

Tartu Ülikool
Bioloogia-geograafia teaduskond
Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut
Rakubioloogia õppetool

Signe Värv

**P19^{ARF}-i mõju p53-e märklaudgeenide transkriptsiooni
aktivatsioonile**

Magistritöö

Juhendajad:
Dina Lepik, *Ph. D*
Toivo Maimets, *Ph. D*

Tartu 2004

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus.....	7
1. Kirjanduse ülevaade	9
1.1. Tuumorsupressor p53-e üldiseloomustus, struktuur ja regulatsioon	9
1.2. P53 märklaudeenide transkriptsiooni regulatsioon	12
1.2.1. P53 märklaudeen p21	13
1.2.2. P53 märklaudeen MDM2.....	14
1.2.3. P53 märklaudeen BAX	14
1.3. P53-e perekond.....	15
1.3.1. P73.....	16
1.3.1.1. P73 aktivatsioon	16
1.4. Tuumorsupressor ARF	18
1.4.1. ARF-i aktiivsuse regulatsioon	19
1.4.1.1. ARF ja pRB-E2F rada	19
1.4.2. ARF-i p53-st sõltuvad funktsioonid.....	21
1.4.3. ARF-i p53-st sõltumatud funktsioonid.....	21
1.4.4. ARF ja DNA kahjustus.....	23
1.5. Rakuline vastus DNA kahjustusele.....	24
1.5.1. Rakutsükli peatamine või apoptoos?.....	25
1.5.2. UV-kiirguse mõju	27
1.5.2.1. P53-e märklaudeenide vastus UV-kiirgusele.....	28
2. Töö eesmärk	31
3. Materjal ja meetodika	32
3.1. Plasmiidid	32
3.2. Rakukultuurid	32
3.3. Transfektsioonimeetodid	33
3.3.1. Elektroporatsioon	33
3.3.2. PEI-transfektsioon	34
3.4. Rakkude indutseerimine UV-kiirgusega.....	35
3.5. Totaalse RNA eraldamine	35
3.6. RPA – <i>Ribonuclease Protection Assay</i>	35
3.7. <i>Northern blot</i>	37
3.8. <i>Western blot</i>	37
3.9. Immuonofluorestsentsanalüüs.....	39
4. Tulemused	40
4.1. Elektroporatsiooni mõju endogeense p53 tasemele ja transkriptsioonilisele aktiivsusele.....	40
4.2. Rakkude ARF-i staatuse mõju DNA kahjustusest sõltuvale p53-e märklaudeenide transkriptsiooni tasemele	43
4.2.1. Ultraviolettkiirguse mõju endogeense p53-e tasemele wt MSF-ides ja ARF-/- MEF-ides	43
4.2.2. Ultraviolettkiirguse mõju p53-e märklaudeenide p21-e, MDM2-e ja BAX-i transkriptsioonitasemele wt MSF-ides, ARF-/- ning p53-/- MEF-ides.....	44

4.3. Eksogeense p19 ^{ARF} -i mõju p53-e märklauageenide transkriptsioonile wt MSF-ides, ARF-/- ja p53 -/- MEF-ides	48
4.4. Endogeense p19 ^{ARF} -i indutseerimine	49
4.5. ARF-i p53-st sõltumatu transkriptsiooni aktivatsiooni mehhanismi uurimine	52
5. Arutelu	53
Transfektsioonimetoodika	53
ARF-i roll p53 märklauageenide regulatsioonis	54
Kokkuvõte	62
<i>Conclusion</i>	63
Kasutatud kirjandus	65
Tänuavaldus	77
LISA 1	78

Kasutatud lühendid

ABL – Abelson'i leukeemia
AIF – *apoptosis inducing factor*
APAF1 – *apoptotic protease activating factor 1*
ARF – *alternative reading frame*
ATM – *ataxia-telangiectasia mutated*
ATR – *ataxia-telangiectasia related*
BAX – *Bcl-2 associated protein X*
BCIP – *5-bromo4-chloro-3-indolyl phoosphate*
BES – *N,N-bis (2-Hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid*
BH3 – kolmas Bcl-2 homologia domeen
bHLH – *basic-helix-loop-helix*
CBP – *CREB binding protein*
Cdk – *cycline-dependent kinase*
cDNA – *complementary DNA*
Chk – *checkpoint kinase*
CMV – tsütomegaloviirus
DAP – *death associated protein*
DNA – desoksüribonukleiinhape
DTT – ditiotreitool
EDTA – dinaatrium etüleendiamiintetra-atsetaat
EGFP – *enhanced green flourescent protein*,
FITC – fluorestseiin-isotiotsüanaat
GADD45 – *growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45*
GAPDH – glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas
HAT – histooni atsetüültransferaas
HIPK2 – homeodomain interacting protein kinase 2
HPV – *human papillomavirus*
IMDM – *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
INK4 – *inhibitor of Cdk4*
kDa – kilodalton
MAPK – *mitogene activated protein kinase*
MCF-7 – *mammary carcinoma female 7*
MDM2 – *mouse double minute 2*
MEF – *mouse embryo fibroblast*
mRNA – *messenger RNA*
MSF – *mouse skin fibroblasts*
Nbs1 – *Nijmegen breakage syndrome gene product 1*
NBT – *nitro blue tetrazodium*
NES – *nuclear export signal*
NF- κ B – *nuclear factor κ B*
NLS – *nuclear localisation signal*
NPM – nukleofosmiin
nt – nukleotiid
p53AIP1 – *p53 apoptosis inducing protein 1*

PAC1 - *phosphatase of activated cells 1*
PBS – *phosphate buffered saline*
PCNA – *proliferating cell nuclear antigen*
PEI – pülüetüleenimiin
PERP – *p53 apoptosis effector related to PMP-22*
PML – *promyelocytic leukemia protein*
Pol – polümeraas
pRb – retinoblasoomi valk
Pu – puriin
PUMA – *p53 upregulated modulator of apoptosis*
PVD – polüvinüülideendifluoriid
Py – pürimidiin
RNA – ribonukleiinhape
RPA – ribonuclease protection assay
rRNA – *ribosomal RNA*
SDS – *sodium dodecyl sulfate*
Ser – seriin
Sp1 – *stimulatory factor 1*
SSC – *saline-sodium citrate*
SV40 – simian virus 40
TBP – *TATA box-binding protein*
TFIIB, D – *transcription factor II B, D*
TGF- β – *transforming growth factor β*
Thr – treoniin
UTR – *untranslated region*
UV – ultraviolet
wt – *wild type*
X-gal – *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside*

Sissejuhatus

Transkriptsioonifaktor, tuumorsupressor p53 on üks keskseid valke raku vastuses genotoksilisele stressile. Läbi transaktivatsiooni- ning transrepressiooniprotsesside suunab p53 rakke apoptoosi, peatab rakutsükli või soodustab DNA parandamist. P53 võib neile protsessidele kaasa aidata ka otseselt, seondudes neis osalevate valkudega. Sel moel genoomi stabiilsust säilitades hoiab p53 ära nii hea- kui halvaloomuliste kasvajate teket.

P53 aktiivsus rakus on reguleeritud erinevatel tasanditel. Normaalses, kahjustamata rakkudes on p53 tase äärmiselt madal tänu valgu aktiivsele lagundamisele. Genotoksilise stressi puhul p53 valk aktiveeritakse post-translatsiooniliste modifikatsioonide läbi ning stabiliseeritakse. P53 stabilisatsiooniprotsessis osaleb tuumorsupressor ARF, mis seondub p53 negatiivse regulaatori MDM2-ga viimast inhibeerides.

Pikka aega peeti ARF-i peamiseks rolliks p53 stabiliseerimist ning tema transkriptsioonilise aktiivsuse toetamist. ARF-i tähtsus p53 vastuses DNA kahjustusele pole siiani päris selge, kuid on andmeid, et ta suurendab genotoksilise stressi puhul p53 vastuse efektiivsust. Nüüdseks on teada, et ARF omab ka p53-st sõltumatu funktsioone – on võimeline peatama rakutsükli ning viimasel ajal on näidatud ka rakkude ARF-sõltuvat, kuid p53-sõltumatut apoptoosumist.

Antud töös uurisin endogeense p19^{ARF}-i rolli p53 märklauddgeenide p21, BAX-i ja MDM2 transkriptsiooni regulatsioonis DNA kahjustuse tingimustes ajalises dünaamikas, samuti p19^{ARF}-i üleekspressiooni mõju p53 märklauddgeenide transkriptsioonile.

Püüdes välja selgitada sobivat transfektsioonimetoodikat, mida kasutada oma katsetes rakuliste protsesside uurimisel, huvitas mind seni meie laboritöös

sageli kasutatava elektroporatsioonimeetodi mõju endogeensele p53-e tasemele ning transkriptsioonilisele aktiivsusele. Saadud tulemused on publitseeritud (LISA 1).

Käesoleva töö kirjanduse osa hõlmab lühikest ülevaadet p53 funktsioonidest ning regulatsioonist rakus, pikemalt peatatakse tuumorsupressor ARF-i rollil rakuliste protsesside reguleerijana. Samuti antakse ülevaade raku vastusest DNA kahjustusele ning p53 märklaudgeenide transkriptsiooni regulatsioonist DNA kahjustuse tingimustes.

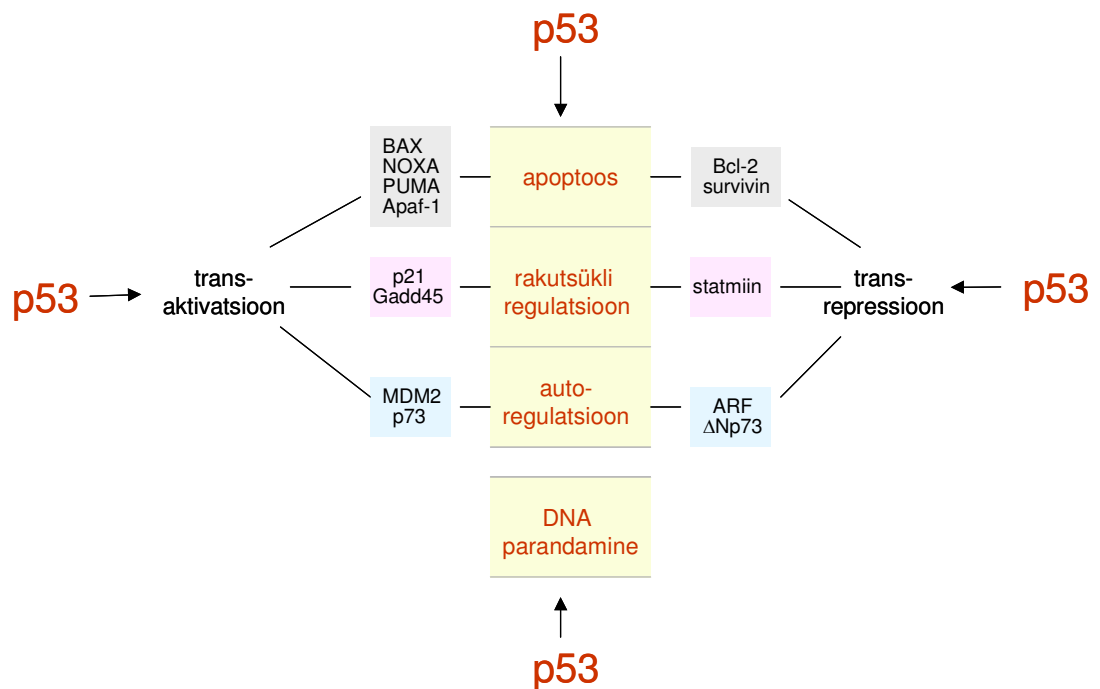
1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Tuumorsupressor p53-e üldiseloostus, struktuur ja regulatsioon

Veerand sajandit tagasi – 1979. aastal – leiti koos SV40 suure T antigeeniga koimmunosadestuv 53 kDa suurune valk, mis sai nimeks p53 (Chang *et al.*, 1979; DeLeo *et al.*, 1979; Kress *et al.*, 1979; Lane & Crawford, 1979). Kuna esialgu kloneeriti p53-e dominant-negatiivse mutandi cDNA ning algused katsed p53 funktsioonide teada saamiseks tehti just sellega, peeti p53 pikka aega ekslikult onkogeeniks, mis põhjustab rakkude transformatsiooni. Nüüdseks ei ole kahtlust, et p53 toimib rakus kui tuumorsupressor, mille mutatsioone esineb ~50 % inimese kasvajatest (Bennett *et al.*, 1992; Hollstein *et al.*, 1991). Tüüpilise järjestusspetsiifilise transkriptsioonifaktorina transaktiveerib ning transrepressioneerib p53 mitmeid rakutsükli reguleerivaid geene vastuseks rakulisele stressile. Sel teel võib p53 olenevalt vajadusest (rakule tekitatud kahjustuse suurusel) peatada rakutsükli, andes rakule võimaluse tekitatud kahjustuse parandamiseks või suunata rakud apoptoosi, kaitstes nõnda genoomi puutumatus. Samas on p53 võimeline ka otseselt, transkriptsiooni modulatsioonist sõltumatult, osalema nii DNA-parandamises kui apoptoosis (joonis 1).

P53-l on kirjeldatud mitmeid funktsionaalseid domeene (joonis 2). Valgu N-terminaalne transaktivatsioonidomeen (ah 1-42) (Fields & Jang, 1990) seondub erinevate transkriptsioonimasiinavärgi komponentidega (sh CBP/p300, TBP) ning ka p53 negatiivse regulaatori MDM2-ga. Transaktivatsioonidomeeni fosforüleerivad erinevad kinaasid (näiteks ATM, ATR) vastuseks rakulisele stressile (DNA kahjustus, hüpoksia, ribonukleosiid trifosfaatide vähesus, onkogeenid). Sellest piirkonnast on leitud ka tuumaekspordisignaali (NES – ah 11-27) (Zhang & Xiong, 2001).

P53 keskne, järjestusspetsiifiline DNA-ga seondumise domeen (ah 102-292) (El-Deiry *et al.*, 1992), on muteerunud 80-90 % p53-e mutatsiooniga kasvajatel (Cariello *et al.*, 1994).

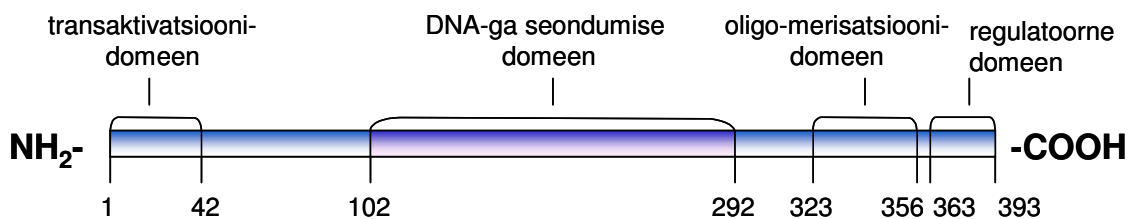


Joonis 1. P53-e erinevad funktsioonid.

Seega on just see osa valgust esmase tähtsusega p53 võime juures hoida ära rakkude transformeerumist. Lisaks järjestusspetsiifilisele soendumisele võib südamikdomeen seonduda DNA-ga mittespetsiifiliselt (Wang *et al.*, 1993) ning on täheldatud ka seondumist üheaheelalise DNA-ga (Bakalkin *et al.*, 1995).

Valgu C-terminuses asub tetramerisatsioonidomeen (ah 323-356), tänu millele tekivad funktsionaalsed p53 homotetrameerid ning lisaks on seal ka regulatoorne domeen (ah 363-393), mis töötab kui negatiivne regulaator, seondudes p53 keskse domeeniga ja inhibeerides sel viisil valgu võimet seonduda märklaud-DNA-ga (Hupp *et al.*, 1992). On näidatud, et C-ots võib seonduda otseselt DNA-ga ja ka sel viisil takistada keskse domeeni tööd (Yakovleva *et al.*, 2001). Karboksüterminus on võimeline ilma järjestusspetsiifikata siduma erinevaid DNA vorme, sh ioniseeriva kiirguse tagajärjel kahjustatud DNA (Reed *et al.*, 1995), üheaheelised DNA otsad (Bakalkin *et al.*, 1995), Holliday ühendused (Lee *et al.*, 1997).

Tetramerisatsioonidomeenis on üks tuumaekspordisignaali. Tetrameeride moodustumisel see varjutatakse ning p53 püsib tuumas (Stommel *et al.*, 1999). C-terminuses asuvad ka kolm tuumalokalisatsioonisignaali (NLS). Kui neist aminotermiinaalseim on muteerunud, sünteesitakse ainult tsütoplasmaatilist p53-e, kui on aga muteerunud kumbki C-terminaalseist NLS-idest, leidub p53-e nii tuumas kui tsütoplasmas (Dang & Lee, 1989; Shaulsky *et al.*, 1991).



Joonis 2. P53-e domeenide skeem. Numbrid joonisel tähistavad aminohappeid.

P53 regulatsioonist transkriptsiooni ja translatsiooni tasemel on üsna vähe teada. Arvatavasti on selle põhjuseks tõik, et p53 valgu taseme tõus stressi tingimustes saavutatakse suuresti tänu post-translatsioonilistele modifikatsioonidele, mitte aga transkriptsiooni aktiveerimisele. Siiski on andmeid, et p53 seondub iseenese mRNA 5'-UTR alaga ning inhibeerib seeläbi mRNA translatsiooni (Mosner *et al.*, 1995).

Normaalsetes, stressivabades rakkudes on p53 tase madal tänu valgu kiirele degradatsioonile MDM2-e ja JNK vahendusel. MDM2, omades E3 ligaasset aktiivsust, suunab p53 ubiquitiin-sõltuvasse proteasoomsesse degradatsiooniratta põhiliselt G₂/M faasis (Fuchs *et al.*, 1998; Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Lisaks seondub MDM2 p53 amino-terminaalse osaga ning blokeerib p53 assotsieerumist basaalse transkriptsioonimasinavärgiga (Haupt *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1993). Ka JNK

seondub p53-ga ning selgi juhul suunatakse p53 ubikvitiinsõltuvasse degradatsiooniratta, seda põhiliselt G₀ faasis (Fuchs *et al.*, 1998). Stressiolukorras fosforüeerib JNK p53-e positsioonis Thr 81, p53-JNK kompleks ei saa moodustuda ning p53 stabiliseerub (Buschmann *et al.*, 2001).

Stressitingimustes p53-e erinevaid aminohappejääke fosforüeeritakse, atsetüleeritakse ning sumoüleeritakse. Lisaks loetletud post-translatsioonilistele modifikatsioonidele p53 ka ribosüleeritakse ning O-glükosüleeritakse. Kõik need modifikatsioonid on enamasti seotud p53 valgu stabiliseerimisega ning tema transkriptsioonilise aktiivsuse suurendamisega. Näiteks p53 C-terminaalse osa atsetüleerimine blokeerib viimase võime seonduda keskse domeeniga ning kõrvaldab seega negatiivse regulatsiooni. Kuna aminohappejäägid, mida MDM2 ubikvitinüleerib, on samad, mida atsetüleeritakse, kaitseb atsetüleerimine p53-e ka degradatsiooni eest (Vousden, 2002). Üks atsetüültransferaasidest, mis osaleb p53-e stabiliseerimises on CBP/p300. P300-l on täheldatud kaheseid funktsioone. Ühest küljest ta stabiliseerib p53-e, samas stabiliseerib ta ka MDM2. Rakkudes, kus p53-e tase on madal ning MDM2 ei indutseerita, osaleb p300 p53-e algses aktivatsioonis ning akumuleerumises vastuseks stressisignaalile. Kui p53 tase on aga piisavalt tõusnud ning indutseeritakse MDM2, muutub p300 p53-e stabiilsuse negatiivseks regulaatoriks stabiliseerides hoopis MDM2 (Kawai *et al.*, 2001).

1.2. P53 märklaudgeenide transkriptsiooni regulatsioon

Inimese genoomis leidub umbes 1500 geeni, mille ekspressioonimustrit p53 mõjutab. ~360-l geenil leidub regulatoorses järjestuses p53 vastuselement (Mirza *et al.*, 2003), teisi geene reguleerib p53 kaudselt (Kannan *et al.*, 2001). Tüüpiline p53 seondumiskoht koosneb kahest 10 aluspaarilisest motiivist (5´ - Pu Pu Pu C (A/T)(T/A) G Py Py Py – 3´), mille vahele võib jääda 0-13 kindlaksmääramata aluspaari (Kern *et al.*, 1991). Samas võib p53 reguleerida ka selliste geenide ekspressiooni, mille järjestuses ei ole kanoonilist p53-e seondumiskohta. Näiteks PIG3 geenis tunneb p53 ära intronis asuva

pentanukleotiidsed mikrosatelliitide järjestused (Contente *et al.*, 2002) ning PAC1 geenid on leitud uude palindroomse p53 seondumiskohta (Yin *et al.*, 2003).

Microarray analüüsil on jagatud p53-märklauddgeenid funktsioonide järgi nelja suurde rühma: 1. rakutsükli regulatsioonis osalevad geenid; 2. apoptoosis ning raku vastuses oksüdatiivsele stressile osalevad geenid; 3. ekstratsellulaarse maatriksi valkude geenid ning neid valke modifitseerivate ensüümide geenid; 4. signaaliülekanne radades oluliste valkude geenid. Ekspressioonikineetika järgi jaotusid p53 märklauddgeenid kaheksasse klassi. P53 ekspresseerimisel rakkudes aktiveeriti viit geeniklassi, represseriti aga kolme. Kiire aktivatsiooniga on näiteks rakutsükli peatamises osalevad geenid p21 ja GADD45. (Zhao *et al.*, 2000). Kiires vastuses rakulisele stressile p53 pigem transaktiveerib märklauddgeene ning tema transrepresserivad omadused avalduvad hilisemas vastuse faasis (Mirza *et al.*, 2003).

1.2.1. P53-e märklauddgeen p21

P21 (kirjanduses ka WAF1/CIP1/Sdi1/CDKN1) on üks esimesena identifitseeritud p53 märklauddgeene (El-Deiry *et al.*, 1993). Tema promootoris on kaks p53 suhtes erineva afiinsusega seondumiskohta (Espinosa & Emerson, 2001). P21 osaleb rakutsükli kontrollis inhibeerides tsükliin-sõltuvaid kinaase (Smits *et al.*, 2000) ning seondub ka PCNA-ga (Cayrol *et al.*, 1998). Mõlema seondumise puhul on tulemuseks rakutsükli peatumine G₁ ja G₂ faasis.

