

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Marko Lõoke

Tuumorsupressorvalgu p53 mõju CD43 ekspressioonile

Magistritöö

Juhendajad:
Lilian Kadaja-Saarepuu, *Ph.D.*
Prof. Toivo Maimets, *Ph.D.*

TARTU 2007

Sisukord

Sisukord	2
Kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus	4
Kirjanduse ülevaade	5
p53	5
p53 geen	5
p53 valgu struktuur	5
Aminoterminaalne regioon	6
Südamikudomeen	7
Karboksüterminus	8
p53 valgu aktiivsuse regulatsioon	9
p53 kui transaktivaator	10
p53 kui transrepressor	12
CD43	14
CD43 geen	14
CD43 valk	15
CD43 funktsioonid	16
CD43-vahendatud adhesioon	16
CD43-vahendatud signaaliülekanne	17
CD43 ja kasvajakud	18
Töö eesmärk	19
Eksperimentaalne osa	20
Materjal ja meetodika	20
Rakud ja nende kultiveerimine	20
Rakkude transfektsioon	20
Plasmiidid	21
Praimerid	21
Western blot	22
Apoptootiliste rakkude määramine	23
Rakkude analüüs läbivoolutsütomeetrial	24
RNA eraldamine	24
Northern blot	25
Lutsiferaasi reporter-analüüs	26
Kromatiini immuunosadestamine	26
Kvantitatiivne PCR	27
Tulemused	28
p53 mõjutab eksogeense CD43 valgu taset H1299 rakuliinis	28
p53 mõju CD43 valgu tasemele ei tulene rakkude apoptoosist	29
p53 alandab endogeense CD43 valgu taset H1299 rakuliinis	30
p53 alandab endogeense CD43 mRNA taset	31
CD43 ekspressiooni mõjutamiseks vajalikud p53 piirkonnad	34
p53 vähendab histoon H3 K14 atsetüeeritust CD43 promootori läheduses	38
p53 vastuselemendid CD43 geeni regulatoorsesel aladel	41
Arutelu	43
Kokkuvõte	49
Summary	50
Kasutatud kirjandus	51
Tänuavaldused	56

Kasutatud lühendid

AP - *alkaline phosphatase*, aluseline fosfataas
Apaf-1 - *apoptotic protease-activating factor 1*, apoptootilist proteaasi aktiveeriv faktor 1
ARF - *alternative reading frame*, alternatiivne lugemisraam
ATM - *ataxia telangiectasia mutated*, ataksia telangiektaasia muteeritud
ATR - *ATM-Rad3-related*, ATM-Rad3-sarnane
B2M - *β 2-microglobulin*, β 2-mikroglobuliin
Bax - *Bcl-2-associated X protein*, Bcl-2-seotud valk X
Bcl-2 - *B-cell lymphoma protein 2*, B-rakulise lümfoomi valk 2
BCIP - *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*, 5-bromo-4-kloro-3-indolüülfosfaat
Chk1 - *checkpoint kinase 1*, kontrollpunkti kinaas 1
Chk2 - *checkpoint kinase 2*, kontrollpunkti kinaas 2
EGFP - *enhanced green fluorescence protein*, täiustatud roheliselt fluorestseeruv valk
GADD45 - *growth arrest and DNA-damage inducible gene 45*, kasvupeatamise ja DNA-kahjustuse poolt indutseeritav geen 45
HDAC 1 - *histone deacetylase 1*, histooni deatsetülaas 1
hnRNP-K - *heterogenous nuclear ribonucleoprotein K*, heterogeenne tuuma ribonukleoproteiin K
Hdm2 - *human double minute 2*, inimese double minute 2
HPRT1 - *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1*, hüpoksantiin-guaaniin fosforibosüül transferaas 1
IMDM - *Iscove's modified Dulbecco's medium*, Iscove'i muudetud Dulbecco sööde
MAP4 - *microtubule associated protein 4*, mikrotuubuliga seondunud valk 4
MDM2 - *murine double minute 2*, hiire double minute 2
MHC I - *major histocompatibility complex 1*, suur koesobivuskompleks 1
mSin3a - *mammalian sin3a*, imetaja sin3a
Na-Bes - *N,N-2-hydroxy-2-amino-ethanesulphonacid*, N, N – 2-hüdroksüül-2-amino-etaansulfoonhape
NBT - *nitro blue tetrazolium*, nitrosinine tetrasool
NES - *nuclear export signal*, tuumaekspordi signaal
NF- κ B - *nuclear factor κ B*, tuumafaktor κ B
NLS - *nuclear localization signal*, tuumalokalisatsiooni signaal
p53AIP1 - *p53-regulated apoptosis-inducing gene 1*
PKC - *protein kinase C*, proteiinkinaas C
PVDF - *polyvinylidene fluoride*, polüvinülideendifluoriidfilter
RPA - *replication protein A*, replikatsioonivalk A
SDS - *sodiumdodecylsulphate*, naatriumdodetsüülsulfaat
SH3 - *Src homology domain 3*, Src homoloogia domeen 3
SV40 - *simian virus 40*, simian viirus 40
TAF - *TATA box-binding protein associated factor*, TATA-box valguga seonduv faktor
TBP - *TATA-box binding protein*, TATA-box-ga seonduv valk
TFIID - *transcription factor II D*, transkriptsioonifaktor II D

Sissejuhatus

p53 on enamasti rakutuumas lokaliseeruv transkriptsioonifaktorile iseloomulike omadustega valk, mis on rakule oluline eelkõige stressitingimustes (radiatsioon, onkogeneenne stress, toitainete puudus) ja ei ole hädavajalik normaalses rakutsükli ega organismi arengus üldisemalt. p53 aitab stressitingimustes ära hoida võimalikku kahjustatud rakkude jagunemist. Selleks võib p53 käituda nii transkriptsioonilise aktivaatorina kui ka transkriptsioonilise repressorina ja erinevaid geene mõjutades peatada rakutsükli või suunata suuremate kahjustustega raku apoptoosi. Fakt, et tuumorsupressorvalk p53 on ligikaudu pooltes inimese pahaloomulistes kasvajates muteerunud, kinnitab tema tähtsust kasvaja tekke pidurdamisel. Sellest funktsioonist tulenevalt ongi täheldatud funktsionaalse p53 kõrgendatud ekspressiooni just kasvajate, sealhulgas ka käärsoolekasvajate varastel arengujärkudel.

CD43 on enamike inimese vererakkude pinnal olev transmembraanne glükosüleeritud valk, mille peamiseks funktsiooniks vererakkudes on vahendada rakkudevahelisi interaktsioone ja osaleda ka rakkude jagunemisega seotud signaaliradades. Siiski ekspresseerub see eranditult leukotsüütide markeriks peetud valk ka mitmete käärsoole adenoomide ja kartsinoomide varajases arengujärgus, kuid mitte normaalses koes. Need andmed viitavad sellele, et CD43 võib omada olulist rolli kasvaja arengus, rikkudes apoptootilise mehhanismi või stimuleerides rakkude jagunemist.

Varasemalt on erinevates töödes näidatud p53 ja CD43 ekspressioonitaseme muutusi vererakkude küpsemisel. CD43 ekspresseerub eelkõige vererakkude proliferatsioonil (diferentseerumisel tema ekspressioon väheneb), samas kui p53 kõrgendatud ekspressiooni täheldatakse vereloome rakkude diferentseerumisel. Meie oma töögrupi varasemas töös on näidatud CD43 võimet ARF-sõltuvalt indutseerida p53 taseme tõusu, mille tulemusena viiakse rakud apoptoosi. Samas p53 või ARF puudumisel stimuleerib CD43 kasvajakude jagunemist. Need andmed viitavad teatava seose esinemisele CD43 ja p53 vahel. Sellest sõltuvalt ongi käesolev töö suunatud p53 rolli uurimisele CD43 ekspressiooni mõjutajana.

Töö kirjanduse osas antakse ülevaade valkudest p53 ja CD43. Iseloomustatakse nende ekspressiooni ning kirjeldatakse nende põhilisi bioloogilisi funktsioone. Eksperimentaalses osas uuritakse kas ja mis mehhanismi abil võiks p53 CD43 ekspressiooni mõjutada.

Kirjanduse ülevaade

p53

p53 geen

Inimese genoomis esineb p53 geen ühes korduses ja lokaliseerub 17. kromosoomi lühikesse õlga (17p13) (McBride et al., 1986; Miller et al., 1986). Geen võtab enda alla umbes 20 kb suuruse DNA lõigu ja koosneb 11 eksonist, millest esimene on mittekodeeriv (Benchimol et al., 1985; Bienz et al., 1984; Reisman et al., 1988). p53 mRNA on inimese rakkudes 2,8 kb suurune (Harlow et al., 1985; Zakut-Houri et al., 1985).

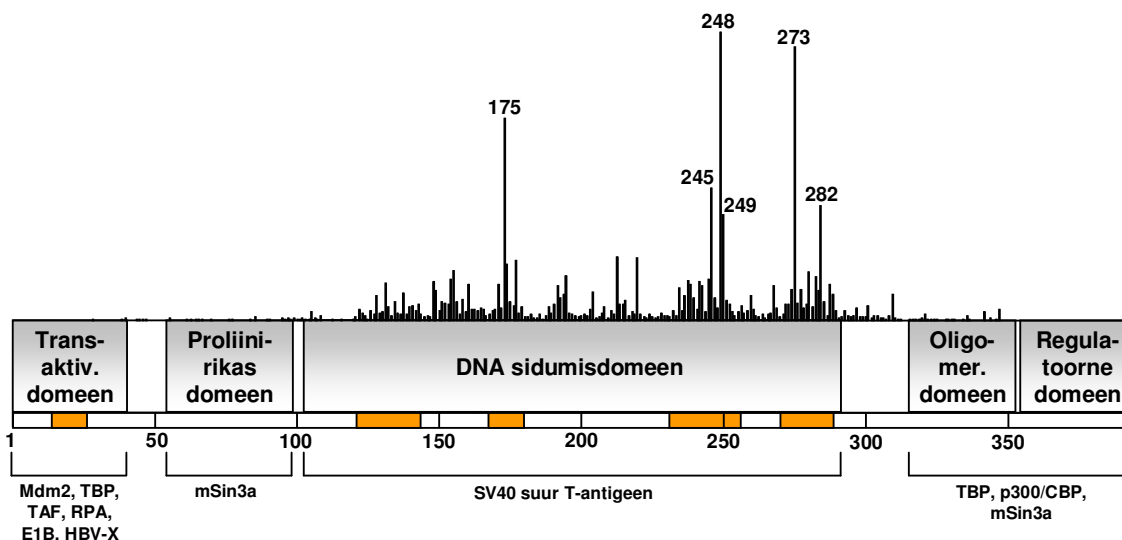
Fülogeneetiliselt on p53 geenis eristatavad viis kõrgelt konserveerunud piirkonda (koodonid 13-23, 117-142, 171-181, 234-258 ja 270-286) (joonis 1) (Soussi et al., 1990; Soussi & May, 1996). Neli neist asuvad eksonites, mis vastavad p53 valgu DNA-ga seonduvale osale ja üks teises eksonis, mis on transaktiivatsiooni domeeni osa. Seega on enamik konserveerunud koodoneid koondunud just p53 valgu DNA-ga seondumise alasse (Cho et al., 1994).

p53 valk puudub või on muteerunud umbkaudselt pooltes inimese pahaloomulistes kasvajates (Hollstein et al., 1994). Hoolimata arvukatest võimalikest mutatsioonidest (p53 geeni 393 koodonist 222 on erinevate mutatsioonide sihtmärgiks), on inimese kasvajates eristatavad kuus enamlevinud mutatsiooni koodonites 175, 245, 248, 249, 273 ja 282 (Joonis 1) (Cariello et al., 1994). Muteerunud koodonid ja muteerumise sagedus on aga kasvaja tüübiti erinevad. Nii on inimese enamikes pahaloomulistes kasvajates üldiselt sagedamini muteerunud koodon 248, kitsamalt ajukasvajates aga hoopis koodon 273 (Rhodes et al., 1995).

p53 valgu struktuur

Inimese p53 valk koosneb 393-st aminohappe jäägist. Valgu ligikaudne molekulmass on ~53 kDa ja p53 valgu saab tinglikult jagada viieks funktsionaalseks domeeniks: transkriptsiooni aktivatsiooni domeen (aminohapped 1 – 42) ja proliinirikas domeen (aminohapped 60 – 97) valgu aminotermiinis, järjestus-spetsiifiline DNA sidumise domeen valgu keskosas (aminohapped 102 – 292) ning oligomerisatsiooni domeen (aminohapped 360

– 393) ja C-terminaalne reguleeriv domeen valgu karboksüterminuses (aminohapped 360 – 393) (Joonis 1) (Harlow et al., 1985; May & May, 1999; Zakut-Houri et al., 1985).



Joonis 1. Skemaatiline kujutis p53-st. Joonise üllemisel osal on näidatud inimese kasvajasagedamini esinevad mutatsioonid (tulba kõrgus vastab mutatsiooni esinemissagedusele). Numbrid tähistavad vastavat koodonit. Oranžiga on näidatud fülogeneetiliselt konserveerunud piirkonnad. Samuti on näidatud erinevate p53 piirkondadega seonduvad valgud.

Aminoterminaalne regioon

p53 aminoterminaalsetes osades on transkriptsiooni aktivatsiooni ja proliinirikas domeen. Transaktivatsiooni domeeni moodustavad p53 valgu esimesed 42 aminohappejääki. Oma iseloomult on p53 transaktivatsiooni domeen struktureerimata (Bell et al., 2002; Dawson et al., 2003; Lee et al., 2000). Väheine struktureeritus on iseloomulik ka paljudele teistele transkriptsiooni aktivatsiooni domeenidele (Dyson & Wright, 2002). Erinevate modifikatsioonide tagajärjel ja/või teiste valkudega seostumisel stabiliseeruvad p53 transkriptsiooni aktivatsiooni domeenis erinevad substruktuurid ja selliselt on võimalik genereerida võrdlemisi lai spekter erinevaid seostumismotiive omakorda uute sihtmärkmolekulide kõrgeendatud sidumiseks (Chene, 2003; Geddie et al., 2005).

p53 transaktivatsiooni domeeniga seonduvad TFIID (*Transcription Factor II D*) komponendid TBP (*TATA-box binding protein*) ja TAF (*TBP-associated factor*) valgud (Lu & Levine, 1995), mis soodustavad p53-sõltuvat transkriptsiooni aktivatsiooni. Selle alga seostuvad ka transkriptsiooni inhibeerivad adenoviiruse valk E1B-55kDa ja HBV-X (hepatiit B viiruse X valk) (Oliner, 1993; Yew & Berk, 1992). Samuti on üheaheelalise DNA-ga seonduva valgu RPA (*replication protein A*) seondumiskoht p53 aminoterminuses

(aminohapped 40-57). RPA bioloogiline roll on tagada korrektne p53-st sõltuv vastus DNA kahjustustele (Dutta et al., 1993). Oluline on veel märkida, et ka interaktsioon p53 ja tema regulaatorvalgu Hdm2 (*human double minute 2*) (hiires Mdm2, *mouse double minute 2*) vahel toimub p53 transaktivatsiooni domeeni kaudu (Chen et al., 1993; Freedman et al., 1997; Oliner et al., 1993; Picksley et al., 1994).

Teiseks funktsionaalseks domeeniks p53 aminoterminaalses osas on proliinirikas domeen, mille moodustavad aminohapped 63-97. See domeen sisaldab SH3-märklajärjestust (Src homologne domeen 3), mida SH3 domeeni sisaldavad valgud on võimelised siduma (Mayer & Gupta, 1998). Proliinirikas domeen on vajalik eelkõige p53-vahendatud apoptoosi induktsiooniks, samas ei mõjuta proliinirikka regiooni deletsioon p53 sõltuvat transaktivatsiooni mitmetelt olulistelt sihtmärkgeenidelt nagu p21, Mdm2 ja Bax (*Bcl-2-associated X protein*), kuid muudab oluliselt transkriptsiooni repressiooni mustrit (Sakamuro et al., 1997; Walker & Levine, 1996; Venot et al., 1998). p53 proliinirikka domeeniga seondub p53-vahendatud transrepressioonis oluline valk mSin3a (Ho & Benchimol, 2003).

p53 aminoterminaalse ala post-translatsiooniliste modifikatsioonide tulemusena (peamiselt fosforüleerimine) ja interaktsioonidel teiste valkudega, moduleeritakse suures osas ka p53 aktiivsust ja ekspressioonitaset rakus (Banin et al., 1998; Liu et al., 2001).

Südamikudomeen

Südamikudomeeni moodustavad aminohapped 102 - 292 ja selle abil seostub p53 järjestusspetsiifiliselt DNA-ga. Erinevalt transaktivatsiooni domeenist on südamikudomeen stabiilne ja hästi struktureeritud. p53 valgu kristallide röntgenograafilisel analüüsil on kindlaks tehtud, et südamikudomeenis moodustub üks *β-sandwich* struktuurelement, mis koosneb kahest antiparalleelsest β-lehest (hüdrofoobne südamik). Viimane hoiab koos kolme *loop-based* elementi (kahte suurt *loopi* L2, L3 ja *loop-sheet-helix* motiivi), mis moodustavad otseselt DNA-ga seostuva struktuuri (Cho et al., 1994). Oluline on veel märkida, et nende *loop-based* elementide valguline järjestus kattub peaaegu täielikult p53 valgu keskosa evolutsiooniliselt konserveerunud regioonide järjestustega, kust on leitud ka enamus kasvajates esinevatest p53 mutatsioonidest. p53 südamikudomeen on lisaks stabiliseeritud ka tsiingiioonide poolt ning tsiingi puudumisel ei ole südamikudomeen normaalselt pakkunud (Verhaegh et al., 1998; Verhaegh et al., 1997).

p53 tunneb ära 10 aluspaari pikkust DNA konsensusjärjestust: RRRCWWGYYY (R - A/G, W - A/T, Y - T/C). Antud konsensusjärjestus peab sihtmärk DNA-l olema kahe koopiana, mis on teineteisest eraldatud 0-13 nukleotiidiga (el-Deiry et al., 1992). Inimese genoomis on teada üle 500 lookuse kuhu p53 on võimeline seostuma, aga vähesed neist p53 seostumissaitidest vastavad täpselt konsensus-järjestusele (Qian et al., 2002; Wei et al., 2006). Lisaks sellele on kirjeldatud p53 seostumine ka konsensusjärjestusega vähest sarnasust omavatele DNA elemendile, mis on oluline p53 vahendatud transrepressioonis (Johnson et al., 2001).

Ajalooliselt p53 avastamisega seoses on oluline märkida, et p53 tsentraalse regiooniga seostub SV40 (simian virus 40) suur T antigeen (Jenkins et al., 1988).

Karboksüterminus

Karboksüterminaalses osas on p53 valgul oligomerisatsiooni domeen ja regulatoorne domeen (joonis 1). Oligomerisatsiooni domeeni abil moodustab p53 valk stabiilseid tetrameere (Arrowsmith & Morin, 1996). Kuigi ka monomeersel p53-l on DNA sidumise, transkriptsiooni aktivatsiooni ja kasvajakarude kasvukiiruse pidurdamise võime, moodustab stabilised komplekse DNA-ga vaid p53 tetrameerne vorm (Friedman et al., 1993; Jeffrey et al., 1995; Nagaich et al., 1999; Shaulian et al., 1993). Olukorras, mil rakus on muteerunud vaid üks p53 alleelidest, võivad moodustuda heterotetrameersed valgud mutantsete ja metsiktüüpi p53 monomeeride vahel. Sellises olukorras on mutantsed p53 valgud võimelised dominant-negatiivselt inaktiveerima wt-p53 transkriptsioonilist aktiivsust (Joers et al., 1998; Milner, 1994; Milner & Medcalf, 1991; Milner et al., 1991).

p53 normaalse funktsioneerimise tagamiseks on vajalik tema lokaliseerumine rakutuuma. Selleks on p53 valgu karboksüterminaalses osas kolm tuumalokalisatsiooni-signaali (aminohapped: NLS I - 316-325, NLS II - 369-375, NLS III - 379-384) (Dang & Lee, 1989; Shaulsky et al., 1991). On näidatud, et tuuma liikumiseks kasutab p53 mikrotoubulite võrgustikku ja seondub düneiiniga (Giannakakou et al., 2002; Giannakakou et al., 2000). p53 valgu eksport tuumast toimub tänu kahe ekspordisignaali olemasolule. Neist üks, NES II asub samuti karboksüterminuses tetramerisatsiooni domeenis (aminohapped 339-352) ja teine, NES I valgu aminotermiinis transaktivatsiooni domeenis (aminohapped 11-27) (Stommel et al., 1999). Lisaks tuumast väljumise signaalidele mõjutab p53 eksporti tuumast ka Mdm2 (Freedman & Levine, 1999; Zhang & Xiong, 2001).

p53 regulatoorne domeen toimib järjestus-spetsiifilise DNA-ga seondumise negatiivse regulaatorina (Abarzua et al., 1996; Hupp et al., 1992; Shaw et al., 1996). Regulaatorse domeeni DNA sidumist takistav efekt kaob peale positsiooni seriin 392 fosforüeerimist või C-terminaalsete lüsiinijääkude atsetüleerimist (Hupp & Lane, 1994; Hupp et al., 1992; Luo et al., 2004; Sakaguchi et al., 1998). On välja pakutud, et regulatoorne domeen lukustab p53 südamik domeeni latentsesse konformatsiooni ja avab selle alles sobivate modifikatsioonide korral (Hupp & Lane, 1994).

p53 valgu aktiivsuse regulatsioon

Kuna mittestressitingimustes võib p53 osutada rakule asjatult toksiliseks, peab tema aktiivsus olema kindlalt kontrollitud. p53 aktiivsuse kontroll on tagatud peamiselt valgu tasandil, läbi mitmete post-translatsiooniliste modifikatsioonide ja seostumise mitmete tema stabiilsust, lokalisatsiooni ja aktiivsust reguleerivate valkudega (Appella, 2001; Prives & Hall, 1999).

p53 valgus on 17 seriini ja treoniini aminohappejääki, mida võidakse fosforüeerida. p53 türosiinide fosforüeerimist kirjeldatud ei ole (Bode & Dong, 2004; Steegenga et al., 1996). Peamisteks kinaasideks, mis fosforüeerimise kaudu p53 aktiivsust moduleerivad on ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) ja ATR (*ATM- and Rad3 related protein kinase*) kinaasid. ATM kinaas, mis aktiveeritakse peamiselt DNA kahjustuste ja ioniseeriva kiirguse tagajärjel aktiveerib omakorda ka kinaasi Chk2 (Steegenga et al., 1996). ATM ise fosforüeerib p53 seriin 15 positsiooni, Chk2 aga seriin 20 positsiooni. Mõlemate positsioonide fosforüeerimine stabiliseerib p53 valku ja samuti tõstab p53 afiinsust kindlatele promootorjärjestustele (Helt et al., 2005a; Helt et al., 2005b). ATR kinaas koos enese poolt aktiveeritud kinaasiga Chk1 fosforüeerivad p53 erinevatest positsioonidest vastusena ultraviolettkiirgusele (Caspari, 2000). Lisaks on aminoterminalsete alade fosforüeerimist positsioonidest seriin 33 ja seriin 46 kirjeldatud vastusena onkogeense ras valgu ekspressioonile MAPK-sõltuvalt (*mitogen activated protein kinase*), mille eelduseks on eelnev seriin 15 fosforüeerimine (Bulavin et al., 1999).

p53 lühike eluiga kahjustamata rakus saavutatakse peamiselt tänu tema aktiivsele lagundamisele proteasoomses rajal. Selleks on aga vajalik ubikvitiini liitmine p53 karboksüterminaalsetele lüsiinijääkidele (Freedman & Levine, 1999; Jesenberger & Jentsch, 2002; Zhang & Xiong, 2001). p53 ubikvitinüleerimise eest vastutab tema antagonist, Mdm2

(Fang et al., 2000). Madal Mdm2 tase rakus kutsub esile p53 monoubikvitinüleerimise ja p53 ekspordi tuumast tsütoplasmasse. Kõrge Mdm2 tase rakus aga viib p53 poliubikvitinüleerimiseni ja p53 lagundamiseni rakutuumas (Li et al., 2003). Kuna Mdm2 geeni promootoralas on kaks p53 poolt aktiveeritavat vastuselementi, siis moodustub p53 ja Mdm2 vahel negatiivse tagasiside ling, mis kontrollib mõlema valguga taset rakus (Freedman et al., 1997; Juven-Gershon & Oren, 1999). Seandumisel interakteeruvad p53 ja Mdm2 valkude aminoterminaalised osad (Chen et al., 1993; Freedman et al., 1997; Picksley et al., 1994). Mdm2 sidumisel moodustub struktureerimata p53 aminoterminaalises osas amfiipaatne α -heeliks, mille hüdrofoobne osa seondub Mdm2 hüdrofoobse sidumistaskuga (Dawson et al., 2003; Kussie et al., 1996; Lee et al., 2000). Kuna Mdm2 seondub p53 transaktivatsiooni domeeniga, inhibeerib see ka p53 transkriptsiooni aktivatsiooni võimet (Uesugi & Verdine, 1999).

