

Przyleganie komórek do podłoża pełni istotną rolę w ich wzroście, różnicowaniu, migracji czy apoptozie. Celem niniejszej pracy była próba poznania mechanizmów warunkujących przeżywanie komórek w warunkach braku adhezji. Badania przeprowadzono na dwóch ludzkich liniach komórkowych: OVP 10 (komórki raka jajnika) oraz HCV-29 (komórki nabłonka przejściowego pęcherza moczowego). Do badań używano komórek rosnących *in vitro* w warunkach adhezji oraz kultywowanych na czas eksperymentu w formie zawiesiny. Procent komórek apoptotycznych wydaje się być w związku z ekspresją focal adhesion kinase (FAK). Technika Western Blotting wykazano m. in. obecność FAK w adhezyjnych i pozbawionych adhezji komórkach linii OVP 10. W przypadku linii HCV-29 FAK był obecny jedynie w komórkach adhezyjnych. Obecność transkryptów mRNA w obu przypadkach (adhezyjne i pozbawione adhezji), sugerować może potranslacyjne modyfikacje tej kinazy.

Słowa kluczowe: adhezja, transdukcja sygnału, apoptoza

Cell adhesion to the extracellular matrix (ECM) triggers a cascade of intracellular signalling pathways initiated by a family of integrin receptors. These receptors activate FAK, Ras and MAP kinase cascades to regulate a variety of cellular functions, such as cell proliferation, adhesion, migration and apoptosis. Adhesion of anchorage dependent cells to the ECM is thought to be the crucial factor for their survival. Many tumour cell lines are anchorage dependent, although not to the same degree as normal cells. In this work we were interested in the mechanism of cell survival in non adherent conditions. We investigated some aspects of signal transduction in adherent and non adherent cells of different origin. The cell lines were human ovarian carcinoma cell line (OVP 10) and human urothelial cell line (HCV-29). We found new information on anchorage-independent behaviour in cells of different origin.

Key words: adhesion, signal transduction, apoptosis

Badania mechanizmu przeżywania komórek w warunkach braku adhezji

Study of cell survival in non adherent conditions

Maciej Małecki, Paulina Sroczyńska, Przemysław Janik

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

WSTĘP

Adhezja komórek do podłoża – macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) – odgrywa kluczową rolę w wielu procesach biologicznych, np. we wzroście komórek, ich różnicowaniu, migracji czy apoptozie. Komórki prawidłowe po utracie kontaktu z podłożem przestają proliferować i giną na drodze śmierci apoptotycznej – *anoikis* [1]. Komórki nowotworowe natomiast cechuje częściowe uniezależnienie się od adhezji (ang. *anchorage independence*). Dzięki tej właściwości mogą one przeżywać w krwiobiegu oraz w wysiękach otrzewnowych. Adhezja komórek do podłoża inicjuje kaskadę wewnątrzkomórkowych reakcji; dochodzi wtedy do aktywacji białek strategicznych dla przewodzenia sygnału z ECM przez integryny do jądra komórkowego. Konieczne należy tu wymienić szereg białek, takich jak FAK, Ras, MAP. W procesie karcinogenezy funkcję obecności, aktywności tych białek w komórkach prawidłowych i nowotworowych można sprowadzić do próby szukania mechanizmów odpowiedzialnych za regulację wzrostu i rozsięgu nowotworu, które decydują o adaptacji komórek nowotworowych do warunków o ograniczonej formule przylegania. Obserwujemy to m.in. w krwiobiegu, podczas przedostawania się komórek nowotworowych oraz w wysiękach otrzewnowych.

Celem naszych doświadczeń była charakterystyka zachowania się komórek no-

wotworowych i prawidłowych w eksperymentalnych warunkach braku adhezji. Praca miała odpowiedzieć na pytanie, w jakim stopniu pozbawienie komórek możliwości bezpośredniego przylegania do podłoża wpłynie na ich przeżywalność i jaki jest tego mechanizm.

