yang G, Rosen DG, Colacino JA i wsp. Disruption of the retinoblastoma pathway by small interfering RNA and ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase lead to immortalization of human ovarian surface epithelial cells. *Oncogene* 2007; 26: 1492-8.
85. Yang G, Rosen DG, Mercado-Urbe I i wsp. Knockdown of p53 combined with expression of the catalytic subunit of telomerase is sufficient to immortalize primary human ovarian surface epithelial cells. *Carcinogenesis* 2007; 28:174-82.
86. Cudre-Mauroux C, Occhiodoro T, Konig S i wsp. Lentivector-mediated transfer of Bmi-1 and telomerase in muscle satellite cells yields a duchenne myoblast cell line with long-term genotypic and phenotypic stability. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 1525-33.
87. Saito M, Handa K, Kiyono T i wsp. Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 50-7.
88. Zhang X, Soda Y, Takahashi K i wsp. Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the

- differentiation abilities of immortalized cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 853-9.
89. Haga K, Ohno S, Yugawa T i wsp. Efficient immortalization of primary human cells by p16-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci* 2007; 98: 147-54.
 90. Morales CP, Holt SE, Ouellette M i wsp. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 1999; 21:115-8.
 91. Jiang XR, Jimenez G, Chang E i wsp. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 1999; 21: 111-4.
 92. Harada H, Nakagawa H, Oyama K i wsp. Telomerase induces immortalization of human esophageal keratinocytes without p16INK4a inactivation. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 729-38.
 93. Wang J, Hannon GJ, Beach DH. Risky immortalization by telomerase. *Nature* 2000; 405: 755-6.
 94. Lindvall C, Hou M, Komurasaki T i wsp. Molecular characterization of human telomerase reverse transcriptase-immortalized human fibroblasts by gene expression profiling: activation of the epi-regulin gene. *Cancer Res* 2003; 63: 1743-7.
 95. Smith LL, Collier HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 474-9.
 96. Baross A, Schertzer M, Zuyderduyn SD i wsp. Effect of TERT and ATM on gene expression profiles in human fibroblasts. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 298-310.
 97. Li HM, Man C, Jin Y i wsp. Molecular and cytogenetic changes involved in the immortalization of nasopharyngeal epithelial cells by telomerase. *Int J Cancer* 2006; 119: 1567-76.
 98. Roth A, Baerlocher GM, Schertzer M i wsp. Telomere loss, senescence, and genetic instability in CD4+ T lymphocytes overexpressing hTERT. *Blood* 2005; 106: 43-50.
 99. Milyavsky M, Shats I, Erez N i wsp. Prolonged culture of telomerase-immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype. *Cancer Res* 2003; 63: 7147-57.
 100. Zongaro S, de Stanchina E, Colombo T i wsp. Stepwise neoplastic transformation of a telomerase immortalized fibroblast cell line. *Cancer Res* 2005; 65: 11411-8.
 101. Hermeking H, Benzinger A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 183-92.
 102. Yang HY, Wen YY, Chen CH, i wsp. 14-3-3 sigma positively regulates p53 and suppresses tumor growth. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 7096-107.
 103. Yang H, Wen YY, Zhao R i wsp. DNA damage-induced protein 14-3-3 sigma inhibits protein kinase B/Akt activation and suppresses Akt-activated cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 3096-105.
 104. Yang H, Zhang Y, Zhao R i wsp. Negative cell cycle regulator 14-3-3sigma stabilizes p27 Kip1 by inhibiting the activity of PKB/Akt. *Oncogene* 2006; 25: 4585-94.
 105. Lodygin D, Hermeking H. Epigenetic silencing of 14-3-3sigma in cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 214-24.
 106. Dellambra E, Golisano O, Bondanza S i wsp. Downregulation of 14-3-3sigma prevents clonal evolution and leads to immortalization of primary human keratinocytes. *J Cell Biol* 2000; 149: 1117-30.
 107. Kirschner M, Montazem A, Hilaire HS i wsp. Long-term culture of human gingival keratinocyte progenitor cells by down-regulation of 14-3-3 sigma. *Stem Cells Dev* 2006; 15: 556-65.
 108. Oshiro MM, Futscher BW, Lisberg A i wsp. Epigenetic regulation of the cell type-specific gene 14-3-3sigma. *Neoplasia* 2005; 7: 799-808.
