

PROTEIN FOSZFATÁZOK SZABÁLYOZÁSA KÖLCSÖNHATÓ FEHÉRJÉKKEL

BEVEZETÉS

A protein foszfatázokkal kölcsönható fehérjék fontos szerepet játszanak a protein foszfatáz-1 (PP1) enzimesalád szabályozásában. Az utóbbi években tanulmányoztuk a miozin foszfatáz (MP) szabályozását simaizomban és trombocitákban [1, 2]. Az MP-ben a PP1 katalitikus alegységhez (PP1c) és miozinhoz is kötődő 130/133 kDa molekulatömegű regulátor alegység (MYPT) kapcsolódik. Eredményeink szerint a MYPT N-terminális régiói kooperatív módon kötődnek a PP1c-hez, amely kölcsönhatásokat a MYPT ankirinszerű régiójának foszforilációja módosíthatja [3, 4]. Kimutattuk, hogy a MYPT-ben az enzim gátlását okozó foszforilációt Thr695 oldalláncon a Rho-kináz mellett integrinek által aktivált kináz (ILK) is katalizálja [5, 6]. A miozin foszfatáz foszforilációval történő szabályozásának számos kérdése (pl. a különböző foszforilálási helyek és foszforiláló kinázok viszonya, a defoszforiláló foszfatázok típusa) azonban még feltáratlan. Ezen kívül a MP foszforilálható fehérje inhibitorokkal is gátolható, amelyek közül a protein kináz C (PKC)-vel foszforilálható 17 kDa fehérje (CPI-17) gátlási mechanizmusát jellemezték részletesen. A MP számos nem-izom sejtben is előfordul, amelyekben az MP és a MYPT feltehetően nemcsak a kontraktilis sajátságokat, hanem más sejtfolyamatokat is szabályozhat. Ez utóbbi lehetőségek megismeréséhez az MP és a MYPT sejten belüli lokalizációja és specifikus kölcsönhatásainak vizsgálata vihet közelebb.

CÉLKITŰZÉSEK

A pályázatban a protein foszfatázok foszforilációval és kölcsönható fehérjékkel történő szabályozásának tanulmányozását terveztük. Vizsgálataink fő modell molekulája a miozin foszfatáz holoenzim (MP), amely protein foszfatáz-1 katalitikus alegységből (PP1c) és miozinhoz is kötődő regulátor alegység (MYPT1 vagy MYPT2) kölcsönhatásával alakul ki. Kísérleteink az eredeti kutatási tervben, ill. a kutatási szerződésben megfogalmazottak szerint az alábbi fő kérdések tanulmányozására irányulnak:

1. A MYPT1 N- és C-terminális régióinak foszforilációja és defoszforilációja
2. ILK és ZIPK szerepe a MYPT1 és a CPI-17 fehérjék foszforilációjában
3. A MYPT1 lokalizációja agy régiókban, hepatocitákban és HaCat sejtekben
4. A MYPT1 fehérje-fehérje kölcsönhatásainak tanulmányozása

5. A miozin foszfatáz és a MYPT1 funkciójának vizsgálata: az enzim specifikus gátlása, a MYPT1 expresszió gátlása, MYPT1 fragmentek transzdukciója sejtekbe.

Becslésünk szerint a kutatási terv mintegy 80%-ban megvalósult, annak ellenére, hogy a szerződéshez képest a kutatási támogatást a pályázat kutatási periódusa alatt csökkentették. Az eredeti célkitűzésektől való eltérések annak is tulajdoníthatók, hogy a kutatási támogatás odaítélésének idejére számos tervezett kísérlettel kapcsolatban történt tudományos közlés hasonló területen működő munkacsoportok által. Így pl. leírták a CPI-17 foszforilációját ZIPK által [7], ezért kísérleteink elsősorban a CPI-17 ILK, cAMP-függő protein kináz A (PKA) és cGMP-függő protein kináz G (PKG) által történő foszforilációjának vizsgálatára irányultak. Ezen kívül tanulmányoztuk a CPI-17 fehérjéhez hasonló fehérjék (Phosphatase Holoenzyme Inhibitor, PHI, és Kinase Enhanced Phosphatase Inhibitor, KEPI) foszforilációját és foszfatázgátló hatását. A MYPT expresszió gátlását RNS interferenciával a munkacsoportunkkal tudományos együttműködést folytató amerikai partner kezdte el (Dr. David Hartshorne munkacsoportja, University of Arizona, Tucson), ill. hasonló témában szintén megjelent közlemény időközben [8]. A pályázat beadása után szintén megjelent közlemény a MYPT általunk is tervezett defoszforilációs vizsgálatáról [9]. Továbbá, előkísérleteink szerint a teljes hosszúságú MYPT N-terminális részének foszforilációja (pl. PKC által) kisebb mértékű volt annál, mint azt az N-terminális fragmentumok esetén észleltük, ezért ezt a témát a továbbiakban nem tanulmányoztuk, ugyanis a megfelelő kináz és kísérleti körülmény kiválasztásának idő- és költségigényét nem láttuk arányosnak az eredmények esetleges tudományos értékével.

EREDMÉNYEK

1. A MYPT1 foszforilációjának tanulmányozása

1.1 A MYPT új gátló foszforilációs helyének azonosítása

Az MP szabályozásának egyik mechanizmusa a MYPT1 regulátor alegység Thr695 oldalláncának (zúza izoformák számozása) foszforilációja Rho-kinázzal, amely a katalitikus alegység (PP1c) aktivitásának gátlását okozza [1, 2]. A Rho-kináz a MYPT1 Thr850 oldalláncát (zúza izoformák számozása) is foszforilálja, amelynek szerepe az MP szabályozásában még nem ismert. Glutation-S-transzferázzal (GST) fuzionált vad típusú és mutáns MYPT1 fehérjéket (Thr695A, Thr850A, Ser694A/Thr695A/Thr850A) állítottunk elő és jellemeztük Rho-kináz (ROK) által történő foszforilációjukat [10]. A foszforilált mutánsok PP1c-t gátló hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a korábbi feltételezésekkel ellentétben

MYPT1^{P-Thr695} mellett a MYPT1^{P-Thr850} is gátolja a miozin defoszforilációját, mégpedig a MYPT1^{P-Thr695}-hez hasonló hatékonysággal.