Peale fosforüleerimisele ja ubikvitinüleerimisele on kirjeldatud p53 valgul veel terve rida erinevaid post-translatsioonilisi modifikatsioone. p53 atsetüleerimist teostavad histooni atsetülaasid p300/CBP ja PCAF, mis atsetüleerivad karboksüterminaalset lüsiinijääke, mõjutades selliselt eelkõige p53 transkriptsioonilist aktiivsust ja suurendades p53 võimet seonduda järjestusspetsiifiliselt DNA-ga (Barlev et al., 2001; Bode & Dong, 2004; Ito et al., 2001; Sakaguchi et al., 1998). Lisaks kirjeldatutele, on p53 puhul teada veel tema post-translatsioonilist O-glükosüleerimist, sumoüleerimist ja ADP-ribosüleerimist, mis võimendavad p53 transaktivatsiooni võimet (Gostissa et al., 1999; Shaw et al., 1996).

Onkogeense stressi korral on üheks p53 vastuse vahendajaks tuumorsupressorvalk ARF (p14ARF inimeses, p19ARF hiires) (Kamijo et al., 1998; Pomerantz et al., 1998; Sherr & Weber, 2000). Onkovalkude (c-myc, β -kateniin jne) ekspressioon viib ARF-i vahendusel ka p53 aktivatsioonini. ARF stabiliseerib p53 seondudes Mdm2-ga, hoides seda tuumakeses ja inhibeerides selle ubikvitiinligaasset aktiivsust (Honda & Yasuda, 1999; Weber et al., 1999). Samuti on näidatud ARF-i võimet soodustada p53 seriin 15 fosforüleerimist ATM kinaasi vahendusel (Li et al., 2004).

p53 kui transaktivaator

p53 takistab kasvajakrakkude jagunemist rakutsükli peatamise ja apoptoosi initsieerimisega. Nende protsesside käivitamiseks on p53 võimeline reguleerima teiste geenide transkriptsiooni. p53 reguleerib oma märklaudgeenide ekspressiooni nii transkriptsiooni aktiveerimise kui repressioonimise kaudu.

Aktiveerituna seondub tertameerne p53 järjestus-spetsiifiliselt DNA-ga ja võib aktiveerida transkriptsiooni interakteerudes transkriptsioonilise koaktivaatorite p300/CBP ja basaalseste transkriptsioonifaktoritega (Avantaggiati et al., 1997; Lill et al., 1997). P300/CBP ja PCAF on atsetülaasid, mis soodustavad p53 transkriptsiooni aktivatsiooni atsetüleerides nii histoone, kui ka p53 ennast (Bode & Dong, 2004; Gu & Roeder, 1997; Gu et al., 1997). Histoone atsetüleeritus avab kromatiini struktuuri ja võimaldab transkriptsiooni masinavärgi ligipääsu DNA-le. p53 atsetüleeritus aga soodustab tema järjestusspetsiifilist DNA-ga seondumist (Sakaguchi et al., 1998). p53 aktiveerib transkriptsiooni ka läbi aminoterminaalset alaga seonduvate üldise transkriptsioonifaktori TFIID komponentide TBP ja TAF valkude sidumise (Lu & Levine, 1995).

Inimese genoomis on kuni 300 potentsiaalset lookust, mis võiksid olla p53 poolt transaktiveeritavad (Tokino et al., 1994). Suuresti võib need geenid jagada kaheks. Ühe osa moodustavad geenid, mis osalevad rakutsükli bloki induktsioonis ja teise osa geenid, mis on vajalikud apoptoosi induktsiooniks.

Rakutsükli G1 ja G2 bloki indutseerimiseks aktiveerib p53 selliste geenide nagu p21 ja GADD45 (*Growth arrest and DNA damage protein 45*) transkriptsiooni (Cayrol et al., 1998; el-Deiry et al., 1994; Kastan et al., 1995; Zhan et al., 1999). G2 bloki induktsiooniks aktiveeritakse näiteks geenide GADD45 ja 14-3-3 σ transkriptsioon (Hermeking et al., 1997; Zhan et al., 1999).

Apoptoosi initsieerimiseks aktiveerib p53 sellised proapoptoosilised sihtmärkgeenid nagu Bax, Noxa, p53AIP1 (*p53 regulated Apoptosis-Inducing Protein 1*) ja Puma (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) (Miyashita et al., 1994; Nakano & Vousden, 2001; Oda et al., 2000a; Oda et al., 2000b). Need valgud lokaliseeruvad mitokondrisse ning indutseerivad tsütokroom c ja apoptoosi indutseeriva faktori AIF (*apoptosis protease-activating factor 1*) vabanemise. Vabanenud tsütokroom c moodustab kompleksis kaspas-9 ja Apaf-1'ga (*Apoptotic Protease Activating Factor 1*) apoptosoomi, mis lõikab ja aktiveerib efektor-kaspase (Zamzami & Kroemer, 2003). Apoptoosi tagajärjel raku DNA ja valgud lagundatakse ja pakitakse vesiikulitesse, mis fagotsüteerimisvõimeliste rakkude poolt organismist eemaldatakse (Fridman & Lowe, 2003).

p53-sõltuv transaktiivatsioon toimub valdavalt rakutsükli bloki indutseerimisel ja varajases apoptoosi järgus, p53 tingitud transrepressiooni esineb seevastu rohkem apoptoosi hilisemates etappides (Mirza et al., 2003).

p53 kui transrepressor

Lisaks transkriptsiooni aktiveerimisele on p53 võimeline ka transkriptsiooni represserima mitmetelt raku enese ja viiruslikelt promotoritelt (Ginsberg et al., 1991; Jackson et al., 1993; Kley et al., 1992; Mack et al., 1993; Seto et al., 1992). Samas on nende protsesside täpne molekulaarne mehhanism ja funktsionaalne tähtsus olnud pikka aega arusaamatu.

Praegusel hetkel arvatakse, et p53 transrepressioonivõime on vajalik eelkõige normaalseks apoptoosi toimumiseks. Näiteks suudavad teatud p53 transkriptsiooni aktivatsiooni defektsed valgud siiski apoptoosi indutseerida (Haupt et al., 1995; Kokontis et al., 2001; Ryan & Vousden, 1998). Paljudel juhtudel aga transrepressiooniks vajaliku p53 proliinirikka domeeni puudumisel ei ole p53 apoptoosi induktsiooniks võimeline, kuid suudab endiselt transkriptsiooni aktiveerida sellistelt geenidelt nagu p21, Mdm2, ja Bax (Haupt et al., 1995; Sakamuro et al., 1997; Walker & Levine, 1996; Venot et al., 1998). Lisaks sellele on teada, et selliste p53-e poolt represseritavate geenide nagu Bcl-2, surviviin, MAP4 (*Microtubule Associated Protein 4*), ja p202 üleekspressioon takistab p53-sõltuvat apoptoosi induktsiooni (Chiou et al., 1994; D'Souza et al., 2001; Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002; Murphy et al., 1996; Wang et al., 1993). Seega on p53-sõltuvaks apoptoosiks vajalik lisaks proapoptoetiliste geenide aktivatsioonile ka antiapoptoetiliste geenide repressioon.

p53 võimet transkriptsiooni represserida saab hetkel kirjeldada kolme erineva mudeli alusel. p53 võib takistada teiste transkriptsiooni aktivaatorite DNA-ga seostumist (1), takistada basaalse transkriptsiooni masinavärgi komponentide assambleerumist (2) või remodelleerida kromatiini (3).

p53 võib transaktivaatorite seostumise takistamiseks seostuda kas DNA-ga (takistada teiste transkriptsioonifaktorite seostumist) või teiste transkriptsioonifaktorite endiga. Näiteks APF (*alfa-fetoprotein*) geeni puhul seostub p53 oma seostumissaidile APF promotoralal ja takistab tugeva transkriptsiooni aktivaatori HNF-3 seostumist APF promotoralale (Crowe et al., 1999; Lee et al., 1999; Ogden et al., 2001). Sellist p53 ja teiste transkriptsioonifaktorite seostumissaitide osalist kattumist on teada ka teiste geenide puhul. Inimese DNA polümeraasi δ katalüütilise subühiku promotooril konkureerib p53 transkriptsioonifaktoriga SP1 (Li & Lee, 2001). Lisaks võib p53 seostuda ka SP1 endaga ja muuta tekkinud kompleksi transkriptsiooniliselt mitteaktiivseks (Borellini & Glazer, 1993). Teada on, et SP1 aktiivsust moduleerides represserib p53 veel mitmete valkude, nagu telomeraasi pöördtranskriptaasi, insuliini retseptori ja VEGF'i (vaskulaarne endoteeli kasvufaktor) ekspressiooni (Kanaya et

al., 2000; Zhang et al., 2000; Webster et al., 1996). Samaselt seostumisele transkriptsiooni faktoriga SP1 on näidatud ka p53 seostumine glükokortikoidi retseptoriga, östrogeeni retseptoriga ja hepatotsüütide transkriptsiooni-faktoriga HNF4 α 1 (Liu et al., 1999) (Maeda et al., 2002; Maiyar et al., 1997).

Lisaks teiste transkriptsiooni aktivaatorite aktiivsuse moduleerimisele võib p53 represseerida teatud geene ka läbi interaktsioonide üldiste transkriptsioonifaktoritega. Selliselt on represseeritud näiteks tsükliin B geen (Krause et al., 2000). Leitud on, et p53 seostub TBP (*TATA-binding protein*) ja TAF valkudega ja võib selliselt takistada normaalset transkriptsiooni initsiatsiooni (Farmer et al., 1996; Horikoshi et al., 1995; Seto et al., 1992; Thut et al., 1995; Truant et al., 1993). Näidatud on ka, et p53 on võimeline takistama TBP seostumist TATA elemendile (Ragimov et al., 1993).

p53 on võimeline transkriptsiooni represserima ka kromatiini remodelleerides. Teada on, et HDAC (histooni deasetülaasikompleks) inhibiitor TSA (trihhostatiin A) takistab mitmete geenide p53-sõltuvat transkriptsiooni repressiooni. Nii on see näiteks Map4, α -tubuliini ja surviviini puhul (Koumenis et al., 2001; Mirza et al., 2002; Murphy et al., 1999). Lisaks sellele on surviviini puhul teada, et p53 vähendab histoon H3 atsetüleeritust tema promootoralal (Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002). Map4 ja c-myc geeni puhul on näidatud ka p53 seostumine HDAC'ga korepressori mSin3a vahendusel (Ho et al., 2005; Murphy et al., 1999). Samuti on teada, et hüpoksia puhul (mis indutseerib peamiselt p53-sõltuvat transrepressiooni) sageneb p53 ja mSin3a komplekside teke (Koumenis et al., 2001). Nendest andmetest lähtuvalt võib oletada, et vähemalt teatud geenide puhul on p53-vahendatud transkriptsiooni repressioon tingitud kromatiini remodelleerimisest.

Tulenevalt kogu genoomi hõlmavatest ekspresiooniuuringutest, kasvab nii teadaolevate p53 aktiveeritavate, kui ka represseritavate geenide hulk pidevalt. Samas on selge, et p53 reguleerib rakulisi protsesse kasutades nii transrepressiooni kui ka transkriptsiooni aktivatsiooni. Nii on näiteks rakutsükli G2 arrest vahendatud nii GADD45 ja 14-3-3 σ transaktivatsioonist, kui ka tsükliin B, cdc25c ja cdc2 repressioonist (Innocente et al., 1999; Jung et al., 2001; Krause et al., 2001; Krause et al., 2000; Taylor et al., 2001; Yun et al., 1999).

Antud töö kontekstis on lõpetuseks oluline märkida, et p53 võib nii transkriptsioonilise aktivaatori- kui ka repressorina käitudes mõjutada väga suure hulga geenide ekspresiooni. Käesoleva töö eksperimentaalse osa raames on vaadeldud p53 mõju potentsiaalse onkogeeni CD43 ekspresioonile.

CD43

CD43 geen

CD43, tuntud ka kui leukosialiin või sialoforiin, on enamike inimese vererakkude pinnal olev tüüp I transmembraanne glükoproteiin (Carlsson & Fukuda, 1986; Fukuda & Carlsson, 1986). Esmalt arvati CD43 olevat spetsiifiline leukotsüütide marker, kuid hilisemad uuringud on näidanud, et ka paljud mittevarepärilolu vähirakkudest ekspresseerivad CD43. Näiteks ekspresseerub CD43 kooloni kartsinoomi rakuliinis COLO-205 (Baekstrom, 1997; Baekstrom et al., 1995). Lisaks COLO-205 rakuliinile on leitud, et CD43 ekspresseerub erinevates adenoomsetes ja kartsinoomsetes vähikudedes ja teistes mittevarepärilolu rakuliinides (Fernandez-Rodriguez et al., 2002; Santamaria et al., 1996; Sikut et al., 1997).



Joonis 2. CD43 geeni promootala. Näidatud on transkriptsiooni algussait (+1). Lisaks sellele on välja toodud promootalaga interakteeruvate valkude seondumiskohad.

CD43 geen lokaliseerub 16 kromosoomi (lookus: 16p11.2) ja sisaldab kahte eksonit, mida eraldab 378 aluspaari pikkune intron (Pallant et al., 1989; Shelley et al., 1989). Translatsiooni produkti kodeerib siiski vaid teine ekson (Shelley et al., 1990). CD43 geeni promootala on GC rikas ja seal on ka transkriptsioonifaktori SP1 sidumisjärjestus (Kudo & Fukuda, 1995). Transkriptsioon CD43 promootalilt on rangelt sõltuv metüleerimisest. CD43 mitteekspresseerivates rakkudes on promootor metüleeritud ja CD43 ekspresseerivates rakkudes metüleerimata. Veelgi enam, CD43 ekspressiooni on võimalik indutseerida teda mitteekspresseerivates rakkudes lisades DNA metüültransferaasi inhibiitorit 5-asatsütidini (Kudo & Fukuda, 1995). Metüülühmi siduv valk MeCP2 (*Methyl-CpG-Binding protein 2*) takistab SP1 transaktiveerivaid omadusi seondudes ise metüleeritud promootaliga (Kudo, 1998). Lisaks sellele on näidatud, et transkriptsioonifaktor Pura ja ribonukleoproteiin hnRNP-K (*Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein K*) represserivad kooperatiivselt transkriptsiooni CD43 geenilt (Da Silva et al., 2002).

CD43 valk

CD43 on tüüp I transmembraanne valk, mis koosneb 19 aminohappe pikkusest signaalpeptiidist valgu aminoterminuses, sellele järgneb 235 aminohappe pikkune ekstratsellulaarne domeen, 23 aminohappe pikkune transmembraanne domeen ja 123 aminohappe pikkune tsütoplasmaatiline ehk intratsellulaarne domeen (Pallant et al., 1989; Shelley et al., 1989).

CD43 ekstratsellulaarne domeen sarnaneb mutsiinidele ja sisaldab 46 seriinjääki ja 47 treoniinjääki, milledest paljusid O-glükosüleeritakse (Carlsson et al., 1986). Ekstratsellulaarsel domeenil on tänu 27-le seal sisalduvale proliinile võrdlemisi jäik struktuur. Sellest tulenevalt on CD43 võimeline moodustama raku pinnast kuni 45 nm kaugusele väljaulatuvaid struktuure (Cyster et al., 1991). CD43 sisaldab ka ühte N-glükosüleerimise saiti, milleks on asparagiin positsioonis 220 (Cyster et al., 1990). CD43 ekstratsellulaarse domeeniga seostuvad mitmed rakkude adhesiooni ja organismi immuunvastuse reguleerimisel olulised valgud nagu E-selektiin, ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), MHC-I (suur koosobivuskompleks 1) ja galektiin-1 (Fuhlbrigge et al., 2006; Rosenstein et al., 1991) (Baum et al., 1995; Stockl et al., 1996).

CD43 intratsellulaarne domeen on suhteliselt pikk ja oma järjestuse poolest evolutsiooniliselt konserveerunud (Cyster et al., 1990). Intratsellulaarses domeenis sisaldub 6 treoniinjääki ja 11 seriinjääki, mida võidakse potentsiaalselt fosforüleerida (Pallant et al., 1989; Shelley et al., 1989). Kindlasti fosforüleeritakse seriin 332 positsiooni proteiinkinaas C poolt (Piller et al., 1989). Lisaks sellele on karboksüterminaalne proliinirikas ala homoloogne SH3-märklaudjärjestusega (Pedraza-Alva et al., 1996). CD43 tsütoplasmaatiline osa seondub Src perekonna türosiin-kinaasidega ja β -kateniiniga (Andersson et al., 2004; Pedraza-Alva et al., 1996; Wang et al., 2000).

CD43-le on iseloomulik paljude posttranslatsiooniliste modifikatsioonide (peamiselt glükosüleerimine) esinemine. CD43 glükosüleerimise muster võib erineda erinevates rakkudes. Leukotsüütset päritolu rakkudes on CD43 molekulmass vahemikus 113 kDa – 135 kDa (Carlsson & Fukuda, 1986). Kooloni kartsinoomi rakuliinis COLO 205 on CD43 mass aga näiteks isegi suurem kui 200 kDa (Baeckstrom, 1997). CD43 glükosüleerimata prekursorimolekul liigub elektriväljas 54 kDa juures, kuigi arvutuslikult peaks prekursori molekulmass olema 38,4 kDa (Carlsson & Fukuda, 1986).

CD43 funktsioonid

CD43-le on omistatud väga erinevaid funktsioone. Kirjeldatud on tema osalemine immuunvastuse tagamisega seotud protsessides leukotsüütide aktivatsioonil, adhesioonil ja migratsioonil. Samuti on CD43 osaline rakkude jagunemise ja apoptoosi reguleerimises. Enamus CD43 funktsiooni kirjeldavaid töid on tehtud vererakkudes.

CD43-vahendatud adhesioon

Rakkude vahelisel interaktsioonil on CD43 puhul kirjeldatud nii tema anti- kui ka pro-adhesiivseid omadusi. CD43 antiadhesiooni on näidatud HeLa rakkude puhul, kus CD43 ekspressioon vähendab T-lümfotsüütide adhesiooni nendele (Ardman et al., 1992). Samuti on sarnaseid omadusi täheldatud *in vivo* katsetega. Transgeensetel hiirtel, kelle perifeersed B-lümfotsüüdid ekspresseerivad CD43, on T- ja B-rakkude vahelised interaktsioonid häiritud (Ostberg et al., 1996). Samuti on CD43-*knockout* hiirte T-rakkudel kõrgendatud võime siduda erinevaid ligande nagu fibronektiin, ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule type 1*), HIV-1 gp120 (*Human Immunodeficiency Virus*) (Manjunath et al., 1995). CD43 antiadhesiivseid omadusi seletatakse üldjuhul tema negatiivselt laetud ekstratsellulaarsete glükosüleeritud domeenide vahelise füüsilise tõukumisega (Fukuda, 1991).

Vastupidiselt CD43-*knockoutidele* on näidatud, et ICAM-1 on võimeline CD43-ga interakteeruma ja indutseerima adhesiooni T-rakkude ja antigeeni esitlevate rakkude vahel (Rosenstein et al., 1991). CD43 ja ICAM-1 vahendatud adhesiivseid omadusi on lisaks vereloome rakkudele näidatud ka mitmetes kartsinoomi kasvajakudedes (Ziprin et al., 2004). Lisaks ICAM-1-le võib CD43 seostuda ka mitmete teiste retseptormolekulidega, nagu E-selektiin, galektiin-1, MHC I ja selliselt tugevdada rakkudevahelisi kontakte (Baum et al., 1995; Fuhlbrigge et al., 2006; Zhang et al., 1997).

Lisaks eelnevatele esineb võimalus, et peale esialgset CD43 seostumist retseptorile võib initsieeruda vastav signaalirada, mis viib lõpuks rakkude agregeerumiseni (Ostberg et al., 1998). Selliseid CD43 erinevaid omadusi saab seletada tema erinevate posttranslatsiooniliste modifikatsioonidega (näiteks glükosüleerimine). Seega võivad erinevad CD43 vormid olla vastutavad erinevate adhesiivsete funktsioonide eest rakkude vahelisel interaktsioonil.

