

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Martin Kala

**Transkriptsioonifaktori ATF4 seosed kaltsitoniini perekonna geenide  
*CALCB* ja *ADM2* ekspressiooni regulatsiooniga imetajarakus**

Bakalaureusetöö

Juhendajad  
Tiit Örd  
Prof. Jaanus Remme

TARTU 2014

# Sisukord

<b>KASUTATUD LÜHENDID.....</b>	<b>4</b>
<b>SISSEJUHATUS .....</b>	<b>5</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....</b>	<b>6</b>
1.1 <b>AKTIVEERIV TRANSKRIPTSIOONIFAKTOR 4.....</b>	<b>6</b>
1.1.1. ATF4 geeni ja valgu struktuur .....	7
1.1.2. ATF4 on translatsiooniliselt ülesreguleeritud vastusena eritüübilistele stressiseisunditele	8
1.1.3. ATF4 transkriptsiooniline ja post-translatsiooniline regulatsioon .....	9
1.1.4. ATF4 interaktsioonipartnerid ja seondumisjärjestused .....	10
1.1.5. ATF4 funktsioonid organismi tasemel ja seosed haigustega .....	11
1.2. <b>PEPTIIDHORMOON KALTSITONIINI PEREKOND IMETAJATES .....</b>	<b>12</b>
1.2.1. Kaltsitoniiniga seotud polüpeptiid $\beta$ (CALCB) geen inimeses .....	12
1.2.1.1. CALCB funktsioonid .....	13
1.2.2 Adrenomedulliin 2 (ADM2) ehk intermediin .....	13
1.2.2.1 ADM2 funktsioonid .....	14
<b>2. EKSPERIMENTAALOSA .....</b>	<b>15</b>
2.1 <b>TÖÖ EESMÄRGID.....</b>	<b>15</b>
2.2 <b>MATERJAL JA METOODIKA .....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Polümeraasi ahelreaktsioonide teostamine .....	16
2.2.1.1 PCR-id plasmiidsete konstruktide valmistamiseks vajalike DNA järjestuste paljundamiseks .....	16
2.2.1.2 PCR-id plasmiidseid konstrukte sisaldavate bakterikolooniate analüüsimiseks.....	17
2.2.2 DNA fragmentide väljapuhastamine reaktsioonisegudest .....	18
2.2.3 Konstruktide valmistamiseks kasutatud plasmiidsed vektorid .....	18
2.2.4 DNA restriksioon.....	19
2.2.5 Restrikteeritud vektorite 5' otste defosforüleerimine .....	20
2.2.6 DNA geelelektroforees .....	20
2.2.7 CALCB ja ADM2 fragmentide ligeerimine klonereimisvektorisse.....	20
2.2.8 Bakterirakkude transformatsioon .....	20
2.2.9 Bakterite kasvatamine vedelsöötmes ja plasmiidide eraldamine .....	21
2.2.10 DNA sekveneerimine .....	21
2.2.11 Inimese rakukultuuri kasvatamine.....	22
2.2.12 Eukarüootsete rakkude transfektsioon.....	22
2.2.13 Stressivastuse induktsioon koekultuuri rakkudes .....	23
2.2.14 Lutsiferaasi aktiivuse määramine .....	23
2.2.15 Tulemuste statistiline analüüs .....	24

2.3 TULEMUSED JA ARUTELU.....	25
2.3.1 CALCB ja ADM2 geenide bioinformaatiline analüüs ATF4 jaoks sobilike seondumisjärjestuste leidmiseks .....	25
2.3.2 ATF4 ja TRB3 mõju uurimine CALCB ja ADM2 ekspressioonile.....	26
2.3.3 CALCB ja ADM2 reporterkonstrukti aktiivsus rakustressi tingimustes .....	28
<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>32</b>
<b>THE EFFECTS OF ATF4 ON THE REGULATION OF CALCITONIN FAMILY GENES CALCB AND ADM2 IN MAMMALIAN CELLS .....</b>	<b>33</b>
<b>TÄNUAVALDUSED.....</b>	<b>34</b>
<b>KIRJANDUSE LOETELU.....</b>	<b>35</b>
<b>KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....</b>	<b>41</b>
<b>LIHTLITSENTS .....</b>	<b>42</b>

## Kasutatud lühendid

**ADM** – adrenomedulliin

**AP-1** – aktivaatorvalk 1 (*Activator Protein 1*)

**ATF** – aktiveeriv transkriptsioonifaktor (*Activating Transcription Factor*)

**bZip** – aluselist regiooni ja leutsiini tõmblukku sisaldav (*basic region-leucine Zipper*)

**C/EBP** – CCAAT enhanseriga seonduv valk (*CCAAT-Enhancer-Binding Protein*)

**CALCA ja -B** – kaltsitoniiniga seotud polüpeptiid  $\alpha$  ja  $\beta$  geenid

**cAMP** – tsükliline adenosiin monofosfaat (*cyclic Adenosine MonoPhosphate*)

**CGRP** – kaltsitoniini geeniga seotud peptiid (*Calcitonin Gene-Related Peptide*)

**CHOP** – C/EBP-ga homologne valk (*C/EBP Homologous Protein*)

**CRE** – cAMP vastuselement (*cAMP Responsive Element*)

**CREB** – cAMP vastuselemendiga seonduv valk (*Cyclic AMP Response Element-Binding protein*)

**CREM** – cAMP vastuselemendi modulaator (*Cyclic AMP Response Element Modulator*)

**CRLR/RAMP** – kaltsitoniini retseptori sarnane retseptor/retseptori aktiivsust modifitseeriv valk (*Calcitonin Receptor-Like Receptor/Receptor Activity Modifying Protein*)

**eIF2 $\alpha$**  – eukariootne translatsiooni initsiatsioonifaktor 2  $\alpha$  (*eukaryotic translation Initiation Factor 2  $\alpha$* )

**ER** – endoplasmaatiline retiikulum

**GCN2** – üldise aminohapete metabolismi kontrolli mitterepresseeritav mutant 2 (*General Control Nonderepressible 2*)

**h** – inimese (*human*) geenile või valgule viitav eesliide

**HRI** – heemi poolt reguleeritud inhibiitor (*Haem-Regulated Inhibitor*)

**HSV TK** – *Herpes Simplex virus* tümidinkinaas (*Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase*)

**IBMX** – 3-isobutüül-1-metüülksantiin (*3-Isobutyl-1-methylxanthine*)

**IMD** – intermediin

**PERK** – PKR-i sarnane ER kinaas (*PKR-like Endoplasmatic Reticulum Kinase*)

**PKR** – valgu kinaas R (*Protein Kinase R*)

**TNF $\alpha$**  – vähi nekroosi faktor  $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* )

**TRB3** – Tribbles homolog 3

**TSS** – transkriptsiooni alguspunkt (*Transcription Start Site*)

**uORF** – ülesvoolu asuv avatud lugemisraam (*upstream Open Reading Frame*)

**UPR** – pakkimata valkude vastus (*Unfolded Protein Response*)

**UTR** – mRNA mitte-transleeritav regioon (*UnTranslated Region*)

## Sissejuhatus

Raku välis- või sisekeskkonna muutumise järel lülituvad rakus sisse mitmed kompleksed signalisatsioonirajad, mille funktsiooniks on vahendada muutusi raku füsioloogias. Sõltuvalt rakus indutseeritud stressivastuse intensiivsusest võimaldab mitmetasandiline signaliseerimisprogramm rakul uute tingimusega kohaneda, taastades homöostaasi või, tugevama stressi korral, aktiveerida rakusurma programmi.

Üheks olulisemaks eukariootse raku stressivastuse signalisatsiooni transkriptsiooniliseks regulaatoriks on aktiveeriv transkriptsioonifaktor 4 (ATF4). Seejuures toodetakse nimetatud faktorit ka olukorras, kus raku üleüldine translatsioon on stressi tingimuses eukariootse initsiatsiooni faktori 2  $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) inhibitsiooni tõttu seiskunud. Seondudes mitmete teadaolevate DNA elementidega on ATF4 suuteline reguleerima paljude geenide ekspressiooni taset ja mõjutama selle kaudu nii raku talitlust kui ka organismi fenotüüpi, mistõttu on ATF4 märklaudgeenide identifitseerimine olulise tähtsusega. Kuna paljude levinud haiguste nagu vähi, diabeedi, isheemiatõve ja parkinsonismi patoloogia on seotud rakulise stressiga, võib stressi tingimustes indutseeritud ATF4 transkriptsiooniliste toimemehhanismide selgitamine aidata kaasa nende haigusseisundite molekulaarsete mehhanismide mõistmisele.

Selle bakalaureusetöö eesmärk on uurida ATF4 ja üldisemalt rakustressi mõju kahe võimaliku märklaudgeeni, kaltsitoniini perekonda kuuluvate *CALCB* ja *ADM2*, ekspressiooni regulatsioonile inimese rakukultuuris.

Märksõnad: Geeniekspressioon; Stressivastus; ATF4; CALCB; ADM2

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Aktiveeriv transkriptsioonifaktor 4

ATF4, mis on tuntud ka nimega CREB2 (*cyclic AMP response element-binding protein 2*), on imetajate transkriptsioonifaktor, mis kuulub aluselist regiooni ja leutsiini tõmblukku sisaldavate (*basic region-leucine Zipper*, bZip) transkriptsioonifaktorite perekonda (Ameri ja Harris, 2008). ATF4 paigutatakse ATF/CREB alam perekonda, kuhu kuuluvad inimese transkriptsioonifaktoritest veel CREB, CREM, CREB314, CREB-H ning ATF1, ATF2, ATF3, ATF5, ATF6, ATF7 ja B-ATF (Persengiev ja Green, 2003). Nagu tüüpiline bZip transkriptsioonifaktoritele, seondub ka ATF4 DNA-ga dimeriseerunud kujul ja sellel on hulgaliselt erinevaid dimerisatsioonipartnereid, millest sõltub ka transkriptsioonifaktori spetsiifika (Hai ja Curran, 1991).

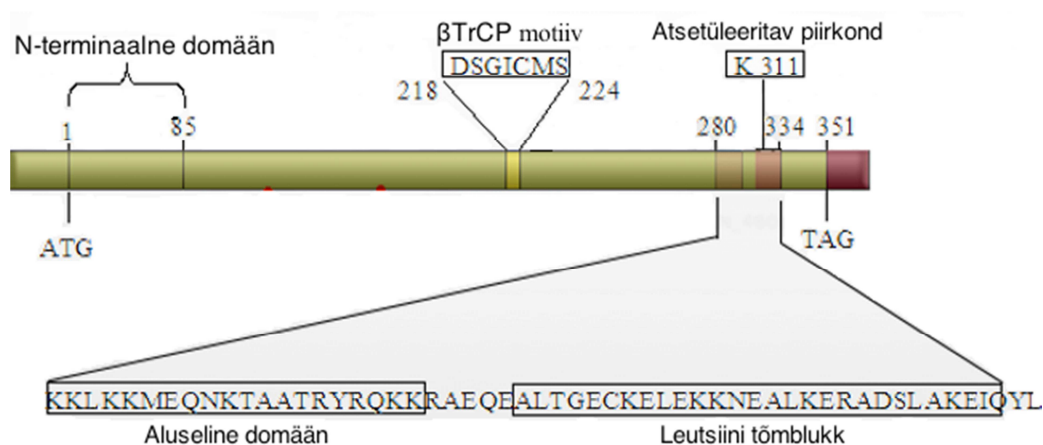
ATF4-le on iseloomulik ekspresioonitaseme tõus vastusena mitmesugustele stressiseisunditele nagu näiteks hapnikupuudus (Ameri jt., 2004; Blais jt., 2004), endoplasmaatilise retiikulumi (ER) stress (Whitney jt., 2009), aminohapete defitsiit (Siu jt., 2002) ja oksüdatiivne stress (Harding jt., 2003). ATF4 omakorda reguleerib selliste geenide ekspressiooni, mis on rakule vajalikud eelpool nimetatud sise- või väliskeskkonnas toimunud ebasoodsate muutuste poolt põhjustatud stressiseisundite leevendamiseks ning selle läbi homöostaasi taastamiseks (Ameri ja Harris, 2008).

ATF4 märklaudgeenide hulgas on nii rakustressiga kohanemist võimaldavaid geene, stressivastuse regulaatoreid kui ka rakusurma käivitamises osalevaid geene. Näiteks on ATF4 üks aminohapete metabolismi põhilistest regulaatoritest, aktiveerides suurt osa geenidest, mis kodeerivad aminohapete biosünteesi, aminohapete transpordi ja aminoatsüül-tRNA-de sünteesiga seotud valke (Harding jt., 2003). Samuti aktiveerib ATF4 mitmeid geene, mille produktid on seotud anti-oksüdantse vastusega (Harding jt. 2003). Olulised rakustressi vastuse regulaatorvalgud, mille geene ATF4 aktiveerib, on näiteks GADD34 (Ma ja Hendershot, 2003) ja TRB3 (Örd ja Örd, 2005; Ohoka jt., 2005). Apoptoosi soodustavatest geenidest aktiveerib ATF4 näiteks pro-apoptoosilise transkriptsioonifaktori CHOP promotorit (Fawcett jt., 1999).