1. 2 A MYPT PKA és Rho-kináz általi foszforilációjának kölcsönönhatása

Eredményeink szerint a protein kináz A (PKA) a MYPT1 Ser694 és Ser849 oldallaáncait (zúza izoformák számozása), valamint kisebb mértékben eddig még nem azonosított más oldallánco(ka)t is foszforilál [11, 12]. Vizsgáltuk, hogy PKA és Rho-kináz foszforilációs helyek befolyásolják-e egymás foszforilálhatóságát. A Rho-kináz a MYPT1-et 1,6 mol P/mol, a MYPT1^{Thr695A}-et 0,7 mol P/mol mértékig foszforilálta. A foszforilált MYPT1 gátolta a PP1c aktivitását (IC₅₀=0,3 nM), ami kisebb mértékben ugyan, de a mutáns MYPT1^{Thr695A} (IC₅₀=1,5 nM) foszforilációja után is megfigyelhető volt. Ezek az adatok szintén megerősítik azt a megfigyelést, hogy a MYPT1-ben a Thr850 foszforilációja is gátlást okoz. A PKA a MYPT1 és a MYPT1^{Thr695A} fehérjéket közel azonos mértékben (~2,8 mol P/mol) foszforilálta, ezek a foszforilált formák azonban az előbbieknél két nagyságrenddel magasabb koncentrációban is csak kismértékű gátló hatást mutattak. A MYPT1 és a MYPT1^{Thr695A} PKA-val történő foszforiláció mérsékelte a Rho-kináz által katalizált foszforiláció mértékét, amely MYPT1 esetén 1,6 mol/mol-ról 0,4 mol/mol, MYPT1^{Thr695A} esetén pedig 0,7 mol/mol-ról 0,33 mol/mol értékekre csökkent. A MYPT1 Rho-kinázzal és PKA-val történő foszforilációja, a fenti megfigyelések alapján egymástól tehát nem független, ami a Rho és a cAMP függő jelpályák kölcsönhatására utal az MP szabályozásában.

A simaizomban lejátszódó foszforilációs mechanizmusok tisztázására kísérleteket végeztünk a cGMP-függő protein kinázzal (PKG) is [13]. Megállapítottuk, hogy a PKG a PKA-hoz hasonló mértékben, és tömegspektrometriai adatok alapján a PKA-val megegyező helyeken (Ser692, Ser695 és Ser852, humán izoformák számozása alapján) foszforilálja a MYPT1-et. Simaizomban a MYPT1 foszforilációja Thr696 oldalláncon (humán izoforma számozása) az MP gátlása által lehetővé teszi a kontrakció kifejlődését alacsony Ca²⁺-koncentrációnál (Ca²⁺-szenzitizáció). Kimutattuk, hogy az izom nem hidrolizálható cGMP analóggal való előinkubálása a Ca²⁺-szenzitizációt csökkenti. Eredményeink szerint ezen folyamat hátterében az áll, hogy a MYPT1 PKG által történő foszforilációja a Ser695 oldalláncon gátolja a Thr696 foszforilációját Rho-kinázzal vagy más MYPT1 kinázokkal (ILK, ZIPK). A foszforilált Thr696-ra specifikus antitesttel kimutattuk, hogy a MYPT1 Thr696 foszforilációja jelentős mértékben csökken akár PKA vagy PKG-vel történő előfoszforiláció után. A foszforilált Ser695-re specifikus antitesttel pedig igazoltuk, hogy simaizomban cGMP analóg hatására növekszik a Ser695 foszforilációja, és ezzel párhuzamosan csökken a Thr696 foszforiláltságának mértéke. Eredményeinkből arra

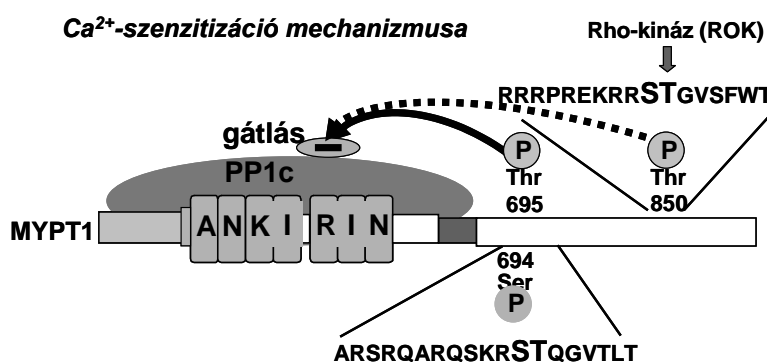
következtetünk, hogy a cGMP és/vagy a PKG által kiváltott Ca^{2+} -deszenzitizáció mechanizmusában a MYPT1 egymást kizáró foszforilációs folyamatainak lehet szerepe.

1. 3 A MYPT1 foszforiláció/lokalizáció/aktivitás viszonyának és funkciójának tanulmányozása

A foszforilációs helyekre specifikus antitestekkel kimutattuk, hogy A7r5 sejtekben a RhoA/ROK útvonalat aktiváló lizofoszfátidsav (LPA), valamint a foszfátázgátló kalikulin-A (CLA) hatására is lejátszódik a MYPT-ben a Thr695 és a Thr850 foszforilációja [10]. ROK inhibitor (Y-27632) jelenlétében végzett kísérletekből arra következtetünk, hogy a Thr850 foszforilációja ROK-függő, míg a Thr695 viszonylag kismértékű foszforilációjáért ROK-tól eltérő kináz lehet felelős.

A foszfátáz inhibitor okadánsav (OA) hatását vizsgáltuk a MYPT1 és a miozin könnyűlánc (MLC20) foszforilációjára HepG2 sejtekben olyan OA koncentrációknál (5-50 nM), amely a protein foszfátáz 2A (PP2A)-t már gátolta, de a PP1 holoenzimeket közvetlenül még nem befolyásolta [14]. A MYPT1 két tanulmányozott foszforilációs helyének foszforilációja eltérő sejten belüli lokalizációt eredményezett. Az OA hatására a Thr695 oldalláncon foszforilált MYPT1 populáció a citoszolból a plazmamembránba transzlokálódott. A Thr850 oldalláncon foszforilált MYPT1 a sejtmagban és a perinukleáris régióban dúsult fel, foszforilációja Rho-kináz (ROK) függő módon valósult meg, míg a P-Thr850 defoszforilációjáért feltehetően a PP2A felelős. Az OA-indukált MP gátlásával stresszrostok alakultak ki és a sejtek migrációja lassult. A MP gátlást 5-50 nM OA által (feltehetően indirekt módon a MYPT foszforilációjával) fokozta az MLC20 foszforilációjának mértékét, a stressz rostok mennyiségét és a sejtek migrációjának lassulásához vezetett. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az MP gátlása a stressz-rostok lassabb "turnoveréhez" vezethet a sejt központi részén, ami stabilabb adheziós szerkezeteket és csökkent migrációs rátát eredményezhet.

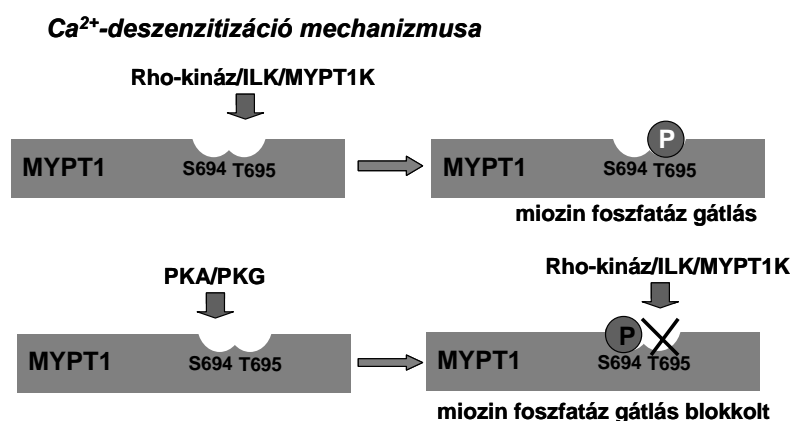
A MYPT foszforilációjára vonatkozó kísérleteinket az 1. és a 2. ábra foglalja össze.



