

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

SIIM PAUKLIN

**TUUMORSUPRESSOR ARF JA ATM/ATR KINAASIDE
KOMPLEMENTAARNE ROLL APOPTOOSI INDUTSEERUMISES
VASTUSENA ONKOGEENSELE STRESSILE**

Magistritöö

Juhendajad: VILJAR JAKS, *Ph.D.*
ARNOLD KRISTJUHAN *Ph.D.*
TOIVO MAIMETS *Ph.D.*

TARTU 2005

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	3
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. ATM ja ATR kinaasid.....	7
1.2. DNA kaksikahelaliste katkete reparatsioon	9
1.3. ARF.....	10
1.4. Onkogeenid.....	13
1.5. p53 geeni ja valggu struktuur.....	17
1.7. p53 kui transaktivaator.....	21
1.8. p53 kui transrepressor	22
1.9. p53 märklaudgeenid.....	24
2. Töö eesmärk	28
3. Eksperimentaalne osa	29
3.1. Materjalid ja meetodid	29
3.1.1. Plasmiidid.....	29
3.1.2. Rakud ja nende kultiveerimine.....	29
3.1.3. PEI transfektsioon	30
3.1.4. Rakkude inkubeerimine wortmanniniga	30
3.1.5. Rakkude lüüs.....	30
3.1.6. Western Blot.....	31
3.1.7. Apoptoosi analüüs.....	32
3.1.8. Immuunofluorestsents analüüs.....	33
3.2. Tulemused.....	34
3.2.1. ARF-i ekspressioon ja onkogeensest stressist tingitud p53 fosforüleerumine indutseerivad p53-sõltuva transkriptsiooni sünergiliselt	34
3.2.2. Onkogeenide ülekspressioon põhjustab fosfo-H2AX fookuste tekke.....	35
3.2.3. Onkogeenne stress indutseerib DNA reparatsioonivalgu Rad51 taset.....	37
3.2.4. Efektiivne apoptoosi induktsioon sõltub nii ARF-st kui ka ATM/ATR kinaasidest.....	38
4. Arutelu.....	44
Kokkuvõte	48
Summary	49
Kasutatud kirjandus.....	50
Tänuõnad	63

Kasutatud lühendid

ABL – *Abelson's leukemia*, Abelsoni leukeemia
AP – *alkaline phosphatase*, aluseline fosfataas
AP1 – *activator protein-1*, aktivaatorvalk 1
Apaf-1 – *apoptotic protease-activating factor 1*, apoptootilist proteaasi aktiveeriv faktor 1
APC – *adenomatous polyposis coli*, β -kateniini degradatsiooniosalev valk
ASPP1 – *apoptosis stimulating protein 1*, apoptoosi stimuleeriv valk 1
ARF – *alternative reading frame*, alternatiivne lugemisraam
ATM – *ataxia telangiectasia mutated*, ataksia telangiektasia muteeritud
ATR – *ATM-Rad3-related*, ATM-Rad3-sarnane
ATX – *autotaxin*, autotaksiin
Bax – *Bcl-2-associated X protein*, Bcl-2-seotud valk X
BCIP – *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*, 5-bromo-4-kloro-3-indolüülfosfaat
Bcl-2 – *B-cell lymphoma protein 2*, B-rakulise lümfoomi valk 2
BH1 – *bcl-homology domain 1*, Bcl-homoloogia domään 1
bp – *base pair*, aluspaar
BRCA1 – *breast cancer susceptibility gene 1*, rinnavähi eelsoodumuse geen 1
CAAT – promootoris asuv CAAT konsensusjärjestus
CDK – *cyclin-dependent kinase*, tsükliin-sõltuv kinaas
cDNA – *complementary DNA*, komplementaarne DNA
CHK1 – *checkpoint kinase 1*, kontrollpunkti kinaas 1
CHK2 – *checkpoint kinase 2*, kontrollpunkti kinaas 2
CSB – *Cockayne syndrome B*, Kokaiini sündroom B
DNA – *deoxyribonucleic acid*, desoksüribonukleinhape
DNA-PK – *DNA dependent protein kinase*, DNA-sõltuv proteiinkinaas
DSB – *DNA double-strand break*, DNA kaksikahelaline katke
E-box – konsensusjärjestus, millele seonduvad transkriptsioonifaktorid, k.a. c-myc
EGFP – *enhanced green fluorescence protein*, täiustatud roheliselt fluorestseeruv valk
FRAP – *FKBP12-rapamycin-associated protein*, FKBP12-rapamütsiiniga seonduv valk
GSK-3 β – *glycogen synthase kinase 3 β* , glükogeeni süntaasi kinaas 3 β
HDAC 1 – *histone deacetylase 1*, histooni deatsetülaas 1
Hdm2 – *human double minute 2*, inimese double minute 2
HNF-3 – *hepatocyte nuclear factor Y*, hepatotsüüdi tuuma faktor Y
hMMP1 – *human matrix metalloproteinase-1*, inimese maatriksi metalloproteinaas 1
HOXA5 – *homeobox protein A*, homeobox-i valk A
HPV – *human papilloma virus*, inimese papilloomiviirus
hTERT – *human telomerase reverse transcriptase*, inimese telomeraasi pöördtranskriptaas
HR – *homologous recombination*, homoloogiline rekombinatsioon
IMDM – *Iscove's modified Dulbecco's medium*, Iscove'i muudetud Dulbecco sööde
INK4a – *inhibitor of cyclin-dependent kinase 4*, tsükliin-sõltuva kinaasi 4 inhibiitor
JNK – *Jun N-terminal kinase*, Jun N-terminaalne kinaas
kb – *kilobasepair*, kiloaluspaar
KIP1 – *cyclin-dependent kinase inhibitor protein 1*, tsükliin-sõltuva kinaasi inhibiitorvalk 1

MAF – *musculoaponeurotic fibrosarcoma protein*, muskuloaponeurootilise fibrosarkoomi valk

MAP4 – *microtubule associated protein 4*, mikroituubuliga seondunud valk 4

MDM2 – *murine double minute 2*, hiire double minute 2

MDR1 - *multidrug resistance-1*, ravimi multiresistentsus 1

MEF – *mouse embryonic fibroblast*, hiire embrüonaalsed fibroblastid

mSin3a – *mammalian sin3a*, imetaja sin3a

mTOR – *mammalian target of rapamycin*, imetaja rapamütsiini märklaud

MRN - *MRE11-Rad50-NBS1*, *meiotic recombination 11-Radiation sensitive 50-Nijmegen Breakage Syndrome 1*, meiootiline rekombinatsioon 11-kiirgustunglikkus 50-Nijmegeni murru sündroom 1

Na-Bes – *N,N-2-hydroxy-2-amino-ethanesulphonacid*, N, N – 2-hüdrosüül-2-amino-etaansulfoonhape

NBT – *nitro blue tetrazolium*, nitrosinine tetrasool

NF1 – *nuclear factor 1*, tuumafaktor 1

NF- κ B – *nuclear factor κ B*, tuumafaktor κ B

NHEJ – *non-homologous end-joining*, mittehomoogiliste otste ühendamine

PAX5 – *paired box transcription factor 5*, paarisboxi transkriptsioonifaktor 5

PBS – *phosphate buffered saline*, fosfaatpuhverdatud soolalahus

PIKK – *phosphatidyinositol 3-kinase like kinases*, fosfatidüülinsotool-3-kinaas tüüpi kinaasid

PI3K - *phosphatidyinositol 3-kinase*, fosfatidüülinsotool-3-kinaas

PVDF – *polyvinylidene fluoride*, polüvinülideendifluoriidfilter

Rb – *retinoblastoma protein*, retinoblastoomi valk

RNA – *ribonucleic acid*, ribonukleinhape

RPA – *replication protein A*, replikatsioonivalk A

SDS – *sodiumdodecylsulphate*, naatriumdodetsüülsulfaat

Ser – *serine*, seriin

Siah-1 - *seven in absentia homolog*, seitse absentia homolog

SMG-1 - *suppressor with morphogenetic effects on genitalia 1*, supressor morfogeneetiliste mõjudega genitaalidele 1

SH3 – *Src homology domain 3*, Src homologia domeen 3

SV40 – *simian virus 40*,

TAE – *Tris-Acetic acid-EDTA*, Tris-atsetaat EDTA

TAF – *TATA box-binding protein associated factor*, TATA-box valguga seonduv faktor

TATA box – TATA järjestust sisaldav piirkond promotoris

TBE – *Tris-Boric acid-EDTA*, Tris-boorhape EDTA

TBP – *TATA-box binding protein*, TATA-box-ga seonduv valk

TCF/LEF – *T-cell factor/Leukocyte enhancing factor 1*, T-raku faktor/leukotsüüdi indutseeriv faktor 1

TFIID – *transcription factor II D*, transkriptsioonifaktor II D

Thr – *threonine*, treoniin

VDAC – *voltage-dependent anion channel*, voltaaži-tundlik aniooni kanal

UV – *ultraviolet*, ultraviolet

Wnt – *wingless-type MMTV integration site family member protein*, wingless-tüüpi MTV integratsioonikoha perekonna valk

Waf1 - *wildtype p53 activated fragment X*, metsiktüüpi p53 poolt aktiveeritud fragment X

wt – *wild-type*, metsiktüüpi

XPB - *xeroderma pigmentosum complementation group B*, xeroderma pigmentosum
komplementeeriv grupp B
XPD - *xeroderma pigmentosum complementation group D*, xeroderma pigmentosum
komplementeeriv grupp D
XRCC4 - *X-Ray cross-complementing gene 4*, röntgenkiirte rist-komplementeeriv
geen 4
YY1 – *yin-yang 1*, yin-yang valk 1

Sissejuhatus

Hulkkrakse organismi eksisteerimiseks on vajalik, et tema rakud oleks võimelised reageerima rakuväliste ja -sisestele muutustele, reguleerima vastavalt olukorrale oma kasvu ning vajaduse korral indutseerima programmeeritud raku surma ehk apoptoosi. Imetajas on rakkude jagunemise kontroll keskse tähtsusega – kui see on defektne nagu kasvajate puhul, muutub rakk ohtlikuks kogu organismile.

Rakkude kasvu ja jagunemise keskseteks regulaatoriteks on onkogeenid ja tuumorsupressorid. Onkogeenide kaudu toimub kasvusignaali edastamine, seevastu tuumorsupressorite ülesandeks on hoida rakkude jagunemine “lubatud piirides”. Ebasobivatel tingimustel onkogeenidelt saabunud jagunemissignaal või DNA kahjustus käivitab rakus mehhanismid, mille kaudu otsustatakse, kas indutseeritakse rakutsükli arest ja parandatakse DNA või kogu organismi huvidest lähtudes tuleb rakul sooritada enesetapp – indutseerida apoptoos. Apoptoosi indutseerumise häirimine on üheks tähtsaimaks eelduseks raku transformeerumisele ja vähi tekkele. Kuigi kasvajates tihti muteerunud tuumorsupressor p53-e ning tema regulaator ARF-i peetakse olulisteks faktoriteks raku saatuse määramisel, on siiani väljaselgitamisel tingimused, mis muudavad raku kasvu soodustavad signaalid raku suitsiidisignaaleks.

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse ülevaade ATM ja ATR kinaasidest, DNA reparatsioonimehhanismidest, tuumorsupressor ARF-st, apoptoosist ja seda mõjutavatest faktoritest, onkogeenidest c-myc, β -kateniin ja inimese papilloomiviirus tüüp 18 E7, tuumorsupressorist p53 ning kahest p53-e märklaugeenist. Töö eksperimentaalses osas uuriti imetajarakkudes toimuvaid muutusi onkogeense stessi tingimustes ning analüüsiti apoptootilise vastuse kujunemises olulist rolli mängivaid faktoreid.

1. Kirjanduse ülevaade

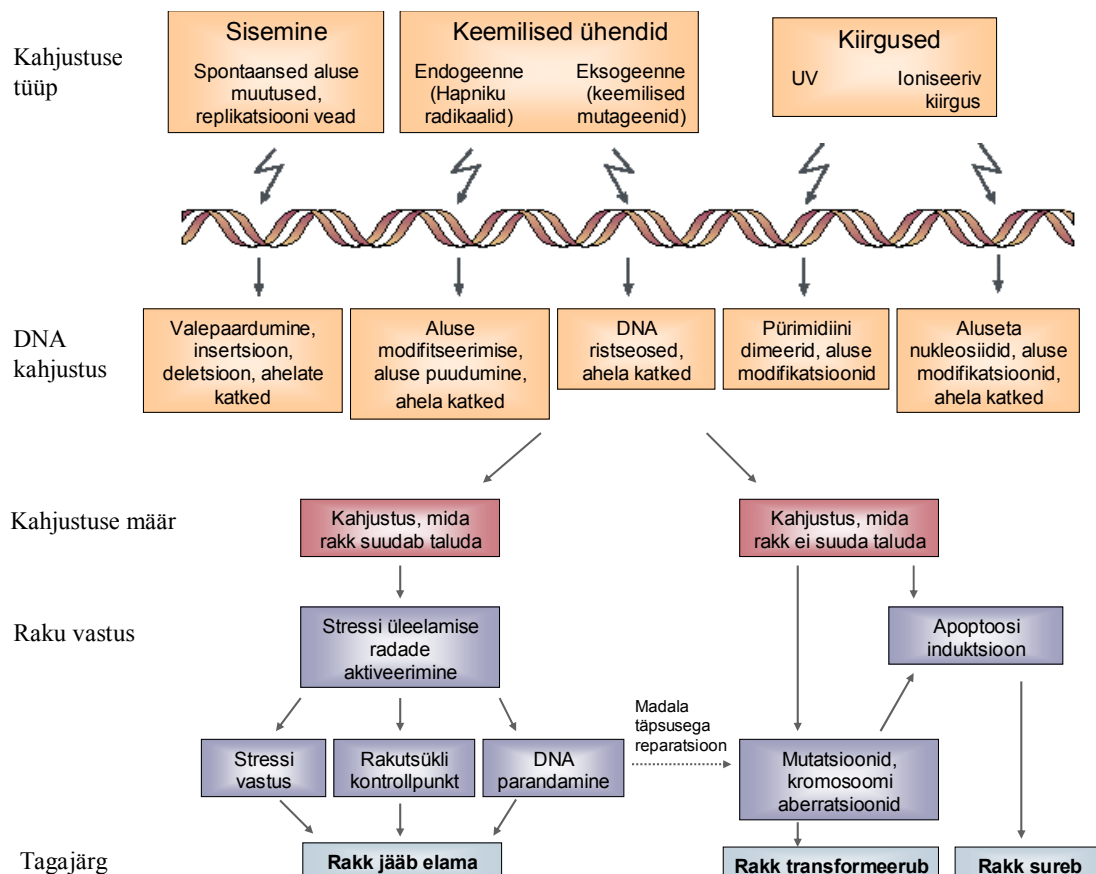
1.1. ATM ja ATR kinaasid

Organismi rakud on pidevalt eksponeeritud genotoksilistele stressifaktoritele. DNA kahjustusi võivad põhjustada nii raku enese metabolismis tekkivad vabad radikaalid kui ka keskkonnast pärinevad kiirgused ning mutageensed ühendid (joonis 1). Et sellistele DNA-d kahjustavatele faktoritele vaatamata saaks toimuda organismi normaalne areng, on rakus DNA parandamise mehhanismid. Rakus mängivad DNA kahjustusele vastuse kujundamises olulist rolli fosfatidüülinositool 3-tüüpi proteiin kinaasid (PI3K-tüüpi kinaasid ehk PIKK-d). PI3K-tüüpi kinaaside hulka kuuluvad viis evolutsiooniliselt konserveerunud seriin/treoniin kinaasi: ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated*), ATR (*ATM and rad3-related*), ATX/SMG-1, mTOR/FRAP ja DNA-PK. Nii ATM kui ATR aktiveeruvad vastusena DNA kahjustustele (Shiloh, 2003). ATM-i ja DNA-PK aktiveerumine toimub rakus DNA kaksikahelaliste katkete toimetel (Abraham, 2001). Seevastu ATR ja ATX osalevad lisaks kaksikahelalistele katketele ka UV-st ja peatunud replikatsioonikahvlitest lähtuva signaali edastamises (Hekmat-Nejad et al., 2000). Lisaks reparatsiooniprotsesside koordineerimisele on ATM seotud ka telomeeride säilitamisega - protsessiga, mis on määrava tähtsusega vananemises ja vähi tekkes (Campisi et al., 2001, Maser & DePinho, 2002). mTOR/FRAP on selles perekonnas ainus kinaas, mis ei osale DNA kahjustusele vastuse kujunemises, vaid reageerib toitainete hulgale keskkonnas ning mitogeensetele stiimulitele (Proud, 2002).

ATM ja ATR. Normaalses tingimustes on ATM rakus inaktiivne ja moodustab dimeere või multimeere. DNA kahjustuse järgselt fosforüleerivad agregeerunud monomeerid üksteist, mille toimetel nad dissotsieeruvad teineteisest (Bakkenist & Kastan, 2003). ATM-i aktiveerumise põhjustab tõenäoliselt kromatiini struktuuri muutus mitte otseselt vabad DNA ahelate otsad, kuigi osa rakus esinevast ATM-st lokaliseerub DNA kaksikahelaliste katkete juurde (Andegeko et al., 2001). ATM-i signaalirada on väga tundlik - arvatakse, et ATM-i aktiveerumiseks piisab ainult ühest DNA katkest. ATM-st ja ATR-st lähtuvad signaalirajad ei ole rakkudes selgelt eristatavad, vaid on teineteisega tihedalt seotud signaaliradade ristumise tõttu (Yang et al., 2003). DNA kahjustuse järgne ATM-i aktiveerumine toimub kiiresti - mõne minuti jooksul ja on esmatähtis 1-2 tunni jooksul pärast DNA kahjustuse teket.

Seevastu ATR vastutab mitmete ATM-i substraatide fosforüleerumise eest hilisemates staadiumites (Shiloh, 2003). ATR seob kaksikahelalistest katketest tingitud ATM-i signaali võrgustiku teiste stressitingimustega nagu hüpoksiaga ja seiskunud replikatsioonikahvlitest lähtuva signaaliga.

ATM/ATR ja nende efektorinaasid Chk2/Chk1 reguleerivad nii G1, S kui ka G2 faasi kontrollpunkte. DNA kahjustus võib ATM/ATR kinaaside signaaliraja kaudu põhjustada rakutsükli ajutist peatumist G1, S ja G2 faasis või blokeerida rakutsükli jätkumise pikaks ajaks G1 ja G2 faasis. Sellise kontrollmehhanismi kaudu takistatakse kahjustatud DNA sünteesi ja võimaldatakse DNA reparatsiooniprotsesside toimumist. ATM ja ATR kinaasidel on palju ühiseid substraatvalke. Sellele vaatamata on neil ka eelistatud märklaudasid. Rakutsükli kontrollpunktide rajas on Chk2 eelistatult ATM-i substraat, samas Chk1 on ATR-i eelistatud märklaud G2-M kontrollpunkti signaalirajas (Kastan & Bartek, 2004).



Joonis 1. Raku vastus DNA kahjustusele. Erinevad faktorid põhjustavad erinevaid DNA kahjustusi, millele rakk võib reageerida mitmel viisil. Tagajärjeks võib olla raku ellujäämine, raku surm või raku transformeerumine. Shiloh 2003 järgi.

DNA kaksikahelaliste katkete piirkonnas toimub ühe varaseima sündmusena histoon H2AX fosforüleerumine. See on signaaliks reparatsioonifaktorite seondumisele nagu MRN kompleks, Rad51 ja BRCA1 (Celeste et al., 2002). Reparatsiooniraja aktiveerumist seostatakse Rad51 ja Rad52 fosforüleerumisega ABL türosiini kinaasi poolt (Kitao & Yuan, 2002), mis indutseerub omakorda DNA katkete järgselt ATM-st sõltuvalt (Shangary et al., 2000). ATM-defektsetes ataxia-telangiectasia rakkudes on DNA kaksikahelaliste katkete parandamine defektne. Kuna ATM-vahendatud fosforüleerumine on vajalik reparatsioonikompleksi tekkeks, seostatakse seda homoloogilise rekombinatsiooni saidis Rad51-ga seonduva valgukompleksi suboptimaalse moodustumisega (Morrison et al., 2000).