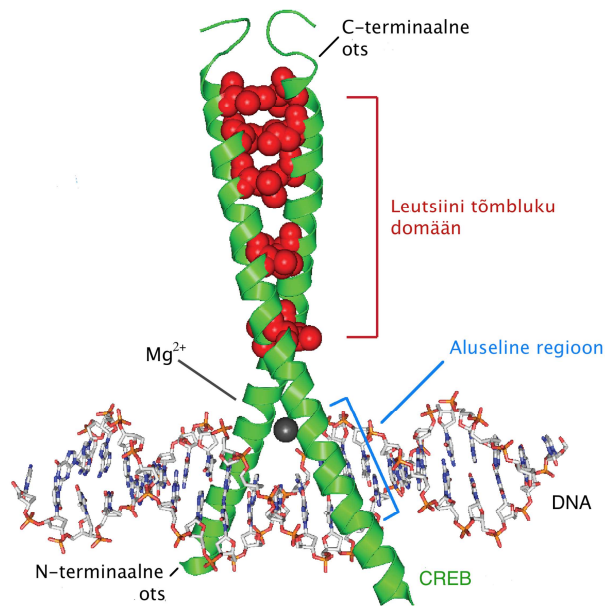
### 1.1.1. ATF4 geeni ja valgu struktuur

Inimese genoomis asub ATF4 kodeeriv geen 22. kromosoomis ja on 2123 aluspaari pikkune (referentsgenoomis GRCh38). Inimese *ATF4* mRNA sisaldab kolme lühikest avatud lugemisraami, mis asuvad ATF4 valku kodeerivast avatud lugemisraamist ülesvoolu (*upstream open reading frame*, uORF), paiknedes seega 5' mitte-transleeritavas regioonis (5' *untranslated region*, 5' UTR) (Vattem ja Wek, 2004). *ATF4* mRNA 5' UTR-i struktuur on kriitilise tähtsusega ATF4 valgu hulga regulatsiooni jaoks (kirjeldatud alateemas 1.1.4).

Inimese ATF4 valk koosneb 351 aminohappejäägist ja selles on eristatavad mitmed domäänid (joonis 1) (Schoch jt., 2001). Valgu N-terminaalses osas asub transkriptsiooni aktivatsiooni domään, mis on oluline transkriptsiooni ko-aktivaatoritega seondumiseks, ning C-terminaalselt paiknevad aluseline domään, mis on oluline DNA-ga seondumiseks, ja leutsiini tõmbluku domään, mis on oluline homo- ja heterodimeriseerumiseks teiste bZip faktoritega (joonis 2). Valgu keskosas paikneb  $\beta$ TrCP motiiv, mille kaudu reguleeritakse valgu degradeerimist (Lassot jt., 2001).



**Joonis 1. ATF4 valgu struktuur.** ATF4 N-terminaalne domään on vajalik transkriptsiooni ko-aktivaatoritega seondumiseks (transaktivatsiooni domään), valgujärjestuse keskosas paikneb  $\beta$ TrCP äratundismotiiv ning C-terminaalselt paiknevad aluseline domään ja leutsiini tõmbluku domään, mille abil ATF4 vastavalt seondub DNA-ga ja dimeriseerub teiste bZip transkriptsioonifaktoritega. Joonis Ameri ja Harrise (2008) järgi, modifitseeritud.

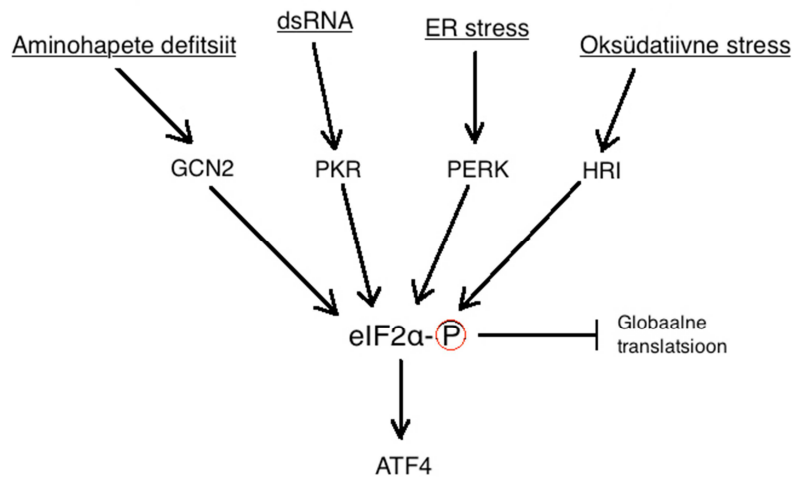


**Joonis 2. bZip transkriptsioonifaktori seondumine DNA-ga CREB-i homodimeeri näitel.** Märgitud on bZip transkriptsioonifaktorite dimeriseerumist võimaldav leutsiini tõmbluku domään ja DNA-d seondav aluseline regioon. Kujutatud on ka bZip perekonna transkriptsioonifaktorite DNA-ga seondumiseks vajalik magneesiumioon ( $Mg^{2+}$ ) (Moll jt., 2002). Joonisel ei ole näidatud N-terminaalselt paiknevat transaktiivse domääni. Joonise algvariandi tegi Curtis Neveu (en.wikipedia.org), lähtudes Protein Data Bank'i (www.rcsb.org/pdb) sissekandest 1DH3.

### 1.1.2. ATF4 on translatsiooniliselt ülesreguleeritud vastusena eritiübilistele stressiseisunditele

Vastusena stressiseisunditele käivitatakse rakus signaliseerimisrajad, mille ülesanne on võimaldada rakul uute tingimustega kohaneda. Üheks olulisemaks selliseks mehhanismiks on translatsiooni initsiatsioonifaktori eIF2 $\alpha$  töö inhibeerimine, mis toob kaasa raku globaalse translatsiooni vaigistamise ja spetsiifiliste mRNA-de (sh ATF4 mRNA) translatsiooni aktiveerumise (Vattem ja Wek, 2004). eIF2 $\alpha$  inhibeerimine toimub seriin 51 fosforüleerimise kaudu, mida võivad imetajates teostada teadaolevalt neli erinevat stressi tüübist sõltuva aktivatsioonimehhanismiga kinaasi (joonis 3) (Wek jt., 2006):

- GCN2 (*general control nondepressible 2*), mis aktiveeritakse vastusena laadimata tRNA-dele ja võimaldab rakul tunnetada aminohapete defitsiiti;
- PKR (*protein kinase R*), mis aktiveeritakse vastusena kaheaheelalise RNA esinemisele rakus ja võimaldab rakul tuvastada viirusinfektsiooni;
- PERK (*PKR-like endoplasmatic reticulum kinase*), mis aktiveeritakse vale konformatsiooniga valkude akumulatsioonil ER-is ja seega on PERK-i aktivatsioon märk ER funktsioneerimise häirest;
- HRI (*haem-regulated inhibitor*), mis aktiveeritakse heemipuuduse, aga ka oksüdatiivse stressi korral.



**Joonis 1. Eukariootse translatsiooni initsiatsioonifaktori 2α (eIF2α) fosforüleerumise signaalirada.** Kujutatud on ATF4 sünteesini viiv ja globaalset translatsiooni inhibeeriv signaalirada, mille käigus fosforüleeritakse eIF2α vastusena erinevat tüüpi stressiseisunditele.

eIF2α fosforüleerimise tulemusena aeglustub initsiaator-tRNA Met-tRNA<sub>i</sub> transport translatsiooni initsiatsiooni kompleksi ja kuna translatsiooni kiirust piirav etapp on initsiatsioon, siis langeb raku vastusena eIF2α fosforüleerimisele üldine valgusünteesi tase, vähendades sellega raku biosünteesilist koormust rakustressi korral (Clemens, 2001). Vaatamata üleüldise translatsiooni aeglustumisele suureneb selle protsessi läbi mõnede üksikute mRNA-de translatsioon, mille hulka kuulub ka ATF4 (Harding jt., 2000; Vattem ja Wek, 2004). Selle mehhanismi toimimiseks on vajalikud eelpool nimetatud uORF-id ATF4 mRNA 5' UTR-is, mis inhibeerivad normaaltingimustel ATF4 translatsiooni, kuid eIF2α fosforüleerimist põhjustava stressi korral võimaldavad ribosoomil mRNA skaneerimist jätkata kuni ATF4 startkoodonini, et ATF4 valgu transleerimist alustada (Vattem ja Wek, 2004). ATF4 kontsentratsiooni tõus raku võimaldab seejärel käivitada transkriptsiooni geenidelt, millel on ATF4 seondumisjärjestused (kirjeldatud peatükis 1.1.4).

### 1.1.3. ATF4 transkriptsiooniline ja post-translatsiooniline regulatsioon

Lisaks translatsiooni tasemel regulatsioonile reguleeritakse ATF4 aktiivsust veel ka transkriptsioonilisel ja post-translatsioonilisel tasemel.

Transkriptsioonilise regulatsiooni tasemel on täheldatud, et erinevat tüüpi stressiseisundid on võimelised ATF4 geeniekspressiooni aktiveerima. Näiteks on ATF4 mRNA kontsentratsiooni kõrgenemist täheldatud hapniku defitsiidi korral (Estes jt., 1995) ning aminohapete ja glükoosi puuduse korral (Siu jt., 2002).

Post-translatsioonilisel tasemel reguleeritakse ATF4 aktiivsust näiteks inhibiitorvalkude abil. Üks selline on TRB3, mis on võimeline ATF4 aktiivsust inhibeerima, seondudes ATF4 transaktiivatsiooni domäänile ja oletatavasti seeläbi takistades transkriptsiooni käivitumiseks vajalike ko-aktivaatorite seondumist ATF4-ga (Örd ja Örd, 2003).

ATF4 on rakus võrdlemisi lühikese elueaga valk (Vallejo jt., 1993), mida lagundatakse rakus konstitutiivselt, ja esineb mehhanisme, mille kaudu on võimalik ATF4 kontsentratsiooni mõjutada reguleerides lagundamist. ATF4 suunatakse proteasoomsele degradeerimisele SCF $\beta$ TrCP klassi kuuluva ubikvitiini ligaasi abil, mille teeb võimalikuks ATF4 valgus esinev  $\beta$ TrCP äratundmismotiiv (Lassot jt., 2001). Sellist ATF4 lagundamise mehhanismi inhibeerib histooni atsetüültransferaas p300, mis atsetüleerib ATF4 ja takistab ATF4- $\beta$ TrCP interaktsiooni toimumist, pikendades ATF4 valgu eluiga (Lassot jt., 2005).

#### **1.1.4. ATF4 interaktsioonipartnerid ja seondumisjärjestused**

ATF4 seondumine spetsiifiliste DNA järjestustega sõltub suures osas sellega eelnevalt dimeriseerunud transkriptsioonifaktorist (Hai ja Curran, 1991). Imetajates on ATF4 suuteline moodustama homodimeere ja ka heterodimeere ATF/CREB, AP-1 ja C/EBP (*CCAAT-enhancer-binding protein*) alamperekondadesse kuuluvate bZip valkudega (Ameri ja Harris, 2008). AP-1 alamperekonnast on kirjeldatud ATF4 dimeriseerumist näiteks valkudega Jun, Fos, Fra-1 (Hai ja Curran, 1991) ja JunD (Shimizu jt., 1998) ning C/EBP alamperekonnast valkudega C/EBP $\beta$  (Vallejo jt., 1993) ja CHOP (*C/EBP homologous protein*) (Gachon jt., 2001).

Suurem osa imetajates siiani kirjeldatud ATF4 reguleeritavatest geenidest aktiveeritakse ATF4 dimeriseerumisel C/EBP alamperekonda kuuluvate faktoritega C/EBP-ATF liitelemendiga (5'-NTTNCATCA-3') seondumise kaudu (Fawcett jt., 1999). Selliste DNA elementidega reguleeritakse näiteks asparagiini süntetaasi geeni (Balasubramanian jt., 2013), histooni demetülaasi JMJD3 geeni (Shan jt., 2012) ja pseudokinaasi TRB3 geeni (Örd ja Örd, 2005). Moodustades homodimeere või heterodimeriseerudes teiste ATF/CREB alamperekonnast pärit transkriptsioonifaktoritega seondub ATF4 CRE-laadsete DNA elementidega. Näiteks aktiveerib ATF4 *GADD34* transkriptsiooni, seondudes selle geeni promootoris asuva kanoonilise CRE järjestusega (5'-TGACGTCA-3') (Ma ja Hendershot, 2003), ja GRP78/BiP kodeerivat geeni, seondudes CRE-sarnase järjestusega (5'-TGACGTGA-3') (Luo jt., 2003). ATF4 paindlikkus seonduda erinevate CRE-laadsete

järjestustega on veelgi laiem, mida iseloomustab Lin'i ja Green'i (1988) kirjeldatud ATF4 konsensusjärjestus, mis on defineeritud kui 5'-TGACGT(C/A)(G/A)-3'.

