

Uloga signalnog puta dušikovog oksida u apoptozi uzrokovanoj patogenim hantavirusima

Ivan-Christian KUROLT, dipl. ing. biol.
znanstveni novak
Alemka MARKOTIĆ, doc. dr. sc., dr. med.,
specijalist infektologije

Klinika za infektivne bolesti
»Dr. Fran Mihaljević«, Zagreb

Ključne riječi

hantavirusi
apoptoza
virus Hantaan
virus Andes
signalni put NO

Key words

hantaviruses
apoptosis
Hantaan virus
Andes virus
NO signaling pathway

Primljeno: 2008-01-16

Received: 2008-01-16

Prihvaćeno: 2008-03-11

Accepted: 2008-03-11

Uvod

Hantavirusi roda *Hantavirus*, familije *Bunyaviridae* u Hrvatskoj i cijeloj Euroaziji uzrokuju hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom (HVBS), dok u Sjevernoj i Južnoj Americi izazivaju hantavirusni plućni sindrom (HPS) [1]. Dugo vremena smatralo se da ovi virusi nisu citopatogeni u stanicama *in vitro*, kao i da ne izazivaju citopatski učinak (CPE) u ljudi, kao ni u svojim prirodnim rezervoarima, malim glodavcima [2]. Tek smo 2003. godine dokazali da patogeni hantavirusi izazivaju CPE u

Znanstveni rad

Dugo se smatralo da hantavirusi nisu citopatogeni virusi. Tek smo nedavno dokazali da patogeni hantavirusi izazivaju citopatski učinak i apoptozu u staničnoj liniji humanih epitelnih stanica bubrega embrija (HEK293). Cilj našeg rada je bio na razini ekspresije gena istražiti ulogu signalnog puta dušikovog oksida (NO) pri apoptozi uzrokovanoj patogenim hantavirusima: Hantaan i Andes u HEK293 stanicama. Genska ekspresija je analizirana metodom GEArray (GEArray, Superarray Bioscience, Frederic, MD, SAD). Naši rezultati su pokazali važnost uloge unutarstaničnog puta apoptoze pri infekciji HEK293 stanica patogenim hantavirusima, a virus Andes je imao veći učinak na promjene u genskoj ekspresiji od virusa Hantaan. Promjene u ekspresiji gena: ABCC1, BNIP3, CCL5, GCLC, HSPA4, MYC, PRKDC, PRMT3, p11, SLC6A6, TFRC vjerojatno sudjeluju u složenoj interakciji pro- i anti-apoptotičkih mehanizama tijekom infekcije HEK293 stanica patogenim hantavirusima. U nastavku naših istraživanja potrebno je na razini proteina utvrditi molekule odgovorne za pokretanje unutarnjeg puta apoptoze, te moguću interakciju s vanjskim putem apoptoze.

The role of nitric oxide signaling pathway in apoptosis caused by pathogenic hantaviruses

Scientific paper

For a long time it was believed that Hantaviruses don't cause cytopathic effect (CPE). Only recently it was proved that pathogenic hantaviruses induce CPE and apoptosis in the human embryonic kidney cells (HEK293). The goal of our paper was to examine the nitric-oxide (NO) signaling pathway on the level of gene expression during apoptosis caused by pathogenic hantaviruses: Hantaan virus and Andes virus in HEK293 cells.