1.2. DNA kaksikahelaliste katkete reparatsioon

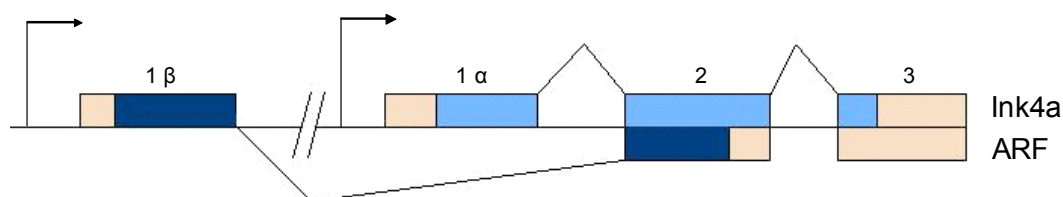
DNA kaksikahelaliste katkete (DSB) parandamiseks on rakkudes kaks mehhanismi: kiire kuid vigaderohke mittehomoloogiline otste ühendamine NHEJ (non-homologous end-joining), mis kiiresti sulgeb DNA katked lokaalsete mikrodeletsioonide tekitamise hinnaga ning kõrge täpsusega homoloogilise rekombinatsiooni (HR) abil toimuv reparatsiooniprotsess. Imetajarakkudes on domineerivaks mehhanismiks NHEJ. NHEJ reparatsioonis seondub DNA ahelate vabade otstega KU70-KU80 heterodimeer, mille abil tuuakse kohale DNA-sõltuva proteiinkinaasi (DNA-PK) katalüütiline subühik (Ramsden & Gellert, 1998). DNA otsad ligeerib XRCC4-ligaas IV heterodimeer. NHEJ protsess on vajalik ka V(D)J rekombinatsioonil tekitatud DSB parandamiseks ning antikehade klassi ümberlülituseks (Pastink et al., 2001).

HR reparatsioonirajas toimivad Rad51 ning temaga seonduvad valgud, mitmed Rad51 paraloogid nagu Rad52, helikaas Rad54 ja tuumorsupressor BRCA2 (Pastink et al., 2001). Esmalt toimub DNA ahelate otste äratundmine Rad52 poolt. Seejärel moodustab Rad51 üksikahelalisel DNA-l nukleoproteiini filamendi, mis on vajalik kogu protsessi tähtsaimaks sündmuseks - ahela invasiooniks ning ahelate vahetuseks (Sung & Roberson, 1995). Rad51 filamendi moodustumiseks on vajalik Rad51-BRCA2 kompleksi tekkimine (Yang et al., 2002). Ahela invasioon on vahendatud Rad51 ja Rad54 poolt ning vajab kahjustamata DNA tütmolekuli, mida kasutatakse

matriitsina vigase molekuli puuduvate osade resünteeksiks. MRE11-Rad50-NBS1 (MRN) kompleks osaleb HR rajas ahelate otste protsessimises ja ka meiootilises rekombinatsioonis, telomeeride säilitamises ning rakutsükli kontrollpunktide signaalirajas (Pastink et al., 2001).

1.3. ARF

ARF (*alternative reading frame*) tuumorsupressor asub imetajatel INK4a/ARF lookuses, mis kodeerib lisaks p19ARF-le (inimeses p14ARF) veel teist geeni – p16INK4a (Quelle et al., 1995). INK4a ja ARF geenidel on eraldi promootorid, millelt toodetakse erinevaid transkripte: INK4a transkript moodustub eksonitest 1 α , 2 ja 3; ARF transkript koosneb eksonitest 1 β , 2 ja 3. Kuigi eksonid 2 ja 3 on mõlemal geenil ühised, loetakse neid erinevates lugemisraamides ning seetõttu ei oma vastavad valgud sarnast aminohappelist järjestust (joonis 2) (Serrano, 2000).



Joonis 2. INK4a/ARF lookus. Erinevate promootorite poolt transkribeeritud alternatiivsed eksonid 1 β ja 1 α splaissitakse ühise aktseptorsaidi külge eksonis 2. Ekson 2 transleeritakse INK4a ja ARF puhul erinevates lugemisraamides. INK4a kodeerivad järjestused on kujutatud helesinisega, ARF-i kodeerivad järjestused on kujutatud tumesinisega. Quelle et al., 1995 järgi.

Tuumorsupressor INK4a inhibeerib tsükliin-sõltuvaid kinaase CDK4 ja CDK6, mille tulemusena hoitakse tuumorsupressor retinoblastoomi valk (pRB) aktiivses, antiproliferatiivses olekus (Serrano, 2000). Tuumorsupressor ARF üheks tähtsaimaks funktsiooniks peetakse aga onkogeenide ekspressioonist tingitud p53 aktiveerimist. ARF-i induktsioon toimub näiteks onkogeenide Ras, E2F1 ja Myc dereguleeritud ekspressiooni korral (Palmero et al., 1998, Zindy et al., 1998). Seetõttu on defektse ARF-ga hiirtel eelsoodumus paljude kasvaja tekkeks, millest kõige sagedamini esineb sarkoome ja lümfoome (Kamijo et al., 1999). INK4a-ARF lookuse mutatsioonid, mis inaktiveerivad kas ARF või INK4a, on inimese kasvaja peaaegu

sama sagedased kui p53 mutatsioonid (Kamijo et al., 1999). Kasvajates on INK4a/ARF lookuse inaktiveerimine seotud kolme järgneva sündmusega. 1) Homosügootne deletsioon. Seda esineb 14% inimese kasvajates ning tihti hõlmab see lisaks INK4a/ARF lookusele ka lähedal asuvat INK4b lookust. 2) Intrageensed mutatsioonid, mida on leitud 5% kasvajates. Punktmutatsioonid paiknevad põhiliselt eksonis 2, mis muudab nii ARF-i kui INK4a aminohappelise järjestust, vähem on mutatsioone eksonis 1 α (Ruas & Peters, 1998). 3) Promootori vaigistamine metüleerimisega. Ink4a promootori vaigistamist esineb 19% kõigist inimese kasvajatest. ARF-i promootori metüleerimine on eriti sage käärsoole vähi puhul (28%). ARF-i vaigistamine toimub Ink4a promootori metüleerimisest sõltumatult (Esteller et al., 2000).

p53-e aktiveerimine toimub rakus tema negatiivse regulaatori Mdm2-e inhibeerimise kaudu. Selleks on vajalik ARF-Mdm2 kompleksi moodustumine. ARF-i seondumine Mdm2-ga takistab viimase E3 ubikvitiin ligaasi aktiivsust. Lisaks sellele toimub ARF-Mdm2 kompleksi liikumine tuumakestesse, välistades nii p53 interakteerumise Mdm2-ga (Weber et al., 2000a). On näidatud, et ARF-i üleekspressioon stabiliseerib p53 valku ja aktiveerib p53-sõltuva transkriptsiooni, mis põhjustab G1-faasi blokki või viib rakud apoptoosi (Pomerantz et al., 1998, Zhang et al., 1998).

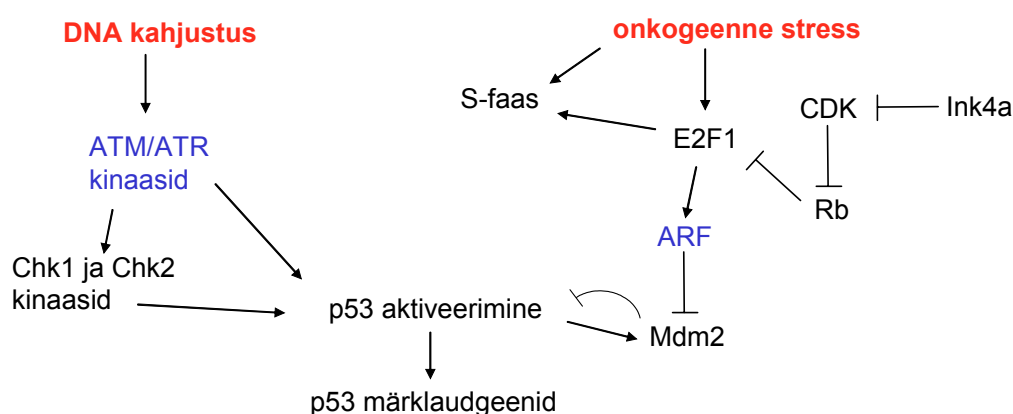
Lisaks p53 aktiveerimisele on ARF seotud ka rakulise vananemisega – rakutsükli arestiga, mis näib olevat pöördumatu ning põhjustab kultuuris kasvavate rakkude jagunemise lõppemise. ARF-null hiire embrüo fibroblastides ei toimu replikatiivset vananemist ning selliste rakkude transformeerumist saab esile kutsuda ainult Ras onkogeeni üleekspressiooniga (Kamijo et al., 1997).

Tuumorsupressor ARF võimeline takistama kasvajate teket ka p53-st sõltumatult. Seda tõestab leid, et inimese mitmetes kasvajates esineb p53 ja ARF samaaegseid defekte ning hiire B-rakulised lümfoomid, milles on defektsed mõlemad geenid, kasvavad kiiremini võrreldes p53-null või ARF-null rakkudega (Lindstrom et al., 2001). ARF-i funktsioneerimist p53-Mdm2-teljest sõltumatu tuumorsupressorina toetab ka fakt, et hiirtel, kellel puudub nii p53, ARF kui Mdm2, tekib kasvaja sagedamini kui p53^{-/-} Mdm2^{-/-} või p53^{-/-} isenditel (Weber et al., 2000b). Olulisteks ARF-i poolt reguleeritavateks protsessideks on ribosoomide biogenees ja apoptoos. ARF põhjustab ribosoomide biogeneesis ja raku proliferatsioonis osaleva valgu B23 ubikvitiinüleerimise ja degradatsiooni (Itahana et al., 2003). B23 on tuumakestes

paiknev endoribonukleas, mis viib läbi 28S rRNA küpsemist viimase järjestusspetsiifilise lõikamise kaudu. Seega ARF-vahendatud B23 lagundamine takistab ribosoomide moodustumist, inhibeerides nii rakkude kasvu. Lisaks selle indutseerib B23 taseme langus apoptoosi (Sugimoto et al., 2003). ARF soodustab programmeeritud raku surma ka proapoptootilise Bax valgu induktsiooni kaudu (Suzuki et al., 2003). ARF-i kodeeriva adenoviiruse ekspressioonivektoriga on näidatud, et ta on võimeline tekitama apoptoosi nii normaalsetes fibroblastides kui p53-null rakkudes (Matsuoka et al., 2003).

p53 ja E2F1 regulaator retinoblastoomi signaalirajad on teineteisega tihedalt seotud ARF-i kaudu. Retinoblastoomi fosforüleerimine CDK4 ja CDK6 poolt põhjustab Rb dissotsieerumise E2F1 küljest, mis viib E2F1-sõltuva transkriptsiooni aktiveerumiseni. Kuna ARF on E2F1 märklaudeen, toimub ARF-i induktsioon, mis viib omakorda p53-sõltuva transkriptsiooni aktivatsioonile. Nii moodustab E2F1 poolt indutseeritav ARF funktsionaalse “silla” Rb ja p53 radade vahel (joonis 3).

ARF-i ekspressiooni reguleeritakse rakus mitmel viisil. p53 märklaudeenide seas on CDK 4 ja CDK6 inhibiitor Waf1 (*wildtype p53 activated fragment X*), mille induktsioon takistab Rb fosforüleerumist nende kinaaside poolt. See takistab E2F1 repressiooni kaudu ARF-i induktsiooni. ARF-i repressoritena käituvad lisaks p53 kaudsetele efektidele ning Rb-E2F kompleksile ka Bmi-1 ja Twist valk (Lowe & Sherr, 2003, Sherr & Weber, 2000).



Joonis 3. DNA kahjustuses ja onkogeensest stressist lähtuvad signaalirajad. Positiivne interaktsioon on tähistatud noolega, inhibeeringimine on tähistatud T-kujulise joonega.

1.4. Onkogeenid

c-myc. Proto-onkogeen c-myc kodeerib transkriptsioonifaktorit, mis on rakuline homoloog linnu müelotsütomatoosi retroviiruse onkogeenile v-myc (Vennstrom et al., 1982). Mitmetes kasvajates esineb muutusi, mis otseselt või kaudselt põhjustavad konstitutiivset c-myc üleekspressiooni (Eischen et al., 2001, Vennstrom et al., 1982).

c-myc moodustab valguga Max heterodimeere ning seondub spetsiifiliselt E-box järjestusega 5'-CACGTG-3'. Konsensusjärjestuse äratundmine viib lähedalasuvate nukleosoomide H4 histoonide atsetüleerimiseni, põhjustades sellega märklaudgeeni transkriptsiooni aktiveerumise (Bouchard et al., 2001, Luscher & Larsson, 1999). c-myc-i transkriptsiooni ko-aktivaator on histooni atsetültransferaas TRRAP. Transkriptsiooni aktivatsioonis osaleb ilmselt ka ATPaasset/helikaasset aktiivsust omavate TIP48/TIP49 valkude assotsieerumine c-myc transaktivatsiooni domeeniga (McMahon et al., 2000). Lisaks transaktivatsioonile võib c-myc osaleda ka geenide repressioonis. Arvatakse, et see toimub kaudselt teiste faktorite stimuleerimise või nendega interakteerumise kaudu (Gartel et al., 2001). Üldiselt peetakse c-myc indutseeritavateks märklaudgeenideks raku kasvu, metabolismi, ribosoomide biogeneesi, translatsiooni ja mitokondrite funktsioneerimisega seotud geene. Seevastu transrepressioneeritavad geenid on seotud väliskeskonna ja raku vahelise info vahetusega ning on anti-proliferatiivsete ja anti-metastaatiliste omadustega (O'Connell et al., 2003).

Üheks c-myc tähtsaimaks bioloogiliseks funktsiooniks on rakutsükli progressiooni soodustamine (Amati, 2001). c-myc indutseeritakse tihti kasvajates dereguleeritud β -kateniini ja c-Myb poolt, kuid inhibeeritakse TGF- β toimel (Baek et al., 2003). Mittejagunevates rakkudes on c-myc ekspressioon väga madal. Mitogeeni või seerumiga stimuleerimine indutseerib aga kiiresti tema mRNA ja valgu sünteesi, põhjustades rakkude sisenemise G1-faasi. G1-S progressioon on tingitud c-myc poolt indutseeritud tsükliin E-CDK2 aktiivsusest, mis saavutatakse CDK4 ja tsükliin D2 ekspressiooni tõusuga ning CDK inhibiitori KIP1 lagundamisega c-myc märklaudgeenide poolt (Bouchard et al., 1999).

Lisaks rakkude kasvu ja proliferatsiooni soodustamisele, takistab c-myc raku lõplikku diferentseerumist ning soodustab apoptoosi (Santoni-Rugiu et al., 2000). Tema ekspressioon muudab rakud tundlikumaks mitmetele apoptootilistele stiimulitele nagu hüpoksiaale ja anti-apoptootiliste faktorite defitsiidile. On näidatud, et

c-myc on võimeline indutseerima tsütokroom c vabanemise mitokondritest, põhjustades apoptosoomi tekke ning kaspasid kaskaadi aktiveerumise (Acehan et al., 2002). Mitokondri välismembraanis paikneva anti-apoptootilise Bcl-2 üleekspressioon takistab paljusid raku surma signaaliradasid, sealhulgas ka c-myc indutseeritud apoptoosi (Fanidi et al., 1992).

Aktiveeritud ja üleekspressioonitud c-myc on sarnaselt mitmetele teistele onkogeenidele võimeline indutseerima ARF-Mdm2-p53 tuumorsupressor signaaliraja, mis võib põhjustada rakkude apoptoosi (Zindy et al., 1998). Kuigi ARF või p53 defektsus vähendab, kuid ei elimineeri täielikult c-myc poolt tekitatud apoptoosi primaarsetes fibroblastides ja eellas B-rakkudes, viitab see teiste faktorite ja signaaliradade osalusele selles protsessis (Eischen et al., 1999, Zindy et al., 1998).

β -kateniin. Onkogeen β -kateniin kirjeldati esmakordselt inimeses kui raku membraanis asuva adhesioonikompleksi komponent (Kemler & Ozawa, 1989). Ta seondub transmembraansete adhesioonivalkude kadheriinide intratsellulaarse domeeniga ning seob need α -kateniinide kaudu aktiini tsütoskeletiga (Ben-Ze'ev & Geiger, 1998). Samas on β -kateniin ka oluliseks efektoriks Wnt/Wingless signaalirajas, mis omab võtmerolli mitmetes arengulistes protsessides (Damalas et al., 1999), kuid mida siinkohal pikemalt ei käsitleta.

β -kateniini kogus ja rakusisene lokalisatsioon on rangelt reguleeritud. Rakk-rakk ühendustes mitteosalevad tsütoplasmaatilised molekulid inkorporeeritakse valk-kompleksi, kuhu kuulub tuumorsupressor APC (*adenomatous polyposis coli*), GSK-3 β seriin/treoniin proteiin kinaas ja aksiin/konduktiin. Sellise kompleksi teke viib β -kateniini seriinide ja treoniinide fosforüleerimisele GSK-3 β kinaasi poolt, mis on eelduseks tema ubikvitiin-sõltuval proteasoomsele lagundamisele (Salomon et al., 1997). Wnt ligandi seondumine retseptorile aktiveerib Wnt/Wingless signaaliraja, mis takistab β -kateniini lagundamist (Damalas et al., 1999). Selle tulemusena toimub vaba β -kateniini akumulatsioon ja translokeerumine raku tuuma. Tuumas seondub ta TCF/LEF perekonna transkriptsioonifaktoritega ning stimuleerib oma märklaudeenide transkriptsiooni (Clevers & van de Wetering, 1997).

Esimeste β -kateniini märklaudeenidena tuvastati onkogeenid c-myc (He et al., 1998) ja tsükliin D1 (Tetsu & McCormick, 1999), sidudes nii tema aktiivsuse dereguleeritud proliferatsiooniga. Transaktiveeritakse ka MDR1 ja survivin, mis supresseerivad raku surma radasid (Zhang et al., 2001). Lisaks sellele osalevad

mitmed märklaudgeenid, näiteks aluseline fosfaas ja soole rasvhapetega seonduv valk, β -kateniini üleekspressiooniga kaasnevas rakkude dediferentseerumises (Mariadason et al., 2001). Teised sihtmärkgeenid nagu maatriksi metalloproteinaasid, sekreteeritavad ja membraanseoselised proteinaasid, urokinaas, trombiin ja plasiin on käärsoole kasvaja rakkude progressiooni otsesteks efektoriteks, teostades näiteks ekstratsellulaarse maatriksi proteolüüsi, soodustades vähirakkude maatriksilt eraldumist ja suurendades nende liikuvust või angiogeneesi (Liotta & Kohn, 2001).

β -kateniini deregulatsiooni esineb mitmetes kasvajates, eriti sage on see käärsoole vähi puhul (Brabletz et al., 2002). Tihti on β -kateniini akumulatsioon põhjuseks mutatsioonide tõttu inaktiveerunud APC valk, mis ei ole võimeline osalema β -kateniini degradatsioonis. Harvematel juhtudel esineb mutatsioone β -kateniinis eneses, mis takistavad samuti tema lagundamist (Polakis, 2000).

Üleekspressioonitud tuuma lokaliseeruv β -kateniin põhjustab transkriptsiooniliselt aktiivse p53 akumulatsioon rakkudes tema degradatsiooni takistamise kaudu (Damalas et al., 1999). Samas p53 võib omakorda vähendada β -kateniini ekspressiooni, indutseerides Siah-1 ja GSK-3 β vahendatud β -kateniini proteasoomset lagundamist (Sadot et al., 2001). See on ka üheks põhjuseks, miks p53 muteerumine võib soodustada käärsoole vähi teket.

