

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Jaak Jänes

**FRET meetodi optimeerimine p53 ja Mdm2 valk-valk interaktsiooni
detekteerimiseks**

Magistritöö

Juhendajad:
Viljar Jaks, *Ph. D*
Toivo Maimets, *Ph. D*

Tartu 2004

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus	5
Kirjanduse ülevaade	6
Valk- Valk interaktsioonid ja nende tähtsus raku elutegevuses.....	6
Metoodikast.....	7
<i>In vivo</i> valk-Valk interaktsioonide detekteerimise meetodid (imetaja rakus).....	7
Mudelsüsteemist.....	15
Tuumorsupressor p53 ja selle avastamine.....	15
p53 geen	16
p53 valk.....	16
Valgu struktuur ja selle seos funktsiooniga	16
p53-e vastus rakulisele stressile	19
p53-e funktsiooni regulatsioon.....	20
Mdm2 avastamine ja bioloogiline roll	22
Mdm2 geen ja valk.....	23
Mdm2 sõltuv p53-e taseme regulatsioon	25
p53-Mdm2 interaktsioon.....	26
Eksperimentaalne osa.....	28
Töö eesmärk	28
Materjalid ja metoodika	28
Ekspressioonivektorid	28
Rakud ja nende kultiveerimine	29
Rakkude transfektsioon.....	29
Antikehad	30
Immuunosadestamine.....	30
Western analüüs	30
Fluorestsentsmikroskoopia ja FRET analüüs.....	31
Analüüs fluorestsents-spektrofotomeetriga (fluorimeetriga)	32
Töö tulemused ja arutelu	33
Tulemused	33

Arutelu.....	42
Kokkuvõte	44
Summary	45
Kasutatud kirjandus.....	46

Kasutatud lühendid

53BP1 – *p53 binding protein 1*
53BP2 – *p53 binding protein 2*
BCIP – *5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate*
CAK – *CDK-activating kinase*
CBP – *CREB-binding protein*
CCD – *charge-coupled device*
CDC – *cell division cycle genes*
cDNA – *complementary DNA*
CDK – *cyclin dependent kinase*
CFP – *cyan fluorescent protein*
CREB – *cAMP-responsive element-binding protein*
DNA – *deoxyribonucleic acid*
DNA-PK – *DNA activated protein kinase*
FRET – *fluorescence resonance energy transfer*
GFP – *green fluorescent protein*
HAUSP – *herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*
HPV – *human papilloma virus*
Mdm2 – *mouse double minute 2*
Na-Bes – *Na N, N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid*
NBT – *nitroblue tetrazolium*
NLS – *nuclear localisation signal*
pAb – *protein antibody*
PBS – *phosphate buffered saline*
PKC – *protein kinase C*
RING – *really interesting new gene*
RNA – *ribonucleic acid*
SDS – *sodium dodecyl sulfate*
SH3 – *Src-homology domain 3*
SV40 – *simian virus 40*
TAF – *TBP-associated factors*
TBP – *TATA-box binding protein*
TFIID – *transcription factor II D*
wt – *wild type*
YFP – *yellow fluorescent protein*

Sissejuhatus

Valk- Valk interaktsioonid on ülitähtsad pea kõikidel tasemetel raku funktsioneerimise juures – rakuorganellide struktuuride moodustamine, transpordi masinavärgi funktsioneerimine membraanidel, kromatiini pakkimine, membraani filamentide võrgustiku moodustumine, signaali ülekanne, geeniekspressiooni kontroll jne. Selliste interaktsioonide uurimine kasutades biokeemilisi meetodeid (afiinsuskromatograafia, *crosslinking*) on tihti raskendatud, kuna on keeruline tagada antud interaktsiooni toimumiseks vajalikke füsioloogilisi tingimusi, samuti eeldavad sellised meetodid tihti ekstreemseid valgukonsentratsioone. Seetõttu oleks parem rakuliste valk- Valk interaktsioonide vaatlemiseks kasutada mõnd *in vivo* meetodit.

Oma töö teoreetilises osas püüan anda ülevaate *in vivo* valk- Valk interaktsioonide detekteerimise meetoditest, valkude p53 ja Mdm2 ehitusest ning funktsioonidest, nende omavahelise interaktsiooni olemusest. Praktilises osas üritan valgust heita FRET metoodika optimeerimise probleemidele ja tulemusele.

Käesolev töö on tehtud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi rakubioloogia laboris.

Kirjanduse ülevaade

Valk- Valk interaktsioonid ja nende tähtsus raku elutegevuses

Valk- Valk interaktsioonid on omased pea kõikidele rakulistele protsessidele. Kõik olulisemad uurimissuunad molekulaarbioloogias – DNA replikatsioon, transkriptsioon, translatsioon, splaining, sekretsioon, rakutsükli kontroll, signaali ülekanne jne – on reeglina vältimatult seotud valkkomplekside moodustumisega.

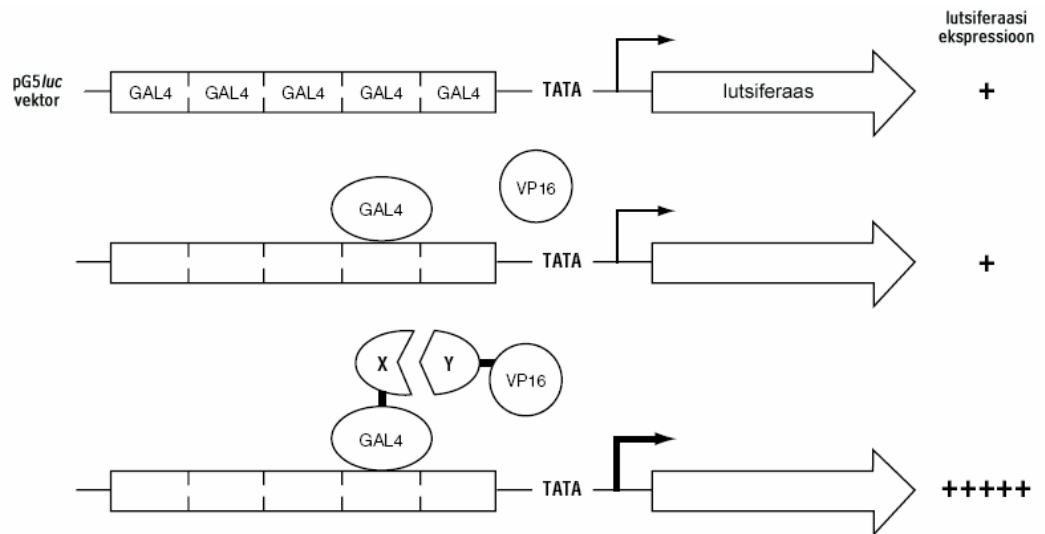
Paljude rakuprotsesside läbiviimisel ja kontrollimisel esineb suur hulk ajutisi (transientseid) valk- Valk interaktsioone. Selliste ajutiste komplekside olemasolu on vajalik näiteks kõikide valgude modifitseerimisega seotud protsesside juures. Näiteks võib tuua valgude kinaaside, fosfataaside glükosüültransferaaside, proteaaside jne seostumine oma substraatidega. Valke modifitseerivad ensüümid ja nende interaktsioonid oma substraatidega moodustavad suure osa kõikidest raku esinevatest valk- Valk interaktsioonidest ning on ülimalt olulised selliste fundamentaalsete protsesside juures nagu raku kasv, rakutsükkel, metaboolsed rajad ja signaali ülekanne. Samuti on ajutised valkudevahelised interaktsioonid tähtsad transkriptsiooni kompleksi kokkupanemisel ja moodustumisel kindlal promootoril, valkude transpordil, *chaperonide* poolt katalüüsitud natiivsete valkude voltumisel, translatsioonil ning raku sisete struktuuride lõhkumisel ja taastamisel rakutsükli jooksul (tsütoplasma mikrotuubulid, tuuma lamiinid, tuuma poori kompleks). Kahjuks on aga ajutisi interaktsioone ka raskem uurida – kõigepealt peab tuvastama interaktsioonil osalevad valgud ja interaktsiooniks tekkimiseks vajalikud tingimused. Kasutades interaktsioonide uurimiseks biokeemilisi ja biofüüsilisi meetodeid (afiinsuskromatograafia, immuunopretsipitatsioon, *crosslinking*) ei suudeta reeglina tagada antud interaktsiooniks vajalikke füsioloogilisi tingimusi, samuti nõuavad sellised meetodid tihti ekstreemseid valgukonsentratsioone. Viimasel ajal on tunduvalt arenenud ka füsioloogilistes tingimustes (*in vivo*) valk- Valk interaktsioonide tuvastamiseks mõeldud meetodika.

Metoodikast

***In vivo* valk-valk interaktsioonide detekteerimise meetodid (imetaja rakus)**

1) Imetaja kaksik-hübriidne süsteem

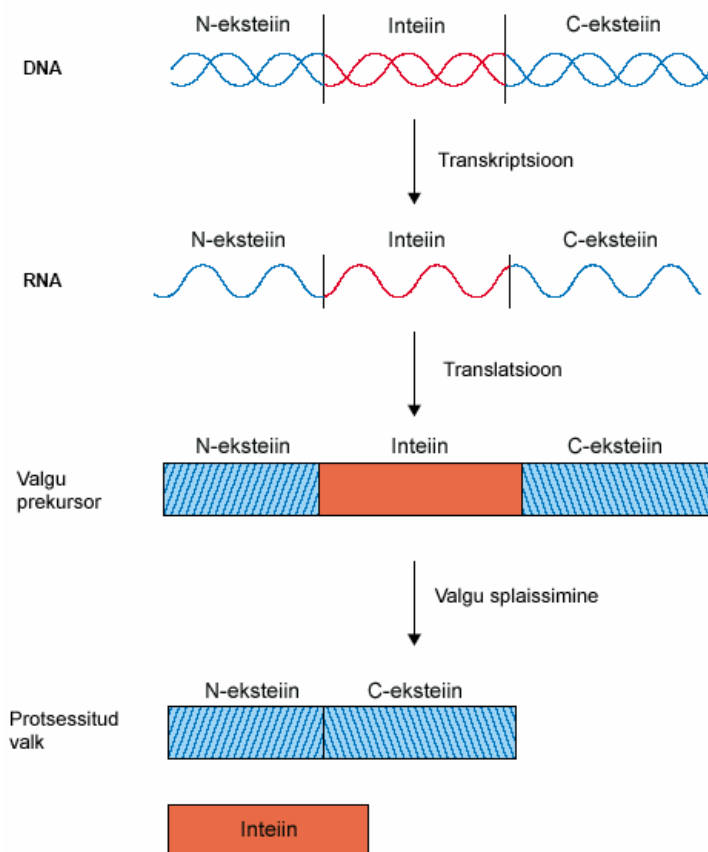
Kaksik-hübriidse süsteemi aluseks on mõningais transkriptsioonifaktorites leiduvad modulaarsed domäänid. Näiteks sisaldub *Promega Corporation* poolt toodetavas imetaja kaksik-hübriidses süsteemis (*CheckMate*TM) ühes vektoris (pBIND) pärmi GAL4 DNA sidumisdomeen, teises vektoris (pACT) herpes simplex viiruse VP16 aktivatsiooni domeen. Uuritavate valkude DNA järjestuse sisestamiseks vektoritesse sisaldavad mõlemad ka *multiple cloning region*-i. Kahte huvipakkuvat (potentsiaalselt interakteeruvat) valku kodeerivad geenid kloneeritakse vektoritesse pBIND ja pACT, et moodustuks liitvalgud, milles ühes sisaldub vastavalt GAL4 DNA seostumisdomeen ja teises VP16 aktivatsioonidomeen. Kolmas vektor (pGluc) sisaldab viite GAL4 sidumissaiti, millele järgneb minimaalne TATA box, millele omakorda järgneb *Photinus pyralis* (Põhja Ameerika jaanimardikas – edaspidi jaanimardikas) lutsiferaasi geen (*luc*⁺). Kõik kolm vektorit transfekteeeritakse imetaja rakku. 2-3 päeva möödudes lüüsitakse rakud ning lutsiferaasi kogus kvantiteeritakse. Testvalkude (GAL4 ja VP16 liitkonstruktid) interaktsiooni korral on lutsiferaasi ekspressioon suurenenud (võrrelduna negatiivse kontrolliga) (joonis 1).



Joonis 1. CheckMate™ imetaja kaksik-hübriidne süsteem. Tähtedega X ja Y on tähistatud uuritavat valkudepaari. (Promega Corporation, <http://www.promega.com/tbs/tm049/tm049.pdf>).

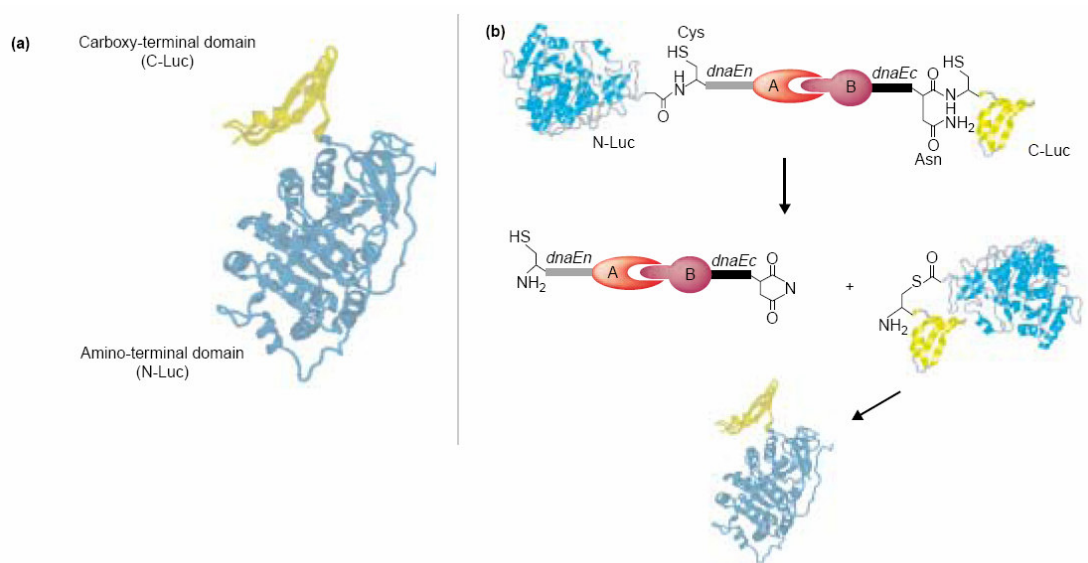
2) Split-lutsiferaasi süsteem

Split-lutsiferaasi süsteem põhineb protsessil, mida nimetatakse valkude splaissimiseks. Valkude splaissimine on mitmeastmeline protsess, mis hõlmab primaarsest translatsiooni produktist kindla sisemise valgu osa (inteiin) „väljalõikamist“ ja järeljäävate valguosade (eksteiinid) ligeerimist (joonis 2) (Noren et al., 2000), (Paulus, 2000).



Joonis 2. Valkude splaissimine. DNA-s säiluv geneetiline informatsioon kopeeritakse mRNA-ks (transkriptsioon), millele omakorda järgneb valgu biosüntees (translatsioon). Spetsiaalne sisemine valgujärjestus (inteiin, joonisel punane) lõigatakse valgu prekursorist välja ning külgnevad valguosad (eksteiinid, joonisel sinisena) ligeeritakse valmis valguks.