1. ábra A MP szabályozása a MYPT alegység foszforilációjával. A MYPT Thr695 oldalláncon foszforilációjának gátló hatását korábban kimutatták. A Thr850 foszforilációjának gátló hatását a pályázat keretében végzett munkában igazoltuk. Ez arra utal, hogy a Thr850 foszforilációja is hozzájárulhat a kontrakciós folyamatokban megfigyelt Ca^{2+} -szenzitizációban.

A kétféle gátló foszforilációs helyen foszforilált MYPT eltérő lokalizációja a sejtben szintén fiziológiai jelentőséggel bírhat, a szabályozó mechanizmus feltárására azonban még további kísérleteket kell végezni. A MYPT Thr695 oldallánc foszforilációjának gátló hatását korábban kimutatták. A Thr850 foszforilációjának gátló hatását a pályázat keretében végzett munkában igazoltuk. Ez arra utal, hogy a Thr850 foszforilációja is hozzájárulhat a kontrakciós folyamatokban megfigyelt Ca^{2+} -szenzitizációban.

A PKA és a ROK egymást kizáró foszforilációja a Ser695 és a Thr696 oldalláncokon a cGMP szintet növelő agonisták Ca^{2+} -deszenzitizációt okozó hatásának mechanizmusára adnak magyarázatot (2. ábra).



2. ábra A MP szabályozása a MYPT alegység PKA/PKG és ROK által történő foszforilációjával. A MYPT Thr696 oldalláncának gátló foszforilációját a Ser695 PKA/PKG által való foszforilációja mérsékli, elősegítve ezzel a relaxációt és ennek megfelelően Ca^{2+} -deszenzitizációt eredményez.

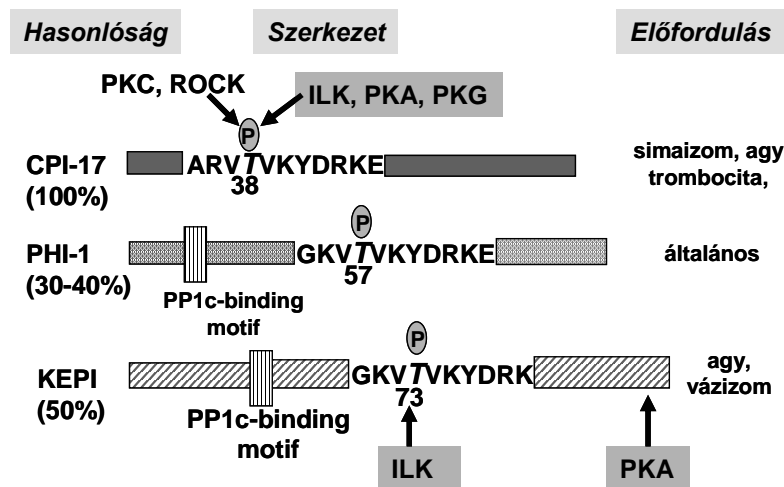
2. ILK, PKA és PKG szerepe a CPI-17 és KEPI fehérjék foszforilációjában

Az MP gátlása a simaizmok kontrakcióját indukálja alacsony intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációnál. Az MP gátlását a katalitikus alegységhez (PP1c) kötődő foszforilált inhibitor fehérjék (pl. CPI-17) is okozhatják [1]. A gátlási mechanizmusok egyik kulcsenzime a Rho-kináz, amely a MYPT1 Thr695 oldalláncának és a CPI-17 Thr38 oldalláncának gátlást okozó foszforilációját is katalizálja. Ezzel szemben a cAMP/cGMP szintet növelő effektorok az MP aktiválásával az izom relaxációját idézik elő. Eredményeink szerint a Rho-kináz és a protein kináz C (PKC) mellett a CPI-17 gátló foszforilációját (Thr38 odalláncon) PKA, PKG és az integrinekhez kapcsolódó kináz (ILK) is katalizálja [15]. Az MP gátlásában tehát a PKA, PKG és az ILK is szerepet játszik, ami a miozin foszforiláció szabályozásában a Rho-jelátviteli útvonaltól eltérő alternatív mechanizmus létezésére utal. A CPI-17 gátló foszforilációja PKA és a PKG enzimekkel *in vitro* és *in vivo* ellentétes a PKA/PKG-t aktiváló cAMP/cGMP foszfatáz gátlást mérséklő hatásával és e tekintetben a regulációs mechanizmus komplexitására irányítja a figyelmet. Ezen foszforiláció jelentősége talán abban rejlik, hogy a CPI-17 foszforilációja nemcsak simaizomban, hanem pl. neuronokban is szabályozhatja a fehérjék foszforilációs szintjét, ahol a stimulációs mechanizmusoktól függően a fenti

kinázokkal való foszforiláció lehet szükséges a foszfatáz gátlásához. A gátlás mechanizmusának feltárása azt is igazolta, hogy a CPI-17 foszforilált formája a PP1 holoenzimek közül csak a MP-t gátolja, és ez a specificitás a PP1c és a MYPT kölcsönhatásában a MYPT alloszterikus hatásának tulajdonítható [16]. Ezért a CPI-17 alkalmas az MP-nek tulajdonítható defoszforilációs folyamatok elkülönítésére.

A CPI-17-el rokon fehérjék (PHI, KEPI) gátló foszforilációs szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutat.

CPI-17-hez hasonló fehérjék szerkezete és foszforilációja



3. ábra A CPI-17 és rokon fehérjék (PHI és KEPI) előfordulása, szerkezetük és foszforilációs helyeik hasonlósága. Az ábrán a sötétített kinázok által történő fehérje foszforilációt a pályázat keretében végzett kutatások során azonosítottuk.

Kimutattuk, hogy az ILK foszforilálja a CPI-17-hez hasonló KEPI fehérjét is. A foszforilált KEPI gátolja a PP1c ($IC_{50}=0,1$ nM) és az MP holoenzim ($IC_{50}=8$ nM) aktivitását is. A KEPI-t Rho-kináz és protein kináz G (PKG) nem, a protein kináz A (PKA) pedig a gátló helytől (Thr73) eltérő oldalláncon foszforilálja. Ez utóbbi különbségek arra utalnak, hogy a gátló foszforilációs helyek nagyfokú hasonlóságának ellenére is vannak különbségek a különböző kinázok által történő foszforilálhatóságban, ami feltehetően a fehérjék további régióinak tulajdoníthatók a kinázokkal való kölcsönhatás szabályozásában.