MATERIAŁ I METODYKA

Komórki oraz warunki hodowlane

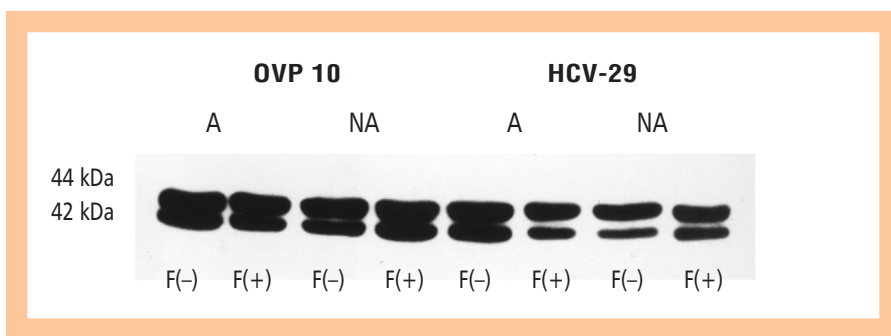
Badania zostały przeprowadzone na dwóch ludzkich liniach komórkowych: OVP 10 oraz HCV-29. Linia OVP 10 została wywodząca z wysięku w przebiegu raka jajnika [2], natomiast komórki HCV-29 pochodzą z nabłonka przejściowego pęcherza moczowego [3]. Komórki były hodowane w pożywce Eagle'a z dodatkiem 10 proc. surowicy oraz antybiotyków: penicyliny 10 000 jednostek/100 ml i streptomycyny 40 mg/100 ml w atmosferze 5 proc. CO₂ i 90 proc. wilgotności w 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 nieobecności surowicy. Następnie komórki płukano PBS i inkubowano je 4 godziny w obecności i przy braku fibronektyny (1 µg/ml). Badania prowadzono również na komórkach określanych dalej jako pozbawione adhezji, toteż po 24 godz. inkubacji w nieobecności surowicy,

Tab. 1. Odsetek komórek apoptotycznych po 4-godzinnej inkubacji w zawiesinie, określonych barwieniem odczynikiem Hoechst. FCS (+) – komórki inkubowano w obecności surowicy; FCS (-) – komórki inkubowano w nieobecności surowicy; FCS (-) F – komórki inkubowano w nieobecności surowicy i stymulowano fibronektyną. Eksperymenty przeprowadzono w 4 powtórzeniach

Warunki inkubacji	Linia komórkowa	
	HCV-29	OVP 10
FCS (+)	4,8±2,2	1,4±0,4
FCS (-)	6,0±3,0	1,3±0,2
FCS (-) F	6,1±4,2	1,4±0,3

Tab. 2. Odsetek komórek apoptotycznych po 4-godzinnej inkubacji w zawiesinie, oznaczonych metodą TUNEL. FCS (+) – komórki inkubowano w obecności surowicy; FCS (-) – komórki inkubowano w nieobecności surowicy; FCS (-) F – komórki inkubowano w nieobecności surowicy i stymulowano fibronektyną. Eksperymenty przeprowadzono w 3 powtórzeniach

Warunki inkubacji	Linia komórkowa	
	HCV-29	OVP 10
FCS (+)	29,0±1,0	3,0±1,1
FCS (-)	24,0±5,0	2,7±0,9
FCS (-) F	23,0±3,0	2,8±0,4



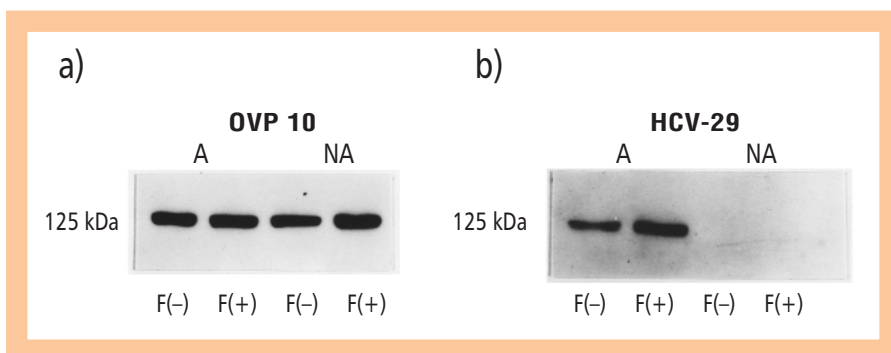
Ryc. 1. Badania białek ERK 1/2. Obecność ERK 1/2 w komórkach OVP 10 i HCV-29 (42 / 44 kDa) wykazano techniką Western Blotting