Anti-oksüdantse vastuse keskse transkriptsioonifaktori Nrf2-ga dimeriseeritud kujul seondub ATF4 DNA elemendile järjestusega 5'-(T/C)GCTGAGTCA-3' heemi oksügenaasi 1 promootoril (He jt., 2001). Kompleksis cJun-ga on ATF4 suuteline seonduma ATF/AP-1 liitjärjestusega (5'-TGACGTAA-3') ja seeläbi indutseerima transkriptsiooni näiteks DNA-d parandava ensüümi Ap1 geenilt (Fung jt., 2007).

#### **1.1.5. ATF4 funktsioonid organismi tasemel ja seosed haigustega**

Kooskõlas sellega, et ATF4-1 on keskne roll raku stressisignaliseerimises, on sellel valgul leitud ka mitmeid rolle normaalses füsioloogias ja haiguste korral.

Uuringud ATF4-*knockout* hiirtel on näidanud, et tegemist on organismi normaalseks arenguks vajaliku geeniga. ATF4-*knockout* hiired on mittetäieliku silmaläätse arengu tõttu pimedad (Hettmann jt., 2000), neil esineb varajastel eluetappidel aneemia (Masuoka, 2002), nende viljakus on vähenenud (Fischer jt., 2004) ja tugieliundkonna defektse arengu tõttu on nad metsiktüüpi hiirtest väiksema kasvuga (Yang jt., 2004). ATF4 roll tugieliundkonnas on seotud ka inimese haiguse, Coffin-Lowry sündroomi, tekkimisega (Yang jt., 2004). Luukoe normaalseks arenguks on vajalik ATF4 fosforüleerimine osteoblastides: ATF4 fosforüleerimise puudumisel blokeerub osteoblastide diferentseerumine ja väheneb luukoe mineraliseerumine (Yang jt., 2004).

ATF4 roll seoses neuronite ellujäämise regulatsiooniga haigusmodelites on keerukas. Põhjus võib seisneda selles, et ATF4 aktiveerib sõltuvalt olukorrast gene, mis on olulised nii stressitingimustega kohanemiseks kui ka apoptoosi indutseerimiseks. On näidatud, et insuldi korral on ATF4-*knockout* hiirtel madalam neuronite suremus (Lange jt., 2008) ja ATF4-puudulikud neuronid on vastupidavamad ER stressile (Galehdar jt., 2010), mis viitab ATF4 pro-apoptootilisele toimele. Samas on ATF4-puudulikud neuronid tundlikumad DNA-d kahjustavatele ühenditele (Galehdar jt., 2010) ja aktiveerivad mutatsioonid ATF4 valgus suurendavad glutamaadi toksilisust närvirakkudele (Lewerenz jt., 2012), mis viitab sellele, et ATF4-1 on rakkude elulemust kaitsev funktsioon. ATF4 anti-apoptootilist rolli toetavad ka leiud, et ATF4 kaitseb apoptoosi eest parkinsonismi rakulises mudelis, aidates säilitada parkiini taset (Sun jt., 2013), mille kontsentratsiooni ja funktsiooni langust peetakse üheks parkinsonismi peamiseks põhjuseks (Poorkaj jt., 2004).

## 1.2. Peptiidhormoon kaltsitoniini perekond imetajates

Kaltsitoniini perekonna peptiidhormoonide alla kuuluvad inimeses peale kaltsitoniini enda veel ka CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*), amüliin (ehk *Islet Amyloid Polypeptide*, IAPP), adrenomedulliin (ADM) ja adrenomedulliin 2 (ADM2) (ülevaade Naot ja Cornish, 2008). Perekonnale nime andnud peptiid - kaltsitoniin - on kaltsiumi kontsentratsiooni reguleeriv hormoon, mida sünteesitakse kilpnäärmes (Copp ja Cheney, 1962). Teistel selle perekonna peptiididel on suuresti teistsugused rollid kui kaltsitoniinil.

### 1.2.1. Kaltsitoniiniga seotud polüpeptiid $\beta$ (*CALCB*) geen inimeses

Kaltsitoniini ja CGRP-d kodeerivad mRNA-d toodetakse samalt geenilt (*CALCA*) alternatiivse splaissingu mehhanismiga (Rosenfeld jt., 1983). Kaltsitoniini sünteesitakse eksonite 1-4 kokkuliitmisel saadavalt mRNA-lt ning CGRP-d kodeeriv mRNA saadakse, kui jäetakse vahele 4. ekson ja lisatakse eksonid 5-6 (Rosenfeld jt., 1983). Kaltsitoniini sünteesitakse kilpnäärmes (Copp ja Cheney, 1962), seevastu *CALCA* geenilt toodetakse CGRP-d peamiselt neuraalsetes kudedes, seega on *CALCA* mRNA alternatiivne splaissimine koespetsiifiline (Rosenfeld jt., 1983).

Inimesel ja mitmel teisel imetajaliigil esineb lisaks geenile *CALCA* ka sellega väga sarnane geen *CALCB*, kuid *CALCB* geenilt toodetakse vaid CGRP-d kodeerivat mRNA-d (Amara jt., 1985; Naot ja Cornish, 2008). Selleks, et eristada *CALCA* ja *CALCB* kodeeritud CGRP-d, nimetatakse neid peptiide vastavalt  $\alpha$ CGRP ja  $\beta$ CGRP (Amara jt., 1985). Inimese *CALCB* mRNA-lt sünteesitakse 127 aminohappejäägi pikkune eellasmolekul, millest protsessimise tulemusena saadakse 37 aminohappejäägi pikkune  $\beta$ CGRP (RefSeq järjestuse NP\_000719.1 järgi). Inimesel erineb protsessitud  $\beta$ CGRP molekul  $\alpha$ CGRP-st kolme ja rottidel ühe aminohappejäägi poolest (Amara jt., 1985; Naot ja Cornish, 2008). Fülogeneetilise analüüsi baasil on näidatud, et  $\alpha$ CGRP ja  $\beta$ CGRP geenid on suure tõenäosusega evolutsioneerunud ühest eellasgeenist läbi duplikatsiooni (Rezaeian jt, 2009). Siiani on paljudes teistes imetajate seltsides nagu sõralised (*Artiodactyla*), kiskjalised (*Carnivora*) ja kabjalised (*Perissodactyla*) täheldatud vaid ühe CGRP produktsiooni, mis pärineb *CALCA* mRNA splaiss-variandist (Rezaeian jt, 2009; Katafuchi jt., 2004).

Inimesel asub *CALCB* geen koos *CALCA*-ga 11. kromosoomi lühikesel õlal (Kittur jt., 1985).  $\beta$ CGRP on teadaolevalt ainus *CALCB* geenilt kodeeritav polüpeptiid ja pole andmeid *CALCB* alternatiivsest splaissingust (Steenbergh jt., 1986). Erinevalt *CALCA*-st ei ole

*CALCB*-1 funktsionaalsed kaltsitoniini kodeerimist määravad eksonid (Schütz jt., 2004). *CALCB* mRNA ekspressiooni on inimesel tuvastatud näiteks luukoes, ajus ja testises (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.534305>).

#### **1.2.1.1. *CALCB* funktsioonid**

$\alpha$ CGRP ja  $\beta$ CGRP funktsioone peetakse suuremas osas eristamatuteks (Hou jt., 2011) ja neile on omistatud hulka erinevaid rolle mitmesugustes rakutüüpides. CGRP on üks tõhusaimaid teadaolevaid endogeenseid vasodilataatoreid (Struthers jt., 1986) ja võib olla üks migreeni tekke põhipõhjustest (Goadsby ja Edvinsson, 1994). Neuraalsetes rakkudes on leitud, et CGRP-l on neurotrofiline aktiivsus (Buldyrev jt., 2006) ja arvatatakse, et CGRP-d sisaldavad närvirakud osalevad motoorse aktiivsuse regulatsioonis, kutsudes lihasrakus esile kontraktsiooni (Samuelson jt., 1985; Ringer jt., 2009). Immunoloogia valdkonnast on tuvastatud, et CGRP reguleerib antigeeni presentatsiooni (Wimalawansa, 1996) ja et sellel on tsütokiini TNF $\alpha$  kontsentratsiooni alandamise kaudu põletikuvastane toime (Monneret jt., 2000).

Kuna CGRP-d on üksteisele väga sarnased, siis on raske rakendada immunohistokeemilisi meetodeid spetsiifiliselt  $\alpha$ CGRP või  $\beta$ CGRP uurimiseks. Ühe lahenduse sellele olukorrale andis  *$\alpha$ CGRP-knockout* hiirte uurimine (Schütz jt., 2004). Selgus, et  $\alpha$ CGRP-st iseseisvalt on  $\beta$ CGRP tugevalt avaldunud ainult seedeelundkonnas, mis võimaldas spetsiifiliselt  $\beta$ CGRP puhul oletada seost seedeelundkonna regulatsiooniga (Hou jt., 2011; Schütz jt., 2004).

#### **1.2.2 Adrenomedulliin 2 (*ADM2*) ehk intermediin**

*ADM2*, mis on tuntud ka kui intermediin (IMD), kirjeldati inimese kaltsitoniini perekonna peptiididest kõige viimasena ja teadaolevalt on sellel *ADM*-ile sarnaseid funktsioone (Roh jt., 2004).

Inimesel asub *ADM2* geen 22. kromosoomis, kus sellelt toodetakse alternatiivse splicingu tulemusena saadud erinevatelt mRNA isovormidelt 47 aminohappejäägist koosnevat pikka (*Intermedin-Long*, *IMDL*) ja 40 aminohappejäägi pikkust lühikest (*Intermedin-Short*, *IMDS*) *ADM2* peptiidi (Roh jt., 2004). *ADM2* mRNA on ekspresseeritud mitmetes organites ja samuti on täheldatud *ADM2* ekspressiooni mitmetes vähkkasvajates (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.449099>).

### 1.2.2.1 *ADM2* funktsioonid

Kuna *ADM2* mõjutab sarnaselt *ADM*-ile rakkude füsioloogiat *CRLR/RAMP* (*calcitonin receptor-like receptor/receptor activity modifying protein*) retseptor-kompleksi vahendusel (Roh jt., 2004), on see sellel ka osaliselt sarnaseid funktsioone. *ADM*-i üheks peamiseks toimeks on vererõhu alandamine (Lainchbury jt., 1997; Kitamura jt., 1993). Lisaks rollile veresoonekonna toimimise reguleerimisel, mis on iseloomulik paljudele kaltsitoniini perekonna peptiididele, on *ADM2* puhul leitud ka võime mõjutada raku vastust stressile.

Aktiveerides *CRLR/RAMP* kompleksi vaskulaarsetes endoteeli rakkudes, alandab *ADM2* koos teiste temaga suguluses olevate peptiidhormoonidega vererõhku, kusjuures *ADM2* mõju on samaväärne või isegi suurem kui teistel kaltsitoniini perekonna peptiidhormoonidel (Roh jt., 2004). Lisaks veresoonte toimimise reguleerimisele mõjutab *ADM2* ka veresoonte arengut ja seeläbi on *ADM2* peptiidil oluline roll vähkkasvaja angiogeneesil, mistõttu on *ADM2* uus potentsiaalne sihtmärk vähi angiogeneesi tõkestamisele keskendunud vähiteraapias (Zhang jt., 2012).

Geeniekspressiooni regulatsiooni osas on teada, et *ADM2* geenil on östrogeeni retseptori seondumisjärjestus (Lin Chang jt., 2005) ja *ADM2*-le on omistatud erinevaid funktsioone reproduktiivbioloogias (Chauhan jt., 2007; Chauhan jt., 2006; Chauhan jt., 2009).

Rakustressi kontekstis on *ADM2* peptiidil täheldatud mitmeid rolle, mille ühendav joon on see, et *ADM2* on parandanud raku elulemust. Näiteks on *ADM2* suuteline inhibeerima apoptoosi inimese kopsuarteri endoteeli rakkudes ning stabiliseerima kopsus põletiku ja hüpoksia poolt põhjustatud mikrovaskulaarset permeabiilsust (Pearson jt., 2009). Samuti aeglustab *ADM2* hüpoksiast tingitud apoptoosi südamelihaskudedes, aktiveerides Akt signaliseerimisrada (Song jt., 2009). Akt raja kaudu inhibeerib *ADM2* ka hüpoksiast tingitud ER stressi (Teng jt., 2011). *ADM2* on seostatud ka oksüdatiivse stressi leevendamisega, vähendades hapniku vabade radikaalide teket (Bell jt., 2008). Seega on *ADM2* oluline rakustressi modulaator, kuid *ADM2* geeniekspressiooni regulatsiooni mehhanismid rakustressi kontekstis pole hetkel veel selged.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Bakalaureusetöö eesmärkideks on:

- otsida ATF4-sõltuva regulatsiooni kandidaatgeenide *CALCB* ja *ADM2* järjestustest ATF4 seondumissaitidele vastavaid järjestuselemente;
- koostada reporterplasmiididel põhinev katsesüsteem, millega oleks võimalik uurida potentsiaalseid ATF4-tundlikke alasid inimese *CALCB* ja *ADM2* geenides;
- selgitada, kas ATF4 mõjutab *CALCB* ja *ADM2* geenide ekspressiooni regulaatoralade transkriptsioonilist aktiivsust inimese rakuliinis;
- selgitada, kas TRB3 inhibeerib *CALCB* ja *ADM2* reporterplasmiidide aktivatsiooni;
- selgitada, kas *CALCB* ja *ADM2* reporterplasmiidid aktiveeritakse rakustressi tingimustel inimese rakkudes.