3. A MYPT1 lokalizációja különböző sejtekben

3.1 A MYPT1 lokalizációja agy régiókban

Az MP szerepe és szabályozása nem-izom sejtekben, így pl. a különböző agy régiókban kevésbé tanulmányozott, ezért vizsgáltuk a MYPT1 lokalizációját immunológiai technikák (Western blot, immunfluoreszcencia) alkalmazásával [17-19]. Kimutattuk, hogy a MYPT1 izoforma a patkány agy lizátumban nagyobb koncentrációban van jelen, mint a MYPT2. A MYPT1 expresszióját valamennyi agyrégióban kimutattuk és kvantitatív Western blot analízissel meghatároztuk a koncentrációját. A MYPT viszonylag nagyobb

mennyiségben volt jelen az agykéreg, szagló hagyma, striatum, hippocampus és köztiagy régiókban, és kisebb mennyiségben a középagy és utóagy régiókban. Az agyrégiókban a MYPT1 koncentrációja (30-78 nmol/g fehérje) összevethető a simaizom sejtekben és nem-izom sejtekben becsült MYPT1 koncentrációval. A MP specifikus aktivitása (1.1-2.7 nmol/perc/mg) az agyrégiók lizátumaiban hasonló volt az előzőleg simaizom és nem izom sejtekben talált értékekhez. A középagyban és az utóagyban a MYPT1 mennyisége és a miozin foszfatáz aktivitása is 1,5-2-ször kisebb, mint más agyrégiókban. A MP aktivitás és MYPT1 különböző agyrégiókban detektált relatív mennyiségi eltéréseinek fiziológiai jelentőségét, ill. a különböző mértékű expresszió molekuláris hátterét még nem ismerjük. Immunhisztokémiai vizsgálatokkal a MYPT1-et valamennyi agyrégióban detektáltuk, de a fehérje különböző intenzitású festődést mutatott az eltérő agyi magok és idegpályák esetén. Eredményeink szerint a MYPT1 jelen van az agytörzsben, ahol a központi idegrendszer felső és alsó kompartmentjei közötti információcsere zajlik, valamint a limbikus rendszer részeiben és az azt beidegző axonágakban is, ahol pedig az emocionális és ösztönös viselkedés szabályozása történik. A memória kialakulásában szintén szerepet játszhat a MYPT1, mivel kimutattuk az entorhinális agykéreg sejttestjeiben és a hippocampusba futó idegpályákban is. A MYPT1 számos, de nem mindegyik idegsejt sejtmagjában és bizonyos idegsejt magvacskájában is jelen van. A MYPT1 lokalizációját sejtmagban már korábban kimutatták, jelenlétének igazolása a magvacskákban azonban új megfigyelés. Megjegyzendő, hogy a MYPT1 jelenlétét a magvacskákban csak a szöveti metszeteken észleltük, primer hippocampális és nucleus cochlearis sejtekben a magvacskák nem mutattak MYPT1 festődést.

A primer idegsejteken részleges eltérést tapasztaltunk a sejtmagi lokalizációt tekintve is: a hippocampális sejt kultúrában a MYPT1-et a citoplazmában és a sejtmagban is detektáltuk, míg a nucleus cochlearis sejtekben a MYPT1 főleg citoplazmatikus lokalizációt mutatott. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a MYPT1 lokalizációját számos tényező befolyásolhatja, beleértve a sejtek fiziológiai állapotát, a sejtek korát és fejlődési stádiumát. Ezen kívül a lokalizációs sajátosságok kimutatási lehetősége gyakran függ az immunfluoreszcenciás detektálásra alkalmazott módszerektől és azok körülményeitől (fixálás módja és ideje) is.

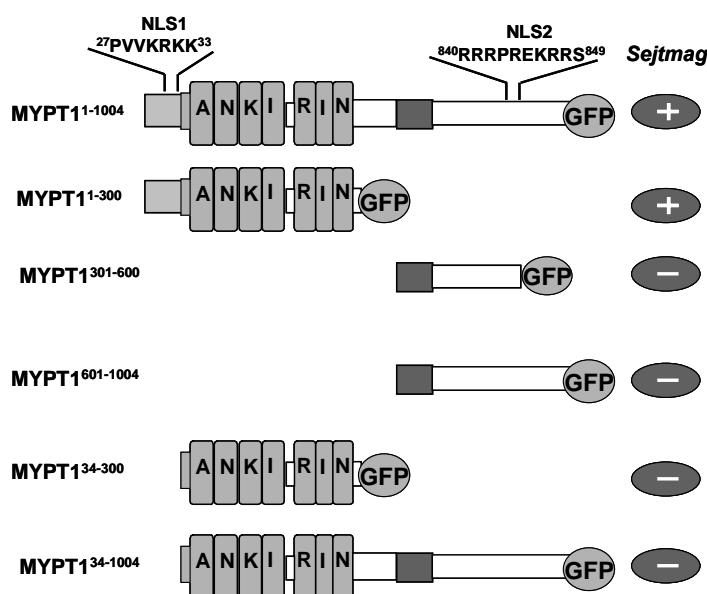
3. 2 A MYPT lokalizációja HepG2 és HaCat sejtekben

Tanulmányoztuk foszfatáz inhibitor toxin, okadainsav (OA) hatását a miozin foszfatáz (MP) foszforilációjára és sejtben belüli lokalizációjára HepG2 sejtekben [14]. A MP katalitikus (PP1c) és regulátor alegység (MYPT1) jelen volt a HepG2 valamennyi szubcelluláris frakciójában, ezen belül nagyobb mennyiségben a sejtmagban, a citoskeletonban és a

mitokondriumban fordult elő. A MYPT hasonló megoszlását figyeltük meg HaCat sejtek szubcelluláris frakcióiban is. A MP sejtmagi lokalizációját konfokális mikroszkóppal végzett kísérletek is megerősítették.

3.3 A MYPT-GFP konstruktok lokalizációja

A MYPT1 lokalizációját és lehetséges funkcióját vizsgáltuk MYPT1-GFP konstruktok transzfekciójával. Különböző hosszúságú MYPT1-GFP konstruktok fibroblasz és HEK sejtekbe történő transzient transzfekciójával is igazoltuk a MYPT1 sejtmagi lokalizációját, és kimutattuk, hogy a sejtmagba történő transzportban (4. ábra) a MYPT1 N-terminális részén található nukleáris lokalizációs szignál (MYPT1²⁷⁻³³) játszik szerepet [20].



4. ábra MYPT1-GFP konstruktok lokalizációja a sejtmagban. Az ábrán látható, hogy a MYPT1 N-terminális részén elhelyezkedő nukleáris lokalizációs szignál (NLS1) jelenléte szükséges a MYPT1 sejtmagban történő lokalizációjához. A C-terminális régióban lévő NLS2 valószínűleg nem játszik szerepet a sejtmagban történő lokalizációban.

Szérum jelenlétében a MYPT1-GFP expressziója csökkentette az adherens sejtek számát, a sejtciklust M-fázis előtt blokkolta és apoptózist okozott. Ezek a jelenségek szérummentes körülmények mellett nem figyelhetők meg.

A lokalizációs kísérleteket összefoglalva: eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a MYPT1 megoszlása az agyban, ill. az idegsejtekben, valamint más nem-izom sejtekben (HepG2, HaCat, 3T3 fibroblast, HEK sejtek, stb.) nem homogén, hanem funkciójukat tekintve specializálódott régiókhoz, ill. sejten belül bizonyos kompartmentekhez kötött. Ez, a miozintól meglehetősen eltérő lokalizációs mintázat, a miozin foszfatáz általánosabb sejtfuncióit és a miozintól eltérő alternatív szubsztrátok jelenlétét is valószínűsíti, ezért feltételezhető, hogy nem-izom sejtekben az enzim defoszforiláló aktivitásának célpontja a foszforilált miozin II-től eltérő szubsztrátok is lehetnek.

