Współczesna Onkologia (2003) vol. 7; 2 (90–94)

Przeżywanie komórek w warunkach braku adhezji

Study of cell survival in non-adherent conditions

Maciej Małecki

Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa

Oporność komórek na apoptozę zależną od adhezji (anoikis) jest jednym z głównych czynników warunkujących przeżywanie komórek w warunkach braku adhezji, czyli takich, które spotykają komórki w krwiobiegu czy płynach wysiękowych. Pozbawienie komórek adhezji wiąże się ze zmianą wzorca transdukcji sygnału i ujawnia się – w przypadku komórek nowotworowych – ekspresją szeregu cech, które wpływają na ich inwazyjność i oporność na apoptozę. W niniejszej pracy podjęto próbę oceny wpływu braku adhezji na ekspresję białek proapoptotycznych wiązanych z mitochondriami w komórkach nowotworowych i prawidłowych. Część doświadczeń poświęcono również wstępnym badaniom mechanizmów naprawy DNA komórek adhezyjnych i pozbawionych adhezji. Badania przeprowadzono na dwóch ludzkich liniach komórkowych: OVP 10 (rak jajnika) i HCV-29 (nabłonek przejściowy pęcherza moczowego). Jak wcześniej wykazano [5] wśród komórek nieadhezyjnych OVP 10 odsetek apoptozy jest blisko 4-krotnie niższy niż dla komórek HCV-29 kultywowanych w tych samych warunkach. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania wskazują, iż w komórkach OVP 10 w wyniku oderwania od podłoża dochodzi do translokacji cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy, zaś we frakcji cytozolowej nieadhezyjnych komórek HCV-29 nie stwierdzono obecności tego białka. Wykazano również, iż komórki OVP 10 cechuje nieobecność kaspazy 3, co może być istotnym czynnikiem warunkującym ich oporność na anoikis. Otrzymane wyniki wnoszą nowe informacje dotyczące przeżywania komórek w warunkach nieadhezyjnych. Pozwalają lepiej zrozumieć mechanizmy oporności komórek na apoptozę indukowaną przez utratę kontaktu z podłożem.

Słowa kluczowe: adhezja, anoikis, mitochondria.

WSTĘP

Śmierć komórek, podobnie jak proliferacja, jest naturalnym procesem fizjologicznym, który zachodzi w każdym organizmie. Komórki umierają zarówno w okresie embriogenezy, jak i w dorosłym organizmie (np. komórki nabłonkowe, dojrzewające komórki krwiotwórcze, czy komórki z uszkodzonym DNA). Szczególną odmianą apoptozy jest śmierć komórki w wyniku utraty kontaktu z podłożem. Ten rodzaj śmierci komórek został nazwany *anoikis* [1, 2]. *Anoikis* spowodowane jest zaburzeniem oddziaływań komórka – macierz zewnątrzkomórkowa. Zmiany komórki, jakie są następstwem utraty kontaktu z podłożem są takie same, jak w przypadku śmierci apoptotycznej. Istnienie zjawiska *anoikis* wskazuje, iż adhezja wpływa na przeżywanie lub śmierć komórek. Dla komórek zależnych od przylegania (ang. *anchorage dependent*) zjawisko adhezji do ECM warunkuje ich przeżywanie w warunkach braku dostępu czynników troficznych [3]. Rytomaa i wsp. [4] dowiedli, że oderwanie komórek od macierzy zewnątrzkomórkowej indukuje w nich *anoikis*. Autorzy wskazują, iż utrata adhezji powoduje uwolnienie cytochromu c z mitochondrium, a proces ten może być blokowany przez inhibitory kaspaz. Wykazano również, iż oderwanie komórek wpływa na uaktywnienie białka BAX. *Anoikis* w warunkach *in vivo* sprawia, iż komórki oderwane od podłoża nie są zdolne do ponownego zagnieżdżenia i do wzrostu ektopowego. W komórkach nowotworowych, na skutek zmian w charakterystyce białek adhezyjnych uczestniczących w oddziaływaniach komórka-komórka, zmian dotyczących integryn, jak również białek regulatorowych apoptozy dochodzi do ujawnienia oporności na *anoikis*. Zmniejszona wrażliwość na *anoikis* ułatwia przeżywanie komórek w warunkach braku adhezji, co z kolei determinuje fenotyp inwazyjny tych komórek i rozwój choroby. W niniejszej pracy podjęto próbę kontynuowania badań dotyczących mechanizmów przeżywania komórek w warunkach braku adhezji. We wcześniejszej pracy [5] wykazano, iż oporność komórek nowotworowych na *anoikis* może być związana z niezależną od adhezji ekspresją białka FAK. W bieżącej pracy szczególną uwagę zwrócono na transdukcję sygnału apoptotycznego związanego z mitochondriami, stąd badano białka rodziny BCL, cytochrom c, kaspazy. Część badań poświęcono również wstępnym analizom wpływu braku adhezji na mechanizmy naprawy DNA komórek. Otrzymane wyniki wnoszą nowe informacje dotyczące przeżywania komórek w warunkach nieadhezyjnych. Pozwalają lepiej zrozumieć mechanizmy oporności komórek nowotworowych na apoptozę zależną od adhezji.