Uurides p21 basaalse promootori arhitektuuri mõju geeni aktivatsioonile pärast UV ning doksorubitsiiniga põhjustatud DNA kahjustust leiti, et osa raku olevast p53-st on p21 promootoriga seotud juba enne DNA kahjustuse teket. Samuti oli samal ajal suur osa H4 histoonidest p53 seondumiskohtadel atsetüleeritud, mis viitab sellele, et p53 osaleb histoon-atsetültransferaaside (HAT) toimetamises oma märklauddgeenide promootoritele juba enne DNA kahjustust (Espinosa *et al.*, 2003).

1.2.2. P53-e märklaugeen MDM2

P53 aktiveerib transkriptsiooni ka oma negatiivse regulaatori MDM2 geenilt (Juven *et al.*, 1993), milles on kaks p53 äratundmiskohta (Zauberman *et al.*, 1995). MDM2 töötab kui ubikviitini ligaas ning on võimeline end autoubikvitinüleerima, kontrollides ka iseenda aktiivsust. MDM2 deletsioon hiirtes põhjustab surma varases looteas (Jones *et al.*, 1995), embrüod arenevad aga normaalselt, kui deleteerida ka p53 (Montes de Oca Luna *et al.*, 1995). MDM2 negatiivseks regulaatoriks on ARF, mis esimesega seondudes paigutab selle ümber tuumakesse, stabiliseerides nõnda p53 karüoplasmas (Tao & Levine, 1999; Weber *et al.*, 1999). Samas on viimasel ajal viidatud sellele, et MDM2 relokaliseerimine ARF-i poolt ei pruugi olla esmase tähtsusega p53 stabiliseerimisel (Llanos *et al.*, 2001).

1.2.3. P53-e märklaugeen BAX

BAX oli esimene p53 märklaugeen, mida seostati apoptoosiga (Miyashita *et al.*, 1994). BAX-i promootoris on enne p53 seondumiskohta Sp1 seondumiskoht. On võimalus, et p53 peab seonduma Sp1-ga, et aktiveerida transkriptsiooni BAX-i promootorilt (Thornborrow & Manfredi, 2001). Teistele promootoritele võib p53xSp1 kompleks toimida aga antagonistlikult (Wang & Beck, 1998).

BAX on Bcl-2 perekonna pro-apoptootiline liige, mis seondub Bcl-2-ga ning inhibeerib viimast. Sama kehtib ka vastupidi (Crompton, 2000). Kahjustamata rakus lokaliseerub BAX tsütoplasmas, kuid pärast induktsiooni liigub ta mitokondri välismembraani ning seondub Bid-ga, mis on samuti Bcl-2 perekonna liige ning p53 poolt reguleeritud. Bid-i seondumine muudab BAX-i konformatsioon, mille tulemusena BAX oligomeriseerub ning siseneb mitokondri välismembraani. Mitokondrist vabanevad tsütokroom C ning AIF (apoptoosi indutseeriv faktor) ja indutseerivad apoptoosi aktiveerides kaspasid kaskaadi (Antonsson *et al.*, 2000; Desagher *et al.*, 1999; Eskes *et al.*, 2000).

BAX-il on ka tuumorsupressorile omaseid funktsioone. Tema inaktiveerimine kiirendab müogeensete rakkude immortaliseerumist, seda ka ilma p53, p16^{INK4a} või p19^{ARF}-i funktsioonide kaotamiseta (Nowak *et al.*, 2004). Umbes 50 % -l käärsoole adenokartsinoomidest on leitud raaminihke mutatsioone BAX-i geenis (Rampino *et al.*, 1997).

P53 on võimeline aktiveerima BAX-sõltuvat apoptoosi raku tsütoplasmas BAX-i promootori transaktivatsioonist sõltumatult. P53 ja BAX-i otsese interakteerumise kohta pole küll andmeid, kuid arvatakse, et p53, olles võimeline seonduma anti-apoptoetiliste Bcl-xL-i ja Bcl-2-ga, vabastab nende kütkest pro-apoptootilisi Bcl-2 perekonna BH3 domeeniga valke, mis aktiveerivad BAX-i (Chipuk *et al.*, 2004).

1.3. P53-e perekond

Inimese genoomis on kaks p53-e homoloogi: p63 ja p73. p53 ning tema perekonnaliikmete võrdlus näitab, et valkude funktsionaalsete domeenide aminohappeline järjestus (DNA-d siduv domeen, N-terminaalne transaktivatsiooni ja C-terminaalne oligomerisatsioonidomeen) on märkimisväärselt sarnane. Erinevalt p53-st esineb homoloogide geenide puhul alternatiivne splaiising, mille tulemusena tekivad erinevat bioloogilist aktiivsust omavad valgud. P63 ja p73 on inimese kasvujärges võrreldes p53-ga harva muteeritud. Nii p63 kui ka p73 on võimelised seonduma kanooniliste DNA seondumiskohtadega ning aktiveerima transkriptsiooni p53-e seondumiskohta sisaldavalt promootoritelt (Kaelin, 1999).

Mõlemat p53-e perekonna liiget on vaja, et toimuks normaalne loote areng. Hiirtel, kellel puudub p63, esineb tõsiseid defekte jäsemete ning epidermise arengus (Mills *et al.*, 1999), p73 deletsioon põhjustab puudusi aju arengus ning põletikuliste protsesside regulatsioonis (Yang *et al.*, 2000). P53 vajab oma sugulaste p63-e ja p73-e abi, et seonduda apoptoosi indutseerivate valkude – BAX, NOXA, PERP - promootoritele ning seeläbi suunata rakud apoptoosi (Flores *et al.*, 2002). P53-e puudumisel võib p73 olla valk, mis võtab p53-e rolli

enda kanda. Näiteks on teada p73 osalus E2F1 poolt indutseeritavas p53-st sõltumatus apoptoosis (Irwin *et al.*, 2000). Hiire p53^{-/-} primaarsetes käärsoole rakkudes kuhjus p73 vastuseks töötlustele tsisplatiiniga ning viis rakke apoptoosi (Oniscu *et al.*, 2004). Kuna ka minu töös võib p73 olla seletuseks p53-st sõltumatutele efektidele, temast pikemalt.

1.3.1. P73

Normaalses rakus leidub vähemalt seitse p73-e splaiss-varianti, mis erinevad üksteisest oma C-otsa pikkuse poolest. Hiljuti leiti lisaks TAp73-le (täispikk transaktiivatsioonidomeeniga p73) ka kärbitud p73 isovorm Δ Np73, millel transaktiivatsioonidomeen puudub. On näidatud, et Δ Np73 omab dominant-negatiivset mõju nii TAp73-le kui ka p53-le blokeerides nende transaktiivatsioonilist aktiivsust. Samas on huvitav fakt, et Δ Np73 promootor on nii p53 kui TAp73 kontrolli all moodustades nõnda negatiivse tagasiside ringi (Melino *et al.*, 2002).

1.3.1.1. P73-e aktivatsioon

P73 ja p53 aktiivsuse regulatsioon on sarnane – mõlemad aktiveeritakse vastuseks DNA kahjustusele, kuid p73 aktivatsioon toimub vastuseks väiksemale hulgale stiimulitele võrreldes p53-ga. Näiteks ei aktiveeri p73-e UV-kiirgus ning ka aktinomütsiin D, mis mõlemad aktiveerivad p53-e (Kaghad *et al.*, 1997).

P73 aktivatsiooniks vastusena DNA kahjustusele ei ole vaja p73 geeni transkriptsioonitaseme tõusu. Ka p73 aktiveeritakse pigem post-translatsiooniliste modifikatsioonide kaudu. Üks kinaasidest, mis p73 fosforüleerib ning sellega teda aktiveerib, on c-ABL. P73-e aktiveerimiseks on vaja c-ABL valgu SH3 domeeni ja p73-e PxxP motiivide seondumist. Lisaks fosforüleerivad P73-e MAPK ning HIPK2. viimane neist kolokaliseerub p73-ga

PML-kehakestes (Melino *et al.*, 2002). P73-e atsetüleerimine p300 poolt C-terminusest on samuti oluline p73-e transkriptsioonilise aktiivsuse regulaator. Näiteks aktiveeritakse vastusena p73-e atsetüleerimisele p53AIP1 (apoptoosi indutseeriv valk) promootor (Costanzo *et al.*, 2002).

P73 aktiveeritakse ka onkogeenide poolt. On näidatud nii E1A kui c-myc signalseerimist p73-le, arvatavasti läbi E2F1 (Zaika *et al.*, 2001). E2F1 reguleerib p73 ekspressiooni otseselt, seondudes p73 promootoralas olevate E2F seondumiskohtadega (Irwin *et al.*, 2000).

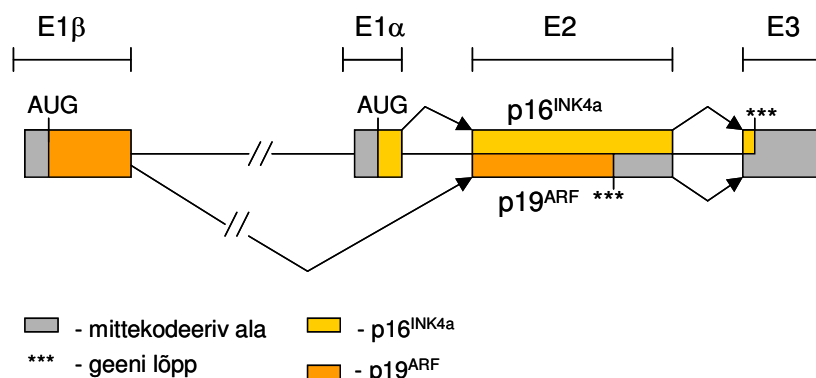
Andmed p73-e ja c-myc-i suhete kohta on vastuolulised. Väidetavalt võib c-myc indutseerida ning aktiveerida p73-e (Zaika *et al.*, 2001), samas on ka andmeid, et otsene interaktsioon p73-e ja c-myc-i vahel inhibeerib p73-e transkriptsioonilist aktiivsust (Watanabe *et al.*, 2002). C-myc-iga seotud valk MM1 seondub p73 C-terminaalse otsaga ning suurendab sel viisil p73 võimet aktiveerida transkriptsiooni näiteks BAX-i geenilt. MDM2 ja p21 promootoritele on MM1 p73-ga seondumise mõju aga vaevu märgatav (Watanabe *et al.*, 2002).

P73 aktiveerib transkriptsiooniliselt mitmeid p53 märklaugeene nagu näiteks MDM2, BAX, PUMA, GADD45, p21 (Levrero *et al.*, 2000), kuid aktiveeritavate geenide loetelu ei kattu täielikult. On mõningaid p53 vastus-geene, mida p73 ei aktiveeri (Zhu *et al.*, 1998) ning ta võib aktiveerida ka säärase geene ekspressiooni, mille promootoralas pole kanoonilist p53-e seondumiskohta (Takagi *et al.*, 2001). Isegi kui p53 ja p73 erinevate isovormide poolt indutseeritav märklaugeenide transkriptsiooni aktivatsioon kattub, võib see erineda kvantitatiivselt (Zhu *et al.*, 1998).

P73 põhjustab apoptoosi läbi PUMA transkriptsioonilise aktivatsiooni, mis omakorda põhjustab BAX-i liikumise mitokondri välismembraani (Melino *et al.*, 2004).

1.4. Tuumorsupressor ARF

Tuumorsupressorvalku ARF kodeeritakse imetajatele ebahariliku geneetilise korraldusega INK4a lookuselt. Lisaks ARF-le kodeerib sama lookus ka teist raku kasvu tõkestavat valku p16^{INK4a}. Valkudel on erinevad esimesed eksonid,



Joonis 3. INK4a lookuse ülesehitus (Quelle et al. 1995 järgi).

mis alternatiivse splaissingu tulemusena liidetakse ühiste järgnevate eksonitega (joonis 3). Aminohappelises järjestuses homoloogia kahel valgul aga puudub, kuna eksonite liitmise tulemusena tekib ARF-i geenis lugemisraami nihe (ARF – **Alternative Reading Frame**) (Quelle et al., 1995). Umbes 40 % vähkkasvajatest on ARF inaktiveeritud promootorala metüleerimise kaudu (Anzola et al., 2004). Närilistes kodeeritav ARF valk on 19 kDa suurune, inimeste sama valk aga veidi väiksem – 14 kDa – ning võrreldes p19^{ARF}-ga, puudub tal 37 aminohappe pikkune C-terminaalne domeen (Stott et al., 1998). Liikidevaheline homoloogia ARF-i geenis on üsna väike. Aminotermiinalsete alade sarnasus hiire ning inimese geeni puhul on 49 % (Bates et al., 1998). Samas ei ole veel täit selgust, mil määral avaldab p14^{ARF} ja p19^{ARF} struktuuriline erinevus mõju valkude funktsioonidele. Nii inimese kui hiire ARF osalevad p53 stabiliseerimises läbi MDM2 inhibeerimise, kuid samas on neil mõlemal ka p53-st sõltumatuid

funktsioone. ARF, retinoblastoomi valk (pRB), p16^{INK4a} ning p53 moodustavad keskse signalisatsioonivõrgustiku, mis kontrollib raku elutegevust ning vastust keskkonnast tingitud stressile (Lowe & Sherr, 2003).

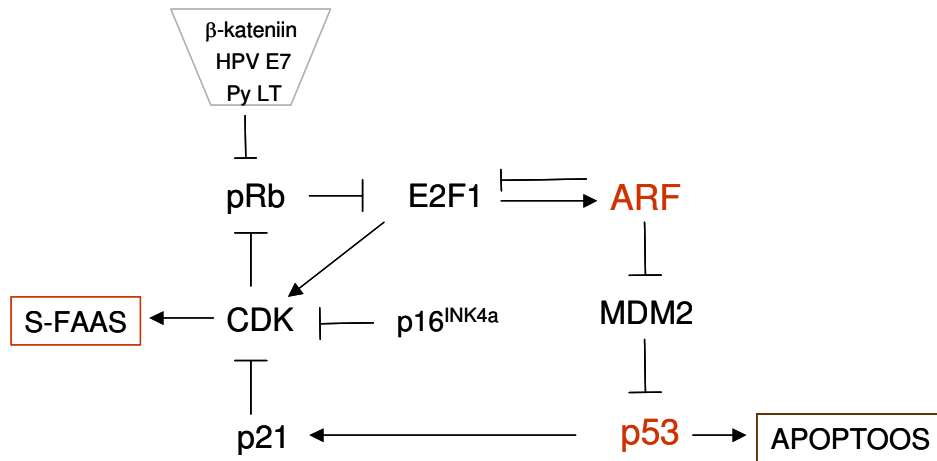
1.4.1. ARF-i aktiivsuse regulatsioon

Konkreetsetest stressisignaalist ning biokeemilistest signaaliradadest, mis määravad *INK4a* – *Arf* ekspressiooni, eriti *in vivo* tingimustes, on veel vähe teada. Lookuse kontrollis osalevad erinevad transkriptsioonifaktorite perekonnad - Jun, Ets ja Id, (Alani *et al.*, 2001; Ohtani *et al.*, 2001; Passegue & Wagner, 2000), lookus on tundlik ekstratsellulaarsete signaalide suhtes ning on negatiivselt reguleeritud kasvufaktorite poolt. Negatiivselt reguleerib lookust pRB – E2F kompleks (Rowland *et al.*, 2002). On leitud ka onkogeene, mis suruvad ARF-i ekspressiooni alla, hoides nõnda ära rakkude apopteerumist. Nendeks on näiteks bHLH valkude perekonda kuuluv *twist* ja *polycomb* valkude gruppi kuuluv *Bmi-1* (Jacobs *et al.*, 1999; Maestro *et al.*, 1999). P53^{-/-} rakkudes on ARF-i ekspressioon suurenenud, kuid see väheneb eksogeense p53 rakkudesse viimisel (Quelle *et al.*, 1995; Stott *et al.*, 1998).

ARF-i transkriptsiooni aktivatsiooni võivad põhjustada erinevad onkogeenid – *Myc*, *E1A*, *Ras*, *v-Abl* ja *β-kateniin* (Damalas *et al.*, 1999; de Stanchina *et al.*, 1998; Palmero *et al.*, 1998; Radfar *et al.*, 1998; Zindy *et al.*, 1998). Kõrgel tasemel *Myc*-i ekspressioon põhjustab MEF-ides apoptoosi, *Ras*-i üleekspressioon aga p53-sõltuvat rakutsükli aresti.

1.4.1.1. ARF ja pRB-E2F rada

ARF-i promootorit reguleerivate E2F transkriptsioonifaktorite perekonna liikmete kontrolli all on mitmete rakku G₁-faasist S-faasi suunavate geenide ekspressioon. Kromatiinil olevate E2F valkudega on füüsiliselt seotud pRB perekonna valgud, mis toovad kohale ka histoonide deatsetülaase ning teisi



Joonis 4. ARF – pRB/E2F1 rada.

DNA-d modelleerivad valke, pärssides nõnda E2F aktiivsust. E2F aktiveerimiseks fosforüleerivad tsükliin D- ja tsükliin E-sõltuvad kinaasid (Cdk-d) pRB-d, mille tulemusena pRB dissotsieerub transkriptsioonifaktoritelt ning viimased indutseerivad reguleeritavate geenide transkriptsiooni sh INK4a/ARF promootorilt. P16^{INK4a} inhibeerib pRB-d fosforüleerivaid tsükliinsõltuvaid kinaase (Bates *et al.*, 1998; Sherr, 2001). ARF vastuseks E2F1 aktivatsioonile aga stabiliseerib p53 olles nõnda ühendavaks lüliks p53 ning pRB radade vahel (joonis 4).

E2F transkriptsioonifaktorite perekonna liige E2F1 indutseerib ARF-i, kuid pole näidatud, et ta seonduks otseselt ARF-i promootorile (Zhu *et al.*, 1999). P19^{ARF} omakorda on võimeline suunama mõningaid E2F perekonna liikmeid, sealhulgas ka E2F1, proteasoomsesse degradatsiooniratta (Martelli *et al.*, 2001). P14^{ARF} puhul on näidatud, et seonduks E2F1-ga inhibeerib ta viimase transkriptsioonilist aktiivsust, kuid vajab selleks MDM2 valku (Eymin *et al.*, 2001).

E2F1 interakteerub p53-ga, mille tulemusena viimane akumuliseerub, kuid ei aktiveeri transkriptsiooni oma märklaudgeenidelt (Nip *et al.*, 2001). ARF-i

seondumine E2F1-ga aitab seega kaasa rakutsükli peatamisele (inhibeerib rakutsükli G₁-faasist S-faasi viivate valkude geenide transkriptsiooni aktivatsiooni) p53-sõltumatult ning soodustab p53 aktiveerimist, sidudes ära viimase aktiivsust inhibeeriva E2F1.

1.4.2. ARF-i p53-st sõltuvad funktsioonid

Normaalsetes tingimustes asub ARF rakkudes tuumakestes (Pomerantz *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 1999). ARF-i osa nähakse onkogeense signaali kandmises p53-le. ARF-i peamiseks funktsiooniks on p53 negatiivse regulaatori MDM2-ga seondumine. Sellega inhibeerib ARF MDM2 E3 ligaasit aktiivsust ning takistab p53-e ubiquitinüleerimist ja sattumist proteasoomsesse degradatsiooniratta (Pomerantz *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Lisaks p53 stabiliseerimisele kannab ARF ka p53 transkriptsioonilist aktiivsust tõstvat signaali. Kuna ARF on võimeline seonduma DNA-l oleva p53-ga, võib näiteks see interaktsioon olla signaaliks mõningatele kinaasidele p53 N-terminaalsete seriinide fosforüleerimiseks ning seeläbi p53-e transkriptsioonilise aktiivsuse suurendamiseks (Kamijo *et al.*, 1998). On näidatud ARF-i võimet seonduda otseselt topoisomeraas I-ga ning ka stimuleerida viimase DNA pingeid vähendavat aktiivsust. Seega võib ARF osaleda ka erinevais topoisomeraas I-te vajavates protsessides (Karayan *et al.*, 2001).

Microarray analüüsil on identifitseeritud mitmeid gene, mille ekspressiooni ARF indutseerib. ARF aktiveerib mitmeid rakutsükli regulatsioonis osalevaid gene, kuid ka selles teadaolevalt mitteosalevaid gene sh proapoptoosilised APAF1 ja Fas; lisaks transkriptsiooni regulatsioonis olulisi gene. ARF-sõltuvalt inhibeeriti raku metabolismis, rRNA protsessimises ning ribosoomide biogeneesis osalevate valkude gene (Kuo *et al.*, 2003).

1.4.3. ARF-i p53-st sõltumatud funktsioonid

Pikka aega peeti ARF-i peamiseks rolliks p53 stabiliseerimist ning tema transkriptsioonilise aktiivsuse toetamist. Viimasel ajal on aga kogunemas üha

rohkem andmeid selle kohta, et ARF omab p53-st sõltumatu funktsioone ning osaleb ka iseseisvalt raku elutsükli kontrollis.