Gene expression was analyzed with a commercial DNA microarray. Our results showed the importance of the mitochondrial pathway of apoptosis in HEK293 cells infected with pathogenic hantaviruses, where Andes virus induced more changes in gene expression than Hantaan virus. Changes in gene expression: ABCC1, BNIP3, CCL5, GCLC, HSPA4, MYC, PRKDC, PRMT3, p11, SLC6A6, TFRC probably participate in the complex pro- and anti-apoptotic mechanisms during the infection of HEK293 with pathogenic hantaviruses. Further studies have to determine signal molecules of the mitochondrial pathway on the protein level and possible interactions with the extrinsic pathway.

staničnoj liniji humanih epitelnih stanica bubrega embrija (HEK293), te da je CPE posljedica procesa programirane stanične smrti – apoptoze [3]. Zadnjih desetak godina, rijetka *in vitro* i klinička istraživanja su pokazala da patogeni i apatogeni hantavirusi mogu uzrokovati apoptozu u različitim staničnim substratima, ali su mehanizmi apoptoze uzrokovane hantavirusima većim dijelom još uvijek nepoznati [4]. Dosadašnja istraživanja pokazuju da bi FAS-FASL put mogao imati ulogu u apoptozi uzrokovanoj apatogenim hantavirusima [5], te da ulogu u apoptozi može imati i stres endoplazmatskog retikuluma [6]. Naša pre-

liminarna istraživanja pokazuju moguću važnost unutarnjeg puta apoptoze pri infekciji patogenim hantavirusima [7]. U složenim procesima apoptoze razlikujemo vanjski put apoptoze tijekom kojeg vezivanjem različitih liganda na različite receptore smrti dolazi do aktivacije signalnog puta, poglavito preko kaspaze 8. Kod unutarnjeg puta, jedan od glavnih mehanizama je oštećenje membrane mitohondrija nakon čega dolazi do ispuštanja citokroma c, te posljedične aktivacije kaspaze 9 molekulom Apaf 1 [8].

Dušikov oksid (NO) može inducirati apoptozu, ali također molekule uključene u signalni put apoptoze mogu djelovati i na zaštitu stanica od apoptoze uzrokovane različitim stimulusima, uključujući i viruse [9].

Cilj našeg rada je bio na razini ekspresije gena istražiti ulogu signalnog puta NO pri apoptozi uzrokovanoj patogenim hantavirusima: Hantaan i Andes. Kao model su nam poslužile HEK293 stanice u kojima smo prethodno dokazali CPE uzrokovan hantavirusima. Analiza je rađena pet dana nakon infekcije stanica spomenutim virusima. Analiza genske ekspresije inficiranih stanica daje nam mogućnost analizirati veliki broj gena koji utječu na apoptozu. Ovo istraživanje nam može dati daljnje smjernice za istraživanja mehanizama apoptoze uzrokovane hantavirusima.

Materijal i metode

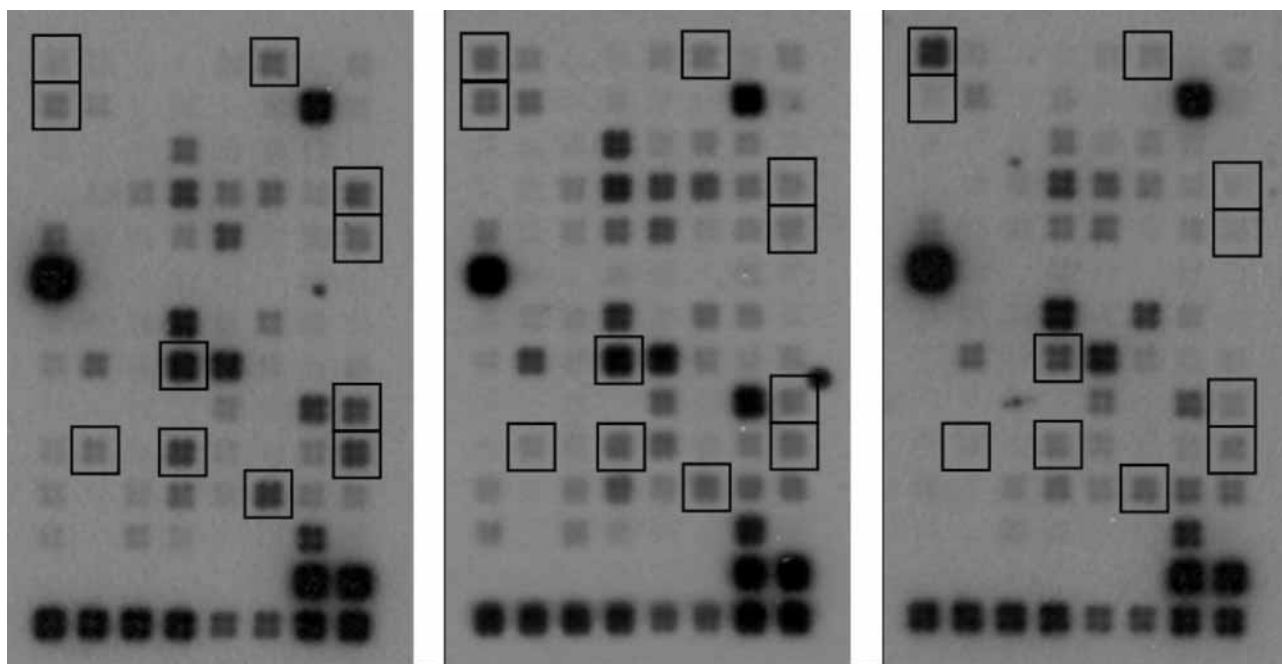
Za infekciju humanih embrionalnih epitelnih stanica bregra (HEK293, ATCC CRL 1573) korišteni su slijedeći vi-