Crucial steps of the development of malignant cells include their ability to survive in non-adherent conditions. These cells can separate from solid tumors and escape from anoikis. The anoikis resistant cells do not undergo apoptosis induced by the loss cell to cell or cell to extracellular matrix contacts and may then be disseminated in the whole organism. The survival of neoplastic cells in the blood stream determines their potential ability to produce secondary tumors. The main aim of this work was to study cell survival in non-adherent conditions. Some aspects of the mitochondrial dependent apoptosis and DNA repair of the adherent and non-adherent tumor and normal cells were evaluated. The human ovarian cancer cell line, OVP 10 and human urothelial cell line, HCV-29 were used in all experiments. The studies were performed on adherent and non-adherent cells in a relatively short period of time after detachment. In contrast to non-adherent HCV-29 cells, the non-adherent OVP 10 cells revealed the ability to translocate cytochrom c protein from mitochondrion to cytoplasm. It is worth underlining that OVP 10 cells did not reveal the presence of caspase 3 protein. These findings may explain the low percentage of apoptosis in non-adherent OVP 10 cells as described previously [5]. It has also been shown that non-adherent HCV-29 cells expressed the DNA double-strand break repair protein (Rad51) weaker than adherent ones, whereas the DNA mismatch repair protein (MSH-2) was of the same in the same level. The present results give new information concerning anoikis and extend knowledge about biology of tumor cells and mechanisms of metastasis formation.

Key words: adhesion, anoikis, mitochondria.

MATERIAŁ I METODY

Hodowla komórkowa – linie komórkowe: OVP 10 i HCV-29

Badania przeprowadzono na ludzkich liniach komórkowych: OVP 10 oraz HCV-29. Linia OVP 10 została wyprowadzona z wysięku raka jajnika [6], natomiast komórki HCV-29 pochodziły z nabłonka przejściowego pęcherza moczowego [7]. Komórki były hodowane w pożywce Eagle'a z dodatkiem 10 proc. surowicy oraz antybiotyków: penicyliny 100 jednostek/1 ml i streptomycyny 0,4 mg/1 ml w atmosferze 5 proc. CO_2 i 90 proc. wilgotności, w temp. 37°C. Hodowlę prowadzono na 160 mm płytkach do momentu prawie całkowitego pokrycia dna płytki przez komórki. Wówczas komórki przepłukiwano PBS i hodowano dalej przez 24 godz. w medium bez surowicy. Komórki przepłukiwano PBS i przechowywano do czasu eksperymentów w temp. -70°C. Ponieważ badania prowadzono również na komórkach określanych dalej jako *nieadhezyjne*, toteż po 24 godz. inkubacji w nieobecności surowicy, część z nich pozbawiono adhezji. W tym celu komórki trypsynizowano (trypsyna 0,25 proc.) zdrapywano z płytek używając *cell scrape'a*, a następnie po kilku płukaniach w PBS, zawieszano w płynie hodowlanym Eagle'a. Tak przygotowane zawiesiny inkubowano przez 4 godz. w warunkach hodowlanych na kołysce laboratoryjnej. Po 4 godz. inkubacji zbierano komórki. Materiał przechowywano w temp. -70°C.