A – komórki kulturowane w warunkach adhezyjnych,

NA – kultywacja w warunkach nieadhezyjnych,

F (+) – inkubacja w obecności fibronektyny,

F (-) – inkubacja bez fibronektyny



Ryc. 2. Badania białka FAK:

a) FAK (125 kDa) obecny w komórkach OVP 10 adhezyjnych (A), jak i nieadhezyjnych (NA),

F (+) – inkubacja w obecności fibronektyny,

F (-) – inkubacja bez fibronektyny,

b) FAK (125 kDa) obecny w komórkach HCV-29 jedynie w wariancie adhezyjnym (A). W komórkach nieadhezyjnych (NA) poza możliwością detekcji techniką Western Blotting,

F (+) – inkubacja w obecności fibronektyny,

F (-) – inkubacja bez fibronektyny

komórki przepłukiwano PBS, następnie – po 3-minutowej trypsynizacji, którą inaktywowano surowicą – komórki były mechanicznie zdrapywane z płytek przy użyciu *cell scrape*. Po kilku płukaniach w PBS, komórki zawieszano w płynie hodowlanym Eagle'a, z fibronektyną i bez fibronektyny. Tak przygotowane zawiesiny inkubowano następnie przez 4 godz. w warunkach hodowlanych na laboratoryjnej kołyszce. Komórki adhezyjne – przylegające, jak i nieadhezyjne – inkubowane w zawiesinie, zbierano po 4 godz. inkubacji. Materiał przechowywano w -70°C .

Określanie odsetka komórek apoptotycznych

Odsetek komórek apoptotycznych po 4-godzinnej inkubacji w warunkach braku przylegania określono poprzez barwienie fluorescencyjnym odczynnikiem Hoechst lub metodą TUNEL. Pierwszy sposób polegał na tym, że komórki po naniesieniu na szkiełko podstawowe utrwalono w płynie Carnoy'a i barwiono przez 5 min w 0,5 proc. roztworze barwnika Hoechst. Preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym, określając odsetek komórek apoptotycznych na podstawie zliczania co najmniej 500 komórek.

Do badań metodą TUNEL, komórki na szkiełkach podstawowych utrwalono 1 proc. roztworem formaliny. Po przeprowadzeniu reakcji z terminalną transferazą znakowaną dioksygeniną stosowano przeciwciała antydioksygeninowe skoniugowane z peroksydazą. Barwne reakcje otrzymywano po dodaniu substratu, jakim był DAB. Preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym zliczając co najmniej 500 komórek. Wykonywano 4 powtórzenia.

Western Blotting

Białkowe ekstrakty z komórek OVP 10 i HCV-29 poddano analizie metodą Western Blotting. Wykorzystano przeciwciała przeciw FAK i ERK 1/2 firmy Santa Cruz. Na żel nanoszono po 50 μg białka do studzienki. Elektroforezę przeprowadzono w temp. pokojowej. Następnie przystąpiono do elektrotransferu. Blotowano na filtr nitrocelulozowy Hybond-ECL firmy Amersham 60 min przy napięciu 100 V (aparatus do blotowania BioRad). Przeniesione na błonę nitrocelulozową białka identyfikowano, używając przeciwciał pierwszorzędowych (antyFAK, antyERK) i drugorzędowych, skoniugowanych z peroksydazą

chrzanową. Stężenia przeciwciał: I-rzędowe (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) rozcieńczano 100 razy; II-rzędowe (200 $\mu\text{g}/0,5\text{ ml}$) rozcieńczano 2000 razy. Błonę blokowano 5 proc. mlekiem, następnie po przepłukaniu PBST inkubowano z przeciwciałami I-rzędowymi przez 1 godzinę. Przepłukiwano PBST i inkubowano z przeciwciałami II-rzędowymi. Do detekcji metodą chemiluminescencji zastosowano odczynniki firmy Amersham. Po kolejnym płukaniu w PBST błonę inkubowano z odczynnikami A i B do detekcji. Kliszę naświetlano ok. 3 min, wywoływano, płukano w wodzie i utrwalano w utrwalaczu.