Esmased vihjed sellele, et ARF võib omada ka p53-st sõltumatu funktsioone, tulid töödest *knockout* hiirtega. Ilmnes, et hiirtel, kellel puudusid nii p53, MDM2 kui ka ARF, esines rohkem kasvajaid, kui hiirtel, kellel olid kaotatud vaid p53-e ja MDM2-e funktsioonid, ARF aga oli funktsionaalne. Rakkude transfekterimisel eksogeense p19^{ARF}-ga näidati kaksik*knockout* (p53^{-/-} ja MDM2^{-/-}) rakkudes rakutsükli peatumist G₁ faasis. Arest tekkis aga aeglasemalt kui *wt* rakkudes (Weber *et al.*, 2000). ARF-i üleekspressioon võib ära hoida ka p53^{-/-} MEF proliferatsiooni, kuigi ka sel juhul esineb rakutsükli arest aeglasemalt (Carnero *et al.*, 2000). Näiteks ARF^{-/-} hiired jäävad varsti pärast sündi pimedaks, p53^{-/-} hiirtega seda aga ei juhtu (McKeller *et al.*, 2002). P19^{ARF}-i võime tekitada apoptoosi ning mõjutada rakutsükli p53-st sõltumatult on leidnud kinnitust erinevate autorite poolt (Korgaonkar *et al.*, 2002; Matsuoka *et al.*, 2003; Nakazawa *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003; Tsuji *et al.*, 2002). Täpsed mehhanismid, mille kaudu p19^{ARF} p53-sõltumatult apoptoosi ning rakutsükli mõjutab, on veel teadmata. Küll on näidatud, et p19^{ARF} sõltuv apoptoos võiks käia üle BAX-i induktsiooni (Suzuki *et al.*, 2003) ning et p19^{ARF} osaleb Bcl-2 perekonna valkude regulatsioonis (Nakazawa *et al.*, 2003). P53-sõltumatu apoptoosi indutseerimisel on oluline p19^{ARF} C-terminaalne osa, kuid apoptoosi panustavad ka teised piirkonnad ARF-i valgus (Matsuoka *et al.*, 2003).

p14^{ARF} osalust p53-sõltumatus apoptoosis on näidatud p14^{ARF} üleekspressiooni tingimustes. ARF indutseeris kasutatud süsteemis apoptoosi läbi mitokondriaalse raja, kuid tegi seda BAX-ist sõltumatult (Hemmati *et al.*, 2002). P14^{ARF} võimet indutseerida apoptoosi ning G₂ aresti kinnitab Eymin *et al.* töö (Eymin *et al.*, 2003). Samas on näidatud, et ARF ei ole võimeline tekitama rakutsükli aresti, kui on rikutud p53 signaalsüsteemirada (Weber *et al.*, 2002) ning p14^{ARF} ei tekita apoptoosi p53 puudumisel (Matsuoka *et al.*, 2003). Neile vastuoludele võib olla seletuseks asjaolu, et erinevad grupid on vaadelnud

ARF-i mõju rakutsüklile ning rakkude suremusele erinevatel ajapunktidel ning kas transientse või stabiilse p14^{ARF} ekspressiooni puhul. Nimelt on ARF-i p53-st sõltumatu mõju näha pigem pikemaajalisel – kuni mitu päeva – ekspressioonil (Eymin *et al.*, 2003).

P19^{ARF} ja p14^{ARF} võivad p53-st ning MDM2-st sõltumatult maha suruda antiapoptootilise NF-κB funktsioone, represserides viimase perekonda kuuluva RelA transkriptsiooni aktivatsiooni domeeni. RelA represserimiseks, vajab P14^{ARF} kinaas ATR-i aktiivsust, mis fosforüleerib RelA. Fosforüleerimine soodustab RelA seondumist histoonide deatsetülaasiga, mis otseselt represserib RelA transaktivatsiooni domeeni (Rocha *et al.*, 2003).

1.4.4. ARF ja DNA kahjustus

ARF-i roll DNA kahjustuse tingimustes on veel üsna segane. Pikka aega oldi seisukohal, et p53 akumulereub kahjustuse tingimustes ARF-st sõltumatult (Kamijo *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 1997; Siliciano *et al.*, 1997). Samas on näidatud, et p19^{ARF} suurendab p53-e vastuse efektiivsust ioniseeriva kiirguse poolt põhjustatud DNA kahjustuse korral (Khan *et al.*, 2000) ning eksogeenne p14^{ARF} tõstab kopsuvähi rakkude tundlikkust röntgenkiirgusele (Gao *et al.*, 2001).

On näidatud, et transkriptsioonifaktor E2F1 stabiliseerub vastuseks erinevatele DNA-d kahjustavatele teguritele (Blattner *et al.*, 1999; Hofferer *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1997; Meng *et al.*, 1999). E2F1 aktivatsiooniks on vaja ATM ja ATR kinaase (Lin *et al.*, 2001). E2F1 üleekspressioon aga soodustab apoptoosi läbi ATM ja Chk2 aktivatsiooni, mis viib p53-e fosforüleerimisele vastuseks DNA kahjustusele (Rogoff *et al.*, 2004). On andmeid (avaldamata andmed konverentsilt), et p53-sõltumatu G2 aresti tekitamiseks vajab p14^{ARF} MAPK p42 ja p44, samuti ATM ja ATR ning Chk1 ja Chk2 kinaase. Kuna need kinaasid fosforüleerivad ka p53-e, võib see viidata ARF-i võimele mõjutada vastuseks stressile p53-e post-translatsioonilist modifitseerimist.

P19^{ARF} seondub otseselt nukleofosmiiniga (NPM, kirjanduses ka B23 nime all), mis on väike ribosoomide biogeneesis osalev tuumakese valk. Seondumine toimub ARF-i N-otsa kaudu, mida on vaja ka MDM2-ga seondumiseks. (Bertwistle *et al.*, 2004). P14^{ARF} on võimeline NPM-i degradeerima (Itahana *et al.*, 2003). On näidatud NPM-i osalust rakkude muutumises kasvajalisteks (Derenzini, 2000). Samuti on leitud, et madalate UV dooside puhul (kuni 10 J/m²) seondub NPM p53-ga ning inhibeerib viimase transkriptsioonilist aktiivsust kuni 70 % võrra. NPM seondub p53-e N-terminaalse osaga, kus asub Ser 15, mida fosforüleerib ATR- kinaas vastuseks DNA kahjustusele. Ka NPM on ATR substraadiks ning konkurentsitingimustes fosforüleerib ATR pigem NPM-i kui p53-e vähendades seega p53 vastuse tugevust DNA kahjustusele (Mauguel *et al.*, 2004). Samas töös näidatakse ka NPM-i taseme UV-dooisist sõltuvat tõusu, mis aga korreleerub p21 taseme langusega UV-dooisini 10 J/m². 14 J/m² juures p21 stabiliseeritakse vaatamata NPM-i taseme tõusule. See viitab võimalusele, et NPM on p21 ekspressiooni esmane reguleerija vastuseks genotoksilisele stressile.

Vastusena UV-le (30 J/m²) tõuseb NPM-i mRNA tase 45 - 60 minuti jooksul pärast induktsiooni. Normaalne rakuline tase taastub 12 h pärast. Seega osaleb NPM varases vastuses UV poolt põhjustatud DNA kahjustusele (Wu & Yung, 2002). NPM-i fosforüleerib CDK2/tsükliin E. Viimase ekspressiooni soodustab UV-kiirgus 10 J/m², inhibeerib aga kiirgus tasemel 30 J/m² (Okuda *et al.*, 2000). Reguleerides NPM-i taset (läbi degradatsiooni soodustamise) võib ARF aidata kaasa p53-e fosforüleerimisele ja aktiveerimisele genotoksilise stressi korral.

1.5. Rakuline vastus DNA kahjustusele

DNA kahjustusi põhjustavaid tegureid on mitmeid. Neist levinuimad on ultraviolettkiirgus, ioniseeriv kiirgus, erinevad keemilised ained. DNA kahjustust ning mutatsioone võivad põhjustada ka raku metabolismi produktid. Hapniku radikaalid, mis tekivad O₂ redutseerimisel, ründavad DNA lämmastikaluseid või desoksüriboosi jääke, mille tulemusena tekivad kas kahjustatud aluspaarid või

katked DNA ahelas. Lisaks võivad hapniku radikaalid oksüdeerida lipiide või valgumolekule, tekitades nõnda vaheühendeid, mis reageerivad DNA-ga. Säärase DNA replitseerimine võib viia mutatsioonide kinnistumiseni või ka apoptoosini (Marnett, 2000). DNA kahjustust mimikeerib raku sensormolekulidele näiteks ka DNA replikatsioonist tingitud DNA ahelate katkemine. Vastus DNA kahjustusele käivitub ka rakkude elektroporeerimisel ning kandja-DNA-ga transfekteerimisel. Poratsiooniprotsess ise võib otseselt tekitada katkeid DNA ahelas või ka kaudselt aktiveerida rakusisesid nukleaase, muutes rakusisest ioonset tasakaalu. Kandja-DNA, milles on hulgaliselt katkeid ning vabu DNA otsi, mimikeerib DNA-kahjustust (Lepik *et al.*, 2003).

DNA kahjustuse äratundmine raku poolt on keeruline protsess, milles ATM ja ATR proteiinkinaasidel arvatakse olevat otsustav roll (Shiloh, 2001). γ -kiirguse poolt põhjustatud DNA kaheahelaliste katkete puhul aktiveeritakse ATM kinaas. Kiiritamata rakkudes on see kinaas dimeerina, DNA katke puhul üks monomeeridest fosforüleerib teise ning dimeer dissotsieerub üksikuteks valkudeks, mis on võimelised fosforüleerima teisi valke. Varases DNA kahjustuse staadiumis on nendeks näiteks H2AX ja p53BP1 ning hilisemas faasis Chk2, MDM2, Nbs1 ja Brca1 (Bakkenist & Kastan, 2003; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002).

1.5.1. Rakutsükli peatamine või apoptoos?

Senini pole täit selgust selles, millest täpselt sõltub raku vastus DNA kahjustusele ning millel baseerub otsus rakutsükli peatamiseks, DNA parandamiseks või minekuks apoptoosi. Kindlasti mängivad selles rolli rakutüüp, rakku ümbritsev keskkond ning raku sisemiljöö, näiteks seal ekspresseeruvad onkogeenid (Fridman & Lowe, 2003). Raku vastus DNA kahjustusele sõltub ka konkreetsest kahjustuse tekitajast. Doksorubitsiin põhjustab p53-sõltuvat G1 aresti, tsisplatiin aga mitte. Samas UVC indutseerib p53-sõltumatut G1 aresti (Attardi *et al.*, 2004). On näidatud, et üheks raku

vastust determineerivaks teguriks on DNA kahjustuse ulatus. Töödeldes rakke madalate γ -kiirguse ja tsisplatiini doosidega aktiveerus p53-st sõltuv DNA parandamine, kõrgemate dooside puhul see aga vähenes ning rakud suunati pigem apoptoosi (Offer *et al.*, 2002). Sarnast doosist sõltuvust on näidatud ka UVB-kiirguse puhul (Li & Ho, 1998). P53 märklaudgeenide aktivatsioon ajalises dünaamikas osutus samuti erinevaks. Kiirema ekspressiooniga olid geenid, mille produktid osalevad pigem rakutsükli peatamises kui rakkude viimises apoptoosi (Zhao *et al.*, 2000). Seega võib järeldada, et rakk valib pigem DNA parandamise ehk siis rakutsükli peatamise tee ning kui võimalik, väldib apopteerumist.

Hiljutises artiklis väidetakse, et p53-e vastuse UV-kiirgusele määrab ära p300 (atsetüültransferaas) aktiivsus. (P300 on vaja nii p53 degradatsiooniks MDM2 poolt kui p53 valgu stabiliseerimiseks ning tema transkriptsioonilise aktiivsuse suurendamiseks. P300 seondub p53-e N-terminaalse osaga ning atsetüleerib C-terminuse lüsiine.) Rakkudes, kus p300 puudus, ei aktiveeritud p21 ning üleekspressiooni apoptoosi indutseerivat valku PUMA. Seda seletati p53-e stabiliseerumise, vähenenud atsetüleerimise ning MDM2 aktiivsuse vähenemisega (Gopalakrishna Iyer, 2004).

Transkriptsiooni initsiatsioonikompleksi komponentide võrdlus basaalsel promootoril enne ja pärast stressi tekitamist näitas, et selgi tasemel reguleeritakse p53 märklaudgeenide promootorite aktivatsiooni sõltuvalt stressi tekitajast ning promootori ehitusest. Oli üllatav, et üsna palju basaalse transkriptsioonimasinavärgi komponente seondus promootoralaga juba enne DNA kahjustust ning oli jälgitav dünaamiline muutus transkriptsiooniks vajalike komponentide liikumises pärast DNA kahjustust. Näiteks TBP on DNA-ga seotud ka enne kahjustust ning tema tase stressitingimustes ei muutu, samas TFIID kompleksi ühe liikme, TAFII250, promootorile seondumise tase tõuseb vastuseks UVC-ga kiiritamisele drastiliselt. TFIIB tase aga hoopis langeb. Kui rakkudes indutseeriti DNA kahjustus doksorubitsiiniga, TAFII250 tase ei muutunud, tõusis aga TFIIB valgu hulk promootoralas.

Enne DNA kahjustust on promootoril olemas transkriptsiooni initsiatsioonikompleks, milles esineb ka peatunud RNA Pol II, mis alustab DNA transkribeerimist, kui tõuseb Ser15 fosforüleeritud p53-e, atsetüleeritud histoonide ning TAFII250 tase. Uurides RNA Pol II erinevat afiinsust erinevate p53 märklaudgeenide promootorite suhtes leiti, et ensüümi tase on kõrgem raku kasvuarestis osalevate ja DNA parandamiseks vajalike valkude geenide promootoritel ning madalama afiinsusega on ta seondunud apoptoosis osalevate valkude geenide promootoritele. Kirjeldatud tööga näidati, et promootorite regulatsioonis on põhiline just elongatsiooni tase, kus erinevad transkriptsioonifaktorid reguleerivad RNA Pol II protsessiivsust. Kuna p53 on võimeline seonduma mitmete transkriptsiooni koaktivaatoritega, siis on tõenäoline, et ta reguleerib transkriptsiooni elongatsiooni just sel teel (Espinosa *et al.*, 2003).

1.5.2. UV-kiirguse mõju

UV-kiirguse poolt põhjustatud peamine DNA kahjustuse liik on tsüklobutaan pürimidiini dimeerid, mis esinevad põhiliselt tümiin-tümiin (T=T) dimeeridena. Vähem on leitud tümiin-tsütosiin (T=C) ja tsütosiin-tsütosiin (C=C) dimeere. Lisaks põhjustab UV-kiirgus ka (6-4) fotoproduktide teket (Cooke *et al.*, 2003).

Vastuseks UV-kiirgusele aktiveeritakse enamasti ATR kinaas (Durocher & Jackson, 2001). ATR seondub p53-ga ning fosforüleerib teda *in vitro* (Lakin *et al.*, 1999). P53 taseme tõusu vastuseks UV-kiirgusele näidati juba 1984-l aastal (Maltzman & Czyzyk, 1984). Siis ei pööratud sellele avastusele küll suuremat tähelepanu kuniks leiti, et p53 osaleb DNA kahjustuse poolt põhjustatud rakutsükli arestis (Kastan *et al.*, 1991).

1.5.2.1. P53-e märkladugeenide vastus UV-kiirgusele

DNA kahjustuse poolt indutseeritavaid p53 märkladugeene saab jagada funktsionaalselt erinevatesse klassidesse. Näiteks rakutsükli reguleerivad geenid (p21, GADD45, CDK2), apoptoosiga seotud geenid (BAX; BCL-2, FAS/APO-1, KILLER/DR5, PIG-3) ning lisaks raku signalisatsiooniradades ning raku ülesehituses osalevate valkude geenid (Zhao *et al.*, 2000).

P53 märkladugeenide regulatsioon UV-kiirguse tingimustes sõltub suuresti kiiritamiseks kasutatud UV-doosist (Latonen *et al.*, 2001; Li & Ho, 1998). Samuti ka indutseeritava geeni pikkusest (McKay *et al.*, 2004). P53-poolt indutseeritavate geenide hulk väheneb sõltuvalt UV-doosi taseme tõusust. Suuremate UV-dooside puhul indutseeriti väiksemaid geene, milles on vähem introne – enamasti p53- vastusgeenid, mis kodeerivad pro-apoptoetilisi valke, seega suunavad rakke apoptoosi. Samas p53 poolt indutseeritavate ta enda negatiivsete regulaatorite ja mitokondriaalsete apoptootiliste signaaliradade inhibiitorite geenid on märgatavalt suuremad ning indutseeruvad pigem väiksemate UV-dooside korral (McKay *et al.*, 2004).

P21 aktivatsioon

P21 tase tõuseb nii inimese kui hiire fibroblastides pärast UV-ga kiiritamist (Geyer *et al.*, 2000; Haapajarvi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996; Poon *et al.*, 1996). On näidatud nii p21 mRNA kui valgu taseme kiiret tõusu 2 – 6 h jooksul vastuseks UV-kiirgusele (20 – 25 J/m²) (Espinosa *et al.*, 2003; Wu & Levine, 1997). Enamasti korreleerub p21 ekspressioon p53 aktiivsuse tõusuga, kuid on leitud ka p53-sõltumatut p21 taseme tõusu inimese naha fibroblastides (Haapajarvi *et al.*, 1999; Loignon *et al.*, 1997). P21 p53-st sõltuvat tõusu on seostatud p53 Ser 20 fosforüleerimisega vastuseks nii UV- (30 J/m²) kui ka ioniseerivale kiirgusele (Jabbur *et al.*, 2000).

Samas mõnedes töödes ollakse vastupidisel arvamusel ning näidatakse p21 taseme langust vastuseks UV-kiirgusele (Allan & Fried, 1999; Maki & Howley,

1997; Rieber & Strasberg Rieber, 2000; Wang *et al.*, 1999). Sellele vastuolule pakutakse seletuseks varianti, et olenemata rakuliinist ning p53 ja pRB staatusest degradeeritakse p21 madalate UV-dooside puhul, kuid teda ei degradeerita vastuseks kõrgetele doosidele. P21 degradeerimiseks on vaja funktsionaalset ATR kinaasi ning lagundamine sõltub valgu ubikvitinüleerimisest (Bendjennat *et al.*, 2003). On teada, et p21 seondub PCNA-ga, mis osaleb DNA parandamises (Nichols & Sancar, 1992; Shivji *et al.*, 1992; Waga *et al.*, 1994). Normaalses rakkudes on vaid väike hulk PCNA-d p21-ga seondunud. Madalate UV-dooside puhul p21 degradeeritakse, ning ta ei seonu PCNA-ga, võimaldades DNA parandamist, kõrgetel UV-doosidel p21 aga ei degradeerita ning ta seob PCNA-d aktiivsemalt. Kuna kõrged UV-kiirguse doosid põhjustavad usutavalt DNA-s suuremaid kahjustusi, on raku jaoks nende parandamine mõttetu ning isegi riskantne, kuna ellujäänud rakkude DNA võib olla kahjustatud. Mis on aga p21 kõrgetel UV-doosidel mitte degradeerimise molekulaarne mehhanism, on veel selgusetu. Võimalikuks seletuseks on p21 posttranslatsiooniline modifitseerimine mõne ATR-st pärisuunas asuva kinaasi poolt.

Pidev DNA kahjustuse tekitamine UV-poolt inhibeerib p21 ning ka BAX-i ekspressiooni, kuna p53 ei suuda aktiveerida transkriptsiooni tümidiini dimeere sisaldavatelt promootoritelt (McKay *et al.*, 1998). UV-kiirguse poolt tekitatud tümidiini dimeerid takistavad valkude seondumist DNA-le (Ghosh *et al.*, 2003).

Kui enamasti näidatakse, et p21 tase tõuseb vastuseks kõrgetele UV-doosidele ning p21 degradeeritakse vastuseks madalatele kiirgusdoosidele, on selles reas ka erandeid - vastuseks 50 J/m² p21 tase roti embrüonaalsetes fibroblastides ei tõusnud (Reinke & Lozano, 1997). P21 akumulatsioonist eelkõige vastuseks madalatele UV-doosidele on näidatud inimese diploidsetes fibroblastides (Barley *et al.*, 1998; Latonen *et al.*, 2001) ning ka NIH3T3 ja T22 rakkudes (Lu *et al.*, 1996).

MDM2-e ja BAX-i aktivatsioon

MDM2 aktivatsioon toimub üldiselt hiljem kui p21 indutseerimine. On näidatud, et MDM2 mRNA tase langeb veidi pärast kiiritamist UV-ga p53-st sõltumatult 8-12 tunni pärast hakkab aga taas tõusma p53-sõltuvalt (Reinke & Lozano, 1997; Wu & Levine, 1997). Nii inimese kui hiire teratokartsinoomi rakkudes langes MDM2 RNA ning valgu tase 12 h jooksul vastuseks UV-poolt (20 J/m^2) põhjustatud DNA kahjustusele. MDM2 repressioon oli p53-st sõltumatu. Näidati, et MDM2 promootoris leidub UV-kiirgusele reageeriv DNA *cis* element, mis vahendab transkriptsiooni repressiooni (Zeng *et al.*, 2000).

On kummastav, et kõrgete UV dooside puhul inhibeeritakse MDM2 ekspressiooni p53-st sõltumatult, madalatel UV-doosidel indutseeritakse MDM2 transkriptsiooni aga p53-st sõltuvalt (Perry *et al.*, 1993; Wu & Levine, 1997). MDM2 repressioon kõrgetel UV-doosidel ei olnud seotud võimaliku üleüldise transkriptsiooni supressiooniga UV-poolt, kuna GAPDH, p53 ning p21 tase ei langenud. Seega arvatakse, et on olemas rakulised UV-poolt aktiveeritavad repressorid, mis võivad spetsiifiliselt reguleerida MDM2 transkriptsiooni, seondudes oletatava UV-le reageeriva DNA *cis* elemendiga MDM2 promootoris. On võimalik, et selline repressor aktiveeritakse vaid vastuseks kõrgetele UV-doosidele. Väiksemad UV-doosid põhjustavad väiksemat DNA kahjustust, mis parandatakse kiiresti. Sel juhul indutseeritakse MDM2 p53-sõltuvalt, et inhibeerida viimase tegevust rakutsükli peatamises ning rakkude viimises apoptoosi, kuna see pole vajalik. Suuremat sorti DNA kahjustute puhul on aga vaja just viimatimainitud p53 aktiivsusi, seega eemaldatakse MDM2 ning rakud apoteeruvad (Zeng *et al.*, 2000).

BAX-i tase tõuseb nii kõrgete (50 J/m^2) kui madalate (10 J/m^2) UVC-dooside puhul, seda küll erinevatel ajapunktidel – vastavalt 6 ja 24 h pärast (Latonen *et al.*, 2001; Reinke & Lozano, 1997). Inimese rakkudes tehtud katsed UVB kiirgusega näitasid küll Bcl-2 taseme langust, kuid BAX-i mRNA tase oluliselt ei muutunud (Isoherranen *et al.*, 1999).

2. Töö eesmärk

Kirjanduse ülevaates andsin lühikese ülevaate p53 regulatsioonist ning tuumorsupressor ARF-i rollist p53-e stabiliseerijana, seda eelkõige MDM2 inhibeerimise läbi. Samas selgus, et ARF on võimeline teadmata mehhanismide läbi mõjutama ka p53 transkriptsioonilist aktiivsust ning arvatakse, et tal on roll ka p53 vastuses genotoksilisele stressile. Lisaks omab ARF ka p53-st sõltumatu funktsioone, mille täpseid toimimise mehhanisme pole veel selgitatud.