Izolacja białek

Osad komórek zawieszano w buforze lizującym o następującym składzie: 10 mM TrisHCl pH 7,5; 1 proc. NP40; 0,5 proc. deoksycholan sodu; 0,1 proc. SDS z dodanymi przed użyciem inhibitorami proteaz: 30 μl/ml aprotynina; 1 mM ortowanadian sodu; 5 μg/ml pepstatyna A; 10 μg/ml leupeptyna; 100 μg/ml PMSF. Zawiesinę komórek inkubowano w 4°C przez 30 min i wirowano przez 20 min przy 12 500 rpm. Supernatanty przenoszono do nowych probówek. Stężenie białka oznaczano metodą Lowry'ego [8] wykorzystując procedurę i odczynniki firmy BioRad. Widmo absorpcyjne analizowano przy długości fali 750 nm. Do pomiarów wykorzystano spektrofotometr typu Beckman Du-65. Stężenie białek obliczono na podstawie sporządzonej wcześniej krzywej kalibracyjnej.

Izolacja frakcji mitochondrialnej i cytozolowej

Komórki lizowano w buforze S [9] (15 mM Tris pH 7,6, 0,25 mM sacharoza, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 2,5 μg/ml aprotynina, 10 μg/ml leupeptyna, 0,5 mM PMSF, 0,1 mM ortowanadian sodu, 2 mM pirofosforan sodu, 1,25 μg/ml pepstatyna) przez 30 min w lodzie. Wirowano następnie w 4°C, przy 700 rpm przez 10 min. Supernatant przeniesiono do nowych probówek i wirowano w 4°C, w 13 500 rpm przez 20 min uzyskując w osadzie frakcję mitochondrialną (Mt), zaś w supernatancie fazę cytoplazmatyczną (C). Frakcję Mt zawieszono w buforze S.

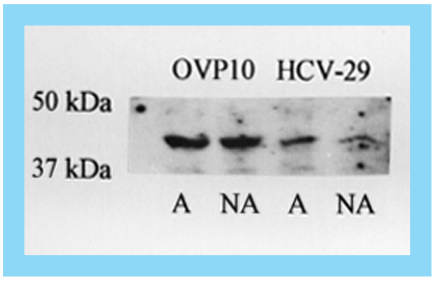
Western blotting

Białkowe ekstrakty poddano analizie metodą Western blotting. W tym celu po określeniu stężenia białka całkowitego w próbie przystąpiono do przeprowadzenia rozdziału elektroforetycznego, a następnie elektrotransferu białek z żelu na błonę nitrocelulozową. Rozdział wykonano w żelu poliakrylamidowym: 4 proc. żelu zagęszczającym i 12 proc. żelu rozdzielającym. Próby mieszano z buforem SDS (0,185 M. TrisHCl pH 6,8; 14,8 proc. glicerol; 4,44 proc. SDS; 7,41 proc. 2-merkaptoetanol; 0,015 błękit bromofenolowy) w stosunku 1:1 i gotowano 1–2 min. Nanoszono po 50 μg białka do studzienki. Elektroforezę przepro-

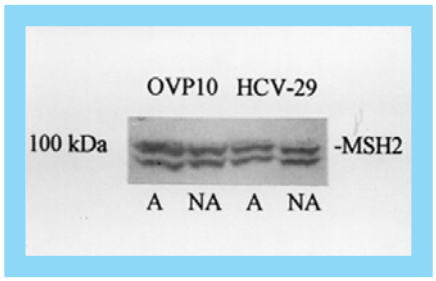
wadzono w temperaturze pokojowej. Następnie przystąpiono do elektrotransferu. Proces przeprowadzono w buforze do elektrotransferu (48 mM Tris pH 9,2, 39 mM glicyna, 20 proc. metanol) w 4°C. Blotowano na filtr nitrocelulozowy Hybond-ECL firmy Amersham 60 min przy napięciu 100 V (aparat do blotowania BioRad). Stężenia przeciwciał: I-rzędowe (100–200 μg/ml) rozcieńczano 100–200 razy; II-rzędowe (200 μg/0,5 ml) rozcieńczano 2 000 razy. Błonę blokowano 5 proc. mlekiem, następnie po przepłukaniu PBST inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi godzinę (anty-blc-2, anty-bax, anty-cytochrom c-Santa Cruz; anty-rad51, anty-msh-2 – Oncogene). Przepłukiwano PBST i inkubowano z przeciwciałami II-rzędowymi (Santa Cruz). Do detekcji metodą chemiluminescencji zastosowano odczynniki firmy Amersham. Po kolejnym płukaniu w PBST błonę inkubowano minutę z odczynnikami A i B do detekcji, według zaleceń producenta. Kliszę naświetlano 1–3 min, wywoływano, płukano w wodzie i utrwalano w utrwalaczu.