## 2.2 Materjal ja meetodika

### 2.2.1 Polümeraasi ahelreaktsioonide teostamine

Reaktsioonisegud valmistati jääl ja kõik PCR-id teostati aparaadiga Mastercycler Gradient (Eppendorf). Oligonukleotiidide sulamistemperatuuride kalkuleerimiseks kasutati firma Thermo Scientific koduleheküljel olevat veebirakendust (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>).

#### 2.2.1.1 PCR-id plasmiidsete konstruktide valmistamiseks vajalike DNA järjestuste paljundamiseks

PCR-i praimerid disainiti väljapoole *CALCB* ja *ADM2* geenide potentsiaalseid ATF4 seondumissaite sisaldavaid piirkondi. Soovitud DNA fragmentide pikkus oli *CALCB* puhul 435 bp ja *ADM2* puhul 124 bp. Et ülespaljundatud DNA regioone oleks hiljem võimalik restriктаasidega lõigata, kasutati primereid, mille 5' otsesse olid lisatud soovitud restriksioonisaaidid. Selleks, et vähendada punktmutatsioonide tekke tõenäosust, kasutati kloneerimisel Phusion High-Fidelity DNA polümeraasi (Finnzymes).

#### Kloneerimise PCR-ides kasutatud praimerite järjestused (5' → 3'):

*CALCB* jaoks (alla on joonitud Kpn I ja Hind III restriksioonisaaidid)

*Sense* CACGGTACCGCTGGATTCGGGTCCCTCACT

*Anti-sense* GTGAAGCTTGACCCGGGATGAACACCACAC

*ADM2* jaoks (alla on joonitud Xba I restriksioonisaaidid)

*Sense* ATATCTAGAGCCCGGATCCCGACGGC

*Anti-sense* GTGTCTAGATGGGTTTGACGGGTCGC

## Reaktsioonisegu komponendid

<b>Komponent</b>	<b>Lõppkontsentratsioon</b>
5X Phusion HF puhver (Thermo Scientific)	1X
4dNTP-d (25 mM igaüks) (Fermentas)	200 µM igaüks
praimerid (100 µM) (DNA Technology A/S)	0,5 µM kumbki
inimese rakuliini HepG2 genoomne DNA	4 ng/µl
Phusion DNA polümeraas (2 U/µl) (Finnzymes)	0,02 U/µl
H <sub>2</sub> O	mahuni 50 µl

## PCR-i programm:

<b>Reaktsiooni etapp</b>	<b>Temperatuur</b>	<b>Aeg</b>
Algne denaturatsioon:	98 °C	30 sekundit
Paljundamine (35 tsükli):		
Denaturatsioon:	98 °C	15 sekundit
Seondumine:	66 °C	15 sekundit
Süntees:	72 °C	10 sekundit
Otste täissünteesimine, 1 tsükkel:	72 °C	5 minutit

### **2.2.1.2 PCR-id plasmiidseid konstrukte sisaldavate bakterikolooniate analüüsimiseks**

Pärast bakterirakkude transformeerimist ligeerimissegudega kontrolliti saadud bakterikolooniaid PCR-i abil. Plasmidi sisestatud DNA järjestuse suuna ja korduste kontrollimiseks teostati PCR-id, kasutades kloneerimisel kasutatud *sense* praimerit (2.2.1.1.) ja *anti-sense* praimerit kloneerimisvektorist (*CALCB* kontrollimisel *anti-sense* praimer järjestusega 5'-CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA-3' ja *ADM2* kontrollimisel *anti-sense* praimer järjestusega 5'-CATAAGTGCGGCGACGATAG-3').

## Reaktsioonisegu komponendid

<b>Komponent</b>	<b>Lõppkontsentratsioon</b>
10X PCR-i puhver Yellow (Naxo)	1X
4dNTP-d (25 mM igäüks) (Fermentas)	200 µM igäüks
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Naxo)	2 mM
praimerid (100 µM) (DNA Technology A/S)	0,2 µM kumbki
Hot-Start Taq DNA polümeraas (10 U/µl) (Naxo)	0,02 U/µl
H <sub>2</sub> O	mahuni 15 µl
baktereid kolooniast (steriilse tikuga)	määratlemata

### PCR-i programm:

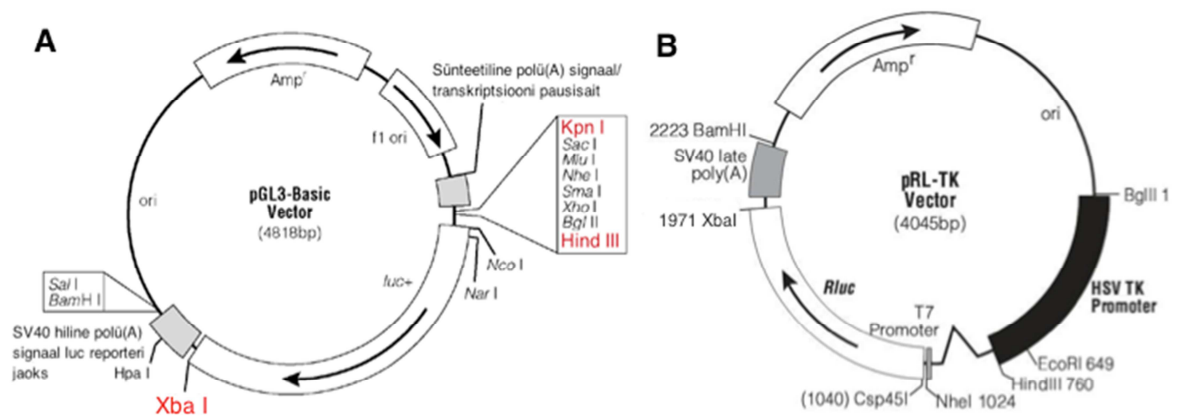
<b>Reaktsiooni etapp</b>	<b>Temperatuur</b>	<b>Aeg</b>
Algne denaturatsioon:	95 °C	15 minutit
Paljundamine (25 tsükli):		
Denaturatsioon:	95 °C	30 sekundit
Seondumine:	66 °C	30 sekundit
Süntees:	72 °C	60 sekundit
Otste täissünteesimine, 1 tsükkel:	72 °C	5 minutit

### **2.2.2 DNA fragmentide väljapuhastamine reaktsioonisegudest**

*CALCB* ja *ADM2* DNA fragmentide väljapuhastamiseks PCR-i ja restriksioonisegudest kasutati QIAquick PCR Purification Kit'i (Qiagen). Üldiselt järgiti tootja protokollit, kuid DNA elueeriti 30 µl eluatsioonipuhvriga (10 mM Tris-Cl, pH 8,5).

### **2.2.3 Konstruktide valmistamiseks kasutatud plasmiidsed vektorid**

Selleks, et uurida *CALCB* ja *ADM2* regulatsiooni lutsiferaasi reportersüsteemis, sisestati *CALCB* oletatav promooterregioon *Photinus pyralis* lutsiferaasi geeni sisaldavasse vektorisse pGL3-Basic (Promega), kasutades restriksioonisaite Kpn I ja Hind III (joonis 3A). *ADM2* geeni fragmendi uurimiseks kasutati vektorit pGL3-TK, mis on modifitseeritud pGL3-Basic vektor, mis sisaldab Bgl II ja Hind III restriksioonisaite vahel pRL-TK vektorist (joonis 3B; Promega) pärit *Herpes Simplex virus* tümidiinkinaasi (HSV TK) promootorit. *ADM2* geeni fragment sisestati pGL3-TK vektorisse kasutades Xba I restriksioonisaite.



**Joonis 3. Töös kasutatud kommertsiaalsete plasmiidide tsirkulaarsed joonised.** (A) pGL3-Basic sisaldab SV40 (*Simian Virus 40*) hilist polüadenüleerimissignaali, *Photinus pyralis*'e lutsiferaasi järjestust (*luc+*) ja transkriptsiooni pausisaiti. Punasega on märgitud töös kasutatud plasmiidsete konstruktide valmistamiseks valitud restriktioonisaidid (*Xba I*, *Hind III* ning *Kpn I*). (B) pRL-TK sisaldab HSV TK (*Herpes Simplex virus* tümidüinkinaas) promootorit ja *Renilla reniformis*'e lutsiferaasi järjestust (*Rluc*). Tähistused: *Amp<sup>r</sup>* - ampitsilliini resistentsusgeen, *ori* - replikatsiooni alguspunkt *E. coli*'s, -^ - näitab introni asukohta ja nooled tähistavad transkriptsiooni suunda (f1 *ori* puhul suunda, kuhu sünteesitakse ssDNA-d). Joonised on võetud tootja (Promega) käsiraamatutest, modifitseeritud.

## 2.2.4 DNA restriksioon

Pärast PCR-i produktide puhastamist (2.2.2) restrikteeriti *CALCB* ja *ADM2* fragmendid. *Kpn I* restriktioonisaidi lõikamiseks kasutati ensüümi *Acc65 I*, mis lõikab sama järjestust (neoskisomeer). Restriksioon toimus temperatuuri 37 °C juures 3 tundi.

### Reaktsioonisegu *CALCB* fragmendi lõikamiseks

Komponent	Kogus
QIAquick eluaat ( <i>CALCB</i> DNA fragment)	mahuni 16,5 µl
10X puhver Tango (Fermentas)	2X
restriktaasid <i>Acc65 I</i> (Fermentas) ja <i>Hind III</i> (Fermentas)	0,75 U/µl mõlemat

### Reaktsioonisegu *ADM2* fragmendi lõikamiseks

Komponent	Kogus
QIAquick eluaat ( <i>ADM2</i> DNA fragment)	mahuni 15 µl
10X puhver Tango (Fermentas)	1X
restriktaas <i>Xba I</i> (Thermo Scientific)	1,5 U/µl

Plasmiide pGL3-Basic ja pGL3-TK (kirjeldatud alateemas 2.2.3) restrikteeriti analoogselt *CALCB* ja *ADM2* DNA fragmentidega. Plasmiidi võeti 3 µg ja reaktsioonisegusse lisati vett eelpool märgitud lõppruumalani.

### **2.2.5 Restrikteeritud vektorite 5' otste defosforüleerimine**

Vältimaks iseendaga ligeerumist töödeldi restrikteeritud plasmiidide 5' otsi fosfataasiga. Selleks kasutati vasika soole aluselist fosfataasi (Fermentas), mida lisati restriksiooni toimumise järel restriksioonisegusse 0,5 U ning inkubeeriti 30 minutit 37 °C juures.

### **2.2.6 DNA geelelektroforees**

DNA fragmentide pikkust hinnati elektroforeesiga agarosgeelis 1X TAE puhvris. DNA visualiseerimiseks lisati geeli etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,5 µg/ml. Elektroforees viidi läbi pingega 5 V/cm.

Kindla pikkusega DNA fragmentide kättesaamiseks fragmentide segust viidi läbi preparatiivne geelelektroforees, kus geel ühendati puhvriga filterpaberist sildadega ja rakendati elektrivälja tugevusega 7 V/cm. Pärast elektroforeesi lõigati geelist skalpelliga välja soovitud fragmendid 366 nm UV all.

### **2.2.7 *CALCB* ja *ADM2* fragmentide ligeerimine kloneerimisvektorisse**

Ligeerimisreaktsioonid mõlema konstrukti koostamiseks valmistati ruumalas 10,8 µl. Preparatiivsest agarosgeelist väljalõigatud geelitükk külmutati ja sulatati ning sulamisel geelitükist eraldunud vedelikku (inserti lahust) võeti ligeerimissegusse 6 µl. Analoogselt geelitükist eraldatud vektori lahust võeti 3 µl. Lisaks sisaldas ligeerimissegu 1X T4 DNA ligaasi puhvrit (Fermentas) ja 0,2 U/µl T4 DNA ligaasi (Fermentas). Uuritavad *CALCB* ja *ADM2* fragmendid ligeeriti eelnevalt restrikteeritud ja defosforüleeritud vektoritesse. Tehti ka ilma insertita kontroll-ligeerimine. Reaktsioonisegused inkubeeriti 18 °C juures 13 tundi.

### **2.2.8 Bakterirakkude transformatsioon**

*CALCB* ja *ADM2* konstruktide ligeerimissegudega transformeeriti Tõnis Ördi poolt Inoue (1990) meetodil valmistatud kompetentseid *E. coli* DH5a rakke. Rakkude aeglase sulatamise järel lisati 80 µl rakususpensioonile 4 µl ligeerimissegu ja inkubeeriti jääl 15 minutit. Seejärel tehti kuumašokk, hoides rakke 25 sekundit 42 °C juures. Lõpuks pipeteeriti

rakkudele peale 1 ml LB söödet ja inkubeeriti rakke 37 °C juures 1 tund. Transformeeritud bakterirakkude suspensioonist plaaditi 100 µg/ml ampitsilliini sisaldavatele LB tardsöötme tassidele välja 80 µl. Petri tasse inkubeeriti üleöö 37 °C juures.

Järgmisel päeval loendati tassidel kolooniad ning võrreldi inserdiga ja inserdita ligeerimissegudest saadud kolooniate arvu. Ligikaudu 10 kolooniat igalt tassilt külvati ümber uuele tassile ja kontrolliti PCR-iga (reaktsioonisegu ja programm on kirjeldatud punktis 2.2.1.2).