4. A MYPT1 fehérje-fehérje kölcsönhatásainak tanulmányozása

4.1 Kölcsönhatás neuronális fehérjékkel

Primer idegsejtekben kimutattuk mind a MYPT1 és a PP1delta kolokalizációját szinaptofizinnel, amely preszinaptikus marker fehérjeként és szinaptikus vezikulák integráns membrán fehérjeként is ismert [19]. A MYPT1 és a szinaptofizin lehetséges kölcsönhatásának bizonyítására, valamint más már ismert, MYPT1-el asszociáló fehérjékkel való kölcsönhatás igazolására az idegsejtekben, agyrégiók kivonatából immunprecipitációt végeztünk MYPT1-re specifikus antitesttel. Az immunprecipitáció során kölcsönható partnerként azonosítottuk a ROK, PP1delta és a szinaptofizin fehérjéket, valamint a PP1delta-tól eltérő PP1c izoformákat. Ezekből az adatokból részben arra következtetünk, hogy az idegsejtek miozin foszfátáz holoenzimében a MYPT1-gyel asszociált fő PP1c izoforma feltehetően a PP1delta, hasonlóan a simaizomhoz. Ezt megerősíti a PP1delta és a MYPT1 koprecipitációja, valamint a PP1delta MYPT1-hez részben hasonló megoszlása a különböző agyrégiókban. Ennek ellenére a MYPT1 és PP1delta részben eltérő lokalizációja primer idegsejtekben arra is utalt, hogy a MYPT1 átmenetileg a PP1delta-tól disszociált állapotban, vagy más PP1c izoformákhoz (PP1calfa és PP1cgamma) is előfordulhat. Ez utóbbit támasztja alá az a megfigyelés, hogy a PP1calfa/ PP1cgamma izoformák is koprecipitálódtak a MYPT1-gyel agy kivonatból. Más neuronális PP1c-t kötő fehérjék (neurofilament-L, a neurabin I vagy a neurabin II) preferenciáját PP1calfa és/vagy PP1cgamma1 izoformák iránt már korábban igazolták. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a MYPT1 az első olyan idegsejtekben azonosított PP1c szabályozó alegység, amely elsődlegesen a PP1delta –val alkot holoenzimet. A MYPT kölcsönhatása a szinaptofizinnel felvetette annak a lehetőségét, hogy a MP a szinaptikus vezikulák és azon belül a preszinapszisok egyik fontos Ser/Thr specifikus foszfátáz komponense lehet. Szinapszómá és posztzinaptikus denzitás frakciókat izoláltunk és vizsgáltuk a miozin foszfátáz, MYPT1 és a MYPT1-gyel kölcsönható fehérjék (ROK, szinaptofizin és PP1delta) eloszlását. A miozin foszfátáz aktivitás a szinapszómában magas, míg a posztzinaptikus denzitás frakcióban alacsony volt. A MYPT1, ROK és nagyobb mennyiségben volt jelen a szinapszómákban, mint a PP1delta posztzinaptikus denzitásokban, míg a szinaptofizint csak a szinapszómákban között mutattuk ki. A MYPT1, a ROK, a szinaptofizin valamint a PP1delta kialakuló kölcsönhatást alátámasztotta a GST-MYPT1-el végzett pull-down vizsgálat is. Az eddig idegrendszerben, ill. idegsejtekben leírt PP1 szabályozó alegységek (mint pl. a neurofilament-L, a neurabin I vagy a neurabin II) mindegyikét a posztzinaptikus

denzitásokban mutatták ki. Eredményeink alapján tehát a MYPT1 az első preszinapszisban leírt idegrendszeri PP1c szabályozó alegység. A szinaptofizin foszforilálható, és ismert, hogy foszforilációja befolyásolja a neurotranszmitterek felszabadulását. A MYPT1 kölcsönhatása a szinaptofizinnel arra utal, hogy a miozin foszfatáznak új szubsztrátként célpontja lehet a szinaptofizin fehérje is, és ezzel az idegsejtekben szerepet játszhat a vezikulák szállításában és a neurotranszmitter kibocsátás szabályozásában is. A mechanizmus további résztvevője lehet a Rho-kináz (ROK) is, amelyről ismert, hogy a RhoA/ROK jelátviteli útvonalon keresztül szabályozhatja a miozin foszfatáz aktivitását a MYPT1 gátló helyének (Thr695 oldallánc) foszforilációjával. A ROK és a MP számos közös szubsztrátja (pl. adducin, moezin, Tau) ismert, az azonban még bizonyításra vár, hogy vajon a szinaptofizin foszforilációja és defoszforilációja is szabályozható-e ezzel az enzimpárral.

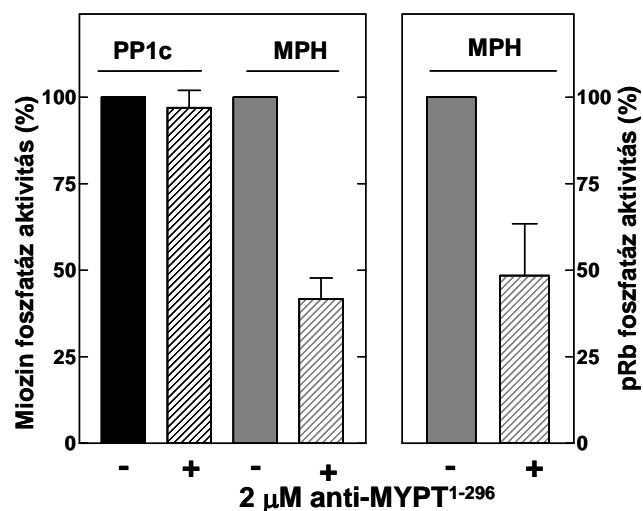
4.2 A MYPT kölcsönhatása a retinoblasztóma fehérjével

A MYPT1-GFP konstruktok overexpressziója számos sejtvonalban esetén sejthalált okozott, feltehetően azért mert a MYPT1 megnövekedett koncentrációja gátolhatja a sejtek növekedését [20]. Az egyetlen sejtvonal, amelyben a fenti hatást nem figyeltük meg a HEK293 volt. A HEK293 sejtek jellemzője, hogy adenovírusal transzformált, amelyekben az adenovírus E1A génterméke a retinoblasztóma fehérjéhez kötődve elnyomja annak sejtciklust gátló hatását. Mivel a retinoblasztóma fehérje (pRB) foszforiláció függő módon szabályozza az E2F transzkripciós faktor aktiválását, felvetődött annak a lehetősége, hogy a MYPT1 esetleg a pRb foszforilációs szintjét szabályozza. Felülrétegzési kísérletekkel kimutattuk, hogy a pRB egy, a főbb foszforilációs helyeket is tartalmazó C-terminális fragmentumához MYPT1 N-terminális fragmentumai kötődnek [20]. A különböző MYPT1 mutánsokkal végzett kísérletekből arra következtetünk, hogy a kötődésben a MYPT1 104-511 aminosavakkal határolt szerkezeti régiójának lehet szerepe. További kísérleteinkben immunprecipitációval is igazoltuk a teljes hosszúságú pRb és MYPT1 kölcsönhatását THP-1 sejtekben, valamint a két fehérje sejtmagban történő részleges lokalizációját konfokális mikroszkópiával is kimutattuk (még nem közölt eredmények). Foszforilált pRb szubsztráttal végzett foszfatáz aktivitás mérésekkel bizonyítottuk, hogy a MYPT1-nek szerepe lehet a pRb defoszforilációjában (ld. 5. ábra a következő részben). Kimutattuk azt is, hogy a pRB és a MYPT1 foszforilációja is befolyásolja sejten belüli lokalizációjukat. THP-1 sejtekben foszfatáz inhibitor (CLA) hatására a MYPT1 a gátló helyeken foszforilálódik, valamint növekszik a pRB foszforilációs szintje is, ami az apoptotikus folyamatok gátlását eredményezi.