RT-PCR

Wykorzystując własności odwrotnej transkryptazy z wyizolowanego RNA, przeprowadzono syntezę cDNA. Do syntezy cDNA, jak i do późniejszej amplifikacji – PCR wykorzystano zestaw firmy GIBCOBRL. Do syntezy wykorzystano termocykler firmy PerkinElmer Typ 9600. Powstały cDNA posłużył następnie do przeprowadzenia reakcji PCR. Do tego celu wykorzystano następujące startery: dla FAK (produkt 1867 bp): sens: 5'- GACAGATACCTAGCATCTAGC-3'; antysens: 5'- CACACCATGCATCAGTATCTCCC-3'; dla p21 (produkt 385 bp): sens: 5'- GGCGGCAGACCAGCATGACAGATT-3'; antysens: 5'- ATGAAGCCGGCCACCCAACCTC-3'; dla GADD45 (produkt 396 bp): sens: 5'- GAGCGGCGCCTGTGAGTGAGTGC-3'; antysens: 5'- CGGCCCGGGTTGCTGACG -3'. PCR przeprowadzono w warunkach:

- ▶ 95°C, 5 min – wstępna denaturacja,
- ▶ 95°C, 1 min – właściwa denaturacja,
- ▶ 58°C, 1 min – etap przyłączenia startterów – 35 razy,
- ▶ 72°C, 1 min 15 sek – etap polimeryzacji,
- ▶ 72°C, 10 min – końcowa elongacja.

Powstałe produkty poddano analizie na 1,2 proc. żelu agarozowym. Elektroforezę przeprowadzono w buforze TAE. Żele płukano następnie przez 30 min w wodnym roztworze bromku etydydy (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Żele oglądano w świetle UV, fotografowano, używając filmów Polaroid Typ 665. Pozytywną kontrolą dla określania transkryptów p21 i GADD45 były komórki linii HCV-29 transfekowane wirusowym genem raf. Komórki te wykazują konstytutywną obecność transkryptu p21 i GADD45.

WYNIKI

Badania zostały przeprowadzone na dwóch ludzkich liniach komórkowych: OVP 10 – komórki raka jajnika (typ wysiękowy) oraz HCV-29 – komórki nabłonka przejściowego pęcherza moczowego. Wykorzystano komórki rosnące *in vitro* w warunkach adhezji oraz kultywowane na czas eksperymentu w formie zawiesiny.

Tabele 1. i 2. przedstawiają procent komórek apoptotycznych dwóch ludzkich linii komórkowych, kultywowanych w warunkach

nieadhezyjnych (zawiesina), określony odpowiednio metodą barwienia odczynnikiem Hoechst a metodą Tunel. Otrzymano stosunkowo niskie odsetki komórek apoptotycznych kultywowanych w warunkach nieadhezyjnych, szczególnie dla komórek OVP 10. Natomiast w przypadku komórek HCV-29, odsetek komórek apoptotycznych jest wyraźnie wyższy od otrzymanego dla komórek raka jajnika.