HPV-18 E7. Inimese papilloomiviirused (HPV) on heterogeenne grupp viirusi, mis on esmaseks põhjuseks emakakaela vähi tekkes (Pisani et al., 2002). HPV-d jaotatakse vastavalt viiruse kasvajaid tekitavale võimele kaheks rühmaks – madala riski (nagu tüüp 6 ja 11) ning kõrge riski (tüüp 16 ja 18) papilloomi viirusteks (Finzer et al., 2002).

Papilloomiviiruse E7 on varajase ekspressiooniga tuumavalk, mida võib jaotada kolmeks domeeniks: CR1 (aminohape 1-20), CR2 (ah 21-39) ja CR3 (ah 40-98). CR1 ja CR2 kaudu interakteerub E7 retinoblastoomi perekonna valkudega (Rb, p107 ja p130), CR3 domeenis asub E7 valgul tsink-sõrme motiiv, mille kaudu E7 dimeriseerub ning mis on vajalik valguga õigesti voltumiseks (Chakrabarti & Krishna, 2003). E7 seondub rakus erinevate valkudega, millest paljud on olulised raku kasvu regulaatorid, osaledes G1-S faasi üleminekus. E7 seondub eelpool nimetatud retinoblastoomi perekonna valkudega, histooni deatsetülaasidega, AP-1 tüüpi transkriptsioonifaktoritega (c-fos, c-jun, junB, junD), TATA-box seonduva valguga

(TBP), M2-püruvaadi kinaasiga, α -glükosidaasiga, tsükliinidega ja tsükliin-sõltuvate kinaasidega ning nende inhibiitoritega.

Rakutsükli aresti vältimine retinoblastoomiga seandumise kaudu on lisaks E7-le omane mitmele teisele viiruselisele onkovaalgule nagu adenoviiruse E1A ja SV40 suur T-antigeen (Munger, 1995). Rb valgu perekond mängib olulist rolli eukarüootide rakutsükli regulatsioonis. Hüpofosforüleeritud Rb seondub E2F-perekonna transkriptsioonifaktoritega ning represseerib E2F märklaudgeene, mis soodustavad raku sisenemist S-faasi (Dyson, 1998). E7 seondub hüpofosforüleeritud Rb valguga, takistades Rb-E2F kompleksi ning indutseerides rakke sisenema enneaegselt S-faasi (Huang et al., 1993, Wu et al., 1993). On näidatud, et E2F1-3 üleekspressioon indutseerib S-faasi tsükliine ja tsükliin-sõltuvaid kinaase, DNA polümeraas α , nukleotiidi metabolismis osalevaid ensüüme ja replikatsiooni originides toimivaid valke (Dyson, 1998, Muller et al., 2001). Rb-alkude fosforüleerimine tsükliin D ja tsükliin E sõltuvate kinaaside poolt vabastab E2F-d negatiivsetest regulaatoritest, võimaldades sellega E2F-sõltuva transkriptsiooni toimumist. Retinoblastoomi tuumorsupressori funktsioon on tihedalt seotud E2F-dega, sest Rb inaktiveerimisest tingitud kasvaja fenotüübi teke ja apoptoosi induktsioon on E2F1-null ja E2F3-null rakkudes takistatud (Ziebold et al., 2003).

G1/S tsükliinid ja tsükliin-sõltuvad kinaasid (tsükliin D-CDK4, tsükliin E-CDK2, tsükliin A-CDK2) on jagunevates rakkudes DNA sünteesi ja rakutsükli kulgemise võtmeregulaatorid (Sherr & Roberts, 1999). E7 mõjutab rakus nii tsükliin E-CDK2 kui ka tsükliin A-CDK2 aktiivsust, suunates rakke jagunema. E7 soodustab inimese keratinotsüütides DNA sünteesi tsükliin E-CDK2 kompleksi aktiveerimise kaudu (Funk et al., 1997). See toimub E2F-sõltuva transkriptsiooni aktiveerimise ja posttranslatsioonilise regulatsiooni abil (Zerfass et al., 1995). E7 valgu seundumine tsükliin A-CDK2-ga toimub rakutsüklist sõltuvalt. Tsükliin A-CDK2 fosforüleerib E2F-i, mis inhibeerib viimase DNA-ga seostumist (Tommasino et al., 1993). Seetõttu takistab E7 seundumine tsükliin A-CDK2-ga ilmselt E2F-i inaktiveerumist, võimaldades rakkudel läbida rakutsükli kontrollpunkte.

E7 ekspresseerivates rakkudes on M2-püruvaadi kinaasi aktiivsus märgatavalt tõusnud. See tõstab rakus glükolüüsi aktiivsust, suunates rohkem glükoosi molekulde sünteetilistesse protsessidesse ning vähendades raku hapnikuvajadust (Zwerschke et al., 1999). Ka kõrge riski papilloomiviruste E7 omadus aktiveerida α -glükosidaasi

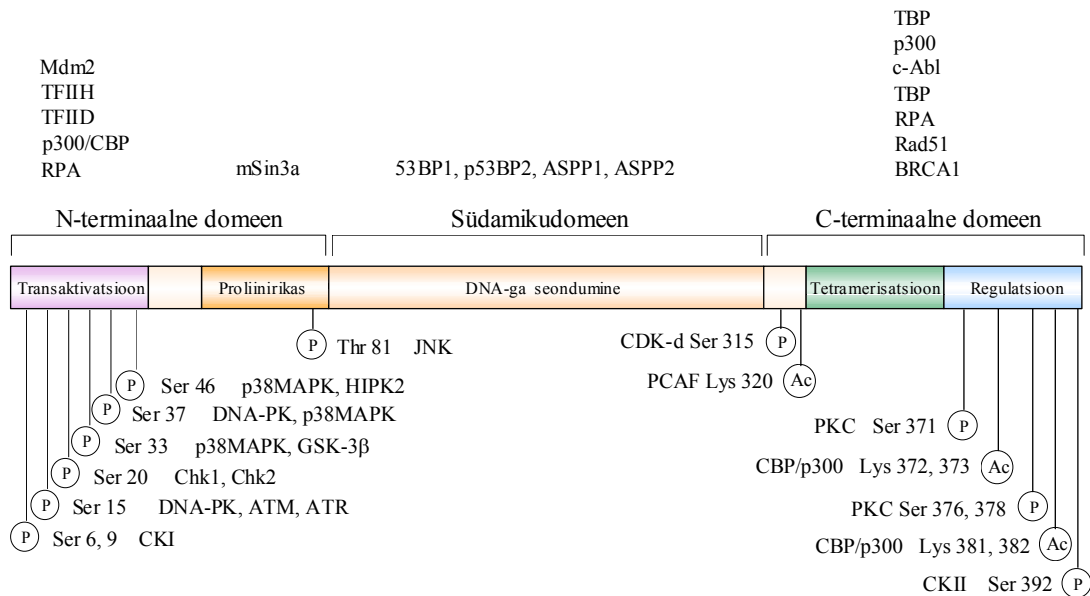
viib rakus metaboolsete muutusteni, mis soodustavad rakkude kiiremat jagunemist (Zwerschke & Jansen-Durr, 2000).

1.5. p53 geeni ja valgu struktuur

p53 avastati 1979. aastal kui 53 kilodaltonilise näiva suurusega rakuline valk, mis interakteerub SV40 suure T-antigeeniga (Chang et al., 1979, Kress et al., 1979). p53 geen paikneb inimese genoomis 17-nda kromosoomi lühikeses õlas, regioonis p13. Ta hõlmab 20 kb ja sisaldab 11 eksonit, millest esimene ekson on mittekodeeriv (Benchimol et al., 1985, Isobe et al., 1986). p53 promootor on erinev paljudest teistest eukarüootsetest promootoritest – ei inimese, roti ega hiire promootorist pole leitud TATA box-i ega CAAT konsensusjärjestust. Vaatamata sellele aktiveerivad p53 transkriptsiooni mitmed faktorid nagu NF- κ B (Hellin et al., 1998), c-myc/max heterodimeer (Roy et al., 1994), koespetsiifilised faktorid YY1 ja NF1 (Furlong et al., 1996), HOXA5 (Raman et al., 2000) ning MAF (Hale et al., 2000). p53 transkriptsiooni takistavad PAX5 perekonna valgud (Stuart et al., 1995).

p53 geen on evolutsiooniliselt kõrgelt konserveerunud (Soussi et al., 1987) ning kuulub geeniperekonda, millel on veel vähemalt kaks liiget – p73 ja p63 (Levrero et al., 2000). p53 perekonna valgud erinevad oma ülesannete poolest rakus - on näidatud, et p53-defektsed hiired on normaalse arenguga, kuid neil tekib juba varases eas kõrge sagedusega erinevaid tuumoreid (Donehower et al., 1992). Seevastu p73- ja p63-defektsetel hiirtel on arengulised ja füsioloogilised kõrvalekalded, kuid ei esine kõrgeenenud sagedusega kasvaja (Yang et al., 2000).

p53 valk koosneb 393 aminohappest. Tema järjestuses on leitud viis konserveerunud piirkonda (domeenid I-V), mis hõlmavad vastavalt aminohappeid 13-23, 117-142, 171-181, 234-250 ja 270-286 (Soussi et al., 1990).



Joonis 4. Tuumorsupressor p53 valgus struktuur. Posttranslatsioonilised modifikatsioonid on tähistatud Ser – seriin, Thr – treoniin, Lys – lüsiin, P – fosforüleerimissait, Ac – atsetüleerimissait. Joonise kohal on nimekiri vastava domeeniga seonduvatest valkudest.

Üldiselt võib p53 valgul eristada kolme põhilist funktsionaalset domeeni, selline ülesehitus (joonis 4) on omane klassikalisele järjestusspetsiifilisele transkriptsioonifaktorile:

Aminoterminaalne regioon – see on happeline järjestus, kus asub transkriptsiooni aktivatsiooni domeen (aminohapped 1-42) (Fields & Jang, 1990). N-terminaalse domeeniga seonduvad basaalse transkriptsiooni masinavärgi osad TBP (*TATA box binding protein*) ja TFIID komponendid TAF-id (*TBP-associated factors*) (Lu & Levine, 1995) ning üheaheelalise DNA-ga seonduv valk RP-A. Transaktivatsiooni domeeni kaudu interakteerub p53-ga ka tema negatiivne regulaator Mdm2 (*murine double minute clone 2*). N-terminaalse regiooni teine oluline piirkond on proliini-rikas järjestus (63-97), mis on vajalik p53-vahendatud apoptoosiks (Sakamuro et al., 1997). Proliinirikka järjestuse kaudu võib toimuda p53 sekkumine signaali ülekande radadesse, sest selle domeeniga interakteerub ta SH3-domeeni (*src homology domain 3*) omavate valkudega.

Tsentraalne hüdrofoobne regioon ehk südamikudomeen (102-292), mis on vajalik järjestusspetsiifiliseks seondumiseks DNA suure ja väikese vaoga. Selles regioonis paiknevad konserveerunud domeenid II kuni V. Tsentraalse regiooniga

seonduvad SV40 (*simian virus 40*) suur T antigeen (Jenkins et al., 1988) ja rakulised valgud ASPP1 ja 53BP2 (*p53 binding protein 2*) (Samuels-Lev et al., 2001). p53-s esinevatest mutatsioonidest 75 % on „missense“ mutatsioonid, millest valdav enamus klasterdub DNA-ga seondumise domeeni. Samas valgu N-otsas ja C-otsas, kus on olulised reguleerivad domeenid ja valgu aktiivsuseks vajalikud post-translatsiooniliselt modifitseeritavad aminohapped, esineb mutatsioone väga vähe (ainult 0,1% 15 000st praeguseks leitud mutatsioonist) (Szymanska & Hainaut, 2003). See viitab kaudselt asjaolule, et DNA sidumise funktsioon on p53-le tähtis käitumaks tuumorsupressorina.

Lisaks sellele ei ole DNA-ga seondumise domeenis esinevad mutatsioonid jaotunud ühtlaselt, vaid umbes 30% kõikidest mutatsioonidest on koondunud kuude „hotspot“ koodonisse. Nendest kuuest koodonid 245, 248 ja 273 on olulised valgu-DNA interaktsioonides ning koodonid 175, 249 ja 282 on vajalikud valgu konformatsiooni määramisel (Cho et al., 1994).

Karboksüterminaalne aluseline oligomeriseerumis- ja reguleeriv domeen (300-393). C-terminaalses regioonis paikneb linker-piirkond (300-318), tetrameriseerumisdomeen (323-356) ning kolm tuuma lokaliseerimise signaali (NLS). Kõige C-terminaalsem regioon (363-393) tundub toimivat p53 järjestus-spetsiifilise seondumise negatiivse reguleerijana (Hupp et al., 1992, Takenaka et al., 1995).

Karboksüterminaalse domeeniga interakteeruvad TFIIH subühikud helikaasid XPD ja XPB, TBP (*TATA box binding protein*) ning helikaas CSB, mis osaleb DNA reparatsioonis (Levine, 1997).

p53 aktivatsioonis osalevad tema C-terminaalse regiooni fosforüleerimine (Ko & Prives, 1996), atsetüleerimine (Sakaguchi et al., 1998), glükosüleerimine (Shaw et al., 1996) ja peptiidi proteolüütiline eemaldamine (Okorokov et al., 1997), mis ilmselt kõik põhjustavad valgu konformatsiooni muutuse.

1.6. p53 modifikatsioonid ja aktiivsuse regulatsioon

Normaalsetes rakkudes on tuumorsupressor p53 latentse olekus ning tema poolestusaeg on väga lühike (5-20 min), kuna p53 ubiquitinüleerimine suunab valgu tsütoplasmas asuva 26S proteasoomi poolt läbiviidavale lagundamisele (Maki et al., 1996). p53 taset kontrollivatest valkudest on ilmselt kõige olulisem E3 ubiquitiini

ligaasina käituv Mdm2, kuid p53 stabiilsuse regulatsioonis osalevad ka kalpaiin 1, JNK (Jun N-terminal kinase) ja β -kateniin (Kubbutat & Vousden, 1997, Oren et al., 2002).

Stressi tingimustes toimub rakus p53 aktivatsioon ja akumulatsioon, mis on vajalikud tema funktsioonide täitmiseks. Aktivatsiooni ja akumulatsiooni võivad põhjustada erinevad rakuvälised või -sised signaalid. Selliseks signaaliks võib olla DNA-d kahjustav aine või kiirgus (UV, röntgen-, γ -kiirgus) (Kastan et al., 1991). Lisaks genotoksilisele stressile indutseerib p53 ka konstitutiivselt aktiivne kasvusignaal (onkogeenne stress), ribonukleotiidide vähesus rakus (Linke et al., 1996) ning hüpoksia (Koumenis et al., 2001). Aktiveeritud p53 omab antiproliferatiivset efekti, osaledes rakutsükli regulatsioonis, DNA kahjustuste parandamises, angiogeneesis, raku diferentseerumises ja apoptoosis (Vogelstein et al., 2000).

DNA kahjustuse korral osaleb signaali edastamises mitu proteiinkinaasi – ATM, ATR ja nende substraatkinaasid Chk2 ja Chk1 (Banin et al., 1998, Chehab et al., 2000). Kuigi onkogeense stressi puhul peetakse p53 aktiivsuse regulatsioonis kõige olulisemaks tuumorsupressor ARF vahendatud p53 aktiveerimist, viitavad mitmed kirjanduse andmed alternatiivsetele võimalustele hüperproliferatiivse signaali jõudmises p53-ni. On näidatud, et ATM stabiliseerib onkogeense stressi poolt indutseeritavat transkriptsioonifaktorit E2F1, mis omakorda on võimeline indutseerima ATM kinaasi ekspressiooni (Lin et al., 2001). Kuna E2F1 käitub onkogeense stressi korral p53 indutseerijana ARF-i transaktivatsiooni kaudu (Russell et al., 2002), tõestab see erinevate signaaliradade ristumist ning üksteisele mõju avaldamist. Seetõttu ei ole ka p53-e regulaatori ARF osalemises erinevate stresside korral täit selgust.

p53 aktiveerimiseks ja degradeerimise takistamiseks on vajalikud posttranslatsioonilised modifikatsioonid, millest tähtsamad on fosforüleerimine ja atsetüleerimine. Inimese p53 modifitseeritakse posttranslatsiooniliselt vähemalt 18 kohast. UV ja ioniseeriva kiirguse toimel fosforüleeritakse p53 N-terminaalses domeenis seitset seriini ja kahte treoniini – ser 6, 9, 15, 20, 33, 37, 46 ning thr 18 ja 81, defosforüleeritakse aga thr 55. C-terminaalses regioonil fosforüleeritakse ser 315 ja 392 (Appella & Anderson, 2001).

UV-st ja ioniseerivast kiirgusest tingitult fosforüleeritakse ser 6, 9 ja 15 juba umbes 30 minutit pärast stressi teket (Sakaguchi et al., 2000). Ser 15 fosforüleerimine

toimub ka käesolevas töös kasutatud DNA kahjustust tekitava alkaloidi kamptotetsiiniga rakkude inkubeerimisel (Appella & Anderson, 2001). Selle aminohappe fosforüleerimist teostavad nii ATM kui ATR, vastavalt ioniseeriva kiirguse (Banin et al., 1998, Nakagawa et al., 1999) ja UV puhul (Tibbetts et al., 1999). Fosforüleerimise tulemuseks on p53-sõltuva transkriptsiooni aktiveerimine, kuna p53 ja ko-aktivaator CBP/p300 vaheline interaktsioon on sellistes tingimustes soodustatud (Dumaz & Meek, 1999). p53 stabiliseerumist soodustavad Chk2-sõltuv ser 20 fosforüleerimine ja ATM-st tingitud Mdm2 fosforüleerimine, mis mõlemad takistavad p53-Mdm2 kompleksi teket (Khosravi et al., 1999).

N-terminaalsed fosforüleerimised reguleerivad p53 c-terminaalset atsetüleerimist, mis soodustab p53 seondumist järjestusspetsiifiliselt DNA-ga. Atsetüleerimisel on roll ka p53 stabilisatsioonis, ubikvitinüleerimises, oligomeriseerumises ning valgu tuuma ja tsütoplasma vahelise ekspordi/impordi regulatsioonis.

1.7. p53 kui transaktivaator

p53 takistab kasvajakrakkude jagunemist rakutsükli peatamise ja apoptoosi indutseerimisega. Oluliseks mehhanismiks nende protsesside juures on p53 omadus reguleerida teiste geenide transkriptsiooni. p53 reguleerib oma märklaudeenide ekspressiooni nii transkriptsiooni aktiveerimise kui represseerimise kaudu.

DNA kahjustusest ja onkogeensest stressist tingitult seondub p53 järjestusspetsiifiliselt DNA-ga, mis koosneb kahest koopias 10 aluspaari pikkusest motiivist 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' (Pu = puriin, Py = pürimidiin), mida eraldab 0 kuni 13 aluspaari. p53 mutandid, mis esinevad tihti inimese kasvajatel ning mis sisaldavad mutatsioone „hot spot“ nukleotiidides, ei ole suutelised seonduma konsensus dimeerse järjestusega (El-Deiry et al., 1992). Funktsionaalne p53 seondub sellisele järjestusele tetrameerina (Chene, 2001).

p53 võib aktiveerida transkriptsiooni otsese seondumisega DNA-le ning interakteerudes transkriptsioonilise koaktivaatori p300-ga (CBP) ja basaalsete transkriptsioonifaktoritega (Avantaggiati et al., 1997, Lill et al., 1997). p300/CBP ja P/CAF on koaktivaatorid, mis soodustavad p53 transkriptsiooni aktivatsiooni, atsetüleerides märklaudeenide promootoris asuvaid histoonid ja ka p53 ennast (Gu &

Roeder, 1997). Histooneid atsetüleerimine vähendab kromatiini pakitust ning võimaldab transkriptsiooni masinavärgi ligipääsu DNA-le, p53 atsetüleerimine aga soodustab valgu järjestusspetsiifilist seondumist DNA-le (Sakaguchi et al., 1998). Basaalsetest transkriptsioonifaktoritest seondub p53 oma N-terminaalse happelise domeeni (1-42) kaudu eelpool mainitud TBP-ga seotud faktorite TAF_{II}40 ja TAF_{II}60-ga (Thut et al., 1995) ning transkriptsiooni/reparatsiooni faktori TFIID p62 subühikuga (Wang et al., 1995).