WYNIKI

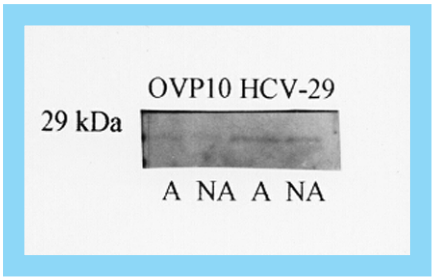
Badanie wpływu utraty adhezji na naprawę DNA w komórkach OVP 10 i HCV-29 – analiza białek RAD51 i MSH-2



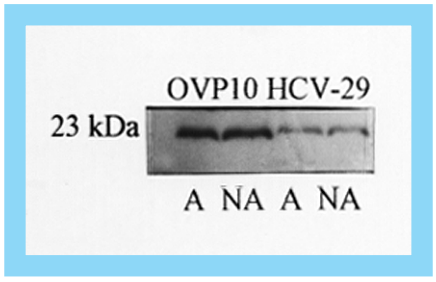
Ryc. 1. Występowanie białka Rad51 w komórkach adhezyjnych i nieadhezyjnych linii OVP 10 i HCV-29 badano metodą Western blotting. A – komórki adhezyjne, NA – komórki nieadhezyjne; Rad51 – 41 kDa



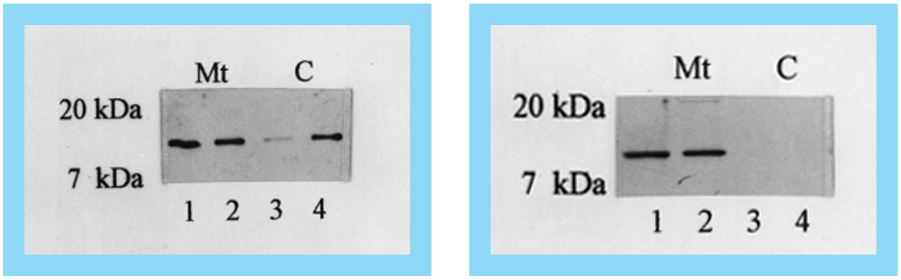
Ryc. 2. Występowanie białka MSH-2 w adhezyjnych i nieadhezyjnych komórkach OVP 10 i HCV-29 – Western blotting. A – komórki adhezyjne, NA – komórki nieadhezyjne; MSH-2 – 100 kDa



Ryc. 3. Białko Bcl-2 w adhezyjnych i nieadhezyjnych komórkach OVP 10 i HCV-29 – Western blotting. A – komórki adhezyjne, NA – komórki nieadhezyjne; Bcl-2 – 29 kDa



Ryc. 4. Białko Bax w adhezyjnych i nieadhezyjnych komórkach OVP i HCV-29 – Western blotting. A – komórki adhezyjne, NA – komórki nieadhezyjne; Bax – 23 kDa



Ryc. 5. (a, b). Cytochrom c we frakcji mitochondrialnej i cytozolowej adhezyjnych i nieadhezyjnych komórek OVP 10 (a) i HCV-29 (b). 1 i 3 – komórki adhezyjne, 2 i 4 – komórki nieadhezyjne; Mt – frakcja mitochondrialna; C – frakcja cytozolowa. Cytochrom c – ok. 13 kDa