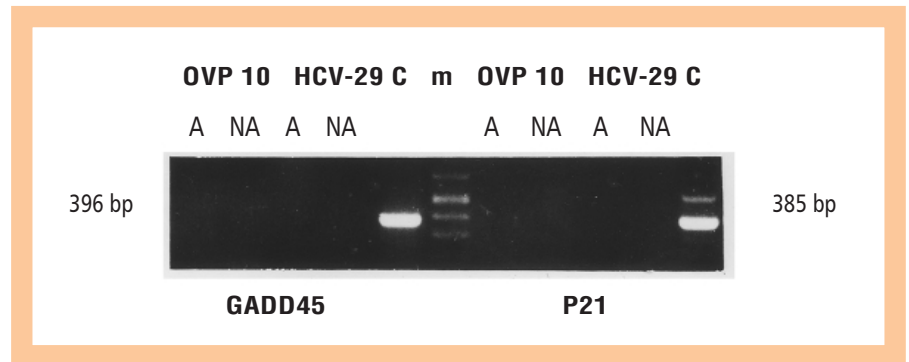
Techniką Western Blotting wykazano obecność ERK w adhezyjnych i pozbawionych adhezji komórkach linii OVP 10 i HCV-29 (ryc. 1.). W przypadku FAK, białko to było obecne w komórkach OVP w obu modelach (ryc. 2. a), zaś w komórkach HCV-29 jedynie w wariancie adhezyjnym (ryc. 2. b). Transkryptów p21 i GADD45 w obu liniach komórkowych nie stwierdzono (ryc. 3.). W celu wyjaśnienia potencjalnego mechanizmu warunkującego nieobecność FAK w pozbawionych adhezji komórkach HCV-29, badano obecność transkryptów (mRNA) FAK w komórkach HCV-29 metodą RT-PCR. W obu przypadkach (adhezyjne i pozbawione adhezji) stwierdzono obecność FAK mRNA (ryc. 4.), co sugerować może posttranslacyjną modyfikację białka FAK.

OMÓWIENIE

Zdolność komórek nowotworowych do przeżywania w krwiobiegu jest jednym z głównych czynników charakteryzujących ich fenotyp inwazyjny i tym samym sprzyja ona tworzeniu wtórnego ogniska nowotworzenia, czyli przerzutu [1, 4, 5].

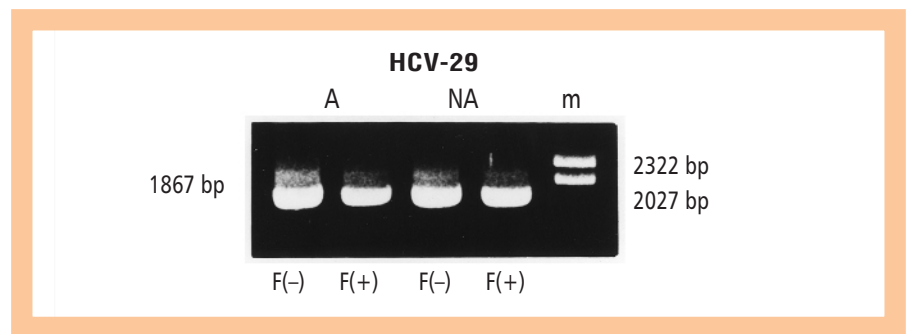
Przyjmując, iż podłożem jest macierz zewnątrzkomórkowa (fibronektyna, laminina, kolagen), a głównymi strukturami, które pozwalają odbierać sygnały z ECM są receptory integrynowe – zjawisko *anchorage independence* jest funkcją zmiany transdukcji sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej do i przez receptory integrynowe. Informacja o przyleganiu dociera do komórki za pośrednictwem właśnie tych receptorów [6]. Strategiczną funkcję w transmisji sygnału z ECM do jądra komórkowego pełni niereceptorowa kinaza tyrozynowa FAK. Wiele faktów przemawia za tym, iż FAK związany jest ze zjawiskami adhezji i pełni kluczową rolę w transdukcji sygnałów z receptora integrynowego [7]. Nadekspresja FAK w wielu typach nowotworów, w porównaniu z komórkami nietransformowanymi sugeruje, iż spadek ekspresji tego białka może mieć wpływ na proliferację komórek. Badania z użyciem antysensowych oligonukleotydów dla FAK wykazały, iż *wyciszenie* ekspresji FAK w komórkach indukuje w nich proces apoptozy [8].

Wykazano również, iż sygnał z macierzy zewnątrzkomórkowej przewodzony przez FAK hamuje w komórkach zależnych od zakotwiczenia proces apoptozy związany z p53 [9].