rusi: virus Hantaan, soj 76118 [10] i virus Andes, soj Chile-9717869 [11]. Trećeg dana nakon kultivacije stanice smo inficirali virusima: HTNV (MOI = 10) i ANDV (MOI = 1).

Adsorpcija je trajala jedan sat na 37 °C i 5 % CO₂. Kao kontrole za inficirane stanice koristili smo neinficirane stanice kojima je dodan samo medij. Inkubacija je trajala pet dana, na 37 °C, 5 % CO₂ bez promjene medija. Infekcija stanica je dokazana plak-testom [12]. Stanice korištene u pokusu testirane su na kontaminaciju mikoplazmama ELISA-PCR-om (Roche, Basel, Švicarska). Ukupnu RNK iz sakupljenih uzoraka izolirali smo pomoću Trizola (Life Technologies, Rockville, MD, SAD), nakon čega je slijedila fazna separacija s kloroformom i precipitacija s izopropanolom prema uputama proizvođača. Genska ekspresija je analizirana metodom GEArray (GEArray, Superarray Bioscience, Frederic, MD, SAD) a koristili smo komercijalni kit – GEArray Q serija – signalni put humanog dušikovog oksida (kat.br. HS-062) prema uputama proizvođača. Analizu genske ekspresije na membranama radili smo pomoću programa Kodak ID Analysis Software, Version 3.5 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, SAD). Značajnom ekspresijom smatrali smo onaj rezultat kod kojeg je omjer jačine signala određenog gena prema kontroli veći ili manji od dva i pol.