Inimese genoomis on umbes 200 kuni 300 geeni, millel on p53 konsensusjärjestus ning mis võivad olla transkriptsiooniliselt aktiveeritavad p53 poolt (Tokino et al., 1994). On näidatud, et p53 induktsiooni korral aktiveeritakse rohkem kui saja geeni transkriptsioon (Zhao et al., 2000). *In vivo* p53 poolt transaktiveeritavate geenide, näiteks apoptoosis osalevate Noxa, Puma ja Bid ekspressiooni puhul, esineb koe ja rakutüübi spetsiifilisust. Seega organismi erinevates kudedes indutseeritakse kiirguse aga ilmselt ka teiste stressifaktorite korral erinev geenide ekspressioonimuster, mille tulemuseks on rakutüüpide varieeruv tundlikus ja käitumine vastava stressi korral (Fei et al., 2002).

p53-sõltuv transaktivatsioon toimub valdavalt rakutsükli bloki põhjustamisel ja varajases apoptoosi järgus, seevastu p53 tingitud transrepressiooni esineb rohkem apoptoosi hilisemates etappides (Mirza et al., 2003). Seega toimuvad geenide ekspressioonimustri muutused ka vastavalt sellele, millist füsioloogilist etappi rakk parajasti läbib.

1.8. p53 kui transrepressor

Erinevalt transaktiveeritavatest geenidest puudub suuremal osal p53-represseeritavatel geenidel klassikaline p53 seondumisjärjestus (Krause et al., 2001). Mõnedel represseritavatel geenidel esineb p53 seondumisjärjestus, mis erineb transaktivatsiooni omast korduste orientatsiooni poolest – kui transkriptsiooni soodustavas saidis on kordusjärjestused orienteeritud vastakuti ehk pea-pea tüüpi (*head to head*), siis repressiooni korral paiknevad kordused tandeemselt ehk pea-saba (*head to tail*) suunaliselt (Johnson et al., 2001). Pea-saba paigutusega järjestusi on leitud näiteks p53 poolt represseritavate geenide nagu MDR1, ARF (*alternative reading frame*), tsükliin A ja tsükliin B1 promootoritest.

p53-vahendatud repressiooni korral interakteerub p53 ko-repressor mSin3a-ga, mis omakorda seob histoon-deatsetülaasi (HDAC) (Murphy et al., 1999). Kui transaktivatsiooni käigus teostab p300 märklaudgeeni promootoris asuvate histoonide atsetüleerimist, siis repressiooni protsessis toimub histoonide (H3) deatsetüleerimine HDAC poolt. Histoonide deatsetüleerimine viib kromatiini tihedamale pakitusele ja seega transkriptsiooni masinavärgi halvemale ligipääsule. Sellise mehhanismiga represseritakse näiteks mikrotuubulite stabiilsust reguleerivaid gene Statmiin ja Map4 (*microtubule associated protein 4*) (Murphy et al., 1996, Murphy et al., 1999) ning anti-apoptotilist geeni Bcl-2 (Wu et al., 2001).

Transrepressiooni teiseks võimaluseks on p53 interakteerumine teiste transkriptsioonifaktoritega. p53 interaktsioone on täheldatud näiteks Sp1-ga hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) promootoris (Kanaya et al., 2000), NF-Y-ga (*nuclear factor Y*) CDK1 geenis (Yun et al., 1999) ja AP-1-ga (*activator protein-1*) hMMP1 (*matrix metalloproteinase-1*) promootoris (Sun et al., 1999). Valdav osa sellistest interaktsioonidest toimub ilma p53 seondumiseta DNA-le.

Lisaks eelnevale võib p53 represserida transkriptsiooni, seondudes ise DNA-ga ja takistades teiste transkriptsioonifaktorite seondumist promootorile. Sellisel juhul p53 seondumisjärjestused kattuvad teiste efektiivsemate transkriptsiooni aktivaatorite konsensusjärjestustega – kuigi p53 aktiveerib märklaudgeeni transkriptsiooni, takistab ta efektiivsema aktivaatori seondumist promootorile ning tulemuseks on ikkagi transkriptsiooni vähenemine ehk näiline repressioon. Selline mehhanism esineb näiteks α -fetoproteiini promootoris, kus p53-ga konkureerivaks faktoriks on HNF-3 (*hepatocyte nuclear factor-3*) (Lee et al., 1999).

p53-represseritavate geenide arvu hinnangud varieeruvad laias vahemikus otseste ja kaudsete efektide eristamise raskuste tõttu. Värskematest uuringutest lähtudes on p53 poolt reguleeritavaid gene umbes 360, millest koguni 80 % on represseritavad. Viimaste hulgas on ka 19 transkriptsioonifaktorit, 8 üldise transkriptsiooniga seotud valku ja 6 RNA protsessingus osalevat valku - seega kaudselt mõjutab p53 tunduvalt suurema hulga geenide ekspressiooni (Mirza et al., 2003, Zhao et al., 2000).

1.9. p53 märklaudgeenid

p53 tähtsaimaks funktsiooniks kasvajate tekke takistamisel on tema transkriptsiooni regulaatori aktiivsus. Kuigi p53 mõjutab imetajates sadade geenide transkriptsiooni, kirjeldatakse käesolevas töös põhjalikumalt ainult kahte p53-e poolt indutseeritavat geeni – Mdm2 ja Bax.

Mdm2. *Murine double minute clone 2* ehk Mdm2 kloneeriti esmakordselt spontaanselt transformeerunud 3T3DM hiire rakuliinist pärit atsentrilistest kromosoomidest (Cahilly-Snyder et al., 1987). Teadmine, et genoomse Mdm2 geeni amplifitseerimine viib hiirtes sagedasele kasvajate tekkele (Fakharzadeh et al., 1991) tõestas, et Mdm2 on onkogeen. Mdm2 seundumine p53-ga viitas aga sellele, et ta võib olla p53 regulaator (Momand et al., 1992).

Inimese mdm2 ehk hdm2 on 491 aminohappe pikkune valk, mis asub kromosoomis 12 regioonis q13-14 ning on amplifitseerunud umbes 30% osteosarkoomides ja pehme koe kasvajates (Oliner et al., 1992). Erinevate organismide Mdm2 valgu järjestuse joondamisel on temas leitud kolm konserveerunud piirkonda (CR1-3) (Piette et al., 1997). CR1 (aminohapped 42-94) seob raku kasvu reguleerivaid valke p53 (Chen et al., 1993), p73 (Zeng et al., 1999), E2F1 (Martin et al., 1995) ja DP1 (Martin et al., 1995). CR2 (ah 301-329) interakteerub tuumorsupressor pRB-ga (Hsieh et al., 1999). CR3 kodeerib RING sõrme domeeni, mida on vaja p53 ubikvitinüleerimiseks (Honda et al., 1997, Kataoka et al., 1997). Mdm2 interakteerub ka RNA-ga ja ribosoomi valgu L5-ga (Elenbaas et al., 1996) ning omab tuuma lokalisatsiooni- (NLS) ja tuuma ekspordi järjestust (NES) (Roth et al., 1998).

Geneetilised uuringud näitavad, et Mdm2 mängib olulist rolli p53 regulatsioonis. Mdm2 *-/-* hiire embrüod hukuvad juba arengu esimeste päevade jooksul (Jones et al., 1995), samas p53 deletsiooni korral jäävad sellised embrüod elama – seega on p53 valk embrüogeneesis aktiivne ning vajalik on tema negatiivne regulatsioon mdm2 poolt. Mdm2 tähtsaimaks funktsiooniks rakus on p53-e inaktiveerimine. Kuna p53 indutseerib Mdm2-e ja Mdm2 omakorda põhjustab p53-e lagundamist, siis moodustub negatiivse tagasiside mehhanism, mille kaudu hoitakse normaalsetes tingimustes p53 koguseid madalana (joonis 3). Mdm2 seondub p53 N-otsa lähedale ja käitub ubikvitiini ligaasina, märgistades sellega p53 degradatsiooniks tsütoplasmas asuvale 26S proteasoomile. Mdm2 osaleb ilmselt ka p53

degradatsiooniks vajalikus valgu transpordis tuumast tsütoplasmasse (Freedman & Levine, 1998, Roth et al., 1998).

Mdm2 reguleerib p53 aktiivsust lisaks degradatsiooni soodustamisele ka teise mehhanismi kaudu. Ta seondub p53 N-terminaalse happelise transaktivatsiooni domeeniga, takistades sellega p53-vahendatud transkriptsiooni – selle protsessi jaoks pole vaja p53 proteolüütilist degradatsiooni, piisav on valkude omavaheline interaktsioon (Chen et al., 1993, Oliner et al., 1993). Kuna p53-l on täheldatud peale transaktiveerivale funktsioonile ka teisi omadusi nagu DNA reparatsioon (Ford & Hanawalt, 1997), eksonukleasne aktiivsus (Mummenbrauer et al., 1996) ja transaktivatsioonist sõltumatu apoptoosi põhjustamine (Caelles et al., 1994, Haupt et al., 1997), siis võib rakus olla teatud olukordades vaja eemaldada p53 transaktivatsiooni aktiivsus, kuid samas jätta alles teised valgu aktiivsused.

Kui mdm2 on p53 regulaator, siis mdm2 regulaator on omakorda valk ARF (inimeses p14^{Arf}). Nagu eelnevalt mainitud, seondub hiire ARF mdm2 N-terminaalse piirkonnaga (Pomerantz et al., 1998) ning *in vitro* vähendab mdm2 ubikvitiini ligaasset aktiivsust (Honda & Yasuda, 1999). ARF seondub mdm2-ga ning viib ta tuumakestesse, võimaldades seeläbi p53-l transaktiveerida oma märklaugeene (Tao & Levine, 1999).

Mdm2 osaleb rakus veel mitmes olulises protsessis, näiteks on ta sarnaselt p53-le negatiivseks regulaatoriks p73-le (Zeng et al., 1999), takistades p73-sõltuvat transaktivatsiooni ja apoptoosi (Dobbelstein et al., 1999). Mdm2 soodustab rakkude S-faasi minekut mitme mehhanismi kaudu – aktiveerides transkriptsioonifaktorit E2F1 (Martin et al., 1995) ning takistades pRb ja E2F1 omavahelist seondumist (Xiao et al., 1995).

Bax. Bax kuulub Bcl-2 valkude perekonda, mis on oma nime saanud p53 poolt represseeritava anti-apoptootilise Bcl-2 geeni järgi. Selles valkude perekonnas on lisaks Bax-le ja Bcl-2-le veel mitmed p53 märklaugeenid (Miyashita & Reed, 1995), näiteks Bid ja Puma. Bcl-2 perekonna moodustavad anti-apoptootilised valgud Bcl-2, Bcl-X_L ja Bcl-X_W ning pro-apoptootilised valgud nagu Bax, Bak ja Bid. Aminohappelise järjestuse põhjal saab perekonna jaotada kolmeks alamperekonnaks: Bcl-2 tüüpi molekulidel on neli konserveerunud piirkonda BH1 (*Bcl-2 homology*) kuni BH4, Bax tüüpi molekulidel BH1-3 ja kolmanda alamperekonna liikmetel on ainult BH3 regioon (Gross et al., 1999).

Bax ja teiste perekonna liikmete ühiseks omaduseks on moodustada homo- ja heterodimeere, mille kaudu toimub apoptoosi reguleerimine (Oltvai et al., 1993). Anti-apoptootilise ja pro-apoptootilise molekuli heterodimeriseerumine inhibeerib vastavalt nende partneri aktiivsust (Oltvai et al., 1993). Heterodimeriseerumine toimub pro-apoptootilise valgu BH3 domeeni ja anti-apoptootilise molekuli BH1, BH2 ja BH3 domeenist moodustuva hüdrofoobse „tasku“ interaktsiooni kaudu (Sattler et al., 1997). Bax BH3 domeeni oligopeptiid on võimeline indutseerima raku apoptoosi (Chittenden et al., 1995) ning Bcl-2 BH3 regiooni asendamine Bax-i BH3-ga põhjustab Bcl-2 muutumise raku surma antagonistist agonistiks (Hunter & Parslow, 1996). See näitab, et anti-apoptootilise valgu ja pro-apoptootilise valgu BH3 regiooni järjestuses on teatud erinevused, mis omavad tähtsust vastava molekuli bioloogilise funktsiooni täitmisel.

Bax paikneb apoptootilise signaali puudumisel tsütoplasmas, stiimuli korral aga liigub ta mitokondri välismembraani – selline Bax-i translokatsioon on vajalik raku surma põhjustamiseks (Antonsson et al., 2001, Wolter et al., 1997). Bax-i anti-apoptootiline interaktsiooni partner Bcl-2 paikneb rakus transmembraanse valguna mitokondrite välismembraanis, tuumamembraanis ja endoplasmaatilise retiikulumi membraanis (Krajewski et al., 1993). Bcl-2 takistab mitokondri membraanis apoptogeensete faktorite nagu tsütokroom c (Liu et al., 1996) ja apoptoosi indutseeriva faktori (AIF) (Susin et al., 1996) vabanemist intermembraanses ruumist tsütoplasmasse. Seevastu Bax soodustab tsütokroom c vabanemist (Rosse et al., 1998). Apoptootiliste faktorite vabanemise kontroll toimub ilmselt mitokondri membraanis paikneva kanali (*permeability-transition pore*) reguleerimise kaudu (Marzo et al., 1998). Bax on võimeline interakteeruma selle poori ühe komponendi VDAC-ga (*voltage-dependent anion channel*) põhjustades tsütokroom c liikumise tsütoplasmasse (Shimizu et al., 1999). See omakorda viib ATP-st sõltuva kaspasid kaskaadi aktiveerumiseni (Li et al., 1997). Bcl-2 saab takistada kaspasid aktiveerumist lisaks tsütokroom c vabanemise takistamisele ka pro-kaspasid ja Apaf-1-ga seondumise kaudu (Ng et al., 1997). Bax-i heterodimeriseerumine anti-apoptootilise molekuliga põhjustab Apaf-1 vabanemise sellest kompleksist.

Bax ja Bcl-2 aktiivsust reguleeritakse seriini ja treoniini jääkide fosforüleerimisega (Haldar et al., 1995), proteolüütilise lõikamisega kaspasid poolt (Cheng et al., 1997) ja mitmete Bcl-2 perekonna väliste valkude seondumisega. Raku

elu või surma üle otsustamises toimib tõenäoliselt kaalukeelena pro-apoptoosilise Bax ja anti-apoptoosilise Bcl-2 valgu suhteline rakusisene kogus.

2. Töö eesmärk

Onkogeenide ja tuumorsupressorgeenide ekspressiooni kaudu reguleeritakse organismis rakkude kasvu ja jagunemist. Regulaatorsete mehhanismide puudumisel võib aga onkogeenidest lähtuv kasvusignaal põhjustada raku kontrollimatut jagunemist ning kasvaja teket. Kasvajate tekke takistamise üheks tähtsaimaks komponendiks on organismile potentsiaalselt ohtliku raku võime käivitada apoptoos. Kuigi onkogeenide ekspressioon on üheks eelduseks apoptoosi induteerumisele, on täpsed tingimused raku suitsiidisignaali tekkeks teadmata.

Käesolevas töös uuriti tuumorsupressorgeeni ARF ja PI3K-tüüpi kinaaside ATM ning ATR osalust apoptootilise vastuse kujunemises onkogeense stressi tingimustes. Lisaks sellele analüüsiti onkogeenide dereguleeritud ekspressiooni mõju rakkudele ning selle seost ATM/ATR kinaaside aktiveerumisega.

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Materjalid ja meetodid

3.1.1. Plasmiidid

Töös kasutati ekspresioonivektorina pCG plasmidi, kus geeni kõrge ekspresiooni tagab tsütomegaloviiruse (CMV) promootor. Kuna c-myc onkogeen on liikidevaheliselt kõrgelt konserveerunud, kasutasin inimese homoloogi ekspresseerivat vektorit pCGc-myc hiire katsesüsteemis. pCG β -catenin S33Y kodeerib hiire β -kateniini, milles on punktmutatsiooni tõttu valgu seriin 33 asendunud türosiiniga. Seriin 33 fosforüleerimine glükogeen süntaas kinaas-3 β (GSK-3 β) poolt on eelduseks normaalse β -kateniini valgu lagundamisele. S33Y asendus aga takistab valgu fosforüleerimist ning tema lagundamist, mille tulemusena muteerunud β -kateniin akumulereerub rakkudes ja on konstitutiivselt aktiivne. pQmHPV-18 E7 plasmiid ekspresseerib inimese papilloomiviirus 18 E7 onkogeeni.

pCGArf ekspresseerib hiire p19ARF valku. Kontrollplasmiidina kasutati EGFPd (*enhanced green fluorescence protein*) ekspresseerivat vektorit pIRES2-EGFP (*Invitrogen*). IRES järjestuse poolt reguleeritud EGFP on metsiktüüpi GFP-ga võrreldes rakule vähem toksiline.

3.1.2. Rakud ja nende kultiveerimine

Käesolevas töös kasutati rakuliine ARF $-/-$ MEF (*mouse embryonic fibroblasts*, tuumorsupressor ARF deletsiooniga hiire embrüonaalsed fibroblastid) ja p53 $-/-$ MEF (hiire embrüonaalsed fibroblastid, mis on homosügootsed p53 defektsuse suhtes). Mõlemad rakuliinid on saadud prof. Klas Wimani käest Karolinska Instituudist.

Hiire p53 $-/-$ MEF rakkudes transkribeeritakse p53 geeni, kuid rakud sisaldavad defekti p53 pre-mRNA splaissingus, mille tõttu funktsionaalset p53 valku ei ekspresseerita. Lisaks viienda eksoni splaissingu aktseptorsaidile on nendes rakkudes deleteeritud ka 106 aluspaari pikkune lõik p53 geeni viiendast eksonist (Donehower et al., 1992).

Rakuliine kultiveeriti IMDM söötmes, millele oli lisatud 10% veise loote seerumit. Kasvutemperatuur oli 37 °C, keskkond sisaldas 5% CO₂.

3.1.3. PEI transfektsioon

Plasmiidide rakkudesse transfekkeerimiseks kasutati PEI-d (polüetüleenimiin, *Fermentas*). Transfekkeerimisel lähtuti polüetüleenimiini tootja juhendist. ARF -/- MEF-e loeti 60 mm tassile 120 000, p53-/- MEF 80 000 rakku. Uuritavaid valke ekspresseerivaid plasmiide transfekkeeriti 5 µg, kontrollplasmiidi transfekkeeriti 10 µg, et oleks tagatud kotransfektsiooniga võrdne DNA ja PEI kogus. DNA / PEI koefitsiendina kasutati 1:8.

3.1.4. Rakkude inkubeerimine wortmanniniga

3h pärast PEI transfektsiooni lisati söötmesse PI3K-tüüpi kinaaside inhibiitorit wortmanniini lõppkontsentratsioon 1,5 µM. Sobiv wortmanniini kontsentratsioon määrati eelnevalt kontsentratsioonirea abil: 0 µM, 0,5 µM, 1 µM, 1,5 µM, 2 µM, 3 µM, kus erinevate wortmanniini kontsentratsioonide mõju hinnati rakkude suremusele. Edasistes katsetes kasutati kontsentratsioonirea abil määratud suurimat wortmanniini kontsentratsiooni, mis kontrollrakkudega võrreldes rakkude apoptoosi ei põhjustanud.

3.1.5. Rakkude lüüs

24h pärast PEI transfektsiooni valati tassidelt sööde ning hoiti järgnevate protseduuride käigus jääl. Rakke pesti 4 °C PBS-ga, seejärel lisati tassidele 500 µl külma PBS-i ning koguti rakud kummispaatliga *Eppendorf*'i tuubi. Tassidele pipeteeriti veelkord 500 µl PBS-i ja ka see koguti *Eppendorf*'i tuubi. Rakke tsentrifugeeriti 12 000g juures 12 sekundit, eemaldati supernatant ja korrati tsentrifugeerimist.