Meie laboris tehtud varasemad eksperimendid viitasid sellele, et ARF võib mõjutada p53 märklaudgeenide diferentsiaalset aktivatsiooni. D. Lepiku poolt tehtud katsetest ilmselgus, et 10 (1) rakkudes, kus puudub endogeenne p53, tõstis p19^{ARF} koporatsioonil wt p53-ga MDM2 valgu taset, p21 valgu tase jäi aga muutumatuks.

Eeltoodust lähtuvalt sai minu töö eesmärgiks

- 1) uurida endogeense ARF-i rolli p53 märklaudgeenide transkriptsiooni regulatsioonis DNA kahjustuse tingimustes ajalises dünaamikas erineva ARF-i ja p53-e staatusega hiire fibroblastides
- 2) uurida eksogeense ARF-i mõju p53 märklaudgeenide transkriptsioonitasemele

Lisaks hõlmas osa mu tööst rakubioloogilistes eksperimentides korrektse raku elutegevust mittemõjutava transfektsioonimeetodi leidmist.

3. Materjal ja metoodika

3.1. Plasmiidid

Tühi pCG ja pcDNA – sisaldavad eukarüootse promootorina tsütomegaloviiruse (CMV) IE1 geeni promootorit ja SV40 replikatsiooni alguspunkti (*ori*).

pCGp19^{ARF} – kodeerib hiire ARF valku. p19^{ARF} cDNA saadi Dr C. Sherr'ilt ning kloneeriti pCG vektorisse Lilian Kadaja poolt.

pCGβ-gal – kodeerib β-galaktosidaasi.

pcDNAΔ1-125CD43 – kodeerib CD43 deletsioonimutanti ning saadi C. Andersson'ilt (Göteborg'i Ülikool).

pCGc-myc – kodeerib hiire c-myc-i.

3F12pCGp73 – kodeerib hiire 3F12 *tag*-iga p73-e valku. P73 cDNA restrikteerisin firma "Riken" pBluescriptl KS⁽⁺⁾ plasmiidist *EcoRI* abil, sellele järgnes Klenow'i töötlus, inserdi kloneerisin tõmbligatsioonil 3F12pCG plasmiidi *SmaI* restrikstioonikohta. Saadud plasmiidi õigsust kontrollisin sekveneerimisel ning valgu ekspressiooni 3F12 antikehaga. Tulemused olid positiivsed.

pCI-neo-β-kateniin – kodeerib inimese wt β-kateniini; pCI-neo-β-kateniinS33Y – kodeerib inimese wt β-kateniinist stabiilsemat mutantset β-kateniini, mille seriin positsioonis 33 on asendatud türosiiniga (saadud Dr. B. Vogelstein'ilt).

pSCTHPV18E7 ja pSCTHPV16E7 – kodeerivad vastavalt inimese papilloomiviiruse tüüp 18 ja tüüp 16 E7 valku CMV promootori alt. Saadud Tanel Punga'lt (Uppsala Ülikool).

pCGPyLT – kodeerib polüoomiviiruse LT antigeeni.

pE2GFP – kodeerib parandatud spektriomadustega varianti *Aequorea victoria* rohelisest fluorestseeruvast valgust GFP, mille promootoralas on papilloomiviiruse E2 valgu seondumiskohad ning mis ka kodeerib E2 valku (Abroi *et al.*, 2004).

3.2. Rakukultuurid

MCF-7 – inimese rinnanäärme kartsinoomi rakud, kus p53 lokaliseerub tsütoplasmas ning puudub p14^{ARF}.

wt MSF – metsik-tüüpi hiire naha fibroblastid (tehtud Viljar Jaksi ja Ilvi Rimmi poolt).

ARF^{-/-} MEF-id – hiire embrüonaalsed fibroblastid, kus p19^{ARF} alleelid on deleteeritud (saadud Dr K. Wiman'ilt).

P53^{-/-} MEF-id – hiire embrüonaalsed fibroblastid, kus p53 alleelid on deleteeritud (saadud Dr K. Wiman'ilt).

10(1) – spontaanselt immortaliseerunud hiire embrüonaalsed fibroblastid, kus puudub p53 (saadud Dr. A Levine'ilt).

Kasvatasin rakke IMDM söötmes, mis sisaldas 10 % veise looteserumit ning penitsilliini 100 U/ml ja streptomütsiini 0,1 mg/ml. Inkubatsioon toimus temperatuuril 37 °C keskkonnas, mis sisaldas 5 % CO₂.

3.3. Transfektsioonimeetodid

3.3.1. Elektroporatsioon

MCF-7 rakkude transfektsiooniks kasutasin elektroporatsiooni meetodit (Ustav *et al.*, 1991). Trüpsiniseerisin rakud 70 % konfluentsetelt 100 mm koekultuuritassidelt ja kogusin 50 ml *Falcon*'i tuubi, tsentrifugeerisin 200 g, 5 minutit, 4 °C juures ning suspendeerisin söötmes, kuhu oli lisatud Na-Bes puhvrit (pH 7,5) lõppkontsentratsiooniga 5 mM. Küvettesse panin katsest lähtuvalt 50 µg kandja-DNA-d (lõhe spermi DNA) üksi või koos ettenähtud koguse plasmiidse DNA-ga, segasin 250 µl rakususpensiooniga ja elektroporeerisin. Tühjaporaatoril transfektsioneeritavat DNA-d ei lisanud. Elektroporatsioonil kasutatud mahtuvus oli 975 µF ja pinge 220 V. Kasutasin "*In vitro gene*" elektroporaatorit. Pärast elektroporatsiooni seisisid rakud küvetis 10-15 minutit ning seejärel pipeteerisin nad 60 mm koekultuuritassidele 4 ml-sse söötmesse. Rakud kasvasid temperatuuril 37 °C 5 % CO₂ keskkonnas. Transfektsiooniefektiivsuse määrasin β-galaktosidaasi ekspresseeriva plasmiidiga transfektsioneeritud rakkude *in situ* värvimise teel. (Eemaldasid söötmest, pesin rakke PBS-ga kolm korda, fikseerisin 0,05 % glutaaraldehüüdiga 0,5 tundi,

eemaldasin glutaaraldehüüdi, pesin rakke PBS-ga 3 - 4 korda ning lisasin 3 ml substraadi lahust, mis sisaldas: 3 ml 1x PBS, 45 µl 4 % X-gal, 4,5 µl 2 M MgCl₂, 198 µl kaaliumferrotsüaniidi (42 mg/ml) ja 198 µl kaaliumferritsüaniidi (33 mg/ml)). Inkubeerisin rakke üleöö temperatuuril 37 °C ning loendasin värvunud rakud mikroskoobi abil). Poratsiooniefektiivsuseks MCF-7 rakkudes oli 30 – 40%.

3.3.2. PEI-transfektsioon

24 tundi enne transfekkeerimist lugesin Bürcheri kambrit kasutades 60 mm tassidele vajaliku koguse rakke (wt MSF – 130 000, ARF-/- MEF – 100 000 – 110 000, p53-/- MEF – 80 000). PEI- (polüetüleenimiin-) transfektsiooniks pipeteerisin *Eppendorf*i 1,5 ml tuubidesse vajaliku koguse DNA-d, lisasin igasse tuubi 150 mM steriilset NaCl arvestusega, et DNA/PEI lahuse maht moodustaks lõpuks tassile pandavast söötme mahust 1/10. Segasin NaCl/DNA segu Voretix-il. Järgnevalt lisasin tuubidesse vajaliku koguse ExGen500 *in vitro* transfektsioonireagenti (*Fermentas*), mis sisaldab PEI-d. ExGen500 koguse arvutamiseks kasutasin valemit:

$$\frac{eq \times 3 \times DNA (\mu g)}{5,47} = ExGen500 (\mu l)$$

eq ehk ekvivalentide arv väljendab DNA/PEI koguste suhet ja on saadud katsesüsteemi optimeerides. Nii wt MSF-ide kui ARF-/- ja p53-/- MEF-ide puhul kasutasin ekvivalentide arvuna kümnet. Pärast ExGen500 lisamist segasin segu Vortex-il 10 sekundit ning jätsin toatemperatuurile seisma 10 minutiks. Seejärel tilgutasin DNA/PEI segu aeglaselt eelmisel päeval külvatud 60 mm koekultuuritassidel kasvavatele rakkudele ning segasin kaheksakujuliste liigutustega, et segu jaotuks söötmes ühtlaselt üle tassi.

Transfektsiooniefektiivsuse määramiseks kasutasin voolutsütomeetrit. (Kogusin rakud 60 mm koekultuuritassidelt 24 h pärast transfektsiooni EGFP-d sisaldava plasmiidiga. Selleks valasin söötme 15 ml tsentrifuugituubi, pesin rakud 1 ml

PBS-ga, suspendeerisin 1 ml trüpsiinis ja tsentrifugeerisin 200 g 5 min 5 °C juures. Aspireerisin supernatandi, suspendeerisin rakud 300 µl PBS-s ja analüüsisin voolutsütomeetriga *FACSCalibur* (*Becton Dickinson*), kasutades programmi *CellQuest*. Transfektsiooniefektiivsuse määramiseks leidsin EGFP-d ekspresseerivate rakkude hulga.) Wt MSF-ides oli infektsiooniefektiivsus 29 - 35 %, ARF^{-/-} MEF-ides 30 – 55 %, p53^{-/-} MEF-ides 25 – 40 %.

3.4. Rakkude indutseerimine UV-kiirgusega

Rakke indutseerisin UV-kiirguse doosiga 40 J/m². Selleks kogusin rakkudelt söötme 50 ml tsentrifuugituubi, aspireerisin söötme jäägid ning kiiritasin rakke eeltoodud UVC (254 nm) kiirguse doosiga, kasutades *UV Stratalinker® 1800* (*Stratagene®*). Pipeteerisin rakkudele söötme ning inkubeerisin neid 37 °C 5 % CO₂ keskkonnas vastavalt kas 4, 8 või 12 tundi.

3.5. Totaalse RNA eraldamine

Totaalse RNA eraldamiseks kasutasin *RNeasy® Mini Kit*-i (*Qiagen*) ja *NucleoSpin® RNA II Kit*-i (*Macherey-Nagel*). Pesin rakke kaks korda PBS-iga ning eraldas RNA vastavalt tootja juhistele ja säilitasin –70 °C juures RNase'i vabas vees.

3.6. RPA – Ribonuclease Protection Assay

p53 kolme märklaudgeeni ja GAPDH mRNA taseme analüüsimiseks kasutasin *RiboQuant® Multi-Probe RPA Kit*-i (*Pharmingen*). Vajalikud protseduurid teostasid enamjaolt vastavalt tootja soovitudele, kuid esines ka muudatusi.

pBluescript SK⁽⁺⁾ plasmiidid, millelt T7 polümeraas on võimeline sünteesima p21, BAX-I, MDM2 ja GAPDH *antisense* mRNA proove on tehtud ning kontrollitud Viljar Jaks'i poolt (Jaks *et al.*, 2001). Lineariseerisin 5 µg igat plasmidi kasutades *XbaI*, eraldasid lineariseeritud plasmiidid geelist *NucleoSpin® Gel Extraction Kit*-i (*Macherey-Nagel*) abil vastavalt tootja

juhistele. Segasin kokku *template*'ide segu – võrdses koguses kõiki lineariseeritud plasmide.

RPA proovide sünteesimiseks kasutasin 1 µl RNase'i inhibiitorit (40 U/µl, *Fermentas*), 1 µl GACU segu (GAC segu, iga ribonukleotiidi kontsentratsiooniks 2,75 mM, U 61 µM), 2 µl DTT (100 mM), 4 µl 5 x transkriptsioonipuhvrit (*Fermentas*), 1 µl *template*'ide segu, 5-10 µl [α -³²P]UTP ja 1 µl T7 RNA polümeraasi (20 U/µl, *Fermentas*). Inkubeerisin segu 1 h 37 °C. Järgnevalt lisasin DNA *template*'i eemaldamiseks 20 U RNase'i vaba DNase I (*Fermentas*). Inkubeerisin segu 30 min 37 °C. Eraldasin RNA proovide segu kasutades *RNeasy® Mini Kit*-i (*Qiagen*) vastavalt tootja juhistele ning sadestasin 50 µl RNase'i vaba veega kolonnilt elueeritud proovi 50 µl 4 M ammooniumatsetaadi ja 250 µl 96 % etanooliga 30 min -70°C. Tsentrifugeerisin proovi 16 000 g 15 min 4 °C. lahustasin proovide segu 50 µl hübridisatsioonipuhvris, mis tagas lahjenduse $\sim 3 \times 10^5$ cpm/µl.

Kuivatasin 5 µg eraldatud totaalset RNA-d vaakumkuivatiga, lahustasin 8 µl hübridisatsioonipuhvris ning lisasin 2 µl ³²P-märgistatud *antisense* RNA proovide segu. Antisense proovide ja mRNA hübridisatsioon toimus üleöö 56°C, õlikihi all.

Hübridiseerumata RNA eraldamiseks lisasin RNase A ja T1, reaktsioon toimus 45 min 30 °C. RNase'I inaktiveerisin proteiink töötlusega pärmi tRNA juuresolekul 15 min 37 °C. Eraldasin RNA fenool/kloroform töötlusega ning sadestasin ammooniumatsetaadi ja etanooliga 30 min -70 °C. Proovid lahustasin 5 µl geelilekandmispuhvris. Hübridiseerunud RNA lahustasin denatureerivates tingimustes (8 M urea) 5 % polüakrüülamiid geelelektroforeesil. Selleks kasutasin *Hoeferi* vertikaalset geelelektroforeesiaparaati (mõõtmed 10x12 cm) ning pinget 190-210 V. Saadud geeli kuivatasin ning signaali detekteerisin kasutades *Phosphoimageri* skannerit. Tulemust analüüsisin kasutades *ImageQuaNT* arvutiprogrammi.

Kvantiteerisin saadud signaalid, jagasin läbi sisemise kontrolliga (GAPDH) ning normaliseerisin tulemused kontrollraja suhtes.

3.7. Northern blot

Elektroforeesisin ~10 µg totaalset RNA-d (formamiidiga suhtes 1:1 läbi kuumutatud 2 min 95 °C juures) 1 % agaros-formaldehüüdgeelis. Loksutasin geeli 2 x SSC-s ning kandsin RNA *Hybond-N* nitrotselluloosfiltrile üleöö 20 x SSC lahuses kapillaarse ülekande meetodil. RNA fikseerisin filtrile kovalentselt ultraviolettkiirguse (1200 J/m²) abil ja filtri panin 0,5 - 1 tunniks 65 °C temperatuurile prehübridisatsioonilahusesse (6 x SSC, 10 mM EDTA, 0,67 % SDS). Hübridiseerisin filtrit RNA prooviga, mille sünteesisin RPA meetodis kirjeldatud viisil, kasutades *template*'ina vaid ühe uuritava geeni cDNA-d sisaldavat pBluescript SK⁽⁺⁾ plasmidi. Radioaktiivne proov ning filtril olev mRNA hübridiseerusid üleöö 65 °C juures hübridisatsioonilahuses (6 x SSC, 10 mM EDTA, 0,67 % SDS) kandja-DNA (0,1 mg/ml) ning dekstraansulfaadi (10 %) juuresolekul. Filtrit pesin 2 x 30 minutit 2 x SSC 2,1 % SDS lahuses 65 °C juures ning 2 x 30 minutit 0,2 x SSC 2,1 % SDS lahuses. Saadud signaali detekteerisin filmil (kasutades võimendavate ekraanidega kassetti, temperatuuril -70 °C) või kasutades *Phosphoimager*'i skännerit.

3.8. Western blot

Eemaldas koekultuuritassidel kasvavatelt rakkudelt söötme, pesin 3 korda PBS-ga, lisasin 500 µl külma PBS-i ja jätsin 5 minutiks jääle seisma. Kogusin rakud kummispaatli abil *Eppendorf*'i tuubi ning tseentrifuugisin 12 sek 11 000 g rakud tuubi põhja. Aspireerisin supernatandi ning suspendeerisin rakud 30 – 40 µl lüüsipuhvril (150 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH8, 1 % TritonX-100, 1 kordne kompleksne proteaaside inhibiitor - firma *Roche* kommertsiaalsed *Protease Inhibitor Cocktail Tablets*) ning jätsin 30 minutiks jääle seisma. Rakulüsaati fuugisin 13 000 g 5 minutit, temperatuuril 4 °C ning supernatandi pipeteerisin uude tuubi.

Et tagada võrdse valgu hulga kasutamine erinevate lüsaatide puhul, määrasin saadud lüsaatide optilise tiheduse Bradford'i meetodil (Bradford, 1976). Normaliseerisin lüsaatide kogused. Lisasin lüsaatidele kahekordset SDS geelilekandmispuhvrit (0,125 M Tris-Cl pH 6,8, 4 % SDS, 10 % 2-merkaptotoetanool, 20 % glütserool, 0,004 % broomfenoolsinine) ning kuumutasin 5 minutit temperatuuril 100 °C.

Valgud lahutasin geelelektroforeesil 10 % või 12 % SDS-polüakrüülamiidgeelis (Sambrook *et al.*, 1989) ühekordses SDS puhvis (0,25 M Tris, 0,192 M glütsiin, 0,1% SDS). Enne ülekannet PVD filtrile, märjutasin viimast metanoolis ja loksutasin nagu geeligi 10 minutit ülekandepuhvis (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037 % SDS, 20 % metanool). Ülekanne toimus 45 minutit konstantsel pingel 15 V firma *BIO –RAD Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell* aparaadiga. Blokeerisin filtrit üleöö temperatuuril 4 °C 5 % lõssipulbrilahusega 0.05 % Tween20-1 x PBS-s. Primaarse antikehaga inkubeerisin 1 tund 5 % lõssipulbrilahuses ja pesin 3 korda 5 minutit 0,05 % Tween20-1xPBS-ga.

P53 detekteerimiseks MCF-7 rakuliinis kasutasin hiires saadud inimese p53 vastaseid antikehi 240 (epitooop ah 213-217) ja 1801 (epitooop ah 46-55) (lõppkontsentratsioon 1 µg/ml). wt MSF ja ARF-/- MEF-ides kasutasin hiires saadud hiire p53 vastast antikeha pAb 122 (lõppkontsentratsioon 1 µg/ml). MDM2 detekteerimiseks kasutasin 2A10 (oletatavad epitoobid ah 258-260, 393-395) antikeha (lõppkontsentratsioon 1 µg/ml). p21 mAb F-5 p21 vastase antikehaga (lõppkontsentratsioon 0,4 µg/ml) (*Santa Cruz Biotech.*). CD43 deletsioonimutanti detekteerisin 4D2 antikehaga (hübriidoomi supernatant). β-aktiini detekteerisin mAb (AC-15) β-aktiini vastase antikehaga tootja poolt soovitatud lahjendusel 1:5000 (*Abcam*).

Sekundaarse antikehaga inkubeerisin filtrit samuti 5 % lõssipulbrilahuses 1 tund toatemperatuuril. Sekundaarse antikehana kasutasin p53, MDM2, p21 ja CD43 puhul peroksüdaasiga konjugeeritud hiire IgG vastast antikeha (firma *LabAS*, lahjendus 1:1000). β-aktiini jaoks aluselise fosfataasiga konjugeeritud hiire Ig vastast antikeha (*LabAS*, lahjendus 1:1000). P19^{ARF} detekteerimiseks kasutasin sekundaarse antikehana aluselise fosfataasiga konjugeeritud jänese Ig vastast antikeha.

Pesin filtrit 3 korda 5 minutit 0,05 % Tween20-1xPBS-ga. P53, MDM2, CD43 ja p21 signaali detekteerisin *Amersham Pharmacia Biotech*'i ECL™ detektsioonilahustega. P19^{ARF}-i ning β-aktiini signaali visualiseerisin 10 ml aluselise fosfataasi puhvris (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-Cl (pH 9,5)), millele oli lisatud 66 µl NBT (50 mg/ml) ja 33 µl BCIP (50 mg/ml).

3.9. Immuonofluorestsentsanalüüs

Kasvatsin rakke nelinurksetel (2,4x2,4 cm) kattedklaasidel 70 % konfluentsuseni. Eemaldasin söötme ning pesin klaase 3 korda PBS-ga. Fikseerisin kattedklaasil kasvanud rakud metanool:atsetoon seguga (1:1) temperatuuril –20 °C 10 minutit. Seejärel eemaldasin fiksaatori ja lasin klaasidel kuivada. Asetasin kattedklaasid 6-augulistesse plaatidesse ning lisasin primaarseid hiires saadud inimese p53 vastast antikeha 1801 (lõppkontsentratsioon 10 µg/ml) 5 % lõssipulbrilahuses. Inkubeerisin klaase primaarse antikehaga 1 tund toatemperatuuril. Seejärel aspireerisin primaarse antikeha ning pesin klaase 3 korda 1 x PBS-ga. Inkubeerisin rakke sekundaarse antikeha–fluorestsein konjugaadiga (*anti-mouse IgG-FITC, developed in goat; stock solution lahjendus 1:100*) pimedas 1 tund, toatemperatuuril. Aspireerisin sekundaarse antikeha ning pesin klaase 3 korda PBS-ga. Pipeteerisin alusklaasile 10 µl 50 % glütserooli ja asetasin sellele kattedklaasi nii, et rakud jääksid klaaside vahele. Mikroskopeerisin preparaadid *OLYMPUS Vanox-S* mikroskoobi abil (filter B) ja pildistasin tulemused kasutades 40 kordset objektiivi.

4. Tulemused

4.1. Elektroporatsiooni mõju endogeense p53-e tasemele ja transkriptsioonilisele aktiivsusele

Transientse transfektsiooni meetodite kasutamisel rakuliste protsesside uurimisel on oluline, et efektid, mida näeme, oleksid tõesti tingitud meid huvitavate plasmiidide rakkudesse viimisest, mitte aga rakulisest vastusest transfektsiooniprotsessile. Oma varasemas töös kasutasin rakkude transfekteerimiseks elektroporatsioonimeetodit, mille käigus muudetakse raku membraan elektrivoolu mõjul läbilaskvaks. Arvatavasti viib see kompleksi moodustumiseni rakumembraani ja rakku viidava plasmidi vahel ja viimane inserteerub. Elektroporatsiooni käigus võib kahjustuda raku DNA, samuti võivad elektroporatsiooni käigus aktiveeruda rakulised nukleaasid vastuseks rakusisesele ioonse tasakaalu muutusele. Kuna elektroporatsioon võimaldab efektiivselt viia rakkudesse võrdlemisi väikseid DNA koguseid, kasutatakse elektroporeerimisel kandja-DNA-d (*carrier*), mis küllastab rakusisesed nukleaasid ja vähendab sellega rakku viidava plasmidse DNA lagundamist. Kandja-DNA-na kasutatakse enamasti sonikeeritud spermi DNA-d, mis sisaldab üheahelalist DNA-d, hulgaliselt vabu DNA-otsi ning DNA-katkeid, mis võivad rakule mimikeerida genoomse DNA kahjustust. Tuumorsupressor p53 on aga üks olulisemaid efektormolekule raku vastuses DNA kahjustusele.