 109. Namba M, Mihara K, Fushimi K. Immortalization of human cells and its mechanisms. *Crit Rev Oncog*. 1996; 7: 19-31.
 110. Thielmann HW, Fischer E, Dzarlieva RT i wsp. Spontaneous in vitro malignant transformation in a xeroderma pigmentosum fibroblast line. *Int J Cancer* 1983; 31: 687-700.
 111. Mukherji B, MacAlister TJ, Guha A i wsp. Spontaneous in vitro transformation of human fibroblasts. *J Nail Cancer Inst* 1984; 73: 583-93.
 112. Nagasawa H, Zamansky GB, McCone EF i wsp. Spontaneous transformation to anchorage-independent growth of a xeroderma pigmentosum fibroblast cell strain. *J Invest Dermatol* 1987; 88: 149-53.
 113. Bischoff FZ, Yim SO, Pathak S i wsp. Spontaneous abnormalities in normal fibroblasts from patients with Li-Fraumeni cancer syndrome: aneuploidy and immortalization. *Cancer Res* 1990; 50: 7979-84.
 114. Rogan EM, Bryan TM, Hukku B i wsp. Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4745-53.
 115. Forsyth NR, Morales CP, Damle S i wsp. Spontaneous immortalization of clinically normal colon-derived fibroblasts from a familial adenomatous polyposis patient. *Neoplasia* 2004; 6: 258-65.
 116. Briand P, Petersen OW, Van Deurs B. A new diploid nontumorigenic human breast epithelial cell line isolated and propagated in chemically defined medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987; 23: 181-8.
 117. Baden HP, Kubilus J, Kvedar JC i wsp. Isolation and characterization of a spontaneously arising long-lived line of human keratinocytes (NM 1). *In Vitro Cell Dev Biol* 1987; 23: 205-13.
 118. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D i wsp. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; 106: 761-71.
 119. Shay JW, Tomlinson G, Piatyszek MA i wsp. Spontaneous in vitro immortalization of breast epithelial cells from a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 425-32.
 120. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR i wsp. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* 1990; 50: 6075-86.
 121. Paine TM, Soule HD, Pauley RJ i wsp. Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. *Int J Cancer* 1992; 50: 463-73.
 122. Rice RH, Steinmann KE, deGraffenried LA i wsp. Elevation of cell cycle control proteins during spontaneous immortalization of human keratinocytes. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 185-94.
 123. Chopra DP, Xue-Hu IC, Reddy LV. Growth and gene expression in diploid epithelial cell lines derived from normal human parotid gland. *Differentiation* 1995; 58: 241-51.
 124. Allen-Hoffmann BL, Schlosser SJ, Ivarie CA i wsp. Normal growth and differentiation in a spontaneously immortalized near-diploid human keratinocyte cell line, NIKS. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 444-55.
 125. Diebold Y, Calonge M, Enriquez de Salamanca A i wsp. Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4263-74.
 126. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR i wsp. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 1996; 62: 155-69.
 127. Roberts EA, Letarte M, Squire J i wsp. Characterization of human hepatocyte lines derived from normal liver tissue. *Hepatology* 1994; 19: 1390-9.
 128. Kono Y, Yang S, Letarte M i wsp. Establishment of a human hepatocyte line derived from primary culture in a collagen gel sandwich culture system. *Exp Cell Res* 1995; 221: 478-85.
 129. Limb GA, Salt TE, Munro PM i wsp. In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 864-9.
 130. Cockerill GW, Meyer G, Noack L i wsp. Characterization of a spontaneously transformed human endothelial cell line. *Lab Invest* 1994; 71: 497-509.
 131. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC i wsp. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005; 65: 3035-9.
 132. Kaltroft K, Pedersen CB, Hansen BH i wsp. In vitro genetically aberrant T-cell clones with continuous growth are associated with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1994; 287: 42-7.
 133. Siwicki JK, Hedberg Y, Nowak R, Loden M, Zhao J, Landberg G, Roos G. Long-term cultured IL-2-dependent T cell lines demonstrate p16(INK4a) overexpression, normal pRb/p53, and upregulation of cyclins E or D2. *Exp Gerontol* 2000; 35:375-88.
 134. Siwicki JK, Degerman S, Chrzanowska KH i wsp. Telomere maintenance and cell cycle regulation in spontaneously immortalized T-cell lines from Nijmegen breakage syndrome patients. *Exp Cell Res* 2003; 287: 178-89.