CD43-vahendatud signaaliülekanne

Peale rakkudevahelise adhesiooni reguleerimise osaleb CD43 ka mitmetes rakkude jagunemisega seotud signaaliradades, kus peamiseks vahendajaks on just CD43 valgu tsütoplasmaatiline domeen. Laboritingimustes on nende signaaliradade uurimisel kasutatud erinevaid monoklonaalseid antikehi, imiteerides CD43 seondumist tegelikele ligandidele. Selliselt on püütud välja selgitada CD43 osa nendes signaaliradades. Näiteks on leitud, et monoklonaalse antikeha L10-ne seondumine CD43-ga soodustab T-rakkude ja monotsüütide jagunemist proteiinkinaas C vahendatud signaaliraja kaudu (Piller et al., 1989; Silverman et al., 1989). CD43 vahendatud signaaliradade kaudu indutseeritakse transkriptsioonifaktorite AP-1 (*Activator Protein-1*), NF-AT (*nuclear factors of activated T-cells*), NF κ B (*nuclear factor κ B*) aktivatsioon T-rakkudes, mis arvatakse olevat samuti seotud PKC-st lähtuva signaalirajaga (Santana et al., 2000). Peale selle on näidatud, et CD43 seostub oma proliinirikka domeeni kaudu Fyn kinaasi SH3 domeeniga (Pedraza-Alva et al., 1996), mille tulemusena käivitub signaaliahel MAP kinaasi osalusel ning indutseeritakse erinevate valkude sh interleukiin-2 ekspressioon (Pedraza-Alva et al., 1998).

CD43 võib vahendada ka apoptootilisi signaale. CD43 pidev kõrgeenenud ekspressioon transgeensete hiirte küpsetes lümfotsüütides (kus CD43 tavaliselt ei ekspresseerita) põhjustab põrna suurenemist ja pikendab B-lümfotsüütide eluiga *in vivo*, mida saab seletada rakkude vähenenud tundlikkusega apoptoosi suhtes (Dragone et al., 1995). Samas on leitud, et jagunevate vereloome-eellasrakkude seostumine plastikule kinnitatud CD43 vastase monoklonaalse antikeha MEM-59-ga viis nad apoptoosi (Bazil et al., 1995). Sarnane tulemus saadi ka Jurkat rakkudega, kui kasutati monoklonaalset antikeha J393 (Brown et al., 1996), millega kaasnes ka NF κ B DNA-ga seostumise aktiivsuse langus. Samuti ilmnes müeloidset tüüpi eellasrakkudest pärit rakuliini TF-1 puhul monoklonaalset antikeha MEM-59 kasutades, et seondumine CD43-ga käivitas apoptoosiraja. Sellega kaasnes AP-1 DNA-ga seondumise aktiivsuse langus (Cermak et al., 2002).

Selliste üksteisele vastanduvate andmete esinemisel CD43-vahendatud signaaliradade lõpptulemustes, viib eeldatava järelduseni, et CD43-vahendatud vastus on sõltuv nii rakutüübist kui ka spetsiifilisest keskkonnast.

CD43 ja kasvajakud

Organismis esineb erineva molekulmassiga CD43 molekule, mis tuleneb nende erinevast O-glükosüleerimise astmest (Carlsson et al., 1986). Üks põhjusi, miks pikka aega CD43 ekspressiooni ei täheldatud väljaspool hematopoeetilisi rakke on tema erinev glükosüleerimise muster nendes rakkudes ja varasem glükosüleeritud vormide spetsiifiliste antikehade kasutamine (Baeckstrom et al., 1991).

Pärast uute, glükosüleerimisest mittesõltuvate antikehade kasutuselevõtmist leiti, et eranditult leukotsüütide markeriks peetud valk ekspresseerus ka mitmete käärsoole adenoomide ja kartsinoomide varajases arengujärgus, kuid mitte normaalses koes (Pimenidou et al., 2004; Sikut et al., 1999). Need andmed viitavad sellele, et CD43 võib omada olulist rolli kasvaja arengus, rikkudes apoptootilise mehhanismi või stimuleerides rakkude jagunemist (Dragone et al., 1995; Sikut et al., 1999).

CD43 valgu puhul on kirjeldatud tema intratsellulaarse domeeni eemaldamine proteaasse lõikamise tulemusena. See lõikamine on eeldatavalt sõltuv γ -sekretaas kompleksist, millele eelneb metalloproteaasne lõikamine ekstratsellulaarses domeenis. Selle tulemusena võib rakkudes esineda ka CD43 tsütoplasmaatiline domeen (Andersson et al., 2005). CD43 tsütoplasmaatilise domeeni kõrgendatud esinemine ongi iseloomulik just kasvajakudades leitud CD43-le. Lisaks sellele esineb intratsellulaarses domeenis funktsionaalne kaheosaline tuumalokalisatsioonisignaal, mis suunab selle rakutuuma. CD43 intratsellulaarne domeen interakteerub β -kateniiniga ja soodustab selle sihtmärkgeenide nagu c-myc ja tsükliin D1 ekspressiooni suurenemist (Andersson et al., 2004). Seega võib CD43 käituda kui rakkude jagunemist soodustav faktor.

Samuti on meie töögrupi varasemas töös näidatud, et CD43 indutseerib p53 ekspressioonitaseme suurenemise ja aktivatsiooni nii hiire kui inimese rakuliinides. See protsess toimub tuumorsupressorvalgu ARF vahendusel ja nendes rakkudes indutseeritakse apoptoos (Kadaja et al., 2004). Rakuliinides, kus puudub p53 või ARF soodustab CD43 üleekspressioon rakkude jagunemist, inhibeerides Fas-sõltuvat apoptoosi (avaldamata andmed publitseerimiseks esitatud käsikirjast). Seega võib CD43 valku käsitleda kui potentsiaalset onkogeeni, mille üleekspressioon kasvajakudades võib viia rakkude p53-vahendatud elimineerimiseni, mis on üks olulisemaid kasvajakate tekke ärahoidmise mehhanisme.

Töö eesmärk

Käesolev töö moodustab osa suuremast projektist, mille raames uuritakse CD43 rolli kasvaja tekkel. CD43 ekspresseerub käärsoole adenoomide ja kartsinoomide arengu algetapis (Sikut et al., 1997). Samuti on teada, et p53 akumulereerub erinevate kasvujate, sealhulgas ka käärsoolekasvajate arengu algfaasis, samas kui mutatsioonid p53 geenis ilmuvad suhteliselt hilisemas kasvaja arengujärgus (Mazars et al., 1991). Lisaks sellele on erinevates töödes näidatud p53 ja CD43 ekspressioonitaseme muutusi vererakkude küpsemisel. CD43 ekspresseerub eelkõige vererakkude proliferatsioonil (diferentseerumisel tema ekspressioon väheneb), samas kui p53 kõrgendatud ekspressiooni täheldatakse vereloome rakkude diferentseerumisel (Dragone et al., 1995) (Kastan et al., 1991). Meie töögrupi varasemates avaldatud töödes on juba näidatud, et leukotsüüdi markeri CD43 üle-ekspressioon põhjustab tuumorsupressorvalgu p53 akumulereerimise ja aktivatsiooni nii inimese kui hiire rakuliinides (Kadaja et al., 2004). Mainitud uurimistöö käigus märgati aga, et p53 ekspresseerivates rakkudes oli CD43 valgu tase madalam võrreldes p53 mitte-ekspresseerivate rakkudega. Nendest andmetest lähtuvalt tekkis huvi uurida kahe mainitud valgu vahelisi võimalikke seoseid.

Töö eesmärgid olid sellest lähtuvalt:

- Uurida, kas p53 mõjutab CD43 ekspressiooni?
- Uurida, mis mehhanismi abil võiks p53 CD43 ekspressiooni mõjutada?

Eksperimentaalne osa

Materjal ja meetodika

Rakud ja nende kultiveerimine

Töös kasutati inimese kopsukartsinoomi rakuliini H1299 (puudub endogeenne metsiktüüpi p53 valk) ja inimese kooloni adenokartsinoomi rakuliini COLO-205 (p53 mutantne, G266E) (O'Connor et al., 1997). Rakke kasvatati IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes, kuhu oli lisatud veise loote seerumit (FCS) 10% söötme kogumahust, penitsilliini (100 U/ml) ja streptomütsiini (0,1 mg/ml). Rakke kasvatati temperatuuril 37 °C ja kasvukeskkond sisaldas 5% CO₂-te.

Rakkude transfektsioon

1. H1299 rakkude transfekkeerimiseks kasutati PEI (polüetüleenimiin) reagenti ExGen 500 (*Fermentas*). Transfekkeerimisel lähtuti tootja juhendist. DNA : PEI suhe oli 1 µg DNA : 4,4 µl PEI. Päev enne transfektsiooni loeti 60 mm koekultuuri tassile 400 000 H1299 raku. EGFP helenduse alusel määrati läbivoolutsütomeetril ka transfektsiooni-efektiivsus, mis oli ~ 80 %.
2. COLO-205 rakuliini transfekkeerimiseks kasutati elektroporatsiooni. Ühe proovi tarvis koguti rakud ühelt 100 mm 70 % konfluentsusega koekultuuri tassilt. Rakud suspendeeriti 250 µl söötmes ja suspensioon viidi elektroporatsiooni küvetti (elektroodide vahega 4 mm). Rakususpensioonile lisati 50 µg *carrier* DNA-d, Na-BES'i lõppkonsentratsioon 5 mM ja soovitud kogus plasmidi. Elektroporaatori (Bio-Rad GenePulserXcell™) parameetriteks oli 220V (pinge langes eksponentsiaalselt) ja 1000 µF. Pärast elektriimpulsi rakendamist lasti segul seista 30 minutit toatemperatuuril ja rakud külvati 60 mm koekultuuri tassile. EGFP helenduse alusel määrati läbivoolutsütomeetril ka transfektsiooniefektiivsus, mis oli ~ 50 %.

Plasmiidid

Erinevate valkude ekspresseerimiseks kasutati kommertsiaalseid plasmiide, millesse oli eelnevalt kloneeritud vastavad cDNA järjestused. Metsiktüüpi p53-e ekspresseeriti plasmiidilt pCG-human-wtp53. CD43-e valgu ekspressiooniks kasutati konstrukti pQM-CD43wt-3F12, mis ekspresseerib täispikka CD43 valku, mille C-terminuses on spetsiifiline E2 Tag, mida tunneb ära vastav antikeha (*Quattromed*)(Kurg et al., 1999). Plasmiidilt pEGFP-N1 ekspresseeriti EGFP valku, mille abil määrati ka transfektsiooniefektiivsus. Erinevate p53 mutantsete valkude ekspressiooniks kasutati pCG plasmiidi. Mutantsete p53 valkude transaktivatsioonivõime uurimiseks kasutati plasmiidi pGL3-CyclinG-luciferase (saadud M. Oren'lt), kus lutsiferaasi geen on tsükliin G promootori korntolli all. Valgu p14ARF ekspressiooniks kasutati vektorit pCG-p14ARF. Transfekteeritavate plasmiidikoguste ühtlustamiseks kasutati tühja pCG plasmiidi.

Praimerid

Kõigi kasutatud praimerite tootja on *Sigma-Proligo*. CD43-e mRNA taseme analüüsimiseks kasutati primereid AGTGCTGCGTCCTTATCAGC (seondub CD43-e esimesse eksonisse) ja GGCTCGCTAGTAGAGACCAA (teises eksonis). Inimese genoomist saab nende praimeritega PCR'i reaktsioonil amplifitseerida 555 aluspaarise produkti kromosoomist 16 koordinaatidega 29582112-29582666. Tänu introni eemaldamisele amplifitseeritakse mRNA-lt aga 177 aluspaari pikkune produkt.

CD43-e mRNA analüüsil kvantitatiivse pöördtranskriptaas-PCR'iga kasutati tulemuste normaliseerimiseks GAPDH mRNA-d, mis amplifitseeriti praimeritega CTGGAAGATGGTGATGGGATT ja ATGTTCCAATATGATTCCACCCA. Nende praimeritega saab PCR'i reaktsioonil nii inimese genoomist kui ka GAPDH mRNA-lt amplifitseerida 99 aluspaari pikkuse produkti, mis kattub alaga 12. kromosoomist koordinaatidega 6516117-6516215.

Kromatiini immuunosadestamisel saadud proovides kasutati CD43 geeni uurimisel primereid GGCACCAATGGAAGTCCAAA ja GCCTTTGGTCTCTACTAGCGA, millega saab inimese genoomist amplifitseerida 157 aluspaarise produkti 16. kromosoomist koordinaatidega 29582643 – 29582799. Antud produkt on ~ 500 aluspaari kaugusel CD43 promootoralast. Kuna kromatiini immuunosadestamisel saadud DNA fragmentide keskmine pikkus oli ~ 500 aluspaari, siis iseloomustavad need praimerid ka CD43 promootorala (vt

kromatiini immuunosadestamine). Samades katsetes vaadeldi kontrollina ka p21-e geeni promootorala, mille amplifikatsiooniks kasutati primereid CTGTGGCTCTGATTGGCTTT ja AGGTCTCCTGTCTCCTACCA. Nende primeritega saadud 140 aluspaarine produkt on identne alaga 6. kromosoomist koordinaatidega 36752173 – 36752312. Ka siin kasutati tulemuste normaliseerimiseks samu GAPDH primereid (CTGGAAGATGGTGATGGGATT ja ATGTTCCAATATGATTCCACCCA).

Western blot

Rakkude lüüsimiseks koguti 15 ml tuubi nii kinnitunud (kasutades 0,025 % trüpsiini) kui ka suspensioonis olevad rakud. Seejärel tsentrifugeeriti rakususpensiooni kasutades raskusjõudu 200 g 5 minutit 4 °C juures, aspireeriti supernatant ning rakusademed koguti 200 µl PBS-is (*Phosphate Buffered Saline*). Suspensioon viidi 1,5 ml Eppendorfi tuubidesse ning tsentrifugeeriti raskusjõul 12000 g 12 sekundit toatemperatuuril. Rakusademed lüüsi lüüsipuhvris (159 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH8; 1% Triton X-100) 1 h jääl. Valgu kontsentratsioon lüsaatides määrati kasutades *BioRad* reagenti. ELISA plaadi kannusesse pipeteeriti 5 µl lüsaadi lahjendust, 75 µl mQ vett ja 20 µl *BioRad* reagenti, segu suspendeeriti ja määrati valguse neeldumine 620 nm juures kontrolli (sisaldab lüsaadi asemel lüüsipuhvri 1/6 lahjendust) suhtes. Saadud tulemuste põhjal arvutati lüsaadi mahud, milles oleks võrdne hulk koguvalku. Lõpuks lisati lüsaatidele kuuendik kogumahust 6xSDS-proovipuhvrit (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS, 10 % β-merkaptotanol, 20 % glütserool, 0,004 % broomfenoolsinine) ja segu kuumutati seejärel 5 minutit 100 °C juures.

Lüsaatides olevad valgud lahutati elektroforeesil 8-15%-gradient-SDS-polüakrüülamiidgeelis. Enne valkude ülekannet niisutati Bio Trace™ PVDF (polüvinüülideendifluoriid, *Gelman Laboratory*) filtrit metanoolis ja inkubeeriti koos geeliga 5 minutit ülekandepuhvris (48 mM Tris; 39 mM glütsiin; 0,037 % SDS; 20 % metanool). Ülekanne toimus 45 minutit konstantsel pingel (20 V) firma *Hoefor SemiPhor* ülekandemasinaga, mis võimaldab poolkuiva ülekannet. Lisavõimalusena kasutati ka kahte järjestikust ülekannet ühelt ja samalt geelilt, tänu millele oli võimalik samadest lüsaatidest analüüsida erinevaid sarnase molekulmassiga valke. Pärast ülekannet blokeeriti filter 5% lõssipulbri 0,05% Tween 20 lahusega PBS-s 4 °C juures üleöö.

Järgmisel päeval inkubeeriti filtrit 1 tunni jooksul primaarsete antikehadega 5% lõssilahuses. CD43 detekteerimiseks kasutati tsütoplasmaatilise domeeni vastast antikeha 4D2.A6 (hübriidomiliini supernatant) (Sikut et al., 1999) või E2-tag'i vastast antikeha

(lõppkonsentratsioon 0,2 µg/ml) (Kurg et al., 1999). p53 detekteerimiseks kasutati antikehi DO-1 (lõppkonsentratsioon 1,4 µg/ml) või 240 (lõppkonsentratsioon 1,5 µg/ml). Inimese p14ARF-i ja EGFP detekteerimiseks kasutati kommertsiaalseid antikehi (lõppkonsentratsioon 1 µg/ml) (*Abcam*). Kontrollimaks võrdset valgulahulka erinevatel radadel kasutati β-aktiini vastast antikeha (lõppkonsentratsioon 0,2 µg/ml) (*Abcam*). Seejärel pesti filtrit 0,05 % Tween 20 lahusega PBS-s 3x7 minutit loksutil. Sekundaarsete antikehadena kasutati CD43, p53 ja EGFP puhul hiire IgG vastast antikeha (lahjendusega 1/1000) (*LabAs*), millega oli konjugeeritud ensüümid peroksüdaas või aluseline fosfataas. p14ARF-i puhul kasutati sekundaarsete antikehadena jänese IgG vastast antikeha (lahjendusega 1/1000) (*Cell Signaling Technology*), millega oli konjugeeritud ensüüm peroksüdaas.

Tulemuste visualiseerimiseks kasutati erinevaid meetodeid sõltuvalt kasutatud ensüüm-konjugaadist sekundaarsel antikehal. Aluselise fosfataasi kasutamise korral inkubeeriti filtrit 10 minutit aluselise fosfataasi puhvris (100 mM Tris pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂). Tulemus visualiseeriti NBT (*nitro blue tetrazolium*) 50 mg/ml ja BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*) 50 mg/ml lahusega AP puhvris. Peroksüdaasiga ensüüm-konjugaadi puhul kasutati kommertsiaalset ECL+ (*Amersham*) substraatlahust, mida inkubeeriti filtril 5 minutit ja reaktsiooni käigus eralduv valgus eksponeeriti seejärel pimedas valgustundlikule filmile (*Fuji*).

Apoptoetiliste rakkude määramine

Apoptoetiliste rakkude hulga määramiseks koguti rakud 24 tundi pärast transfektsiooni 15 ml tuubi. Tuubi koguti nii kinnitunud (kasutades 0,025 % trüpsiini) kui ka suspensioonis olevad rakud. Seejärel tsentrifugeeriti rakuksuspensioon kasutades raskusjõudu 200 g 5 minutit 4 °C juures. Supernatant aspireeriti ja rakud pesti 3ml PBS-ga ning tsentrifugeeriti veelkord, kasutades raskusjõudu 200 g 5 minutit 4 °C juures. Pärast supernatandi aspireerimist suspendeeriti rakud 100 µl-s sidumispuhvris (10 mM Hepes/NaOH; pH 7,4; 140 mM NaCl; 5 mM CaCl₂), kuhu oli lisatud *Annexin V-PE* (anneksiin V-fükoerütriin, *Boehringer Mannheim*) sidumispuhvri suhtes kontsentratsiooniga 1/20-le ning inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril pimedas. Seejärel pesti rakke 1 ml sidumispuhvriga ja tsentrifugeeriti taaskord kasutades raskusjõudu 300 g 5 minutit 4 °C juures. Pärast supernatandi aspireerimist suspendeeriti rakusade 300 µl sidumispuhvris ja rakke analüüsiti kasutades läbivoolutsütomeetrit (*FACS calibur, BD Immunocytometry systems*).

Rakkude analüüs läbivoolutsütomeetril

Rakud koguti ja suspendeeriti 100 µl PBS'is (4 °C). Fikseerimiseks lisati suspensioonile vorteksil 500 µl 70 % etanooli (-20 °C) ja hoiti 5 minutit jääl. Seejärel pesti rakke 3,5 ml PBS-Tween-BSA (1 x PBS, 0,05 % Tween-20, 1 % BSA) seguga ja tsentrifuugiti raskusjõul 300 g 5 minutit 4 °C juures. Supernatant eemaldati, rakusade suspendeeriti 500 µl seerumiga söötmes, inkubeeriti 10 min 37 °C juures ja pesti uuesti PBS-Tween-BSA (1 x PBS, 0,05 % tween, 1 % BSA) seguga. Segu tsentrifuugiti taas kasutades raskusjõudu 300 g 5 minutit 4 °C juures, supernatant eemaldati ja sade suspendeeriti 100 µl PBS-Tween-BSA segus, milles oli 5 µg anti-CD43 L10 (*Caltag*) või 242 antikeha. Kontrollina kasutatud hiire p53 vastane antikeha 242 ei seostu inimese valkudega. Primaarse antikehaga inkubeeriti rakke 1 h. Seejärel pesti rakud 3,5 ml PBS-Tween-BSA seguga ja tsentrifuugiti kasutades raskusjõudu 300 g 4 °C juures. Sade suspendeeriti 100 µl PBS-Tween-BSA segus, milles oli sekundaarne antikeha *antimouse-FITC* (*Boehringer Mannheim*). Sekundaarset antikeha lahjendati PBS-Tween-BSA segus 1:20 ja sellega inkubeeriti rakke 45 minutit. Seejärel pesti rakud taas 3,5 ml PBS-Tween-BSA seguga, tsentrifuugiti 5 min raskusjõul 300 g 4 °C juures ja sade suspenderiti 300 µl külmas PBS'is. Sekundaarse antikehaga konjugeeritud fluorestseeruv märgis detekteeriti läbivoolutsütomeetril (*FACS calibur, BD Immunocytometry systems*).

RNA eraldamine

Rakud lüüsi koekultuuritassil 500 µl „lahuses D“ (4 M guanidiin-isotiotsüanaat, 25 mM naatriumtsitraat, pH 7, 0,5 % sarkosüül, 100 mM β-merkaptopetanol) ja saadud lüsaat koguti kasutades kummispaatlit. Lüsaadile lisati 50 µl 2M naatriumatsetaati (pH 4) ja segati korralikult. Seejärel lisati 500 µl fenooli (pH 4) ja 100 µl kloroformi ning segati taas. Segu hoiti 15 min jääl ja tsentrifuugiti seejärel kasutades raskusjõudu 10 000 g 4 °C juures. Pärast tsentrifuugimist viidi tekkinud vesifaas uude tuubi, lisati sellele 250 µl fenooli ja 250 µl kloroformi, hoiti taas 15 minutit jääl ja tsentrifuugiti uuesti 10 minutit kasutades raskusjõudu 10 000 g 4 °C juures. Tekkinud vesifaas sadestati sellega võrdse koguse isopropanooliga 20 min -20 °C juures ja RNA koguti tuubi põhja tsentrifuugides segu 10 minutit kasutades raskusjõudu 16 000 g, 4 °C juures. Viimaks pesti RNA sadet 70 % etanooliga, kuivatati ja RNA lahustati 50 µl vees.

Northern blot

Kasutades ensüüme Eco 105 I ja Xho I lõigati plasmiidist pcDNA-wtCD43 välja CD43 cDNA ja plasmiidist pGRMZ-b-actin ensüümiga Pst I β -aktiini cDNA. Tekkinud fragmendid lahutati 1 % agaros-TAE geelis, millele oli lisatud etiidumbromiidi (lõppkonsentratsiooniga 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Seejärel lõigati geelist välja 1613 aluspaari pikkune CD43-e ja 1200 aluspaari pikkune β -aktiini cDNA fragment. DNA fragmendid puhastati kasutates *NucleoSpin Gel Extraction Kit-i* (*Macherey-Nagel*) järgides tootja protokollit.