Jaanimardika lutsiferaas on voltunud kaheks kompaktses domääniks – N-terminaalseks globulaarseks domääniks ja C-terminaalseks osaks, domäänide vahele jääb natiivses valgus lai vagu, kus asub ka ensüümi aktiivsait (joonis 3) (Conti et al., 1996). Split-lutsiferaasi süsteemis on lutsiferaas eraldatud kaheks osaks – N- ja C-terminaalseks domääniks. Inteiinina on süsteemis kasutatud *Synechocystis* sp. dnaE inteini. DnaE on jagatud samuti kaheks osaks – N- ja C-dnaE – millele on vastavalt seotud N- ja C-lutsiferaasi osad. Kummagile liitvalgule seotakse veel omakorda uuritavad (potentsiaalselt interakteeruvad) testvalgud ja konstrukte ekspresseeritakse imetaja rakkudes. Kui testvalgud moodustavad omavahel kompleksi, siis suure tõenäosusega satuvad lähestiku ka dnaE fragmendid, mis omakorda initsieerib splaisingu ning lutsiferaasi fragmentide ühendamise. Lutsiferaasi moodustumine tekitab bioluminestsensi, mille intensiivsust on proportsionaalne interakteeruvate valkudepaari arvuga (Ozawa et al., 2001).



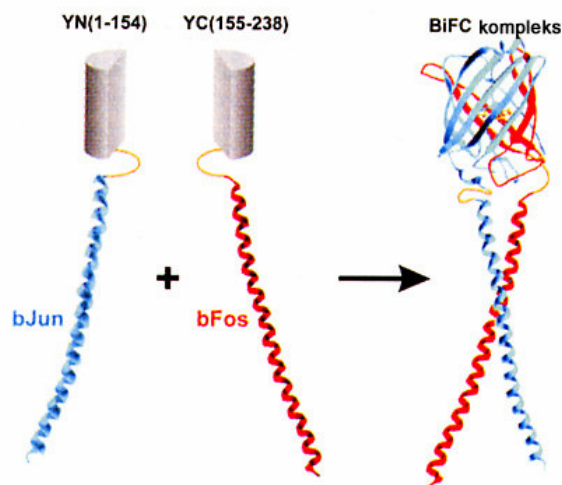
Joonis 3. Split-lutsiferaasi süsteem.

a) lutsiferaasi domäänne struktuur; b) süsteemi kokkuvõttev joonis (selgitus tekstis) (Ozawa et al., 2001).

Põhimõtteliselt sama süsteemi on kasutatud ka veidi teistsuguses konfiguratsioonis. Inteiinina on kasutatud dnaE asemel *Saccharomyces cerevisiae* VMA1-derived endonukleaasi (VDE), visuaalse signaali andjaks lutsiferaasi asemel EGFP-d (*enhanced green fluorescent protein*) (Ozawa et al., 2001).

3) Bimolekulaarne fluorestsents komplementatsioon (*Bimolecular Fluorescence Complementation – BiFC*)

Antud meetod põhineb kahe mittefluorestseeruva YFP (*yellow fluorescent protein*) osa liitumisel fluorestseeruvaks valguks. YFP on jagatud kaheks fragmendiks YN (1-154) ja YC (155-238), kummagile fragmendile on liidetud üks uuritav testvalk (joonis 4). Kui testvalgud interakteeruvad, siis satuvad ruumiliselt lähedistiku ka YFP fragmendid – moodustub fluorofoor ja interaktsioon on visuaalselt detekteeritav (Hu et al., 2002).



Joonis 4. BiFC kompleksi moodustumine. Testvalkudena on kasutatud valke bJun ja bFos (selgitus tekstis) (Hu et al., 2002).

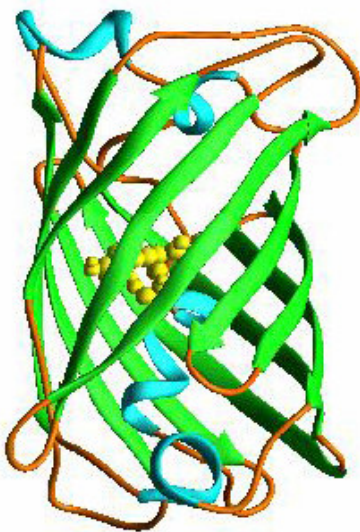
4) Fluorestsents resonants energia ülekanne (*Fluorescence Resonance Energy Transfer – FRET*)

FRET meetod on tuntud juba ligi pool sajandit. Arvestades viimastel aastatel toimunud uuendusi (uued fluorofoorid, detekteerimisvõimaluste paranemine jne) on meetod taas laialt kasutatav ja selle kasutusvaldkond laieneb. FRET põhineb kaugusest sõltuval energia ülekandel doonorfluorokroomilt aktseptorfluorokroomile. Tegemist on ühe vähese tööriistaga, mis lubab meil mõõta molekulidevahelisi kaugusi ning nende muutumist nanomeetrite tasemel nii *in vivo* kui ka *in vitro*. Viimastel aastatel on toimunud suured muutused meetodi kvaliteedi ning kvantiteedi osas – suurenenud resolutsioon, paranenud tundlikkus jne), seda kõike suuresti tänu uutele fluorestseeruvatele märgistele, aga ka täienenud optilistele metoodikatele ja instrumentidele.

Kui ühe fluorokroomi kiirgusspekter kattub märgatavalt teise fluorokroomi neeldumisspektriga ja kui antud fluorokroomid on füüsiliselt teineteisele väga lähedal (tavaliselt 1-6nm), siis on võimalik energia ülekanne esimeselt molekulilt (doonor – emissiooni lühema lainepikkusega) teisele molekulile (aktseptor – emissioon pikema

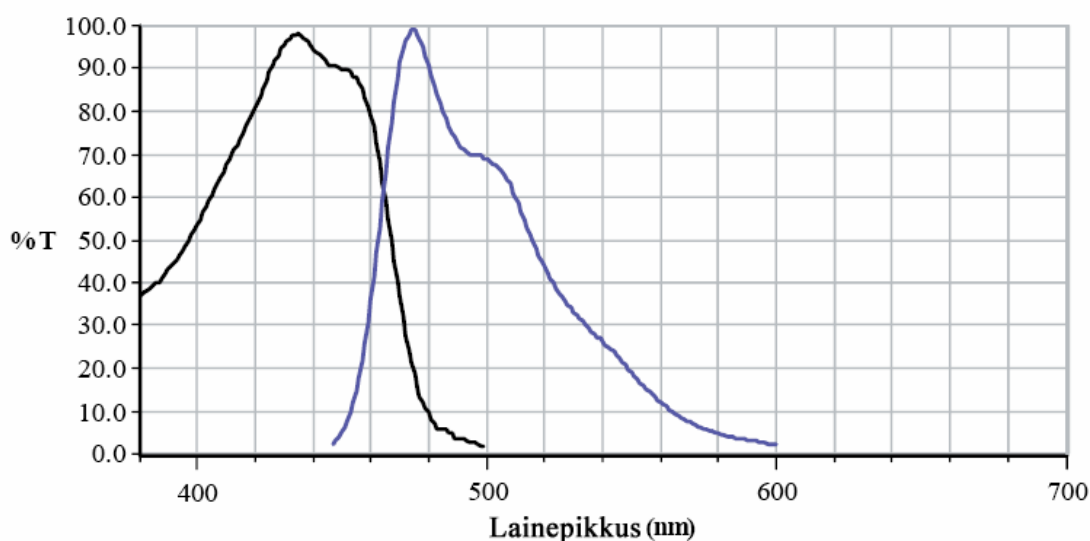
lainepikkusega). Tegemist on mitteradioaktiivse nähtusega (doonor ei emiteeri footoneid). Energia ülekandumisel väheneb doonorfluorokroomi fluorestsents, samas hakkab neeldunud energia arvel fluorestseeruma aktseptorfluorokroom. Kuna energia ülekanne on kaugusest sõltuv (FRET'i efektiivsus on pöördvõrdeline molekulide vahelise kauguse kuuenda astmega), siis valepositiivse tulemuse saamine on praktiliselt võimatu – see teeb antud meetodi molekulidevaheliste interaktsioonide vaatlemisel usaldusväärseks.

Uurimaks valkudevahelise interaktsiooni võimalikkust või kvantiteerides kaugust valgumolekulide vahel, on vaja kahte fluorokroomi, mida saaks liita uuritavatele valkudele. Fluorokroomide paari valik on edasise katse optimeerimise juures ülimalt oluline. Fluorokroomide paaridena kasutatakse tänapäeval nii mitmeid tavapäraseid fluorestseeruvaid värve kui ka GFP (joonis 5) erinevaid vorme – FITC-rodamiin, Alexa488-Cy3, Cy3-Cy5, BFP-GFP, BFP-RFP, BFP-YFP, CFP-YFP, CFP-RFP.



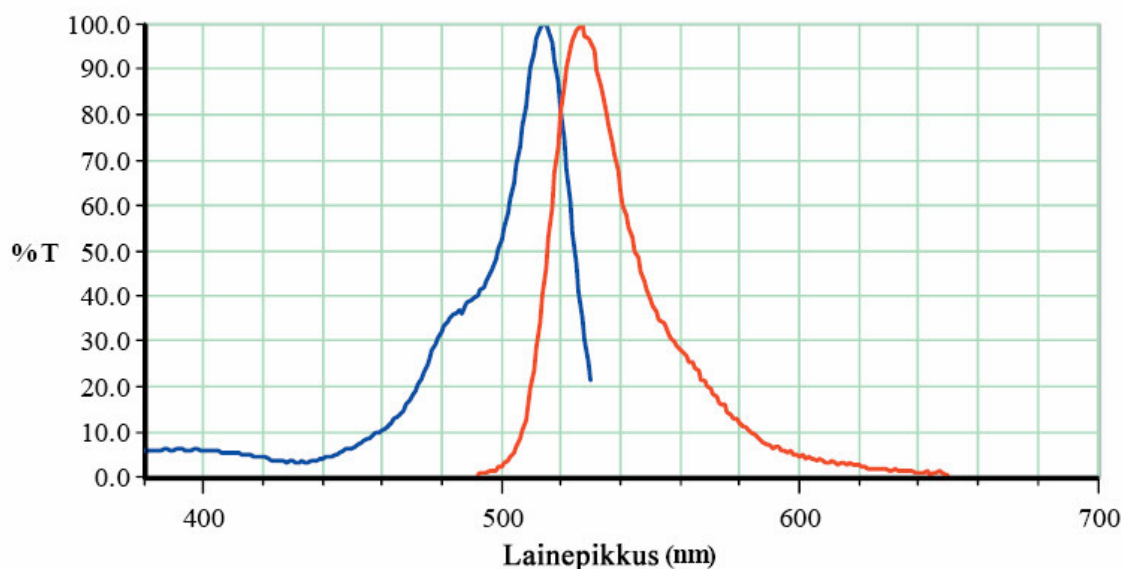
Joonis 5. GFP struktuur. Joonisel on näha 11 antiparalleelset beta lehte (rohelised), mis moodustavad kompaktse silindri. Sinisega on tähistatud alfa-heelik, kollane on kromofoor. Silindri diameeter on ca 30 Å ja kõrgus ca 40 Å (Yang et al., 1996).

Üks kõige levinuimaid fluorokroomide paare on CFP-YFP (*cyan fluorescent protein* - *yellow fluorescent protein*). Mõlemad valgud on GFP mutandid. CFP neeldumismaksimum on 435nm, kiirgusmaksimum 480nm (joonis 6).



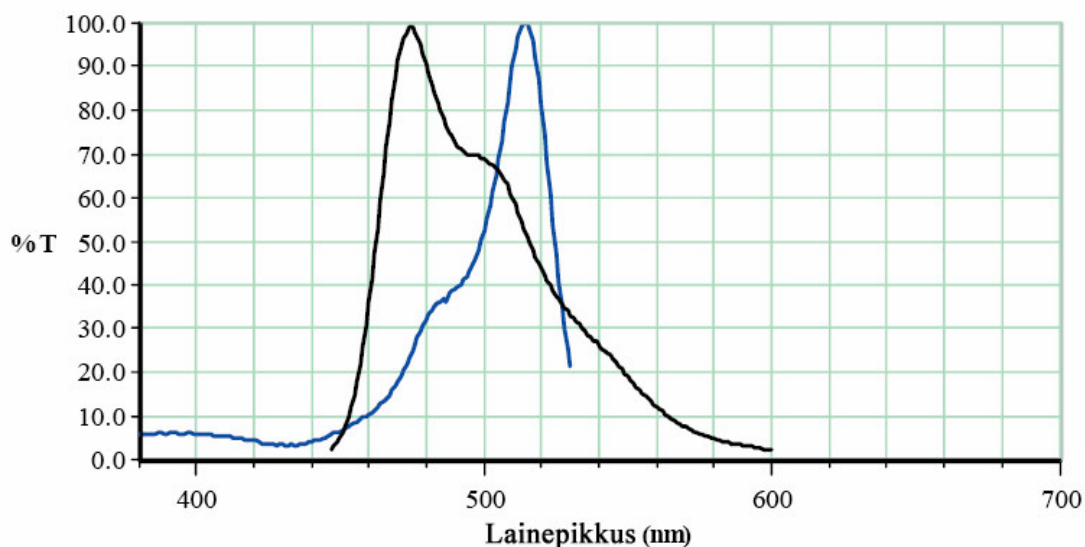
Joonis 6. CFP neeldumis- ja kiirgusspekter. Must graafik – neeldumisspekter, sinine graafik – kiirgusspekter (Chroma Technology Corp., http://www.chroma.com/resources/PDF_files/Fretnote.pdf).

YFP valgu neeldumismaksimum on 505nm, kiirgusmaksimum 530nm (joonis 7).



Joonis 7. YFP neeldumis- ja kiirgusspekter. Sinine graafik – neeldumisspekter, punane graafik – kiirgusspekter (Chroma Technology Corp., http://www.chroma.com/resources/PDF_files/Fretnote.pdf).

CFP emissioonikõver kattub suures ulatuses YFP neeldumiskõveraga (joonis 8) ja see on üks möödapääsmatuid FRET meetodi õnnestumise eeltingimusi ning vähemalt esmapilgul teeb CFP-YFP valkudest ideaalse FRET-i paari.



Joonis 8. CFP kiirgus- ja YFP neeldumisspekter. Must graafik – CFP kiirgusspekter, sinine graafik – YFP neeldumisspekter (Chroma Technology Corp., http://www.chroma.com/resources/PDF_files/Fretnote.pdf).

FRET-i peaks olema CFP-YFP paari korral võimalik tuvastada ergastades CFP-d lainepikkusel ca 436nm (tugev piik elavhõbeda emissiooni spektris) ja detekteerides signaali lainepikkusel ca 530nm. Kahjuks esineb aga kõigil fluorestseeruvatel valkudel arvestatav emissiooni „saba“ – seega peab arvestama olulise CFP ja YFP emissioonide kattuvusega (vähemalt 25%) ja suur osa CFP emissioonist on nähtav ka „kollases“ kanalis. Kuigi ergastusmaksimumid on kummalgi valgul selgelt erinevad (435nm ja 505nm), on YFP neeldumisspekter üsna lai ja kattub osaliselt CFP neeldumisspektriga – seega on võimalik YFP ergastus ka lainepikkusel ca 436nm. FRET signaali detekteerimisel on niisiis ülimalt tähtis arvestada CFP ja YFP spektraalset kattuvust – nii emissiooni kui ka neeldumisspektri osas.