Ryc. 3. Badania transkryptów genów p21 i GADD45. Elektroforetyczny rozdziel produktów reakcji RT-PCR wykonanej z użyciem starterów dla p21 i GADD45.

A – kultywacja komórek w warunkach adhezyjnych,
NA – kultywacja komórek w warunkach nieadhezyjnych,
C – linia HCV-29/Raf, pozytywna pod względem p21 i GADD45,
m – marker [bp]



Ryc. 4. Badania transkryptów genu FAK. Transkrypt FAK (1836 bp) w komórkach HCV-29 adhezyjnych (A) i nieadhezyjnych (NA) wykazano metodą RT-PCR;

m – marker [bp];
F (+) – inkubacja w obecności fibronektyny;
F (-) – inkubacja bez fibronektyny

Obecne badania zostały przeprowadzone na dwóch różnych ludzkich liniach komórkowych. Komórki tych linii różnią się w sposób zasadniczy swoją *adhezyjnością*. Wynikać to może w części z rodowodu komórek. Linia OVP 10 została wyprowadzona z raka jajnika, którego komórki są przystosowane do życia w warunkach braku kontaktu z podłożem, zaś HCV-29 stanowią komórki nabłonka przejściowego pęcherza moczowego, silnie zależne od zakotwiczenia.

Badania komórek apoptotycznych wykazały, że w przypadku komórek HCV-29 ich odsetek wyraźnie wzrasta, nawet po krótkotrwałej hodowli w warunkach braku adhezji. Komórki OVP10 natomiast, po krótkim okresie kultywacji w formie zawiesiny, nie wykazują wzrostu odsetka komórek apoptotycznych.

Wyraźnie wyższy odsetek komórek apoptotycznych określanych metodą TUNEL (w porównaniu z otrzymanym z barwienia odczynnikiem Hoechst) wynika z różnej czułości metod. Na podstawie pierwszej z nich określa się nawet bardzo wczesne postacie uszkodzonego DNA, natomiast określanie komórek apoptotycznych metodą Hoechst opiera się na określaniu ciałek apoptotycznych będących różnym

objawem tego procesu. Tak więc na podstawie badań odsetka komórek apoptotycznych można powiedzieć, że komórki wywodzące się z raka jajnika charakteryzują się dużą opornością na pozbawienie adhezji.

Komórki HCV po utracie adhezji są wrażliwe na proces apoptotyczny. Obecność surowicy lub fibronektyny w medium nie zmienia w znaczący sposób ich wrażliwości na apoptozę. Komórka łączy się z podłożem poprzez szereg molekuł adhezyjnych. Na podstawie wielu badań [6, 10] można przypuszczać, że podstawową rolę w zjawisku adhezji komórek do podłoża odgrywają receptory integrynowe. Szlak transdukcji sygnału z tego receptora wiedzie poprzez *focal adhesion kinase* (FAK) do MAP kinazy, zwanej też ERK 1 i 2 [7, 10, 11]. W świetle ostatnich prac wynika, że do aktywacji wielu procesów życiowych, takich jak proliferacja, różnicowanie, wymagana jest koordynacja sygnałów wiodących z receptora dla czynników wzrostowych oraz receptora integrynowego – aktywacja FAK [1].

Przeprowadzone w tej pracy badania białek ERK metodą Western Blotting wykazały ich obecność niezależnie od rodzaju komórek, jak i charakteru manipulacji, jakim zosta-

ty one poddane. Badania FAK natomiast jednoznacznie wykazują brak tych białek w komórkach HCV-29 pozbawionych adhezji.

Równocześnie przeprowadzone zostały badania transkryptów genu kodującego FAK. Wykazały one obecność transkryptu tego genu w komórkach HCV-29, niezależnie czy były one adhezyjne, czy pozbawione adhezji. Wynik ten sugeruje potranslacyjną modyfikację białka FAK, które to zjawisko opisywane jest w literaturze jako wynik działania kaspaz i kalpain [12, 13].