 135. Siwicki JK, Rymkiewicz G, Błachnio K i wsp. Spontaneously immortalized T lymphocytes from Nijmegen Breakage Syndrome patients display phenotypes typical for lymphoma cells. 2007 (wysłane do publikacji).
 136. Perillo NL, Walford RL, Newman MA i wsp. Human T lymphocytes possess a limited in vitro life span. *Exp Gerontol* 1989; 24: 177-87.
 137. Cantrell DA, Smith KA. Transient expression of interleukin 2 receptors. Consequences for T cell growth. *J Exp Med* 1983; 158: 1895-911.
 138. Greene WC, Waldmann TA. Inhibition of human lymphocyte proliferation by the nonmitogenic lectin wheat germ agglutinin. *J Immunol* 1980; 124: 2979-87.
 139. Dillner-Centerlind ML, Axelsson B, Hammarstrom S i wsp. Interactions of lectins with human T lymphocytes. Mitogenic properties, inhibitory effects, binding to the cell membrane and to isolated surface glycopeptides. *Eur J Immunol* 1980; 10: 434-442.
 140. Yachie A, Hernandez D, Blaese RM. T3-T cell receptor (Ti) complex-independent activation of T cells by wheat germ agglutinin. *J Immunol* 1987; 138: 2843-7.
 141. Kawakami K, Yamamoto Y, Onoue K. Effect of wheat germ agglutinin on T lymphocyte activation. *Microbiol Immunol* 1988; 32: 413-22.

142. Reed JC, Robb RJ, Greene WC i wsp. Effect of wheat germ agglutinin on the interleukin pathway of human T lymphocyte activation. *J Immunol* 1985; 134: 314-23.
143. Greene WC, Fleisher TA, Waldmann TA. Soluble suppressor supernatants elaborated by concanavalin A-activated human mononuclear cells. I. Characterization of a soluble suppressor T cell proliferation. *J Immunol* 1981; 126: 1185-91.
144. Oh-Ishi T, Goldman CK, Misiti J i wsp. Blockade of the interleukin-2 receptor by anti-Tac antibody inhibits the generation of antigen-nonspecific suppressor T cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 6478-82.
145. Siwicki JK. Long-term growth of human WGA-activated T-lymphocytes without feeder cells. *Cell Immunol* 1989; 122: 563-8.
146. Siwicki JK, Steffen JA. Early supernatants of mitogen-stimulated mononuclear cells promote long-term IL-2-dependent growth of human T lymphocytes. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1996; 44:109-17.
147. Nijmegen breakage syndrome. The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group. [No authors listed] *Arch Dis Child* 2000; 82: 400-6.
148. MacLeod RA, Dirks WG, Matsuo Y i wsp. Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer* 1999; 83: 555-63.
149. Masters JR. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 233-6.
150. O'Brien SJ. Cell culture forensics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 7656-8.
151. Drexler HG, Dirks WG, Matsuo Y i wsp. False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. *Leukemia* 2003; 7: 416-26.
152. Siwicki JK, Skurzak H, Steffen JA. Surface phenotypes of human T cell lines generated after WGA- and PHA-stimulation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1998; 46: 9-16.
153. Delsol G, Ralfkiaer, Stein H i wsp. Anaplastic large cell lymphoma. W: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, (red.) *Pathology and Genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. IARCPress: Lyon; 2001, s. 230-5.
154. Delsol G, Lamant L, Mariame B i wsp. A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2; 5 translocation. *Blood* 1997; 89: 1483-90.
155. Li XQ, Hisaoka M, Shi DR i wsp. Expression of anaplastic lymphoma kinase in soft tissue tumors: an immunohistochemical and molecular study of 249 cases. *Hum Pathol* 2004; 35: 711-21.
156. Blagosklonny MV, Pardee AB. Exploiting cancer cell cycling for selective protection of normal cells. *Cancer Res* 2001; 61: 4301-5.
157. Yamazaki V, Wegner RD, Kirchgessner CU. Characterization of cell cycle checkpoint responses after ionizing radiation in Nijmegen breakage syndrome cells. *Cancer Res* 1998; 58: 2316-22.