5. A miozin foszfatáz és a MYPT1 funkciójának vizsgálata: az enzim gátlása, a MYPT1 expresszió gátlása, MYPT1 fragmentek transzdukciója sejtekbe

5.1 MP gátlása MYPT-re specifikus antitesttel

Korábban kimutatták, hogy a MYPT N-terminális szakaszára specifikus antitest sejtekbe történő injektálásával növekszik a miozin könnyűlánc foszforilációja, amit a MP gátlásának tulajdonítottak [21]. Kísérleteinkben a MYPT különböző N-terminális régióira specifikus poliklonális antitesteket (anti-MYPT¹⁻³⁸, anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ és anti-MYPT⁴⁰⁻⁵¹¹) állítottunk elő és vizsgáltuk hatásukat a MP holoenzim és izolált PP1c aktivitására. Az antitestek közül az anti-MYPT¹⁻³⁸ és az anti-MYPT⁴⁰⁻⁵¹¹ gyakorlatilag nem befolyásolta (nincs bemutatva), ezzel szemben az anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ gátolta a holoenzim, de nem befolyásolta a katalitikus alegység miozin foszfatáz aktivitását (5. ábra).



5. ábra MYPT1-re specifikus antitest hatása a miozin foszfatáz holoenzim (MPH) és a katalitikus alegység (PP1c) aktivitására. A miozin foszfatáz aktivitás meghatározásához foszforilált 20 kDa miozin könnyűláncot alkalmaztunk szubsztrátként. A pRb foszfatáz aktivitás meghatározásához a foszfoszubsztrátot úgy állítottuk elő, hogy maltóz-kötő fehérjével expresszált rekombináns retinoblasztóma fehérje fragmentumot CDK4/ciklinD1 komplexel foszforiláltunk.

A MYPT1, mint a MP „célra irányító alegysége”, növeli a PP1c miozin foszfatáz aktivitását. Az adataink tehát arra utalnak, hogy az anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ a MYPT ezen célra irányító (targeting) funkcióját gátolja, ezért alkalmas lehet a MYPT1 funkciójának vizsgálatára új MP szubsztrátok defoszforilációjában. Ezzel összhangban azt találtuk, hogy az anti-MYPT¹⁻²⁹⁶ gátolja a foszforilált retinoblasztóma fragment defoszforilációját is, feltehető tehát, hogy a MYPT1 targeting funkciót lát el ezen szubsztrát esetén is.

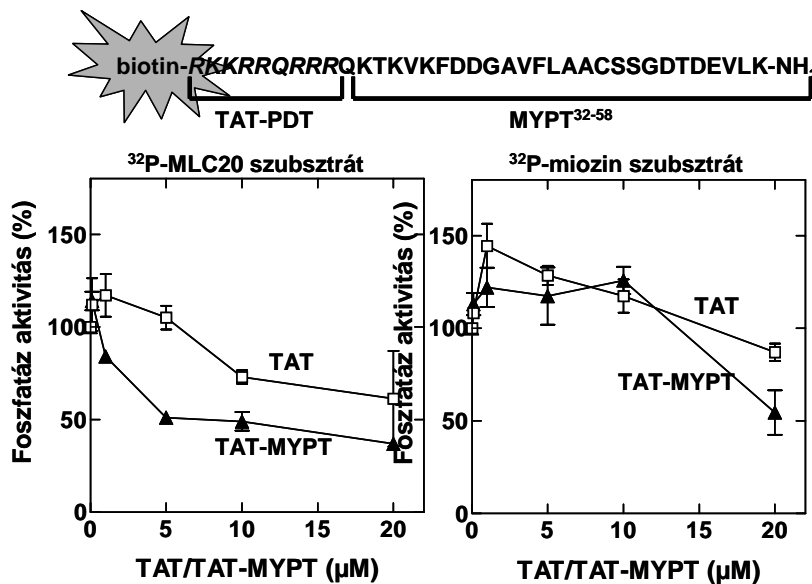
5.2 A PP1 és PP2A új inhibitorának (gallotannin) azonosítása

Kimutattuk, hogy a gallotannin gátolja a PP1c és a PP2Ac enzimek aktivitását is [22]. A PP1c gátlása alacsonyabb gallotannin koncentrációknál (IC₅₀~2 mikromol) figyelhető meg, míg PP2A esetén ez csak magasabb koncentrációnál (IC₅₀~50 mikromol) következik be. Igazoltuk, hogy a gátlás MP holoenzimen is érvényesül, amikor a PP1c a MYPT1 alegységhez kapcsolódik. A gallotannin A549 sejtekben gátolja kemokinek és citokinek

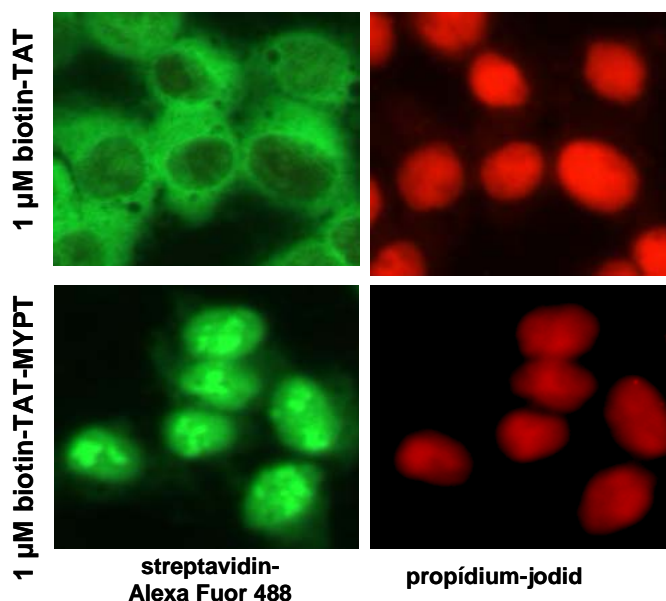
expresszióját is, amely során a MAP-kináz és szubsztrátjainak fokozott foszforilációja is megfigyelhető. Lehetséges, hogy a fehérjék fokozott foszforilációjában a gallotannin PP1 és PP2A enzimekre kifejtett gátló hatásának is szerepe lehet, habár e szabályozási lehetőség pontos molekuláris háttere még feltárandó.