Mudelsüsteemist

Tuumorsupressor p53 ja selle avastamine

p53 valk avastati SV40-ga transformeerunud rakkudest tänu tema võimele moodustada stabiilseid komplekse SV40 suure T antigeeniga (Chang et al., 1979), (Kress et al., 1979). Avastatud valk sai oma näiva massi tõttu nimeks p53. Samal ajal leiti, et keemiliselt indutseeritud kasvajates on p53 kõrgelt ekspresseeritud (DeLeo et al., 1979). Hiljem tõestati ka teiste transformeerivate DNA viiruste onkovalkude võimet moodustada komplekse p53-ga, näiteks adenoviirus E1B (Sarnow et al., 1982), inimese papilloomiviiruse HPV E6 (Scheffner et al., 1990), hepatiit B X valk (Wang et al., 1994) jt. p53 c-DNA kloneerimine (Zakut-Houri et al., 1985) lubas palju täpsemalt uurida p53-e funktsiooni rakkude transformatsioonil ja kasvaja arengul. Sel ajajärgul omistati p53 valgule omadust immortaliseerida rakke (Jenkins et al., 1984) ja koos ras onkogeeniga transformeerida roti embrüonaalseid fibroblaste (Eliyahu et al., 1984; Parada et al., 1984). Näidati ka, et mutatsioonid p53 geenis võimendavad tema transformeerimisvõimet. Kõigest eelnevast tekkiski kindel teadmine, et p53 on tavaline onkogeen, mida saab muteerides aktiveerida (Jenkins et al., 1985).

Siiski vastupidiselt sellele, et p53 käitus kui onkogeen, olid kindlad tõendid, et normaalse p53 ekspressiooni ja funktsiooni kadu võib olla üks tähtis etapp transformatsiooni protsessis. Nüüdseks ollakse aga täiesti kindlad, et p53 pole mitte onkogeen vaid hoopis tuumorsupressorgeen. Tuli ka ilmsiks, et cDNA, mida varasemates katsetes oli kasutatud, sisaldas õige konformatsiooni moodustumiseks ja valgu bioloogilise aktiivsuse saavutamiseks vajalikus konserveerunud piirkonnas mutatsiooni. See seletas ka varem tehtud katsete tulemused.

p53 geen

Inimese tuumrsupressorgeen p53 asub 17. kromosoomi lühikesel õlal (17p13) ja hõlmab umbes 20 kb DNA-d. Geen on jagatud 11 eksoniks, esimene neist on mittekodeeriv (Benchimol et al., 1985; Oren, 1985; Isobe et al., 1986; McBride et al., 1986; Miller et al., 1986). Geeni 5' osas asub suur intron, mille bioloogiline funktsioon ei ole teada. p53 transkriptsiooniline promootor on suhteliselt ebatavaline kuna sealt ei ole leitud ühtegi enamusele eukariootsetele promootoritele omast konsensusjärjestust (CAAT box, TATA box ja G/C rikkad alad). Erinevate organismide (inimene, hiir ja *X. laevis* jt.) kloneeritud p53 geenid on silmatorkavalt sarnased.

p53 valk

Inimese p53 valk sisaldab 393 aminohapet, neist 77 asuvad kõrgelt konserveerunud piirkondades – aminohapete vahemikes 13-23, 117-142, 171-181, 234-250 ja 270-286 (Soussi et al., 1990; Soussi and May, 1996). Need regioonid (tähistatuna domäänidena I-V) mängivad p53-e valgus väga tähtsat rolli. Valgus on neli põhilist funktsionaalset domääni: transaktivatsioonidomään (aminohapped 1-42), järjestusspetsiifilist DNA siduv domään (aminohapped 102-292), oligomerisatsioonidomään (aminohapped 323-356) ja regulatsioonidomään (aminohapped 360-393).

Valgu struktuur ja selle seos funktsiooniga

p53-e aminoterminalne regioon. N-terminaalse regiooni tähtsaim osa on transaktivatsioonidomään (Fields and Jang, 1990; Unger et al., 1992). Külgnevad alad on ilmselt vajalikud selle optimaalseks funktsioneerimiseks. Transaktivatsioonidomääniga seonduvad sellised basaalse transkriptsiooni masinavärgi osad nagu TBP (TATA box binding protein) ja TFIID komponendid (TAF) (Lu and Levine, 1995; Thut et al., 1995). Ka sellised valgud nagu adenoviiruse E1B, inimese

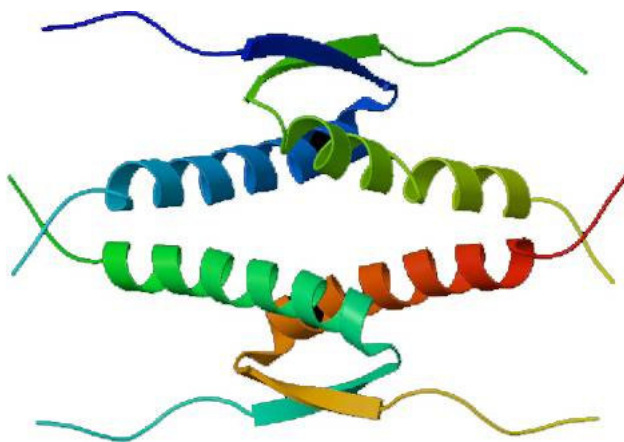
Mdm2 ja hepatiit B viiruse X interakteeruvad p53 aminoterminaalse osaga, kuid need inhibeerivad p53 vahendatud transaktivatsiooni (Yew and Berk, 1992), (Oliner et al., 1993a), (Momand et al., 1992a), (Levine, 1997). Mdm2 vahendatud p53-e negatiivset regulatsiooni puudutan järgmises peatükis. N-terminaalses osas paikneb ka üks viiest konserveerunud piirkonnast (aminohapped 13-23).

Aminoterminaalne regioon sisaldab samuti proliinirikast ala, millel on palju sarnast SH3-siduvate valkudega. Prolinirikas regioon on vajalik kasvajakudedes kasvu allasurumises (Walker and Levine, 1996) ja mõnedes eksperimentaalsetes süsteemides ka p53 vahendatud apoptoosi toimumiseks (Sakamuro et al., 1997).

p53-e tsentraalne domään (südamikudomään). Hõlmab valgust aminohappeid 102-292 ja sisaldab kõrgelt konserveerunud piirkondi II-V. Kasvajatest leitud mutatsioonidest 80-90% on leitud just nendest piirkondadest. Tsentraalse domääni koosseisu kuulub DNA-d siduv domään, mis tunneb ära ja seostub märklaudgeenide järjestustele (El-Deiry et al., 1992). Südamikudomääniga on võime seostuda ka mõnedel valkudel – SV40 suurel T-antigeenil (Jenkins et al., 1988) ning rakulistel valkudel 53BP1 ja 53BP2 (Ruppert and Stillman, 1993; Iwabuchi et al., 1994; Gorina and Pavletich, 1996).

p53-e C-terminaalne regioon. C-terminaalne domään (jäägid 300-393) hõlmab painduvat linker regiooni (jäägid 300-318) ühendades tsentraalset domääni karboksüterminaalse regiooniga ning oligomerisatsioonidomääni (aminohapped 323-356), mis on kaasatud tetrameerse p53 moodustumisel (joonis 9) (Kraiss et al., 1988). Kaks monomeerset peptiidi moodustavad dimeeri, kaks dimeeri moodustavad tetrameeri. Tetrameer on niisiis dimeerne dimeer. Tetramerisatsioon on vajalik *in vivo* transaktivatsiooniks ja p53 sõltuva kasvu mahasurumiseks kartsinoomi rakuliinides (Pietenpol et al., 1994) Kõrgel valgu tasemel on p53-e oligomerisatsioon vajalik ka p53 sõltuva transaktivatsiooni mahasurumiseks (Kristjuhan et al., 1998).

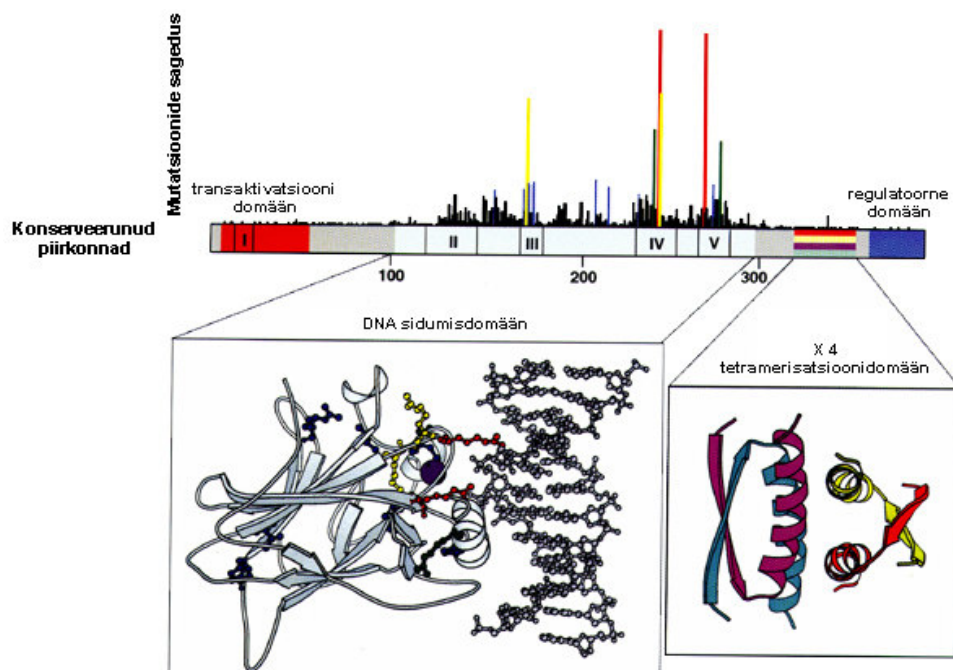
C-terminaalsest regioonist on leitud ka kolm tuumalokalisatsiooni signaali (NLS). Kui neist kõige N-terminuse poolne on muteerunud, siis sünteesitakse ainult tsütoplasmaatilist p53-e, kui aga kumbki teistest NLS-idest on muutunud, leidub p53-e nii tsütoplasmas kui ka tuumas (Dang and Lee, 1989; Shaulsky et al., 1990).



Joonis 9. Tetramerisatsioonidomääni struktuur. Joonisel on kompleksis nelja p53 molekuli tetramerisatsioonidomääni piirkonnad.

Oligomerisatsioonidomääni kõrval (C-terminuse pool) on veel üks regioon (aminohapped 363-393), millest räägitakse kui apoptootilisest domäänist (Wang et al., 1996), transkriptsiooni regulatsiooni domäänist (Wang and Prives, 1995) või DNA kahjustusi äratundvast domäänist (joonis 10). Arvatakse, et see C-terminuse otsmine domään käitub kui p53-e järjestusspetsiifilise seostumise negatiivne regulaator. Seda näitab ka katse, kus p53-e vastase monokloonsed antikeha pAb421 (tunneb ära epitoobi C-terminuses) seostumine p53-ga võib aktiveerida selle spetsiifilise seostumise DNA-ga (Hupp et al., 1995; Abarzua et al., 1996). Arvatakse, et interaktsioonid C-terminuse ja mingi muu regiooni vahel tetrameerses p53-s inaktiveerivad p53 võime siduda DNA-d.

Imetajate rakukultuuridega tehtud katsetes on nähtud p53-e aktiveerumist pärast C-terminaalse domääni fosforüleerimist (Ko and Prives, 1996), atsetüleerimist (Sakaguchi et al., 1998), glükosüleerimist (Shaw et al., 1996) või terve regiooni proteolüütilist eemaldamist (Okorokov and Milner, 1997). Sellised modifikatsioonid põhjustavad ilmselt p53 valgu konformatsioonilisi muutusi ja seeläbi aktiveerivadki p53-e. On näidatud ka paljude rakuliste ja viirusevalkude seotumine karboksüterminaalse osaga – TFIIH subühikud XBD ja XPB, TBP ning hepatiit B viiruse X valk (Wang et al., 1994; Horikoshi et al., 1995).



Joonis 10. p53 valgu domäänne struktuur, konserveerunud piirkonnad ja mutatsioonide esinemine (A. Kristjuhan (1998), Studies of transcriptional activator properties of tumor suppressor protein p53).

p53-e vastus rakulisele stressile

Vastusena DNA kahjustusele (ka hapniku vähesusele ja liigsusele, vabade nukleotiidide vähesusele, aktiveeritud onkogeenidele jne) võib p53 vahendada rakutsükli peatumist või hoopis apoptoosi. Peale DNA kahjustumist (näiteks ahelate katkemine) p53 aktiveerub ja tema tase rakus tõuseb (Kastan et al., 1991; Lu and Lane, 1993). Aktiveerumiseks võib olla mitmeid teid, näiteks võib p53 seonduda C-terminaalse domääni vahendusel katkenud DNA ahelatega (Nelson and Kastan, 1994) ja see stabiliseerib ning aktiveerib valgu. Aktiveerimiseks võib samuti olla vajalik p53 fosforüleerimine, glükosüleerimine, regulaatorvalkudega seostumine, alternatiivne splaising või atsetüleerimine (Gu and Roeder, 1997; Siliciano et al., 1997). p53 aktiveerumisel võib olla kaks tagajärge – rakutsükli peatus (Diller et al., 1990; Lin et al., 1992) või apoptoos (Yonish-Rouach et al., 1991; Shaw et al., 1992).

p53-e funktsiooni regulatsioon

Kuna p53 aktivatsioon (muutumine latentsest vormist aktiivseks) on keskne sündmus vastuses erinevat tüüpi stressile, siis on selge, et see peab olema rangelt kontrollitud. Mõlemad, nii p53 stabilisatsioon kui ka aktivatsioon, koosnevad hulgast molekulaarsetest mehhanismidest.

Fosforüleerimine ja atsetüleerimine. Lisaks p53 kuhjumisele pärast DNA kahjustust, toimub usutavasti ka p53-e kui transkriptsioonifaktori aktivatsioon läbi posttranslatsiooniliste mehhanismide. Mitmed proteiinkinaasid võivad fosforüleerida *in vitro* erinevaid p53 domääne. Näiteks võib tuua DNA-PK (DNA-activated protein kinase), ATM kinaas (Banin et al., 1998; Canman et al., 1998), CK1 (casein kinase I-like protein kinase), CDK-*activating kinase* (CAK) – kõik nad fosforüleerivad p53 N-terminaalse transaktivatsioonidomääni erinevatest saitidest (Steegenga et al., 1996; Chernov et al., 1998; Giaccia and Kastan, 1998). Sellised fosforüleerimised avaldavad mõju p53 transaktiveerivatele omadustele.

p53 C-terminaalne regulatoorne domään on fosforüleerimise märklauaks näiteks kaseiin kinaas 2-le (CK2), proteiin kinaas C-le (PKC) (Herrmann et al., 1991) cdk-le (Wang and Prives, 1995) ja p34cdc2-le (Milner et al., 1990).

p53, Mdm2 ja p14^{ARF}. Nüüdseks on teada, et p53 stabiilsuse regulatsioon on väga kompleksne protsess ja samas väga tundlik stressi erinevatele vormidele. p53-e stabiliseerimiseks võib olla kasutusel mitmeid teid, näiteks fosforüleerimine, Mdm2 sünteesi inhibeerimine ja mdm2-e inhibiitorite (näiteks p14^{ARF}) süntees. Mingil määral on need mehhanismid sõltumatud ja näiteks p14^{ARF} kadu ei hoiä ära p53-e stabilisatsiooni pärast DNA kahjustumist (Kamijo et al., 1997). Mdm2 reguleerib p53 otseselt inhibeerides tema võimet käituda kui transkriptsiooni aktivaator. Usutavasti aktiveerib p53 transkriptsiooni seostudes transkriptsiooni masinavärgi komponentidega oma N-terminuse kaudu. Kui sellega seostub äga Mdm2, siis inhibeeritakse p53 võime aktiveerida transkriptsiooni (Momand et al., 1992b; Oliner et al., 1993b). Niisiis Mdm2 seostub p53-e N-terminusega inhibeerides nõnda p53-e kui transkriptsiooni faktori ja hoiab ära p53-e märklaudgeenide aktivatsiooni. Samas on Mdm2 ka ise p53

märklaugeen (*mdm2* geeni promootoris on p53 seostumissait) ja transkribeeritakse p53 sõltuvalt (Barak et al., 1993; Perry et al., 1993; Wu et al., 1993) ning osaleb niiviisi p53 aktiivsuse negatiivses tagasisides.