Radioaktiivse proovi sünteesiks kasutati *DecaLabel DNA Labeling Kit'i* (*Fermentas*), mille abil sünteesiti CD43 ja β -aktiini mRNA-dele komplementaarsed radioaktiivsed DNA proovid. Radioaktiivse märgisena lülitati DNA ahelasse ^{32}P - αCTP . Ensüümreaktsioonide lõpetamiseks lisati pärast sünteesi lõppu lahusele 100 μl 0,5M EDTA-d (etüleendiamiintetraatsetaat). Seejärel sadestati radioaktiivne DNA lisades segule 1 μl 0,5 YtRNA (pärmi tRNA, 50mg/ml), ammoniumatsetaati (lõppkonsentratsioon 2,5 M) ja kolm mahtu 96 %-list etanooli. Segu hoiti 15 minutit $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures ja seejärel tsentrifugeeriti 15 minutit kasutades raskusjõudu 14000 g. Sadestatud radioaktiivne DNA lahustati 100 μl 10 /1 TE-s.

Eraldatud RNA-st kanti igat proovi geelile 10 μg . Selleks lisati RNA-le kolm mahtu MOPS puhvrit (0,2 M MOPS, 20 mM naatriumatsetaat, 10 mM EDTA), 4 μl formaldehüüdi, 8 μl formamiidi ja inkubeeriti 10 minutit $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Seejärel lisati segule 2 μl foreesivärvi (50 % glütserool, 10 mM EDTA, 0,25 % BB, 0,25 % XCFF) ja RNA lahutati 1% agaros-formaldehüüdgeelis. Pärast elektroforeesi inkubeeriti geeli 15 minutit vees ja seejärel veel 15 minuti 10 x SSC-s (*saline-sodium citrate*, 1,5 M NaCl; 0,15 M naatriumtsitraat) ning RNA kanti üleöö 10 x SSC lahuses kapillaarse ülekande meetodil *Hybond-N* nitrotselluloosfiltrile. Seejärel fikseeriti RNA filtrile kovalentselt ultraviolettkiirguse abil ($1200\text{ J}/\text{m}^2$) ja pandi üheks tunniks prehübridisatsioonilahusesse (6 x SSC, 10 mM EDTA, 0,67 % SDS). Tunni möödudes lisati prehübridisatsioonisegule dekstraansulfaati (lõppkonsentratsioon 10 %), *carrier*-DNA (0,1 mg/ml) ning radioaktiivne DNA proov. Radioaktiivne DNA ja filtril olev RNA hübridiseerusid üleöö $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Pärast hübridisatsiooni pesti filtrit 2 x 30 minutit 2 x SSC, 2,1% SDS ning veel 2 x 30 minutit 0,2 x SSC, 2,1% SDS lahuses $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Radioaktiivne signaal detekteeriti filmil (*Fuji*) või fosfortundlikul ekspositsiooni plaadil (*Amersham*).

Lutsiferaasi reporter-analüüs

Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks proovides kasutati Luciferase Assay System Kit'i (*Promega*). Rakud lüüsi tassil vastavalt tootja juhistele. Seejärel lisati 10 µl lüsaadile 50 µl Kit'is olevat lutsiferaasi substraatlahust ja ensüümreaktsioonil eraldunud valgus detekteeriti luminomeetril (TD – 20/20, *TURNER DESIGNS*).

Kromatiini immuunosadestamine

1×10^6 raku suspendeeriti 25 ml söötmes, millele lisati fikseerimiseks 0,7 ml 37 % formaldehüüdi ja inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. Liigse formaldehüüdi neutraliseerimiseks lisati segule 1,7 ml 2M glütsiini ja inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Seejärel tsentrifugeeriti segu 5 minutit kasutades raskusjõudu 200 g, sade pesti 10 ml PBS'iga ja tsentrifugeeriti uuesti 5 minutit rakendades 200 g. Sade võeti üles 1 ml *FA lysis* puhvris (50 mM Hepes-KOH pH 7,5; 140 mM NaCl; 1mM EDTA; 1 % Triton X-100; 0,1 % Na Deoksükolaat) ja lüüsi 1 h jääl. Genoomse DNA fragmenteerimiseks sonikeeriti proove 8 minutit 30 sekundiliste intervallidega, vahepeal proove jääl jahutades. DNA fragmentide keskmine pikkus on sellise töötlemise järel ~ 500 aluspaari. Pärast sonikeerimist puhastati segu tsentrifugeerides seda algul 5 ja seejärel 15 minutit maksimumpööretel lauatsentrifuugi kasutades, 200 µl supernatanti viidi teise tuubi, lisati sellele veel 100 µl *FA lysis* puhvrit ja sobiv kogus antikeha (vt tulemused). Antikehadega inkubeeriti proove üleöö 4 °C juures keerutajal (*BIOSAN*).

Järgmisel päeval puhastati segu uuesti tsentrifugeerides seda 15 minutit maksimumpööretel lauatsentrifuugi kasutades ja supernatandile lisati 15 µl proteiin A sefaroosi kerakesi (*Amersham*, eelnevalt 15 min inkubeeritud *FA lysis* puhvris, millele on lisatud segus 1mg/ml BSA; 1 mM PSMF), millega inkubeeriti proove 1,5 h 4 °C juures keerutajal. Pärast inkubeerimist tsentrifugeeriti proteiin A sefaroosi kerad lauatsentrifuugil tuubi põhja (12 sekundid maksimum pööretel) ja eemaldati supernatant. Proteiin A kerasid pesti seejärel 1,3 ml järgmiste puhvritega: *FA lysis*; *FA 500* (50 mM Hepes-KOH pH 7,5; 500 mM NaCl; 1mM EDTA; 1 % Triton X-100; 0,1 % Na Deoksükolaat); LiCl (Tris-HCl pH 8; LiCl 250 mM; 0,5 % NP-40 0,5 % Na Deoksükolaat; 1mM EDTA) ja TES (100 mM Tris, pH 7,5; 1mM EDTA; 100mM NaCl) 5 minutit 4 °C juures keerutajal. Erinevate puhvrite kasutamise vahel tsentrifugeeriti kerad tuubi põhja ja supernatant eemaldati. Viimaks elueeriti immuunokompleksid proteiin A sefaroosi kerakestelt kaks korda 100 µl elueerimispuhvriga

(100 mM Tris, pH 7,8; 10 mM EDTA; 1 % SDS; 400 mM NaCl) ja eluaadid liideti. Elueeritud lahusele lisati 200 µl vett ja 20 µg proteinaas K-d (*fermentas*) ning inkubeeriti 4 h 65 °C juures.

Pärast inkubatsiooni lisati segule sellega võrdne kogus fenool/kloroformi (1:1), segati korralikult ja tsentrifuugiti 4 minutit kasutades raskusjõudu 16 000 g. Seejärel eemaldati tekkinud vesifaas ja lisati sellega võrdne kogus veega küllastatud kloroformi. Tsentrifugeeriti taas 4 minutit raskusjõul 16 000 g, eemaldati vesifaas ja lisati sellele DNA sadestamiseks 50 µl 3M naatrium atsetaati, 20 µg glükogeeni ja kolm mahtu 96 %-list etanooli. DNA sadestati 15 minutit -80 °C juures ja koguti tsentrifuugides kasutades raskusjõudu 16 000 g. Tekkinud sade pesti 70 % etanooliga, kuivatati ja DNA lahustati 30 µl vees.

Kvantitatiivne PCR

Kvantitatiivse PCR'i reaktsioon viidi läbi 20 µl mahus, milles oli 10 µl qPCR'i segu (*Abgene, ROX/SYBRGRN mix*), 0.5 µl primereid (forward + reverse, kumbki 20 µM) ja vesi. mRNA-d matriitsina kasutades lisati ka revertaas (5 U reaktsiooni kohta, *Amerhsam*). Pöördtranskriptaasi reaktsioon viidi läbi samas tuubis 48 °C juures 30 minuti jooksul kasutades samu primereid, mida DNA amplifitseerimiseks. Eraldatud RNA-st võeti PCR'i reaktsiooniks 5 µl, kromatiini immuunosadestamisel saadud DNA-st aga 1 µl (mahu ühtlustamiseks lisati vett).

PCR'i reaktsiooni viidi läbi 40 tsükli, millest igaüks koosnes 15 sekundilisest denaturatsiooni osast (95 °C) ning 1 minutilisest primerite seondumise ja elongatsiooni osast (60 °C). DNA hulga kasv reaktsioonis detekteeriti tänu spetsiifiliselt kaksikahelalise DNA-ga seonduvale värvile (*SYBRGRN*). Kasutades tarkvara „SDS 2.2.1.“ määrati tsükli number, mil DNA hulga kasv reaktsioonis oli kõige suurem. Saadud tsükli numbri alusel oli võimalik välja arvutada esialgse primerspetsiifilise DNA kogus reaktsioonis. See tsükliarv viidi üle DNA kogusteks järgneva valemiga: $\text{DNA kogus} = 2^{(40 - [\text{tsükliarv}])}$. Tsükliarv lahutati numbrist 40 seetõttu, et see number ületab kindlasti suurimat saadud tsükli arvu. Antud tehe on vajalik asjaolu tõttu, et suurima esialgse primerspetsiifilise nukleiinhappe kogusega proovid amplifitseeruvad varasematel tsükli arvudel ja vastupidi, sellise tehtega saame me aga tsükliarvud vastavusse proovides olnud nukleiinhappe kogustega. Mida väiksem number, seda vähem esialgset primerspetsiifilist DNA'd. Reaalsete DNA koguste saamiseks tuleb veel PCR'i reaktsiooni eksponentsiaalse iseloomu tõttu eelmises tehtes saadud numbriga astendada kahte.

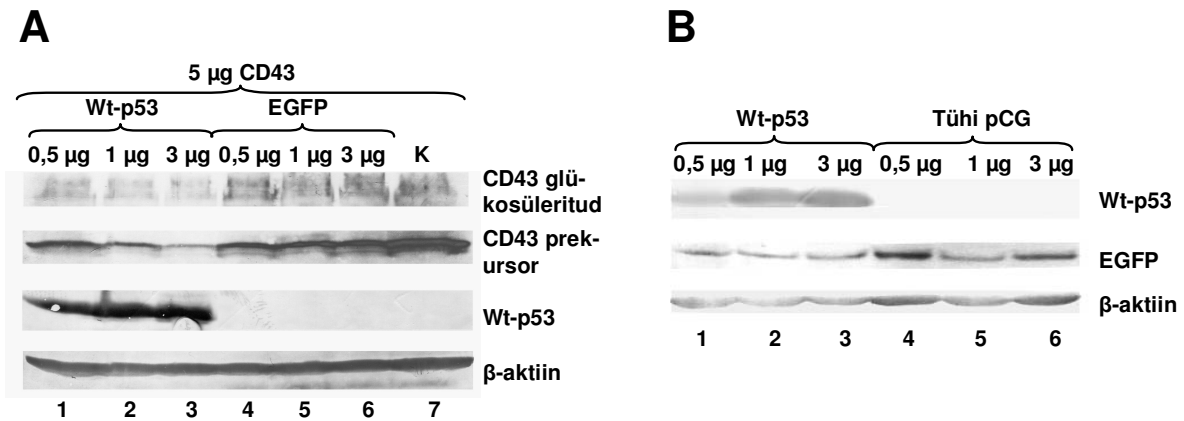
Tulemused

p53 mõjutab eksogeense CD43 valgu taset H1299 rakuliinis

Huvi uurida p53 võimalikku mõju CD43 valgu tasemele tekkis mitmete asjaolude kokkulangemisel. Kirjanduse andmetel ekspresseerub CD43 eelkõige vererakkude proliferatsioonil ja diferentseerumisel CD43 valgu tase väheneb. Samas p53 kõrgendatud ekspressiooni täheldatakse vereloome rakkude diferentseerumisel (Dragone et al., 1995; Kastan et al., 1991). Samuti näidati meie töögrupi varasemas töös, et CD43 on võimeline indutseerima p53 taseme tõusu ARF-i olemasolul (Kadaja et al., 2004). Viimati mainitud töö katsete tegemise käigus märgati, et p53 ekspresseerivates rakkudes on CD43 valgu tase madalam. Need andmed viitasid võimaliku vastastikuse seose esinemisele CD43 ja p53 vahel, millest tulenevalt otsustasimegi uurida p53 võimalikku mõju CD43 valgu tasemele.

Inimese kopsukartsinoomi rakuliini H1299 transfekteeriti metsiktüüpi p53, CD43 ja EGFP valke ekspresseerivate plasmiididega (näidatud joonisel 3). 24 tundi pärast transfektsiooni rakud lüüsi ja analüüsi *western blot* meetodil, kasutades spetsiifilisi antikehi. Joonisel 3 A on näha metsiktüüpi p53 ja kontrolli EGFP mõju eksogeense CD43 valgu tasemele. Joonisel 3 B vaadeldi aga p53 toimet tema poolt eeldatavalt mittemõjutatavale EGFP valgule, kus kontrollina kasutati transfektsiooni tühja pCG plasmiidiga.

Joonisel 3 A esitatud andmed näitavad, et mida kõrgem on p53 valgu tase rakus, seda madalam on CD43 valgu tase (rajad 1, 2 ja 3). Seda nii CD43 valgu glükosüleeritud vormi kui ka prekursorimolekuli puhul. EGFP valgu taseme suurenemise korral CD43 valgu tase ei vähenenud (rajad 4, 5, 6), seega antud süsteemis mitterelevantne valk EGFP CD43 taset ei mõjuta. Joonisel 3 B on aga näidatud, et p53 ei alanda mitterelevantse EGFP valgu taset sarnaselt CD43 valgule. Antud kontrollkatse oli vajalik välistamaks p53 võimalikku mõju CMV (tsütomegaloviirus) promootorile selles katsesüsteemis. CMV promootorist sõltub uuritavate valkude ekspressioon nendes plasmiidides. Varasemalt on aga näidatud, et p53 inhibeerib CMV promootori vahendatud transkriptsiooni (Subler et al., 1992). Saadud tulemused näitavad, et p53 on H1299 rakuliinis võimeline spetsiifiliselt alandama eksogeense CD43 valgu taset. Tegelikult tähendab see seda, et p53 reguleerib CD43 ekspressiooni ka post-transkriptsiooniliselt e mRNA stabiilsuse, translatsiooni või valgu enese tasemel, kuna transkriptsioon on vahendatud viiruslikult promootorilt. Edaspidi on selles töös sellele protsessile viidatud, kui CD43 ekspressiooni regulatsioonile valgu tasemel.



Joonis 3. p53 alandab spetsiifiliselt eksogeense CD43 valgu taset H1299 rakuliinis. A - CD43 ja p53 valkude detekteerimine *western blot* meetodil. Kõikides proovides ekspresseeriti CD43 valku, millele lisati p53 või EGFP valku ekspresseerivaid plasmide joonisel näidatud kogustes. Rajal 7 on kontroll (K), CD43 ekspressioon üksinda. **B** - EGFP ja p53 valkude detekteerimine *western blot* meetodil. Kõikides proovides ekspresseeriti EGFP valku, millele lisati p53 valku ekspresseerivat plasmidi ja tühja pCG plasmidi joonisel näidatud kogustes.

p53 mõju CD43 valgu tasemele ei tulene rakkude apoptoosist

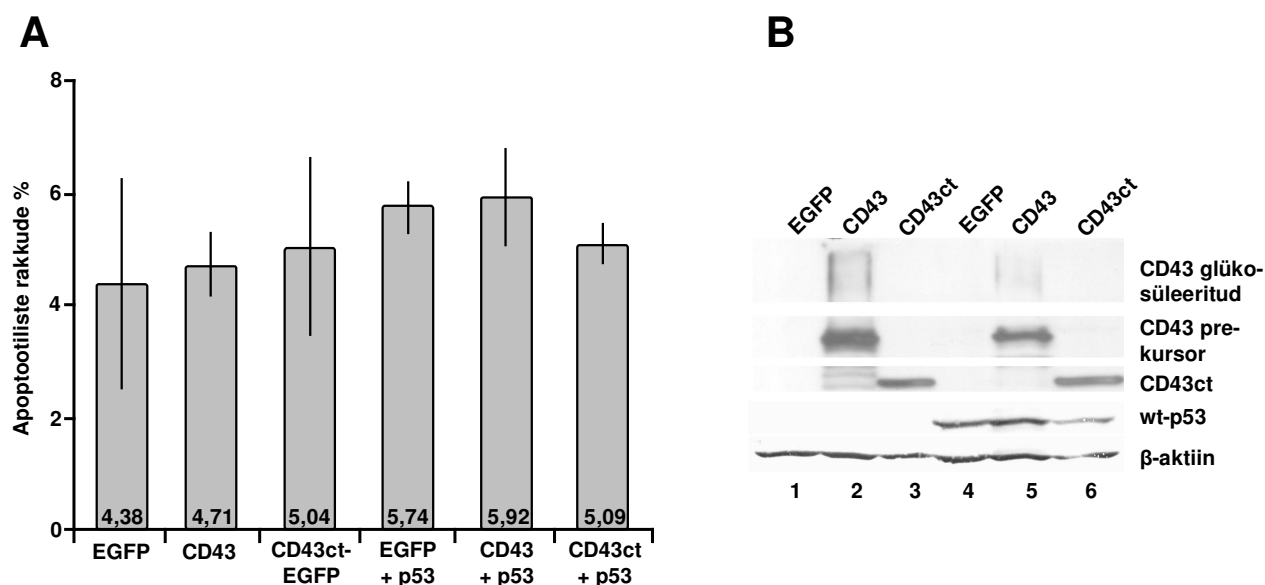
Hoolimata sellest, et eelnevates katsetes näidatud p53 efekt CD43 valgule tuvastati 24 tunni jooksul, tuleb siiski arvesse võtta, et CD43 indutseerib 48 tunni jooksul p53-sõltuva apoptoosi (Kadaja et al., 2004). Sellest tulenevalt on võimalik, et CD43 valgu taseme vähenemine koekspressioonil p53-ga oli tingitud apoptoosist. Selle võimaluse kontrollimiseks määrasime apoptootiliste rakkude osakaalu antud katsesüsteemis 24 tunni möödudes.

H1299 rakkudes ekspresseeriti 5 µg plasmiidilt täispikka CD43, CD43 tsütoplasmaatilise domeeni ja EGFP liitvalku (CD43ct) ning EGFP valku koos metsiktüüpi p53-ga (1 µg plasmiidilt) ja ilma. 24 tundi pärast transfektsiooni rakud koguti, märgiti Annexin V-PE-ga, analüüsiti läbivoolutsütomeetrial ning tehti kindlaks apoptootiliste rakkude protsent kogu rakupopulatsioonist. Pärast apoptootiliste rakkude hulga määramist lüüsi samad rakud ja analüüsiti *western blot* meetodil erinevate valkude suhtelisi ekspressioonitasemeid.

Joonisel 4 A esitatud andmetest on näha, et erinevate valkude ekspressioonil 24 tunni möödudes jääb apoptootiliste rakkude hulga kõikumine vaid mõne protsendi piiresse. See tähendab, et 24 h möödudes p53 ja CD43 ekspresseerimine rakkudes märgatavat apoptoosi esile ei kutsunud. Samas on joonisel 4 B endiselt näha, et p53 alandab eksogeense CD43 valgu glükosüleeritud vormi ja ka prekursori taset rakus (rajad 2 ja 5). Samuti on *western blot* pildil näha, et p53 ei alanda CD43 tsütoplasmaatilise domeeni ja EGFP liitvalgu

(CD43ct) taset rakus. See fakt on kooskõlas eelnevate tulemustega, kus p53 valgu aktivatsiooni kutsub esile vaid täispikk CD43, mitte aga CD43 valgu tsütoplasmaatilise domeeni ja EGFP liitvalk (Kadaja et al., 2004).

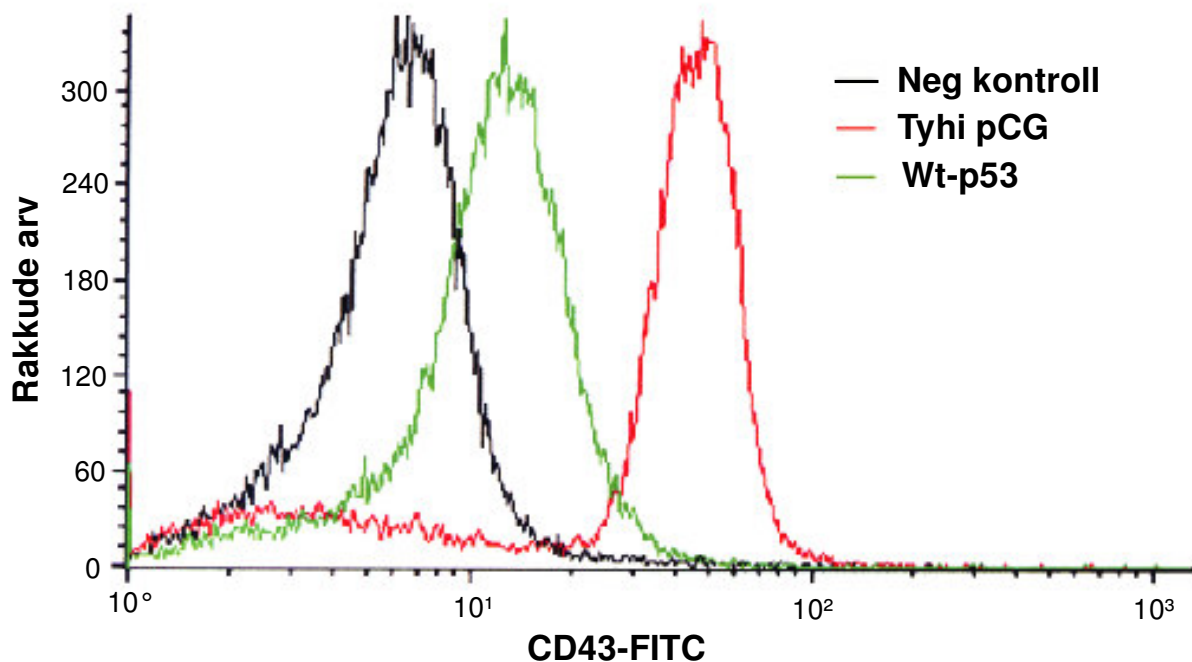
Seega võib öelda, et p53 ja CD43 24 tunni möödudes rakkudes märgatavat apoptoosi suurenemist esile ei kutsu ja kirjeldatud p53 efekt eksogeensele CD43 valgule ei ole tingitud programmeeritud rakusurmast.