W celu sprawdzenia czy brak adhezji powoduje uszkodzenia DNA w komórkach OVP 10 i HCV-29, badano ekspresję białek uczestniczących w naprawie DNA. Analizowano białka biorące udział w naprawie podwójnoniciowych pęknięć DNA (RAD51) i usuwaniu błędnie sparowanych zasad (MSH-2). O ile w przypadku białka MSH-2 nie są zauważalne różnice w jego ekspresji między komórkami adhezyjnymi i nieadhezyjnymi obu linii komórkowych, to ekspresja białka RAD51 jest niższa w komórkach nieadhezyjnych HCV-29 niż w adhezyjnych HCV-29, zaś w komórkach OVP 10-adhezyjnych i nieadhezyjnych – pozostaje na takim samym poziomie. Na podstawie powyższych danych można jedynie przypuszczać, iż dla komórek HCV-29 utrata adhezji do podłoża może ujawniać się również w zaburzeniu naprawy DNA tych komórek. Wyniki badań przedstawiają ryc. 1. i 2.

Badanie wpływu adhezji na proapoptotyczny szlak mitochondrialny w komórkach OVP 10 i HCV-29 – ekspresja białek BCL-2, BAX, Cytochrom c, Kaspaza 3

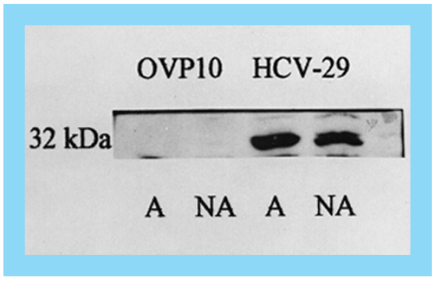
Poszukując mechanizmów odpowiedzialnych za przeżywanie komórek w warunkach braku adhezji zwrócono uwagę na szlaki transdukcji sygnału apoptotycznego, który wiązany jest z mitochondriami. Stąd w komórkach adhezyjnych i nieadhezyjnych obu linii komórkowych charakteryzowano białka rodziny BCL, cytochrom c oraz kaspazę 3. Wyniki pokazano na ryc. 3.–6.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Zdolność komórek nowotworowych do przeżywania w krwiobiegu jest jednym z głównych czynników, które sprzyjają tworzeniu wtórnego ogniska nowotworzenia, czyli przerzutu. Inwazja komórek nowotworowych przez bariery macierzy zewną-

trzkomórkowej wymaga adhezji komórek do śródbłonka, sekrecji enzymów proteolitycznych, uruchomienia mechanizmów sprzyjających migracji komórek, wiąże się zatem z aktywacją określonych kaskad wewnątrzkomórkowych reakcji [10, 11]. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych na dwóch ludzkich liniach komórkowych – OVP 10 – linii komórek raka jajnika oraz HCV-29, która została wyprowadzona z komórek nabłonka przejściowego pęcherza moczowego. We wcześniejszej pracy [5] wykazano, iż komórki OVP 10 w przeciwieństwie do komórek linii HCV-29 ujawniają fenotyp komórek wyraźnie niezależny od zakotwiczenia (ang. *anchorage independent*). Badania odsetka komórek apoptotycznych wykazały, iż oderwanie od podłoża jest istotnym czynnikiem indukującym apoptozę wśród komórek HCV-29, które barwione odczynnikiem Hoechsta wykazały ok. 3–4-krotnie wyższą liczbę komórek apoptotycznych niż komórki OVP 10. Również procent komórek TUNEL pozytywnych był wyraźnie wyższy dla komórek HCV-29 [5]. Tak znaczące różnice w oporności komórek na *anoikis* wiązano głównie z ekspresją białka FAK. Komórki OVP 10 eksprymowały FAK niezależnie od adhezji, zaś w komórkach HCV-29 FAK był obecny jedynie w warunkach adhezyjnych [5]. Nieobecność FAK w komórkach HCV-29 pozbawionych adhezji sugerowała potranslacyjne modyfikacje FAK, ponieważ mRNA dla genu *FAK* stwierdzono w komórkach HCV-29 zarówno adhezyjnych, jak i nieadhezyjnych [5]. Niniejsza praca jest kontynuacją badań dotyczących mechanizmów przeżywania komórek w warunkach braku adhezji. Skądinąd wiadomo [5], iż w warunkach pozbawienia adhezji nie dochodzi do aktywacji transkryptów genów *P21* i *GADD45.* Wobec tego można przypuszczać, iż najprawdopodobniej śmierć komórek nieadhezyjnych obu linii – a zwłaszcza HCV-29 – nie jest związana z uszkodzeniem DNA i zatrzymaniem komórek w cyklu. W celu sprawdzenia czy rzeczywiście brak adhezji nie powoduje uszkodzeń DNA w komórkach OVP 10 i HCV-29, w niniejszej pracy badano ekspresję białek uczestniczących w naprawie DNA. Analizowano białka biorące udział w naprawie podwójnoniciowych pęknięć DNA (RAD51) i usuwaniu błędnie sparowanych zasad (MSH-2). O ile w przypadku białka MSH-2 nie są zauważalne różnice w jego ekspresji między komórkami adhezyjnymi i nieadhezjnymi obu linii komórkowych (ryc. 2.), to ekspresja białka RAD51 jest niższa w komórkach nieadhezyjnych HCV-29 niż w adhezyjnych HCV-29, zaś w komórkach OVP 10 – adhezyjnych i nieadhezyjnych – pozostaje na takim samym poziomie (ryc. 1.). Można zatem przypuszczać, iż oderwanie komórek HCV-29 od podłoża może wpływać na zaburzenia naprawy DNA w tych komórkach.