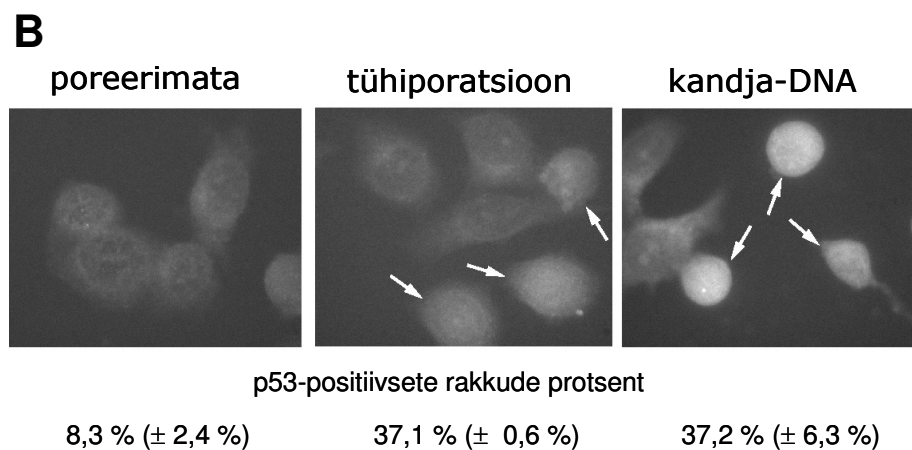
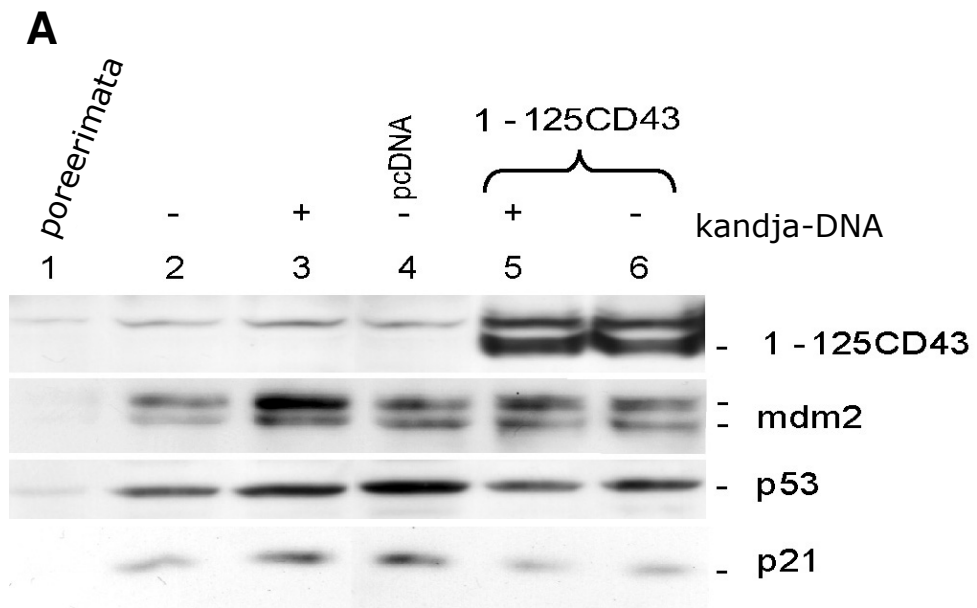
Uurides elektroporatsiooni mõju p53 valgu tasemele *western blot* meetodil inimese rinnanäärme kartsinoomi rakuliinis MCF-7, leidsin, et nii poratsiooniprotsess ise kui ka selle käigus rakkudesse viidav kandja-DNA (50 µg) tõstavad p53-e ning ka viimase märklaudgeenide MDM2 ja p21-e taset (joonis 5A, rajad 2, 3). Transfektsioon superspiraliseerunud DNA-ga (pcDNA 5 µg; joonis 5A, rada 4) ei muutnud p53-e taset võrrelduna kandja-DNA-ga transfekteeritud rakkudega. Uurisin ka eksogeense valgu ekspressiooni mõju p53-e tasemele. Selleks kasutasin leukotsüütide pinnamarkeri CD 43 deletsioonimutanti Δ 1-125CD43, mis teadaolevalt ei mõjuta rakkude elulemust ega vähenda kasvukiirust. Kuigi Δ 1-125CD43 on rakkudes suures hulgas

üleekspressioneeritud (joonis 5A, rajad 5, 6) ei põhjusta see lisatõusu p53-e valgu tasemes, olenemata sellest, kas rakke on transfekteeritud koos kandja-DNA-ga või mitte. P53-e tase jääb kandja-DNA-ga poreeritud rakkudes olevale tasemele (joonis 5A, rajad 5, 6). See näitab, et elektroporatsiooni kõrvalmõjudest ei saa hoiduda jättes kasutamata kandja-DNA. Suurima muutuse p53-e tasemes põhjustab siiski elektroporatsiooniprotsess ise (joonis 5A, rajad 1, 2).

Et kinnitada *western blot*il saadud tulemusi, uurisin elektroporatsiooni mõju p53-le MCF-7 rakkudes ka immuonofluorestsentsanalüüsil. Kui poreerimata MCF7 rakkudes on p53 tase madal ning ta lokaliseerub tsütoplasmas (joonis 5B), siis elektroporatsiooni tagajärjel liigub p53 tuuma ning on näha p53 signaali intensiivistumist (joonis 5B, tühiporatsioon – rakud elektroporeeritud DNA lisamiseta). Kandja-DNA-ga transfekteerides on rakutuumas näha tugev p53-e signaali taseme tõus (joonis 5B). Tühiporatsiooni tagajärjel tõuseb märgatavalt rakkude arv, kus p53 on tuuma liikunud. Rakkude transfekteerimisel kandja-DNA-ga p53-e tuumalokalisatsiooniga rakkude arv ei tõuse, küll aga suureneb p53-e signaali intensiivsus rakkudes. Sellest võib järeldada, et kandja-DNA ei mõjuta elektroporatsiooni poolt mõjutatud rakkude arvu, küll aga intensiivistab ta p53-e vastust.

Otsides alternatiivseid transfektsioonimeetodeid, millega ei kaasneks soovimatuid kõrvalfekte raku elutegevusele, on meie laboris näidatud, et polüetüleenimiin (PEI)-transfektsioon ei avalda mõju p53-e rakusisesele tasemele ega transkriptioonilisele aktiivsusele (Lepik et al, 2003, LISA 1). Sellest lähtuvalt olen oma edasistes eksperimentides kasutanud elektroporatsiooni asemel PEI-transfektsiooni.

Eelpool toodud andmed on avaldatud ka artiklis "*Electroporation & carrier DNA cause p53 activation, cell cycle arrest, & apoptosis*", Dina Lepik, Viljar Jaks, Lilian Kadaja, Signe Värvi, Toivo Maimets, *Analytical Biochemistry* 318 (2003) 52-59 (LISA 1).



Joonis 5. (A) Elektroporatsiooni mõju p53 tasemele ja transkriptsioonilisele aktiivsusele MCF-7 rakkudes. *Western blot* analüüs. Rakke elektroporeeriti ilma kandja-DNA-ta (rada 2), 50 µg kandja DNA-ga (rajad 3, 5), 5 µg pcDNA-ga (rada 4), 500 ng pcDNA Δ 1-125CD43 (rajad 5, 6). Rakud lüüsi 24 h pärast transfektsiooni. P53 detekteeriti pAb 1801, MDM2 2A10, p21 F-5 mAb (*Santa Cruz Biotech.*), Δ 1-125CD43 4D2 antikehaga. **(B)** p53 lokalisatsioon MCF-7 rakkudes. Immuonofluorestsentsanalüüs. Rakke elektroporeeriti ilma kandja-DNA-ta (tühiporatsioon) või 50 µg kandja-DNA-ga. P53 detekteeriti pAb 1801 antikehaga. Nooled viitavad rakkudele kus p53 lokaliseerus tuuma. Arvud piltide all näitavad tuuma lokaliseerunud p53-ga rakkude protsenti, mis on arvutatud kolme eraldiseisva katse põhjal. Loeti ~250 rakku ühe katse kohta.

4.2. Rakkude ARF-i staatuse mõju DNA kahjustusest sõltuvale p53-e märklaudgeenide transkriptsiooni tasemele

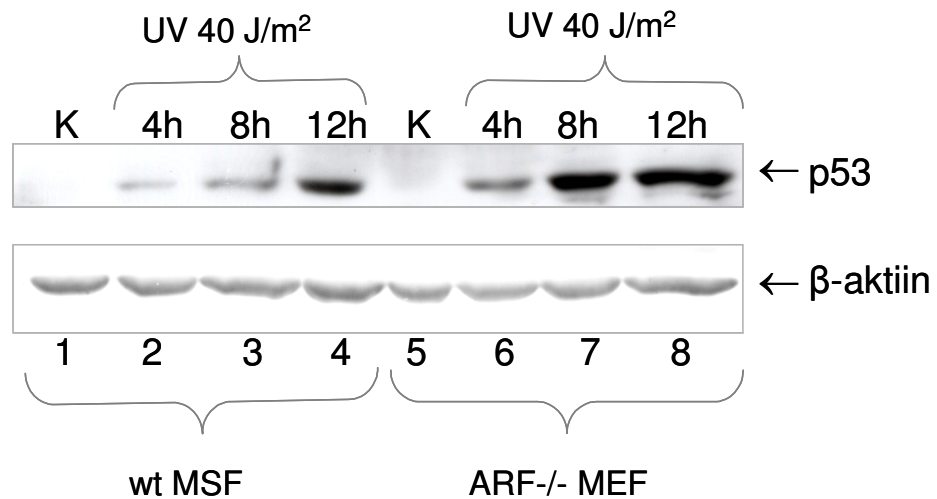
Tuumorsupressor ARF reguleerib p53 stabiilsust MDM2 inhibeerimise teel ning vahendab onkogeense signaali jõudmist p53-ni. Lisaks arvatakse, et ARF võib moduleerida p53-vastust kiirguse poolt põhjustatud genotoksilisele stressile, kuidas täpselt, on veel teadmata.

Sellest lähtuvalt huvitas meid, kuivõrd moduleerib ARF p53 märklaudgeenide ekspressiooni juba transkriptsiooni tasemel ning seda ka DNA kahjustuse tingimustes. ARF-i olulisust p53 märklaudgeenide transkriptsiooni regulatsioonis uurisin RPA meetodiga, mis võimaldab vaadelda korraga mitme erineva geeni ekspressiooni samades rakkudes. Uuritavateks p53 märklaudgeenideks valisin MDM2, p21 ning BAX-i. MDM2 on üks olulisemaid p53 stabiilsuse negatiivseid reguleerijaid rakus ning p21 ja BAX-i transaktivatsiooni kaudu avaldub p53 võime vastavalt kas peatada rakutsükkel või viia rakke apoptoosi. Eksperimentides kasutasin hiire fibroblaste (metsik-tüüpi (wt) MSF, ARF^{-/-} ning p53^{-/-} MEF-e), mis erinevad üksteisest rakkude ARF-i ja p53-e staatuse poolest.

4.2.1. Ultraviolettkiirguse mõju endogeense p53-e tasemele wt MSF-ides ja ARF^{-/-} MEF-ides

Esmalt vaatasin, kas ka minu poolt kasutatavates rakuliinides stabiliseerib UV-kiirgus endogeenset p53-e. Wt MSF-ide ja ARF^{-/-} MEF-ide indutseerimiseks kasutasin lühilainelist (254 nm) UVC-kiirgust doosil 40 J/m², mida üldiselt loetakse kõrgeks UV-doosiks. UV-kiirguse mõju p53 valgu tasemele vaatasin *western blot* meetodil 4, 8 ja 12 tundi pärast kiiritamist. P53 tase tõuseb mõlemas rakuliinis juba 4 h pärast induktsiooni (joonis 6, rajad 2, 6). 8 h pärast kiiritamist on ARF^{-/-} MEF p53 tase tõusnud märgatavalt võrreldes 4 h ajapunktiga (joonis 6, rajad 7, 6) ning püsib samal tasemel ka 12 h pärast induktsiooni (joonis 6, rada 8). Wt MSF-ides p53 valgu tase 8 h pärast rakkude kiiritamist drastiliselt ei tõuse (joonis 6, rada 3), valk stabiliseerub suuremal

hulgal 12 h pärast induksiooni (joonis 6, rada 4). Nende tulemuste järgi saan olla kindel, et UV-kiirguse mõjul p53 rakkudes stabiliseerub ning võiks aktiveerida oma märklaudgeenide transkriptsiooni.



Joonis 6. Ultraviolettkiirguse mõju endogeense p53 tasemele wt MSF-ides ja ARF-/- MEF-ides. *Western blot* analüüs. Rakke indutseeriti UVC-kiirgusega 40 J/m². Rakud lüüsiiti 4, 8 ja 12 h pärast induksiooni. Kontrollradadel (rajad 1, 5) on UVC-ga indutseerimata rakud. P53 detekteeriti antikehaga pAb 122. Sisemise kontrollina on kasutatud β-aktiini.

4.2.2. Ultraviolettkiirguse mõju p53-e märklaudgeenide p21-e, MDM2-e ja BAX-i transkriptsioonitasemele wt MSF-ides, ARF-/- ning p53-/- MEF-ides

Järgnevalt vaatasin, kuidas aktiveerunud p53 wt MSF-ides ning ARF-/- MEF-ides mõjutab oma märklaudgeenide p21, MDM2 ja BAX transkriptsioonitaset vastuseks UV-kiirgusele. Vaatasin ka p53 märklaudgeenide taset p53-/- MEF-ides, kus p53 puudub, ARF aga esineb. Kasutasin RPA (*Ribonuclease Protection Assay*) meetodit. Kiiritasin rakke UV-kiirguse doosiga 40 J/m² ning kogusin totaalse RNA 4, 8 ja 12 tundi pärast rakkude indutseerimist. Sünteesisin p21, MDM2, BAX-i ja GAPDH radioaktiivsete proovide segu, hübridiseerisin seda totaalse RNA-ga ning vaatasin kõikide geenide

Wt MSF-ides hakkab **p21** tase aeglaselt tõusma 4 h pärast induktsiooni UV-kiirgusega ning umbes kolmekordne tõus võrreldes kiiritamata rakkudega saavutatakse 12 h pärast kiiritamist (joonis 8, A). ARF^{-/-} ja p53^{-/-} MEF-ides p21 tase samuti tõuseb vastuseks UV-kiirgusele, kuid neis rakuliinides on tõus 4 h pärast kiiritamist suurem (joonis 8, D, G) võrreldes wt MSF-idega. ARF^{-/-} MEF-ides on p21 tase juba 8 h pärast kiiritamist rohkem kui 4 x võrreldes kiiritamata rakkudega samas kui p53^{-/-} MEF-ides p21 tase 8 ja 12 h pärast kiiritamist rohkem enam ei tõuse ning võib näha pigem langustendentsi võrreldes 4 h tasemega (joonis 8, G). Need tulemused viitavad p53-e olulisele rollile p21 aktivatsioonis, eriti aktivatsiooni säilimisel. P21 tugevam induktsioon ARF^{-/-} MEF-ides (umbes 4 x algtasemest) võrreldes wt MSF-idega (umbes 2,7 x algtasemest), võib viidata mõningatele ARF-st sõltuvatele regulaatorsete mehhanismide olemasolule rakkudes, mis ARF^{-/-} MEF-ides on inaktiveeritud.

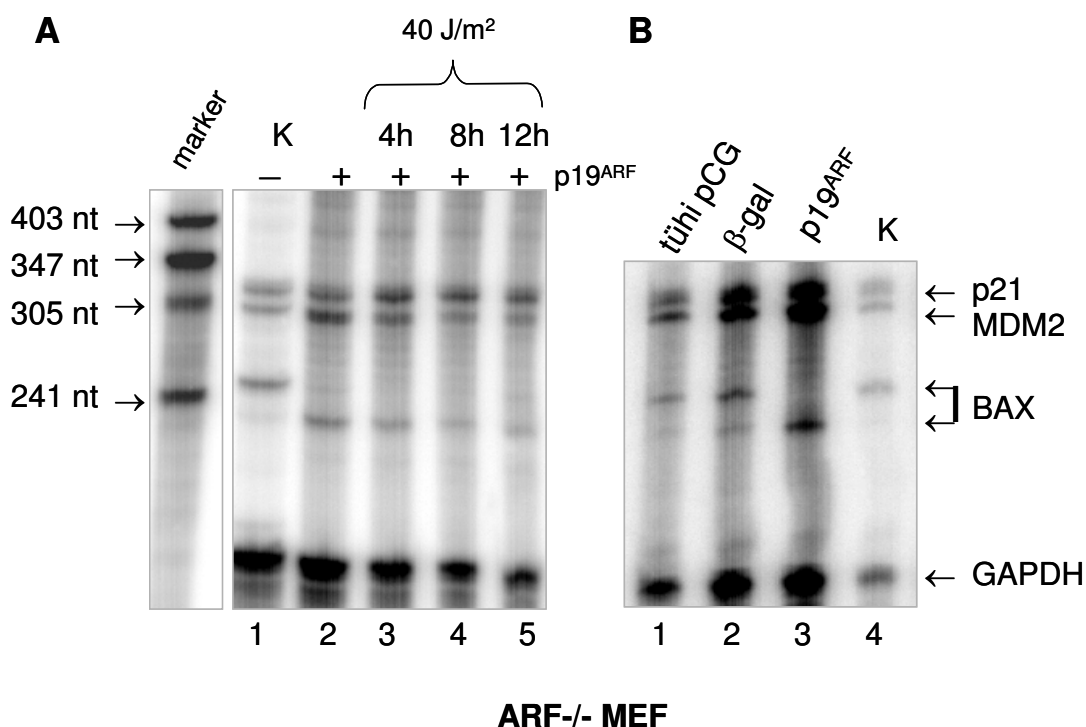
MDM2 tase langeb 4 h pärast UV-ga kiiritamist kõigis vaadeldud rakuliinides (joonis 8, B, E, H), 8 h pärast kiiritamist tõuseb vähemalt kiiritamata rakkude tasemele ning 12 h pärast on wt MSF-ides ja ARF^{-/-} MEF-ides veelgi tõusnud. P53^{-/-} MEF-ides langeb MDM2 tase 12 h pärast kiiritamist kiiritamata rakkude tasemele või alla selle (joonis 8, H), mis jällegi rõhutab p53 rolli MDM2 aktiveerimisel kiiritusjärgsetel hilisematel ajapunktidel. Kuna 12 h pärast kiiritamist on MDM2 tase wt MEF-ides 1,6 x suurem kui kiiritamata rakkudes, teistes rakuliinides jääb aga kiiritamata rakkude tasemele võib see viidata ARF-i rollile MDM2 transkriptsiooni aktivatsioonis.

Wt MSF-ides ja ARF^{-/-} MEF-ides püsib **BAX**-i tase vastuseks UV-kiirgusele kiiritamata rakkudega samal tasemel või langeb (joonis 8, C, F). p53^{-/-} MEF-ides BAX-i tase 4 tundi pärast kiiritamist langeb, 8 h pärast on jälle tõusnud ning 12 h pärast kiiritamist langenud oluliselt alla kiiritamata rakkude taseme (joonis 8, I).

Joonis 8 koht ☺

4.3. Eksogeense p19^{ARF}-i mõju p53-e märklaudeenide transkriptsioonile wt MSF-ides, ARF^{-/-} ja p53^{-/-} MEF-ides

Järgnevalt tahtsin teada, kuidas mõjutab p53 märklaudeenide aktivatsiooni DNA kahjustuse tingimustes eksogeense p19^{ARF}-i rakkudesse viimine. Selleks transfekteeisin wt MSF, ARF^{-/-} ja p53^{-/-} MEF-e PEI-meetodil 5 µg p19^{ARF}-i ekspresseeriva plasmiidiga. 24 h pärast transfektsiooni kiiritasin rakke UVC-kiirguse doosiga 40 J/m². Totaalse RNA kogusin 4, 8 ja 12 tundi pärast kiiritamist. Joonisel 9A on toodud RPA geeli pilt, millel p21, MDM2 ning GAPDH signaalid olid ootuspärastel kõrgustel, kuid radadel, kus rakkudesse oli transfekteeitud p19^{ARF}, kadus kontrollrajal olev BAX-i signaal (joonis 9A, rada 1) ning oodatavast veidi allpool tekkis uus, nn lühem signaal (joonis 9A, rajad 2-5).



Joonis 9. Eksogeense p19^{ARF} mõju p53 märklaudeenide transkriptsioonitasemele DNA kahjustuse tingimustes ARF^{-/-} MEF-ides. RPA geeli pilt. (A) Rakkudesse transfekteeeriti 5 µg pCGp19^{ARF} (rajad 2-5), 24 h pärast transfektsiooni indutseeriti rakke UVC-dooisiga 40 J/m² (rajad 3-5), totaalne RNA koguti 4, 8 ja 12 tundi pärast induktiooni (rajad 3-5) (rada 2 RNA koguti samal ajal 4 h ajapunktiga) ning analüüsiti RPA meetodil. (B) rakkudesse transfekteeeriti 5 µg tühja pCG vektorit, pCGβ-gal-i ja pCGp19^{ARF}-i. K – transfekteeerimata ja indutseerimata rakud.