5.3 TAT-MYPT1 peptidek transzdukciója A7r5 sejtekbe

A PP1c és a MYPT1 N-terminális fragmentumának röntgenkristallográfiai elemzése azt igazolta [23], hogy a MYPT1³²⁻⁵⁸ régió fontos szerepet játszhat a PP1c-hez történő kötődésben és esetleg a peptid alkalmas lehet a holoenzim disszociációjára és ezzel a MYPT1 célra irányító funkciójának szabályozására. Ezért a peptidet TAT transzdukciós doménnel és biotinnal kapcsolva szintetizáltattuk a peptid sejtekbe való bejuttatásához és sejten belüli lokalizációjának azonosításához (6. ábra).



6. ábra (felső) A TAT és TAT-MYPT peptidek hatása a MP holoenzim aktivitására foszforilált 20 kDa miozin könnyűlánc és teljes miozin szubsztráttal.



6. ábra (alsó) A TAT és TAT-MYPT1 peptidek transzdukciója A7r5 sejtekbe.

A TAT-MYPT1 peptid azonban a várakozással ellentétben csak kismértékben és viszonylag magas koncentrációban gátolta a MP holoenzim aktivitását [24]. További zavaró tényező, hogy maga a TAT peptid is gátolja az enzim aktivitását. A 6. ábrán bemutatott immunfluoreszcencia felvételek arra utalnak, hogy a TAT-MYPT1 peptid könnyen permeál a sejtmembránon és a sejten belül elsősorban a sejtmagban lokalizálódik. Ezzel szemben a TAT peptid a citoplazmában dúsul fel, de hosszabb inkubációs idő után megjelenik a sejtmagban is.

Eredményeink arra utalnak, hogy a TAT transzdukciós peptiddel történő kapcsolat alkalmas módszer lehet szabályozó peptidek sejtekbe történő bejuttatására, de egyben felhívják a figyelmet arra is, hogy a transzdukciós domén, valamint a sejten belüli lokalizáció is módosíthatja ezen peptidek hatását.

A kutatási tervben leírtaknak megfelelően megkíséreltük a Chariot fehérje transzdukciós kit alkalmazását is a tiofoszforilált CPI-17 sejtekbe történő transzportjának elősegítésére és ezzel a MP specifikus gátlásának elősegítésére. Ezek a kísérletek azonban nem bizonyultak sikeresnek, mivel nem tapasztaltuk a CPI-17 feldúsulását a sejtekben.

Egyéb, a témához nem közvetetten kapcsolódó eredmények

NO-szintetáz indukciójának vizsgálata betegségekben: az eNOS és a MYPT1 lehetséges kölcsönhatásának tanulmányozása

Az NO/cGMP jelátviteli útvonalak szerepet játszhatnak a miozin foszfatáz szabályozásában is (ld. 1. 2 pontnál leírtakat). Egy klinikai kutatásokat végző munkacsoporttal kollaborációban tanulmányoztuk az indukálható (iNOS) és endotéliás (eNOS) expresszióját egészséges kontroll és gyulladással szövetekből kimetszett biopsziákban [25, 26]. Az eredmények arra utalnak, hogy gyulladással szövetekben az iNOS szintje megemelkedik, ami immunhisztokémiai módszerekkel és immunoblottal is kimutatható, azonban ezen változások mértéke a betegség típusától függően eltérő. Humán köldökzsinórból nyert endotél sejt kultúrákban tanulmányoztuk az eNOS sejtciklus függő expresszióját és lokalizációját. Az eNOS aktivitás foszforilációval szabályozható és tartalmaz olyan foszforilálható szekvenciaregionokat, amelyek esetleg a MP szubsztátjai lehetnek. Ezért előzetes kísérletekben GST-MYPT1 pull-down technikát, valamint anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶-tel való immunprecipitációt alkalmazva tanulmányoztuk a MYPT1 és az eNOS lehetséges kölcsönhatását. A kezdeti adatok a két fehérje kölcsönhatására utalnak, azonban ezek az eredmények még további megerősítésre várnak.

Az eredmények jelentősége

A protein foszfatázok szabályozásában fontos szerepe van a regulátor alegységek és inhibitor fehérjék foszforilációjának. Az általunk tanulmányozott miozin foszfatázok és a miozin foszfatáz foszforilációval szabályozó kinázoknak (pl. Rho-kináz, ILK) fontos szerepet tulajdonítanak a simaizmok és a sejtek kontrakciós folyamataiban. A pályázat kutatási tervének kidolgozása során kapott eredményeink hozzájárultak a miozin foszfatáz foszforilációval és fehérje-fehérje kölcsönhatásokkal történő szabályozásának behatóbb megismeréséhez, és utat mutattak a további szabályozási lehetőségek vizsgálatának tervezéséhez. A kontrakciós mechanizmusok és szabályozásuk ismeretének klinikai jelentősége sem lebecsülendő, mivel pl. az artériás és a vénás simaizmok összehúzódnak normál és patológiás elváltozások esetén is fontos szerepe van a vérellátás és a vérnyomás szabályozásában is. A kontrakciós folyamatokon túl a miozin foszfatázok a sejthalak-változás, migráció és motilitás szabályozásában is szerepe lehet, ennek kapcsán, pl. rákos sejtek metasztatikus képességét is befolyásolhatja. Ezért a fehérjék foszforilációs szintjét befolyásoló kinázok és foszfatázok működésének molekuláris szintű megismerése akár terápiás gyógyszerek felismerésének kiindulópontja is lehet.

A pályázat kidolgozása során kapott eredményeink egyik újdonsága, hogy a miozin foszfatáz nem-izom sejtekben számos, a kontraktilitástól eltérő sejtanyagot (pl. neuronális és sejtanyag fehérjék, ill. feltehetően mitokondriális fehérjék defoszforilációjával) is szabályozhat. Ezzel összhangban a miozin foszfatáz széleskörű és változatos lokalizációja az idegrendszerben a neurotranszmisszióban való szabályozó szerepet sejtet. A miozin foszfatáz asszociációja a retinoblasztóma fehérjével, ill. a retinoblasztóma fehérje defoszforilációjában játszott szerepe pedig arra utal, hogy az enzim a sejtciklust is szabályozhatja.

Mindezek az adatok alátámasztják a miozin foszfatáz, és ezen belül a MYPT regulátor alegység, sokoldalú szerepét a sejtanyagok szabályozásában. A további kutatások egyik célpontja olyan molekulák kifejlesztése lehet, amelyek szelektíven gátolják/aktiválják a miozin foszfatáz és ezzel lehetőséget adnak az enzim sejtanyagokat szabályozó szerepének mélyebb megértésére. Ezen kívül a MYPT fehérje-fehérje kölcsönhatásának további vizsgálata is érdekes eredményeket szolgáltathat az enzim újabb célpontjainak felismeréséhez.

A kutatás során megvalósuló nemzetközi együttműködések és hozzájárulásuk a téma kidolgozásához

Dr. David J. Hartshorne (University of Arizona, Muscle Biology Group): MYPT1-GFP expressziós konstruktok és antitestek biztosítása.

Dr. Masaaki Ito (1st Department of Internal Medicine, Mie University School of Medicine, Japan): MYPT1 expressziós konstruktok és antitestek előállítása.

Dr. Michael P. Walsh (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Smooth Muscle Research Group, University of Calgary, Canada): PKA és PKC enzimek, CPI-17 fehérje biztosítása.

Dr. Timothy Haystead (Department of Pharmacology and Cancer Biology, Duke University Medical Center, USA): -Anti-P-Ser695-MYPT antitest előállítása és izomkontrakciós kísérletek kivitelezése.