Mdm2 avastamine ja bioloogiline roll

Mdm2 (*murine double minute 2*) geen identifitseeriti esmakordselt hiire spontaanselt transformeerunud BALB/c rakuliinist (3T3-DM). *Mdm2* oli üks kolmest geenist (*mdm1*, 2 ja 3), mis leiti olevat antud rakuliinis geeniamplifikatsiooni tõttu kuni 50 korda üleekspresseerunud. *Mdm* geenid olid lokaliseerunud väikestes atsentromeersetesse kromosoomivälistesse tuumakehadesse (nn *double minutes*). Hiljem näidati, et *mdm2* geeniprodukti üleekspressioon põhjustab rakkude transformatsiooni (Fakharzadeh et al., 1991), (Cahilly-Snyder et al., 1987).

Varsti peale *mdm2* geeni avastamist tehti kindlaks ka tema transformatsiooniliste omaduste põhjus. Näidati, et Mdm2 seondub tuumorsupressoriga p53 ja inhibeerib p53-vahendatud transaktivatsiooni (Momand et al., 1992b). Samal ajal täheldati rohkem kui kolmandikus wild-type p53 positiivses inimese sarkoomides *mdm2* geeni amplifikatsiooni (Oliner et al., 1992). Antud tähelepanekud viisid hüpoteesini, et Mdm2 üleekspressioon on üks mehhanism läbi mille saab rakk transformatsiooni protsessi käigus inaktiveerida p53-e.

Mdm2 funktsioneerib E3 ubikvitiinligaasina ja on vastutav p53-e ubikvitinüleerimise ja lagundamisele suunamise eest (Haupt et al., 1997), (Kubbutat et al., 1997). Valkude ubikvitinüleerimine toimub läbi mitme keerulise etapi ja hõlmab valke E1, E2 ja E3 (Lee and Peter, 2003). Ensüüm E1 seob ubikvitiini ja aktiveerib selle, ensüüm E2 kannab ubikvitiini E1-lt üle ligaasile E3, mis omakorda seob ubikvitiini kovalentselt substraadile. Mdm2 käitub kui E3 ligaas ubikvitinüleerides p53-l mitut lüsiini jääki (Nakamura et al., 2000), (Rodriguez et al., 2000). Mdm2 on võimeline ubikvitinüleerima ka iseennast (Fang et al., 2000). E3 ligaasidele on iseloomulik RING motiivi olemasolu, samuti vastutab see Mdm2-e ligaasse aktiivsuse eest (joonis 11). Pikka aega usuti, et Mdm2 sarnaselt iseenda ubikvitinüleerimisele poliubikvitinüleerib ka p53-e lagundamisele suunamiseks. Hiljutised avastused on aga näidanud, et Mdm2 vahendab siiski vaid monomeerset p53-e ubikvitinüleerimist mitmetel lüsiini jääkidel. Monoubikvitinüleerimine kui protsess on üldiselt seotud retseptorite endotsütoosiga, transkriptsiooniga, DNA parandamisega ja kaspaaside värbamisega apoptoosis, alles poliubikvitinüleerimine põhjustab aga antud valgu

lagundamise (Lee and Peter, 2003). Kuna arvatakse, et efektiivseks valgu lagundamiseks proteasoomides on tarvilik vähemalt neljast ubikvitiini molekulist koosneva ahela sidumine lagundamisele mineva valgu lüsiini jääkidele (Thrower et al., 2000), siis ilmselt lisaks Mdm2-le tegelevad p53 ubikvitinüleerimisega ka teised valgud. Vähemalt üks uurimustöö pakub Mdm2-e partneriks p53 ubikvitinüleerimisel p300/CBP-d.

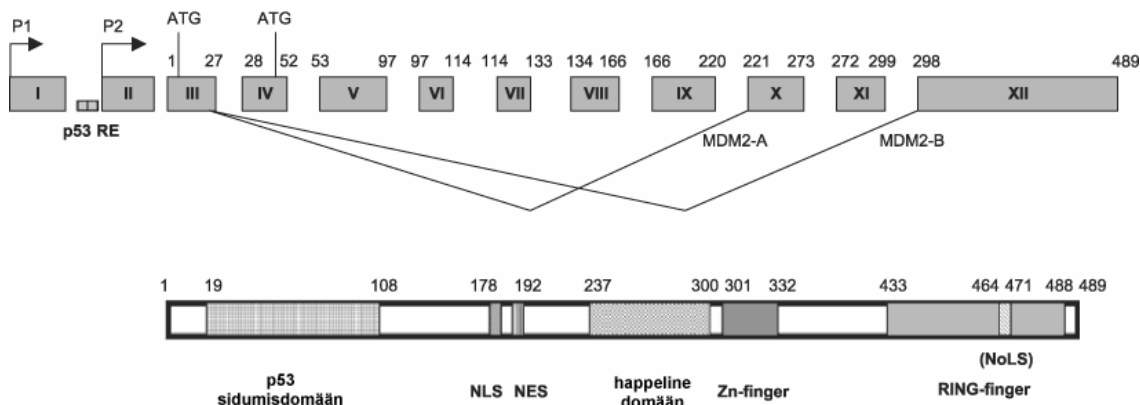
In vivo eksperimentidega on veenvalt näidatud Mdm2/p53 interaktsiooni tähtsust (Jones et al., 1995), (Montes de Oca Luna et al., 1995), (Mendrysa et al., 2003). Mdm2 -/- hiired surevad enne implantatsiooni, seevastu p53 samaaegne kustutamine genoomist päästab hiired surmast. See annab tunnistust, et hiirte surm on põhjustatud Mdm2 kadumisest tulenevast p53 aktivatsioonist. Uurimaks Mdm2 erinevast ekspressioonitasemest tingitud muutuseid täiskasvanud organismis, tegid Mendrysa *et al.* (Mendrysa et al., 2003) katseid hiirel, kelle üks Mdm2-te ekspresseerivatest alleelidest ekspresseeris valku vaid 30% ulatuses normaalsest koguhulgast, teiselt alleelilt ei ekspresseeritud üldse funktsionaalset Mdm2 valku. Sellisted hiired olid võrreldes normaalsete hiirtega vähenenud kehakaaluga, probleeme oli vereloomega, samuti oli tõusnud tundlikus radioaktiivsusele. Selline fenotüüp on p53 sõltumatu, rõhutades Mdm2 taseme reguleerimise tähtsust erinevates rakutüüpides. Seega on Mdm2 kriitiline faktor p53-e aktiivsuse reguleerimisel, Mdm2 kaol on tõsised tagajärjed nii raku tasemel kui ka embrüos.

Mdm2 geen ja valk

Nii hiire kui inimese *mdm2* geen sisaldab 12 eksonit (joonis 11), mille põhjal võidakse genereerida mitmeid erinevaid valke. Geen on 2 promootorit, millest üks on p53 aktiveeritav. Promootorid genereerivad 2-te valku – täispikk p90 ja lühem p76, mida initsieeritakse sisemiselt ATG järjestuselt (Olson et al., 1993), (Saucedo et al., 1999), (Perry et al., 1993). p76-l puudub osaliselt p53 sidumisdomään ja see võib käituda p90 suhtes dominant-negatiivse inhibiitorina ning aktiveerida p53-e. Paljudes hiire ja inimese kasvajates esineb *mdm2*-e alternatiivset splaissimist ja valgu erinevate lühemate vormide genereerimist. Inimeses on kaks põhilist alternatiivseks

splaiissimisvariandiks mdm2-A ja mdm2-B, kus puuduvad vastavalt eksonid 4-9 ja 4-11. Kumbki valk ei sisalda p53-e seostumissaiti. Mdm2-B (Mdm2-ALT1) interakteerub täispika Mdm2-ga ja takistab selle liikumist tuuma (Evans et al., 2001). Ka hiirte kasvajatest on leitud mitmesuguseid splaisitud Mdm2-e vorme (Dang et al., 2002). Sellised lühikesed Mdm2-e valgu vormid võivad tihti käituda dominant-negatiivsete inhibiitoritena takistades täispika Mdm2 funktsiooni ja tõstes p53-e aktiivsust. Siit tõstatub loomulikult küsimus – miks kasvajakarak peaks vajama selliseid Mdm2-e lühikesi vorme (mis aktiveerivad p53-e)? Lühikeste vormide eksisteerimise üks võimalikke seletusi oleks signaali “ülejäak” ajast, mil rakk üritas säilitada rakutsükli üle kontrolli.

p53 seostumisdomään moodustub ca 100-st esimesest aminoterminaalsest aminohappest. Selle domääni kaudu seostub Mdm2 p53-e N-terminaalse transaktivatsioonidomääniga. Seega isegi kui Mdm2 ei suuda p53-e lagundamisele suunata, segab see p53-e seostumast transkriptsioonilise masinavärgiga. Teiste valgumotiivide hulgast võib leida tuuma lokalisatsiooni signaali (NLS) ja tuuma ekspordi signaali (NES). Nende signaalide abil saab Mdm2 liikuda nii raku tuuma kui ka sealt välja. Aminohapped 464-471 võivad moodustada tuumakese lokalisatsiooni signaali (Lohrum et al., 2000), aga selle bioloogiline roll on senini teadmata. Keskne happeline domään on teadaolevalt vajalik interaktsiooniks ribosoomi valgu L5-ga ning p300/CBP (*CREB binding protein*) valguga. Arvatakse, et see domään mängib samuti väga tähtsat osa p53 lagundamise juures – hiljaaegu avastati, et Mdm2-e mutant, kus osaliselt puudub happeline domään, suudab küll ubikvitinüleerida p53-e, ometigi ei suuda seda lagundamisele suunata (Argentini et al., 2001), (Zhu et al., 2001). Lisaks sisaldab Mdm2 valk veel „tsinksõrme“ motiivi (mille roll pole selge) ning sellele järgnevat RING domääni.



Joonis 11. Mdm2 geeni ja valgu struktuur. *mdm2* geen sisaldab 12 eksonit ja kahte p53 vastavat elementi (p53 RE) (intronis 1). Promootorid on märgitud joonisel nooltega. Täispikk Mdm2 valk (p90) transleeritakse alustades esimesest startkoodonist (eksonis 3), lühike vorm (p76) transleeritakse alates teisest startkoodonist (eksonis 4). Kaks põhilist alternatiivse splaisingu varianti inimeses on tähistatud MDM2-A ning MDM2-B. Alumisel paneelil on toodud Mdm2 valgu motiivid: NES-tuumakese ekspordi signaal, Zn-finger-„tsinksõrm“ motiiv, NoLS-tuumakese lokalisatsiooni signaal, RING-finger-RING-finger domään. Araabia numbrid tähistavad aminohappeid, rooma numbrid eksoneid (Iwakuma and Lozano, 2003).

Mdm2 sõltuv p53-e taseme regulatsioon

p53 aktiveerib paljude märklaudgeenide transkriptsiooni, sealhulgas ka *mdm2* transkribeerimist (Perry et al., 1993), (Barak et al., 1993). p53 seondub *mdm2*-e P2 promootorile ja tõstab *mdm2*-e transkriptsiooni, mille tulemusena Mdm2 tase rakus tõuseb. Kuna Mdm2 inhibeerib p53-e aktiivsust, siis p53 tase seepeale väheneb ja alaneb ka *mdm2*-e transkriptsioon. Moodustub negatiivne tagasiside ahel, mille abil on p53 funktsioon tugevasti kontrollitud. Võimalik on ka Mdm2-e ubiquitinüleerimine tema enda poolt, mille tulemusena indutseerib Mdm2 iseenda degradatsiooni. (Fang et al., 2000), (Honda and Yasuda, 2000). See annab juurde veel ühe võimaluse reguleerimaks Mdm2-e taset ja seeläbi ka p53 taset.

p53 stabiliseerimiseks (peale DNA kahjustumist, onkogeenide aktivatsiooni, hüpoksiat jne) on mitmeid mooduseid. Esimeseks võimaluseks on p53-e posttranslatsiooniline modifitseerimine, mis takistab Mdm2-e seondumist ja viib p53-e stabiliseerumisele. Teise võimalusena võib see toimuda tuumor-supressorvalgu p14^{ARF} kaasabil, p14^{ARF} seondub Mdm2-ga ja takistab Mdm2-e seostumist p53-ga, stabiliseerides seeläbi nii Mdm2-te kui ka p53-e (Lowe and Sherr, 2003), (Zhang and

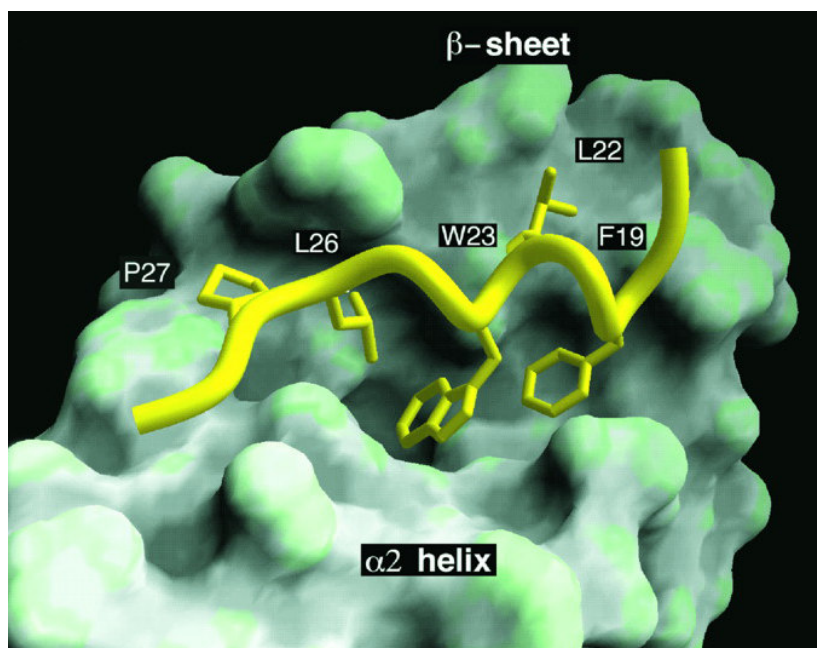
Xiong, 2001). Viimasel ajal on p53-e reguleerijana esile tõustetud ka Mdm2 perekonna liige MdmX. Vastupidiselt Mdm2-le ei suuda MdmX p53-e ubikvitinüleerida, MdmX hoopis stabiliseerib nii p53-e kui ka Mdm2-te (Stad et al., 2001). Ühe võimalusena on välja toodud ka deubikvitinüleerimise võimalus, mille üheks läbiviijaks võiks olla valk HAUSP(Li et al., 2002), (Lim et al., 2004). HAUSP ubikvitiin-hüdrolaas seondub otseselt p53-ga ja deubikvitinüleerib seda (Li et al., 2002). Samuti on HAUSP võimeline deubikvitinüleerima Mdm2-te (Li et al., 2004).