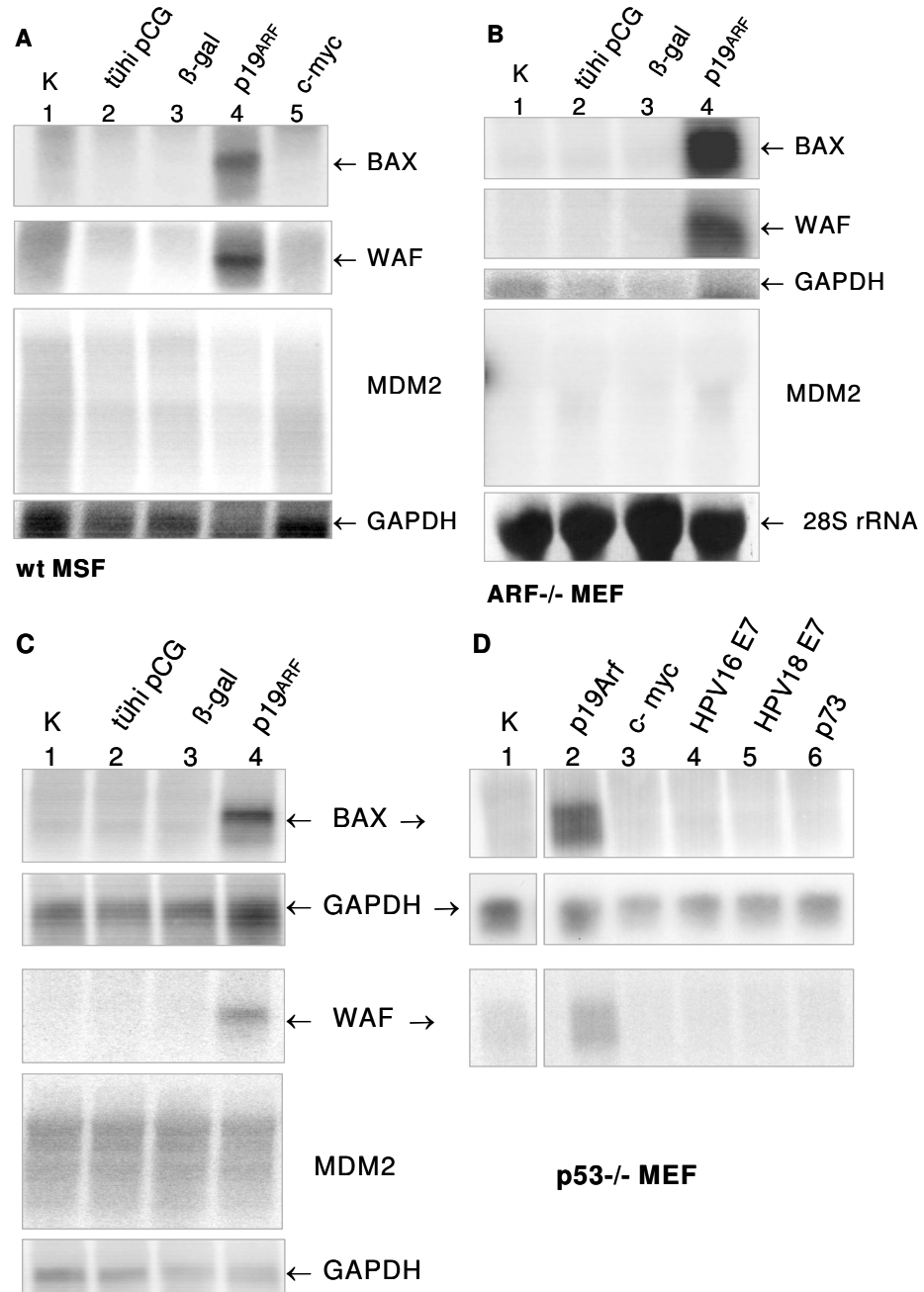
Et kontrollida, kas selline muutus BAX-i signaalis on ARF-spetsiifiline, transfekteeerisin rakke ka 5 μ g tühja pCG vektoriga (joonis 9B, rada 1) ning 5 μ g bakteriaalset valku β -galaktosidaasi ekspresseeriva vektoriga (joonis 9B, rada 2). Mõlemal juhul domineeris nn BAX-i pikem signaal, kuigi oli näha ka nn lühemat varianti (joonis 9B rajad 1, 2). Joonisel 9 on toodud eksogeense ARF-i mõju ARF^{-/-} MEF-ides. Samasuguse tulemuse andsid ka katsed wt MSF-ides ning p53^{-/-} MEF-ides (andmeid pole toodud).

Otsustasin ka *northern blot* meetodil vaadata, kuidas mõjutab p19^{ARF} üldist BAX-i ning ka teiste p53-e märklaudgeenide mRNA taset. Eksogeense p19^{ARF}-i mõju uurimiseks transfekteeerisin uuritavaid rakke PEI-meetodil 5 μ g p19^{ARF}-i ekspresseeriva plasmiidiga. Lisaks viisin rakkudesse samas koguses tühja pCG vektorit ning bakteriaalset valku ekspresseerivat pCG β -gal-i, et välistada võimalike efektide tulenemist rakkudesse võõr-DNA või -valgu viimisest. Totaalse RNA kogusin 24 h pärast transfektsiooni.

Uuritavate geenide basaalsel taset *northern blot* meetodiga ei õnnestunud detekteerida (joonis 10A; B; C rajad 1-3). BAX-i ja p21 signaal oli nähtav rakkudes, kuhu oli viidud p19^{ARF}-i ekspresseeriv plasmiid (joonis 10A, B, C rada 4), seda nii wt MSF-ide, ARF^{-/-} kui ka p53^{-/-} MEF-ide puhul. MDM2 signaali ei õnnestunud vastuseks transfektsioonile p19^{ARF}-ga detekteerida üheski uuritud rakuliinis (joonis 10).

4.4. Endogeense p19^{ARF}-i indutseerimine

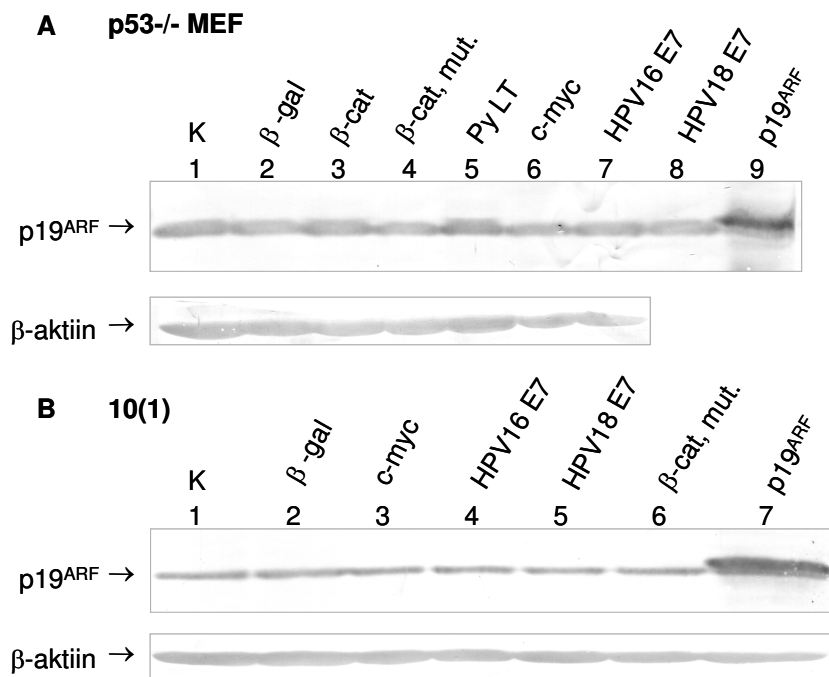
Kuigi p19ARF üleekspressioonitingimustes indutseerusid p53-e märklaudgeenid p21 ja BAX, huvitas mind, kuivõrd adekvaatne on saadud tulemus endogeense p19^{ARF} induktsiooni puhul. Endogeense p19^{ARF}-i indutseerimiseks kasutasin erinevaid onkogeene, mis kirjanduse põhjal peaksid tõstma ARF-i ekspressioonitaset – c-myc, β -kateniin, muteeritud β -kateniin, polüoomiviiruse LT antigeen, inimese papilloomiviiruse tüüp 16 ja tüüp 18 E7



Joonis 10. eksogeense p19ARF-I mõju p53 märklaudgeenide transkriptsioonitasemele. Northern blot analüüs. Kasutati wt MSF (A), ARF^{-/-} (B) ja p53^{-/-} (C, D) MEF-e. Rakke transfekteeeriti 5 µg tühja pCG, pCGβ-gal, pCGp19ARF, c-myc, 3F12pCGp73, pSCTHPV16 E7 ja pSCTHPV18E7-ga. Totaalne RNA koguti 24 h pärast transfektsiooni, RNA lahutati 1 % -sel agaros-formaldehüüd geelil ning kanti nitrotselluloosfiltrile. Filtrit hübridiseeriti pBluescript SK+ vektorilt sünteesitud vastavalt kas p21, MDM2, BAX-i või GAPDH ³²P-UTP-ga märgistatud RNA prooviga. Signaal detekteeriti filmil või Phosphoimager'il. GAPDH-d kasutati sisemise kontrollina radadele kantud materjali koguse määramiseks. ARF^{-/-} MEF-ides (B) MDM2 proovi puhul on sisemise kontrollina kasutatud 28S rRNA-d (värvitud EtBr-ga). K – transfekteeerimata rakud.

valgud. Transfekteerisin p53^{-/-} MEF-e 5 µg DNA-ga PEI meetodil. Rakud lüüsisin 24 tundi pärast transfektsiooni ning vaatasin p19^{ARF} valgu taset *western blot* meetodil. Endogeense p19^{ARF}-i induktsiooni p53^{-/-} MEF-ides ei õnnestunud detekteerida ühegi onkogeeni puhul (joonis 11A, rajad 2-8). Sama katset kordasin 10(1) rakuliinis, kus samuti puudub p53. Ka neis rakkudes ei õnnestunud p19^{ARF}-i induktsiooni detekteerida (joonis 11B, rajad 2-6).

Kuigi endogeense ARF-i valgu induktsiooni ei õnnestunud detekteerida, vaatasin potentsiaalselt endogeenset p19ARF-i indutseerivate onkogeenide mõju p53 märklaudgeenide transkriptsiooni aktivatsioonile *northern blot* meetodil. Transfekteerisin rakke 5 µg c-myc, HPV16E7 ja HPV18E7-e ekspresseerivate plasmiididega. P53 märklaudgeenide BAX-i ja p21 transkriptsiooni aktivatsiooni ei õnnestunud vastuseks transfektsioonile onkogeenidega detekteerida (joonis 10D, rajad 3-5; A, rada 5).



Joonis 11. Erinevate onkogeenide mõju endogeense p19^{ARF} valgu tasemele p53^{-/-} MEF-ides ja 10(1) rakkudes. Rakke transfekteeriti 5 µg pCGβ-gal, pC1-neo-β-kateniiniXL, muteeritud pC1-neo-β-kateniiniS33Y, pCGPyLT, pCGc-myc, pSCTHPV16E7, pSCTHPV18E7 ja pCGp19^{ARF}-i ekspresseeriva plasmiidiga. K – transfekteerimata rakud. P19ARF detekteeriti pAb p19^{ARF} (Abcam Ltd.) antikehaga. Sisemise kontrollina on kasutatud β-aktiini.

4.5. ARF-i p53-st sõltumatu transkriptsiooni aktivatsiooni mehhanismi uurimine

Järgnevalt huvitas mind mehhanism, mille kaudu ARF aktiveerib p21 ja BAX-i transkriptsiooni p53-sõltumatult. Potentsiaalne kandidaat, kes samuti võiks p53-e märklaudgeenide transkriptsiooni aktiveerida, on p53 perekonna üks liikmetest, p73. Selleks, et uurida p73-e osalust p53-e märklaudgeenide aktivatsioonis, transfekteerisin p53-/- MEF-e hiire p73-e ekspresseeriva plasmiidiga. P21 ja BAX-i transkriptsiooni aktivatsiooni ei õnnestunud detekteerida (joonis 10D, rada 6). Kuna on näidatud, et p73 peab olema mõningate apoptoosis osalevate valkude geenide aktiveerimiseks atsetüleeritud vormis (Costanzo *et al.*, 2002), võib ARF olla vajalik p73 post-translatsioonilise modifitseerimise juures ning seega eksogeense ARF-i osaluseta ei ole ka üleekspresseeritud p73 võimeline transkriptsiooni aktiveerima.

5. Arutelu

Transfektsioonimetoodika

Eukarüootsete rakkude transientne transfektsioon rekombinantse DNA-ga on laialt levinud ning mugav meetod valkude ekspressiooni ja funktsiooni uurimisel. On välja töötatud mitmeid transfektsioonimeetodeid, kuid on üsna vähe teada nende meetodite mõjust raku elutegevusele ning sealhulgas tuumorsupressor p53-le. Kuna p53 on üks olulisemaid regulaatoreid raku vastuses keskkonnast tingitud stressile, põhjustades rakutsükli peatumist või rakkude apopteerumist, on oluline teada, kuidas rakubioloogilistes töödes kasutatavad transfektsioonimeetodid mõjutavad p53 taset rakus ning viimase transkriptsioonilist aktiivsust.

Uurides meie laboris sageli kasutatava elektroporatsiooni mõju p53-e tasemele ning transkriptsioonilisele aktiivsusele, leidsin, et inimese MCF-7 rakkudes tõusis p53 valgu tase juba vastuseks rakkude elektroporeerimisele. Poreerimisel kandja-DNA-ga tõusis p53 tase veelgi. Samuti nägin tõusu p53-e märklaudgeenide p21 ja MDM2 tasemes. Rakkude transfektsioonilisel superspiraliseerunud DNA-ga p53-e tase võrreldes kandja-DNA-ga transfektsioneeritud rakkudega ei tõusnud. P53-e tasemele ei avaldanud mõju ka teadaolevalt p53-ga mitteseotud võõrvalgu ekspressioon. Immuunofluorestsentsanalüüsil nägin, et p53, mis MCF-7 rakkudes lokaliseerub tsütoplasmas, liikus elektroporatsiooni mõjul tuuma ning tema signaal intensiivistus. Kandja DNA-ga poreerides ei tõusnud küll aktiveeritud p53-ga rakkude arv, küll aga tugevnes p53-e signaal veelgi. Seega ei mõjuta kandja-DNA-ga poreerimine elektroporatsioonist mõjutatud rakkude arvu, küll aga põhjustab p53 akumulatsiooni kasvu, viidates p53-st sõltuvate signaaliradade aktivatsioonile vastuseks kahjustatud DNA viimisele rakkudesse.

Elektroporatsioon iseenesest on võimeline rakkudes kutsuma esile p53-vastuse kas otseselt, kahjustades DNA-d, või aktiveerides rakusiseseid nukleaaase,

muutes rakusisest ioonide tasakaalu. Kandja-DNA-s esineb hulgaliselt DNA katkeid ning vabu DNA otsi, mis mimikeerivad DNA-kahjustust. See on aga otseseks signaaliks p53-e aktiveerimiseks.

Lisaks minu poolt kasutatud MCF-7 rakkudele, on meie laboris uuritud elektroporatsiooni mõju p53 tasemele, transkriptsioonilisele aktiivsusele ning raku bioloogilist vastust sellele ka teistes rakuliinides. Elektroporatsiooniprotseduur ise indutseeris S-faasi aresti ning apoptoosi nii p53-positiivsetes NIH3T3 rakkudes kui ka p53-negatiivsetes 10(1) rakkudes. Kandja-DNA-ga poreerimine suurendas neid efekte veelgi. Seega elektroporatsiooni poolt aktiveeritav DNA kahjustuse äratundmine võib toimuda ka p53-sõltumatult.

Otsides alternatiivseid rakkude transfektsioonimeetodeid, leiti, et kasutades polüetüleenimiini (PEI-) –transfektsiooni, ei esine rakkude kasvu inhibitsiooni ning apoptoosumist. Samuti ei tõuse p53 tase ning transkriptsiooniline aktiivsus. Sellest lähtuvalt olen kasutanud oma edaspidises töös elektroporatsiooni asemel PEI-transfektsiooni.

ARF-i roll p53-e märklaudgeenide regulatsioonis

Kuna arvatakse, et ARF-il võib olla p53-e stabiliseeriv roll p53-vastuses DNA kahjustusele (Khan *et al.*, 2000), kuid ei teata, millise mehhanismi läbi see võiks toimuda, uurisin ARF-i rolli p53 märklaudgeenide transkriptsioonitaseme mõjutajana DNA kahjustuse tingimustes.

Katsete läbiviimiseks valisin erineva p53-e ja ARF-i staatusega hiire fibroblastid. DNA kahjustuse tekitamiseks kasutasin lühilainelist UVC kiirguse (254 nm) kõrget doosi (40 J/m^2). Korduvalt on näidatud et UV-kiirgus indutseerib rakkudes p53 valgu akumulatsioonist. Kontrollisin, kas UVC-kiirgus stabiliseerib p53-e ka minu valitud rakusüsteemis. *Western blot* analüüs näitas, et p53 tase tõuseb vastuseks 40 J/m^2 UVC-kiirgusele nii wt MSF-ides kui ka ARF-/- MEF-

ides. ARF-i olulisust p53 märklaudgeenide transkriptsiooni regulatsioonis uurisin RPA meetodiga.

P21 transkriptsioonitaseme tõusu vastuseks UV-kiirgusele nägin kõigis uuritud rakuliinides olenemata ARF-i ning p53-e staatusest. See on vastavuses ka kirjanduse andmetega, kus enamasti nähakse p21 stabiliseerumist vastuseks kõrgetele UV-doosidele. P21 taseme aeglasem tõus metsik-tüüpi fibroblastides võrreldes ARF-/- MEF-idega korreleerub hästi *western blot* analüüsil nähtud p53 valgu taseme tõusuga. Wt MSF-ides akumulereerub p53 valk vastuseks UV-kiirgusele aeglasemalt kui ARF-/- MEF-ides, see kajastub ka p21 transkriptsiooni aktivatsioonis. Wt rakkudes võib olla ARF-sõltuvaid kontrollmehhanisme, mis kontrollivad raku vastust DNA-kahjustusele selle algetappidel. ARF-/- MEF-ides need mehhanismid ei toimi, moduleerides sel moel p21 transkriptsiooni aktivatsiooni.

p53-/- MEF-ides on p21 taseme (nii mRNA kui valgu) tõusu vastuseks UV-kiirgusele ka varem täheldatud (Haapajarvi *et al.*, 1999). Selles protsessis olid olulised p21 promootoris asuvad Sp1 seondumiskohad. Kuna nii p53-/- kui ka p53+/+ fibroblastides oli p21 induktsioonikineetika sarnane, eeldasid autorid, et p53 ei oma otsustavat tähtsust p21 induktsioonil vastuseks UV-kiirgusele. Kõrge UV-kiirguse doosi puhul hakkas p21 tase p53-/- MEF-ides 16 h pärast induktsiooni langema, p53+/+ rakkudes aga mitte (Haapajarvi *et al.*, 1999). Sellist fenomeni seletaks üsna hästi transkriptsioonifaktorite UV-st sõltuv promootoritele toomine ning sealt viimine. Vastuseks DNA kahjustusele aktiveeritakse rakus signalisatsioonirajad, mis initsieerivad transkriptsiooni vajalikelt geenidelt ning ühe komponendi puudumine aktivatsioonirajas (antud juhul näiteks p53) on kompenseeritud teiste tegurite poolt. Rakk ei saa endale lubada luksust omada asendamatute funktsioonidega valke. Samas ilma p53-ta ei ole promootori aktivatsioon niivõrd püsiv, kui koos p53-ga. See seletaks ka p21 transkriptsioonitaseme langustendentsi minu poolt läbi viidud katsetes p53-/- MEF-ides 8 ja 12 tundi pärast induktsiooni UV-kiirgusega.

MDM2 transkriptsioonitase langeb vastuseks UV-kiirgusele 4 tundi pärast induktsiooni kõigis uuritud rakuliinides ning tõuseb 8 tundi pärast induktsiooni basaalsele tasemele. Sarnast MDM2 transkriptsiooni dünaamilist vastust DNA kahjustusele on täheldatud ka varasemates töödes. On teada, et MDM2 tase langeb rakkudes p53-st sõltumatult, kuid hakkab tõusma juba p53-st sõltuvalt (Reinke & Lozano, 1997; Wu & Levine, 1997). MDM2 geenil on kaks promootorit - konstitutiivne ja p53 vastuselementi sisaldav. Konstitutiivne promootor, mis on aktiveeritud normaalsetes tingimustes, blokeeritakse DNA kahjustuse korral ning MDM2 transkriptsioon jääb sõltuvaks p53 vastuselementi sisaldavast promootorist (Saucedo *et al.*, 1998). Selline regulatsioon tagab raku jaoks adekvaatse p53 vastuse tekke DNA kahjustuse tingimustes, kuna esialgu elimineeritakse p53 negatiivne regulaator, võimaldades p53 taseme tõusu, mis omakorda aktiveerib MDM2 tagades negatiivse tagasiside ning p53 aktiivsuse elimineerimise, kui seda enam ei vajata ning see võib rakule pigem kahjulikuks osutada.

Minu katsetes tõusis MDM2 transkriptsioonitase 12 tundi pärast kiiritamist wt MSF-ides poolteist korda kõrgemale kiiritamata rakkude tasemest. Nii ARF-/- kui p53-/- MEF-ides jäi see aga basaalsele tasemele. See viitab mõningasele ARF-i rollile MDM2 transkriptsiooni regulatsioonis.

P53-/- MEF-ides seletab MDM2 tõusu 8 h pärast UV-kiirgust MDM2 promootoris asuvad UV-le reageerivad elemendid, läbi mille aktiveeritakse MDM2 transkriptsiooni ka p53-st sõltumatult. P53 puudumine seletab MDM2 taseme languse hilisematel ajapunktidel, kuna ei aktiveerita p53-st sõltuvat promootorit.

BAX-i tase jääb wt MSF-ides ning ARF-/- MEF-ides vastuseks UV-kiirgusele samaks või näitab langustendentsi. P21 tase tõuseb samas aga märgatavalt. On näidatud, et vastuseks UV-kahjustusele aktiveeritakse esmajärjekorras transkriptsioon geenidelt, mille produktid osalevad rakutsükli peatamises ning DNA parandamises. Hilisema vastusena käivitub rakku apoptoosi viivate valkude geenide transkriptsioon. Oma katsesüsteemis olen vaadanud geenide

transkriptsiooni aktivatsiooni 12 tunni jooksul. On võimalik, et hilisematel ajapunktidel BAX-i ekspressioonitase tõuseb ning p21 tase langeb. P21 taseme langust hilisematel ajapunktidel on kirjanduses ka näidatud.