Rozważając różne mechanizmy, które mogą ułatwiać przeżywanie komórek w warunkach braku adhezji zwrócono również uwagę na szlaki transdukcji sygnału apoptotycznego, który obejmuje czynniki związane bezpośrednio lub pośrednio z mitochondriami. Wielu badaczy podkreśla zdolność białka BAX do zwiększania przepuszczalności błon mitochondrialnych. Następstwem tego procesu może być translokacja cytochromu c do cytoplazmy i aktywacja apoptotycznych prokaspaz efektorowych, w tym i prokaspazy 3 [12–14]. Rytomaa i wsp. [4] dowiedli, iż oderwanie komórek od podłoża powoduje uwolnienie cytochromu c z mitochondrium do cytoplazmy i indukuje w tych komórkach proces apoptotyczny. W niniejszej pracy wykazano, iż niespodziewanie komórki HCV-29 cechuje niższa ekspresja białka BAX niż komórki OVP 10 (ryc. 4.). Badając natomiast cytochrom c we frakcji mitochondrialnej i cytozolowej komórek obu linii zauważono, że w przypadku komórek



Ryc. 6. Kaspaza 3 w adhezyjnych i nieadhezyjnych komórkach OVP i HCV-29 – Western blotting. A – komórki adhezyjne, NA – komórki nieadhezyjne; Kaspaza 3 – 32 kDa

OVP 10 oderwanie od podłoża powoduje translokację cytochromu c do cytoplazmy, zaś we frakcji cytozolowej nieadhezyjnych komórek HCV-29 nie stwierdzono obecności tego białka (ryc. 5a.–b.). Powyższe wyniki wydają się sugerować, iż w przypadku pozbawienia adhezji uwolnienie cytochromu c jest bardziej widoczne w komórkach OVP 10 niż HCV-29. Jednakże jak dalej wykazano komórki te nie posiadają kaspazy 3 (ryc. 6.), dlatego proces apoptotyczny wynikający z uwolnienia cytochromu c do cytoplazmy nie może być dalej realizowany. Można także wnioskować, iż dla komórek HCV-29 czynnikiem strategicznym dla przeżycia jest kontakt z podłożem i ekspresja FAK. Są one bardziej zależne od zakotwiczenia niż OVP 10, dlatego adhezja determinuje w sposób bezpośredni oporność tych komórek na *anoikis* [5]. W pracy badano także białko BCL-2 w komórkach OVP 10 i HCV-29. Wykazano wyższą jego ekspresję w komórkach HCV-29 niż OVP 10 (ryc. 3.). W świetle wielu danych literaturowych o proproliferacyjnym i antyapoptotycznym charakterze tego białka uzyskano w ten sposób nieco zaskakujący wynik. Warto jednak wspomnieć, iż dosyć niedawno zostały opublikowane przez Saintigny i wsp. [15] dane, które wskazują, iż białko BCL-2 może również hamować procesy rekombinacji kierowane przez RAD51. Można – z dużym jednak przybliżeniem – wiązać te informacje i wnioskować, iż wyższa ekspresja BCL-2 w HCV-29 pozostaje w związku z wykazaną wcześniej