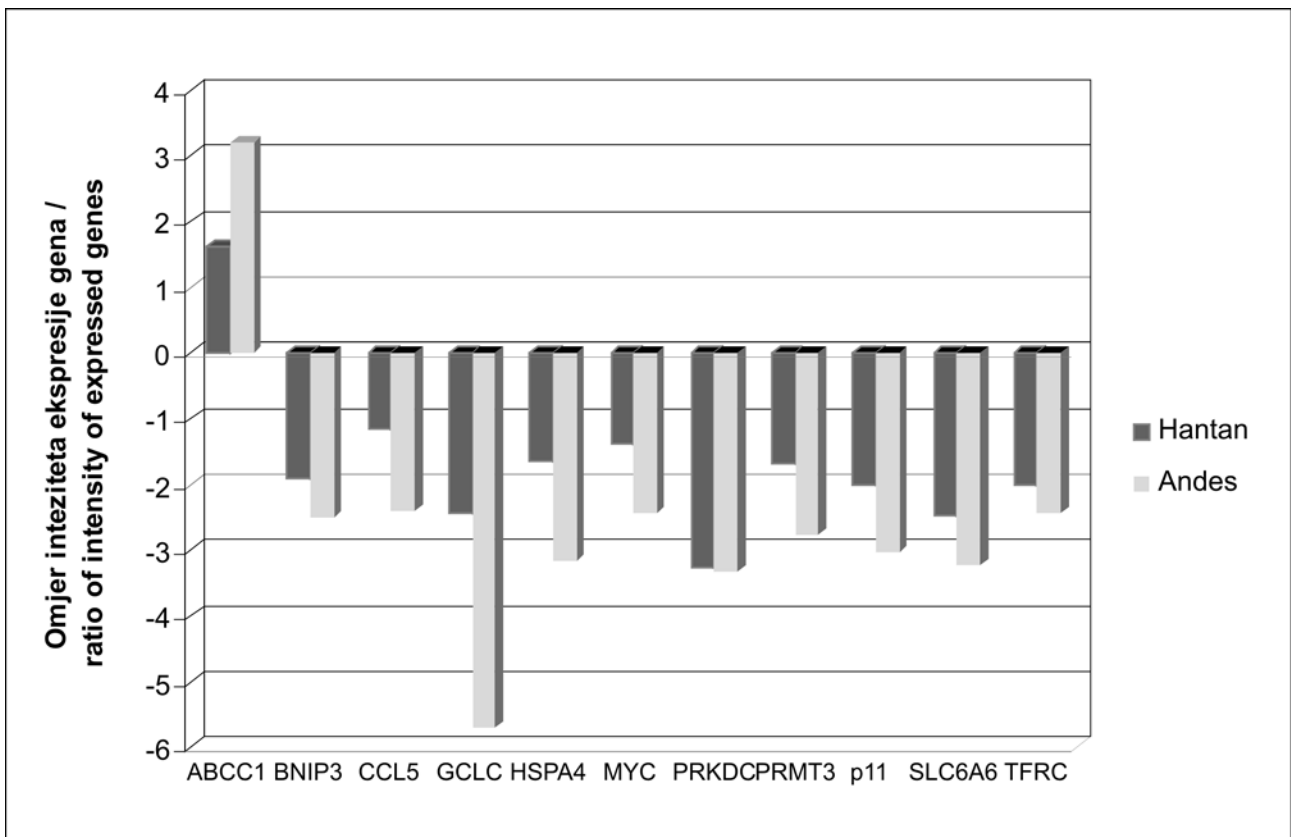
Rezultati

Analizirali smo 96 gena (slika 1) u sklopu signalnog puta dušikovog oksida. Na slici 2 su prikazani svi geni, čija



Slika 1. Prikaz GEArray Membrana. Uokvirena područja pokazuju gene čija je ekspresija značajno različita od kontrole. Membrane slijeve na desno: kontrola, virus Hantaan, virus Andes

Figure 1. Presentation of GEArray Membranes. Marked fields show genes whose expression significantly varied from the control. Membranes from left to right: Control, Hantaan, Andes



ABCC1 – ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1 (multiple drug resistance protein 1)

BNIP3 – BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3

CCL5 – Chemokine (C-C motif) ligand 5; small inducible cytokine A5

GCLC – Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit

HSPA4 – Human heat shock protein 70

MYC – V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene

PRKDC – Homo sapiens protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide

PRMT3 – Protein arginine N-methyltransferase 3 (hnRNP methyltransferase *S. cerevisiae*)-like 3

p11 – S100 calcium binding protein A10

(annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11))

SLC6A6 – Solute carrier family 6

(neurotransmitter transporter, taurine), member 6

TFRC – Transferrin receptor (p90, CD71)

Slika 2. Omjer promjene u intenzitetu ekspresije različitih gena prema kontroli, neinficiranih stanica