Võrreldes erineva ARF-i ja p53-e staatusega rakuliine, on ilmne, et p53-/- MEF-ides p53-e kadu mõjutab küllaltki tugevasti raku vastust DNA kahjustusele. ARF-i kadumisel on aga oluliselt väiksem efekt, piirdudes vaid vastuse amplituudiga MDM2 ja p21 puhul. UV-kiirguse mõju BAX-i tasemele raku ARF-i staatus praktiliselt ei mõjuta.

Oma katsesüsteemis kasutasin kõrgeid UV-doose. Samas on näidatud, et madalate UV-doside puhul on raku vastus DNA-kahjustusele erinev. Näiteks degradeeritakse p21, et takistada viimase seondumist DNA parandamisprotsessis osaleva PCNA-ga. On ka näidatud, et madalatel UV-dosidel (10 J/m^2) aktiveeritakse väike ribosoomide biogeneesis osalev valk nukleofosmiin, mis on võimeline aktiveerituna inhibeerima p53 vastust DNA kahjustusele ning transkriptsioonilist aktiivsust. NPM-i ei aktiveerita kõrgematel UV-dosidel. P19^{ARF} omakorda degradeerib NPM-i, aktiveerides seeläbi p53-e. Seega võib p19^{ARF} mõju p53-e märklaudgeenide transkriptsioonile avalduda vaid madalate UV-doside puhul, mida tulevikus on plaanis ka uurida.

Lisaks oleks huvitav vaadata ka UV-kiirguse mõju vaadeldud p53-e märklaudgeenide ekspressioonile valgu tasemel ning ka kiirguse mõju bioloogilist väljundit antud rakuüsteemis ja selle korrelatsiooni geenide transkriptsioonitaseme muutusega.

Edasistes katsetes huvitas mind eksogeense ARF-i mõju samade p53 märklaudgeenide transkriptsioonitasemele. ARF-iga transfekteeritud rakkudes märkasid BAX-i signaaliga seotud huvitavat fenomeni. Nimelt liikus geelil ARF-i ekspresseeriva plasmiidiga transfekteeritud rakkudes BAX-i signaal allpool võrreldes kontrollrajal oleva signaaliga. Järgnevad katsed näitasid, et selline BAX-i signaali muutumine on eelkõige ARF-spetsiifiline. Kuigi transfekteerimisel

tühja pCG vektoriga ning β -galaktosidaasi ekspresseeriva vektoriga ilmnes samuti nn lühem BAX-i signaal, oli see kordi nõrgem signaalist ARF-iga transfekteeritud rakkudes ning kontrollradadel domineeris siiski nn pikem BAX-i variant. Selline BAX-i signaali muutus viis mõtted BAX-i mRNA alternatiivse splaissingu peale vastuseks transfektsioonile eksogeense p19^{ARF}-ga. Rakkudes on leitud mitmeid BAX-i splaissvariante, mis arvatavalt omavad erinevaid bioloogilisi funktsioone (Zhou *et al.*, 1998).

Otsustasime ka *northern blot* meetodil vaadata, kuidas mõjutab p19^{ARF} üldist BAX-i mRNA taset. Ilmnes, et eksogeenne ARF aktiveeris nii BAX-i kui ka p21-e transkriptsiooni, seda kõigis vaadeldud rakuliinides. Seevastu MDM2-e signaali ei õnnestunud detekteerida üheski rakuliinis. Samas meie laboris eelnevalt tehtud katsetes näidati, et p19^{ARF} stabiliseeris MDM2 valgu tasemel. Seda võiks seletada asjaolu, et ARF võib soodustada MDM2 sumoüleeritud vormi akumulereerumist. MDM2 sumoüleerimine takistab viimase võimet iseennast ubiquitinüleerida, seega ei suunata ARF-i toimel MDM2-e proteasoomsesse lagundamisse (Xirodimas *et al.*, 2002).

Northern blot meetodil ei õnnestunud näha geenide transkriptsiooni basaalseid tasemeid, kuigi RPA meetodil õnnestus see suurepäraselt. Selle põhjuseks on arvatavasti kahe meetodi tundlikkuse vahe. RPA hübridisatsioonireaktsioon toimub väga väikeses mahus ning on äärmiselt spetsiifiline, *northern bloti* puhul toimub hübridisatsioon filtrile kantud RNA ja sünteesitud radioaktiivse proovi vahel hübridisatsioonipuhvril ning nõrgemate signaalide puhul ei pruugi me neid detekteerida.

Kui wt MSF ning ARF^{-/-} MEF-ides on p21 ning BAX-i transkriptsiooni aktivatsioon seletatav p53 stabiliseerimisega eksogeense ARF-i poolt, siis üllatuslikum oli mõlema märklaudgeeni aktivatsioon ka p53^{-/-} MEF-ides.

On näidatud et ARF on võimeline moduleerima Bcl-2 perekonna valkude hulka mitokondris (Nakazawa *et al.*, 2003). P19^{ARF}-i ekspresseeriva

retroviirusvektoriga transfekteeritud NIH3T3 rakkudes akumulereerusid pro-apoptoosilised BAX ja Bim, vähenes Bcl-2 valgu hulk ning rakud apopteerusid. BAX-i ja Bim-i valgu tase tõusis ARF-i mõjul ka neis NIH3T3 rakkudes, kuhu oli sisse viidud p53-e dominant negatiivne mutant, viidates ARF-i võimele indutseerida BAX-i ka p53-st sõltumatult. Bcl-2 tase dominant negatiivse p53 mutandi juuresolekul aga ei langenud. Samas ei suutnud dominant negatiivse mutandi sisseviimine rakkudesse täielikult inhibeerida ARF-i võimet viia rakke apoptoosi (Nakazawa *et al.*, 2003). BAX-i osalust p53-st sõltumatus apoptoosis on näidatud ka teiste autorite poolt (Suzuki *et al.*, 2003). BAX-/- MEF-ides vähenes oluliselt eksogeense p19^{ARF}-i poolt vahendatud apoptoos. P53 oli neis rakkudes inaktiveeritud SV40 LT antigeeni poolt. Samas on oluline märkida, et ka BAX-i puudumisel täheldati, kuigi väga vähesel määral, rakkude apoptoosi, mis viitab sellele, et rakus võib olla teisigi apoptoosi viivaid radasid, mis on nii BAX- kui ka p53-sõltumatud (Suzuki *et al.*, 2003). Täpset mehhanismi, mis läbi ARF BAX-i aktiveerib, pole senini suudetud kirjeldada.

Üks võimalikke variante p53 märklaudgeenide transkriptsiooni aktivatsiooniks p53-/- MEF-ides oleks aktivatsioon läbi p53-e perekonda kuuluva transkriptsioonifaktor p73-e. P53 vajab nii p63-e kui ka p73-e, et viia rakke apoptoosi. Samas on näidatud p73-e võimet põhjustada E2F1 sõltuvat apoptoosi p53-st sõltumatult (Irwin *et al.*, 2000). Oma katses transfekteerisin p53-/- MEF-e p73-e ekspresseeriva plasmiidiga, eeldades, et seeläbi võiks aktiveeruda mõningate p53-e märklaudgeenide transkriptsioon. Minu katsesüsteemis p73 transfektsioon rakkudesse ei kutsunud esile BAX-i ega ka p21 transkriptsiooni aktivatsiooni detekteeritaval tasemel. On näidatud, et mõningate apoptoosis osalevate geenide transkriptsiooni aktiveerimiseks peab p73 olema atsetüleeritud (Costanzo *et al.*, 2002). Arvestades ARF-i potentsiaalset võimet soodustada p53 fosforüleerimist vastuseks genotoksilisele stressile, võib ARF soodustada ka p73 post-translatsioonilist modifitseerimist, mistõttu rakkude transfekteerimisel vaid p73-e ekspresseeriva plasmiidiga ei näe me märklaudgeenide aktivatsiooni, kuna p19^{ARF}-i tase ei ületa vajalikku kriitilist piiri. P73 rolli kindlakstegemiseks oleks huvitav kasutada RNAi meetodit,

millega põhjustatakse p73 mRNA lagundamist ning seega supresseeritaks p73 valgu ekspressioon.

Eksogeense ARF-i ekspressiooni ning p53 märklaudgeenide transkriptsiooni aktivatsiooni bioloogilist mõju rakkude elutegevusele on meie laboris samuti vaadeldud. 24 h ja 48 h pärast transfektsiooni ei avalda eksogeenne p19^{ARF} rakutsükli profiilile p53^{-/-} ja ARF^{-/-} MEF-ides mõju. Küll aga põhjustab eksogeenne ARF nii p53^{-/-} rakkudes (10(1) ja MEF-id) kui ka ARF^{-/-} MEF-ides apoptoositaseme tõusu.

Eksogeense ARF-i mõjul aktiveerus nii BAX-i kui p21-e transkriptsioon p53^{-/-} MEF-ides. Uurimaks, kas sarnast transkriptsiooni aktivatsiooni põhjustab ka endogeenne p19^{ARF}, püüdsin indutseerida ARF-i erinevate onkogeenidega, mis kirjanduse põhjal peaksid ARF-i ekspressiooni soodustama. Oma katsesüsteemis transfekteerisin rakke (p53^{-/-} MEF-e ja 10(1)) 5 µg onkogeeni ekspresseeriva plasmiidiga. ARF-i valgu tase ei tõusnud aga vastuseks ühelegi kasutatud onkogeenile. Ka *Northern blot* analüüsil ei õnnestunud detekteerida p53 märklaudgeenide transkriptsiooni aktivatsiooni c-myc-i ja inimese papilloomiviiruse E7 valgu toimel, kuigi on näidatud, et c-myc peaks aktiveerima BAX-i ekspressiooni ka otse, ilma ARF-i induktsioonita (Mitchell *et al.*, 2000). Samuti võiks papilloomiviiruse onkogeen E7 aktiveerida p53 märklaudgeene ARF-i otseselt indutseerimata. E7 on võimeline seonduma pRB-ga, aktiveerides sel teel E2F1-sõltuva transkriptsiooni (Berezutskaya *et al.*, 1997). E2F1 otsene transkriptsioonimärklaud on aga ka p73, mis võiks aktiveerida transkriptsiooni ka BAX-i ja p21 promootoritelt. Samas võib ka selle tee puhul olla vajalik p73 post-translatsioonilise modifitseerimise indutseerimine näiteks ARF-i poolt.

On võimalus, et kasutatud rakuliinides on inaktiveeritud mõni p19^{ARF}-i aktiveerimiseks oluline komponent. Üheks potentsiaalseks variandiks võiks olla näiteks DAP-kinaas, mis indutseerib p19^{ARF}- ja p53-sõltuvalt apoptoosi vastuseks onkogeensele stressile. On näidatud, et DAP-i funktsionaalne või

geneetiline inaktivatsioon vähendab p19ARF ja p53 poolt vahendatud apoptoosi (Raveh *et al.*, 2001).

Minu töö tulemused näitavad, et ARF moduleerib vähesel määral p53-e märklaudgeenide p21 ning MDM2 aktivatsiooni amplituuti UV-kahjustuse tingimustes. BAX-i transkriptsioonilist regulatsiooni vastuseks kõrgele UVC kiirguse doosile ARF-i staatus rakkudes ei mõjuta. Samas õnnestus mul näidata, et eksogeenne ARF aktiveerib nii p21 kui BAX-i transkriptsiooni kõigis vaadeldud rakuliinides. Erilist huvi sealjuures pakub ARF-i võime aktiveerida p53-e märklaudgeene ka p53^{-/-} MEF-ides. See näitab, et ARF-i p53-st sõltumatud funktsioonid avalduvad ARF-i võimes moduleerida p53-märklaudgeenide ekspressiooni juba transkriptsiooni tasemel. Minu edasise töö eesmärgiks oleks selgitada ARF-i mõju molekulaarseid mehhanisme.

Kokkuvõte

Transkriptsioonifaktor p53 on üks olulisemaid raku genoomse stabiilsuse tagajaid. P53 põhiliseks funktsiooniks on vähkkasvajate ärahodmine, seda läbi rakutsükli regulatsioonis ning apoptoosis osalevate valkude geenide transkriptsiooni aktiveerimise ning represseerimise vastuseks genotoksilisele stressile. P53-ga seotud signaaliradade moduleerimine võib olla üheks potentsiaalseks võimaluseks vähkkasvajate ravis. Seega on oluline mõista mehhanisme, mille kaudu reguleeritakse p53-e vastust raku.

Arvatakse, et p53 transaktivatsioonilist aktiivsust mõjutab vastusena genotoksilisele stressile p53-e negatiivse regulaatori MDM2-ga seonduv ARF. Oma töös uurisin endogeense p19^{ARF}-i rolli p53 märklaudgeenide transkriptsiooni aktivatsioonis vastuseks UVC-kiirguse (40 J/m²) poolt põhjustatud genotoksilisele stressile wt MSF, ARF^{-/-} ja p53^{-/-} MEF-ides. Samuti uurisin eksogeense p19^{ARF}-i mõju p53 vastusgeenide ekspressioonile samades rakuliinides.

Eksperimentaalse töö käigus leidsin, et ARF-i puudumine mõjutab p53 märklaudgeenide p21 ja MDM2 transkriptsiooni aktivatsiooni UV-kiirguse tagajärjel vähesel määral, avaldades aktivatsiooni amplituudis. Kiirguse mõju BAX-i tasemele raku ARF-i staatus praktiliselt ei mõjuta.

Eksogeenne ARF on aga võimeline aktiveerima nii p21 kui BAX-i transkriptsiooni ning seda kõigis uuritud rakuliinides, kaasaarvatud p53^{-/-} MEF-ides. See viitab ARF-i võimele moduleerida p53-e märklaudgeenide transkriptsiooni ka p53-st sõltumatult.

Lisaks hõlmas mu töö ka rakubioloogilistes eksperimentides adekvaatse transfektsioonimetoodika leidmist. Uurisin elektroporatsiooni mõju p53 tasemele ning transkriptsioonilisele aktiivsusele MCF-7 rakkudes. Saadud tulemused on avaldatud ka artiklina (LISA 1).

Conclusion

Les effets de p19^{ARF} sur la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de p53

La protéine p53, facteur de transcription, souvent dérégulée dans beaucoup de tumeurs malignes, est un des garants le plus important de la stabilité génétique de la cellule. La fonction principale de p53 est l'activation et la répression de la transcription des gènes participant à la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, en réponse au stress génotoxique. La modulation des voies de signalisation liées à p53 peut être un des moyens potentiels pour guérir le cancer. Aussi, il est important de comprendre les mécanismes par lesquels la réponse de p53 est régulée dans la cellule.

On suppose que l'activité de la transactivation de p53 est influencée, en réponse au stress génotoxique, par ARF, qui est liée à un régulateur négatif de p53, MDM2. Dans mon mémoire de DEA, j'ai étudié le rôle de p19^{ARF} endogène dans l'activation de la transcription des gènes cibles de la p53 en réponse au stress génotoxique provoqué par l'UVC (40 J/m²), dans les MEF ARF^{-/-}, p53^{-/-} et dans la wt MSF; ainsi que l'influence de p19^{ARF} exogène sur l'expression des gènes de réponse de p53 dans les mêmes lignes cellulaires.

Au cours du travail expérimental, j'ai trouvé que l'absence d'ARF influence peu l'activation de la transcription de p21 et MDM2, gènes cibles de p53, comme conséquence de radiations UV, et qu'il existait peu de variations entre les différentes lignées cellulaires. L'influence de la radiation sur le niveau de BAX n'est presque pas influencé par le statut de ARF.

L'ARF exogène peut toutefois activer la transcription de la p21 ainsi que de BAX et cela dans toutes les lignes cellulaires étudiées, y compris dans les

MEFs p53^{-/-}. Ceci démontre la capacité de ARF à moduler la transcription de gènes cibles de p53, indépendamment de p53.

Mon mémoire comprenant également une étude sur la méthode de transfection adéquate dans les expériences biocellulaires. J'ai étudié l'impact de l'électroporation sur le niveau de p53 et sur l'activité transcriptionnelle dans les cellules des MCF-7. Les résultats ont été publiés dans un article (annexe n° 1).

Kasutatud kirjandus

Abroi, A., Ilves, I., Kivi S., Ustav, M., Analysis of chromatin attachment and partitioning functions of bovine papillomavirus type 1 E2 protein. *J Virol.* Feb;78(4):2100-13. (2004).

Alani, R.M., Young, A.Z. and Shifflett, C.B., Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16/Ink4a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 7812-6. Epub 2001 Jun 26. (2001).

Allan, L.A. and Fried, M., p53-dependent apoptosis or growth arrest induced by different forms of radiation in U2OS cells: p21WAF1/CIP1 repression in UV induced apoptosis [In Process Citation]. *Oncogene*, 18, 5403-12 (1999).

Anzola, M., Cuevas, N., Lopez-Martinez, M., Saiz, A., Burgos, J.J. and Martinez de Pancorboa, M., P14ARF gene alterations in human hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 16, 19-26. (2004).

Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R. and Martinou, J.C., Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J*, 345 Pt 2, 271-8. (2000).

Attardi, L.D., de Vries, A. and Jacks, T., Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene*, 23, 973-80. (2004).

Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K.P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L. and Wiman, K.G., p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res.*, 23, 362-9 (1995).

Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B., DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421, 499-506. (2003).

Barley, R.D., Enns, L., Paterson, M.C. and Mirzayans, R., Aberrant p21WAF1-dependent growth arrest as the possible mechanism of abnormal resistance to ultraviolet light cytotoxicity in Li-Fraumeni syndrome fibroblast strains heterozygous for TP53 mutations. *Oncogene*, 17, 533-43. (1998).

Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L. and Vousden, K.H., p14ARF links the tumour suppressors RB and p53 [letter]. *Nature*, 395, 124-5 (1998).

Bendjennat, M., Boulaire, J., Jascur, T., Brickner, H., Barbier, V., Sarasin, A., Fotedar, A. and Fotedar, R., UV irradiation triggers ubiquitin-dependent degradation of p21(WAF1) to promote DNA repair. *Cell*, 114, 599-610. (2003).

Bennett, W., Hollstein, M., Hsu, I., Sidransky, D., Lane, D., Vogelstein, B. and Harris, C., Mutational spectra and immunohistochemical analyses of p53 in human cancers. *Chest*, 101, 19S-20S (1992).

Berezutskaya, E., Yu, B., Morozov, A., Raychaudhuri, P. and Bagchi, S., Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ*, 8, 1277-86. (1997).

Bertwistle, D., Sugimoto, M. and Sherr, C.J., Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol*, 24, 985-96. (2004).

- Blattner, C., Sparks, A. and Lane, D., Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell Biol*, 19, 3704-13 (1999).
- Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54. (1976).
- Buschmann, T., Potapova, O., Bar-Shira, A., Ivanov, V.N., Fuchs, S.Y., Henderson, S., Fried, V.A., Minamoto, T., Alarcon-Vargas, D., Pincus, M.R., Gaarde, W.A., Holbrook, N.J., Shiloh, Y. and Ronai, Z., Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol*, 21, 2743-54. (2001).
- Cariello, N., Beroud, C. and Soussi, T., Database and software for the analysis of mutations at the human p53 gene. *Nucleic Acids Res.*, 22, 3549-50 (1994).
- Carnero, A., Hudson, J.D., Price, C.M. and Beach, D.H., p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. *Nat Cell Biol*, 2, 148-55. (2000).
- Cayrol, C., Knibiehler, M. and Ducommun, B., p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene*, 16, 311-20 (1998).
- Chang, C., Simmons, D.T., Martin, M.A. and Mora, P.T., Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. *J Virol*, 31, 463-71. (1979).
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M. and Green, D.R., Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*, 303, 1010-4. (2004).
- Contente, A., Dittmer, A., Koch, M.C., Roth, J. and Dobbstein, M., A polymorphic microsatellite that mediates induction of PIG3 by p53. *Nat Genet*, 30, 315-20. (2002).
- Cooke, M.S., Podmore, I.D., Mistry, N., Evans, M.D., Herbert, K.E., Griffiths, H.R. and Lunec, J., Immunochemical detection of UV-induced DNA damage and repair. *J Immunol Methods*, 280, 125-33. (2003).
- Costanzo, A., Merlo, P., Pediconi, N., Fulco, M., Sartorelli, V., Cole, P.A., Fontemaggi, G., Fanciulli, M., Schiltz, L., Blandino, G., Balsano, C. and Levrero, M., DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell*, 9, 175-86. (2002).
- Crompton, M., Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 414-9. (2000).
- Damalas, A., Ben-Ze'ev, A., Simcha, I., Shtutman, M., Leal, J.F., Zhurinsky, J., Geiger, B. and Oren, M., Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *Embo J*, 18, 3054-63 (1999).
- Dang, C. and Lee, W., Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myb, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J. Biol. Chem.*, 264, 18019-23 (1989).
- de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J. and Lowe, S.W., E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev*, 12, 2434-42 (1998).
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W. and Old, L.J., Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 2420-4. (1979).

- Derenzini, M., The AgNORs. *Micron*, 31, 117-20. (2000).
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. and Martinou, J.C., Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, 144, 891-901. (1999).
- Durocher, D. and Jackson, S.P., DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol*, 13, 225-31. (2001).
- El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B., Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.*, 1, 45-9 (1992).
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B., WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 817-25 (1993).
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. and Martinou, J.C., Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*, 20, 929-35. (2000).
- Espinosa, J.M. and Emerson, B.M., Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell*, 8, 57-69. (2001).
- Espinosa, J.M., Verdun, R.E. and Emerson, B.M., p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Mol Cell*, 12, 1015-27. (2003).
- Eymin, B., Karayan, L., Seite, P., Brambilla, C., Brambilla, E., Larsen, C.J. and Gazzeri, S., Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. *Oncogene*, 20, 1033-41. (2001).
- Eymin, B., Leduc, C., Coll, J.L., Brambilla, E. and Gazzeri, S., p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice. *Oncogene*, 22, 1822-35. (2003).
- Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Celeste, A., Ward, I., Romanienko, P.J., Morales, J.C., Naka, K., Xia, Z., Camerini-Otero, R.D., Motoyama, N., Carpenter, P.B., Bonner, W.M., Chen, J. and Nussenzweig, A., DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol*, 4, 993-7. (2002).
- Fields, S. and Jang, S.K., Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, 249, 1046-9 (1990).
- Flores, E.R., Tsai, K.Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F. and Jacks, T., p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*, 416, 560-4. (2002).
- Fridman, J.S. and Lowe, S.W., Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22, 9030-40. (2003).
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X. and Ronai, Z., Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene*, 17, 2543-7 (1998).
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S.N. and Ronai, Z., JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev*, 12, 2658-63 (1998).
- Gao, N., Hu, Y.D., Cao, X.Y., Zhou, J. and Cao, S.L., The exogenous wild-type p14ARF gene induces growth arrest and promotes radiosensitivity in human lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 127, 359-67. (2001).