Kui lüsaatide valgusisalduse hindamiseks kasutati β-aktiini Western bloti järgset tuvastamist, siis supernatandi aspireerimise järel suspendeeriti rakud 100 µl-s 2x

SDS-lüüsi puhvris (1 M TrisCl pH 6,8, 4 % SDS, 10 % β -merkaptotoetanool, 20 % glütseriin, 0,1 % broomfenoolsinine) ja kuumutati 10 minutit 100 °C juures. Kuumutatud lüsaati tsentrifugeeriti 10 min 12 000g ja supernatant säilitati -20 °C.

Alternatiivina määrati valgu kogus enne Western blot-i spektrofotomeetriliselt. Sellisel juhul käituti järgmiselt: supernatandi eemaldamise järel lisati rakkudele 50 μ l lüüsilahust (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH 8), 1% Triton-X), millele oli lisatud proteaaside kompleksinhibiitorit (*Boehringer Mannheim*) vastavalt kasutusjuhendile. Rakke suspendeeriti ja inkubeeriti 1h jääs. Seejärel tsentrifugeeriti lüsaati 5 minutit 12 000g toatemperatuuril. Supernatant kantakse uude tuubi ja mõõdeti selles valgusisaldus, pannes ELISA plaadi kannukestesse 20 μ l BioRad Dye-d (5x), 1 μ l lüsaati ja 79 μ l deioniseeritud vett. Kontrollina kasutati 20 μ l BioRad Dye-d (5x), 1 μ l lüüsi puhvrit ja 79 μ l deioniseeritud vett. Plaati hoiti 10 minutit pimedas ja seejärel mõõdeti spektrofotomeetril optiline tihedus 620 nm juures. Lüsaadile lisati vajalik kogus 6x SDS *loading* puhvrit (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS, 10 %- β -merkaptotoetanool, 20 % glütserool, 0,004 % broomfenoolsinine) ja kuumutati 5 min 100 °C juures.

3.1.6. Western Blot

Valgud lahutati 10 % SDS-polüakrüülamiidgeelis geelelektroforeesiga SDS-puhvris (25 mM Tris, 250 mM glütsiin (pH 8,3), 0,5% SDS) või alternatiivselt 8%-15% SDS-gradientgeelis. Enne valkude ülekannet Bio Trace™ PVDF filtrile märjati see metanoolis ning tasakaalustati geeliga 15 minutit ülekande puhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% metanool). Poolkuiv valkude ülekande toimus Hoefer *semi-dry* transfer aparatuuril 0,8 mA/cm² 1 h jooksul. Pärast ülekannet blokeeriti filter 5 % lõssipulbri 0,05 % Tween 20 lahusega PBS-s (blokeerimislahus) 4 °C juures üleöö või 30 minutit toatemperatuuril. Primaarsete antikehadega inkubeeriti filtrit blokeerimislahuses 1,5 tundi toatemperatuuril, seejärel pesti filtrit 3 korda 5 minutit 0,05 % Tween 20 lahusega PBS-s.

p53 tuvastamisel kasutati antikehi pAb240 (lõppkontsentratsioon 1,4 μ g/ml) ja pAb122 (lõppkontsentratsioon 1,5 μ g/ml). pAb240 epitoobiks on p53 valgu keskosa (aminohapped 203-212), pAb122 epitoobiks on p53 C-terminaalne osa (371-380). p53 seriin 15 tuvastamiseks kasutati küülikus saadud polükloonaalset antikeha (ab1431-50 *Abcam*, lõppkontsentratsioon 1 μ g/ml). Onkogeeni c-myc detekteeriti monokloonaalse

antikehaga (kloon 9E10, lahjendus 1:2), β -kateniin monoklonaalse antikehaga (*BD Biosciences*, lõppkontsentratsioon 0,25 $\mu\text{g/ml}$), Bax monoklonaalse antikehaga (*Santa Cruz*, lõppkontsentratsioon 4 $\mu\text{g/ml}$), Mdm2 antikehaga 2A10 (lõppkontsentratsioon 1 $\mu\text{g/ml}$). Hiire p19^{ARF} detekteerimiseks kasutati küülikus saadud hiire ARF vastast polükloonaalset antikeha (*Abcam*, lõppkontsentratsioon 0,5 $\mu\text{g/ml}$). β -aktiini visualiseerimiseks kasutati aktiini vastast antikeha AC-15 (*Abcam*, lahjendus 1:20 000).

Sekundaarse antikehaga inkubeeriti filtrit toatemperatuuril 1 tund, millele järgnes 3 korda 5 minutiline pesu 0,05 % Tween 20 lahusega PBS-s. Sekundaarseteks antikehadeks olid hiire IgG vastane biotinüleeritud antikeha (*Amersham*, lahjendus 1:2500) või küüliku IgG vastane biotinüleeritud antikeha (lahjendus 1:1000). Järgnevalt inkubeeriti filtrit streptavidiin-aluseline fosfataas (*Amersham*, lahjendus 1:2500) või streptavidiin-peroksüdaas (*Amersham*, lahjendus 1:2500) konjugaadiga.

Streptavidiin-aluselise fosfataasi konjugaadi kasutamisel tehti viimane pesu aluselise fosfataasi (AP) puhvril (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂). Tulemuse visualiseerimine toimus AP puhvril, kus aluselise fosfataasi substraatidena kasutati NBT (*nitro blue tetrazolium*) (*Sigma*, lõppkonts. 0,33 mg/ml) ja BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*) (*Sigma*, lõppkonts. 0,165 mg/ml). Reaktsioon peatati deioniseeritud veega.

Alternatiivina aluselisele fosfataasile kasutati streptavidiin-peroksüdaasi konjugaati. Sellisel juhul toimus visualiseerimine *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (*Pierce*) komplekti või *ECL plus Western Blotting Detection System* (*Amersham*) komplektiga vastavalt valmistaja juhendile.

3.1.7. Apoptoosi analüüs

48h pärast transfektsiooni koguti nii söötmes olevad kinnitumata kui tassile kinnitunud rakud 15 ml tuubi. Rakke tseentrifuugiti temperatuuril 4° C, 1000 pöörat minutis 5 minutit. Sööde aspireeriti ja rakud suspendeeriti 1 ml PBS-ga. Rakud tseentrifuugiti uuesti 1000 rpm 4° C 5 minutit ning eemaldati PBS. Apoptoosi määramiseks suspendeeriti rakud 100 μl sidumispuhvril (10mM Hepes pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) 1:200 annexin-FITC (*annexin fluoroisothiocyanate*, *BD Biosciences*) või annexin-PE (*annexin-phycoerythrin*, *BD Biosciences*) konjugaadi

lahjendusel ja inkubeeriti pimedas 10 minutit toatemperatuuril. Vahetult enne analüüsi läbiviimist FACScan läbivoolu tsütomeetriga lisati raku suspensioonile 200 µl külma sidumispuhvrit. Iga proovi kohta analüüsiti 40 000 rakku. Apoptootilisi rakke eristati elusatest rakkudest annexin V-fluorofooriga värvumise intensiivsuse põhjal.

3.1.8. Immuunofluorestsents analüüs

Rakke kasvatati 24-kannuga plaadis katteklaasil. Igasse kannu loeti 16 000 rakku. Rakke transfekteeriti 1 µg ekspressioonivektoriga, kotransfektsioonil kasutati kokku 2 µg DNA-d. Mitokondrite tuvastamiseks inkubeeriti rakke 30 minutit mitotrackeriga (*Molecular Probes*, lõppkontsentratsioon 20 nM).

Katteklassile kinnitunud rakke pesti PBS-s ja fikseeriti 15 minutit 4% paraformaldehüüdiga PBS-s toatemperatuuril. Rakke pesti PBS-s ning permeabiliseeriti 10 minutit 0,2% TritonX-100 PBS-s jääl. Seejärel pesti rakke 1%BSA-0,05%PBS-Tweenis. Rakke inkubeeriti 1%BSA-0,05%PBS-Tweenis (blokeerimislahus) 15 minutit toatemperatuuril ning siis primaarse antikeha lahuses lahjendatuna blokeerimislahuses 1h. Seejärel pesti rakke PBS-s ning inkubeeriti sekundaarse antikehaga 1h pimedas. Bax tuvastati primaarse antikehaga (*Santa Cruz*) ja sekundaarse FITC-ga konjugeeritud antikehaga (*Molecular Probes*).

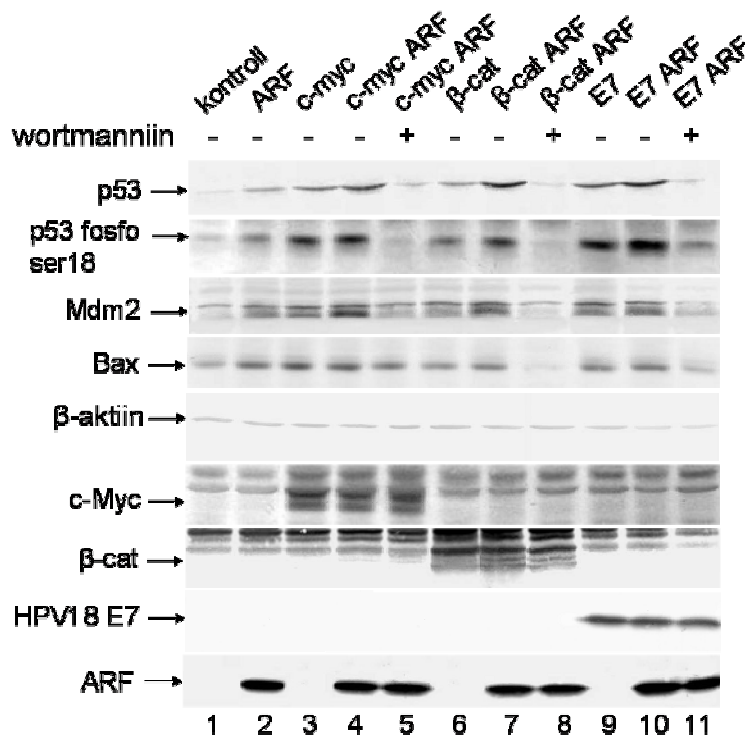
Fosforüleeritud histoon H2AX tuvastati küülikus saadud polükloonaalse antikehaga (*Travigen*) ja FITC-ga konjugeeritud sekundaarse antikehaga (*LabAs*). Fosforüleeritud H2AX katses kasutati positiivse kontrollina rakkude inkubeerimist 2h jooksul topoisomeraas I inhibiitori (Hsiang et al., 1985) kamptotetsiiniga (cpt) lõppkontsentratsioonil 10 µM. Rakud sulustati anti-fade lahusega (*Molecular Probes*) ning analüüsiti fluorestsentsmikroskoobi abil (*Olympus BX61*).

3.2. Tulemused

3.2.1. ARF-i ekspressioon ja onkogeensest stressist tingitud p53 fosforüleerumine indutseerivad p53-sõltuva transkriptsiooni sünergiliselt

Onkogeenide c-myc ja E2F1 üleekspressiooni on seostatud ATM/ATR sõltuva p53-e fosforüleerumisega (Lindstrom & Wiman, 2003, Rogoff et al., 2002). Et analüüsida onkogeenide ekspressiooni mõju p53-e fosforüleerumisele, transfekteerisin ARF-defektseid rakke onkogeenide c-myc, β -kateniini ja HPV-18 E7-ga. Western blot analüüs näitas, et onkogeenide üleekspressioon põhjustab p53 seriin 18 fosforüleerumist ning p53 valgu akumulereerumist ARF-st sõltumatult (joonis 5 rajad 3, 6, 9).

Lisaks sellele uurisin, kas ARF induktsioon ja p53 fosforüleerumine, mis soodustavad p53-sõltuva raja aktiveerumist, toimivad onkogeenide üleekspressiooni korral p53-sõltavas transkriptsiooni induktsioonis sünergiliselt ehk teineteist täiendavalt. Selleks tuvastasin p53 valgu kogust, p53 seriin 18 fosforüleerumist ning Mdm2 ja Bax ekspressiooni, kotransfekteerides ARF-defektseid MEF-e onkogeenide ja ARF-ga. Onkogeenide ja ARF koekspressioon põhjustas p53 seriin 18 fosforüleerumise ja p53 valgu taseme tõusu (joonis 5 rajad 4, 7, 10), võrreldes onkogeenide transfektsiooniga ilma ARF ekspressioonita (joonis 5 rajad 3, 6, 9) või ARF ekspressiooniga ilma onkogeenide transfektsioonita (joonis 5 rada 2). Kotransfekteeritud rakkude inkubeerimine ATM/ATR kinaaside inhibiitori wortmanniniga blokeeris p53 aktiveerumise ning inhibeeris Mdm2 ja Bax indutseerumise (joonis 5 rajad 5, 8, 11), tõestades nii ARF kui ka ATM/ATR kinaaside osalust p53-sõltuva signaaliraja aktiveerumises onkogeense stressi tingimustes.



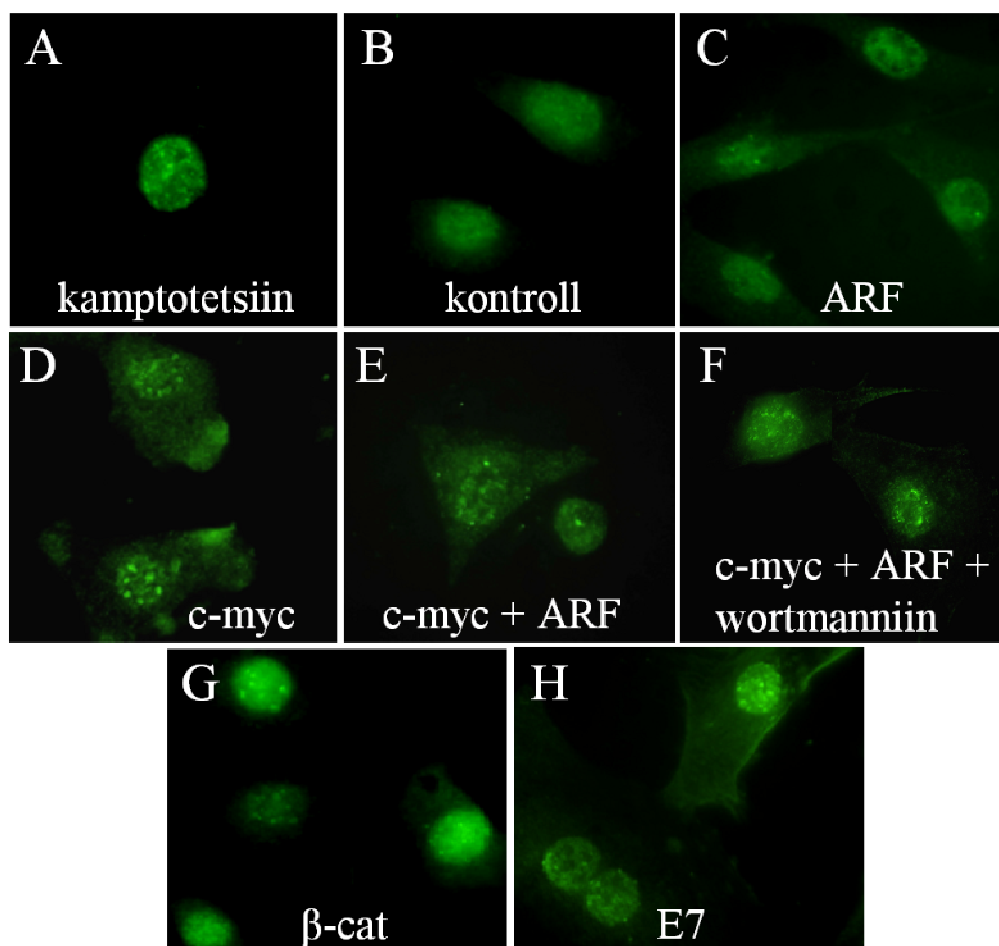
Joonis 5. ARF-i ekspressioon ja onkogeenselt stressist tingitud p53 fosforüleerumine aktiveerivad p53 märklaudgeene sünergiliselt. ARF-defektseid MEF-e analüüsiti western blotiga 24h pärast rakkude transfektsiooni. Plasmiidid ekspresseerivad tuumorsupressorit ARF või onkogeene c-myc, β-kateniin (β-cat) ja HPV-18 E7. Kontrolltransfektsiooniks kasutati EGFP-d ekspresseerivat vektorit. Wortmanniniga töödeldud rakud on tähistatud + märgiga.

3.2.2. Onkogeenide üleekspressioon põhjustab fosfo-H2AX fookuste tekke

Onkogeenide üleekspressioonist tingitud ATM/ATR kinaaside aktiveerumist peetakse oluliseks sündmuseks näiteks kiirgusest tingitud DNA kahjustustele vastuse kujunemises (Appella & Anderson, 2001). DNA kahjustuste tuvastamiseks kasutatakse tihti fosforüleeritud histooni H2AX (γ -H2AX) fookuste moodustumist DNA kaksikahelaliste katkete piirkonnas (Fernandez-Capetillo et al., 2004). Fosforüleeritud H2AX fookuste moodustumist võivad põhjustada erinevad sündmused nagu replikatsioonikahvlite kollisioon (Furuta et al., 2003, Ward & Chen, 2001), apoptoos (Rogakou et al., 2000), defektsed telomeerid (d'Adda di Fagagna et al., 2003) ja meiotiline rekombinatsioon (Mahadevaiah et al., 2001). Uurimaks võimalust, et onkogeenne stress võib aktiveerida PI3-tüüpi kinaase DNA kahjustuste

põhjustamise kaudu, analüüsisin immuunofluorestsentsi abil γ -H2AX fookuste moodustumist onkogeenide üleekspressiooni tingimustes (joonis 6).

γ -H2AX fookuste moodustumist ei põhjustanud ei kontrolltransfektsioon ega ARF ekspressioon (joonis 6 B ja C). Seevastu onkogeenide c-myc, β -kateniini ja HPV-18 E7 üleekspressioon põhjustas γ -H2AX fookuste tekke (joonis 6 D, G, H), mis tõestab DNA kaksikahelaliste katkete olemasolu. ARF ja c-myc kotransfektsioon (joonis 6 E) ega kotransfekteeritud rakkude töötlemine ATM/ATR kinaaside inhibiitori wortmanniiniga (joonis 6 F) ei mõjutanud ainult c-myc onkogeeniga transfekteeritud rakkudes nähtud fookuste teket, mis tõestab, et DNA katked tekkisid onkogeenide ekspressiooni tulemusena. Lisaks sellele järeldeb katsest, et H2AX fosforüleerumine DNA katkete juures toimub signaalirajas ATM/ATR kinaasidest ülevalpool.

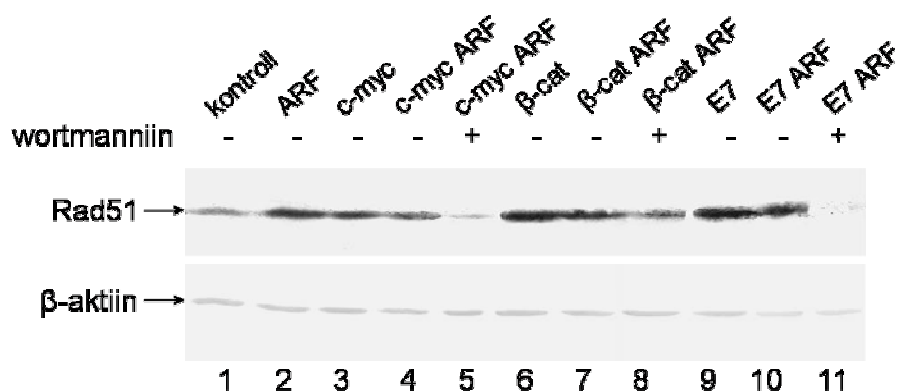


Joonis 6. Onkogeenide üleekspressioon põhjustab γ -H2AX fookuste tekke. Rakke inkubeeriti positiivse kontrollina 10 μ M kamptotetsiiniga 2h (A) või transfekteeriti kontrollplasmiidiga pIRES2-EGFP (B), ARF-ga (C), onkogeenidega c-myc (D), c-myc ja ARF (E), c-myc ja ARF inkubeeritud wortmanniniga (F), β -kateniiniga (G) või HPV-18 E7-ga (H).