Joonis 4. p53 ei mõjuta 24 h jooksul apoptoosiliste rakkude osakaalu, kuid alandab eksogeense CD43 valgu taset H1299 rakuliinis. A - Apoptoosiliste rakkude detekteerimine. Rakkudes ekspresseeriti valke CD43, EGFP ja CD43ct koos p53-ga ja ilma. 24 h pärast transfektsiooni rakud koguti, märgiti *Anneksin V-PE*-ga ja analüüsiti läbivoolutsütomeetrial (vt materjal ja meetodika). Graafikul on esitatud apoptoosiliste rakkude hulk kogu rakupopulatsioonist. **B** - Valkude detekteerimine *western blot* meetodil. Joonise A osal kirjeldatud proovid lüüsi ja valgud detekteeriti kasutades spetsiifilisi antikehi.

p53 alandab endogeense CD43 valgu taset H1299 rakuliinis

Eelnevatest esitatud katsetest selgub, et p53 alandab spetsiifiliselt eksogeense CD43 valgu taset rakus. Tegelikult on aga hoopis olulisem, kuidas p53 mõjutab endogeenset CD43-e, kuna CD43 ekspresseerub organismides just sellises kontekstis. Selle kindlaks tegemiseks ekspresseeriti H1299 rakuliinis 5 µg plasmiidilt wt-p53 valku ja võrreldi seda proovidega, mida oli transfekteeritud 5 µg tühja pCG plasmiidiga. 24 tundi pärast transfektsiooni rakud koguti, märgistati kasutades spetsiifilisi antikehi ja analüüsiti läbivoolutsütomeetrial.



Joonis 5. p53 alandab endogeense CD43 valgu taset. H1299 rakkudesse transfekteeeriti kas wt-p53 plasmidi või tühja pCG plasmidi. 24 h pärast transfektsiooni rakud koguti, märgistati CD43 vastase antikehaga ja analüüsiti läbivoolutsütomeetrial. Negatiivse kontrollina kasutati tühja pCG plasmiidiga transfekteeeritud proovi, kus primaarse antikehana on kasutatud hiire p53-e vastast antikeha 242. Graafiku x-teljel on esitatud CD43-spetsiifiline fluorestsentsi tugevus.

Jooniselt 5 on näha, et metsiktüüpi p53 alandab oluliselt endogeense CD43 valgu taset H1299 rakuliinis (abtsiss-telje skaala logaritmiline). p53-ga transfekteeeritud proovi fluorestsents on tunduvalt madalam, kui tühja pCG plasmiidiga transfekteeeritud proovis. Negatiivse kontrollina on kasutatud proovi, milles primaarseks antikehaks on hiire p53 vastane antikeha, mis inimese valkudega ei seostu.

p53 alandab endogeense CD43 mRNA taset

Kuna p53 mõjutab ka endogeense CD43 valgu taset rakus, otsustasime kontrollida, kas p53 võiks mõjutada transkriptsiooni CD43 geenilt. Selle kindlaks tegemiseks uuriti p53 mõju CD43 mRNA tasemele. Esmalt analüüsisin CD43 mRNA ekspressioonitase käesolevas töös kasutatud rakuliinides. Lisaks H1299 rakkudele kasutati ka inimese kooloni kartsinoomi rakuliini COLO-205, mis ekspresseerib CD43 kõrgemal tasemel (Baekstrom, 1997).

COLO-205 ja H1299 rakud lüüsi ja nendest eraldati totaalne RNA, mida analüüsiti kvantitatiivse RT-PCR'iga. Eraldatud totaalsest RNA-st amplifitseeriti spetsiifilisi primereid

kasutades fragment CD43 ja GAPDH mRNA-st. GAPDH mRNA-d kasutati katsetulemuste normaliseerimiseks. Veendumaks, et proovid ei ole DNA-ga saastunud, teostati igast proovist amplifikatsioon ka ilma revertaasita. Arvutustes kasutatud proovides ilma revertaasita DNA amplifikatsiooni ei toimunud.

Joonisel 6 A on näha, et CD43-e mRNA tase COLO-205 ja H1299 rakuliinis erineb u tuhat korda (ordinaat-telje skaala logaritmiline). COLO-205 rakuliinis on CD43-e mRNA tase võrreldav vererakuliinidega (tulemused esitamata). Samas transkribeeritakse CD43-e geeni ka H1299 rakuliinis piisaval määral, et vastav mRNA oleks detekteeritav ja võimalik p53 efekt selle tasemele tuvastatav. Edasiste esitatud tulemuste saamisel on arvestatud mainitud rakuliinide erineva CD43 mRNA ekspressioonitasemega. Nimelt ekspresseerib COLO-205 rakuliin küll kõrgel tasemel CD43 mRNA-d, kuid on samas suhteliselt halvasti transfekteeritav. H1299 madala CD43 mRNA ekspressioonitaseme kompenseerib aga tema väga hea transfektsiooniefektiivsus.

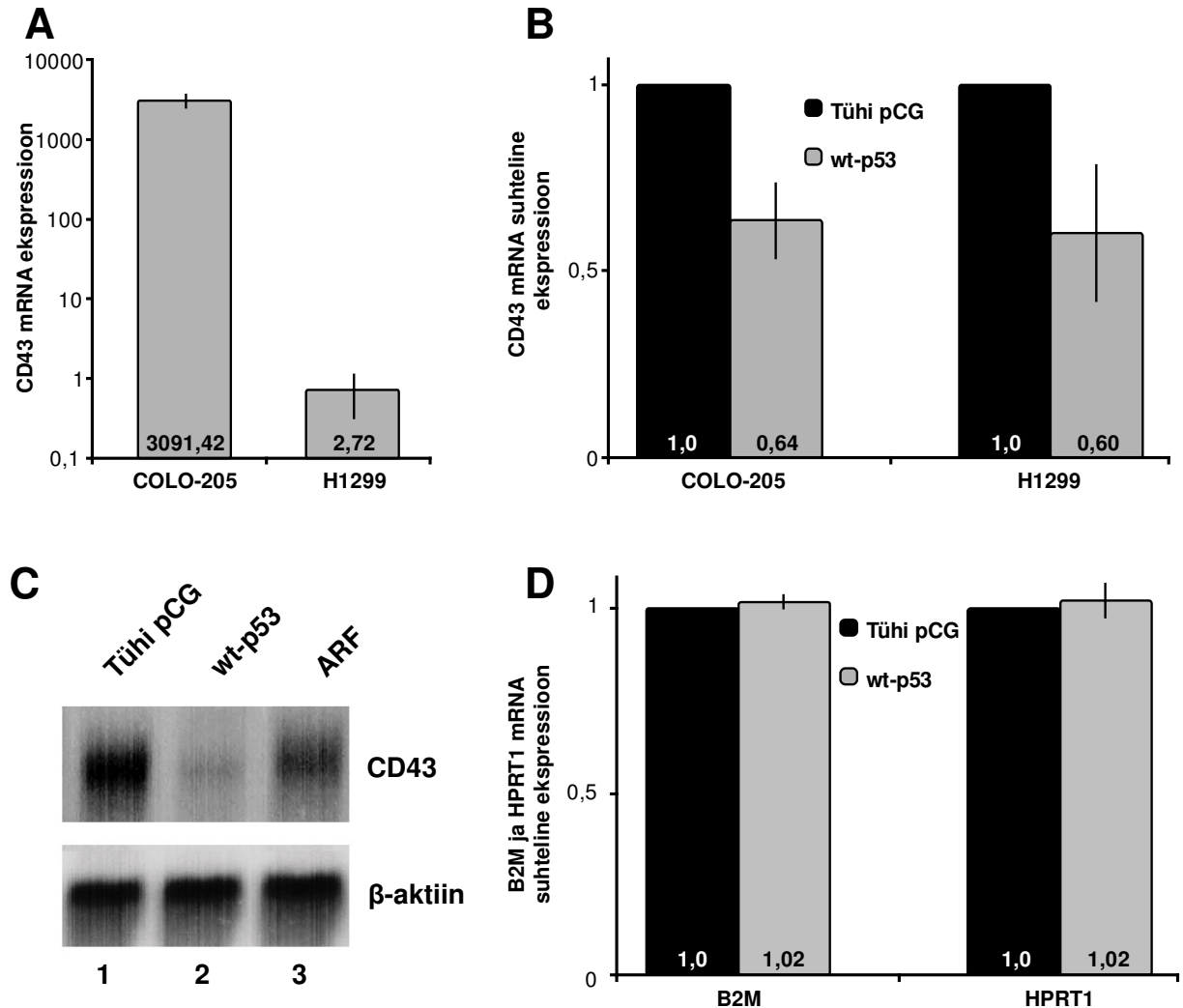
Olles kindlaks teinud CD43-e mRNA ekspressioonitaseme meie poolt kasutatavates rakuliinides ja veendunud, et selle detekteerimine meile probleeme ei valmista, uurisime kas p53 mõjutab ka endogeense CD43-e mRNA ekspresiooni. Selleks transfekteeriti elektroporatsiooniga COLO-205 rakuliini 1 µg tühja pCG või wt-p53 ekspresseerivat plasmidi. H1299 rakuliini transfekteeriti polüetüleenimiini kasutades kokku 5 µg plasmidi (kas 5 µg tühja pCG-d või 1µg pCG-human-wtp53-e + 4 µg tühja pCG). 24 h pärast transfektsiooni rakud lüüsi ja nendest eraldati totaalne RNA, mida analüüsiti *northern blot* meetodil (joonis 6 C) või kvantitatiivse RT-PCR'iga (joonis 6 B). RT-PCR analüüsi puhul on tulemused normaliseeritud GAPDH mRNA suhtes.

Esitatud andmetest on näha, et metsiktüüpi p53 ekspresseerivates rakkudes on CD43 mRNA tase oluliselt madalam võrreldes kontrollrakkudega. Seda nii COLO-205 (joonis 6 B) kui ka H1299 (joonis 6 B ja C) rakuliini puhul. Lisaks sellele on joonisel 6 C näha, et tuumorsupressorvalk p14ARF CD43 mRNA taset ei mõjuta.

Veendumaks, et p53 efekt CD43 mRNA tasemele on spetsiifiline, kontrollisime p53 mõju eeldatavalt mitterelevantsetele madala või keskmise ekspressioonitasemega B2M (β -2 mikroglobuliin) ja HPRT1 (hüpoksantiin-guaniin fosforibosüül transferaas) mRNA-dele. B2M on MHC klass I komponentvalk ja HPRT1 osaleb rakus puriinide metabolismis konverteerides hüpoksantiini inosiin monofosfaadiks.

p53 mõju uurimiseks B2M ja HPRT1 mRNA tasemele transfekteeriti H1299 rakuliini 1 µg wt-p53 plasmidi koos 4 µg tühja pCG plasmiidiga või 5 µg tühja pCG plasmidi üksinda. 24 h pärast transfektsiooni rakud lüüsi ja nendest eraldati totaalne RNA, mida

analüüsiti kvantitatiivse RT-PCR'iga kasutades vastavaid praimereid. Nii B2M kui ka HPRT1 mRNA tasemed on normaliseeritud GAPDH mRNA suhtes. Nagu näha joonisel 6 D, p53 ei mõjuta antud süsteemis irrelevantsete B2M ja HPRT1 geenide mRNA taset rakus.



Joonis 6. p53 alandab CD43 mRNA taset rakus. **A** - CD43 mRNA ekspressioonitaseme analüüs COLO-205 ja H1299 rakuliinides kvantitatiivse RT-PCR'ga. **B** - CD43 mRNA taseme analüüs COLO-205 ja H1299 rakuliinides kvantitatiivse RT-PCR'ga. COLO-205 ja H1299 rakke on transfecteeritud kas wt-p53 ekspresseeriva- või tühja pCG plasmiidiga. Esitatud on CD43 mRNA ekspressioon tühja pCG plasmiidiga transfecteeritud proovide suhtes. **C** - CD43 mRNA taseme analüüs H1299 rakuliinis *Northern blot* meetodil. Rakke on transfecteeritud kas wt-p53, p14ARF ekspresseerivate- või koos tühja pCG plasmiidiga. **D** - B2M ja HPRT1 mRNA taseme analüüs H1299 rakuliinis kvantitatiivse RT-PCR'ga. H1299 rakke on transfecteeritud kas wt-p53 ekspresseeriva- või tühja pCG plasmiidiga. Esitatud on B2M ja HPRT1 mRNA ekspressioon tühja pCG plasmiidiga transfecteeritud proovide suhtes.

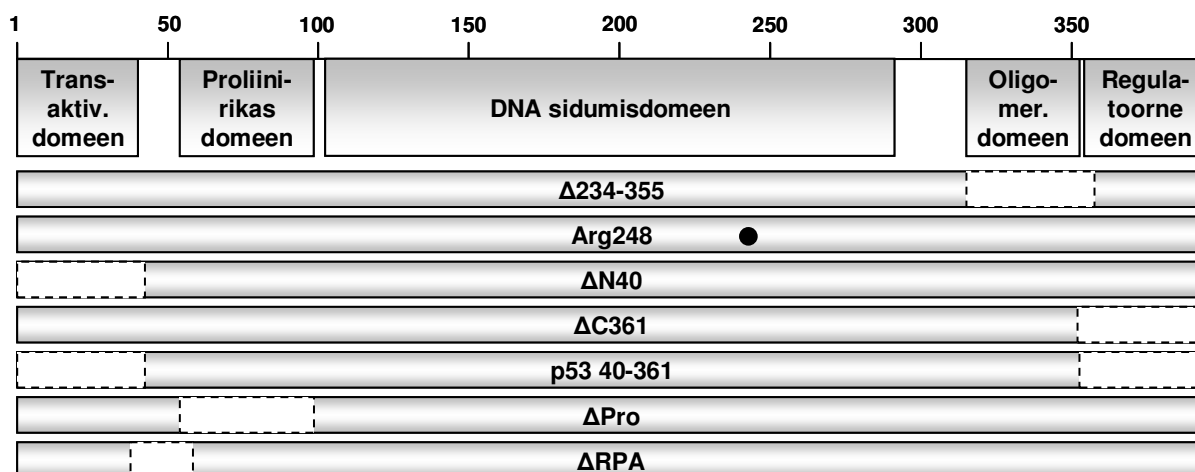
Kokkuvõtteks saab öelda, et hoolimata olulisest erinevusest CD43 mRNA ekspressioonitasemetes COLO-205 ja H1299 rakuliinides (joonis 6 A), väheneb CD43 mRNA tase wt-p53 ekspresseerivates rakkudes sarnasel määral (joonis 6 B ja C).

Seniste tulemuste põhjal väheneb wt-p53 ekspresseerivates rakkudes nii endo- kui eksogeense CD43 valgu tase. Endogeense CD43 taseme vähenemine on seletatav p53 mõjuga transkriptsioonile CD43 geenilt. p53 võime mõjutada eksogeense CD43 valgu taset viitab sellele, et lisaks reguleeritakse CD43 ekspressiooni ka valgu tasemel.

CD43 ekspressiooni mõjutamiseks vajalikud p53 piirkonnad

Olles veendunud selles, et metsiktüüpi p53 mõjutab nii ekso- kui endogeense CD43 valgu taset ja ka endogeense CD43 mRNA taset, otsustasime uurida millised p53 valgu piirkonnad ja bioloogilised aktiivsused on vajalikud nendeks protsessideks. Selleks kasutasime erinevaid mutantseid p53 valke (joonis 7):

- $\Delta 324-355$ - ekspresseerib p53 oligomerisatsioonidefektset valku, deleteeritud oligomerisatsiooni domeen.
- Arg248 - ekspresseerib p53 valku, kus metsiktüüpi valgu aminohape arginiin koodonis 248 on asendatud aminohappega trüptofaan.
- $\Delta N40$ - ekspresseerib N-terminaalse deletsiooniga valku, deleteeritud 39 aminohapet valgu aminoterminusest.
- $\Delta C361$ - ekspresseerib C-terminaalse deletsiooniga valku, deleteeritud 32 aminohapet valgu karboksüterminusest.
- p53 40-361 - ekspresseerib nii N- kui C-terminaalse deletsiooniga valku.
- ΔPro - ekspresseerib p53 valku, millel on deleteeritud proliinirikas domeen.
- ΔRPA – ekspresseerib p53 valku, millel on deleteeritud RPA sidumisdomeen.



Joonis 7. Skemaatiline joonis kasutatud p53 mutantsetest valkudest. Musta ringiga on märgitud Arg248 asendus Trp248-ga. Punktiirjoonega ümbritsetud osad viitavad deleteeritud osale valgus. Numbrid joonisel näitavad aminohappete nubreid p53 valgus.

Erinevate p53 mutantsete valkude mõju uurimiseks eksogeense CD43 valgu tasemele ekspresseeriti H1299 rakuliinis 5 µg plasmiidilt täispikka CD43 koos 1 µg metsiktüüpi p53 või erinevaid p53 mutantseid valke ekspresseerivate plasmiididega nagu näidatud joonisel 8 A. Kontrollina ekspresseeriti koos CD43-ga 1 µg plasmiidilt tuumorsupressorvalku p14ARF. 24 tundi pärast transfektsiooni rakud koguti ja analüüsiti *western blot* meetodil, kasutades spetsiifilisi antikehi.

Joonisel 8 A on näha, et metsiktüüpi p53 ekspressiooni korral on CD43 valgu tase madalam kui wt-p53 mitte ekspresseerivates H1299 rakkudes ja seda nii glükosüleeritud vormi kui ka valgu prekursori osas (rada 1). Huvitaval kombel alandab monomeerne p53 (Δ324-355) küll CD43 glükosüleeritud vormi taset, kuid ei mõjuta CD43 prekursori ekspressiooni (rada 2). Need andmed viitavad sellele, et p53 võib olla võimeline mõjutama CD43 post-translatsioonilist modifitseerimist. p53 punktmutant Arg248 ei olnud võimeline CD43 valgu taset mõjutama (rada 3). Samuti ei alanda CD43 eksogeense valgu taset deleteeritud transaktivatsiooni domeeniga mutant ΔN40 (rada 4). Kuna on teada, et p53 mutant Arg248 ei ole võimeline DNA-d siduma ja transaktivatsiooni domeenita p53 ΔN40 transkriptsiooni aktiveerima, siis on võimalik, et eksogeense CD43 valgu taseme mõjutamiseks on vajalik p53 transaktivatsioonivõime. C-terminaalse ala deletsiooniga p53 oli võimeline CD43 taset mõjutama (rada 5), kuid mitte nii efektiivselt kui wt-p53. Mutant, millel on lisaks C-terminaalsele alale deleteeritud ka transaktivatsioonidomeen ei ole samuti võimeline mõjutama CD43 valgu taset (rada 6). Kontrollrajal on ekspresseeritud CD43 koos

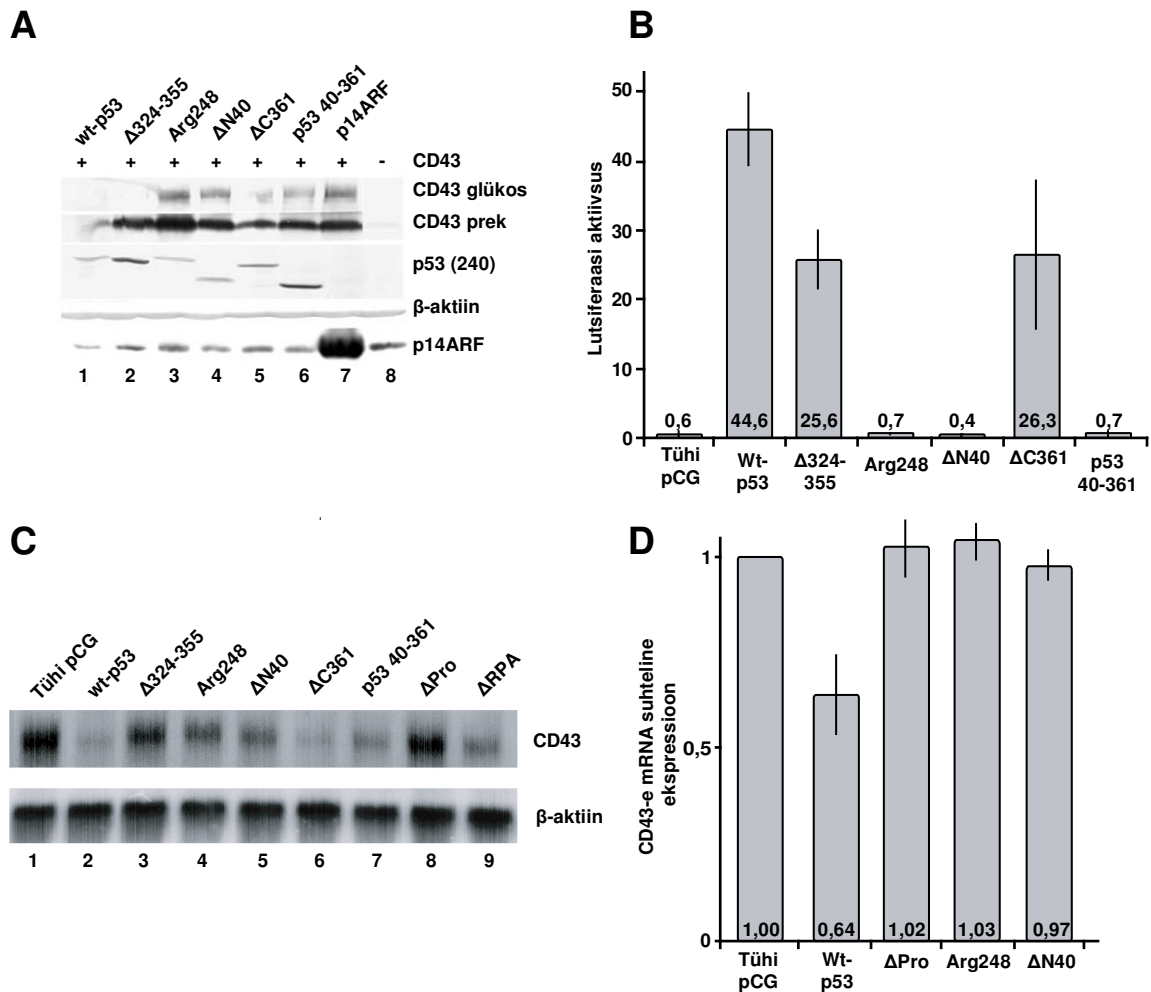
tuumorsupressorvalguga p14ARF (rada 7), mis CD43 taset ei mõjuta kinnitades, et kirjeldatud fenomen on p53 spetsiifiline.

Kuna p53 mutantsed valgud, millel puudub transaktivatsioonidomeen või mis ei oma DNA-ga sidumise võimet (Arg248, Δ N40, p53 40-361), CD43 eksogeense valgu taset ei alandanud, otsustasime kontrollida kasutatud mutantide transkriptsiooni aktiveerimise võimet. Selleks kasutati lutsiferaasi reporter analüüsi (joonis 8 B). H1299 rakkudesse transfekteeriti 1 μ g erinevaid p53 valke kodeerivaid plasmide koos 4 μ g reporterplasmiidiga, kus lutsiferaasi geen oli viidud p53 poolt transaktiveeritava tsükliin G promootori kontrolli alla. 24 tundi hiljem mõõtsime lutsiferaasi aktiivsuse luminomeetril.