- Geyer, R.K., Nagasawa, H., Little, J.B. and Maki, C.G., Role and regulation of p53 during an ultraviolet radiation-induced G1 cell cycle arrest. *Cell Growth Differ*, 11, 149-56. (2000).
- Ghosh, R., Tummala, R., Mitchell, D.L., McKay, B.C., Ljungman, M. and Rainbow, A.J., Ultraviolet radiation-induced DNA damage in promoter elements inhibits gene expression
Persistent DNA damage induced by ultraviolet light inhibits p21waf1 and bax expression: implications for DNA repair, UV sensitivity and the induction of apoptosis. *FEBS Lett*, 554, 427-32. (2003).
- Gopalakrishna Iyer, S.-F.C., Hilal Ozdag, Yataro Daigo, De-En Hu, Massimiliano Cariatì, Kevin Brindle, Samuel Aparicio, Carlos Caldas, p300 regulates p53-dependent apoptosis after DNA damage in colorectal cancer cells by modulation of PUMA/p21 levels. *PNAS*, April 27, 2004, 10.1073 (2004).
- Haapajarvi, T., Kivinen, L., Heiskanen, A., des Bordes, C., Datto, M.B., Wang, X.F. and Laiho, M., UV radiation is a transcriptional inducer of p21(Cip1/Waf1) cyclin- kinase inhibitor in a p53-independent manner. *Exp Cell Res*, 248, 272-9 (1999).
- Haupt, Y., Barak, Y. and Oren, M., Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *EMBO J.*, 15, 1596-606 (1996).
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M., Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387, 296-9 (1997).
- Hemmati, P.G., Gillissen, B., von Haefen, C., Wendt, J., Starck, L., Guner, D., Dorken, B. and Daniel, P.T., Adenovirus-mediated overexpression of p14(ARF) induces p53 and Bax-independent apoptosis. *Oncogene*, 21, 3149-61. (2002).
- Hofferer, M., Wirbelauer, C., Humar, B. and Krek, W., Increased levels of E2F-1-dependent DNA binding activity after UV- or gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res*, 27, 491-5. (1999).
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C., p53 mutations in human cancers. *Science*, 253, 49-53 (1991).
- Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kato, T. and Yuan, Z.M., Role for E2F in DNA damage-induced entry of cells into S phase. *Cancer Res*, 57, 3640-3. (1997).
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A. and Lane, D.P., Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell*, 71, 875-86 (1992).
- Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H. and Kaelin, W.G., Jr., Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature*, 407, 645-8. (2000).
- Isoherranen, K., Sauroja, I., Jansen, C. and Punnonen, K., UV irradiation induces downregulation of bcl-2 expression in vitro and in vivo. *Arch Dermatol Res*, 291, 212-6. (1999).
- Itahana, K., Bhat, K.P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R. and Zhang, Y., Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell*, 12, 1151-64. (2003).
- Jabbur, J.R., Huang, P. and Zhang, W., DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction in vivo. *Oncogene*, 19, 6203-8. (2000).
- Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A. and van Lohuizen, M., The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*, 397, 164-8. (1999).

Jaks, V., Joers, A., Kristjuhan, A. and Maimets, T., p53 protein accumulation in addition to the transactivation activity is required for p53-dependent cell cycle arrest after treatment of cells with camptothecin. *Oncogene*, 20, 1212-9. (2001).

Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A. and Bradley, A., Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature*, 378, 206-8 (1995).

Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., George, D.L. and Oren, M., Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene*, 8, 3411-6 (1993).

Kaelin, W.G., Jr., The p53 gene family. *Oncogene*, 18, 7701-5. (1999).

Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F. and Caput, D., Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 90, 809-19 (1997).

Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G. and Sherr, C.J., Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, 91, 649-59 (1997).

Kamijo, T., Weber, J., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M. and Sherr, C., Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8292-7 (1998).

Kannan, K., Kaminski, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Amariglio, N. and Givol, D., DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene*, 20, 3449-55. (2001).

Karayan, L., Riou, J.F., Seite, P., Migeon, J., Cantereau, A. and Larsen, C.J., Human ARF protein interacts with topoisomerase I and stimulates its activity. *Oncogene*, 20, 836-48. (2001).

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Craig, R.W., Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, 51, 6304-11 (1991).

Kawai, H., Nie, L., Wiederschain, D. and Yuan, Z.M., Dual role of p300 in the regulation of p53 stability. *J Biol Chem*, 276, 45928-32. (2001).

Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C. and Vogelstein, B., Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*, 252, 1708-11 (1991).

Khan, S.H., Moritsugu, J. and Wahl, G.M., Differential requirement for p19ARF in the p53-dependent arrest induced by DNA damage, microtubule disruption, and ribonucleotide depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3266-71 (2000).

Korgaonkar, C., Zhao, L., Modestou, M. and Quelle, D.E., ARF function does not require p53 stabilization or Mdm2 relocalization. *Mol Cell Biol*, 22, 196-206. (2002).

Kress, M., May, E., Cassingena, R. and May, P., Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol*, 31, 472-83. (1979).

Kubbutat, M.H., Jones, S.N. and Vousden, K.H., Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387, 299-303 (1997).

Kuo, M.L., Duncavage, E.J., Mathew, R., den Besten, W., Pei, D., Naeve, D., Yamamoto, T., Cheng, C., Sherr, C.J. and Roussel, M.F., Arf induces p53-dependent and -independent antiproliferative genes. *Cancer Res*, 63, 1046-53. (2003).

- Lakin, N.D., Hann, B.C. and Jackson, S.P., The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene*, 18, 3989-95 (1999).
- Lane, D.P. and Crawford, L.V., T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278, 261-3 (1979).
- Latonen, L., Taya, Y. and Laiho, M., UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-MDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene*, 20, 6784-93. (2001).
- Lee, S., Cavallo, L. and Griffith, J., Human p53 binds Holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *J. Biol. Chem.*, 272, 7532-9 (1997).
- Lepik, D., Jaks, V., Kadaja, L., Varv, S. and Maimets, T., Electroporation and carrier DNA cause p53 activation, cell cycle arrest, and apoptosis. *Anal Biochem*, 318, 52-9. (2003).
- Levrero, M., De Laurenzi, V., Costanzo, A., Gong, J., Wang, J.Y. and Melino, G., The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci*, 113, 1661-70 (2000).
- Li, G. and Ho, V.C., p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol*, 139, 3-10 (1998).
- Li, R., Hannon, G.J., Beach, D. and Stillman, B., Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. *Curr Biol*, 6, 189-99. (1996).
- Lin, W.C., Lin, F.T. and Nevins, J.R., Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev*, 15, 1833-44. (2001).
- Llanos, S., Clark, P.A., Rowe, J. and Peters, G., Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol*, 3, 445-52. (2001).
- Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A. and Drobetsky, E., A p53-independent pathway for induction of p21waf1cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Res.*, 57, 3390-4 (1997).
- Lowe, S.W. and Sherr, C.J., Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev*, 13, 77-83. (2003).
- Lu, X., Burbidge, S.A., Griffin, S. and Smith, H.M., Discordance between accumulated p53 protein level and its transcriptional activity in response to u.v. radiation. *Oncogene*, 13, 413-8 (1996).
- Maestro, R., Dei Tos, A.P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., Doglioni, C., Beach, D.H. and Hannon, G.J., Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev*, 13, 2207-17. (1999).
- Maignel, D.A., Jones, L., Chakravarty, D., Yang, C. and Carrier, F., Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation. *Mol Cell Biol*, 24, 3703-11. (2004).
- Maki, C. and Howley, P., Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 355-63 (1997).
- Maltzman, W. and Czyzyk, L., UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1689-94 (1984).
- Marnett, L.J., Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361-70. (2000).

- Martelli, F., Hamilton, T., Silver, D.P., Sharpless, N.E., Bardeesy, N., Rokas, M., DePinho, R.A., Livingston, D.M. and Grossman, S.R., p19ARF targets certain E2F species for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4455-60. Epub 2001 Mar 27. (2001).
- Matsuoka, M., Kurita, M., Sudo, H., Mizumoto, K., Nishimoto, I. and Ogata, E., Multiple domains of the mouse p19ARF tumor suppressor are involved in p53-independent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 301, 1000-10. (2003).
- McKay, B.C., Ljungman, M. and Rainbow, A.J., Persistent DNA damage induced by ultraviolet light inhibits p21waf1 and bax expression: implications for DNA repair, UV sensitivity and the induction of apoptosis. *Oncogene*, 17, 545-55. (1998).
- McKay, B.C., Stubbert, L.J., Fowler, C.C., Smith, J.M., Cardamore, R.A. and Spronck, J.C., Regulation of ultraviolet light-induced gene expression by gene size. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 15, 15 (2004).
- McKeller, R.N., Fowler, J.L., Cunningham, J.J., Warner, N., Smeyne, R.J., Zindy, F. and Skapek, S.X., The Arf tumor suppressor gene promotes hyaloid vascular regression during mouse eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3848-53. Epub 2002 Mar 12. (2002).
- Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W.X., Corazzari, M., Knight, R.A., Green, D.R., Thompson, C. and Vousden, K.H., p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem*, 279, 8076-83. Epub 2003 Nov 21. (2004).
- Melino, G., De Laurenzi, V. and Vousden, K.H., p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 2, 605-15. (2002).
- Meng, R.D., Phillips, P. and El-Deiry, W.S., p53-independent increase in E2F-1 expression enhances the cytotoxic effects of etoposide and of adriamycin. *Int J Oncol*, 14, 5-14 (1999).
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R. and Bradley, A., p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, 398, 708-13 (1999).
- 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., Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression. *Oncogene*, 22, 3645-54. (2003).
- Mitchell, K.O., Ricci, M.S., Miyashita, T., Dicker, D.T., Jin, Z., Reed, J.C. and El-Deiry, W.S., Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res*, 60, 6318-25. (2000).
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B. and Reed, J.C., Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 9, 1799-805 (1994).
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S. and Lozano, G., Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature*, 378, 203-6 (1995).
- Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Sczakiel, G., Grosse, F. and Deppert, W., Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J*, 14, 4442-9 (1995).
- Nakazawa, Y., Kamijo, T., Koike, K. and Noda, T., ARF tumor suppressor induces mitochondria-dependent apoptosis by modulation of mitochondrial Bcl-2 family proteins. *J Biol Chem*, 278, 27888-95. Epub 2003 May 9. (2003).

- Nichols, A.F. and Sancar, A., Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein. *Nucleic Acids Res*, 20, 2441-6. (1992).
- Nip, J., Strom, D.K., Eischen, C.M., Cleveland, J.L., Zambetti, G.P. and Hiebert, S.W., E2F-1 induces the stabilization of p53 but blocks p53-mediated transactivation. *Oncogene*, 20, 910-20. (2001).
- Nowak, J.A., Malowitz, J., Girgenrath, M., Kostek, C.A., Kravetz, A.J., Dominov, J.A. and Miller, J.B., Immortalization of mouse myogenic cells can occur without loss of p16INK4a, p19ARF, or p53 and is accelerated by inactivation of Bax. *BMC Cell Biol*, 5, 1. (2004).
- Offer, H., Erez, N., Zurer, I., Tang, X., Milyavsky, M., Goldfinger, N. and Rotter, V., The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis*, 23, 1025-32. (2002).
- Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T.J., Stinson, J.A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A.D., Peters, G. and Hara, E., Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature*, 409, 1067-70. (2001).
- Okuda, M., Horn, H.F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A.G., Chan, P.K., Knudsen, E.S., Hofmann, I.A., Snyder, J.D., Bove, K.E. and Fukasawa, K., Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell*, 103, 127-40. (2000).
- Oniscu, A., Sphyris, N., Morris, R.G., Bader, S. and Harrison, D.J., p73alpha is a candidate effector in the p53 independent apoptosis pathway of cisplatin damaged primary murine colonocytes. *J Clin Pathol*, 57, 492-8. (2004).
- Palmero, I., Pantoja, C. and Serrano, M., p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras [letter]. *Nature*, 395, 125-6 (1998).
- Passegue, E. and Wagner, E.F., JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *Embo J*, 19, 2969-79. (2000).
- Perry, M.E., Piette, J., Zawadzki, J.A., Harvey, D. and Levine, A.J., The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11623-7 (1993).
- 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., The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, 92, 713-23 (1998).
- Poon, R.Y., Jiang, W., Toyoshima, H. and Hunter, T., Cyclin-dependent kinases are inactivated by a combination of p21 and Thr-14/Tyr-15 phosphorylation after UV-induced DNA damage. *J Biol Chem*, 271, 13283-91. (1996).
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A. and Sherr, C.J., Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*, 83, 993-1000. (1995).
- Radfar, A., Unnikrishnan, I., Lee, H.W., DePinho, R.A. and Rosenberg, N., p19(Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13194-9 (1998).
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C. and Perucho, M., Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, 275, 967-9. (1997).

- Raveh, T., Droguett, G., Horwitz, M.S., DePinho, R.A. and Kimchi, A., DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol*, 3, 1-7. (2001).
- Reed, M., Woelker, B., Wang, P., Wang, Y., Anderson, M.E. and Tegtmeier, P., The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9455-9 (1995).
- Reinke, V. and Lozano, G., Differential activation of p53 targets in cells treated with ultraviolet radiation that undergo both apoptosis and growth arrest. *Radiat. Res.*, 148, 115-22 (1997).
- Rieber, M. and Strasberg Rieber, M., Apoptosis-inducing levels of UV radiation and proteasome inhibitors produce opposite effects on p21(WAF1) in human melanoma cells. *Int J Cancer*, 86, 462-7. (2000).
- Rocha, S., Campbell, K.J. and Perkins, N.D., p53- and Mdm2-independent repression of NF-kappa B transactivation by the ARF tumor suppressor. *Mol Cell*, 12, 15-25. (2003).
- Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Frame, F.M., Debatis, M.E., Sanchez, Y., Jones, S. and Kowalik, T.F., Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2. *Mol Cell Biol*, 24, 2968-77. (2004).
- Rowland, B.D., Denissov, S.G., Douma, S., Stunnenberg, H.G., Bernards, R. and Peeper, D.S., E2F transcriptional repressor complexes are critical downstream targets of p19(ARF)/p53-induced proliferative arrest. *Cancer Cell*, 2, 55-65. (2002).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., *Molecular Cloning*, Second edition ed. (1989).
- Saucedo, L.J., Carstens, B.P., Seavey, S.E., Albee II, L.D. and Perry, M.E., Regulation of transcriptional activation of mdm2 gene by p53 in response to UV radiation. *Cell Growth & Differ.*, 9, 119-30 (1998).
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Tosky, M., Levine, A. and Rotter, V., Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene*, 6, 2055-65 (1991).
- Sherr, C.J., The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 731-7. (2001).
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C., DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91, 325-34 (1997).
- Shiloh, Y., ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*, 11, 71-7. (2001).
- Shivji, K.K., Kenny, M.K. and Wood, R.D., Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*, 69, 367-74. (1992).
- Siliciano, J.D., Canman, C.E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E. and Kastan, M.B., DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes & Dev.*, 11, 3471-81 (1997).
- Smits, V.A., Klompaker, R., Vallenius, T., Rijksen, G., Makela, T.P. and Medema, R.H., p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem*, 275, 30638-43. (2000).
- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J. and Wahl, G.M., A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J*, 18, 1660-72 (1999).

- Stott, F.J., Bates, S., James, M.C., McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K.H. and Peters, G., The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *Embo J*, 17, 5001-14 (1998).
- Suzuki, H., Kurita, M., Mizumoto, K., Nishimoto, I., Ogata, E. and Matsuoka, M., p19ARF-induced p53-independent apoptosis largely occurs through BAX. *Biochem Biophys Res Commun*, 312, 1273-7. (2003).
- Zaika, A., Irwin, M., Sansome, C. and Moll, U.M., Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J Biol Chem*, 276, 11310-6. Epub 2000 Dec 13. (2001).
- Zauberman, A., Flusberg, D., Haupt, Y., Barak, Y. and Oren, M., A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acids Res.*, 23, 2584-92 (1995).
- Zeng, X., Keller, D., Wu, L. and Lu, H., UV but not gamma irradiation accelerates p53-induced apoptosis of teratocarcinoma cells by repressing MDM2 transcription. *Cancer Res*, 60, 6184-8. (2000).
- Zhang, Y. and Xiong, Y., A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science*, 292, 1910-5. (2001).
- Zhang, Y., Xiong, Y. and Yarbrough, W.G., ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*, 92, 725-34 (1998).
- Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W.H., Tom, E., Mack, D.H. and Levine, A.J., Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev*, 14, 981-93 (2000).
- Zhou, M., Demo, S.D., McClure, T.N., Crea, R. and Bitler, C.M., A novel splice variant of the cell death-promoting protein BAX. *J Biol Chem*, 273, 11930-6. (1998).
- Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W. and Chen, X., The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Research*, 58, 5061-5 (1998).
- Zhu, J.W., DeRyckere, D., Li, F.X., Wan, Y.Y. and DeGregori, J., A role for E2F1 in the induction of ARF, p53, and apoptosis during thymic negative selection. *Cell Growth Differ*, 10, 829-38. (1999).
- Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J. and Roussel, M.F., Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*, 12, 2424-33 (1998).
- Takagi, S., Ueda, Y., Hijikata, M. and Shimotohno, K., Overproduced p73alpha activates a minimal promoter through a mechanism independent of its transcriptional activity. *FEBS Lett*, 509, 47-52. (2001).
- Tao, W. and Levine, A.J., P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6937-41 (1999).
- Thornborrow, E.C. and Manfredi, J.J., The tumor suppressor protein p53 requires a cofactor to activate transcriptionally the human BAX promoter. *J Biol Chem*, 276, 15598-608. (2001).

- Tsuji, K., Mizumoto, K., Sudo, H., Kouyama, K., Ogata, E. and Matsuoka, M., p53-independent apoptosis is induced by the p19ARF tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun*, 295, 621-9. (2002).
- Ustav, M., Ustav, E., Szymanski, P. and Stenlund, A., Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *Embo J*, 10, 4321-9. (1991).
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. and Stillman, B., The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA [see comments]. *Nature*, 369, 574-8 (1994).
- Wang, J.A., Fan, S., Yuan, R.Q., Ma, Y.X., Meng, Q., Goldberg, I.D. and Rosen, E.M., Ultraviolet radiation down-regulates expression of the cell-cycle inhibitor p21WAF1/CIP1 in human cancer cells independently of p53. *Int J Radiat Biol*, 75, 301-16 (1999).
- Wang, Q. and Beck, W.T., Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer Research*, 58, 5762-9 (1998).
- Wang, Y., Reed, M., Wang, P., Stenger, J.E., Mayr, G., Anderson, M.E., Schwedes, J.F. and Tegtmeyer, P., p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes & Dev.*, 7, 2575-86 (1993).
- Watanabe, K., Ozaki, T., Nakagawa, T., Miyazaki, K., Takahashi, M., Hosoda, M., Hayashi, S., Todo, S. and Nakagawara, A., Physical interaction of p73 with c-Myc and MM1, a c-Myc-binding protein, and modulation of the p73 function. *J Biol Chem*, 277, 15113-23. Epub 2002 Feb 13. (2002).
- Weber, H.O., Samuel, T., Rauch, P. and Funk, J.O., Human p14(ARF)-mediated cell cycle arrest strictly depends on intact p53 signaling pathways. *Oncogene*, 21, 3207-12. (2002).
- Weber, J.D., Jeffers, J.R., Rehg, J.E., Randle, D.H., Lozano, G., Roussel, M.F., Sherr, C.J. and Zambetti, G.P., p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev*, 14, 2358-65. (2000).
- Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J. and Bar-Sagi, D., Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol*, 1, 20-26 (1999).
- Vousden, K.H., Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta*, 1602, 47-59. (2002).
- Wu, L. and Levine, A.J., Differential regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 genes after high-dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene. *Mol. Med.*, 3, 441-51 (1997).
- Wu, M.H. and Yung, B.Y., UV stimulation of nucleophosmin/B23 expression is an immediate-early gene response induced by damaged DNA. *J Biol Chem*, 277, 48234-40. Epub 2002 Oct 8. (2002).
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. and Levine, A.J., The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & Dev.*, 7, 1126-32 (1993).
- Xirodimas, D.P., Chisholm, J., Desterro, J.M., Lane, D.P. and Hay, R.T., P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2. *FEBS Lett*, 528, 207-11. (2002).
- Yakovleva, T., Pramanik, A., Kawasaki, T., Tan-No, K., Gileva, I., Lindegren, H., Langel, U., Ekstrom, T.J., Rigler, R., Terenius, L. and Bakalkin, G., p53 Latency. C-terminal domain

prevents binding of p53 core to target but not to nonspecific DNA sequences. *J Biol Chem*, 276, 15650-8. (2001).

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., p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*, 404, 99-103. (2000).

Yin, Y., Liu, Y.X., Jin, Y.J., Hall, E.J. and Barrett, J.C., PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression. *Nature*, 422, 527-31. (2003).

Tänuavaldused

Täna oma juhendajat Dina Lepik'ut innustava eeskuju eest. Täna kõiki sõbralikke inimesi rakubioloogia õppetoolist ning teistestki õppetoolidest nõu, jõu ja abi eest.

Aitäh Margusele ja Pillele värvide eest. Aitäh Liivile kolme koma eest. Aitäh vanaemale sooja toidu ja sooja südame eest. Aitäh emale - küll näed, lõpuks ma hakkas kõike nõnda tegema nagu Sina, sest nii on õige ja hea. Aitäh Siimule rattakummi parandamise eest. Aitäh Arnole hommikuse kaissupugemise eest. Aitäh Lainelile. Aitäh Maia-Liisale leiva ja Coca-Cola (kes oleks võinud seda arvata!) eest. Aitäh mu kursusele. *Merci*, Tiina ja Erwan :)

“Electroporation and carrier DNA cause p53 activation, cell cycle arrest, and apoptosis”

Dina Lepik, Viljar Jaks, Lilian Kadaja, Signe Värvi, Toivo Maimets
Analytical Biochemistry 318 (2003) 52-59