Figure 2. Ratio showing changes in the intensity of various gene expression according to uninfected, control cells

je ekspresija bila značajno promijenjena u odnosu na kontrolne stanice. Vidljivo je da je više promjena izazvala infekcija stanica virusom Andes koji je uzročnik HPS-a, nego virusom Hantaan, uzročnikom HVBS-a. Ekspresija gena ABCC1 (od engl. *ATP-binding cassette, sub-family C*) je povišena u oba slučaja ali jedino je infekcija virusom Andes značajno utjecala na ekspresiju tog gena. Za ostale gene za koje je uočena promjena prema kontrolnim stanicama, pokazana je smanjena ekspresija (slika 2). Najznačajnije sniženje ekspresije je zabilježeno za gen GCLC (od engl. *Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit*). Infekcija virusom Hantaan je smanjilo ekspresiju za 2,5, a virusom Andes za 5,7 puta prema kontrolnim stanicama. Ekspresija gena za PRKDC (od engl. *Homo sapiens pro-*

tein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide) te prijenosnika taurina SLC6A6 (od engl. *Solute carrier family 6, member 6*) je značajno snižena kod oba virusa. Pored ovih gena, sniženje ekspresije je nađeno i za slijedeće gene kod infekcije virusom Andes: BNIP3 (od engl. *BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*), CCL5 (od engl. *Chemokine (C-C motif) ligand 5; small inducible cytokine A5*), HSPA4 (od engl. *Human heat shock protein 70*), MYC (od engl. *V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene*), PRMT3 (od engl. *Protein arginine N-methyltransferase 3 (hnRNP methyltransferase S. cerevisiae)-like 3*), p11 (od engl. *S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11))*) i TFRC (od engl. *Transferrin receptor (p90, CD71)*).

Diskusija

Ovo je prvo istraživanje uloge molekula iz signalnog puta NO u apoptozi uzrokovanoj patogenim hantavirusima. Iz rezultata je jasno da je virus Andes uzrokovao jače promjene u povišenju ili sniženju genske ekspresije pojedinih molekula, nego virus Hantaan. Jasno se vidi sveukupno smanjivanje ekspresije kod deset gena, a jedan gen ABCC1 je povišen kod infekcije virusom Hantaan kao i virusom Andes. Razlika postoji i u jačini kojom infekcija utječe na ekspresiju. Dok virus Andes pokazuje značajnu promjenu kod svih 11 prikazanih gena, virus Hantaan do značajnih promjena dovodi samo kod tri gena: SLC6A6, PRKDC i GCLC. Jedan od razloga koji dovode do takvih razlika može biti i u molekularnim karakteristikama virusa, koje su vjerojatno dijelom odgovorne i za različitu težinu i oblik kliničke slike. Virus Hantaan izaziva HVBS s mortalitetom do 20 %, dok infekcije virusom Andes izazivaju hantavirusni plućni sindrom kod kojeg može doći do smrtnosti i u do 40 % slučajeva.

Gen PRKDC je jedini gen kod kojeg je učinak oba virusa gotovo isti, a ekspresija je smanjena za otprilike 3,3 puta. Taj gen kodira kataličku podjedinicu proteinske kinaze DNA-PK (od engl. *DNA-activated protein kinase*) koja je ovisna o DNK i prepoznaje lomove dvolančane DNK-a. Za sada se zna da su spomenuti lomovi izazvani zračenjem ili nepotpunom integracijom retroviralne DNK. Smanjenje razine te specifične kinaze povisuje postotak apoptotičnih stanica tijekom retroviralne integracije. [13]. Jedan od glavnih supstrata DNA-PK je tumorski supresor p53, koji, fosforiziran, postaje aktivan transkripcijski faktor [14]. Protein p53 tada može aktivirati gene koji zaustavljaju stanični ciklus i popravljaju DNK-a ili vode do apoptoze. Sa smanjivanjem ekspresije PRKDC-gena dvolančani lomovi DNK-a se više ne popravljaju, što potiče vjerojatnost izazivanja apoptoze. Do sada nema podataka o integraciji hantavirusa u genom stanice domaćina i takvo nešto je malo vjerojatno. Mehanizme kojim hantavirusi mogu dovesti do smanjenja ekspresije DNA-PK tek će trebati istražiti. Jedan od gena na koji utječe p53 je i SLC6A6. To je membranski protein koji je prijenosnik taurina, čija je važna uloga u detoksifikaciji i osmoregulaciji stanice. Dokazano je da smanjenje ekspresije SLC6A6 gena potiče apoptozu, pogotovo u bubrežnim stanicama poput HEK293 stanica korištenih u ovim pokusima [15].