158. Xu B, Kim St, Kastan MB. Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3445-50.
159. Xu B, Kim ST, Lim DS i wsp. Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 2002; 22:1049-59.
160. Buscemi G, Savio C, Zannini L i wsp. Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 5214-22.
161. Jongmans W, Vuillaume M, Chrzanowska K i wsp. Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5016-22.
162. Antoccia A, Stumm M, Saar K i wsp. Impaired p53-mediated DNA damage response, cell-cycle disturbance and chromosome aberrations in Nijmegen breakage syndrome lymphoblastoid cell lines. *Int J Radiat Biol* 1999; 75: 583-91.
163. Ito A, Tsuchi H, Kobayashi J i wsp. Expression of full-length NBS1 protein restores normal radiation responses in cells from Nijmegen breakage syndrome patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: 716-21.
164. Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 792-804.
165. Young BR, Painter RB. Radioresistant DNA synthesis and human genetic diseases. *Hum Genet* 1989; 82: 113-7.
166. Girard PM, Foray N, Stumm M i wsp. Radiosensitivity in Nijmegen Breakage Syndrome cells is attributable to a repair defect and not cell cycle checkpoint defects. *Cancer Res* 2000; 60: 4881-8.
167. Falck J, Petrini JH, Williams BR i wsp. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 2002; 30: 290-4.
168. Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K i wsp. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 1994; 8: 2540-51.
169. Tweddle DA, Malcolm AJ, Cole M i wsp. p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G(1) arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells. *Am J Pathol* 2001; 158: 2067-77.
170. Sheen JH, Dickson RB. Overexpression of c-Myc alters G(1)/S arrest following ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 1819-33.
171. Bodnar AG, Kim NW, Effros RB i wsp. Mechanism of telomerase induction during T cell activation. *Exp Cell Res* 1996; 228: 58-64.
172. Roth A, Yssel H, Pene J i wsp. Telomerase levels control the lifespan of human T lymphocytes. *Blood* 2003; 102: 849-57.
173. Rufer N, Migliaccio M, Antonchuk J i wsp. Transfer of the human telomerase reverse transcriptase (TERT) gene into T lymphocytes results in extension of replicative potential. *Blood* 2001; 98: 597-603.
174. Ramirez RD, Sheridan S, Girard L i wsp. Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer Res* 2004; 64: 9027-34.
175. Zhang T, Nanney LB, Luongo C i wsp. Concurrent overexpression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) in intestinal adenomas from multiple intestinal neoplasia (Min) mice and human familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1997; 57: 169-75.
176. He J, Allen JR, Collins VP i wsp. CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res* 1994; 54: 5804-7.
177. Yao J, Pollock RE, Lang A i wsp. Infrequent mutation of the p16/MTS1 gene and overexpression of cyclin-dependent kinase 4 in human primary soft-tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1065-70.
178. Dicianni MB, Omura-Minamisawa M, Batova A i wsp. Frequent deregulation of p16 and the p16/G1 cell cycle-regulatory pathway in neuroblastoma. *Int J Cancer* 1999; 80:145-54.
179. An HX, Beckmann MW, Reifemberger G i wsp. Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. *Am J Pathol* 1999; 154: 113-8.
180. Gray-Bablin J, Zalvide J, Fox MP i wsp. Cyclin E, a redundant cyclin in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 24; 93: 15215-20.
181. Wang J, Xie LY, Allan S i wsp. Myc activates telomerase. *Genes Dev* 1998; 12: 1769-74.
182. Wu KJ, Grandori C, Amacker M i wsp. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* 1999; 21: 220-4.
183. Maser RS, Zinkel R, Petrini JH. An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet* 2001; 27: 417-21.
184. Siwicki JK, Berglund M, Rygier J i wsp. Spontaneously immortalized human T lymphocytes develop gain of chromosomal region 2p13-24 as an early and common genetic event. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 41: 133-44.
185. Houldsworth J, Mathew S, Rao PH i wsp. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* 1996; 87: 25-9.
186. Werner CA, Dohner H, Joos S i wsp. High-level DNA amplifications are common genetic aberrations in B-cell neoplasms. *Am J Pathol* 1997; 151: 335-42.
187. Bea S, Ribas M, Hernandez JM i wsp. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 1999; 93: 4365-74.
188. Goff LK, Neat MJ, Crawley CR i wsp. The use of real-time quantitative polymerase chain reaction and comparative genomic hybridization to identify amplification of the REL gene in follicular lymphoma. *Br J Haematol* 2000; 111: 618-25.