3.2.3. Onkogeenne stress indutseerib DNA reparatsioonivalgu Rad51 taset

γ -H2AX fookuste moodustumise abil visualiseeritud DNA kaksikahelalised katked, mis tekkisid onkogeenide üleekspressiooni tulemusena, võivad olla tingitud erinevatest põhjustest, kaasaarvatud rekombinatoorsest protsessidest. Kuigi Rad51-vahendatud DNA reparatsioon on vajalik kaksikahelaliste katkete parandamiseks homoloogilise rekombinatsiooni kaudu, on defektset homoloogilist rekombinatsiooni seostatud ka kromosoomi segmentide deletsiooni, translokatsiooni ja kasvajate eelsoodumusega (Daboussi et al., 2002, Henning & Sturzbecher, 2003, Karlsson et al., 2003).

Seetõttu analüüsisin DNA reparatsioonis osaleva valgu Rad51 taset onkogeenidega, tuumorsupressoriga ARF või onkogeen-ARF-ga kotransfekteeritud ARF-defektsetes rakkudes. Western blot katsest selgus, et Rad51 valgu taset indutseerivad kõik kolm onkogeeni – c-myc, β -kateniin ja HPV-18 E7 (joonis 7 rajad 3, 6, 9) – võrrelduna kontrolltransfektsiooniga (joonis 7 rada 1). Sellest katse tulemusest lähtudes võib väita, et onkogeenne stress aktiveerib DNA kaksikahelaliste katkete reparatsiooni. Üllatusena indutseerib ka ARF-i ekspressioon Rad51 taset (joonis 7 rada 2). See viitab tuumorsupressor ARF rollile DNA reparatsioonis, kuigi ARF-i koekspressioon onkogeenidega ei võimendanud Rad51 induktsiooni (joonis 7 rajad 4, 7, 10). Rad51 induktsiooni inhibeeris wortmanniin (joonis 7 rajad 5, 8, 11), seega DNA reparatsiooni signaali vahendavad ATM/ATR kinaasid.

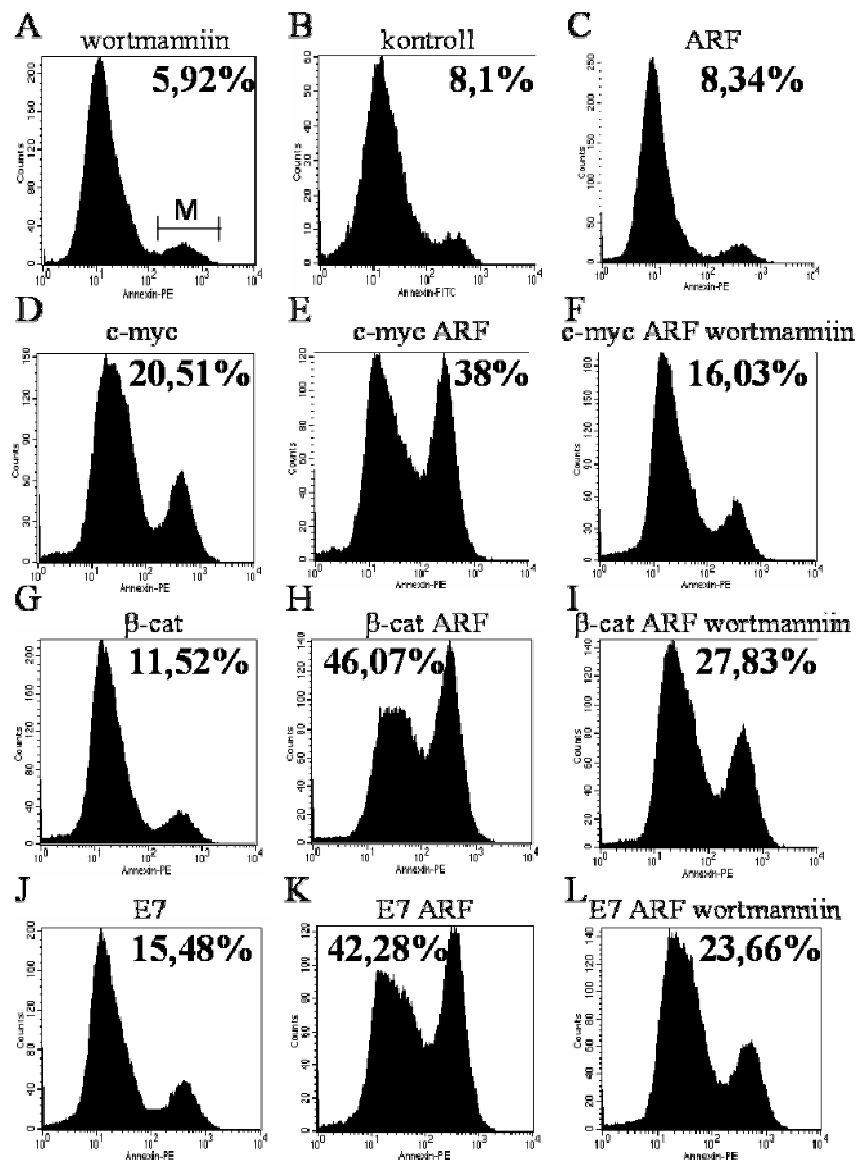


Joonis 7. Onkogeenne stress ja ARF põhjustavad Rad51 valgu induktsiooni ATM/ATR kinaasidest sõltuvalt. Rad51 valk tuvastati 24h pärast transfektsiooni western blot analüüsiga. Kontrolltransfektsioonina kasutati pIRES2-EGFP. Wortmanniniga inkubeeritud rakud on tähistatud + märgiga.

3.2.4. Efektiivne apoptoosi induksioon sõltub nii ARF-st kui ka ATM/ATR kinaasidest

Mõnevõrra vastuoluliste tulemustena on näidatud, et onkogeenid c-myc ja E2F1 on võimelised soodustama nii raku jagunemist kui ka apoptoosi (DeGregori et al., 1997, Pelengaris & Khan, 2003). Olulist ülesannet võib raku elu/surma otsustusprotsessis mängida ARF, mis indutseerub hüperproliferatiivse stiimuli toimele ning mille keskseks rolliks on p53-sõltuva vastuse aktiveerimine (Bates et al., 1998, Serrano, 2000, Sherr, 2001, Sherr & Weber, 2000).

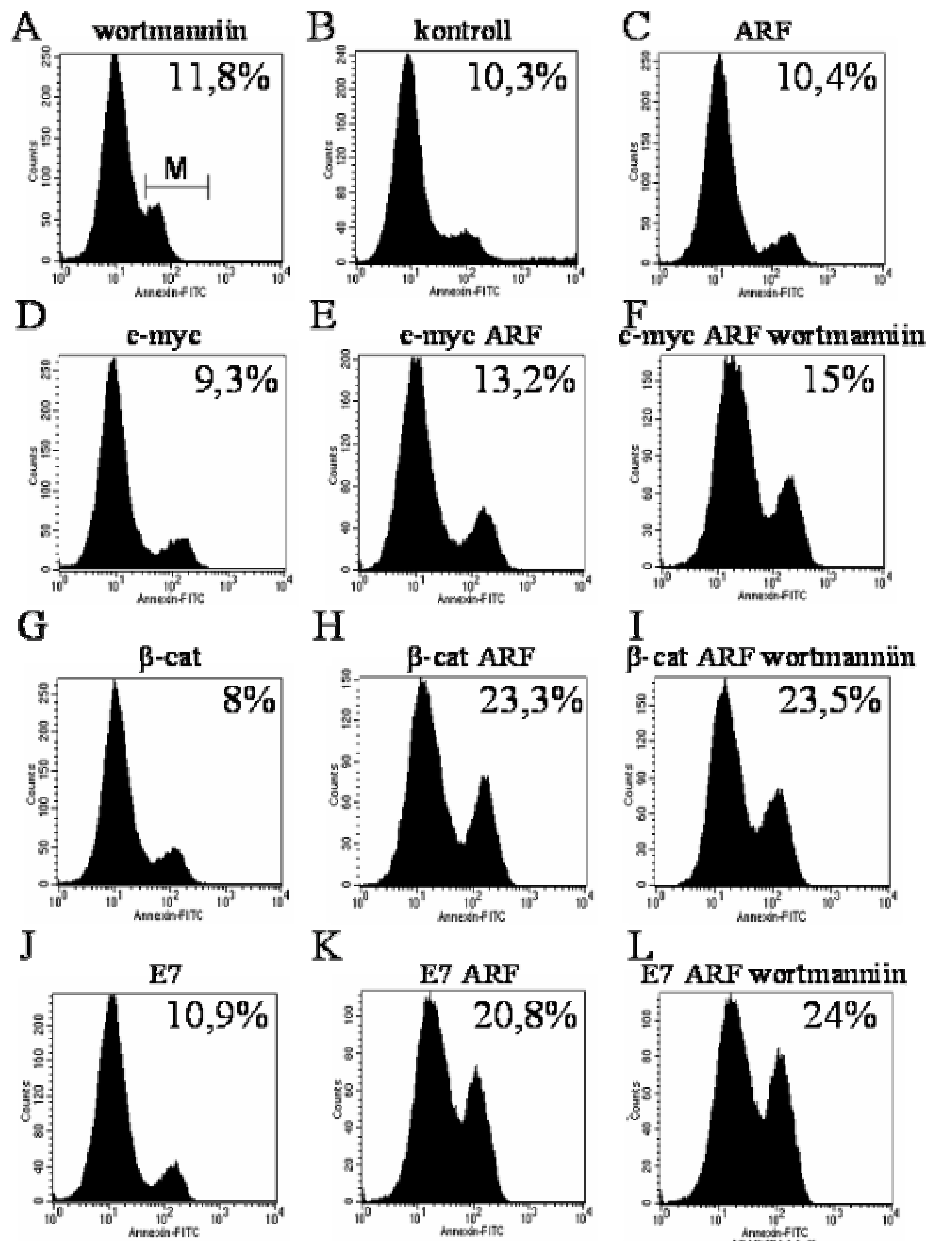
Et uurida raku vastust onkogeenide üleekspressioonile, transfekteerisin ARF-defektseid rakke erinevate onkogeenidega ning tuvastasin apoptootiliste rakkude suhtelise osakaalu rakupopulatsioonis 48 tundi pärast transfektsiooni. Selgus, et onkogeenide üleekspressioon indutseerib apoptoosi ebaefektiivselt, vaatamata funktsionaalsele p53 valgule olemasolule ARF-defektsetes rakkudes (joonis 8 D, G, J). Kui aga koekspressseerida onkogeene koos ARF-ga (joonis 8 E, H, K), indutseerub tugev apoptootiline vastus, mida inhibeerib efektiivselt ATM/ATR kinaaside inhibiitor wortmannin (joonis 8 F, I, L). Seega on apoptoosi efektiivseks indutseerumiseks vajalikud nii ARF-i kõrgeenenud ekspressioon kui ka ATM/ATR kinaaside signaalirada.



värvumise intensiivsus

Joonis 8. ARF-i ekspressioon ja DNA kahjustuse signaaliraja aktiveerumine töötavad koos efektiivse apoptoosi indutseerimises. ARF-defektseid MEF-e inkubeeriti 1,5 μ M wortmanniniga (A) või transfekteeriti kontrollplasmiidiga pIRES2-EGFP (B), ARF-ga (C), onkogeenidega c-myc (D), c-myc ja ARF-ga (E), c-myc ja ARF inkubeeritud wortmanniniga (F), β -kateniiniga (G), β -kateniini ja ARF-ga (H), β -kateniin ja ARF inkubeeritud wortmanniniga (I), HPV-18 E7-ga (J), HPV-18 E7 ja ARF-ga (K), HPV-18 E7 ja ARF inkubeeritud wortmanniniga (L). Rakke värviti 48h pärast transfektsiooni annexin V-ga ning analüüsiti läbivoolu tsütomeetriga. Histogrammidel olev protsent tähistab apoptootiliste rakkude suhtelist proportsiooni kogu rakupopulatsiooni kohta. Näitena on apoptootilised rakud tähistatud esimesel histogrammil M-ga.

Samuti analüüsisin apoptoosi induktsiooni p53-defektsetes rakkudes, et uurida, kas ARF ja PI3K-tüüpi kinaaside aktiiveerumisest tingitud apoptoosi induktsioonis mängib rolli p53. Onkogeenide üleekspressioon p53-deletsiooniga rakkudes ei põhjustanud efektiivset apoptootilist vastust (joonis 9 D, G, J), samuti ei indutseerunud apoptoos ARF-i üleekspressiooni korral (joonis 9 C). Lisaks eelnevale ei käivitanud p53-e puudumise korral efektiivset apoptootilist vastust onkogeenide koekspressioon koos ARF-ga (joonis 9 E, H, K). Onkogeen-ARF-ga kotransfekteeritud rakkude apoptoosi induktsiooni ei mõjutanud märkimisväärselt ka rakkude inkubeerimine wortmanniniga (joonis 9 F, I, L). Nende tulemuste põhjal võib väita, et tuumorsupressor p53-e staatus on keskse tähtsusega ARF ja ATM/ATR kinaaside poolt vahendatud rakkude efektiivses elimineerimises onkogeense stressi tingimustes.

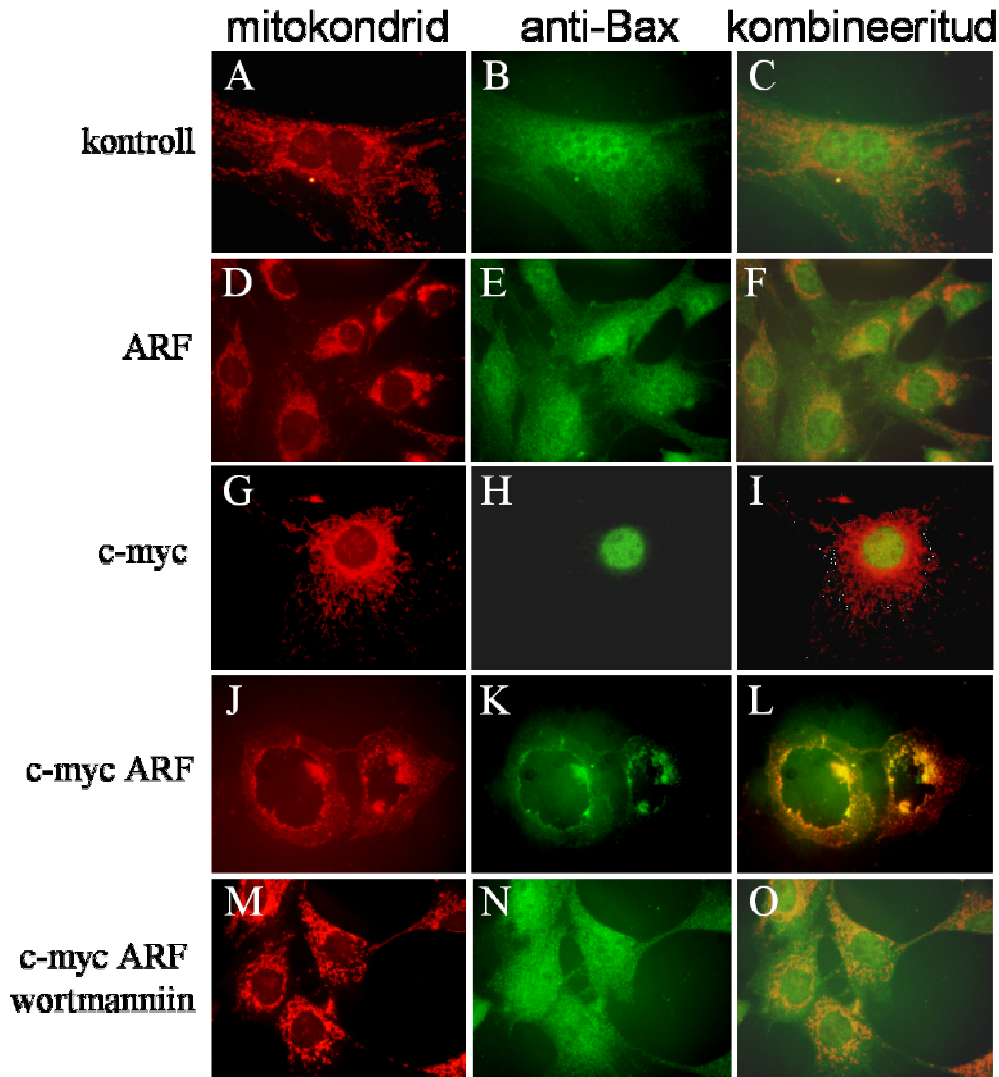


värvumise intensiivsus

Joonis 9. Efektiivne apoptoosi indutseerimine ARF-i ekspressiooni ja DNA kahjustuse signaaliraja aktiveerumisel sõltub suurel määral p53 staatusest. p53^{-/-} MEF-e inkubeeriti 1,5 μ M wortmanniniga (A) või transfekteeriti kontrollplasmiidiga pIRES2-EGFP (B), ARF-ga (C), onkogeenidega c-myc (D), c-myc ja ARF-ga (E), c-myc ja ARF inkubeeritud wortmanniniga (F), β -kateniiniga (G), β -kateniini ja ARF-ga (H), β -kateniin ja ARF inkubeeritud wortmanniniga (I), HPV-18 E7-ga (J), HPV-18 E7 ja ARF-ga (K), HPV-18 E7 ja ARF inkubeeritud wortmanniniga (L). Rakke värviti 48h pärast transfektsiooni annexin V-ga ning analüüsiti läbivoolu tsütomeetriga. Histogrammidel olev protsent tähistab apoptootiliste rakkude suhtelist proportsiooni kogu rakupopulatsiooni kohta. Näitena on apoptootilised rakud tähistatud esimesel histogrammil M-ga.

Onkogeenide ja ARF koekspressioon põhjustas p53-sõltuva transkriptsiooni aktiveerumise, kaasaarvatud Bax valgu tugeva induktsiooni, mis on oluline apoptoosi tekitaja (Cory & Adams, 2002, Gross et al., 1999, Martinou & Green, 2001). Seetõttu uurisin endogeense Bax valgu lokaliseerumist immuunofluorestsentsanalüüsiga, eelnevalt transfekteerides ARF-defektseid rakke onkogeenide, ARF ja wortmanniniga.

Kontrolltransfektsioon näitas Bax-i difuusset paiknemist kogu raku ulatuses (joonis 10 A-C). ARF-defektsete MEF-de transfekteerimisel eraldi ARF-i (joonis 10 D-F) või c-myc-ga (joonis 10 G-I) Bax-i lokaliseerumist mitokondritesse ei põhjusta. Kui aga rakkudes koekspresserida c-myc ja ARF, siis toimub Bax-i translokatsioon mitokondritesse (joonis 10 J-L), mida tõestab Bax signaali ja mitokondrite paiknemise ulatuslik kattumine joonisel 10 L. Seevastu c-myc ja ARF kotransfekteeritud rakkude inkubeerimine wortmanniniga näitab Bax-i difuusset paiknemist (joonis 10 M-O), mis tõestab apoptoosi puudumist nendes rakkudes. Sarnased tulemused sain ka β -kateniini ja ARF-i kotransfektsiooni puhul. Nendest katsete tulemustest võib järeldada, et ATM/ATR kinaasid vahendavad onkogeenide üleekspressioonist lähtuvat signaali apoptoosi indutseerumiseks.