Jedini u ekspresiji povišeni gen je ABCC1, membranski protein koji translocira unutarstanični glutation, ali je značajno povišen samo kod infekcije virusom Andes [16]. Antioksidans glutation reducira reaktivne kisikove vrste (ROS od engl. *reactive oxygen species*) kao npr. radikale $\cdot O_2^-$, koji nastaju u mitohondrijama tijekom redoks-reakcija [17]. Ti reaktivni produkti kisika inače oštećuju unutarstanične makromolekule poput proteina, nukleinskih kiselina, lipida te ugljikohidrata. Gomilanje takvih ošte-

ćenja izaziva apoptozu [17]. Dodatno je kod oba virusa smanjena ekspresija za sintezu novog glutationa. Katalička podjedinica glutamat-cisteinska ligaza (GCLC) je dio enzima u biosintezi glutationa. Infekcija virusom Andes je imala najveći učinak na taj gen, ekspresija je smanjena za 5,7 puta. Deplecija glutationa je neophodna za ispuštanje citokroma c iz mitohondrija i samim time neophodna za poticanje apoptoze inducirane oštećenjem [18]. Stanica ispuštanjem citokroma c još nije prešla točku bez povratka prema apoptozi. Apoptoza se nakon ispuštanja citokroma c još može zaustaviti prestankom proapoptotičnih signala, no ako se stanični stres nastavi, suicidalni program će se nastaviti i prijeći točku bez povratka cijepanjem prokaspaze 9 i potom prokaspaze 3. Apoptozu mogu izazvati razni signali, koji se dijele na vanstanične i unutarstanične. Jedan od unutarstaničnih signala je i ekstenzivno i nepopravljivo oštećenje DNK-a. Mogući razlog gomilanja tih oštećenja je u svojoj funkciji inhibirana DNA-PK.

Molekularni šaperoni su multiproteinski kompleksi koji se vežu za izdužene proteine te sprječavaju njihovo gomilanje i tako im ponovno omogućavaju zauzimanje njihove pravilne konformacije. Određeni molekularni šaperoni imaju i dodatne funkcije. Protein toplinskog šoka 70 (hsp70) inhibira apoptozu sprječavanjem aktivacije prokaspaze 3 i 9 i sprječavanjem ispuštanja citokroma c iz mitohondrija [19]. U našim istraživanjima našli smo značajno smanjenu ekspresiju gena HSPA4 koji kodira hsp70, te se time snižava koncentracija jednog izravnog regulatora citokroma c i nizvodnih efektoru npr. prokaspaze 3 i 9.

Proteinske arginin metiltransferaze (PRMT) čini skupina devet različitih enzima, PRMT 1 do 9, koje modificiraju proteine vezivanjem metila na određene arginine. Posttranslacijske modifikacije imaju važnu ulogu u regulaciji i životnom vijeku proteina. Ekspresija PRMT 3 je snižena kod infekcije virusom Andes. O supstratima tog enzima još nema puno podataka. Poznato je da u kvascu i u miševima PRMT3 homologni enzimi metiliraju podjedinice ribosoma. Stanice oskudne PRMT3 su vijabilne [20, 21]. Novi podaci pokazuju povezanost PRMT3 s apoptozom induciranom tumorskim supresorom DAL-1 (Differentially Expressed in Adenocarcinoma of the Lung)/4.1B [22]. No, za objašnjenje smanjene ekspresije PRMT3 i moguće uloge u apoptozi izazvanoj hantavirusima još nema dovoljnih informacija.