### **2.2.9 Bakterite kasvatamine vedelsöötmes ja plasmiidide eraldamine**

Iga bakterikultuur kasvatati plasmidi eraldamise jaoks 50 ml LB vedelsöötmes, kuhu oli lisatud 100 µg/ml ampitsilliini. Sööde inokuleeriti tardsöötmele kasvanud bakterikolooniaga, kasutades steriilset külvinõela. Kolbe vedelsöötmega hoiti üleöö loksutil 37 °C juures.

Üleöö loksutil kasvanud bakterid tsentrifugeeriti kokku, kasutades tsentrifuugi Sorvall RC-5B rootoriga HS-4 (3000 rpm, 15 minutit). Plasmiidide eraldamiseks kasutati Plasmid Midi Kit'i (Qiagen), järgides tootja protokollit. Eraldatud plasmiidse DNA kontsentratsiooni määramiseks kasutati spektrofotomeetrit NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

### **2.2.10 DNA sekveneerimine**

DNA sekveneeriti fluorestseeruvaid terminaatornukleotiidide kasutaval tsüklilisel meetodil. Sekveneerimiseks vajalikud komponendid pärinesid BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit'ist (Applied Biosystems). Koostatud plasmiidne konstruktsioon pGL3-hCALCB sekveneeriti *sense* suunast praimeriga 5'-CTAGCAAAATAGGCTGTCCC-3' ja *anti-sense* suunast praimeriga 5'-CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA-3' ning konstruktsioon pGL3-hADM2 sekveneeriti *anti-sense* suunast praimeriga 5'-CATAAGTGCGGCGACGATAG-3'.

### Sekvenerimisreaktsiooni koostis:

<b>Komponent</b>	<b>Lõppkontsentratsioon</b>
BigDye 3.1 Sequencing Buffer (5X) (Applied Biosystems)	1X
praimer (1 µM) (DNA Technology A/S)	160 nM
Sequencing Mix BigDye 3.1 (Applied Biosystems)	0,7 µl/10 µl segu
Plasmiid	30 ng/µl
H <sub>2</sub> O	mahuni 10 µl

### Sekvenerimise programm:

<b>Tsükli arv</b>	<b>Temperatuur</b>	<b>Aeg</b>
30 tsükli		
	95 °C	25 sekundit
	50 °C	20 sekundit
	60 °C	60 sekundit

Programmi lõppedes lisati reaktsioonisegule produkti sadestamiseks 2 µl kandja lahust (10 mg/ml roosa dekstraan) ja 30 µl 96% etanooli ning inkubeeriti -20 °C juures 10 minutit. Seejärel segu tseentrifuugiti (10 minutit, 16000g) ja supernatant eemaldati. Sade suspendeeriti 10 µl MegaBACE Loading Solution'iga (GE Healthcare Life Sciences). Edasi saadeti reaktsiooniproduktid Eesti Biokeskuse sekvenerimise tuumiklaborisse. Sekvenerimise andmeid analüüsiti kasutades NCBI koduleheküljel asuvat BLAST-i.

#### **2.2.11 Inimese rakukultuuri kasvatamine**

Katsetes kasutatud HEK-293 (*Human Embryonic Kidney 293*) rakuliini rakke (ATCC) kasvatati IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) söötmes, millele oli lisatud 10% veise looteserumit, 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini (kõik söötme komponendid firmalt PAA). Rakke inkubeeriti 5% CO<sub>2</sub> sisaldusega 37 °C termostaadis.

#### **2.2.12 Eukarüootsete rakkude transfektsioon**

Enne transfektsiooni arvutati välja rakupopulatsiooni tihedus, kasutades Bürkeri hemotsütomeetrit, ja külvati rakud 96-kannusele plaadile tihedusega  $7 \times 10^3$  rakku kannu kohta. Söötme ruumala oli 100 µl kannu kohta ja külvatud rakkudel lasti enne transfektsiooni üleöö kasvada.

Transfektsioonil kasutati polüetüleenimiinil baseeruvat ExGen 500 *in vitro* Transfection Reagent'i (Fermentas), jälgides tootja protokollit. Vahetult enne transfektsiooni vahetati rakkude sööde uue vastu. Söötme vahetamise järel jaotati igasse kannu transfektsioonisegu, mis sisaldas 20 µl 150 mM NaCl, 0,02 µg pRL-TK plasmidi, 0,1 µg vastavat lutsiferaasi reporterplasmidi, 0,15 µg üleekspressiooni plasmide (vastavalt TRB3 või ATF4 kodeerivat plasmidi või tühja vektorit) ning 0,9 µl ExGen 500. Transfektsioonile järgnes 24-tunnine inkubeerimine ekspressiooni stabiliseerumiseks. Iga transfektsioonikatse raames teostati kõik uuritavad tingimused duplitseeritult.

### **2.2.13 Stressivastuse induktsioon koekultuuri rakkudes**

Kakskümmend neli tundi pärast transfektsiooni eemaldati rakkudelt sööde ja lisati uus sööde, mis sisaldas 20 µM naatriumarseniiti, 2 µg/ml tunikamütsiini või üheskoos 15 µM forskoliini ja 0,5 mM IBMX-i (3-isobutüül-1-metüülksantiin), et käivitada stressivastust (kõik lisatud ühendid olid Sigma poolt toodetud). Kõikide stressitingimuste korral inkubeeriti rakke 8 tundi, mille järel määrati lutsiferaasi aktiivsus.

### **2.2.14 Lutsiferaasi aktiivsuse määramine**

*CALCB* ja *ADM2* konstruktide lutsiferaasi aktiivsuse määramiseks kasutati kahe lutsiferaasi reportersüsteemi (Dual-Luciferase Reporter Assay System; Promega), lähtudes tootja protokollist. Rakkudelt aspireeriti sööde ja rakud lüüsi, kasutades 20 µl PLB-d (Passive Lysis Buffer; Promega) ühe kannu kohta. Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks luminomeetriga Turner Designs TD-20/20 kasutati 25 µl LAR II (Luciferase Assay Reagent II; Promega) lahust, millele lisati vahetult enne mõõtmist 5 µl rakulüsaati. Seejärel tehti esimene mõõtmine, mis määras uuritavates proovides *Photinus pyralis*'e lutsiferaasi aktiivsuse. Pärast seda lisati segusse 25 µl Stop & Glo reagenti (Promega) ja mõõdeti *Renilla reniformis*'e lutsiferaasi aktiivsus.

Saadud tulemused esitati suhtelistes lutsiferaasi ühikutes (RLU, *Relative Luciferase Unit*), mille jaoks jagati iga proovi *Photinus pyralis*'e lutsiferaasi aktiivsus läbi sama proovi *Renilla reniformis*'e lutsiferaasi aktiivsusega. Uuritavate konstruktide stressi- ja normaaloleku aktiivsuse tulemused normaliseeriti vastavate kontrollide suhtes (lähtevektori lutsiferaasi aktiivsus antud tingimustel) ja indutseeritavuse määra selgitamiseks jagati stressi indutseeritavate ainetega töödeldud rakkude tulemused läbi vastavate kontrollide (tavasöötmes rakud) tulemustega.

### **2.2.15 Tulemuste statistiline analüüs**

Et kontrollida katsetulemuste andmete vastavust normaaljaotusele, kasutati Kolmogorov-Smirnovi testi. Kui uuritavad andmed olid normaaljaotusega, kasutati statistilise olulisuse selgitamiseks parameetrilist testi, milleks oli Studenti t-test (paariviisiline, kahepoolne hüpotees). Kui normaaljaotus puudus, selgitati erinevuste statistiline olulisus mitteparameetrilise Kruskal-Wallise testi abil. Tulemused loeti erinevaks, kui valimid pärinesid samast populatsioonist tõenäosusega alla 0,05. Kõik testid sooritati kasutades programmi SAS 9.0 (SAS Institute).

## 2.3 Tulemused ja arutelu

### 2.3.1 *CALCB* ja *ADM2* geenide bioinformaatiline analüüs ATF4 jaoks sobilike seondumisjärjestuste leidmiseks

*CALCB* ja *ADM2* geenid valiti uurimistöö objektideks meie laboris varasemalt tehtud ülegenoomse geeniekspressiooni analüüsi tõttu (avaldamata andmed), millest selgus, et nii *CALCB* kui ka *ADM2* võivad olla ATF4 märklaudgeenid.

NCBI andmekogust saadud inimese referentsgenoomi järjestuselt analüüsiti *CALCB* ja *ADM2* geenide oletatavaid promootoralasid (transkriptsiooni alguspunkti suhtes positsioonid -1 kuni -1000) potentsiaalsete ATF4 seondumisjärjestuste leidmiseks. *CALCB* promootoralast leiti CREB konsensusjärjestustele vastav järjestus (-212 TGACCTCA -205) ja ka C/EBP-CREB liitsaidile vastav järjestus (-138 TGACGCAAT -130) (joonis 4). *ADM2* promootoralast ei leitud potentsiaalseid ATF4 seondumisjärjestusi, kuid teades, et teistes geenides on funktsionaalseid ATF4 seondumiskohti tuvastatud ka transkriptsiooni alguspunktist allavoolu (nii intronites kui ka eksonites) (Han jt., 2013; Chen jt., 2005; Marchand jt., 2006), siis analüüsiti ka *ADM2* eksonite ja intronite nukleotiidses järjestust. Leiti, et *ADM2* esimeses eksonis, transkriptsiooni alguspunktist ligikaudu 80 bp allavoolu, paikneb C/EBP-ATF liitsaidile vastav järjestus (+81 TTGCATCA +88) (joonis 5).

```
-272 GCCCCGACTCTTAGTTGAAAAATCTCTGTCCTCTCCCAGGCTCTCCAGCTTC
      CREB konsensus
-220 CCAAGCAATGACCTCAATGAAAAAATGACAGCGGGGCGGACTGCCCCCG
      C/EBP-CREB liitsait
-170 CTCCAGAGTACCAGTGCCGGCAGTGCGAGCTATGACGCAATCGGAGCTCG
-120 GTCGGTCCTTTGATTGGCTAGTCCTGGCCACTTTGGATTGGCCGCGCGGGCT
      TATA boks
-68  GGTGGGGACCCCCCCCCTCCAGCTATCTCTGTAATAAGAGCGGGGTCTCCG
      CALCB transkriptsiooni alguspunkt
-17  CTGGGAAGGCGCCACAGCAGGTGTGGT
```

**Joonis 4. *CALCB* promootorala nukleotiidses järjestuses sisalduvad DNA elemendid.** Kujutatud on *CALCB* geeni oletatava promootorregiooni nukleotiidses järjestuses fragment, mis sisaldab endas CREB (*cAMP response element-binding protein*) konsensusjärjestusele vastavat järjestust, C/EBP (*CCAAT-enhancer binding protein*)-CREB liitsaiti, TATA boksi ning *CALCB* transkriptsiooni alguspunkti (RefSeq järjestuse NM\_000728.3 järgi). Positsioonid on nummerdatud transkriptsiooni startisaidi suhtes (esimene mRNA-sse transkribeeritav positsioon on tähistatud +1).

Transkriptsiooni alguspunkt

+1 CGCCCACGCCCCGGCGCCCCGACCGCGGAGGACTCCCCGAGCCCCGCCCCG  
ADM2 startkoodon mRNA-1 C/EBP-ATF liitsait

+51 CATGGCCCCGGATCCCCGACGGCCGCCCTGGGTTGCATCAGCCTCCTCTGCCT

+102 GCAGCTCCCTGGCTCGCTGTCCCGCAGCCTGGGCGGGGACCCGCGACCCGT

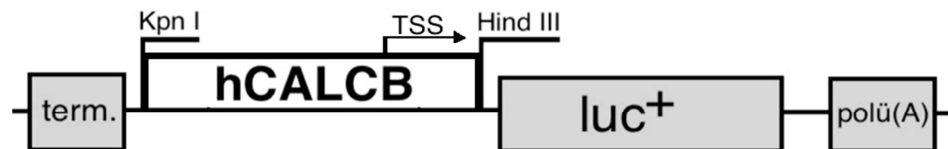
Intron 1 algus

+153 CAAACCCAGGTGAGTCC

**Joonis 5. ADM2 fragmendi nukleotiidse järjestuses sidalduvad DNA elemendid.** Kujutatud on ADM2 geeni nukleotiidse järjestuse fragment, milles asub C/EBP-ATF liitsaidile vastav järjestus. Näidatud on ADM2 transkriptsiooni alguspunkt RefSeq mRNA isovormi NM\_001253845.1 järgi. Topeltjoonega on märgitud ADM2 geeni esimese introni algus. Positsioonid on nummerdatud transkriptsiooni startisaidi suhtes.