Badania transkryptów genów p21, jak i GAAD45 wykazały, że w warunkach pozbawienia adhezji nie dochodzi do ich aktywacji. W takim razie można przypuszczać, że tor wiodący do śmierci apoptotycznej komórek HCV-29, nie jest związany z indukcją inhibitorów cyklu komórkowego.

Na podstawie przeprowadzonych w tej pracy badań można zakładać, że pozbawienie adhezji komórek HCV-29 prowadzi do zaniku FAK. Tym samym nie może być realizowany program aktywacji szlaków transdukcji sygnału, umożliwiający przeżycie komórki nawet w obecności czynników stymulujących, jak surowica czy też fibronektyna. Natomiast w przypadku komórek raka jajnika, utrata adhezji nie doprowadza do zaniku FAK i być może dzięki temu wykazują one żywotność i aktywność, np. kolagenolityczną [14].

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Nasze badania wskazują, iż zachowanie komórek, określony wzorzec transdukcji sygnału, zależą od pochodzenia i fenotypu ko-

mórek nowotworowych oraz od charakterystyki warunków kultuwacji. Wyniki uzyskane w tej pracy dostarczają informacji dotyczących mechanizmów przeżywania komórek nowotworowych w warunkach braku adhezji, np. w płynach wysiękowych lub w krwiobieg, podkreślając rolę *focal adhesion kinase* w przewodzeniu sygnału z macierzy zewnątrzkomórkowej do wnętrza komórki.

Podsumowując, można wskazać, iż ekspresja FAK w komórkach nowotworowych o rodowodzie wysiękowym nie jest zależna od adhezji, a w komórkach linii komórkowej wyprowadzonej bezpośrednio z komórek tkanki prawidłowej zależy od warunków kultuwacji komórek. Można zatem wnosić, iż FAK najprawdopodobniej pełni podstawową rolę w przeżywaniu komórek nowotworowych w warunkach braku adhezji.

PIŚMIENNICTWO

1. Assoian RK. *Anchorage – dependent cell cycle progression. mini-review.* J Cell Biology 1997; 136: 1-4.
2. 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.
3. 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.
4. Schwartz MA. *Integrins, oncogens, and anchorage independence.* J Cell Biol 1997; 139: 575-8.
5. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. *Tumor cell interaction with the extracellular matrix during invasion and metastasis.* Annu Rev Cell Biol 1998; 9: 541-73.
6. Clark EA, Brugge JS. *Integrin and signal transduction pathways: the road taken.* Science 1995; 268: 233-9.
7. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. *Signal transduction and signal modulation by cell*

adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. Pharmac Rev 1998; 50: 199-263.

8. Xu LH, Owens LV, Sturge GC, Yang X, Liu ET, Craven RJ, Cance WG. *Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells.* Cell Growth Differ 1996; 7: 413-8.
9. Ilija D, Almeida EAC, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, Damsky C. *Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis.* J Cell Biology 1998; 143: 547-60.
10. Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. *Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases.* Mol Cell Biol 1995; 15: 954-63.
11. Nishida E, Gotoh Y. *The map kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways.* Trends Biochem Sci 1993; 18: 128-31.
12. Cooray P, Yuan Y, Schoenwaelder SM, Mitchell CA, Salem HH, Jackson P. *Focal adhesion kinase (pp125FAK) cleavage and regulation by calpain.* Biochem J 1995; 318: 41-7.
13. Gervais FG, Thornberry NA, Ruffolo SC, Nicholson DW, Roy S. *Caspases cleave Focal Adhesion Kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polipeptyde.* J Biol Chem 1998; 273: 17102-8.
14. Malecki M, Trembacz H, Sroczyńska P, Janik P. *Signal transduction in adherent and non-adherent human cell lines after fibronectin stimulation.* Oncology Reports 2000; 7: 63-7.

ADRES DO KORESPONDENCJI

mgr **Maciej Malecki**
Zakład Biologii Komórki
Centrum Onkologii –
Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie
Roentgena 5
02-781 Warszawa

*Praca finansowana
z grantu KBN nr 4 PO5A 034 14.*