p53-Mdm2 interaktsioon

Mdm2 reguleerib p53-e läbi kahe negatiivse tagasiside ahela – Mdm2 võib inhibeerida p53 transkriptsioonilise aktiivsuse või suunata selle proteasoom-sõltuvalt lagundamisele. Et selline negatiivne tagasiside saaks toimuda, on vajalik Mdm2-e seostumine p53-ga. Mdm2 seostub p53-e N-terminaalse transaktivatsioonidomääniga (aminohappe jäägid 15-29). p53 transaktivatsiooni domääni α -helikaalne konformatsioon on vajalik normaalse kompleksi moodustumiseks Mdm2-ga. Mdm2-e seostumine p14^{ARF}-ga inhibeerib Mdm2-e seostumise p53-ga (Sherr and Weber, 2000). p53-e transaktivatsiooni domääniga seotud fosforüleerimised on samuti tähtsad reguleerimaks p53-Mdm2 interaktsiooni.

p53-Mdm2 kompleksi kristallstruktuur on juba mõnda aega teada (Kussie et al., 1996a) – Mdm2 N-terminaalne domään moodustab sügava hüdrofoobse vao, kuhu seondub p53 transaktivatsiooni domään (joonis 12). Sel viisil on p53 kaitstud interakteerumise eest transkriptsiooni masinavärgiga. Otsene interaktsioon hõlmab kummaski valgust suhteliselt väikesid alasid: Mdm2 puhul aminohappejääke 25-109, p53 puhul aminohappejääke 15-29. p53 minimaalne Mdm2 seondumissait jääb aminohapete 18-26 vahele (Chen et al., 1993), (Bottger et al., 1997b). Näidatud on aminohappejääkide Leu14, Phe19, Leu22, Trp23 ja Leu26 tähtsust seostumisel, kriitilisem roll arvatakse neist olevat Phe19, Trp23 ja Leu26-l (Chen et al., 1993), (Bottger et al., 1997a). p53-e Mdm2 seostumissaidi mutandid on resistentsed Mdm2 sõltuvalt lagundamisele (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Mdm2-e mutatsioonid asendites Gly58, Glu68, Val75 ja Cys77 põhjustavad võimetuse seostuda

p53-ga (Freedman et al., 1997). Interakteeruvatel domäänidel võib täheldada tugevat lukk-võti konfiguratsiooni – p53-e amfipaatses α -heeliksi hüdrofoobne külg (aa 19-26) ulatub sügavale Mdm2 hüdrofoobse vao sisse. p53-e α -heeliksi stabiilsuse tagamisel on väga tähtis roll Thr18 jäägil (Kussie et al., 1996b). Mdm2 poolt interaktsiooniks vajaliku konformatsiooni moodustamisel kaasatud aa 26-108 moodustavad kahest sarnasest osast kokkuvoltunud sügava vao (Kussie et al., 1996b).



Joonis 12. p53-Mdm2 kompleksi struktuur. Mdm2-e pind on tähistatud sinisena, p53 on näidatud joonisel kollasena. Mdm2-ga interakteeruvad p53-e aminohapped on tähistatud numbritega (Kussie et al., 1996a).

p53-Mdm2 interaktsiooni saab mõjutada p53-e kindlate aminohappe jääkide fosforüleerimisega. S15-e ja S20-e fosforüleerimine ei mõjuta seondumist, samas T18 fosforüleerimine nõrgestab seostumist 10 korda (Schon et al., 2002). DNA kahjustusest tingitud p53-Mdm2 kompleksi lagunemine *in vivo* eeldab samuti vaid T18 fosforüleerimist.

Põhiline tingimus (aga mitte ainus) p53 lagundamisele suunamiseks on otsene interaktsioon Mdm2-ga. Lisatingimusteks on ka tetramerisatsioonidomääni olemasolu p53-l – see võimendab Mdm2-e seostumist, samuti C-terminuses olevad lüsiinijäägid, mis on vajalikud ankrud monoubikvitinüleerimiseks (Fang et al., 2000), (Kubbutat et al., 1998).

Eksperimentaalne osa

Töö eesmärk

Töö eesmärgiks oli optimeerida FRET meetodit detekteerimaks p53 ja Mdm2 valkude interaktsiooni elusas imetaja rakus.

Materjalid ja metoodika

Ekspressioonivektorid

Vektorid pECFP-C1 ja pEYFP-C1 on pärit firmast *Clontech*. pECFP-C1 kodeerib täiustatud varianti (*enhanced cyan fluorescent protein*) *Aequorea victoria* rohelisest fluorestseeruvast valgust (GFP). ECFP valk sisaldab kuute aminohappelise asendust. Tyr-66 asendus aminohappeks Trp annab CFP valgule omase neeldumis- ja kiirgusspektri, ülejäänud asendused on vajalikud valgu fluorestsentsi intensiivsuse ja lahustuvuse parandamiseks. pEYFP-C1 kodeerib samuti täiustatud varianti (*enhanced yellow fluorescent protein*) *Aequorea victoria* rohelisest fluorestseeruvast valgust (GFP). EYFP-C1 valku on sisse viidud 4 aminohappelise asendust. *Multiple cloning site* on mõlemas vektoris fluorestseeruvat valku kodeeriva fragmendi ja stop-koodoni vahel. Samuti sisaldavad mõlemad vektorid SV40 replikatsiooni *origin*-i ja neomütsiini resistentsusgeeni (selekteerimiseks imetaja rakkudes). *E. Coli*-s selekteerimiseks kodeerivad vektorid kanamütsiini resistentsusgeeni.

Mdm2-e ja *p53* cDNA on pärit vastavalt vektoritest pCHDMIA (kink A. Levinlt) ja p53hwt-pCG. pCHDMIA vektorist on *mdm2*-e cDNA eraldatud PCR meetodi abil (N-terminaalse praimeriga) on kasutatud ka cDNA ühtlustamiseks pEYFP-C1 lugemisraamiga). Saadud cDNA on sisestatud pEYFP-C1 vektorisse restriktasid XhoI ja EcoRI abil. Tulemuseks on EYFP-C1-Mdm2 liitvalgu ekspresseeriv vektor, kus alates N-terminusest asetsevad EYFP-d kodeeriv osa, linkerjärjestus (21 aluspaari), Mdm2-e kodeeriv järjestus. Kasutusel olnud praimerjärjestused on järgmised:

5' GCCTCGAGCTATGTGCAATACCAACATGTCTGTACCTA 3' (N-terminaalsele otsale) ja 5' GCTCATATAATCGTTTAGTCATAATATACTGGCC 3' (C-terminaalsele otsale).

p53hwt-pCG vektorist pärit p53-e cDNA on sisestatud pECFP-C1 vektorisse restriктаaside HpaI ja XbaI abil. Kuna XbaI restriksioonisaidid on pECFP-C1-l metüleeritud, siis eeldas XbaI restriksioon ka vektori eelnevat ekspresseerimist ning eraldamist dam- *E. Coli* tüves. Lõpptulemuseks on ECFP-C1-p53 liitvalku ekspresseeriv vektor, kus alates N-terminusest asetsevad ECFP-d kodeeriv osa, linkerjärjestus (78 aluspaari), p53-e kodeeriv järjestus.

EGFP vormidest on valitud just C1 variandid seepärast, et p53 ja Mdm2 interakteeruvad teineteisega N-terminaalsete domäänide vahendusel ja loodetavasti jäävad sel juhul FRET-i tekkeks piisavalt lähestikku ka liitvalkude koosseisus olevad ECFP ja EYFP.

Rakud ja nende kultiveerimine

Katsetes kasutasin hamstri ovaariumi rakuliini 4.15. Rakke kasvasin söötmel F12. Söötmel lisasin veise loote seerumit (FCS) lõppkonsentratsiooniga 10%. Rakud kasvasid 37°C juures 5% CO₂ keskkonnas.

Rakkude transfekteeimine

Rakke transfekteeisin elektroporatsiooni teel. Poratsiooni sooritasin mahus 250µl (proovi kohta), pH säilitamiseks lisasin poratsiooniküveti (*Biorad*) Na-BES-i lõppkonsentratsiooniga 5mM, samuti lisasin igasse küveti 50µg *carrier* DNA-d. Transfektsiooni läbiviimiseks kasutasin firma *Biorad* elektroporaatorit. Rakkude 4.15 puhul kasutasin poreerimisel pinget 230V.

Antikehad

Immuunopretsipitatsioonil ning *western* analüüsil kasutasin primaarseid antikehasid 122, DO1, 248, 2A10. Antikehad 122, DO1 ja 248 on p53-e vastased antikehad, antikeha 248 seondub vaid hiire p53-ga (122 ja DO1 tunnevad ära ka inimese p53-e). Epitoobid asuvad antikehadel vastavalt C-terminuses – aminohapped 371-380 (antikeha 122), N-terminuses – aminohapped 21-25 (DO1) ja aminohapped 43-52 (248). Mdm2-e vastasel antikehal 2A10 on teada kaks epitoopi Mdm2-s, mõlemad asuvad valgu C-terminuses.

Sekundaarse antikehana kasutasin kitse hiire IgG vastast aluselise fosfataadiga konjugeeritud antikeha firmalt *Lab AS*.

Immuunosadestamine

Immuunosadestamiseks kogusin rakud koekultuuritassidelt ning lüüsisin need sobivas mahus lüüsipuhvris (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 1% TritonX-100). Tsentrifuugisin saadud segu 15000 rpm 10min, eemaldasini supernatandi. Sadestamiseks kasutasin firma *Dynal Biotech ASA* magnetkerakesi (*goat anti-mouse IgG, Dynabeads® M-450*). Kerakeste ettevalmistamiseks pesin neid pesulahusega (0,1% BSA+NaN₃ PBS-is) ning inkubeerisin vajaliku antikehaga koekultuuri söötmes 1h toatemperatuuril (ühe proovi kohta 25µl kerakesi ja 1,5 µg antikeha). Peale 1h möödumist pesin kerakesi 3 korda pesulahusega ja segasin kokku sadestamisseguga (rakulüsaat+antikehaga seotud kerakesed). Proove hoidsin 4°C juures 1h, peale mida loputasin proove 5 korda lüüsipuhvriga. Lõpuks lisasin kerakestele SDS lüüsipuhvrit, kuumutasin segu 100°C juures 5min. Enne proovide geelile kandmist eraldasini kerakesed lahusest spetsiaalse magneti abil.

Western analüüs

Transfekteritud rakud lüüsisin SDS lüüsipuhvris (Laemmli, 1970) ja kandsin seejärel proovid SDS elektroforeesi geelile (10%). Teise võimalusena kandsin geelile

immuunosadestamise tulemusena saadud proovid. Peale SDS-elektroforeesi lõppu kandsin proovid geelilt polüvinüül fluoriid (PVDF) filtrile. Peale ülekande lõppu blokeerisin filtrit 1% rasvavaba piimapulbri lahusega PBS-Tweenis (0,05% Tween 20) 30min toatemperatuuril. Primaarse antikehaga inkubeerisin filtrit 1h toatemperatuuril (primaarset antikeha lahjendatud 1:1000), seejärel pesin filtrit 3 korda PBS-Tween-i lahusega. Sekundaarse antikeha inkubatsioon toimus 1h toatemperatuuril, sekundaarse antikeha lahjenduseks oli 1:1000. Signaali filtril detekteerisin aluselise fosfataasi substraadi (33µl BCIP (50mg/ml), 66µl NBT (50mg/ml) 10ml-s aluselise fosfataadi puhvris (10mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100mM Tris·Cl)) abil.

Fluorestsentsmikroskoopia ja FRET analüüs

Fluorestseeruvate rakkude vaatlemiseks ja nendest fotode tegemiseks kasutasin mikroskoopi Olympus BX41, mis oli varustatud CCD kaameraga Olympus DP70. Kasutada olid järgmised filtrid: ergastusfiltrid 426-446nm (CFP ergastus) ja 490-510nm (YFP ergastus), emissioonifiltrid 450-490nm (CFP emissioon) ja 520-550nm (YFP emissioon), samuti poolläbilaskvad peeglid 455 ja Q515. Mikroskoopiaks kasvasin rakud katteklaasil, vaatlemiseks ei fikseerinud rakke – asetasin katteklaasi alusklaasile (rakud allpool) tilga PBS-i sisse.

FRET analüüsiks (fotode korrektsiooniks) on vajalik 7 foto olemasolu. Vajalikud 7 fotot on:

- a) doonori signaal kasutades doonori ergastuse ja emissiooni fitreid;
- b) doonori signaal kasutades doonori ergastuse ja aktseptori emissiooni fitreid;
- c) aktseptori signaal kasutades doonori ergastuse ja aktseptori emissiooni fitreid;
- d) aktseptori signaal kasutades aktseptori ergastuse ja emissiooni fitreid;
- e) doonori ja aktseptori signaal kasutades doonori ergastuse ja emissiooni fitreid;
- f) doonori ja aktseptori signaal kasutades doonori ergastuse ja aktseptori emissiooni fitreid;

- g) doonori ja aktseptori signaal kasutades aktseptori ergastuse ja emissiooni fitreid.

Neli esimest fotot (a, b, c, d) on vajalikud spektrite kattumisest tuleneva läbikumamismäära leidmiseks, kolme viimase foto (e, f, g) põhjal saab arvutada tõelise FRET-i signaali. Kõik fotod (samast katsest) on tehtud identse säriaajaga, vajadusel on muudetud vaid ergastusvalguse intensiivsust. Fotofailid salvestasin mustvalgete 8 bitiste .tif failidena mõõtmetega 1360x1024px. Fotode töötlemiseks (taustamüra lahutamine, vajaliku osa selekteerimine jne) ning signaalide korrigeerimiseks ja lõpliku FRET signaali arvutamiseks kasutasin Java platvormil töötavat vabavaralist programmi ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ning firma *CircuSoft Instrumentation LLC* programmi PFRET (<http://www.circusoft.com/pfret.html>).

Analüüs fluorestsents-spektrofotomeetril (fluorimeetril)

Fluorestsents-spektrofotomeetriliseks analüüsiks kasutasin firma *Hitachi* fluorimeetrit F-4500, küvetina oli kasutusel 10x10 mm küvett. Enne analüüsi kogusin rakud koekultuuri tassidelt 1 ml PBS-i lahuses. Ergastuseks kasutasin lainepikkuseid 431nm ja 497nm (vastavalt CFP ja YFP ergastamiseks), monokromaatori pilu laius 5nm.

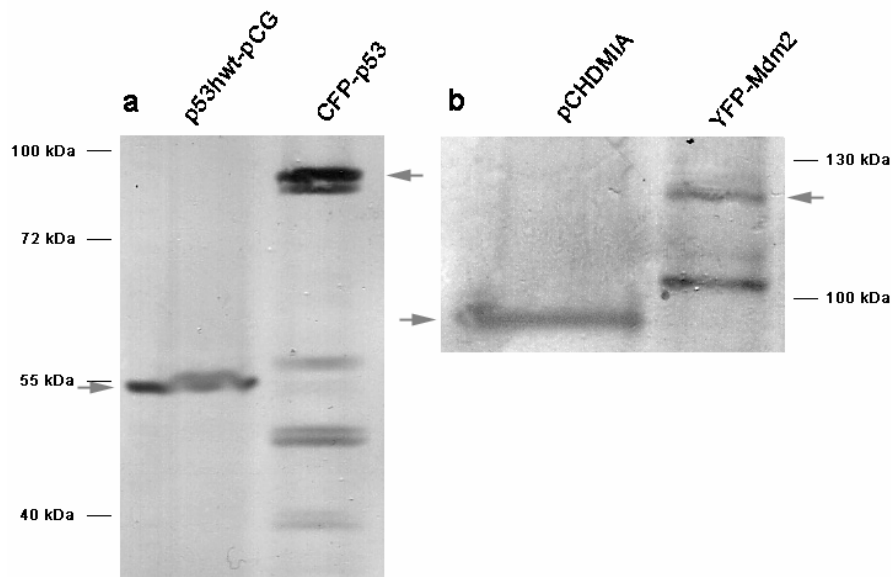
Töö tulemused ja arutelu

Tulemused

Kloneeritud ekspressioonivektorid ekspresseeruvad eukariootses rakus.