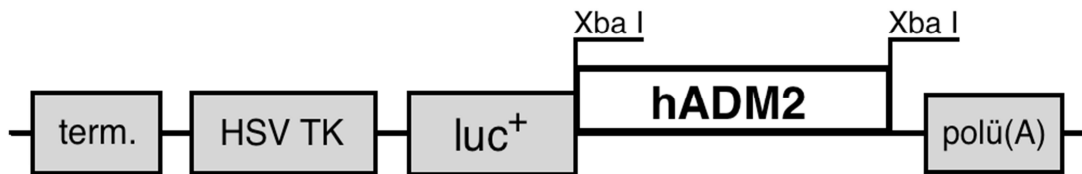
### 2.3.2 ATF4 ja TRB3 mõju uurimine CALCB ja ADM2 ekspressioonile

CALCB ja ADM2 geenide ekspressiooni regulatsiooni uurimiseks kasutati mardika (*Photinus pyralis*) lutsiferaasi geenil põhinevat reportersüsteemi. Eukariootset promotorit mittesisaldavasse plasmidi pGL3-Basic ligeeriti lutsiferaasi kodeeriva järjestuse ette CALCB ekspressiooni regulatsiooni uurimiseks 435-aluspaari pikkune CALCB promotoorregiooni fragment (joonis 6).



**Joonis 6. CALCB promotoorregiooni aktiivsuse uurimiseks valmistatud lutsiferaasi reporterkonstrukti skeem.** Plasmidi konstrueerimiseks kasutati vektorit pGL3-Basic (Promega). Kujutatud on transkriptsiooni terminatsiooni sait ("term."), mille järele, restriktioonisaitide Kpn I ja Hind III vahele, sisestati inimese (h) CALCB oletatavale promotoralale vastav regioon (0,4 kb). CALCB transkriptsiooni alguspunkt (TSS, transcription start site) asub inserteeritud DNA lõigus (vastavalt RefSeq järjestusele NM\_000728.3). Luc<sup>+</sup> tähistab *Photinus pyralis*'e lutsiferaasi. Vektorilt sünteesitavate mRNA-de poliadenüleerimiseks asub konstruktis SV40 (*Simian Virus 40*) hiline poli(A) signaaljärjestus. Joonis ei ole skaalas.

ADM2 esimeses eksonis paikneva kandidaatregiooni uurimiseks kloneeriti potentsiaalset ATF4 seondumisjärjestust sisaldav piirkond vektorisse pGL3-TK, milles lutsiferaasi ekspressiooni käivitab HSV TK promootor. Selleks, et jäljendada kandidaatelemendi paiknemist transkriptsiooni alguspunktist allavoolu, sisestati ADM2 fragment vektorisse lutsiferaasi kodeeriva järjestuse järele (joonis 7).



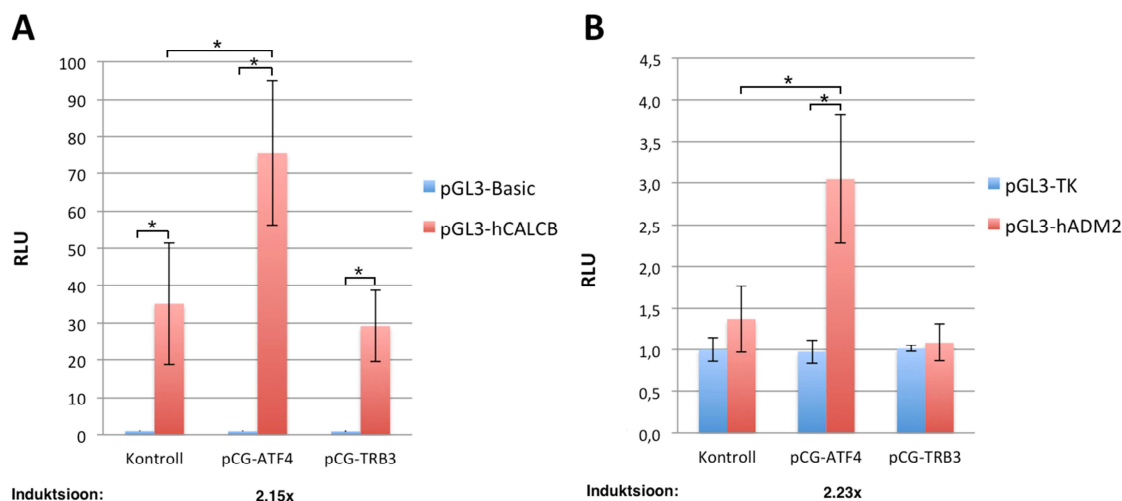
**Joonis 7. *ADM2* ekson 1-intron 1 fragmendi transkriptsioonilise aktiivsuse uurimiseks valmistatud lutsiferaasi reporterkonstrukti skeem.** Plasmidi konstrueerimiseks kasutati pGL3-TK vektorit. Kujutatud on transkriptsiooni terminatsiooni sait ("term."), millele järgnevad *Herpes Simplex* viiruse tümidüinkinaasi promootor (HSV TK) ning *Photinus pyralis*'e lutsiferaasi kodeeriv järjestus ( $luc^+$ ). Inimese (h) *ADM2* DNA lõik (0,1 kb) on sisestatud vektorisse Xba I restriksioonisaiti. Vektorilt sünteesitavate mRNA-de poliadenüeerimiseks asub konstrukti SV40 (*Simian Virus 40*) hiline poli(A) signaaljärjestus. Joonis ei ole skaalas.

Tuginedes geenide *CALCB* ja *ADM2* DNA järjestuste analüüsile ja varasemate uuringute tulemustele, et TRB3-l on ATF4 suhtes inhibeeriv toime (Örd ja Örd, 2003), püstitati kaks hüpoteesi:

1. ATF4 aktiveerib *CALCB* ja *ADM2* geenide transkriptsiooni, seondudes neis asuvate järjestusega.
2. TRB3 inhibeerib *CALCB* ja *ADM2* ekspressiooni, vähendades ATF4 aktiivsust rakus.

Nende hüpoteeside uurimiseks transfekteriti valmistatud reporterplasmiidid inimese rakuliini HEK-293 rakkudesse. Kasutati ka ko-transfekterimist ATF4 ja TRB3 ekspressiooni-plasmidega (valmistatud varasemalt meie töögrupis), et selgitada ATF4 ja TRB3 üleekspressiooni mõju *CALCB* ja *ADM2* geenide kandidaat-regioonide aktiivsusele.

Katsetulemused näitavad, et ATF4 üleekspressioon suurendab statistiliselt olulisel määral *CALCB* promootorregiooni sisaldava reporterkonstrukti aktiivsust (2,15 korda; joonis 8A) ja samuti ka *ADM2* fragmenti sisaldava reporterkonstrukti aktiivsust (2,23 korda; joonis 8B), võrreldes vastava ilma ATF4 ko-transfektsioonita kontrolliga. TRB3 üleekspressioonil ei olnud olulist mõju *CALCB* ega *ADM2* reporterplasmiidide aktiivsusele (joonis 8A ja B).



**Joonis 8.** ATF4 ja TRB3 üleekspressiooni mõju inimese (h) *CALCB* (A) ja *hADM2* (B) reporterkonstrukti aktiivsusele tavatingimustel kasvatatud HEK-293 rakkudes. *CALCB* ja *ADM2* konstrukti aktiivsiooni andmed on esitatud suhtelistes lutsiferaasi ühikutes (RLU, *Relative Luciferase Unit*) normaliseerituna vastavaid fragmente mittesisaldavate vektorite lutsiferaasi aktiivsuse suhtes (pGL3-Basic alajoonisel A ja pGL3-TK alajoonisel B). „Kontroll” tähistab proove, millele pole ko-transfekteeritud ATF4 ega TRB3 ekspressioonikonstrukte (pCG-ATF4 ja pCG-TRB3), vaid on lisatud samas koguses pCG vektorit. „Induksioon” näitab ATF4 üleekspressiooni mõjul *CALCB* ja *ADM2* reporterkonstrukti aktiivsuse kasvu kordades, võrrelduna tühja ekspressioonivektoriga transfekteeritud rakkudega („Kontroll”). \* tähistab statistiliselt olulist erinevust märgitud tingimuste võrdluses. Statistiliselt olulise erinevuse selgitamiseks kasutati Kruskal-Wallise või Studenti t-testi ja olulisusnivood 0,05. Väärtuste standardhälbed on markeeritud veeribadega ja esitatud on nelja (A) või kolme (B) sõltumatu korduskatse tulemused.

### 2.3.3 *CALCB* ja *ADM2* reporterkonstrukti aktiivsus rakustressi tingimustes

Lähtudes sellest, et ATF4-l on kriitiline roll raku stressivastuse regulatsioonil ja sellest, et *CALCB* ja *ADM2* reporterkonstrukti olid aktiveeritavad ATF4 üleekspressiooni poolt (2.3.2), püstitati hüpotees, et *CALCB* ja *ADM2* reporterkonstrukti aktiivsus tõuseb rakustressi tingimustes.

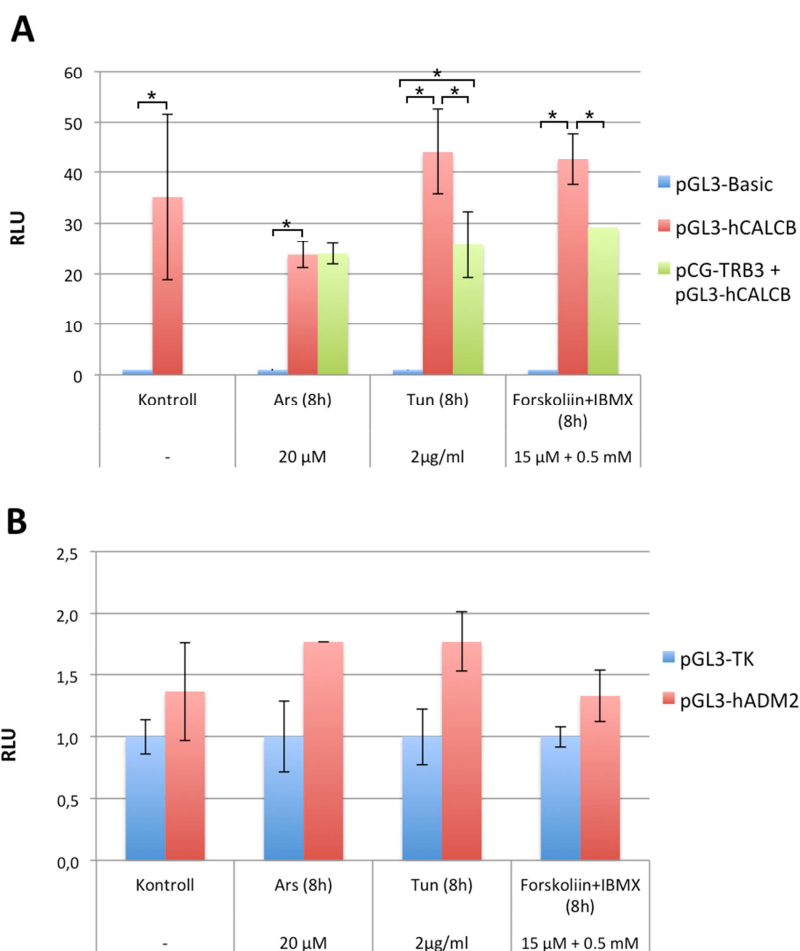
Selgitamaks stressi mõju *CALCB* ja *ADM2* reporterkonstrukti jaoks, lisati HEK-293 rakkudele 24 tundi pärast transfektsiooni aineid, mis kutsuvad esile erinevaid rakustressi vorme. Rakkudele lisati stressitingimuste indutseerimiseks vastavalt:

- naatriumarseniiti, mis kutsub esile oksüdatiivset stressi (Watson jt., 1996), mille tulemusena indutseeritakse raku ATF4 süntees (Fawcett jt., 1999);
- tunikamütsiini, mis inhibeerib N-seoselist valkude glükosüleerimist ja kutsub sellega esile pakkimata valkude stressi (UPR, *Unfolded Protein Response*) (Calton jt., 2002);
- forskoliini (adenülaadi tsüklaasi aktivaator) ja IBMX-i (cAMP fosfodiesteri inhibiitorit), mis tõstavad raku sisest cAMP kontsentratsiooni, mis aktiveerib proteiinkinaas A kaudu transkriptsioonilise regulaatori CREB (Wu jt., 1993).

Katsetulemused näitavad, et rakkude kaheksatunnisel eksponeerimisel stressi tekitavatele ainetele ei ole olulist mõju *CALCB* reporterkonstrukti aktiivsusele, võrreldes ilma stressita kontrolliga (joonis 9A). TRB3 ekspressiooniplasmiidi kotransfektsiooni korral aga *CALCB* ekspressioon langeb nii tunikamütsiiniga kui ka forskoliin+IBMX-iga töödeldud rakkudes, võrreldes ilma TRB3 ko-transfektsioonita kontrollrakkudega (joonis 9A). See tulemus on kooskõlas mehhanismiga, mille korral TRB3 piirab ATF4 aktiveerivat mõju *CALCB* reporterkonstruktile, kuid seda oleks vajalik selgitada lisakatsega, kus on teostatud samaaegselt TRB3 ja ATF4 üleekspressioon. Arseniidistressi tingimustel ei mõjutanud TRB3 *CALCB* reporterplasmiidi aktiivsust (joonis 9A). Kuna TRB3 ko-transfektsiooni katsetel ei teostatud sellist kontrolli, kus rakke poleks töödeldud ühegi stressivastust tekitava ühendiga, siis on praegu keeruline hinnata TRB3 inhibeerivat mõju *CALCB* reporterkonstrukti aktiivsusele UPR-i (tunikamütsiin) ja cAMP raja aktiveerimise (forskoliin+IBMX) tingimustel, sest pole välistatud, et sarnane efekt avalduks ka tavatingimustel rakkudes. Seetõttu oleks vaja sooritada täiendavaid katseid, et täpsemalt tõlgendada leitud TRB3 üleekspressiooni mõjusid *CALCB* reporterplasmiidile.