Joonis 10. ARF-onkogeeni koekspressioonil on vaja ATM/ATR kinaaside aktiivsust, et toimuks pro-apoptootilise Bax-i translokeerumine mitokondritesse. ARF-defektseid rakke transfekteriti kontrollplasmiidiga pIRES-EGFP (**A-C**), ARF-ga (**D-F**), c-myc onkogeeniga (**G-I**), c-myc ja ARF-ga (**J-L**) ning c-myc ja ARF inkubeeritud wortmanniiniga (**M-O**). Bax-i paiknemist rakus tuvastati immunofluorestsentsiga 24h pärast transfektsiooni. Mitokondrite visualiseerimiseks inkubeeriti rakke 30 minutit 20nM mitotrackeriga enne analüüsi.

4. Arutelu

Apoptoosi indutseerimine on kontrollimatult jagunevate rakkude elimineerimiseks määrava tähtsusega. Üheks keskseks sündmuseks programmeeritud raku surma läbiviimisel on p53 aktivatsioon. p53-sõltuva transkriptsiooni aktiveerumist tema N-terminaalse fosforüleerimise kaudu on seniajani peetud oluliseks ennekõike raku vastuses genotoksilisele stressile, mis võib olla tingitud erinevatest kiirgustest või keemilistest ühenditest. Seevastu onkogeense stressi poolt põhjustatud p53 aktivatsiooni seostatakse p53 positiivse regulaatori ARF ekspressiooni tõusuga rakus. Hiljuti avaldatud tulemused seostavad p53 fosforüleerumist siiski ka onkogeenide c-myc ja E2F1 dereguleeritud ekspressiooniga (Lindstrom & Wiman, 2003, Rogoff et al., 2002). Sellele vaatamata on hüperproliferatiivsest signaalist tingitud p53 fosforüleerumise algne põhjus ning nendes tingimustes raku saatust kujundavad faktorid alles väljaselgitamisel.

Tulemus, et onkogeenide c-myc, HPV-18 E7 ja β -kateniini ekspressioon viib p53 ser18 ATM/ATR kinaasidest sõltuva fosforüleerumiseni, olles samas sõltumatu ARF-i funktsionaalsest staatusest tõstatab küsimuse, millest on tingitud nende kinaaside aktiveerumine? ATM ja ATR kinaaside olulisus kiirgusest või genotoksilistest ühenditest lähtuvas signaali ülekande rajal andis põhjust analüüsida, kas nende kinaaside aktivatsioon onkogeenide üleekspressiooni tingimustes võib olla seotud DNA kahjustustega. DNA kahjustuste hindamiseks kasutasin DNA katkete piirkonnas toimuvat fosforüleeritud histooni H2AX fookuste teket. Immuunofluorestsentsanalüüsist selgus, et hüperproliferatiivne signaal tõesti põhjustab fosforüleeritud H2AX fookuste teket – seega onkogeenide üleekspressioon viib DNA kaksikahelaliste katkete tekkeni. Kuna ATM ja ATR kinaaside inhibeerimine wortmanniiniga fookuste teket ei takistanud, toimub H2AX fosforüleerumine signaalirajas nendest kinaasidest „ülevalpool“ asuvate faktorite poolt. Onkogeensest stressist tingitud DNA katkete tekke põhjusi võib olla mitmeid. Üheks võimaluseks on enneaegselt indutseeritud DNA süntees või replikatsioonikahvlite kollisioon. Sellisel juhul alustatakse ebakorrekse CDK aktivatsiooni tõttu DNA replikatsioon liiga vähestelt replikatsiooni originidelt ning tulemuseks on S-faasi lõppedes mittetäielik kromosoomide geneetilise info kahekordistamine, mis võib viia DNA katkete tekkele. Alternatiivse võimalusena võivad katses nähtud fosforüleeritud H2AX fookused peegeldada homoloogilise

rekombinatsiooni asukohti. Viimast võimalust toetab katse tulemus, kus onkogeenide üleekspressioon põhjustas Rad51 valgu taseme tõusu – valk, mis on tähtis komponent DNA kahjustuste parandamises homoloogilise rekombinatsiooni kaudu. Kuigi Rad51 on vajalik DNA reparatsiooniks, peab tema aktiivsus olema rakus rangelt reguleeritud. Näiteks c-myc dereguleeritud ekspressiooni on seostatud homoloogilise rekombinatsiooni kaudu toimuva DNA kahjustuste parandamise takistamises (Karlsson et al., 2003). Minu Rad51 katse tulemuste põhjal võib oletada, et ka teiste onkogeenide dereguleeritud ekspressioon mõjutab HR-sõltuvat DNA kaksikahelaliste katkete parandamise rada Rad51 kaudu. Seega võib onkogeenide dereguleeritud ekspressioon põhjustada järjestuste ümberkorraldusi kromosoomides kuid samas mõjutada ka DNA reparatsiooni. Selle hüpoteesi kaudseks toetuseks on arvukalt tööd, mis näitavad, et kasvajates esineb äärmiselt palju translokatsioone, deletsioone ning teisi kromosoomide ümberkorraldusi. Inimese onkogeense türosiin kinaasi BCR/ABL kaudu toimub nii Rad51 transkriptsiooni, lagundamise kui ka fosforüleerimise regulatsioon, mida on seostatud rakkude resistentsusega genotoksilistele ühenditele tingituna Rad51 kõrgeks ekspresseeritud (Slupianek et al., 2001). Sellest lähtudes võib ka minu töös ilmsiks tulnud onkogeenide üleekspressioonist tingitud Rad51 induktsioon põhjustada rakkude genotoksilise stressi suuremat taluvust.

Mõnevõrra üllatuslikult näitasid katse tulemused, et sarnaselt onkogeenidele indutseerib ARF Rad51 ekspressiooni, kuid erinevalt onkogeenidest ei põhjusta ARF fosforüleeritud histooni H2AX fookuste teket. ARF võib mõjutada Rad51 ekspressiooni või stabiilsust ning teoreetiliselt osaleda normaalsetes rakkudes kasvusignaalist tingitud replikatsioonivigade poolt põhjustatud DNA kahjustuste parandamises. Seega paljudes kasvajates toimuv ARF-i inaktiveerimine võib sellest teooriast lähtudes põhjustada defektset DNA kahjustuste parandamist ning seetõttu viia mutatsioonide akumulatsioonini. ARF-defektsetes rakkudes võib sellisel juhul spontaanselt tekkida mutatsioone näiteks tuumorsupressor geenides, mis annavad nendele rakkudele selektiivse proliferatiivse eelise, võimaldades klonaalset ekspansiooni ning viies lõpuks kasvaja tekkele.

Analüüsides kasvajates tihti muteerunud tuumorsupressori p53 aktiveerumist vastusena onkogeenide üleekspressioonile selgus, et täielikuks p53-sõltuvaks transkriptsiooniks on vaja nii funktsionaalset ARF-i kui ka ATM/ATR kinaaside aktiivsust. Samuti on vaja ARF-i ja ATM/ATR kinaase hüperproliferatiivsest

signaalist tingitud ulatuslikuks apoptootiliseks vastuseks. Proapoptootilise valguga Bax translokatsioon mitokondrite välismembraani toimub juhul kui PI3K-tüüpi kinaasid on aktiveeritud ning ARF on funktsionaalne. See näitab, et PI3K-tüüpi kinaasid ei vahenda raku surma signaale mitte ainult p53-vahendatud Bax-i ekspressiooni induktsiooni kaudu, vaid ka alternatiivse signaaliraja kaudu. Apoptootilise signaali oluliseks vahelülis näib olevat p53, kuna p53-deletsiooniga rakkudes on onkogeensest stressist tingitud apoptoosi induktsioon tugevalt inhibeerunud. p53 olulisus apoptoosi induktsioonil väljendub eriti selgelt onkogeeni c-myc üleekspressiooni korral, β -kateniini ning HPV-18 E7 transientse ekspressiooni puhul näib lisaks domineerivale p53-vahendatud apoptoosile toimivat ka alternatiivsed rakusurma signaalirajad.

Kuidas võiks ARF ja ATM/ATR kinaasi signaaliradade olulisus apoptoosi indutseerumises väljenduda organismi elu jooksul? ARF osaleb onkogeenide dereguleeritud ekspressioonist tingitud raku vananemises (*senescence*). Lisaks sellele on näidatud, et *in vitro* tingimustes on tütarakkudes ARF valguga kogused kõrgemad kui nende vanemrakus, seega toimub järgnevas raku põlvkonnades ARF-i akumulatsioon. Seda nähtust seostatakse teatud kasvufaktorite ja toitainete suboptimaalsete koguste või nende faktorite omavahelise ebakorrektsuse suhteliste kogustega. Kuigi *in vivo* andmed ARF-i akumulatsiooniga raku põlvkonnades puuduvad, võib vananevas organismis esineda sarnane olukord. Samas on organismi rakkude genoom pidevalt ohustatud nii raku enese metabolismi käigus tekkivate vabade radikaalide, onkogeenide ekspressiooni kui ka väliskeskkonnast lähtuvate kiirguste poolt, mille tulemusena aktiveeruvad ATM ja ATR. Kui rakk on läbinud piisavalt palju jagunemisi, võib organismis teoreetiliselt tekkida olukord, kus ARF-i kogused on raku kõrge ja spontaanselt DNA kahjustusest tingitud on aegajalt aktiivsed ka ATM/ATR kinaasid. Minu töö tulemustest lähtudes on sellisel hetkel suur tõenäosus, et rakk indutseerib apoptoosi. Seega et vältida rakusurma, tuleb inaktiveerida üks kahest – kas tuumorsupressor ARF või ATM/ATR kinaaside signaalirada, näiteks viimaste märklaud p53. Statistika lähtudes on umbes 50% inimese kasvajatel p53 muteerunud ning mutatsioonisageduselt (kaasaarvatud promotori metüleerimine, deletsioonid, punktmutatsioonid) teisel kohal (~36%) on tuumorsupressor ARF. Samas on nii ARF-i kui p53 üheaegsed mutatsioonid kasvajatel suhteliselt haruldased, mis toetab tugevalt minu töö tulemust, et kasvaja

tekkeks on apoptoosi blokeerumise seisukohalt hädavajalik kas ARF-i või PI3K-tüüpi kinaaside signaaliraja inaktiveerimine.

Kokkuvõte

Rakulise saatuse määramisel on oluline roll tuumorsupressor geenidel ARF ja p53 kui ka PI3K-tüüpi kinaasidel. P53 kui oluline rakusurma vahendaja indutseeritakse paljude stressitingimuste korral, kaasaarvatud onkogeenide kontrollimatu aktivatsiooni ja DNA kahjustuse puhul. Käesolevas töös uuriti onkogeenide dereguleeritud ekspressioonist tingitud rakulise vastuse kujunemist ning selles protsessis olulist rolli mängivaid faktoreid.

Töö tulemused on kokkuvõtlikult järgmised:

1. Onkogeenne stress põhjustab ATM/ATR kinaaside aktivatsiooni DNA kahjustuste tekke kaudu.
2. Onkogeenide üleekspressioon rakus viib homoloogilises rekombinatsioonis osaleva Rad51 valguga koguste tõusule.
3. Hüperproliferatiivsest signaalist tingitud efektiivseks apoptootiliseks vastuseks on vaja nii tuumorsupressor ARF-i kui ka PI3K-tüüpi kinaase.
4. ARF ja PI3K-tüüpi kinaasid koopereeruvad onkogeensest stressist tingitud p53-sõltuvas transkriptsiooni aktivatsioonis ning pro-apoptootilise valguga Bax translokatsioonis mitokondrite välismembraani. ARF ja ATM/ATR kinaasidest tingitud apoptoosis mängib olulist rolli tuumorsupressor p53.

Summary

Tumorsuppressors p53 and ARF as well as PI3K-related kinases are important factors in determining the cell fate. P53, a pivotal player in cell death is induced upon many cellular stresses which include hyperproliferative signals and DNA damage.

The aim of this work was to investigate the effects of oncogenic stress on mammalian cells and to analyse cellular factors that are crucial for apoptosis induction in response to hyperproliferative stimuli.

The results of my work are:

1. Oncogenic stress activates ATM/ATR kinases via causing DNA damage.
2. Overexpression of oncogenes leads to the upregulation of Rad51 – the central factor of homologous recombination-mediated DNA repair.
3. The effective induction of apoptosis triggered by hyperproliferative stimuli is dependent on both ARF and PI3K-related kinases.
4. ARF and PI3K-related kinases cooperate in the induction of p53-dependent transcription and the translocation of pro-apoptotic Bax to mitochondria. Apoptotic responses caused by ARF and ATM/ATR kinases depend largely on tumorsuppressor p53.

Kasutatud kirjandus

- Abraham R T.** (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, 15, 2177-96.
- Acehan D, Jiang X, Morgan D G, Heuser J E, Wang X and Akey C W.** (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, 9, 423-32.
- Amati B.** (2001). Integrating Myc and TGF-beta signalling in cell-cycle control. *Nat Cell Biol*, 3, E112-3.
- Andegeko Y, Moyal L, Mittelman L, Tsarfaty I, Shiloh Y and Rotman G.** (2001). Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *J Biol Chem*, 276, 38224-30.
- Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B and Martinou J C.** (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem*, 276, 11615-23.
- Appella E and Anderson C W.** (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*, 268, 2764-72.
- Avantaggiati M L, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine A S and Kelly K.** (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell*, 89, 1175-84.
- Baek S H, Kioussi C, Briata P, Wang D, Nguyen H D, Ohgi K A, Glass C K, Wynshaw-Boris A, Rose D W and Rosenfeld M G.** (2003). Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3245-50.
- Bakkenist C J and Kastan M B.** (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421, 499-506.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson C W, Chessa L, Smorodinsky N I, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y and Ziv Y.** (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281, 1674-7.
- Bates S, Phillips A C, Clark P A, Stott F, Peters G, Ludwig R L and Vousden K H.** (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53 [letter]. *Nature*, 395, 124-5.
- Benchimol S, Lamb P, Crawford L, Sheer D, Shows T, Bruns G and Peacock J.** (1985). Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet*, 11, 505-10.
- Ben-Ze'ev A and Geiger B.** (1998). Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 10, 629-39.
- Bouchard C, Dittrich O, Kiermaier A, Dohmann K, Menkel A, Eilers M and Luscher B.** (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev*, 15, 2042-7.
- Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hyde J, Ansorge W, Reed S, Sicinski P, Bartek J and Eilers M.** (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J*, 18, 5321-33.
- Brabletz T, Jung A and Kirchner T.** (2002). Beta-catenin and the morphogenesis of colorectal cancer. *Virchows Arch*, 441, 1-11.

- Caelles C, Helmberg A and Karin M.** (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes *Nature*, 370, 220-3.
- Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U and George D L.** (1987). Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet*, 13, 235-44.
- Campisi J, Kim S H, Lim C S and Rubio M.** (2001). Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp Gerontol*, 36, 1619-37.
- Celeste A, Petersen S, Romanienko P J, Fernandez-Capetillo O, Chen H T, Sedelnikova O A, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio M J, Redon C, Pilch D R, Oлару A, Eckhaus M, Camerini-Otero R D, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner W M, Nussenzweig M C and Nussenzweig A.** (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, 296, 922-7.
- Chakrabarti O and Krishna S.** (2003). Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. *J Biosci*, 28, 337-48.
- Chang C, Simmons D T, Martin M A and Mora P T.** (1979). Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. *J Virol*, 31, 463-71.
- Chehab N H, Malikzay A, Appel M and Halazonetis T D.** (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev*, 14, 278-88.
- Chen J, Marechal V and Levine A.** (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 4107-14.
- Chene P.** (2001). The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene*, 20, 2611-7.
- Cheng E H, Kirsch D G, Clem R J, Ravi R, Kastan M B, Bedi A, Ueno K and Hardwick J M.** (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*, 278, 1966-8.
- Chittenden T, Flemington C, Houghton A B, Ebb R G, Gallo G J, Elangovan B, Chinnadurai G and Lutz R J.** (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *Embo J*, 14, 5589-96.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey P D and Pavletich N P.** (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, 265, 346-55.
- Clevers H and van de Wetering M.** (1997). TCF/LEF factor earn their wings. *Trends Genet*, 13, 485-9.
- Cory S and Adams J M.** (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2, 647-56.
- Daboussi F, Dumay A, Delacote F and Lopez B S.** (2002). DNA double-strand break repair signalling: the case of RAD51 post-translational regulation. *Cell Signal*, 14, 969-75.
- d'Adda di Fagagna F, Reaper P M, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter N P and Jackson S P.** (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426, 194-8.
- Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I, Shtutman M, Leal J F, Zhurinsky J, Geiger B and Oren M.** (1999). Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *Embo J*, 18, 3054-63.

- DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L and Nevins J R.** (1997). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7245-50.
- Dobbelstein M, Wienzek S, Konig C and Roth J.** (1999). Inactivation of the p53-homologue p73 by the mdm2-oncoprotein. *Oncogene*, 18, 2101-6.
- Donehower L A, Harvey M, Slagle B L, McArthur M J, Montgomery C A J, Butel J S and Bradley A.** (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356, 215-21.
- Dumaz N and Meek D W.** (1999). Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *Embo J*, 18, 7002-10.
- Dyson N.** (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, 12, 2245-62.
- Eischen C M, Roussel M F, Korsmeyer S J and Cleveland J L.** (2001). Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis. *Mol Cell Biol*, 21, 7653-62.
- Eischen C M, Weber J D, Roussel M F, Sherr C J and Cleveland J L.** (1999). Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in myc-induced lymphomagenesis [In Process Citation]. *Genes Dev*, 13, 2658-69.
- El-Deiry W S, Kern S E, Pietenpol J A, Kinzler K W and Vogelstein B.** (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.*, 1, 45-9.
- Elenbaas B, Dobbelstein M, Roth J, Shenk T and Levine A J.** (1996). The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Mol Med*, 2, 439-51.
- Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado M A, Baylin S B and Herman J G.** (2000). Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res*, 60, 129-33.
- Fakharzadeh S S, Trusko S P and George D L.** (1991). Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *Embo J*, 10, 1565-9.
- Fanidi A, Harrington E A and Evan G I.** (1992). Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature*, 359, 554-6.
- Fei P, Bernhard E J and El-Deiry W S.** (2002). Tissue-specific induction of p53 targets in vivo. *Cancer Res*, 62, 7316-27.
- Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M and Nussenzweig A.** (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)*, 3, 959-67.
- Fields S and Jang S K.** (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, 249, 1046-9.
- Finzer P, Aguilar-Lemarroy A and Rosl F.** (2002). The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Lett*, 188, 15-24.
- Ford J and Hanawalt P.** (1997). Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 272, 28073-80.
- Freedman D A and Levine A J.** (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Molecular And Cellular Biology*, 18, 7288-93.
- Funk J O, Waga S, Harry J B, Espling E, Stillman B and Galloway D A.** (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is

- blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*, 11, 2090-100.
- Furlong E, Rein T and Martin F.** (1996). YY1 and NF1 both activate the human p53 promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify p53 promoter activity. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 5933-45.
- Furuta T, Takemura H, Liao Z Y, Aune G J, Redon C, Sedelnikova O A, Pilch D R, Rogakou E P, Celeste A, Chen H T, Nussenzweig A, Aladjem M I, Bonner W M and Pommier Y.** (2003). Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem*, 278, 20303-12.
- Gartel A L, Ye X, Goufman E, Shianov P, Hay N, Najmabadi F and Tyner A L.** (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4510-5.
- Gross A, Yin X M, Wang K, Wei M C, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Korsmeyer S J.** (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem*, 274, 1156-63.
- Gu W and Roeder R G.** (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, 90, 595-606.
- Haldar S, Jena N and Croce C M.** (1995). Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4507-11.
- Hale T K, Myers C, Maitra R, Kolzau T, Nishizawa M and Braithwaite A W.** (2000). Maf transcriptionally activates the mouse p53 promoter and causes a p53-dependent cell death. *J Biol Chem*, 275, 17991-9.
- Haupt Y, Rowan S, Shaulian E, Kazaz A, Vousden K and Oren M.** (1997). p53 mediated apoptosis in HeLa cells: transcription dependent and independent mechanisms. *Leukemia*, 11 Suppl 3, 337-9.
- He T C, Sparks A B, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa L T, Morin P J, Vogelstein B and Kinzler K W.** (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281, 1509-12.
- Hekmat-Nejad M, You Z, Yee M C, Newport J W and Cimprich K A.** (2000). Xenopus ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint. *Curr Biol*, 10, 1565-73.
- Hellin A, Calmant P, Gielen J, Bours V and Merville M.** (1998). Nuclear factor -kappaB-dependent regulation of p53 gene expression induced by daunomycin genotoxic drug. *Oncogene*, 16, 1187-95.
- Henning W and Sturzbecher H W.** (2003). Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. *Toxicology*, 193, 91-109.
- Honda R and Yasuda H.** (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo J*, 18, 22-7.
- Honda R, Tanaka H and Yasuda H.** (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*, 420, 25-7.
- Hsiang Y H, Hertzberg R, Hecht S and Liu L F.** (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, 260, 14873-8.