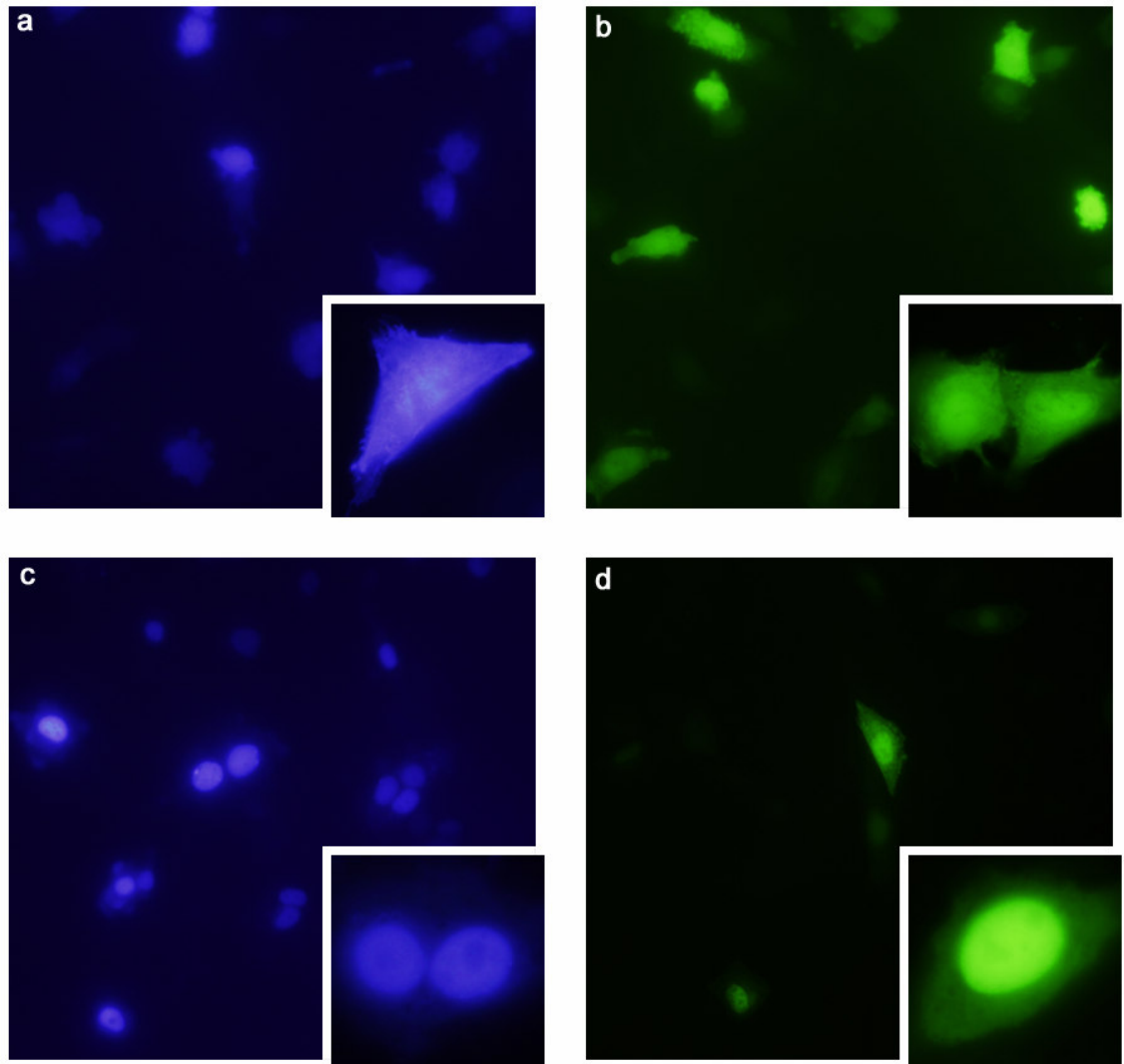
Veendumaks kloneeritud ekspressioonivektorite funktsionaalsuses (liitvalkude mõlema osapoole korrektses ekspresseerumises) eukariootses rakus kasutasin *western* analüüsi ja fluorestsentsmikroskoopiat. *Western* analüüsiks transfecteerisin 4.15 rakke liitvalke ekspresseerivate vektoritega pECFP-C1-p53 (edaspidi CFP-p53) ja pEYFP-Mdm2 (edaspidi YFP-Mdm2) (kumbagi 1µg proovi kohta). Kontrollidena transfecteerisin plasmide p53hwt-pCG ja pCHDMIA (1µg proovi kohta).

Western analüüsi tulemused näitasid, et eelnevalt transfecteeritud rakkude lüsaadist on vastavate antikehadega detekteeritav nii CFP-p53 kui ka YFP-Mdm2 (joonis 13). Kuna ECFP-C1 (edaspidi CFP) ja EYFP-C1 (edaspidi YFP) liikuvus SDS foreesil peaks langema kokku ca 30 kDa valgu liikuvusega, siis vastavate liitvalkude liikuvused peaksid olema ca 83 kDa (CFP-p53) ja 120 kDa (YFP-Mdm2, Mdm2-e lühema vormi esinemise puhul ka 106 kDa).



Joonis 13. *Western* analüüs liitvalkude ekspressiooni kontrolliks. Paneelil a on näha CFP-p53 liitvalgu ekspressioon (kontrolliks p53hwt-pCG), nooltega on näidatud p53hwt-pCG ja CFP-p53 ekspressiooniproduktid, paneelil b on näha YFP-Mdm2 liitvalgu ekspressioon (kontrolliks pCHDMIA), nooltega on näidatud pCHDMIA ja YFP-Mdm2 ekspressioon. Kasutatud primaarsed antikehad on vastavalt 122 ja 2A10.

Liitvalkude ekspressioon oli näha ka fluorestsentsmikroskoobis. Rakkudesse poreerisin kõiki plasmide (CFP, YFP, CFP-p53, YFP-Mdm2) 1µg. Rakkude vaatlemisel kasutasin suurendusi 400X ja 1000X. Nagu näha joonisel 14, liitvalgud ekspresseeruvad (samuti ka kontrollidena kasutatud CFP ja YFP valgud).



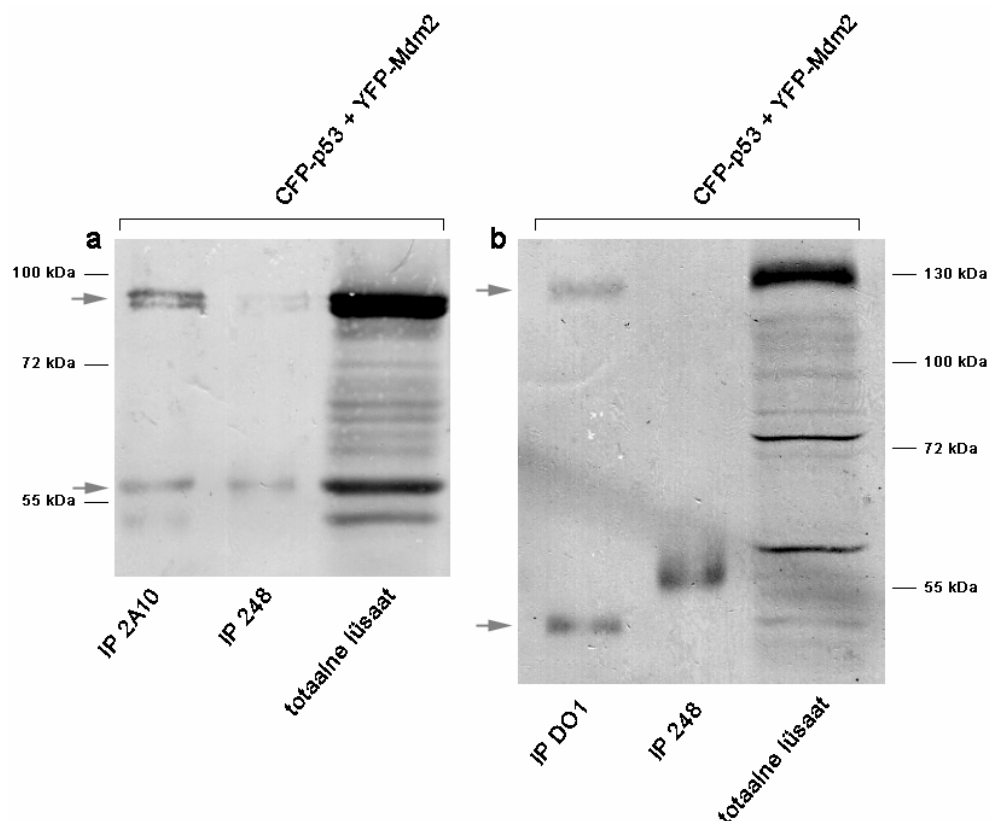
Joonis 14. Liitvalkude ekspressioon nähtuna fluorestsentsmikroskoobis. Paneelil a on näha CFP ekspressioon, paneelil b YFP, paneelil c CFP-p53 ja paneelil d YFP-Mdm2 ekspressioon.

Fotodelt on samuti näha valkude subtsellulaarne lokalisatsioon. CFP ja YFP on lokaliseerunud nii tsütoplasmas kui tuumas, CFP-p53 ja YFP-Mdm2 lokaliseeruvad rakkude tuumadesse (kuna p53 ja Mdm2 normaalselt esinevadki raku tuumas, siis

liitvalkude liikumine tuuma on veel üheks tunnistuseks, et liitvalgul säilinud p53-e või Mdm2-e omadused (tuuma lokalisatsiooni signaal)).

Tehtud katsed andsid tunnistust, et loodud ekspressioonivektorid ekspresseerivad soovitud liitvalke ning liitvalgud on detekteeritavad mõlema osapoole kaudu – *western* analüüsil võib näha p53-e või Mdm2-e olemasolu; mikroskoobi abil on näha CFP või YFP osapoole ekspressiooni.

Liitvalgud sadenevad immuunosadestamisel kompleksina. Uurimaks liitvalkude omavahelise kompleksi moodustamist kasutasin immuunosadestamise abi. Rakkudesse kotransfekteerisin liitvalke ekspresseerivaid plasmide CFP-p53 ja YFP-Mdm2 (vastavalt 5µg ja 1µg). Rakud lüüsisin 24h peale transfektsiooni, viisin läbi immuunosadestamise. Komplekside sadestamiseks kasutasin antikehasid DO1 ja 2A10 (negatiivse kontrollina (mitterelevantse antikehana) ka antikeha 248). Tegin *western* analüüsi, valkude olemasolu filtril detekteerisin antikehadega DO1 ja 2A10 (joonis 15).



Joonis 15. Liitvalkude komplekside immuunosadestamine. Rakkudesse on koporeeritud ekspressioonivektoreid CFP-p53 ja YFP-Mdm2. Paneelil a vasakult esimesel rajal on immuunosadestamine (immuunopretsipitatsioon – IP) läbi viidud antikeha 2A10 abil, teisel rajal on sadestatud antikeha 248 abil, kolmandal rajal pole sadestamist teostatud – SDS geelile on kantud rakulüsaat (ca ½ sadestamisele võetust). Nooltega on näidatud CFP-p53 ja antikeha raske ahel. Filter on inkubeeritud antikehaga DO1. Paneelil b vasakult esimesel rajal on immuunosadestamine läbi viidud antikeha DO1 abil, teisel rajal on sadestatud antikeha 248 abil, kolmandal rajal pole sadestamist teostatud – SDS geelile on kantud rakulüsaat (ca ½ sadestamisele võetust). Nooltega on näidatud YFP-Mdm2 ja antikeha raske ahel. Filter on inkubeeritud antikehaga 2A10.

Katse tulemusena selgus, et liitvalgud (CFP-p53 ja YFP-Mdm2) moodustavad omavahel kompleksi ja selline kompleks on lahusest välja sadestatav nii p53-e kui ka Mdm2-e vastase antikehaga. Mdm2-e vastase antikehaga 2A10 sadeneb lahusest välja kompleks, kus peale SDS lüüsi (kompleks laguneb) ja geelelektroforeesi on detekteeritav p53. Samuti on võimalik p53 vastase antikehaga DO1 lahusest välja sadestada kompleks, milles hiljem detekteeritav Mdm2.

Pildianalüüs programmiga ImageJ. FRET fluorestsentsmikroskoopia eeldab üsna mahukat pildianalüüsi. Kahjuks ei ole tarkvara valik FRET'i mõõtmiseks

fotofailidelt kuigi suur. Esmalt katsetasin piltide kvantiteerimisel ja FRET'i arvutamisel programmi ImageJ. ImageJ abil saab vaadata, toimetada, kvantiteerida jne 8, 16 ja 32-bitiseid pildifaile. Kvantiteerimine tähendab antud juhul kasutaja poolt defineeritud ala või üksiku pikseli keskmise väärtuse (heleduse) arvutamist.

Tavapärane FRET signaali leidmise protseduur oli üsna aeganõudev. Esmalt leidsin CFP ja YFP spektraalse kattuvuse tõttu tekkinud kanalite „läbikumamise“ konstandid (iga katseseeria jaoks eraldi) – st. kui suure osa moodustab näivast FRET'i signaalist CFP emissioon ning milline osakaal on näivas FRET'i signaalis YFP ergastamisel CFP ergastusfiltriga (nn. „otseergastamine“). „Läbikumavuskonstantide“ leidmine eeldas nelja pildi olemasolu:

- a) doonori signaal kasutades doonori ergastuse ja emissiooni fitreid;
- b) doonori signaal kasutades doonori ergastuse ja aktseptori emissiooni fitreid;
- c) aktseptori signaal kasutades doonori ergastuse ja aktseptori emissiooni fitreid;
- d) aktseptori signaal kasutades aktseptori ergastuse ja emissiooni fitreid.

Konstandid leidsin järgnevalt: $\alpha = b/a$ (CFP emissiooni osa näivas FRET-i signaalis), $\beta = c/d$ (YFP „otseergastuse“ osa näivas FRET-i signaalis). Järgmisena avasin koporeeritud (CFP-p53 + YFP-Mdm2) rakkude fotod, kvantiteerisin need ja lahutasin näivast FRET-i signaalist spektrite kattumisest tulenevad komponendid. Sain tõelise FRET'i signaali. Selles etapis oli vajalik järgmiste fotode olemasolu:

- e) doonori ja aktseptori signaal kasutades doonori ergastuse ja emissiooni fitreid;
- f) doonori ja aktseptori signaal kasutades doonori ergastuse ja aktseptori emissiooni fitreid;
- g) doonori ja aktseptori signaal kasutades aktseptori ergastuse ja emissiooni fitreid.