*ADM2* reporterkonstrukti puhul ei õnnestunud tuvastada suurenenud aktiivsust kaheksa tundi kestnud arseniidi, tunikamütsiini ega forskoliin+IMBX töötamise järel (joonis 9B).

Üks põhjus, miks vastusena rakustressi tekitavatele ühenditele ei esinenud statistiliselt olulisi induktsioone, võib olla *CALCB* kontroll-proovide suur hajuvus, mistõttu tuleks suurendada korduskatsete arvu. Põhjus võib olla ka valitud ajapunktis: 8 tundi võib olla liiga lühike aeg, et transkriptsiooni tasemel efekt (mõõdetuna reportervalgu translatsiooni vahendusel) jõuaks selgelt avalduda. Samuti tasuks uurida *CALCB* ja *ADM2* reporterkonstrukte muudes rakulise stressi vormides, mis on suutelised viima eIF2 $\alpha$  fosforüleerumiseni ja selle tulemusena aktiveerima ka ATF4 translatsiooni. Üheks võimaluseks oleks simuleerida rakkudes viirusinfektsiooni, kasutades näiteks struktuurselt kaheaahelalise RNA-ga sarnast sünteetilist ühendit polü-I:C, mis kutsub esile PKR-i aktivatsiooni (Chacko ja Adamo, 2002). Eritüübiline stress on ka asendamatu aminohappe puudus, mille tõttu aktiveerub eIF2 $\alpha$  kinaas GCN2 (1.1.2).



**Joonis 9. Inimese (h) *CALCB* ja *hADM2* lutsiferaasi reporterkonstrukti aktivatsioon erinevate rakustressi tüüpide korral HEK-293 rakkudes.** *CALCB* ja *ADM2* konstrukti aktivatsiooni andmed on esitatud suhtelises lutsiferaasi ühikus RLU (*Relative Luciferase Unit*) normaliseerituna vastavaid fragmente mittedisaldavate vektorite pGL3-Basic (A) ja pGL3-TK (B) suhtes, mille tulbad on värvitud sinisega. Märgitud on ka stressivastuseid indutseeritavate ühendite kontsentratsioonid ja aeg, mille vältel rakud olid nimetatud ainetele eksponeeritud. \* tähistab statistiliselt olulist erinevust märgitud tingimuste võrdluses. Statistiliselt olulise erinevuse selgitamiseks kasutati Kruskal-Wallise või Studenti t-testi ja olulisusnivood 0,05. Standardhälbed on markeeritud veeribadega ja esitatud on kahe (A) või ühe (B) sõltumatu katse tulemused.

Meile teadaolevalt pole *CALCB* ja *ADM2* geeniekspressiooni aktivatsiooni transkriptsioonilisi mehhanisme rakustressi faktorite toimel varem uuritud. Selle töö tulemused võimaldavad järeldada, et *CALCB* ja *ADM2* geenid sisaldavad regioonid, mis on aktiveeritavad raku stressivastuse ühe keskse transkriptsioonifaktori, ATF4, üleekspressiooni poolt.

Teng jt. (2011) leidsid, et *ADM2* on võimeline inhibeerima roti müokardi rakkudes hapniku defitsiidi poolt indutseeritud ER stressi. Kuna ATF4 on ER stressi korral indutseeritud eIF2 $\alpha$  kinaasi PERK kaudu (1.1.2), siis võib *ADM2* geeni transkriptsiooni aktiveerimine ATF4 poolt kujutada mehhanismi ER stressi leevendamiseks.

ATF4 on mitmete erinevate stresside korral närvirakkudes ülesreguleeritud ja osadel neist juhtudest ATF4 toetab närvirakkude elulemuse säilitamist (1.1.5). Kuna aju on üks väheseid organeid, kus *CALCB* on ekspresseeritud (1.2.1) ja CGRP-I on kirjeldatud neurotroofilist mõju (Buldyrev jt., 2006), siis võib *CALCB* aktiveerimine ATF4 poolt olla mehhanism, mille kaudu säilitatakse närvirakkude elulemust stressiseisundi korral.

Selle töö raames tuvastati geenijärjestuste analüüsimisel ka kandidaat-elementid *CALCB* ja *ADM2* geenides, millega ATF4 võiks seonduda. Selleks, et kinnitada just nende elementide olulisust, tuleks teha täiendavaid katseid. Üks võimalus oleks koostada lutsiferaasi reporterkonstruktid, kus kandidaat-saidid on muteeritud, ja uurida mutatsioonidega reporterplasmiidide tundlikkust ATF4 üleekspressioonile.

Tulevikus oleks kasulik teha ka katseid teistel rakuliinidel, et saada aimu *CALCB* ja *ADM2* ekspressiooni regulatsiooni mehhanismide varieeruvusest sõltuvalt rakulisest kontekstist. Seejuures oleks esmajärjekorras huvitav uurida neid rakutüüpe, milles on tuvastatud kõrge *CALCB* või *ADM2* ekspressioon.

## Kokkuvõte

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida ATF4 mõju kaltsitoniini perekonda kuuluvate geenide *CALCB* ja *ADM2* ekspressioonile nii normaalolekus kui ka erinevate rakulise stressi vormide korral. Lisaeesmärgiks oli uurida ka potentsiaalset TRB3 inhibeerivat mõju nimetatud geenide aktivatsioonile.

Geeniekspressiooni uurimiseks otsiti esmalt valitud geenide nukleotiidsest järjestusest potentsiaalseid ATF4 seondumissaite. Seejärel koostati nende saitide transkriptsioonilise mõju mõõtmiseks lutsiferaasi reporterkonstruktid, mis sisaldasid valitud regioone. Valmistatud *CALCB* ja *ADM2* geenide kandidaat-regulaatoralade reporterkonstruktid transfekteeriti inimese rakuliini HEK-293 rakkudesse.

Tulemused näitavad, et ATF4 ekspressiooniplasmiidi ko-transfektsioon aktiveerib *CALCB* ja *ADM2* reporterkonstrukte üle kahe korra rohkem kui tühja ekspressioonivektori ko-transfektsioon. Lisaks selgus, et mõnedel tingimustel on TRB3 ekspressiooniplasmiidi ko-transfektsioonil inhibeeriv toime *CALCB* reporterkonstrukti aktiivsusele.

Töö tulemustest saab järeldada, et *CALCB* ja *ADM2* ekspressioon on transkriptsiooniliselt aktiveeritav ATF4 üleekspressiooni poolt ja on võimalik, et TRB3 on suuteline seda aktivatsiooni inhibeerima, kuid saadud tulemuste kinnitamiseks tuleks teha lisakatseid, muuhulgas ka teiste stressitingimuste juures ja erinevates rakuliinides.

# **The effects of ATF4 on the regulation of calcitonin family genes *CALCB* and *ADM2* in mammalian cells**

Martin Kala

## **Summary**

When cells are exposed to a variety of rapid environmental changes that perturb cellular homeostasis, complex stress-induced intracellular signalling pathways are activated. Depending on the severity of the stress response, different pathways are induced either to ensure the cell's adaptation and restore homeostasis or induce apoptosis.

One of the most crucial transcriptional mediators of the cellular stress response in mammals is activating transcription factor 4 (ATF4), which is translationally upregulated through the stress-induced phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 2  $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) by the kinases PERK, GCN2, PKR and HRI (Wek jr., 2006). As a result, ATF4 binds to different specific binding sites located in the genome and activates genes responsible for coping with the occurring stress stimulus. Since the cellular stress response is linked to the pathogenesis of several diseases, including Parkinson's disease, cancer, diabetes and ischemia, the identification of new ATF4 target genes is important for discovering new potential drug targets for such diseases.

A previous genome-wide gene expression analysis performed in our lab revealed that the calcitonin family genes *CALCB* and *ADM2* might be novel ATF4 target genes in human cells. The aim of this thesis was to study this further. To demonstrate gene expression regulation, genomic fragments of human *CALCB* and *ADM2* containing putative ATF4 target sites were cloned into luciferase reporter plasmids and transfected into HEK-293 cells. The results show that *CALCB* and *ADM2* reporter plasmids are activated by ATF4 overexpression and that the ATF4 inhibitor TRB3 is able to inhibit *CALCB* reporter activity in some contexts. Further experiments are necessary to validate the candidate ATF4 binding sites proposed in this study, and also to define the cell type- and stress-specificity of the effect of ATF4 on the activation of the *CALCB* and *ADM2* promoters.

## Tänuavaldused

Eelkõige soovin tänada oma juhendajaid Tiit Ördi ja prof. Jaanus Remmet, kellel on uuritud valdkonnas imetlusväärased teadmised ning kes olid tänu sellele väga suureks toeks töö kavandamisel, läbiviimisel ja dokumenteerimisel.

Suure tänu võlgnen ka ülejäänud labori kollektiivile, Tõnis ja Daima Ördile, kes leidsid alati aega minu küsimustele vastamiseks ja aitasid kaasa töö teostamisel tekkinud probleemide lahendamisele.

Lisaks soovin tänada matemaatilise statistika tudengit Matvei Miroshnikovi, kes aitas mind katsetulemuste statistilise analüüsiga, ja ka oma filoloogist õde Merikest, kellest oli palju abi töö viimistlemisel.

## Kirjanduse loetelu

- Amara, S. G., Arriza, J. L., Leff, S. E., Swanson, L. W., Evans, R. M. and Rosenfeld, M. G. (1985). Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science* 229(4718): 1094–1097.
- Ameri, K. and Harris, A. L. (2008). Activating transcription factor 4. *J. Biocel.* 40(1): 14–21.
- Ameri, K., Lewis, C. E., Raida, M., Sowter, H., Hai, T. and Harris, A. L. (2004). Anoxic induction of ATF-4 through HIF-1-independent pathways of protein stabilization in human cancer cells. *Blood* 103(5): 1876–1882.
- Balasubramanian, M. N., Butterworth, E. A. and Kilberg, M. S. (2013). Asparagine synthetase: regulation by cell stress and involvement in tumor biology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304(8): E789–99.
- Bell, D., Zhao, Y., McCoy, F. P. G., Devine, A. and McDermott, B. J. (2008). Expression of the counter-regulatory peptide intermedin is augmented in the presence of oxidative stress in hypertrophied cardiomyocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 21(5-6): 409–420.
- Blais, J. D., Filipenko, V., Bi, M., Harding, H. P., Ron, D., Koumenis, C., Wouters, B. G., and Bell, J.C. (2004). Activating Transcription Factor 4 Is Translationally Regulated by Hypoxic Stress. *Mol. Cell. Biol.* 24(17): 7469–7482.
- Buldyrev, I., Tanner, N. M., Hsieh, H.-Y., Dodd, E. G., Nguyen, L. T. and Balkowiec, A. (2006). Calcitonin gene-related peptide enhances release of native brain-derived neurotrophic factor from trigeminal ganglion neurons. *J. Neurochem.* 99(5): 1338–1350.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G. and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415(6867): 92–96.
- Chacko, M. S. and Adamo, M.L. (2002). Double-stranded RNA decreases IGF-I gene expression in a protein kinase R-dependent, but type I interferon-independent, mechanism in C6 rat glioma cells. *Endocrinology* 143(2): 525–534.
- Chauhan, M., Yallampalli, U., Reed, L. and Yallampalli, C. (2006). Adrenomedullin 2 antagonist infusion to rats during midgestation causes fetoplacental growth restriction through apoptosis. *Biol. Reprod.* 75(6): 940–947.
- Chauhan, M., Ross, G. R., Yallampalli, U. and Yallampalli, C. (2007). Adrenomedullin-2, a novel calcitonin/calcitonin-gene-related peptide family peptide, relaxes rat mesenteric artery: influence of pregnancy. *Endocrinology* 148(4): 1727–1735.
- Chauhan, M., Yallampalli, U., Dong Y. L., Hankins, G. D. V. and Yallampalli, C. (2009). Expression of Adrenomedullin 2 (ADM2)/Intermedin (IMD) in Human Placenta: Role in Trophoblast Invasion and Migration. *Biol. Reprod.* 81(4): 777–783.