A kutatási témával kapcsolatos közlemények felhasználása tudományos fokozatok megszerzéséhez, a közlemények visszhangja

A témával kapcsolatos közlemények két doktorandusz hallgató PhD. fokozatának megszerzéséhez, valamint a témavezető MTA doktori fokozatának megszerzéséhez is hozzájárultak:

Kiss Enikő: Az integrinekhez kapcsolódó kináz szerepe a miozin foszfatáz szabályozásában. PhD értekezés, 2003.

Lontay Beáta: Miozin foszfatáz lokalizációja és szabályozása nem izom sejtekben. PhD értekezés, 2005.

Ezen kívül, a pályázati témában dolgozva **Borbíró István** molekuláris biológus hallgató védte meg diplomamunkáját, valamint **Dedinszki Dóra** molekuláris biológus, **Bátori Róbert** molekuláris biológus és **Márton Adrienn** orvostanhallgató tartott tudományos diákköri előadást és nyújtott be pályamunkát, valamint ezek a hallgatók eredményeiket felhasználják diplomamunkájuk elkészítésére is.

Kiss Andrea PhD hallgató e témában végzett sikeres kísérletei és eredményei alapján hamarosan benyújtja értekezését.

Az OTKA témaszám feltüntetésével megjelent közleményekre 2006. év végéig **125** alkalommal hivatkoztak.

IRODALOM

1. Ito, M., Nakano, T., Erdődi, F., Hartshorne, D. J.: Myosin Phosphatase: structure, regulation and function. *Mol. Cell. Biochem.* 259, 197–209 (2004)
2. Hartshorne, D. J., Ito, M., Erdődi, F.: Role of Protein Phosphatase Type 1 in Contractile Functions: Myosin Phosphatase. *J. Biol. Chem.* 279, 37211-37214 (2004)
3. Tóth, A., Kiss, E., Herberg, F.W., Gergely, P., Hartshorne, D. J., Erdődi, F.: Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance. *Eur. J. Biochem.* 267, 1687-1697 (2000)
4. Tóth, A., Kiss, E., Gergely, P., Walsh, M. P., Hartshorne, D. J., Erdődi, F.: Phosphorylation of MYPT1 by protein kinase C attenuates interaction with PP1 catalytic subunit and the 20 kDa light chain of myosin. *FEBS Lett.* 484, 113-117 (2000)
5. Kiss, E., Murányi, A., Csontos, C., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D. J., Erdődi, F.: Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton. *Biochem J.* 365, 79-87 (2002)
6. Murányi, A., MacDonald, J. A., Deng, J. T., Wilson, D. P., Haystead, T. A., Walsh M. P., Erdődi, F., Kiss, E., Wu, Y., Hartshorne, D. J.: Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem J.* 366, 211-216 (2002)
7. MacDonald, J.A., Eto, M., Borman, M.A., Brautigan, D.L., Haystead, T.A.J.: Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase. *FEBS Lett.* 493, 91–94 (2001)
8. Xia, D., Stull, J.T., Kamm, K.E.: Myosin phosphatase targeting subunit 1 affects cell migration by regulating myosin phosphorylation and actin assembly. *Exp. Cell Res.* 304, 506-517 (2005)
9. Takizawa, N., Niiro, N., Ikebe M.: Dephosphorylation of the two regulatory components of myosin phosphatase, MBS and CPI17. *FEBS Lett.* 515, 127 (2002)
10. Muranyi, A., Derkach, D., Erdodi, F., Kiss, A., Ito, M., Hartshorne, D.: Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: Inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett.* 579, 6611-6615 (2005)
11. Erdődi, F., Kiss, E., Lontay, B., Gergely, P., Murányi, A., Walsh, M.P., Hartshorne, D.J.: A miozin foszfatáz szabályozása: alternatív mechanizmusok és ellentmondások. MBKE II. Jelátviteli Konferencia, Hőgyész (2003)
12. Kiss, A., Kiss, E., Hartshorne, D.J., Erdődi, F.: A miozin foszfatáz foszforilációja Rho-kináz és protein kináz-A enzimekkel. MBKE II. Jelátviteli Konferencia, Hőgyész (2003)
13. Wooldridge, A., MacDonald, J. A., Erdődi, F., Ma, C., Borman, M. A., Hartshorne, D. J., Haystead, T. A.: Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of Threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem.* 279, 34496-345004 (2004)
14. Lontay, B., Kiss, A., Gergely, P., Erdődi, F.: Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell. Signalling* 17, 1265-1275 (2005)

15. Erdődi, F., Kiss, E., Walsh, M. P., Stefansson, B., Deng, J. T., Eto, M., Brautigan, D. L., Hartshorne, D. J. : Phosphorylation of protein phosphatase type-1 inhibitory proteins by integrin-linked kinase and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 306, 382-387 (2003)
16. Eto, M., Kitazawa, T., Brautigan, D.L.: Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase-1 by regulatory subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 8888-8893 (2004)
17. Lontay, B., Serfőző, Z., Gergely, P., Erdődi F.: A miozin foszfatáz lokalizációja és szabályozása nem-izom sejtekben. MBKE II. Jelátviteli Konferencia, Hőgyész (2003)
18. Lontay, B., Serfőző, Z., Gergely, P., Erdődi, F.: Localization and possible functions of myosin phosphatase in neuronal cells. FASEB Summer Research Conferences, Snowmass Village, Colorado, USA (2004)
19. Lontay, B., Serfőző, Z., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D. J., Erdődi, F.: Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells. *J. Comp. Neurol.* 478, 72-87 (2004)
20. Wu, Y., Murányi, A., Erdődi, F., Hartshorne, D. J.: Localization of myosin phosphatase target subunit and its mutants. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 26, 123-134 (2005)
21. Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D.J., Sasaki, Y., Matsumura, F.: Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol.* 150, 797-806 (2000)
22. Erdélyi, K., Kiss, A., Bakondi, E., Bai, P., Szabó, C., Gergely, P., Erdődi, F., Virág, L.: Gallotannin inhibits the expression of chemokines and inflammatory cytokines in A549 cells. *Mol Pharmacol.* 68, 895-904 (2005)
23. Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T., Dominguez, R.: Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* 429, 780-784 (2004)
24. Kiss, A., Lontay, B., Erdődi, F.: Miozin foszfatáz szabályozó alegység TAT transzdukciós doménnal kapcsolt N-terminális peptidjének transzdukciója sejtekbe. VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger (2005)
25. Palatka, K., Serfőző, Z., Veréb, Z., Hargitay, Z., Lontay, B., Erdődi, F., Bánfalvi, G., Nemes, Z., Udvardy, M., Altorjay I.: Changes in the expression and distribution of the inducible and endothelial nitric oxide synthase in mucosal biopsy specimens of inflammatory bowel disease. *Scan. J. Gastroenterol.* 40, 670-680 (2005)
26. Palatka, K., Serfőző, Z., Veréb, Z., Bátori, R., Lontay, B., Hargitay, Z., Nemes, Z., Udvardy, M., Erdődi, F., Altorjay, I.: Effect of IBD on expression of inducible and endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *World J. Gastroenterol.* 12, 1730-1738 (2006)