189. Barth TF, Bentz M, Leithauer F i wsp. Molecular-cytogenetic comparison of mucosa-associated marginal zone B-cell lymphoma and large B-cell lymphoma arising in the gastro-intestinal tract. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 31: 316-25.
190. Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG i wsp. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* 2001; 98: 3413-20.
191. Joos S, Menz CK, Wrobel G i wsp. Classical hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood* 2002; 99:1381-87.
192. Martin-Subero JJ, Gesk S, Harder L i wsp. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99:474-77.
193. Mehra S, Messner H, Minden M i wsp. Molecular cytogenetic characterization of non-Hodgkin lymphoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 33: 225-34.
194. Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H i wsp. Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *Int J Cancer* 2003; 103: 489-95.

195. Wessendorf S, Schwaenen C, Kohlhammer H i wsp. Hidden gene amplifications in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas detected by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 2003; 22: 1425-29.
196. Fukuhara N, Tagawa H, Kameoka Y i wsp. Characterization of target genes at the 2p15-16 amplicon in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci* 2006; 97: 499-504.
197. Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA i wsp. bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1989; 320: 1047-54.
198. Levine EG, Bloomfield CD. Cytogenetics of non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1990; 10: 7-12.
199. Hu J, Khanna V, Jones MW i wsp. Comparative study of primary and recurrent ovarian serous carcinomas: comparative genomic hybridization analysis with a potential application for prognosis. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 369-75.
200. Kuhn DJ, Dou QP. The role of interleukin-2 receptor alpha in cancer. *Front Biosci* 2005;10: 1462-74.
201. Delsol G, Al Saati T i wsp. Coexpression of epithelial membrane antigen (EMA), Ki-1, and interleukin-2 receptor by anaplastic large cell lymphomas. Diagnostic value in so-called malignant histiocytosis. *Am J Pathol* 1988; 130: 59-70.
202. Ariyama Y, Mori T, Shinomiya T i wsp. Chromosomal imbalances in adult T-cell leukemia revealed by comparative genomic hybridization: gains at 14q32 and 2p16-22 in cell lines. *J Hum Genet* 1999; 44: 357-63.
203. Kaltoft K, Hansen BH, Pedersen CB i wsp. Common clonal chromosome aberrations in cytokine-dependent continuous human T-lymphocyte cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 85: 68-71.
204. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-69.
205. Cummins JM, Velculescu VE. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene* 2006; 25: 6220-7.
206. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD i wsp. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2999-04.
207. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 2006; 25: 6188-96.
208. Slijepcevic P. The role of DNA damage response proteins at telomeres – an “integrative” model. *DNA Repair (Amst)* 2006; 5: 1299-306.
209. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L i wsp. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003; 426: 194-8.
210. Cheung VG, Ewens WJ. Heterozygous carriers of Nijmegen Breakage Syndrome have a distinct gene expression phenotype. *Genome Res* 2006; 16: 973-9.

Pełną dokumentację badań, których wyniki zostały wykorzystane w rozprawie habilitacyjnej przedstawiono w następujących publikacjach:

1. Siwicki JK, Hedberg Y, Nowak R, Loden M, Zhao J, Landberg G, Roos G. Long-term cultured IL-2-dependent T cell lines demonstrate p16(INK4a) overexpression, normal pRb/p53, and upregulation of cyclins E or D2. *Exp Gerontol* 2000; 35: 375-88.
2. Siwicki JK, Degerman S, Chrzanowska KH, and Roos G. Telomere maintenance and cell cycle regulation in spontaneously immortalized T-cell lines from Nijmegen breakage syndrome patients. *Exp Cell Res* 2003; 287: 178-89.
3. Siwicki JK, Berglund M, Rygiel J, Pieńkowska-Grela, Grygalewicz B, Degerman S, Golovleva I, Chrzanowska KH, Lagercrantz S, Blennow E, Roos G, and Larsson C. Spontaneously immortalized human T lymphocytes develop gain of chromosomal region 2p13-24 as an early and common genetic event. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 41: 133-44.
4. Siwicki JK, Rymkiewicz G, Błachnio K, Rygiel J, Janusz AM, Skurzak H, Płoski R, Chrzanowska KH, and Steffen J. Spontaneously immortalized T lymphocytes from Nijmegen Breakage Syndrome patients display phenotypes typical for lymphoma cells. 2007 (wysłane do publikacji).

Otrzymano i przyjęto do druku: 19 marca 2007 r.