Gen p11/S100A10 spada u skupinu od deset gena čiju ekspresiju smanjuje infekcija virusom Andes. Protein S100A10 formira heterotetramerski kompleks s aneksinom 2. Taj kompleks nastaje od dva monomera S100A10 te dva monomera aneksina 2 i lokalizirani su u čvrstim spojevima epitelnih bubrežnih stanica koji su potrebni za ostvarenje tih međustaničnih kontakata [23]. Isto tako su neophodni za usmjeravanje specifičnih vesikula od Golgijevog kompleksa prema apikalnoj membrani u epitelnim bubrežnim stanicama [24]. Osim s aneksinom 2,

S100A10 je u interakciji i s drugim membranskim proteinima. I ovdje je očita uloga u usmjerivanju tih proteina prema staničnoj membrani. Hantavirusi imaju neobičan replikacijski ciklus s pupanjem u Golgijevom kompleksu. Nije poznato ima li ovaj proces veze sa smanjenom ekspresijom gena p11.

Naša analiza pokazala je niz promjena u genskoj ekspresiji HEK293 stanica inficiranih virusom Andes, dok je učinak virusa Hantaan bio slabiji. Nadalje smo ovim istraživanjem pokazali važnu ulogu unutarstaničnog puta u izazivanju apoptoze. To je u skladu s našim prethodno provedenim istraživanjima [7], gdje je pokazana važna uloga mitohondrija i unutarstaničnog puta, te zapaženo povišenje ekspresije gena proapoptičnog BIK proteina koji potiče oslobađanje citokroma c iz mitohondrija. Isto tako su izmjerene povišene ekspresije gena za razne kaspaze kao što su kaspaze: 2, 3, 6, 8 te 9. Kaspaze 2, 3 i 9 su izravno povezane s mitohondrijskim putem i oslobađanjem citokroma c, dok ekspresiju kaspaze 6 potiče djelovanje p53 [7].

Zaključci

Analiza genske ekspresije u okviru signalnog puta NO upućuje na važnost uloge unutarstaničnog puta apoptoze pri infekciji HEK293 stanica patogenim hantavirusima (Hantaan i Andes) i u skladu je s prethodno provedenim istraživanjima.

Tijekom ovog istraživanja se pokazalo da je virus Andes imao veći učinak na promjene u genskoj ekspresiji inficiranih HEK293 stanica, nego virus Hantaan.

Promjene u ekspresiji gena: ABCC1, BNIP3, CCL5, GCLC, HSPA4, MYC, PRKDC, PRMT3, p11, SLC6A6, TFRC vjerojatno sudjeluju u složenoj interakciji pro- i anti-apoptičkih mehanizama tijekom infekcije HEK293 stanica patogenim hantavirusima.

U nastavku naših istraživanja potrebno je na razini proteina utvrditi molekule odgovorne za pokretanje unutarnjeg puta apoptoze izazvanog patogenim hantavirusima, te moguću interakciju s vanjskim putem apoptoze.