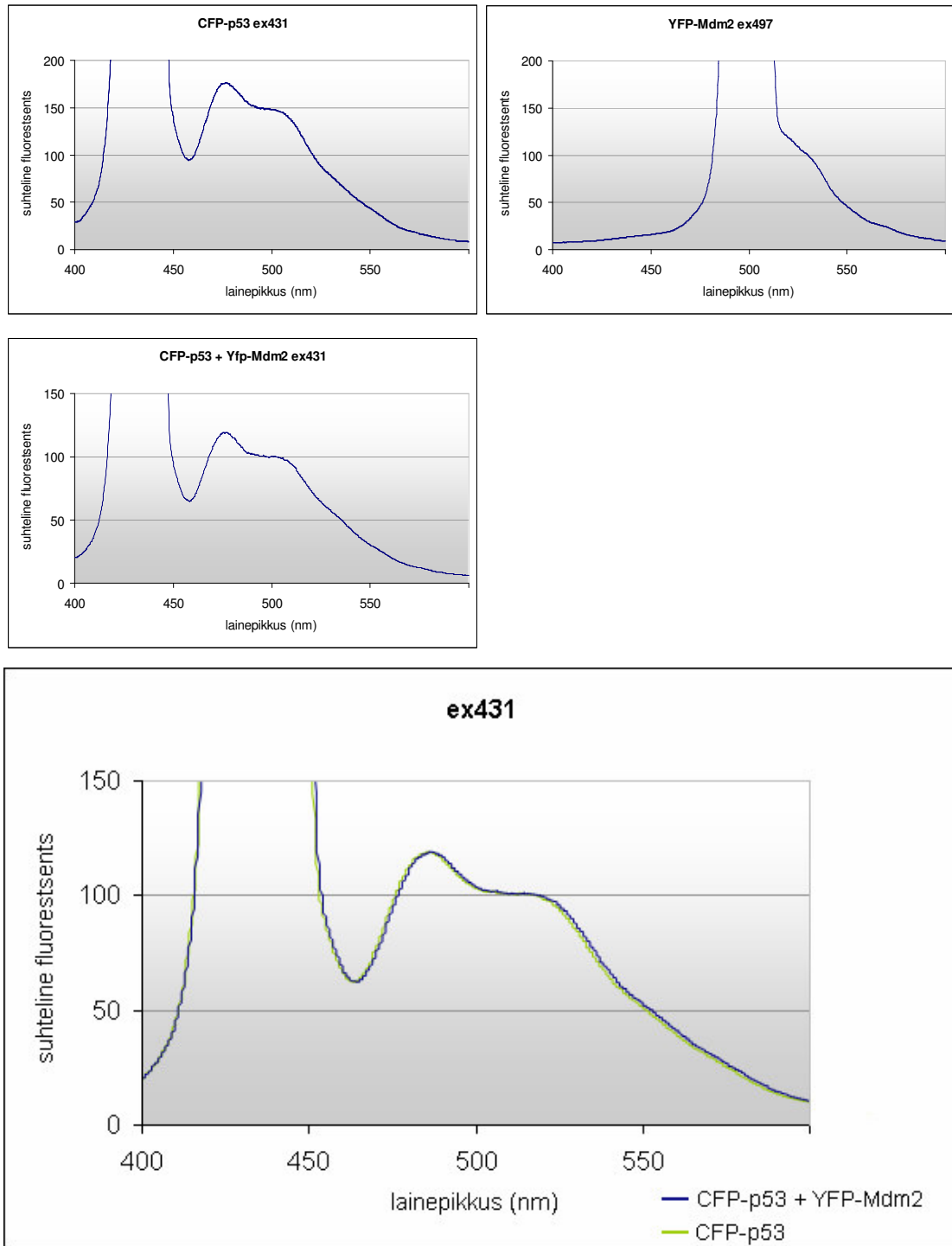
Tõelise FRET-i signaali leidmiseks viisin seega läbi tehte: $FRET = f - \alpha e - \beta g$. Piltide kvantiteerimisele eelnevalt lahutasin neist taustamüra signaali.

Antud tarkvara ja lähenemist kasutades ei suutnud kahjuks tõelist FRET signaali tuvastada. Võimalikke põhjusi puudutan edasistes peatükkides.

Spektraalanalüüs fluorimeetril. Kuna FRET signaali tuvastamine kasutades fluorestsentsmikroskoopi ja ImageJ pilditöötlusarkvara oli ebõnnestunud, siis otsustasin kasutada veidi teist lähenemisviisi – fluorimeetrit. Samuti võimaldab fluorimeeter veenduda kasutatavate fluorestseeruvate valkude spektrite vastavuses tootja poolt märgituga.

Fluorimeetri kindlaks plussiks on spektraalse kattuvuse probleemi vähetähtsus FRET-i detekteerimisel. Kui fluorestsentsmikroskoobis ei ole võimalik silmaga eristada (ega ka pildifaili põhjal öelda), kas näiva FRET-i signaali puhul on tegemist tõelise FRET-iga või tuleneb nähtav signaal CFP emissioonist või YFP „otseergastusest“ (sest filtrid on üsna laia spektraalse kattuvusega ja alles pildianalüüs peab seda ütleva), siis fluorimeetril saab asetada CFP emissioonigraafiku ja FRET graafiku üksteise peale (*overlay*) – kui FRET-i graafikul on näha suuremat signaali YFP emissiooni alas, siis seda signaalide vahet võibki lugeda FRET signaaliks.

Kuna YFP-Mdm2 liitvalgu tase on rakkudes tunduvalt madalam kui CFP-p53 liitvalgu oma, siis pidin fluorimeetris detekteeritavuse huvides tõstma poreeritava YFP-Mdm2 plasmidi kogust, samuti optimeerisin CFP ja YFP plasmiidide kogust (et fluorestseeruvate valkude signaal oleks sarnase tugevusega ja saadavad graafikud oleksid ligikaudu ühes mõõtkavas). Eelneva optimeerimise tulemusena sain poreeritavate vektorite kogusteks: CFP-p53 2µg, YFP-Mdm2 13µg, CFP 0,2 µg, YFP 10ng. Tulemused näitasid, et ka fluorimeetril ei ole valitud testsüsteemis FRET signaal detekteeritav (joonis 16). Põhjuseks ilmselt YFP-Mdm2 liitvalgu liialt madal tase. Samas saan katse tulemusel öelda, et liitvalkude spektraalsed omadused on korrektsed (emissioonigraafik langeb kokku tootja poolt väidetavaga).

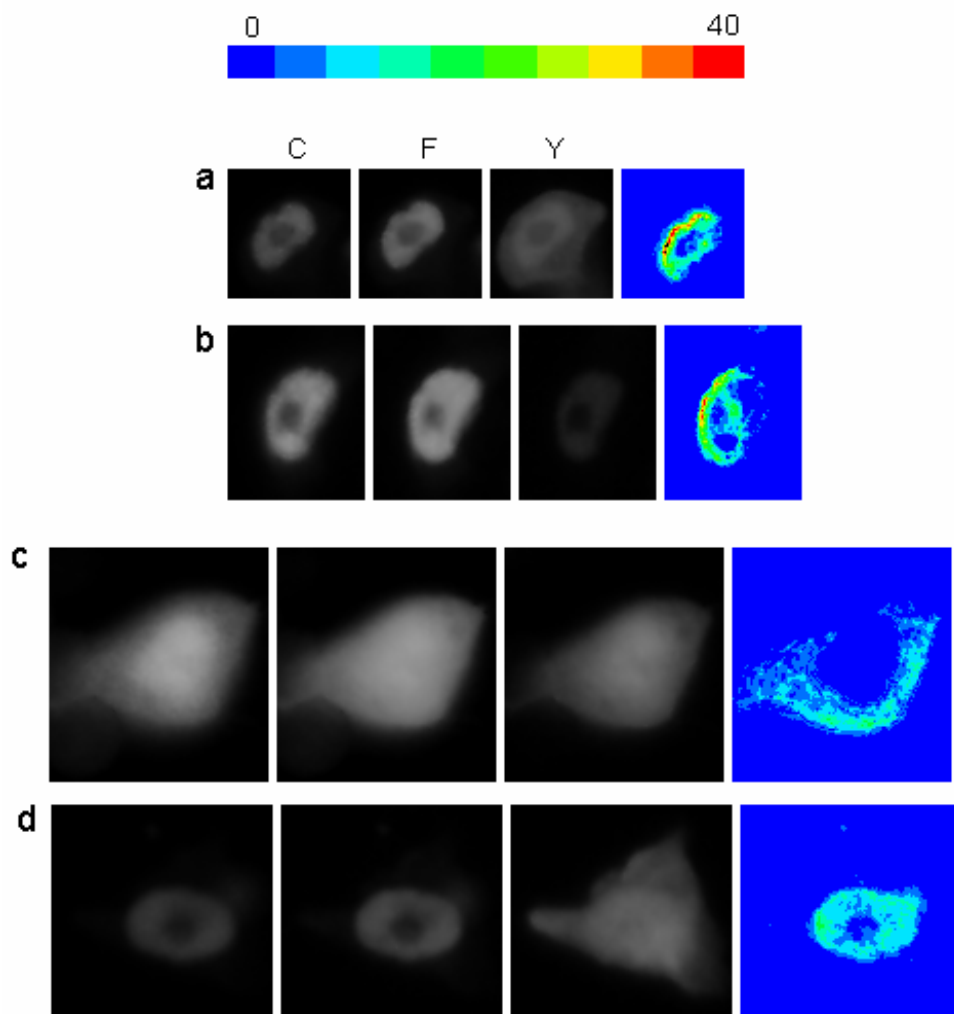


Joonis 16. Liitvalkude spektraalanalüüs fluorimeetril. Näha on CFP-p53-ga, YFP-Mdm2-ga ja kotransfekteeritud (CFP-p53 + YFP-Mdm2) rakkude emissiooni spektreid. Samuti on toodud joonis, kus kotransfekteeritud (CFP-p53 + YFP-Mdm2) rakkude emissiooni graafik on asetatud CFP-p53 emissioonigraafiku peale. Graafikutele on näha ka ergastusvalgus (ulatub skaalast välja). Ergastusvalguse maksimumid on lainepikkustel 431 ja 497. Emissiooni on vaadeldud lainepikkuste vahemikus 400-600nm. Viimaselt jooniselt on näha, et FRET detekteeritav ei ole.

FRET analüüs kasutades PFRET tarkvara. Kolmanda moodusena kasutasin potentsiaalse FRET-i detekteerimiseks programmi PFRET. Minu käsutuses oli programmi 30 päevane (täisfunktsionaalne) testversioon.

Programmi töö eelduseks oli taas kõigi 7 foto kogumine (vt. peatükk „Fluorestsents mikroskoopia ja FRET analüüs“), fotod pidid olema mustvalged ja värvisügavusega 8bit. Enne FRET signaali arvutamist pidi fotodelt olema lahutatud taustasignaali. Programmi tööpõhimõte on põhimõtteliselt sama, mida olin eelnevalt kasutanud ImageJ juures – st. kõigepealt arvutatakse spektraalsest kattuvusest tulenevad „lähikumamis“ konstandid, seejärel lahutatakse „lähikumav“ komponent näivast FRET-i signaalist ja saadakse tõeline FRET-i signaal. Kõik arvutused teeb PFRET fotode tasemel – st. programmile on vaja ette anda vaid vajalikud seitse fotot, kõik kalkulatsioonid teeb programm iseseisvalt (märkimisväärne erinevus ImageJ-a, kus fotosid sai kasutada vaid kvantiteerimisväärtuste saamisel, enamus arvutusi tuli teha kasutajal endal). Veel üks väga oluline erinevus – PFRET teeb analüüse „piksel piksli järel“ (*pixel-by-pixel* – st. programm arvutab signaali iga piksli jaoks eraldi), samas kui ImageJ puhul sain teha arvutusi vaid suurema pikslite kogumi kohta (selekteeritud ala keskmise pikslite väärtuse põhjal).

PFRET-i abil suutsin detekteerida ka CFP-p53 ja YFP-Mdm2 interakteerumisest tuleneva FRET-i signaali. Katseks on rakkudesse koporeeritud 2µg CFP-p53 plasmidi koos 10µg YFP-Mdm2 plasmidiga, negatiivsete kontrollidena kasutasin CFP-p53 + YFP (2µg + 10ng) ja YFP-Mdm2 + CFP (10µg + 0,2µg) kotransfektsiooni. Rakud pildistasin taas fluorestsentsmikroskoobi abil, analüüsid tegin programmis PFRET (joonis 17).



Joonis 17. FRET analüüs kasutades programmi PFRET. Paneelidel on jaotatud pildid printsiibil, et alates vasakult on foto tehtud CFP ergastus- ja emissioonifiltrit kasutades; seejärel foto näivast FRET signaalist (korrigeerimata FRET) ehk foto, mille puhul on kasutatud CFP ergastusfiltrit ja YFP emissioonifiltrit; vasakult kolmanda pildi juures on kasutatud YFP ergastus- ja emissioonifiltrit; paremalt esimene pseudovärvides foto kujutab korrigeeritud FRET signaali. Paneelidel a ja b näha olevatesse rakkudes on kotransfekteeritud plasmide CFP-p53 ja YFP-Mdm2, paneelil c on poratsioonil kasutatud vektorite paari YFP-Mdm2 + CFP (negatiivne kontroll), paneelil d vastavalt CFP-p53 + YFP (negatiivne kontroll). Pseudovärvide legendi järgi on signaali intensiivsuse näitamiseks valitud 10-astmeline värvüleminek sinine-punane (sinine signaaliga 0, punane signaaliga 40), suhteliseks ühikuks on siinjuures halltooni intensiivsus (*gray level intensity*).

Nagu joonisel 17 on näha, on FRET signaal programmi PFRET abil tuvastatav (paneelid a ja b). Ka negatiivsetel kontrollidel (paneelid c ja d) on signaal nõrgalt detekteeritav, see võib tulla programmi võimetusest korrektselt eemaldada spektraalsest kattuvusest tingitud FRET-i komponente, samas on loomulikult võimalik ka negatiivsetes kontrollides kasutatud valkude mittespetsiifiline interakteerumine.

Arutelu

Rakkude elu on suures osas kontrollitud valkkomplekside tekkega ja kadumisega metabolismi- ja signaali ülekanderadades, samuti raku eluks ülitähtsate protsesside (ATP süntees ja kasutamine, geenide replikatsioon ja translatsioon, tsütoskeleti ülesehitus jne) juures tekkivate kompleksidega. Meie teadmised valk-valk interaktsioonidest on suuresti kogunenud tänu tehtud biokeemiliste eksperimentidele, viimasel ajal üha suureneb aga ka *in vivo* katsetuste hulk. Antud töö ülesandeks oligi ühe sellise *in vivo* meetodi rakendamine.

Valku p53 tuntakse juba aastast 1979. Siiani püsib see valk paljude teadustööde keskpunktis pakkudes oma keerukuses huvi hulkadele teadlastele ja uurimisgruppidele. Juba fakt, et p53-e funktsiooni kaotus aitab kaasa rohkem kui pooltele inimese kasvajate arengule, ei lase teda unustada. p53 aktiveerumisel on kaheks võimalikuks tagajärjeks rakutsükli peatus või apoptoos. Mõlemad on rakule üsna tõsised tagajärjed ja seepärast peab p53 aktiivsus olema tugeva kontrolli all. Üheks p53 võtmeregulaatoriks on valk Mdm2. Mdm2 interakteerub p53-ga, läbi mille võib ta inhibeerida p53 transkriptsioonilise aktiivsuse või suunata selle hoopis lagundamisele.

Valk-valk interaktsiooni metodoloogia optimeerimiseks valisin p53-Mdm2 interaktsiooni kahel põhjusel: esiteks on tegemist normaalse raku elus väga tähtsa interaktsiooniga; teiseks on meie laboris pikka aega tegeletud p53-e võrgustiku uurimisega, meetodi õnnestumisel saaksime suurepärase tööriista vaatamaks erinevate huvipakkuvate valkude interaktsioone.