Lutsiferaasi aktiivsuse analüüsi tulemus (joonis 8 B) kinnitas, et mutandid Arg248, Δ N39, p53 40-36, mis eksogeense CD43 valgu taset ei mõjutanud, on kõik transaktivatsiooni defektsed. C-terminaalse deletsiooniga mutant on küll transaktivatsioonivõimeline, kuid tema mõju CD43 valgule oli metsiktüübiga võrreldes veidi nõrgem. Monomeerne p53 (Δ 324-355) mõjutab vaid CD43 glükosüleeritud valgu taset rakus. Seega kinnitavad esitatud tulemused, et eksogeense CD43 valgu taseme alandamiseks on vajalik p53 transaktivatsioonivõime.

Senine uurimistöö näitab, et p53 võime alandada eksogeense valgu taset korreleerub tema transaktivatsioonivõimega. Järgnevalt soovisime teada, kas p53 transaktivatsioonivõime on oluline ka CD43-e mRNA taseme alandamisel. Selle uurimiseks kasutati rakuliine COLO-205 (joonis 8 D) ja H1299 (joonis 8 C). COLO-205 rakuliinis ekspresseeriti 1 μ g plasmiidilt erinevaid p53 mutantseid valke ja kontrollina kasutati transfektsiooni 1 μ g tühja pCG plasmiidiga. H1299 rakke transfekteeriti 1 μ g erinevaid p53 valke ekspresseerivate plasmiididega koos 4 μ g tühja pCG plasmiidiga. Kontrollina kasutatud rakke transfekteeriti 5 μ g tühja pCG plasmiidiga.

p53 võime CD43 mRNA taset vähendada võib tuleneda nii teiste CD43 mõjutavate valkude p53-sõltuvast aktivatsioonist, kui ka CD43 geeni enese või selle ekspressiooni mõjutavate faktorite transrepressioonist. Seetõttu võeti CD43 mRNA analüüsil lisaks eelpool kirjeldatud p53 mutantidele kasutusele ka p53 mutantne valk, kus puudub proliinirikas ala, mis on varem kirjeldatud kui p53-sõltuvaks transrepressiooniks oluline piirkond (Koumenis et al., 2001; Vousden & Lu, 2002). Samuti kasutati p53 mutanti Δ RPA. Sellel p53 valgul on deleteeritud RPA'ga interaktsiooniks vajalik domeen, mis on oluline DNA reparatsioonil. Meie katsesüsteemis Δ RPA transkriptsiooni ei aktiveerinud (Anna Balikova, avaldamata andmed). Samas on Δ RPA valgul rikkumata proliinirikas ala. Teada on ka, et RPA'ga seondumine ei mõjuta p53 võimet rakkude kasvu supresseerida sellisel määral nagu tema transrepressiooni ja transaktivatsioonivõime (Leiter et al., 1996).



Joonis 8. p53 mutantsete valkude mõju CD43 ekspressioonile. **A** - Erinevate p53 mutantide mõju eksogense CD43 valgu tasemele. p53, CD43 ja p14ARF valkude detekteerimine *western blot* meetodil H1299 rakuliinis. Ekspresseeritud on CD43 valgu koos erinevate p53 mutantsete valkudega või p14 ARF'ga. Rajal 8 on negatiivne kontroll, transfekteerimata rakud. **B** - Erinevate p53-valkude transaktiivatsioonivõime kontroll. H1299 rakkudesse lutsiferaasi geeni sisaldavat reporterplasmidi koos erinevaid p53 valke ekspresseerivate plasmiididega. 24 tundi hiljem rakud lüüsi ja mõõdeti lutsiferaasi aktiivsus. **C** - CD43 mRNA taseme analüüs H1299 rakkudes *northern blot* meetodil. Rakkudes on ekspresseeritud erinevaid p53 mutantseid valke. Kontrollina on transfekteeritud tühja pCG plasmidi. **D** - CD43 mRNA taseme analüüs COLO-205 rakkudes kvantitatiivse RT-PCR'ga. Rakkudes on ekspresseeritud erinevaid p53 mutantseid valke. Kontrollina on transfekteeritud tühja pCG plasmidi.

Nagu on näha joonisel 8 C ja D, metsiktüüpi p53 alandab CD43-e mRNA taset oluliselt mõlemas kasutatud rakuliinis. Kummaski rakuliinis ei alanda CD43 mRNA taset p53 mutandid Arg248, Δ Pro ja Δ N40. Samuti ei alanda CD43 mRNA taset H1299 rakuliinis monomeerne p53 (Δ 324-355). Küll aga vähendas monomeerne p53 CD43 valgu glükosüleeritud vormi taset, mis kinnitab, et p53 mõjutab CD43 ka post-translatsiooniliselt.

H1299 rakuliinis alandavad lisaks metsiktüüpi p53 CD43 mRNA taset ka mutandid Δ C361, p53 40-361 ja Δ RPA (rajad 6, 7 ja 9).

Kui p53 võime alandada eksogeense CD43 valgu taset korreleerus tema transaktivatsioonivõimega, siis mRNA taseme alandamise korral sellist korrelatsiooni välja tuua ei saa. Nimelt on transaktivatsioonivõimetud mutandid Δ RPA ja p53 40-361 võimelised CD43-e mRNA taset alandama (joonis 8 C, rajad 7 ja 9). Samas DNA sidumismutant Arg 248, monomeerne p53, aminoterminaalne ala deletsiooniga Δ N40 ja Δ Pro mutant CD43 mRNA taset ei mõjutanud.

p53 mutantsete valkude mõjust CD43 mRNA tasemele on oluline tuua välja järgmist: Esiteks peab p53 CD43 mRNA taseme alandamiseks olema võimeline seonduma DNA-ga. Teiseks, p53 valk peab omama oligomerisatsioonidomeeni. Kirjandusest on teada, et oligomerisatsioonidomeeni jäävad aminohapped 339 - 346 on vajalikud p53-vahendatud transrepressiooniks (Hong et al., 2001) ning samuti seob tetrameerne p53 monomeerist efektiivsemalt DNA-d (Jeffrey et al., 1995; Nagaich et al., 1999). Kolmandaks, ka aminoterminaalne ala deletsiooniga p53 valk ei suuda efektiivselt CD43 mRNA taset alandada. p53 aminoterminaalsetes alades on mitmed p53 aktivatsiooniks olulised aminohapped ning varasemalt on näidatud, et selles alades olevad aminohapped 22 ja 23 on olulised p53-sõltuvaks transrepressiooniks (Stein et al., 2002). Neljandaks, CD43 mRNA taseme alandamiseks on p53 vajalik proliinirikas domeen, mis on oluline piirkond p53 vahendatud transrepressioonis (Koumenis et al., 2001; Vousden & Lu, 2002). Viimaks, karboksüterminaalne ala ja RPA sidumisdomeeni eemaldamine CD43 mRNA taseme alandamist ei takista. Teada on, et karboksüterminaalsete aminohapete (364 - 392) deletsioon ei mõjuta p53 transrepressioonivõimet (Stein et al., 2002; Wu et al., 2001). Kasutatud RPA sidumisdomeenita mutant ei ole aga võimeline transkriptsiooni aktiveerima ning eksogeense CD43 valgu taset mõjutama (Anna Balikova, avaldamata andmed). Oma tulemusi varasemalt avaldatud andmetega kõrvutades otsustasimegi kontrollida võimalust, et CD43-e mRNA taseme alanemine võiks olla tingitud p53-vahendatud transrepressioonist.

p53 vähendab histoon H3 K14 atsetüeeritust CD43 promootori läheduses

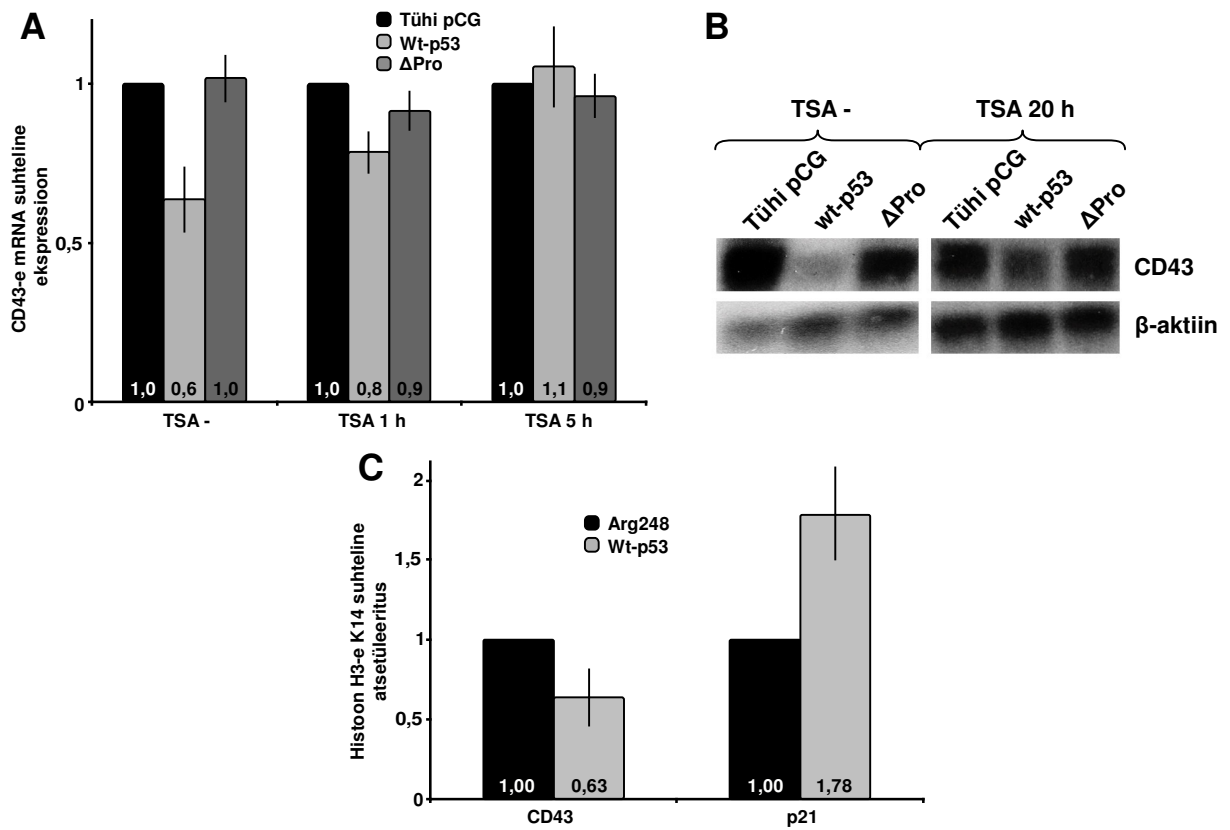
Eelmises punktis esitatud tulemustele tuginedes esitasime hüpoteesi, et p53-vahendatud CD43-e mRNA taseme alanemisele toimub p53-sõltuva transrepressiooni abil. Üheks võimalikuks mehhanismiks mille kaudu p53 on võimeline teatud geenide ekspressiooni repressiooniks on nende geenide läheduses olevate histoonide deatsetüeerimise

indutseerimine. Histonide deatsetüleerimise tagajärjel pakitakse kromatiin tihedamalt kokku ja transkriptsioonifaktorite DNA-ga seostumise efektiivsus väheneb. Kirjeldatud transrepressiooni protsessiks on oluline eelkõige just p53 proliinirikas domeen (Koumenis et al., 2001; Vousden & Lu, 2002). Kuna ka meie katsete tegemise käigus selgus, et CD43 mRNA taseme alandamiseks on vajalik p53 proliinirikas domeen, otsustasime kontrollida, kas p53 mõjutab kromatiini atsetüleeritust CD43 geenis.

Kontrollimaks, kas p53 represserib CD43 geeni transkriptsiooni indutseerides selle läheduses olevate histoonide deatsetüleerimist, kasutati HDAC (histoonide deatsetüleerimis-komplekside) inhibiitorit TSA (trihhostatiin A). Katsed teostati nii COLO-205 (joonis 9 A) kui ka H1299 (joonis 9 B) rakuliinis. COLO-205 rakuliinis ekspresseeriti 1 µg plasmiidilt kas metsiktüüpi p53 või ΔPro valku. Kontrollina kasutati transfektsiooni 1 µg tühja pCG plasmiidiga. H1299 rakke transfekteeriti 1 µg metsiktüüpi p53 või ΔPro mutantset valku ekspresseerivate plasmiididega koos 4 µg tühja pCG plasmiidiga. Kontrollina kasutatud rakke transfekteeriti 5 µg tühja pCG plasmiidiga. Transfekteeritud rakkudele lisati erinevatel ajapunktidel enne rakkude lüüsimist TSA (lõppkonsentratsiooniga 100 ng/ml). Rakud lüüsi 24 h pärast transfektsiooni.

Joonisel 9 A on näha, et TSA puudumisel on wt-p53 erinevalt ΔPro mutandist võimeline COLO-205 rakuliinis CD43 mRNA taset alandama. Samas TSA lisamisel hakkab juba tunni möödudes wt-p53 efekt kaduma. Proovis, millele on TSA lisatud 5 h enne rakkude lüüsimist ei ole wt-p53 enam võimeline CD43 mRNA taset alandama. Sama fenomen kordub ka H1299 rakuliinis (joonis 9 B): wt-p53 on ilma TSA-ta võimeline CD43 mRNA taset alandama. Samas takistab TSA ka siin CD43 mRNA taseme alandamist.

Fakt, et p53 ei suuda HDAC'i inhibiitori juuresolekul CD43-e mRNA taset alandada, annab alust arvata, et p53 vähendab histoonide atsetüleeritust CD43 geeni läheduses. Selle võimaluse kontrollimiseks transfekteeriti H1299 rakuliini 1 µg metsiktüüpi p53 või Arg248 mutantset valku ekspresseerivate plasmiididega koos 4 µg tühja pCG plasmiidiga. 24 h pärast transfektsiooni rakud lüüsi, kromatiin immuunosadestati histoon H3 vastase ja histoon H3 K14 (lüsiin 14) atsetüleerimistundliku antikehadega. Saadud DNA analüüsi kvantitatiivse PCR'iga kasutades CD43 ja p21 spetsiifilisi praimereid (vt materjal ja meetodika). Tulemuste normaliseerimiseks kasutati GAPDH järjestuse spetsiifiliste praimeritega saadud tulemusi.



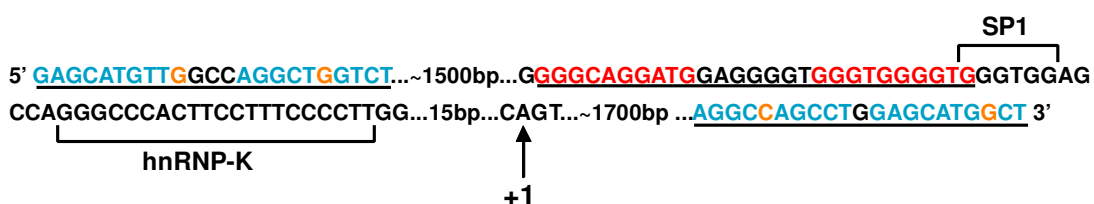
Joonis 9. p53 vähendab histoon H3 K14 atsetüleeritust CD43 geenis. A - CD43 mRNA taseme analüüs COLO-205 rakuliinis kvantitatiivse RT-PCR'ga. Rakkudes ekspresseeriti wt-p53 või p53 ΔPro valke. Kontrollina kasutati rakke, mida on transfecteeritud tühja pCG plasmiidiga. Rakud lüüsiiti 24 h pärast transfectsiooni ja TSA (100 ng/ml) lisati kas 1 h või 5 h enne rakkude lüüsimist. Graafikul on esitatud suhteline mRNA tase võrrelduna tühja pCG plasmiidiga transfecteeritud rakkudesse. **B** - CD43 mRNA taseme analüüs H1299 rakuliinis *northern blot* meetodil. Rakkudes ekspresseeriti wt-p53 või p53 ΔPro valke. Kontrollina kasutati tühja pCG plasmiidiga transfecteeritud rakke. Rakud lüüsiiti 24 h pärast transfectsiooni ja TSA (100 ng/ml) lisati 20 h enne rakkude lüüsimist. **C** - Kvantitatiivse PCR'i analüüs kromatiini immuunosadestamisest saadud DNA fragmentidest CD43 ja p21 spetsiifiliste praaimeritega. H1299 rakuliinis ekspresseeriti kas wt-p53 või p53 Arg248 mutantset valku. Kromatiin sadestati histoon H3 K14 atsetüleerimistundliku ja üldise histoon H3 vastase antikehaga. Graafikul on atsetüleeritus histooni kohta esitatud suhtena Arg248 plasmiidiga transfecteeritud rakkudesse.

Joonisel 9 C esitatud andmetest selgub, et p53 on tõepoolest võimeline spetsiifiliselt alandama CD43 promootori läheduses olevate histoonide atsetüleeritust. Kontrollina on kasutatud p53 poolt transaktiveeritavat geeni p21, mille atsetüleeritus p53 sõltuvalt kasvab. Saadud tulemused on kooskõlas eelpool esitatud andmetega, kus HDAC kompleksi inhibeerimine vähendab p53 mõju CD43 mRNA tasemele.

p53 vastuselemendid CD43 geeni regulatoorsetel aladel

Olles teinud kindlaks, et p53 mõjutab CD43 promootorala lähedustes olevate histoonide atsetüleeritust, huvitas meid, kas p53 ise on võimeline CD43 geeni regulatoorsetele aladese seonduma. Selle tarvis otsisime CD43 geenist ja sellega piirnevatest aladest võimalikke p53 seondumiskohasid vajalikke DNA elemente.

Nende elementide otsimiseks kirjutati võimalikud p53 vastuselemendid lahti regulaaravaldistena. p53 konsensusaidi jaoks näeb selline avaldis välja järgmine: (A|G)(A|G)(A|G)C(A|T)(A|T)G(T|C)(T|C)(T|C)...0-13...(A|G)(A|G)(A|G)C(A|T)(A|T)G(T|C)(T|C)(T|C) ning sellega on defineeritud igasse positsiooni lubatavad nukleotiidid. Kuna vähesed p53 seostumissaidid vastavad täpselt konsensusaidile, lubati igasse saiti ka kaks mutatsiooni (üks kummassegi 10 nukleotiidisesse blokki). Mutatsioon oli defineeritud avaldisena, mis lubas mingisse positsiooni kõiki nukleotide: (A|G|C|T). Inimese 16 kromosoomi järjestus koordinaatidega 29578077 - 29594688 laaditi alla inimese genoomi andmebaasist *Ensemble* ja regulaaravaldistega otsimiseks kasutati programmi *Editplus (ES-computing)*. Lisaks p53 konsensusaidile on p53 puhul kirjeldatud ka teine, erinev seostumisjärjestus, mis on vajalik p53-sõltuvaks transrepressiooniks. Selle järjestuse saab üldistatult kirjutada järgnevalt: RRRYRRRRYR (R - A/G, Y - T/C). Järjestus peab sihtmärk DNA-l olema esindatud kahe koopiana ja seda võib eraldada vähemalt 12 nukleotiidi (Johnson et al., 2001). Selle järjestuse otsimiseks kasutati regulaaravaldist (A|G)(A|G)(A|G)(T|C)(A|G)(A|G)(A|G)(A|G)(T|C)(A|G)...0-12...(A|G)(A|G)(A|G)(T|C)(A|G)(A|G)(A|G)(A|G)(T|C)(A|G) ja järjestuse puhul mutatsioone ei lubatud.



Joonis 10. p53 vastuselemendid CD43 geeni regulatoorsetel aladel. +1 viitab transkriptsiooni alustamise kohale. Allajoonitult on toodud p53 vastuselemendid. Neist punasega on näidatud repressiooni puhul kirjeldatud p53 seondumiskoht ja sinisega p53 konsensusaidid. Oranžiga näidatud konsensusest erinevad positsioonid. Näidatud on ka transkriptsioonifaktorite SP1 ja hnRNP-K seostumise kohad.

Nagu näha joonisel 10, on CD43 geeni läheduses kolm võimalikku p53 vastuselementi. Nendest kaks on sarnased p53 konsensusaidiga ja üks p53 seostumissaidiga,

mis on oluline p53 vahendatud transkriptsiooni repressioonis. p53 konsensussaidile sarnased seostumiskohad on transkriptsiooni initsiatsiooni kohast võrdlemisi kaugel (~1500 bp). Samas p53-sõltuva transrepressiooni vastuselemendile sarnane p53 võimalik seostumise koht asub CD43 otsesel promootoralal. Nendest tulemustest lähtuvalt võib oletada, et p53 võiks olla võimeline CD43 geeni reguleerivate aladega seonduma ja CD43 transkriptsiooni represserima.

Kokkuvõttes näitavad käesoleva töö tulemused, et p53 mõjutab CD43 ekspressiooni nii transkriptsiooni regulatsiooni, kui valgu tasemel. Töö tulemused kinnitavad meie esitatud hüpoteesi, mille kohaselt p53 takistab transkriptsiooni CD43 geenilt indutseerides histoonide deasetüleerimise CD43 promootori läheduses. Töö edasiarendusena on kindlasti plaanis välja selgitada, kas p53 seostub meie poolt leitud vastuselementidega CD43 geeni reguleerivate aladel.

Arutelu

Kasvajarakkude üheks iseloomulikuks tunnuseks on nende suurenenud jagunemiskiirus, mis võib olla tingitud samaaegselt nii onkogeenide aktivatsioonist kui ka tuumorsupressorite inaktivatsioonist. Fakt, et tuumorsupressorvalk p53 on ligikaudu pooltes inimese pahaloomulistes kasvajates inaktiveeritud, kinnitab tema tähtsust kasvaja tekke pidurdamisel. Sellest funktsioonist tulenevalt on varasemalt täheldatud funktsionaalse p53 kõrgendatud ekspressiooni just kasvajate varastel arengujärgudel (Mazars et al., 1991).

Kirjeldatud on ka CD43 kõrgendatud ekspressiooni käärsoole adenoomide ja kartsinoomide varases arengujärgus, mis viitab tema osalusele kasvaja arengus (Sikut et al., 1997). Meie töögrupi varasemas töös on näidatud CD43 võimet ARF sõltuvalt indutseerida p53 taseme tõusu, mille tulemusena viiakse rakud apoptoosi (Kadaja et al., 2004). p53 või ARF puudumisel käitub CD43 kui rakkude jagunemist soodustav faktor (avaldamata andmed esitatud käsikirjast). CD43 omab seega kasvajarakkudes onkogeenidele sarnaseid omadusi ja võib sellest tulenevalt panustada kasvajate tekkesse ja arengusse. Varasemalt on erinevates töödes näidatud p53 ja CD43 ekspressioonitaseme muutusi vererakkude küpsemisel. CD43 ekspresseerub eelkõige vererakkude proliferatsioonil, samas kui p53 kõrgendatud ekspressiooni täheldatakse vereloome rakkude diferentseerumisel (Dragone et al., 1995; Kastan et al., 1991). Huvi CD43 ja p53 vaheliste seoste uurimiseks süvenes veelgi tänu juba teadaolevate tagasisidelingude esinemisele p53 ja mitmete teiste valkude vahel nagu Mdm2, β -kateniin jne. Näiteks onkogeneenne valk β -kateniin indutseerib p53 taseme tõusu ning aktiveerimise, mis omakorda soodustab β -kateniini p53-sõltuvat lagundamist (Sadot et al., 2001). Seetõttu kujunes hüpotees, mille kohaselt CD43 poolt mõjutatav p53 võiks omakorda mõjutada ka CD43 ekspressiooni.