- Chen, C., Dudenhausen, E., Chen, H., Pan, Y.-X., Gjymishka, A. and Kilberg, M. S. (2005). Amino-acid limitation induces transcription from the human C/EBPbeta gene via an enhancer activity located downstream of the protein coding sequence. *Biochem. J.* 391(Pt 3): 649–658.
- Clemens, M. J. (2001). Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 27: 57–89.
- Copp, D. H. and Cheney, B. (1962). Calcitonin-a hormone from the parathyroid which lowers the calcium-level of the blood. *Nature* 193: 381–382.
- Estes, S. D., Stoler, D. L. and Anderson, G. R. (1995). Normal fibroblasts induce the C/EBP beta and ATF-4 bZIP transcription factors in response to anoxia. *Exp. Cell Res.* 220(1): 47–54.
- Fawcett, T. W., Martindale, J. L., Guyton, K. Z., Hai, T. and Holbrook, N. J. (1999). Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem. J.* 339 ( Pt 1): 135–141.
- Fischer, C., Johnson, J., Stillwell, B., Conner, J., Cerovac, Z., Wilson-Rawls, J. and Rawls, A. (2004). Activating transcription factor 4 is required for the differentiation of the lamina propria layer of the vas deferens. *Biol. Reprod.* 70(2): 371–378.
- Fung, H., Liu, P. and Dempfle, B. (2007). ATF4-dependent oxidative induction of the DNA repair enzyme Ape1 counteracts arsenite cytotoxicity and suppresses arsenite-mediated mutagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 27(24): 8834–8847.
- Gachon, F., Gaudray, G., Thébault, S., Basbous, J., Koffi, J. A., Devaux, C., and Mesnard, J. (2001). The cAMP response element binding protein-2 (CREB-2) can interact with the C/EBP-homologous protein (CHOP). *FEBS Letters* 502(1-2): 57–62.
- Galehdar, Z., Swan, P., Fuerth, B., Callaghan, S. M., Park, D. S. and Cregan, S. P. (2010). Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *J. Neurosci.* 30(50): 16938–16948.
- Goadsby, P. J. and Edvinsson, L. (1994). Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache. Neuropeptide changes and effects of acute attacks therapies. *Brain* 117 ( Pt 3): 427–434.
- Hai, T. and Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88(9): 3720–3724.
- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y.-H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C. L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M. S., Sartor, M. A. and Kaufman, R. J. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat. Cell Biol.* 15(5): 481–490.

- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell.* 6(5): 1099–1108.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J. C., Hettmann, T., Leiden, J. M. and Ron, D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell.* 11(3): 619–633.
- He, C. H., Gong, P., Hu, B., Stewart, D., Choi, M. E., Choi, A. M. and Alam, J. (2001). Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J. Biol. Chem.* 276(24): 20858–20865.
- Hettmann, T., Barton, K. and Leiden, J. M. (2000). Microphthalmia due to p53-mediated apoptosis of anterior lens epithelial cells in mice lacking the CREB-2 transcription factor. *Dev. Biol.* 222(1): 110–123.
- Hou, Q., Barr, T., Gee, L., Vickers, J., Wymer, J., Borsani, E., Rodella, L., Getsios, S., Burdo, T., Eisenberg, E., Guha, U., Lavker, R., Kessler, J., Chittur, S., Fiorino D., Rice, F. and Albrecht, P. (2011). Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide  $\beta$ : implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. *Pain* 152(9): 2036–2051.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1): 23–28.
- Katafuchi, T., Hamano, K. and Minamino, N. (2004). Identification, structural determination, and biological activity of bovine and canine calcitonin receptor-stimulating peptides. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 313(1): 74–79.
- Kitamura, K., Kangawa, K., Kawamoto, M., Ichiki, Y., Nakamura, S., Matsuo, H. and Eto, T. (1993). Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 192(2): 553–560.
- Kittur, S. D., Hoppener, J. W., Antonarakis, S. E., Daniels, J. D., Meyers, D. A., Maestri, N. E., Jansen, M., Korneluk, R. G., Nelkin, B. D. and Kazazian, H. H. (1985). Linkage map of the short arm of human chromosome 11: location of the genes for catalase, calcitonin, and insulin-like growth factor II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82(15): 5064–5067.
- Lainchbury, J. G., Cooper, G. J., Coy, D. H., Jiang, N. Y., Lewis, L. K., Yandle T. G., Richards A. M. and Nicholls M. G. (1997). Adrenomedullin: a hypotensive hormone in man. *Clin. Sci.* 92(5): 467–472.
- Lange, P. S., Chavez, J. C., Pinto, J. T., Coppola, G., Sun, C.-W., Townes, T. M., Geschwind, D. H. and Ratan, R. R. (2008). ATF4 is an oxidative stress-inducible, prodeath transcription factor in neurons in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 205(5): 1227–1242.

- Lassot, I., Ségéral, E., Berlioz-Torrent, C., Durand, H., Groussin, L., Hai, T., Benarous, R. and Margottin-Goguet, F. (2001). ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF(betaTrCP) ubiquitin ligase. *Mol. Cell. Biol.* 21(6): 2192–2202.
- Lassot, I., Estrabaud, E., Emiliani, S., Benkirane, M., Benarous, R. and Margottin-Goguet, F. (2005). p300 modulates ATF4 stability and transcriptional activity independently of its acetyltransferase domain. *J. Biol. Chem.* 280(50): 41537–41545.
- Lewerenz, J., Sato, H., Albrecht, P., Henke, N., Noack, R., Methner, A. and Maher, P. (2012). Mutation of ATF4 mediates resistance of neuronal cell lines against oxidative stress by inducing xCT expression. *Cell Death Differ* 19(5): 847–858.
- Lin, Y. S. and Green, M. R. (1988). Interaction of a common cellular transcription factor, ATF, with regulatory elements in both E1a- and cyclic AMP-inducible promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(10): 3396–3400.
- Luo, S., Baumeister, P., Yang, S., Abcouwer, S. F. and Lee, A. S. (2003). Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *J. Biol. Chem.* 278(39): 37375–37385.
- Ma, Y. and Hendershot, L. M. (2003). Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 278(37): 34864–34873.
- Marchand, A., Tomkiewicz, C., Magne, L., Barouki, R. and Garlatti, M. (2006). Endoplasmic reticulum stress induction of insulin-like growth factor-binding protein-1 involves ATF4. *J. Biol. Chem.* 281(28): 19124–19133.
- Masuoka, H. C. (2002). Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice. *Blood* 99(3): 736–745.
- Moll, J. R., Acharya, A., Gal, J., Mir, A. A., Vinson, C. and Gal, J. (2002). Magnesium is required for specific DNA binding of the CREB B-ZIP domain. *Nucleic Acids Res.* 30(5): 1240–1246.
- Monneret, G., Pachot, A., Laroche, B., Picollet, J. and Bienvenu, J. (2000). Procalcitonin and calcitonin gene-related peptide decrease LPS-induced tnf production by human circulating blood cells. *Cytokine* 12(6): 762–764.
- Naot, D. and Cornish, J. (2008). The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone* 43(5): 813–818.
- Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K. and Hayashi, H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.* 24(6): 1243–1255.
- Örd, D. and Örd, T. (2003). Mouse NIPK interacts with ATF4 and affects its transcriptional activity. *Exp. Cell Res.* 286(2): 308–320.

- Örd, D. and Örd, T. (2005). Characterization of human NIPK (TRB3, SKIP3) gene activation in stressful conditions. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 330(1): 210–218.
- Pearson, L. J., Yandle, T. G., Nicholls, M. G. and Evans, J. J. (2009). Intermedin (adrenomedullin-2): a potential protective role in human aortic endothelial cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 23(1-3): 97–108.
- Persengiev, S .P. and Green, M. R. (2003). The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis* 8(3): 225–228.
- Poorkaj, P., Nutt J. G., James D., Gancher S., Bird T. D., Steinbart E., Schellenberg G. D. and Payami H. (2004). parkin mutation analysis in clinic patients with early-onset Parkinson [corrected] disease. *Am. J. Med. Genet. A* 129A(1): 44–50.
- Rezaeian, A. H., Isokane, T., Nishibori, M., Chiba, M., Hiraiwa, N., Yoshizawa, M. and Yasue, H. (2009).  $\alpha$ CGRP and  $\beta$ CGRP transcript amount in mouse tissues of various developmental stages and their tissue expression sites. *Brain and Development* 31(9): 682–693.
- Ringer, C., Weihe, E. and Schütz, B. (2009). Pre-symptomatic alterations in subcellular betaCGRP distribution in motor neurons precede astrogliosis in ALS mice. *Neurobiol. Dis.* 35(2): 286–295.
- Roh, J., Chang, C. L., Bhalla, A., Klein, C. and Hsu, S. Y. T. (2004). Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 279(8): 7264–7274.
- Rosenfeld, M. G., Mermod, J. J., Amara, S. G., Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., Vale, W. W. and Evans, R. M. (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304(5922): 129–135.
- Samuelson, U. E., Dalsgaard, C. J., Lundberg, J. M. and Hökfelt, T. (1985). Calcitonin gene-related peptide inhibits spontaneous contractions in human uterus and fallopian tube. *Neurosci. Lett.* 62(2): 225–230.
- Schoch, S., Cibelli, G., Magin, A., Steinmüller, L. and Thiel, G. (2001). Modular structure of cAMP response element binding protein 2 (CREB2). *Neurochem. Int.* 38(7): 601–608.
- Schütz, B., Mauer, D., Salmon, A.-M., Changeux, J.-P. and Zimmer, A. (2004). Analysis of the cellular expression pattern of beta-CGRP in alpha-CGRP-deficient mice. *J. Comp. Neurol.* 476(1): 32–43.
- Shan, J., L. Fu, Balasubramanian, M. N., Anthony, T. and Kilberg, M. S. (2012). ATF4-dependent Regulation of the JMJD3 Gene during Amino Acid Deprivation Can Be Rescued in Atf4-deficient Cells by Inhibition of Deacetylation. *J. Biol. Chem.* 287(43): 36393–36403.
- Shimizu, M., Nomura, Y., Suzuki, H., Ichikawa, E., Takeuchi, A., Suzuki, M., Nakamura, T., Nakajima, T. and Oda, K. (1998). Activation of the rat cyclin A promoter by ATF2 and Jun family members and its suppression by ATF4. *Exp. Cell Res.* 239(1): 93–103.

- Siu, F., Bain, P. J., LeBlanc-Chaffin, R., Chen, H. and Kilberg, M. S. (2002). ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J. Biol. Chem.* 277(27): 24120–24127.
- Song, J.-Q., Teng, X., Cai, Y., Tang, C.-S. and Qi, Y.-F. (2009). Activation of Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway is involved in intermedin(1-53) protection against myocardial apoptosis induced by ischemia/reperfusion. *Apoptosis* 14(11): 1299–1307.
- Steenbergh, P. H., Hoppener, J. W., Zandberg, J., Visser, A., Lips, C. J. and Jansz, H. S. (1986). Structure and expression of the human calcitonin/CGRP genes. *FEBS Letters* 209(1): 97–103.
- Struthers, A. D., Brown, M. J., Macdonald, D. W., Beacham, J. L., Stevenson, J. C., Morris, H. R. and MacIntyre, I. (1986). Human calcitonin gene related peptide: a potent endogenous vasodilator in man. *Clin. Sci.* 70(4): 389–393.
- Sun, X., Liu, J., Crary, J. F., Malagelada, C., Sulzer, D., Greene, L. A. and Levy, O. A. (2013). ATF4 protects against neuronal death in cellular Parkinson's disease models by maintaining levels of parkin. *J. Neurosci.* 33(6): 2398–2407.
- Zhang, W., Wang, L.-J., Xiao, F., Wei, Y., Ke, W. and Xin, H.-B. (2012). Intermedin: a novel regulator for vascular remodeling and tumor vessel normalization by regulating vascular endothelial-cadherin and extracellular signal-regulated kinase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32(11): 2721–2732.
- Teng, X., Song, J., Zhang, G., Cai, Y., Yuan, F., Du, J., Tang, C. and Qi, Y. (2011). Inhibition of endoplasmic reticulum stress by intermedin(1-53) protects against myocardial injury through a PI3 kinase-Akt signaling pathway. *J. Mol. Med.* 89(12): 1195–1205.
- Vallejo, M., Ron, D., Miller, C. P. and Habener, J. F. (1993). C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(10): 4679–4683.
- Vattem, K. M. and Wek, R. C. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(31): 11269–11274.
- Watson, R. W., Redmond, H. P., Wang, J. H. and Bouchier-Hayes, D. (1996). Mechanisms involved in sodium arsenite-induced apoptosis of human neutrophils. *J. Leukocyte Biol.* 60(5): 625–632.
- Wek, R. C., Jiang, H.-Y. and Anthony, T. G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* 34(Pt 1): 7–11.
- Whitney, M. L., Jefferson, L. S. and Kimball, S. R. (2009). ATF4 is necessary and sufficient for ER stress-induced upregulation of REDD1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379(2): 451–455.

- Wimalawansa, S. J. (1996). Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr. Rev.* 17(5): 533–585.
- Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M. J. and Sturgill, T. W. (1993). Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 262(5136): 1065–1069.
- Yang, X. and Karsenty, G. (2004). ATF4, the osteoblast accumulation of which is determined post-translationally, can induce osteoblast-specific gene expression in non-osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 279(45): 47109–47114.

## **Kasutatud veebiaadressid**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.534305>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.449099>

<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>

# Lihtlitsents

## Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Martin Kala (sünnikuupäev: 30.07.1991),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Transkriptsioonifaktori ATF4 seosed kaltsitoniini perekonna geenide *CALCB* ja *ADM2* ekspressiooni regulatsiooniga imetajarakus“, mille juhendajad on Tiit Örd ja Jaanus Remme,
  - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **26.05.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014