niską ekspresją RAD51 w tych komórkach.

Otrzymane w tej pracy wyniki wnoszą nowe informacje dotyczące biologicznych procesów uczestniczących w zachowaniu komórek w warunkach nieadhezyjnych. Praca uwidacznia możliwy mechanizm oporności komórek nowotworowych (OVP 10 – rak jajnika) na apoptozę zależną od adhezji. Utrata zdolności do przylegania inicjuje w komórkach OVP 10 szereg procesów proapoptotycznych – uwalniany jest m.in. cytochrom c z mitochondrium do cytoplazmy, jednak charakterystyczna dla tych komórek nieobecność białka efektorowego – kaspazy 3 sprawia, iż dalsze, wykonawcze etapy apoptozy są utrudnione. W tym świetle, wykazana wcześniej wysoka oporność komórek OVP 10 na *anoikis* [5] wydaje się być lepiej wytłumaczalna.

PIŚMIENNICTWO

1. Assioan RK. *Anchorage – dependent cell cycle progression. Mini-review.* J Cell Biology 1997; 136: 1-4.
2. Janik P, Małecki M. *The homeless tumor cells.* Adv Clin Exp Med 2000; 9: 103-6.
3. Ilić D, Almeida EA, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, Damsky CH. *Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase* suppress *p53-mediated apoptosis.* J Cell Biol 1998; 143: 547-60.
4. Rytomaa M, Lehmann K, Downward J. *Matrix detachment induces caspase-dependent cytochrome c release from mitochondria: inhibition by PKB/Akt but not Raf signalling.* Oncogene 2000; 9: 4461-8.
5. Małecki M, Soroczyńska P, Janik P. *Badania mechanizmu przeżywania komórek w warunkach braku adhezji.* Wspóczesna Onkologia 2000; 4: 51-4.
6. Szaniawska B, Gawrychowski K, Janik P. *The effect of protein kinase c inhibitors on invasion of human ovary cancer cells.* Neoplasma 1998; 45: 7-11.
7. Christensen B, Kieler J, Vilien M, Dong P, Wang CY, Wolf H. *A classification of human urothelial cells propagated in vitro.* Anticancer Res 1984; 4: 319-38.
8. Lowry CH, Rosenbrough MR, Randall RJ. *Protein measurment with the Folin phenol reagent.* J Biol Chem 1951; 193: 265-75.
9. Siesjo BK, Hu B, Kristian T. *Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum?* J Cereb Blood Flow Metab 1999; 19: 19-26.
10. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. *Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.* Cell 1991; 64: 327-36.
11. Bohle AS, Kalthoff H. *Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis.* Langenbeck's Arch Surg 1999; 384: 133-40.
12. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.* Cell 1993; 74: 609-19.
13. Green DR., Reed JC. *Mitochondria and apoptosis.* Science 1998; 281: 1309-12.
14. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC.* Nature 1999; 399: 483-7.
15. Saintigny Y, Dumay A, Lambert S, Lopez BS. *A novel role for the Bcl-2 protein family: specific suppression the RAD51 recombination pathway.* EMBO J 2001; 20: 2596-607.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr med. Maciej Małecki
Zakład Biologii Komórki
Centrum Onkologii – Instytut
im. M. Skłodowskiej-Curie
ul. Roentgena 5
02-781 Warszawa
tel. 0 (prefiks) 22 546 26 21
e-mail: mahan@poczta.wp.pl

Autor jest stypendystą
Fundacji na rzecz
Nauki Polskiej 2002 i 2003