Käesoleva töö tulemused näitavad, p53 mõjutab CD43 ekspressiooni rakus nii transkriptsiooni reguleerimise, kui ka valgu tasemel (post-transkriptsiooniliselt). Esmalt uuriti p53 mõju CD43 valgu tasemele ja leiti, et p53 alandab 24 h möödudes spetsiifiliselt CD43 eksogeense valgu taset rakus. Varasemalt oli aga teada, et CD43 üleekspressioon indutseerib aktiivse p53 akumulierimise kaudu rakkudes apoptoosi 48 tunni jooksul pärast transfektsiooni (Kadaja et al., 2004). Sellel põhjusel oli oluline kindlaks teha, kas CD43 valgu taseme vähenemine võis olla põhjustatud apoptoosist. Analüüsides 24 h pärast rakkude transfektsiooni apoptootiliste rakkude hulka leiti, et selle aja jooksul märgatavat apoptoosi suurenemist ei esinenud. Küll aga oli samades rakkudes näha p53 mõju eksogeensele CD43

valgu tasemele. p53-st tingitud muutusi CD43 valgu tsütoplasmaatilise domeeni ja GFP liitvalgu taseme osas ei täheldatud.

Eelnevatest katsetest selgus, et p53 alandab spetsiifiliselt eksogeense CD43 valgu taset rakus. Edaspidi huvitas meid aga, kuidas mõjutab p53 endogeenset CD43. Analüüsid CD43 endogeense valgu taset H1299 rakkudes läbivoolutsütomeetril selgus, et p53 ekspresseerivates rakkudes on endogeense CD43 valgu tase võrreldes kontrollrakkudega oluliselt madalam. Sama tulemuse saime ka COLO-205 rakkudes (Anna Balikova avaldamata andmed).

Olles välja selgitanud, et p53 mõjutab endogeense CD43 valgu taset rakus, otsustasime kontrollida, kas p53 võiks lisaks mõjutada ka transkriptsiooni CD43 geenilt. Selle kindlaks tegemiseks uuriti p53 mõju CD43 mRNA tasemele. Esmalt analüüsisime CD43 mRNA taset meie poolt kasutatavates rakuliinides. Selgus, et nii H1299 kui ka COLO-205 rakuliinis ekspresseerub CD43 mRNA piisaval tasemel, et p53 mõju sellele oleks võimalik uurida. COLO-205 rakuliinis oli CD43 mRNA tase võrreldav vererakuliinidega. Need andmed on kooskõlas ka varem kirjanduses avaldatuga (Fernandez-Rodriguez et al., 2002) Samas H1299 rakuliinis ekspresseerus CD43 u 1000 korda madalamal tasemel. Järgnevalt leidsime, et p53 alandab spetsiifiliselt CD43 mRNA taset nii H1299 kui ka COLO-205 rakuliinis. CD43 poolses p53 aktivatsioonis oluline tuumorsupressorvalk ARF aga CD43 mRNA taset ei mõjutanud.

Senised tulemused on näidanud, et wt-p53 ekspresseerivates rakkudes väheneb nii endo- kui eksogeense CD43 valgu tase ning samuti CD43 mRNA tase. mRNA taseme vähenemine on seletatav p53 mõjuga transkriptsioonile CD43 geenilt. p53 võime mõjutada eksogeense CD43 valgu taset viitab sellele, et lisaks reguleeritakse CD43 ekspressiooni ka post-transkriptsiooniliselt. Seega reguleeritakse endogeense CD43 valgu taset nii läbi transkriptsiooni regulatsiooni, kui ka valgu ekspressiooni mõjutamise. Kirjeldatud fenomenide täpsemaks seletamiseks otsustasime uurida millised p53 valgu piirkonnad ja bioloogilised aktiivsused nendeks protsessideks vajalikud on. Tehtud katsete tulemusena võib väita, et eksogeense CD43 valgu taseme alandamiseks vajalik p53 aminotermiinalne osa ja transaktivatsioonivõime, kuna ükski transaktivatsioonidefektsetest mutantidest CD43 taset ei vähendanud. p53 valgu karboksütermiinalse osa deletsioon vähendas mõningal määral tema repressiivset mõju CD43-le. Ka varasemalt kirjeldatud β -kateniini valgu taseme alandamiseks on oluline p53 transaktivatsioonivõime (Sadot et al., 2001). See fakt viitab sellele, et p53 mõju CD43 ja β -kateniini valgule toimub sarnase mehhanismi alusel, kuid see hüpotees vajab veel kontrollimist. Põhjus, miks osaliselt transaktivatsioonivõimeline p53 monomeerne valk CD43 prekursorvalgu taset ei alanda jäi esialgu selgusetu. p53 puhul on

kirjeldatud ka tema võime reguleerida miRNA-de ekspressiooni rakus, mille tulemusena reguleeritakse posttranskriptsiooniliselt p53-spetsiifiliselt kuni 200 geeni ekspressiooni (Xi et al., 2006). Võimalik, et p53 posttranskriptsiooniline efekt CD43 ekspressioonile on vahendatud miRNA-de poolt.

Uurides erinevate p53 mutantsete valkude võimet alandada CD43 mRNA taset leidsime, et p53 transaktivatsioonivõime selleks nii oluline ei ole. CD43 mRNA taset olid võimelised alandama ka mõned transaktivatsioonivõimetud p53 valgud. Nendeks olid p53 valk millel oli deleteeritud ala nii amino- kui ka karboksüterminusest ja valk, millel puudus RPA sidumisdomeen. Samas andsid saadud tulemused vihje, et CD43 mRNA taseme alandamiseks on oluline hoopis p53 transrepressioonivõime. Nimelt pidi p53 CD43 mRNA taseme alandamiseks olema võimeline seonduma DNA-ga, kuna kasutatud DNA sidumisdefektne p53 punktmutant CD43 mRNA taset ei alandanud. CD43 mRNA taset ei alandanud ka oligomerisatsiooni domeenita p53 mutant. Kirjanduse andmetel seob tetrameerne p53 monomeerist efektiivsemalt DNA-d (Jeffrey et al., 1995; Nagaich et al., 1999). Samuti jäävad oligomerisatsiooni domeeni aminohapped 339-346, mis on vajalikud p53-vahendatud transrepressiooniks (Hong et al., 2001). Lisaks sellele on CD43 mRNA mõjutamiseks oluline p53 aminotermiinaalne ala. p53 aminotermiinaalses alas on mitmed p53 aktivatsiooniks olulised aminohapped ning varasemalt on näidatud, et selles alas olevad aminohapped 22 ja 23 on olulised p53-sõltuvaks transrepressiooniks (Stein et al., 2002). p53 kaotas võime mõjutada CD43 mRNA taset ka proliinirikka domeeni deleteerimisel. p53 proliinirikas domeen on aga oluline piirkond p53-sõltuvaks transrepressiooniks (Koumenis et al., 2001; Vousden & Lu, 2002). Kasutatud transaktivatsioonivõimelistes p53 mutantides deleteeritud alad on aga varemgi kirjeldatud kui transrepressiooniks väheolulisi. Nii karboksüterminaalsed aminohapped (364 - 392) kui ka RPA domeen ei ole olulised p53-vahendatud transrepressioonis (Leiter et al., 1996; Stein et al., 2002; Wu et al., 2001).

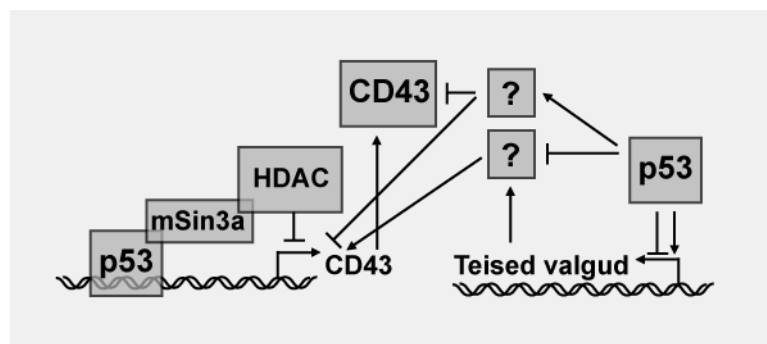
Oma tulemusi kirjanduses avaldatud andmetega kõrvutades otsustasimegi kontrollida võimalust, et CD43-e mRNA taseme alanemine võiks olla tingitud p53-vahendatud transrepressioonist. p53 võib teatud gene repressioneerida initsieerides korepressori mSin3a ja HDAC vahendusel histoonide deatsetüleerimise. Selleks protsessiks on oluline p53 proliinirikas domeen, millega mSin3a interakteerub ja värbab HDAC (Ho & Benchimol, 2003; Ho et al., 2005; Koumenis et al., 2001; Vousden & Lu, 2002). Histoonide deatsetüleerimise tagajärjel pakitakse kromatiin tihedamalt kokku ja transkriptsioonifaktorite DNA-ga seostumise efektiivsus väheneb. Kuna ka meie eelpool toodud tulemused näitasid, et CD43 mRNA taseme alandamiseks on vajalik p53 proliinirikas domeen, kontrollisimegi just

seda repressioonimudelit. Tehtud katsete tulemusena selgus, et HDAC inhibeerimisel TSA-ga ei ole p53 võimeline CD43 mRNA taset alandama. TSA lisamisel hakkab juba tunni möödudes p53 efekt kaduma ja rakkudes, mis on olnud TSA mõju all vähemalt 5 h, ei ole p53 võimeline CD43 mRNA taset alandama. Teades, et HDAC inhibeerimisel kaotab p53 võime alandada CD43 mRNA taset, kontrollisime järgnevalt histoonide atsetüleeritust CD43 promootori läheduses. Selleks kasutasime kromatiini immuunosadestamist histooni H3 atsetüleerimistundliku antikehaga. Tulemus näitas, et p53 ekspresseerivates rakkudes on CD43 geeni promootorala läheduses histoon H3 lüsiin 14 atsetüleeritus vähenenud. Kontrollina kasutasime p53 poolt aktiveeritavat p21 geeni, mille atsetüleeritus p53 ekspresseerivates rakkudes kasvas. Sarnast mehhanismi on kirjeldatud ka onkogeeni c-myc p53-sõltuval transkriptsiooni repressioonil (Ho et al., 2005). Seega, on üsna tõenäoline, et p53-sõltuv CD43 geeniekspressiooni repressioon on vahendatud HDAC ja mSin3a komplekside poolt. Selle hüpoteesi kasuks räägib asjaolu, et mSin3a seondub p53-ga lisaks proliinirikikale alale ka piirkonnaga karboksüterminuses (aminohapped 320-360), mis kattub oligomerisatsiooni domeeniga (Murphy et al., 1999). Vastava ala deletsiooniga p53 mutant CD43 mRNA taset ei mõjutanud.

Olles leidnud, et p53 on võimeline indutseerima CD43 promootori lähedaste histoonide deatsetüleerimist, otsisime võimalikke p53 vastuselemente CD43 geeni lähedusest. Teada on, et DNA-ga seostunud p53 on võimeline seostuma mSin3a-ga ja HDAC vahendusel histoonide deatsetüleerimist algatama. CD43 geeni ja sellega piirnevaid alasid analüüsid leiti, et selles piirkonnas on kolm võimalikku p53 seostumissaiti. Kaks neist asusid ~1500 bp kaugusel transkriptsiooni CD43 transkriptsiooni algussaidist, üks aga CD43 otsesel promootoralal (-50 bp). CD43 promootoralal asuv p53 seostumissait on aga sarnane just p53-transrepressiooni vahendava järjestusega (Johnson et al., 2001). Seega on täiesti võimalik, et p53 seostub CD43 promootoralaga ja indutseerib mSin3a ja HDAC vahendusel histoonide deatsetüleerimise. Lisaks sellele kattub CD43 promootorala p53 seostumissait transkriptsioonifaktori SP1 seostumise kohaga. Seega võib p53 takistada ka CD43 promootorit aktiveeriva SP1 seostumist ja selliselt CD43 ekspressiooni mõjutada. Näiteks inimese DNA polümeraasi δ katalüütilise subühiku promootoril konkureerib p53 transkriptsioonifaktoriga SP1 (Li & Lee, 2001). Lisaks võib p53 seostuda ka SP1 endaga ja muuta tekkinud kompleksi transkriptsiooniliselt mitteaktiivseks (Borellini & Glazer, 1993).

Kirjandusest on teada, et transkriptsiooni CD43 promootorilt reguleerib negatiivselt ka hnRNP-K (Da Silva et al., 2002). p53 on aga võimeline hnRNP-K ekspressioonitaset rakus tõstma. hnRNP-K geenis on p53 vastuselement ja p53 tõstab nii hnRNP-K mRNA kui valgu

taset rakus (Rahman-Roblick et al., 2007). Lisaks sellele on Mdm2 võimeline hnRNP-K'd ubikvitinüleerima ka ja indutseerima tema lagundamise proteasoomses rajas. Aktiivse p53 ekspressioonil on aga hnRNP-K lagundamine takistatud. Kirjandusest on teada ka p53 ja hnRNP-K kooperatiivne seostumine juba teadaolevatele p53 poolt mõjutatavatele p21 ja Mdm2 promootoritele. hnRNP-K puudumisel on nendele promootoritele takistatud ka p53 enese seostumine (Moumen et al., 2005). Sellest lähtuvalt tuleb arvestada ka võimalusega, et meie poolt kirjeldatud p53 mõju CD43 ekspressioonile on ühtlasi vahendatud ka hnRNP-K poolt. Võimalikud mehhanismid, mille kaudu p53 CD43 ekspressiooni mõjutab on toodud joonisel 11.



Joonis 11. Mehhanismid, kuidas p53 võiks CD43 ekspressiooni mõjutada. Üheltpoolt mõjutab p53 otseselt CD43 geeniekspressiooni indutseerides CD43 promootorala deatsetüleerimise. Teiselt poolt toimub p53 mõju CD43 ekspressioonile post-transkriptsiooniliselt. p53 poolt aktiveeritavaks faktoriks võiks olla näiteks hnRNP-K ja represseritavaks faktoriks SP1.

CD43 on oluline valk vererakkude küpsemisel, ekspresseerudes eelkõige just vererakkude proliferatiivses küpsemisfaasis (Dragone et al., 1995). CD43 pidev kõrgeenenud ekspressioon transgeensete hiirte küpsetes lümfotsüütides (kus CD43 tavaliselt ei ekspresseeru) põhjustab põrna suurenemist ja pikendab B-lümfotsüütide eluiga *in vivo*, mida seletati rakkude vähenenud tundlikkusega apoptoosi suhtes (Dragone et al., 1995). p53 puhul on aga teada, et ta represserib mitmeid antiapoptootilisi geenie nagu Bcl-2, surviviin, MAP4, ja p202 (Chiou et al., 1994; D'Souza et al., 2001; Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002; Murphy et al., 1996; Wang et al., 1993). Sarnaselt CD43-le osaleb ka p53 vererakkude küpsemisel. p53 kõrgendatud ekspressiooni täheldatakse vereloome rakkude diferentseerumisel, mil nende aktiivne jagunemine on peatatud (Kastan et al., 1991). Samuti tekivad p53 knock-out hiirtel enamasti just lümfoomsed kasvajakud (Donehower et al., 1992; Donehower et al., 1995). Kasvajarakkudes ongi näidatud CD43 võimet ARF sõltuvalt

aktiveerida p53 ja initsieerida apoptoosi (Kadaja et al., 2004). Samas p53 või ARF puudumisel stimuleerib CD43 kasvajakude jagunemist (avaldamata andmed publitseerimiseks esitatud käsikirjast). Nendest andmetest lähtuvalt võib oletada, et normaalne signaliseerimine CD43 ja p53 vahel on tähtis faktor kasvajate tekke vältimisel. Hetkel teame, et CD43 aktiveerib p53 ja p53 on võimeline vastusena sellele represserima CD43 ekspressiooni ning initsieerima apoptoosi. CD43 puhul on varemalt kirjeldatud ka tema antiapoptootilisi omadusi (Dragone et al., 1995). Sellest tulenevalt võib p53 represseerida CD43 kui ühte antiapoptootilist faktorit ja tagada sellega normaalne apoptoosi kulg.

Olles veendunud normaalse signaliseerimise olulisuses p53 ja CD43 vahel, on antud töö jätkuna plaanis uurida põhjalikumalt mehhanismi, mil viisil p53 CD43 ekspressiooni mõjutab. Esiteks sooviksime kindlalt välja selgitada, kas p53 seostub ise CD43 promootoralaga ja represserib sellelt transkriptsiooni kromatiini kokkupakkumist indutseerides, või on see protsess vahendatud mingite teiste faktorite poolt. Lisaks sellele vajab välja selgitamist mehhanism, kuidas mõjutab p53 CD43 valgu tasemel.

Kokkuvõttes oleme töö tulemusena leidnud, et p53 mõjutab CD43 ekspressiooni nii transkriptsiooni regulatsiooni, kui valgu tasemel. Lisaks kinnitavad käesolevas töös saadud tulemused meie esitatud hüpoteesi, mille kohaselt p53 takistab transkriptsiooni CD43 geenilt indutseerides sellega piirnevate alade deatsetüleerimise ja näitavad varem kirjeldamata tagasisidet CD43 ning p53 vahel, mis võiks olla olulise tähtsusega kasvajate tekke vältimisel.

Kokkuvõte

Nii CD43 kui ka p53 on kasvajate arengu algfaasis ekspresseeruvad valgud. CD43 ekspresseerub eelkõige käärsõole adenoomide ja kartsinoomide arengu algetapis. p53 akumulereerub erinevate kasvajate, sealhulgas ka käärsõolekasvajate arengu algfaasis. Mutatsioonid p53 geenis ilmuvad suhteliselt hilisemas kasvaja arengujärgus. p53 ja CD43 ekspressioonitaseme muutusi on varemalt erinevates töödes näidatud vererakkude küpsemisel. CD43 ekspresseerub eelkõige vererakkude proliferatsioonil, p53 aga vereloome rakkude diferentseerumisel. Töögrupi varasemas avaldatud töös on näidatud, et CD43 üleekspressioon põhjustab tuumorsupressorvalkude p53 ja ARF-i ekspressioonitaseme tõusu ning apoptoosi induktsiooni neis rakkudes. p53 või ARF-i puudumisel stimuleerib CD43 rakkude jagunemist. Uurimistöö käigus selgus aga, et p53 ekspresseerivates rakkudes oli CD43 valgu tase madalam. Nendest andmetest tulenevalt tekkis meie laboris huvi uurida võimalusi, mil viisil CD43 ja p53 võiksid üksteise ekspressioonitaset mõjutada. Käesoleva töö käigus üritasime vastust leida küsimusele, kas p53 mõjutab ka CD43 ekspressiooni.

Töö tulemused näitavad, et p53 on võimeline spetsiifiliselt vähendama ekso- ja endogeense CD43 valgu ja endogeense CD43 mRNA taset rakus. CD43 sõltuvaks p53-vahendatud apoptoosiks on vajalik tuumorsupressori ARF osalus, kuid ARF üleekspressioon üksinda CD43 ekspressiooni ei mõjuta. Eksogeense CD43 valgu taseme alandamiseks on vajalik p53 transaktivatsioonivõime. Eeldatavalt aktiveerib p53 kolmandate geenide ekspressiooni, mis CD43 ekspressiooni valgu tasemel reguleerivad. CD43 mRNA tase alaneb p53-sõltuvalt tänu transkriptsiooni vähenemisele CD43 geenilt. p53 takistab transkriptsiooni CD43 geenilt kutsudes esile promootori läheduses olevate histoonide atsetüleerituse vähenemise. Lisaks endogeense CD43 mRNA vähenemisele kirjeldasime ka endogeense CD43 valgu taseme vähenemise p53-sõltuvalt. Võib arvata, et p53 mõjutab endogeense CD43 ekspressiooni nii transkriptsiooni reguleerimise kui ka valgu tasemel.

Kokkuvõttes näitavad töö tulemused varem kirjeldamata tagasisidet CD43 ja p53 poolt vahendatud signaaliradade vahel, mis võiks olla olulise tähtsusega kasvajate tekke vältimisel.

Summary

Both CD43 and p53 are shown to be present at the early phases of tumorigenesis. CD43 is mostly expressed at the early stages of colon adenomas and carcinomas, but not in normal epithelium. Wt p53 is shown to be present at the early stages of many tumors, including colon adenomas and carcinomas. Mutations of p53 gene are mostly described in late tumors. Previously, the fluctuations in the levels of p53 and CD43 have been described during the differentiation of hematopoietic cells. CD43 is expressed mostly in proliferative stage of hematopoiesis and p53 during the differentiation of hematopoietic cells. Previous work of our group has shown that the overexpression of CD43 causes the accumulation of p53 and induction of apoptosis, which is a ARF-dependent process. Without p53 or ARF CD43 promotes cell growth. Furthermore, it came out that the protein level of CD43 is considerably lower in p53 expressing cells. Therefore, we became interested in studying the cross-talk between these two proteins. This study tries to find out, whether and how p53 affects the expression level of CD43.

The results of this work show that p53 specifically downregulates the expression of endogenous and exogenous CD43 protein and endogenous mRNA. Transactivating properties of p53 are necessary to affect the expression of exogenous CD43. p53 probably activates some other genes that affect CD43 protein levels. The downregulation of CD43 mRNA is caused by decrease in transcription from its gene. p53 initiates the deacetylation of histones near CD43 promoter, which compresses chromatin and reduces transcription. We have also described significant p53-dependent downregulation of endogenous CD43 protein. The levels of endogenous CD43 are probably regulated both by transcription and on protein level.

In conclusion, the results of this work showed a new feedback-loop between CD43- and p53-signaling pathways, which we believe to have an important role on preventing the tumorigenesis.