- Hsieh J K, Chan F S, O'Connor D J, Mittnacht S, Zhong S and Lu X.** (1999). RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell*, 3, 181-93.
- Huang P S, Patrick D R, Edwards G, Goodhart P J, Huber H E, Miles L, Garsky V M, Oliff A and Heimbrook D C.** (1993). Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol Cell Biol*, 13, 953-60.
- Hunter J J and Parslow T G.** (1996). A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis. *J Biol Chem*, 271, 8521-4.
- Hupp T R, Meek D W, Midgley C A and Lane D P.** (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell*, 71, 875-86.
- Isobe M, Emanuel B, Givol D, Oren M and Croce C.** (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, 320, 84-5.
- Itahana K, Bhat K P, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R and Zhang Y.** (2003). Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell*, 12, 1151-64.
- Jenkins J, Chumakov P, Addison C, Stürzbecher H and Wade-Evans A.** (1988). Two distinct regions of the murine p53 primary amino acid sequence are implicated in stable complex formation with simian virus 40 T antigen. *J. Virol.*, 62, 3903-6.
- Johnson R A, Ince T A and Scotto K W.** (2001). Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element. *J Biol Chem*, 276, 27716-20.
- Jones S N, Roe A E, Donehower L A and Bradley A.** (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature*, 378, 206-8.
- Kamijo T, Bodner S, van de Kamp E, Randle D H and Sherr C J.** (1999). Tumor spectrum in ARF-deficient mice. *Cancer Res*, 59, 2217-22.
- Kamijo T, Zindy F, Roussel M F, Quelle D E, Downing J R, Ashmun R A, Grosveld G and Sherr C J.** (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, 91, 649-59.
- Kanaya T, Kyo S, Hamada K, Takakura M, Kitagawa Y, Harada H and Inoue M.** (2000). Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res*, 6, 1239-47.
- Karlsson A, Deb-Basu D, Cherry A, Turner S, Ford J and Felsher D W.** (2003). Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9974-9.
- Kastan M B and Bartek J.** (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432, 316-23.
- Kastan M B, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B and Craig R W.** (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, 51, 6304-11.
- Kataoka A, Nishida T, Sugiyama T, Hori K, Honda S and Yakushiji M.** (1997). Squamous cell carcinoma of the endometrium with human papillomavirus type 31 and without tumor suppressor gene p53 mutation. *Gynecol Oncol*, 65, 180-4.
- Kemler R and Ozawa M.** (1989). Uvomorulin-catenin complex: cytoplasmic anchorage of a Ca²⁺-dependent cell adhesion molecule. *Bioessays*, 11, 88-91.
- Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y and Shkedy D.** (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 14973-7.

- Kitao H and Yuan Z M.** (2002). Regulation of ionizing radiation-induced Rad52 nuclear foci formation by c-Abl-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*, 277, 48944-8.
- Ko L J and Prives C.** (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes & Dev.*, 10, 1054-72.
- Koumenis C, Alarcon R, Hammond E, Sutphin P, Hoffman W, Murphy M, Derr J, Taya Y, Lowe S W, Kastan M and Giaccia A.** (2001). Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol*, 21, 1297-310.
- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler M J, Fenton W and Reed J C.** (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*, 53, 4701-14.
- Krause K, Haugwitz U, Wasner M, Wiedmann M, Mossner J and Engeland K.** (2001). Expression of the cell cycle phosphatase cdc25C is down-regulated by the tumor suppressor protein p53 but not by p73. *Biochem Biophys Res Commun*, 284, 743-50.
- Kress M, May E, Cassingena R and May P.** (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol*, 31, 472-83.
- Kubbutat M H and Vousden K H.** (1997). Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 460-8.
- Lee K C, Crowe A J and Barton M C.** (1999). p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression by specific DNA binding. *Mol Cell Biol*, 19, 1279-88.
- Levine A.** (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88, 323-31.
- Leverro M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang J Y and Melino G.** (2000). The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci*, 113, 1661-70.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula S M, Ahmad M, Alnemri E S and Wang X.** (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91, 479-89.
- Lill N L, Grossman S R, Ginsberg D, DeCaprio J and Livingston D M.** (1997). Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature*, 387, 823-7.
- Lin W C, Lin F T and Nevins J R.** (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev*, 15, 1833-44.
- Lindstrom M S and Wiman K G.** (2003). Myc and E2F1 induce p53 through p14ARF-independent mechanisms in human fibroblasts. *Oncogene*, 22, 4993-5005.
- Lindstrom M S, Klangby U and Wiman K G.** (2001). p14ARF homozygous deletion or MDM2 overexpression in Burkitt lymphoma lines carrying wild type p53. *Oncogene*, 20, 2171-7.
- Linke S, Clarkin K, Di Leonardo A, Tsou A and Wahl G.** (1996). A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes & Dev.*, 10, 934-47.
- Liotta L A and Kohn E C.** (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411, 375-9.

- Liu X, Kim C N, Yang J, Jemmerson R and Wang X.** (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, 147-57.
- Lowe S W and Sherr C J.** (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev*, 13, 77-83.
- Lu H and Levine A J.** (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5154-8.
- Luscher B and Larsson L G.** (1999). The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. *Oncogene*, 18, 2955-66.
- Mahadevaiah S K, Turner J M, Baudat F, Rogakou E P, de Boer P, Blanco-Rodriguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner W M and Burgoyne P S.** (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet*, 27, 271-6.
- Maki C, Huibregtse J and Howley P.** (1996). In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res.*, 56, 2649-54.
- Mariadason J M, Bordonaro M, Aslam F, Shi L, Kuraguchi M, Velcich A and Augenlicht L H.** (2001). Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res*, 61, 3465-71.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin S A, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie Z H, Reed J C and Kroemer G.** (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med*, 187, 1261-71.
- Martin K, Trouche D, Hagemeyer C, Sorensen T S, La Thangue N B and Kouzarides T.** (1995). Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature*, 375, 691-4.
- Martinou J C and Green D R.** (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 63-7.
- Maser R S and DePinho R A.** (2002). Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science*, 297, 565-9.
- Matsuoka M, Kurita M, Sudo H, Mizumoto K, Nishimoto I and Ogata E.** (2003). Multiple domains of the mouse p19ARF tumor suppressor are involved in p53-independent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 301, 1000-10.
- McMahon S B, Wood M A and Cole M D.** (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol*, 20, 556-62.
- Mirza A, Wu Q, Wang L, McClanahan T, Bishop W R, Gheyas F, Ding W, Hutchins B, Hockenberry T, Kirschmeier P, Greene J R and Liu S.** (2003). Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression. *Oncogene*, 22, 3645-54.
- Miyashita T and Reed J C.** (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80, 293-9.
- Momand J, Zambetti G P, Olson D C, George D and Levine A J.** (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69, 1237-45.
- Morrison C, Sonoda E, Takao N, Shinohara A, Yamamoto K and Takeda S.** (2000). The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *Embo J*, 19, 463-71.
- Muller H, Bracken A P, Vernell R, Moroni M C, Christians F, Grassilli E, Prosperini E, Vigo E, Oliner J D and Helin K.** (2001). E2Fs regulate the

- expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev*, 15, 267-85.
- Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W and Grosse F.** (1996). p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell*, 85, 1089-99.
- Munger K.** (1995). The molecular biology of cervical cancer. *J Cell Biochem Suppl*, 23, 55-60.
- Murphy M, Hinman A and Levine A J.** (1996). Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein. *Genes & Dev*, 10, 2971-80.
- Murphy M, Ahn J, Walker K K, Hoffman W H, Evans R M, Levine A J and George D L.** (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a [In Process Citation]. *Genes Dev*, 13, 2490-501.
- Nakagawa K, Taya Y, Tamai K and Yamaizumi M.** (1999). Requirement of ATM in phosphorylation of the human p53 protein at serine 15 following DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 19, 2828-34.
- Ng F W, Nguyen M, Kwan T, Branton P E, Nicholson D W, Cromlish J A and Shore G C.** (1997). p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 139, 327-38.
- O'Connell B C, Cheung A F, Simkevich C P, Tam W, Ren X, Mateyak M K and Sedivy J M.** (2003). A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J Biol Chem*, 278, 12563-73.
- Okorokov A L, Ponchel F and Milner J.** (1997). Induced N- and C-terminal cleavage of p53: a core fragment of p53, generated by interaction with damaged DNA, promotes cleavage of the N-terminus of full-length p53, whereas ssDNA induces C-terminal cleavage of p53. *EMBO J*, 16, 6008-17.
- Oliner J D, Kinzler K W, Meltzer P S, George D L and Vogelstein B.** (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 358, 80-3.
- Oliner J D, Pietenpol J A, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler K W and Vogelstein B.** (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, 362, 857-60.
- Oltvai Z N, Millman C L and Korsmeyer S J.** (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74, 609-19.
- Oren M, Damalas A, Gottlieb T, Michael D, Taplick J, Leal J F, Maya R, Moas M, Seger R, Taya Y and Ben-Ze'ev A.** (2002). Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. *Biochem Pharmacol*, 64, 865-71.
- Palmero I, Pantoja C and Serrano M.** (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*, 395, 125-6.
- Pastink A, Eeken J C and Lohman P H.** (2001). Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. *Mutat Res*, 480-481, 37-50.
- Pelengaris S and Khan M.** (2003). The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys*, 416, 129-36.
- Piette J, Neel H and Marechal V.** (1997). Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene*, 15, 1001-10.
- Pisani P, Bray F and Parkin D M.** (2002). Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer*, 97, 72-81.
- Polakis P.** (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 14, 1837-51.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois N, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee H, Cordon-Cardo C and DePinho R.** (1998).

- The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, 92, 713-23.
- Proud C G.** (2002). Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J Biochem*, 269, 5338-49.
- Quelle D E, Zindy F, Ashmun R A and Sherr C J.** (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*, 83, 993-1000.
- Raman V, Martensen S A, Reisman D, Evron E, Odenwald W F, Jaffee E, Marks J and Sukumar S.** (2000). Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*, 405, 974-8.
- Ramsden D A and Gellert M.** (1998). Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *Embo J*, 17, 609-14.
- Rogakou E P, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y and Bonner W M.** (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem*, 275, 9390-5.
- Rogoff H A, Pickering M T, Debatis M E, Jones S and Kowalik T F.** (2002). E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis. *Mol Cell Biol*, 22, 5308-18.
- Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B and Borner C.** (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 391, 496-9.
- Roth J, Dobbstein M, Freedman D A, Shenk T and Levine A J.** (1998). Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *Embo J*, 17, 554-64.
- Roy B, Beamon J, Balint E and Reisman D.** (1994). Transactivation of the human p53 tumor suppressor gene by c-Myc/Max contributes to elevated mutant p53 expression in some tumors. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 7805-15.
- Ruas M and Peters G.** (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*, 1378, F115-77.
- Russell J L, Powers J T, Rounbehler R J, Rogers P M, Conti C J and Johnson D G.** (2002). ARF differentially modulates apoptosis induced by E2F1 and Myc. *Mol Cell Biol*, 22, 1360-8.
- Sadot E, Geiger B, Oren M and Ben-Ze'ev A.** (2001). Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Mol Cell Biol*, 21, 6768-81.
- Sakaguchi K, Saito S, Higashimoto Y, Roy S, Anderson C W and Appella E.** (2000). Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem*, 275, 9278-83.
- Sakaguchi K, Herrera J E, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson C W and Appella E.** (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*, 12, 2831-41.
- Sakamuro D, Sabbatini P, White E and Prendergast G C.** (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, 15, 887-98.
- Salomon D, Sacco P A, Roy S G, Simcha I, Johnson K R, Wheelock M J and Ben-Ze'ev A.** (1997). Regulation of beta-catenin levels and localization by overexpression of plakoglobin and inhibition of the ubiquitin-proteasome system. *J Cell Biol*, 139, 1325-35.

- Samuels-Lev Y, O'Connor D J, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh J K, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T and Lu X.** (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell*, 8, 781-94.
- Santoni-Rugiu E, Falck J, Mailand N, Bartek J and Lukas J.** (2000). Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway. *Mol Cell Biol*, 20, 3497-509.
- Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows R P, Harlan J E, Eberstadt M, Yoon H S, Shuker S B, Chang B S, Minn A J, Thompson C B and Fesik S W.** (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 275, 983-6.
- Serrano M.** (2000). The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 21, 865-9.
- Shangary S, Brown K D, Adamson A W, Edmonson S, Ng B, Pandita T K, Yalowich J, Taccioli G E and Baskaran R.** (2000). Regulation of DNA-dependent protein kinase activity by ionizing radiation-activated abl kinase is an ATM-dependent process. *J Biol Chem*, 275, 30163-8.
- Shaw P, Freeman J, Bovey R and Iggo R.** (1996). Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene*, 12, 921-30.
- Sherr C J.** (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 731-7.
- Sherr C J and Roberts J M.** (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 13, 1501-12.
- Sherr C J and Weber J D.** (2000). The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev*, 10, 94-9.
- Shiloh Y.** (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, 3, 155-68.
- Shimizu S, Narita M and Tsujimoto Y.** (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 399, 483-7.
- Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Nowicki M O, Pierce A J, Fishel R and Skorski T.** (2001). BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell*, 8, 795-806.
- Soussi T, Caron de Fromentel C and May P.** (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene*, 5, 945-52.
- Soussi T, Caron de Fromentel C, Mechali M, May P and Kress M.** (1987). Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene*, 1, 71-8.
- Szymanska K and Hainaut P.** (2003). TP53 and mutations in human cancer. *Acta Biochim Pol*, 50, 231-8.
- Stuart E, Haffner R, Oren M and Gruss P.** (1995). Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. *EMBO J*, 14, 5638-45.
- Sugimoto M, Kuo M L, Roussel M F and Sherr C J.** (2003). Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. *Mol Cell*, 11, 415-24.
- Sun Y, Wenger L, Rutter J L, Brinckerhoff C E and Cheung H S.** (1999). p53 down-regulates human matrix metalloproteinase-1 (Collagenase-1) gene expression. *J Biol Chem*, 274, 11535-40.

- Sung P and Robberson D L.** (1995). DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell*, 82, 453-61.
- Susin S A, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M and Kroemer G.** (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med*, 184, 1331-41.
- Suzuki H, Kurita M, Mizumoto K, Nishimoto I, Ogata E and Matsuoka M.** (2003). p19ARF-induced p53-independent apoptosis largely occurs through BAX. *Biochem Biophys Res Commun*, 312, 1273-7.
- Zeng X, Chen L, Jost C A, Maya R, Keller D, Wang X, Kaelin W G, Jr., Oren M, Chen J and Lu H.** (1999). MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol*, 19, 3257-66.
- Zerfass K, Levy L M, Cremonesi C, Ciccolini F, Jansen-Durr P, Crawford L, Ralston R and Tommasino M.** (1995). Cell cycle-dependent disruption of E2F-p107 complexes by human papillomavirus type 16 E7. *J Gen Virol*, 76 (Pt 7), 1815-20.
- Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich S M, Fields J Z and Boman B M.** (2001). Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res*, 61, 8664-7.
- Zhang Y, Xiong Y and Yarbrough W G.** (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*, 92, 725-34.
- Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman W H, Tom E, Mack D H and Levine A J.** (2000). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev*, 14, 981-93.
- Ziebold U, Lee E Y, Bronson R T and Lees J A.** (2003). E2F3 loss has opposing effects on different pRB-deficient tumors, resulting in suppression of pituitary tumors but metastasis of medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Biol*, 23, 6542-52.
- Zindy F, Eischen C M, Randle D H, Kamijo T, Cleveland J L, Sherr C J and Roussel M F.** (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*, 12, 2424-33.
- Zwerschke W and Jansen-Durr P.** (2000). Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res*, 78, 1-29.
- Zwerschke W, Mazurek S, Massimi P, Banks L, Eigenbrodt E and Jansen-Durr P.** (1999). Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1291-6.
- Takenaka I, Morin F, Seizinger B R and Kley N.** (1995). Regulation of the sequence-specific DNA binding function of p53 by protein kinase C and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 270, 5405-11.
- Tao W and Levine A J.** (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6937-41.
- Tetsu O and McCormick F.** (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398, 422-6.
- Thut C J, Chen J L, Klemm R and Tjian R.** (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*, 267, 100-4.
- Tibbetts R S, Brumbaugh K M, Williams J M, Sarkaria J N, Cliby W A, Shieh S Y, Taya Y, Prives C and Abraham R T.** (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev*, 13, 152-7.

- Tokino T, Thiagalingam S, El-Deiry W S, Waldman T, Kinzler K W and Vogelstein B.** (1994). p53 tagged sites from human genomic DNA. *Hum. Mol. Genet.*, 3, 1537-42.
- Tommasino M, Adamczewski J P, Carlotti F, Barth C F, Manetti R, Contorni M, Cavalieri F, Hunt T and Crawford L.** (1993). HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene*, 8, 195-202.
- Wang X W, Yeh H, Schaeffer L, Roy R, Moncollin V, Egly J M, Wang Z, Freidberg E C, Evans M K, Taffe B G, Bohr V A, Weeda G, Hoeijmakers J H J, Forrester K and Harris C C.** (1995). p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat. Genet.*, 10, 188-95.
- Ward I M and Chen J.** (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, 276, 47759-62.
- Weber J D, Kuo M L, Bothner B, DiGiammarino E L, Kriwacki R W, Roussel M F and Sherr C J.** (2000a). Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. *Mol Cell Biol*, 20, 2517-28.
- Weber J D, Jeffers J R, Rehg J E, Randle D H, Lozano G, Roussel M F, Sherr C J and Zambetti G P.** (2000b). p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev*, 14, 2358-65.
- Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J and Bishop J M.** (1982). Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol*, 42, 773-9.
- Vogelstein B, Lane D and Levine A J.** (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 307-10.
- Wolter K G, Hsu Y T, Smith C L, Nechushtan A, Xi X G and Youle R J.** (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, 139, 1281-92.
- Wu E W, Clemens K E, Heck D V and Munger K.** (1993). The human papillomavirus E7 oncoprotein and the cellular transcription factor E2F bind to separate sites on the retinoblastoma tumor suppressor protein. *J Virol*, 67, 2402-7.
- Wu Y, Mehew J W, Heckman C A, Arcinas M and Boxer L M.** (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene*, 20, 240-51.
- Xiao Z X, Chen J, Levine A J, Modjtahedi N, Xing J, Sellers W R and Livingston D M.** (1995). Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature*, 375, 694-8.
- Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F and Caput D.** (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*, 404, 99-103.
- Yang H, Jeffrey P D, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma N H, Zheng N, Chen P L, Lee W H and Pavletich N P.** (2002). BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science*, 297, 1837-48.
- Yang J, Yu Y, Hamrick H E and Duerksen-Hughes P J.** (2003). ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis*, 24, 1571-80.

Yun J, Chae H D, Choy H E, Chung J, Yoo H S, Han M H and Shin D Y. (1999).
p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y
transcription factor [In Process Citation]. *J Biol Chem*, 274, 29677-82.

Tänuõnad

Tänan oma juhendajaid Viljar Jaksi ja Arnold Kristjuhanit heade nõuannete ja igakülgse abi eest. Tänan ka kõiki teisi rakubioloogia õppetooli inimesi töise ja sõbraliku õhkkonna loomise eest.