Literatura

- [1] Schmaljohn CS, Hjelle B. Hantaviruses. A Global Disease Problem. *Emerg Infect Dis* 1997; 3 (2), 95–104.
- [2] Meyer BJ, Schmaljohn CS. Persistent hantavirus infections: Characteristics and mechanisms. *Trends Microbiol* 2000; 8 (2), 61–67.
- [3] Markotic A, Hensley L, Geisbert T, Spik K, Schmaljohn CS. Hantaviruses induce cytopathic effects and apoptosis in continuous human embryonic kidney cells. *J Gen Virol* 2003; 84 (8), 2197–2202.
- [4] Markotić A, Schmaljohn C. Immunoreactions to hantaviruses. U: Georgiev V. ur. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. Vol.1 Frontiers in sciences*, Humana Press, Springer Verlag, 2008. Str. 435–444.
- [5] Li XD, Makela TP, Guo D i sur. Hantavirus nucleocapsid protein interacts with the Fas-mediated apoptosis enhancer Daxx. *J Gen Virol* 2002; 83 (4), 759–766.
- [6] Li XD, Lankinen H, Putkuri N, Vapalahti O, Vaheri A. Tula hantavirus triggers pro-apoptotic signals of ER stress in Vero E6 cells. *Virology* 2005; 333 (1), 180–189.
- [7] Cebalo Lj. *Imunološki Odgovor ljudskih plućnih i bubrežnih stanica na infekciju virusima Hantaan i Andes*. Zagreb, Hrvatska: Sveučilište Zagreb, 2006. Disertacija.
- [8] Janković M, Markotić A. Virusi i apoptoza. *Infektol Glas* 2007; 27 (2), 63–70.
- [9] Yoshioka Y, Yamamuro A, Maeda S. Nitric oxide/cGMP signaling pathway protects RAW264 cells against nitric oxide-induced apoptosis by inhibiting the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Sci* 2006; 101 (2), 126–134.
- [10] Lee HW, Lee PW, Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 1978; 137: 298–308.
- [11] Toro J, Vega JD, Khan AS, i sur. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(4): 687–694.
- [12] Hooper JW, Larsen T, Custer DM, Schmaljohn CS. A Lethal Disease Model for Hantavirus Pulmonary Syndrome. *Virology* 2001; 289 (1), 6–14.
- [13] Daniel R, Katz RA, Skalka AM. A role for DNA-PK in retroviral DNA integration. *Science* 1999; 284(5414): 644–647.
- [14] Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997; 91(3): 325–334.
- [15] Han X, Chesney RW. Regulation of TauT by cisplatin in LLC-PK1 renal cells. *Pediatr Nephrol* 2005; 20(8): 1067–1072.
- [16] Ballatori N, Hammond CL, Cunningham JB, Krance SM, Marchan R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204(3): 238–255.
- [17] Suzuki K, Nakamura M, Hatanaka Y, Kayanoki Y, Tatsumi H, Taniguchi N. Induction of apoptotic cell death in human endothelial cells treated with snake venom: implication of intracellular reactive oxygen species and protective effects of glutathione and superoxide dismutases. *J Biochem* 1997; 122(6):1260–4.
- [18] Coppola S, Ghibelli L. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochem Soc Trans* 2000; 28 (2): 56–61.
- [19] Mosser DD, Caron AW, Bourget L i sur. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20 (19): 7146–7159.
- [20] Bachand F, Silver PA. PRMT3 is a ribosomal protein methyltransferase that affects the cellular levels of ribosomal subunits. *EMBO J*. 2004; 23 (13): 2641–2650.
- [21] Swiercz R, Cheng D, Kim D, Bedford MT. Ribosomal protein rpS2 is hypomethylated in PRMT3-deficient mice. *J Biol Chem* 2007; 282 (23): 16917–16923.
- [22] Jiang W, Newsham IF. The tumor suppressor DAL-1/4.1B and protein methylation cooperate in inducing apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer* 2006; 5: 4.
- [23] Lee DB, Jamgotchian N, Allen SG, Kan FW, Hale IL. Annexin A2 heterotetramer: role in tight junction assembly. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 287 (3): F481–491.
- [24] Jacob R, Heine M, Eikemeyer J, Frerker N, Zimmer KP, Rescher U i sur. Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells. *J Biol Chem*. 2004; 279 (5): 3680–3684.