Kasutatud kirjandus

- Abarzua P, LoSardo JE, Gubler ML, Spathis R, Lu YA, Felix A and Neri A. (1996). *Oncogene*, **13**, 2477-82.
- Andersson CX, Fernandez-Rodriguez J, Laos S, Baeckstrom D, Haass C and Hansson GC. (2005). *Biochem J*, **387**, 377-84.
- Andersson CX, Fernandez-Rodriguez J, Laos S, Sikut R, Sikut A, Baeckstrom D and Hansson GC. (2004). *Biochem Biophys Res Commun*, **316**, 12-7.
- Appella E. (2001). *Eur J Biochem*, **268**, 2763.
- Ardman B, Sikorski MA and Staunton DE. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5001-5.
- Arrowsmith CH and Morin P. (1996). *Oncogene*, **12**, 1379-85.
- Avantaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS and Kelly K. (1997). *Cell*, **89**, 1175-84.
- Baekstrom D. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 11503-9.
- Baekstrom D, Hansson GC, Nilsson O, Johansson C, Gendler SJ and Lindholm L. (1991). *J Biol Chem*, **266**, 21537-47.
- Baekstrom D, Zhang K, Asker N, Ruetschi U, Ek M and Hansson GC. (1995). *J Biol Chem*, **270**, 13688-92.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y and Ziv Y. (1998). *Science*, **281**, 1674-7.
- Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD and Berger SL. (2001). *Mol Cell*, **8**, 1243-54.
- Bazil V, Brandt J, Tsukamoto A and Hoffman R. (1995). *Blood*, **86**, 502-11.
- Baum LG, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart CH, Fukuda M and Seilhamer JJ. (1995). *J Exp Med*, **181**, 877-87.
- Bell S, Klein C, Muller L, Hansen S and Buchner J. (2002). *J Mol Biol*, **322**, 917-27.
- Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, Sheer D, Shows TB, Bruns GA and Peacock J. (1985). *Somat Cell Mol Genet*, **11**, 505-10.
- Bienz B, Zakut-Houri R, Givol D and Oren M. (1984). *Embo J*, **3**, 2179-83.
- Bode AM and Dong Z. (2004). *Nat Rev Cancer*, **4**, 793-805.
- Borellini F and Glazer RI. (1993). *J Biol Chem*, **268**, 7923-8.
- Brown TJ, Shuford WW, Wang WC, Nadler SG, Bailey TS, Marquardt H and Mittler RS. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 27686-95.
- Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E and Fornace AJ, Jr. (1999). *Embo J*, **18**, 6845-54.
- Cariello NF, Beroud C and Soussi T. (1994). *Nucleic Acids Res*, **22**, 3549-50.
- Carlsson SR and Fukuda M. (1986). *J Biol Chem*, **261**, 12779-86.
- Carlsson SR, Sasaki H and Fukuda M. (1986). *J Biol Chem*, **261**, 12787-95.
- Caspari T. (2000). *Curr Biol*, **10**, R315-7.
- Cayrol C, Knibiehler M and Ducommun B. (1998). *Oncogene*, **16**, 311-20.
- Cermak L, Simova S, Pintzas A, Horejsi V and Andera L. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 7955-61.
- Chen J, Marechal V and Levine AJ. (1993). *Mol Cell Biol*, **13**, 4107-14.
- Chene P. (2003). *Nat Rev Cancer*, **3**, 102-9.
- Chiou SK, Rao L and White E. (1994). *Mol Cell Biol*, **14**, 2556-63.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD and Pavletich NP. (1994). *Science*, **265**, 346-55.
- Crowe AJ, Sang L, Li KK, Lee KC, Spear BT and Barton MC. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 25113-20.
- Cyster J, Somoza C, Killeen N and Williams AF. (1990). *Eur J Immunol*, **20**, 875-81.
- Cyster JG, Shotton DM and Williams AF. (1991). *Embo J*, **10**, 893-902.
- D'Souza S, Xin H, Walter S and Choubey D. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 298-305.
- Da Silva N, Bharti A and Shelley CS. (2002). *Blood*, **100**, 3536-44.
- Dang CV and Lee WM. (1989). *J Biol Chem*, **264**, 18019-23.
- Dawson R, Muller L, Dehner A, Klein C, Kessler H and Buchner J. (2003). *J Mol Biol*, **332**, 1131-41.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS and Bradley A. (1992). *Nature*, **356**, 215-21.

- Donehower LA, Harvey M, Vogel H, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Park SH, Thompson T, Ford RJ and Bradley A. (1995). *Mol Carcinog*, **14**, 16-22.
- Dragone LL, Barth RK, Sitar KL, Disbrow GL and Frelinger JG. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 626-30.
- Dutta A, Ruppert JM, Aster JC and Winchester E. (1993). *Nature*, **365**, 79-82.
- Dyson HJ and Wright PE. (2002). *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 54-60.
- el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y and et al. (1994). *Cancer Res*, **54**, 1169-74.
- el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW and Vogelstein B. (1992). *Nat Genet*, **1**, 45-9.
- Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH and Weissman AM. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 8945-51.
- Farmer G, Colgan J, Nakatani Y, Manley JL and Prives C. (1996). *Mol Cell Biol*, **16**, 4295-304.
- Fernandez-Rodriguez J, Andersson CX, Laos S, Baeckstrom D, Sikut A, Sikut R and Hansson GC. (2002). *Tumour Biol*, **23**, 193-201.
- Freedman DA, Epstein CB, Roth JC and Levine AJ. (1997). *Mol Med*, **3**, 248-59.
- Freedman DA and Levine AJ. (1999). *Cancer Res*, **59**, 1-7.
- Fridman JS and Lowe SW. (2003). *Oncogene*, **22**, 9030-40.
- Friedman PN, Chen X, Bargonetti J and Prives C. (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3319-23.
- Fuhlbrigge RC, King SL, Sackstein R and Kupper TS. (2006). *Blood*, **107**, 1421-6.
- Fukuda M. (1991). *Glycobiology*, **1**, 347-56.
- Fukuda M and Carlsson SR. (1986). *Med Biol*, **64**, 335-43.
- Geddie ML, O'Loughlin TL, Woods KK and Matsumura I. (2005). *J Biol Chem*, **280**, 35641-6.
- Giannakakou P, Nakano M, Nicolaou KC, O'Brate A, Yu J, Blagosklonny MV, Greber UF and Fojo T. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10855-60.
- Giannakakou P, Sackett DL, Ward Y, Webster KR, Blagosklonny MV and Fojo T. (2000). *Nat Cell Biol*, **2**, 709-17.
- Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M and Oren M. (1991). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9979-83.
- Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M and Del Sal G. (1999). *Embo J*, **18**, 6462-71.
- Gu W and Roeder RG. (1997). *Cell*, **90**, 595-606.
- Gu W, Shi XL and Roeder RG. (1997). *Nature*, **387**, 819-23.
- Harlow E, Williamson NM, Ralston R, Helfman DM and Adams TE. (1985). *Mol Cell Biol*, **5**, 1601-10.
- Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Vousden KH and Oren M. (1995). *Genes Dev*, **9**, 2170-83.
- Helt CE, Cliby WA, Keng PC, Bambara RA and O'Reilly MA. (2005a). *J Biol Chem*, **280**, 1186-92.
- Helt CE, Wang W, Keng PC and Bambara RA. (2005b). *Cell Cycle*, **4**, 529-32.
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW and Vogelstein B. (1997). *Mol Cell*, **1**, 3-11.
- Ho J and Benchimol S. (2003). *Cell Death Differ*, **10**, 404-8.
- Ho JS, Ma W, Mao DY and Benchimol S. (2005). *Mol Cell Biol*, **25**, 7423-31.
- Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J and Murphy M. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 3247-57.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R and Harris CC. (1994). *Nucleic Acids Res*, **22**, 3551-5.
- Honda R and Yasuda H. (1999). *Embo J*, **18**, 22-7.
- Hong TM, Chen JJ, Peck K, Yang PC and Wu CW. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 1510-5.
- Horikoshi N, Usheva A, Chen J, Levine AJ, Weinmann R and Shenk T. (1995). *Mol Cell Biol*, **15**, 227-34.
- Hupp TR and Lane DP. (1994). *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **59**, 195-206.
- Hupp TR, Meek DW, Midgley CA and Lane DP. (1992). *Cell*, **71**, 875-86.
- Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP and Lee JM. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2147-52.
- Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E and Yao TP. (2001). *Embo J*, **20**, 1331-40.
- Jackson P, Bos E and Braithwaite AW. (1993). *Oncogene*, **8**, 589-97.
- Jeffrey PD, Gorina S and Pavletich NP. (1995). *Science*, **267**, 1498-502.
- Jenkins JR, Chumakov P, Addison C, Sturzbecher HW and Wade-Evans A. (1988). *J Virol*, **62**, 3903-6.

- Jesenberger V and Jentsch S. (2002). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 112-21.
- Joers A, Kristjuhan A, Kadaja L and Maimets T. (1998). *Oncogene*, **17**, 2351-8.
- Johnson RA, Ince TA and Scotto KW. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 27716-20.
- Jung MS, Yun J, Chae HD, Kim JM, Kim SC, Choi TS and Shin DY. (2001). *Oncogene*, **20**, 5818-25.
- Juven-Gershon T and Oren M. (1999). *Mol Med*, **5**, 71-83.
- Kadaja L, Laos S and Maimets T. (2004). *Oncogene*, **23**, 2523-30.
- Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF and Sherr CJ. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8292-7.
- Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H and Inoue M. (2000). *Clin Cancer Res*, **6**, 1239-47.
- Kastan MB, Canman CE and Leonard CJ. (1995). *Cancer Metastasis Rev*, **14**, 3-15.
- Kastan MB, Radin AI, Kuerbitz SJ, Onyekwere O, Wolkow CA, Civin CI, Stone KD, Woo T, Ravindranath Y and Craig RW. (1991). *Cancer Res*, **51**, 4279-86.
- Kley N, Chung RY, Fay S, Loeffler JP and Seizinger BR. (1992). *Nucleic Acids Res*, **20**, 4083-7.
- Kokontis JM, Wagner AJ, O'Leary M, Liao S and Hay N. (2001). *Oncogene*, **20**, 659-68.
- Koumenis C, Alarcon R, Hammond E, Sutphin P, Hoffman W, Murphy M, Derr J, Taya Y, Lowe SW, Kastan M and Giaccia A. (2001). *Mol Cell Biol*, **21**, 1297-310.
- Krause K, Haugwitz U, Wasner M, Wiedmann M, Mossner J and Engeland K. (2001). *Biochem Biophys Res Commun*, **284**, 743-50.
- Krause K, Wasner M, Reinhard W, Haugwitz U, Dohna CL, Mossner J and Engeland K. (2000). *Nucleic Acids Res*, **28**, 4410-8.
- Kudo S. (1998). *Mol Cell Biol*, **18**, 5492-9.
- Kudo S and Fukuda M. (1995). *J Biol Chem*, **270**, 13298-302.
- Kurg R, Parik J, Juronen E, Sedman T, Abroi A, Liiv I, Langel U and Ustav M. (1999). *J Virol*, **73**, 4670-7.
- Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ and Pavletich NP. (1996). *Science*, **274**, 948-53.
- Lee H, Mok KH, Muhandiram R, Park KH, Suk JE, Kim DH, Chang J, Sung YC, Choi KY and Han KH. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 29426-32.
- Lee KC, Crowe AJ and Barton MC. (1999). *Mol Cell Biol*, **19**, 1279-88.
- Leiter LM, Chen J, Marathe T, Tanaka M and Dutta A. (1996). *Oncogene*, **12**, 2661-8.
- Li B and Lee MY. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 29729-39.
- Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R and Gu W. (2003). *Science*, **302**, 1972-5.
- Li Y, Wu D, Chen B, Ingram A, He L, Liu L, Zhu D, Kapoor A and Tang D. (2004). *Oncogene*, **23**, 7355-65.
- Lill NL, Grossman SR, Ginsberg D, DeCaprio J and Livingston DM. (1997). *Nature*, **387**, 823-7.
- Liu G, Schwartz JA and Brooks SC. (1999). *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 359-64.
- Liu WL, Midgley C, Stephen C, Saville M and Lane DP. (2001). *J Mol Biol*, **313**, 711-31.
- Lu H and Levine AJ. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5154-8.
- Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG and Gu W. (2004). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2259-64.
- Mack DH, Vartikar J, Pipas JM and Laimins LA. (1993). *Nature*, **363**, 281-3.
- Maeda Y, Seidel SD, Wei G, Liu X and Sladek FM. (2002). *Mol Endocrinol*, **16**, 402-10.
- Maiyar AC, Phu PT, Huang AJ and Firestone GL. (1997). *Mol Endocrinol*, **11**, 312-29.
- Manjunath N, Correa M, Ardman M and Ardman B. (1995). *Nature*, **377**, 535-8.
- Mazars R, Pujol P, Maudelonde T, Jeanteur P and Theillet C. (1991). *Oncogene*, **6**, 1685-90.
- May P and May E. (1999). *Oncogene*, **18**, 7621-36.
- Mayer BJ and Gupta R. (1998). *Curr Top Microbiol Immunol*, **228**, 1-22.
- McBride OW, Merry D and Givol D. (1986). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 130-4.
- Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V and Koeffler HP. (1986). *Nature*, **319**, 783-4.
- Milner J. (1994). *Semin Cancer Biol*, **5**, 211-9.
- Milner J and Medcalf EA. (1991). *Cell*, **65**, 765-74.
- Milner J, Medcalf EA and Cook AC. (1991). *Mol Cell Biol*, **11**, 12-9.
- Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR, Nielsen LL, Pickett CB and Liu S. (2002). *Oncogene*, **21**, 2613-22.

- Mirza A, Wu Q, Wang L, McClanahan T, Bishop WR, Gheyas F, Ding W, Hutchins B, Hockenberry T, Kirschmeier P, Greene JR and Liu S. (2003). *Oncogene*, **22**, 3645-54.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B and Reed JC. (1994). *Oncogene*, **9**, 1799-805.
- Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ and Jackson SP. (2005). *Cell*, **123**, 1065-78.
- Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ and George DL. (1999). *Genes Dev*, **13**, 2490-501.
- Murphy M, Hinman A and Levine AJ. (1996). *Genes Dev*, **10**, 2971-80.
- Nagaich AK, Zhurkin VB, Durell SR, Jernigan RL, Appella E and Harrington RE. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1875-80.
- Nakano K and Vousden KH. (2001). *Mol Cell*, **7**, 683-94.
- O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Friend S, Fornace AJ, Jr. and Kohn KW. (1997). *Cancer Res*, **57**, 4285-300.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T and Tanaka N. (2000a). *Science*, **288**, 1053-8.
- Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y and Taya Y. (2000b). *Cell*, **102**, 849-62.
- Ogden SK, Lee KC, Wernke-Dollries K, Stratton SA, Aronow B and Barton MC. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 42057-62.
- Oliner JD. (1993). *Bioessays*, **15**, 703-7.
- Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW and Vogelstein B. (1993). *Nature*, **362**, 857-60.
- Ostberg JR, Barth RK and Frelinger JG. (1998). *Immunol Today*, **19**, 546-50.
- Ostberg JR, Dragone LL, Driskell T, Moynihan JA, Phipps R, Barth RK and Frelinger JG. (1996). *J Immunol*, **157**, 4876-84.
- Pallant A, Eskenazi A, Mattei MG, Fournier RE, Carlsson SR, Fukuda M and Frelinger JG. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 1328-32.
- Pedraza-Alva G, Merida LB, Burakoff SJ and Rosenstein Y. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 27564-8.
- Pedraza-Alva G, Merida LB, Burakoff SJ and Rosenstein Y. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 14218-24.
- Picksley SM, Vojtesek B, Sparks A and Lane DP. (1994). *Oncogene*, **9**, 2523-9.
- Piller V, Piller F and Fukuda M. (1989). *J Biol Chem*, **264**, 18824-31.
- Pimenidou A, Madden LA, Topping KP, Smith KA, Monson JR and Greenman J. (2004). *Oncol Rep*, **11**, 327-31.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C and DePinho RA. (1998). *Cell*, **92**, 713-23.
- Prives C and Hall PA. (1999). *J Pathol*, **187**, 112-26.
- Qian H, Wang T, Naumovski L, Lopez CD and Brachmann RK. (2002). *Oncogene*, **21**, 7901-11.
- Ragimov N, Krauskopf A, Navot N, Rotter V, Oren M and Aloni Y. (1993). *Oncogene*, **8**, 1183-93.
- Rahman-Roblick R, Roblick UJ, Hellman U, Conrotto P, Liu T, Becker S, Hirschberg D, Jornvall H, Auer G and Wiman KG. (2007). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 5401-6.
- Reisman D, Greenberg M and Rotter V. (1988). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5146-50.
- Rhodes CH, Honsinger C and Sorenson GD. (1995). *Am J Clin Pathol*, **103**, 404-8.
- Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE and Burakoff SJ. (1991). *Nature*, **354**, 233-5.
- Ryan KM and Vousden KH. (1998). *Mol Cell Biol*, **18**, 3692-8.
- Sadot E, Geiger B, Oren M and Ben-Ze'ev A. (2001). *Mol Cell Biol*, **21**, 6768-81.
- Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW and Appella E. (1998). *Genes Dev*, **12**, 2831-41.
- Sakamuro D, Sabbatini P, White E and Prendergast GC. (1997). *Oncogene*, **15**, 887-98.
- Santamaria M, Lopez-Beltran A, Toro M, Pena J and Molina JJ. (1996). *Cancer Res*, **56**, 3526-9.
- Santana MA, Pedraza-Alva G, Olivares-Zavaleta N, Madrid-Marina V, Horejsi V, Burakoff SJ and Rosenstein Y. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 31460-8.
- Seto E, Usheva A, Zambetti GP, Momand J, Horikoshi N, Weinmann R, Levine AJ and Shenk T. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 12028-32.
- Shaulian E, Zauberman A, Milner J, Davies EA and Oren M. (1993). *Embo J*, **12**, 2789-97.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Tosky MS, Levine AJ and Rotter V. (1991). *Oncogene*, **6**, 2055-65.

- Shaw P, Freeman J, Bovey R and Iggo R. (1996). *Oncogene*, **12**, 921-30.
- Shelley CS, Remold-O'Donnell E, Davis AE, 3rd, Bruns GA, Rosen FS, Carroll MC and Whitehead AS. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2819-23.
- Shelley CS, Remold-O'Donnell E, Rosen FS and Whitehead AS. (1990). *Biochem J*, **270**, 569-76.
- Sherr CJ and Weber JD. (2000). *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 94-9.
- Sikut R, Andersson CX, Sikut A, Fernandez-Rodriguez J, Karlsson NG and Hansson GC. (1999). *Int J Cancer*, **82**, 52-8.
- Sikut R, Nilsson O, Baeckstrom D and Hansson GC. (1997). *Biochem Biophys Res Commun*, **238**, 612-6.
- Silverman LB, Wong RC, Remold-O'Donnell E, Vercelli D, Sancho J, Terhorst C, Rosen F, Geha R and Chatila T. (1989). *J Immunol*, **142**, 4194-200.
- Soussi T, Caron de Fromental C and May P. (1990). *Oncogene*, **5**, 945-52.
- Soussi T and May P. (1996). *J Mol Biol*, **260**, 623-37.
- Steegenga WT, van der Eb AJ and Jochemsen AG. (1996). *J Mol Biol*, **263**, 103-13.
- Stein T, Crighton D, Warnock LJ, Milner J and White RJ. (2002). *Oncogene*, **21**, 5540-7.
- Stockl J, Majdic O, Kohl P, Pickl WF, Menzel JE and Knapp W. (1996). *J Exp Med*, **184**, 1769-79.
- Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ and Wahl GM. (1999). *Embo J*, **18**, 1660-72.
- Subler MA, Martin DW and Deb S. (1992). *J Virol*, **66**, 4757-62.
- Zakut-Houri R, Bienz-Tadmor B, Givol D and Oren M. (1985). *Embo J*, **4**, 1251-5.
- Zamzami N and Kroemer G. (2003). *Curr Biol*, **13**, R71-3.
- Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC and Fornace AJ, Jr. (1999). *Oncogene*, **18**, 2892-900.
- Zhang K, Baeckstrom D, Brevinge H and Hansson GC. (1997). *Tumour Biol*, **18**, 175-87.
- Zhang L, Yu D, Hu M, Xiong S, Lang A, Ellis LM and Pollock RE. (2000). *Cancer Res*, **60**, 3655-61.
- Zhang Y and Xiong Y. (2001). *Cell Growth Differ*, **12**, 175-86.
- Ziprin P, Alkhamies NA, Ridgway PF, Peck DH and Darzi AW. (2004). *Biol Chem*, **385**, 755-61.
- Taylor WR, Schonthal AH, Galante J and Stark GR. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 1998-2006.
- Thut CJ, Chen JL, Klemm R and Tjian R. (1995). *Science*, **267**, 100-4.
- Tokino T, Thiagalingam S, el-Deiry WS, Waldman T, Kinzler KW and Vogelstein B. (1994). *Hum Mol Genet*, **3**, 1537-42.
- Truant R, Xiao H, Ingles CJ and Greenblatt J. (1993). *J Biol Chem*, **268**, 2284-7.
- Uesugi M and Verdine GL. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14801-6.
- Walker KK and Levine AJ. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15335-40.
- Wang W, Link V and Green JM. (2000). *Cell Immunol*, **205**, 34-9.
- Wang Y, Szekely L, Okan I, Klein G and Wiman KG. (1993). *Oncogene*, **8**, 3427-31.
- Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ and Bar-Sagi D. (1999). *Nat Cell Biol*, **1**, 20-6.
- Webster NJ, Resnik JL, Reichart DB, Strauss B, Haas M and Seely BL. (1996). *Cancer Res*, **56**, 2781-8.
- Wei CL, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Liu J, Zhao XD, Chew JL, Lee YL, Kuznetsov VA, Sung WK, Miller LD, Lim B, Liu ET, Yu Q, Ng HH and Ruan Y. (2006). *Cell*, **124**, 207-19.
- Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L and Debussche L. (1998). *Embo J*, **17**, 4668-79.
- Verhaegh GW, Parat MO, Richard MJ and Hainaut P. (1998). *Mol Carcinog*, **21**, 205-14.
- Verhaegh GW, Richard MJ and Hainaut P. (1997). *Mol Cell Biol*, **17**, 5699-706.
- Vousden KH and Lu X. (2002). *Nat Rev Cancer*, **2**, 594-604.
- Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M and Boxer LM. (2001). *Oncogene*, **20**, 240-51.
- Xi Y, Shalgi R, Fodstad O, Pilpel Y and Ju J. (2006). *Clin Cancer Res*, **12**, 2014-24.
- Yew PR and Berk AJ. (1992). *Nature*, **357**, 82-5.
- Yun J, Chae HD, Choy HE, Chung J, Yoo HS, Han MH and Shin DY. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 29677-82.

Tänuavaldused

Käesoleva töö valmimisele on kaasa aidanud järgnevad isikud:

Lilian Kadaja-Saarepuu (juhendaja)

Toivo Maimets (juhendaja)

Arnold Kristjuhan

Signe Värv

Rutt Lilleoja

Janeli Viil

Anna Balikova

Reet Lõoke

Viktor Antonov

Kuldar Kõiv

Bob Lob Law

Ott Scheler

Peeter Juhanson

Tanel Mahlakõiv

Martti Maimets

Keiu Paapsi

Kersti Jääger