Interaktsiooni detekteerimiseks olin teinud eelduseks, et potentsiaalselt omavahel seonduvad valgud peavad olema fluorestsentsmikroskoobis vaadeldavad ja sobivad FRET analüüsiks – seetõttu konstrueerisin p53-e ja Mdm2-e liitvalgud vastavalt CFP-ga ja YFP-ga. Esmalt kontrollisin nende ekspresseerumist rakus (mõlema liitvalgu moodustava komponendi põhjal), katsed näitasid, et liitvalgud ekspresseeruvad. Järgmiseks sammuks oli liitvalkude interaktsiooni olemasolu kontroll. Immuunosadestamise katsetest selgus, et liitvalgud interakteeruvad omavahel. Jäi üle veel kasutada valitud *in vivo* valk-valk interaktsiooni detekteerimise meetodit (FRET meetodit), mis aga osutus alguses arvatust keerulisemaks. Esmalt valitud tööriistad (ImageJ programm) ja metodoloogiline protsess on ilmselt teoorias paikapidav, kahjuks

suutsin antud programmi abil töötada vaid suure hulga pikselite hallväärtuste keskmistega ja seepärast soovitud tulemuseni ei jõudnud. Järgmisena valitud fluorestsents-spektrofotomeeter (fluorimeetril) vaatamaks FRET-i on ilmselt paljutöötav moodus, kahjuks oli ühe minu poolt valitud ja konstrueeritud liitvalgu kogus rakkudes niivõrd väike, et probleeme oli juba selle detekteerimisega – rääkimata siis FRET signaali detekteerimisest. Viimasena appi võetud PFRET programm tagas tulemuse. Antud programmi puhul on tegemist spetsiaaltarkvaraga FRET signaali arvutamiseks fotodelt. Võrreldes ImageJ-ga teeb programm kõik kvantitatiivsed analüüsid ühe pikseli tasemel – st. FRET signaal arvutatakse iga fotol leiduva pikseli jaoks eraldi. Ilmselt see programmi iseärasus ka lõpliku edu tagas. PFRET programmi kasutades suutsin detekteerida *in vivo* valk-valk interaktsiooni ja sellest tuleneva FRET signaali.

Läbi kõikide katsete oli probleemiks konstrukti YFP-Mdm2 valgu madal tase rakus. Võimalik, et probleem tuleneb autoubikvitinüleerimisest (ja sellega seotud lagundamisest) – see oleks üheks edasiseks nüansiks, mida uurida. Kõik katsed (välja arvatud katsed fluorimeetril) olid tehtud detekteerimaks FRET signaali üksikus (mõnes) rakus. Tulevikku jääb ka meetodika arendamine, mille abil saaks vaadata interaktsioonide esinemist paralleelselt paljudes rakkudes (proovides).

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli FRET valk-valk interaktsioonide vaatlemise meetodi optimeerimine vaatamaks p53-Mdm2 valkude interaktsiooni.

Antud valgupaari valik tulenes korduvalt varem näidatud interaktsiooni esinemisest (Momand et al., 1992b), samuti mängivad valgud p53 ja Mdm2 meie labori teadustöös tähtsat rolli.

FRET meetodi optimeerimiseks konstrueerisin CFP-p53 ja YFP-Mdm2 liitvalke ekspresseerivad vektorid. Näitasin vektorite ekspresseerumist rakus mõlema liitvalku moodustava osa tasemel. Immuunopretsipiteerimise abil sadestasin liitvalkude kompleksi, kus oli detekteeritav nii p53-e kui ka Mdm2-te sisaldav liitvalk. Spetsiaaltarkvara abil õnnestus näidata ka liitvalkude interakteerumine elusas rakus ja sellest tulenev FRET signaal.

Juhendamise ja abistamise eest tahaksin tänada Viljar Jaksi, Triin Mölterit ja kolleege rakubioloogia õppetoolist.

Summary

The aim of the present study was optimization of FRET method to detect p53-Mdm2 protein interaction.

Interaction between p53-Mdm2 is well known and has been reported several times before (Momand et al., 1992b). p53 and Mdm2 are also one of the key proteins in our lab's research work.

Two expression vectors were constructed (CFP-p53, YFP-Mdm2), both of them expressing corresponding fusion proteins. Western blotting and fluorescence microscopy was used to show expression of fusion proteins in cells. Immunoprecipitation demonstrates coprecipitation of CFP-p53, YFP-Mdm2 in complex. With the help of fluorescence microscopy and PFRET software we can detect FRET signal in CFP-p53 and YFP-Mdm2 in cotransfected live cells.

Kasutatud kirjandus

- Abarzua, P., LoSardo, J., Gubler, M., Spathis, R., Lu, Y., Felix, A. and Neri, A.: Restoration of the transcription activation function to mutant p53 in human cancer cells. *Oncogene* 13 (1996) 2477-82.
- Argentini, M., Barboule, N. and Wasylyk, B.: The contribution of the acidic domain of MDM2 to p53 and MDM2 stability. *Oncogene* 20 (2001) 1267-75.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. and Ziv, Y.: Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281 (1998) 1674-7.
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. and Oren, M.: mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12 (1993) 461-8.
- Benchimol, S., Lamb, P., Crawford, L., Sheer, D., Shows, T., Bruns, G. and Peacock, J.: Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet* 11 (1985) 505-10.
- Bottger, A., Bottger, V., Garcia-Echeverria, C., Chene, P., Hochkeppel, H., Sampson, W., Ang, K., Howard, S., Picksley, S. and Lane, D.: Molecular characterization of the hdm2-p53 interaction. *J. Mol. Biol.* 269 (1997a) 744-56.
- Bottger, A., Bottger, V., Sparks, A., Liu, W.L., Howard, S.F. and Lane, D.P.: Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo. *Curr Biol* 7 (1997b) 860-9.
- Cahilly-Snyder, L., Yang-Feng, T., Francke, U. and George, D.L.: Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet* 13 (1987) 235-44.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. and Siliciano, J.D.: Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281 (1998) 1677-9.
- 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 (1979) 463-71.

Chen, J., Marechal, V. and Levine, A.: Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 4107-14.

Chernov, M., Ramana, C., Adler, V. and Stark, G.: Stabilization and activation of p53 are regulated independently by different phosphorylation events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 2284-9.

Conti, E., Franks, N.P. and Brick, P.: Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* 4 (1996) 287-98.

Dang, C. and Lee, W.: Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 18019-23.

Dang, J., Kuo, M.L., Eischen, C.M., Stepanova, L., Sherr, C.J. and Roussel, M.F.: The RING domain of Mdm2 can inhibit cell proliferation. *Cancer Res* 62 (2002) 1222-30.

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 (1979) 2420-4.

Diller, L., Kassel, J., Nelson, C., Gryka, M., Litwak, G., Gebhardt, M., Bressac, B., Ozturk, M., Baker, S., Vogelstein, B. and et, a.: p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 5772-81.

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 (1992) 45-9.

Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D. and Oren, M.: Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312 (1984) 646-9.

Evans, S.C., Viswanathan, M., Grier, J.D., Narayana, M., El-Naggar, A.K. and Lozano, G.: An alternatively spliced HDM2 product increases p53 activity by inhibiting HDM2. *Oncogene* 20 (2001) 4041-9.

Fakharzadeh, S.S., Trusko, S.P. and George, D.L.: Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *Embo J* 10 (1991) 1565-9.

Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H. and Weissman, A.M.: Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 275 (2000) 8945-51.

Fields, S. and Jang, S.K.: Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249 (1990) 1046-9.

Freedman, D., Epstein, C., Roth, J. and Levine, A.: A genetic approach to mapping the p53 binding site in the MDM2 protein. *Mol. Med.* 3 (1997) 248-59.

Giaccia, A.J. and Kastan, M.B.: The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12 (1998) 2973-83.

Gorina, S. and Pavletich, N.: Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2 . *Science* 274 (1996) 1001-5.

Gu, W. and Roeder, R.G.: Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90 (1997) 595-606.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M.: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387 (1997) 296-9.

Herrmann, C., Kraiss, S. and Montenarh, M.: Association of casein kinase II with immunopurified p53. *Oncogene* 6 (1991) 877-84.

Honda, R. and Yasuda, H.: Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 19 (2000) 1473-6.

Horikoshi, N., Usheva, A., Chen, J., Levine, A.J., Weinmann, R. and Shenk, T.: Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* 15 (1995) 227-34.

Hu, C.D., Chinenov, Y. and Kerppola, T.K.: Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9 (2002) 789-98.

Hupp, T.R., Sparks, A. and Lane, D.P.: Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell* 83 (1995) 237-45.

Isobe, M., Emanuel, B., Givol, D., Oren, M. and Croce, C.: Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320 (1986) 84-5.

Iwabuchi, K., Bartel, P., Li, B., Marraccino, R. and Fields, S.: Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 6098-102.

Iwakuma, T. and Lozano, G.: MDM2, an introduction. *Mol Cancer Res* 1 (2003) 993-1000.

Jenkins, J., Chumakov, P., Addison, C., Stürzbecher, H. and Wade-Evans, A.: Two distinct regions of the murine p53 primary amino acid sequence are implicated in stable complex formation with simian virus 40 T antigen. *J. Virol.* 62 (1988) 3903-6.

Jenkins, J., Rudge, K., Chumakov, P. and Currie, G.: The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. *Nature* 317 (1985) 816-8.

Jenkins, J., Rudge, K. and Currie, G.: Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 312 (1984) 651-4.

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 (1995) 206-8.

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 (1997) 649-59.

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 (1991) 6304-11.

Ko, L.J. and Prives, C.: p53: puzzle and paradigm. *Genes & Dev.* 10 (1996) 1054-72.

Kraiss, S., Quaiser, A., Oren, M. and Montenarh, M.: Oligomerization of oncoprotein p53. *J. Virol.* 62 (1988) 4737-44.

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 (1979) 472-83.

Kristjuhan, A., Jaks, V., Rimm, I., Tooming, T. and Maimets, T.: Oligomerization of p53 is necessary to inhibit its transcriptional transactivation property at high protein concentration. *Oncogene* 16 (1998) 2413-8.

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

Kubbutat, M.H., Ludwig, R.L., Ashcroft, M. and Vousden, K.H.: Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 5690-8.

Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J. and Pavletich, N.P.: Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274 (1996a) 948-53.

Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J. and Pavletich, N.P.: Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274 (1996b) 948-53.

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-5.

Lee, J.C. and Peter, M.E.: Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunol Rev* 193 (2003) 39-47.

Levine, A.J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88 (1997) 323-31.

Li, M., Brooks, C.L., Kon, N. and Gu, W.: A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol Cell* 13 (2004) 879-86.

Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J. and Gu, W.: Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416 (2002) 648-53.

Lim, S.K., Shin, J.M., Kim, Y.S. and Baek, K.H.: Identification and characterization of murine mHAUSP encoding a deubiquitinating enzyme that regulates the status of p53 ubiquitination. *Int J Oncol* 24 (2004) 357-64.

Lin, D., Shields, M., Ullrich, S., Appella, E. and Mercer, W.: Growth arrest induced by wild-type p53 protein blocks cells prior to or near the restriction point in late G1 phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 9210-4.

Lohrum, M.A., Ashcroft, M., Kubbutat, M.H. and Vousden, K.H.: Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nat Cell Biol* 2 (2000) 179-81.

Lowe, S.W. and Sherr, C.J.: Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 13 (2003) 77-83.

Lu, H. and Levine, A.J.: Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 5154-8.

Lu, X. and Lane, D.P.: Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 75 (1993) 765-78.

McBride, O., Merry, D. and Givol, D.: The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 130-4.

Mendrysa, S.M., McElwee, M.K., Michalowski, J., O'Leary, K.A., Young, K.M. and Perry, M.E.: mdm2 Is critical for inhibition of p53 during lymphopoiesis and the response to ionizing irradiation. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 462-72.

Miller, C., Mohandas, T., Wolf, D., Prokocimer, M., Rotter, V. and Koeffler, H.: Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 319 (1986) 783-4.

Milner, J., Cook, A. and Mason, J.: p53 is associated with p34cdc2 in transformed cells. *EMBO J.* 9 (1990) 2885-9.

Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. and Levine, A.J.: The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69 (1992a) 1237-45.

Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. and Levine, A.J.: The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69 (1992b) 1237-45.

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 (1995) 203-6.

Nakamura, S., Roth, J.A. and Mukhopadhyay, T.: Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 9391-8.

Nelson, W. and Kastan, M.: DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 1815-23.

Noren, C.J., Wang, J. and Perler, F.B.: Dissecting the Chemistry of Protein Splicing and Its Applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 39 (2000) 450-466.

Okorokov, A.L. and Milner, J.: Proteolytic cleavage of p53: a model for the activation of p53 in response to DNA damage. *Oncol Res.* 9 (1997) 267-73.

Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L. and Vogelstein, B.: Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358 (1992) 80-3.

Oliner, J.D., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B.: Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362 (1993a) 857-60.

Oliner, J.D., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B.: Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362 (1993b) 857-60.

Olson, D., Marechal, V., Momand, J., Chen, J., Romocki, C. and Levine, A.: Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. *Oncogene* 8 (1993) 2353-60.

Oren, M.: The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 823 (1985) 67-78.

Ozawa, T., Kaihara, A., Sato, M., Tachihara, K. and Umezawa, Y.: Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing. *Anal Chem* 73 (2001) 2516-21.

Parada, L., Land, H., Weinberg, R., Wolf, D. and Rotter, V.: Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312 (1984) 649-51.

Paulus, H.: Protein splicing and related forms of protein autoprocessing. *Annu Rev Biochem* 69 (2000) 447-96.

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 (1993) 11623-7.

Pietenpol, J., Tokino, T., Thiagalingam, S., El-Deiry, W., Kinzler, K. and Vogelstein, B.: Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 1998-2002.

Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Lane, D.P. and Hay, R.T.: Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 8458-67.

Ruppert, J. and Stillman, B.: Analysis of a protein-binding domain of p53. *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 3811-20.

Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W. and Appella, E.: DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12 (1998) 2831-41.

Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E. and Prendergast, G.C.: The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 15 (1997) 887-98.

Sarnow, P., Ho, Y.S., Williams, J. and Levine, A.J.: Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28 (1982) 387-94.

Saucedo, L.J., Myers, C.D. and Perry, M.E.: Multiple murine double minute gene 2 (MDM2) proteins are induced by ultraviolet light. *J Biol Chem* 274 (1999) 8161-8.

Scheffner, M., Werness, B., Huibregtse, J., Levine, A. and Howley, P.: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63 (1990) 1129-36.

Schon, O., Friedler, A., Bycroft, M., Freund, S.M. and Fersht, A.R.: Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *J Mol Biol* 323 (2002) 491-501.

Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A. and Rotter, V.: Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 6565-77.

Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B. and Costa, J.: Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4495-9.

Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R. and Iggo, R.: Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* 12 (1996) 921-30.

Sherr, C.J. and Weber, J.D.: The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10 (2000) 94-9.

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 (1997) 3471-81.

Soussi, T., Caron de Fromentel, C. and May, P.: Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5 (1990) 945-52.

Soussi, T. and May, P.: Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J. Mol. Biol.* 260 (1996) 623-37.

Stad, R., Little, N.A., Xirodimas, D.P., Frenk, R., van der Eb, A.J., Lane, D.P., Saville, M.K. and Jochemsen, A.G.: Mdmx stabilizes p53 and Mdm2 via two distinct mechanisms. *EMBO Rep* 2 (2001) 1029-34.

Steegenga, W., van der Eb, A. and Jochemsen, A.: How phosphorylation regulates the activity of p53. *J. Mol. Biol.* 263 (1996) 103-13.

Zakut-Houri, R., Bienz-Tadmor, B., Givol, D. and Oren, M.: Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *EMBO J.* 4 (1985) 1251-5.

Zhang, Y. and Xiong, Y.: Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell Growth Differ* 12 (2001) 175-86.

Zhu, Q., Yao, J., Wani, G., Wani, M.A. and Wani, A.A.: Mdm2 mutant defective in binding p300 promotes ubiquitination but not degradation of p53: evidence for the role of p300 in integrating ubiquitination and proteolysis. *J Biol Chem* 276 (2001) 29695-701.

Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C.M.: Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* 19 (2000) 94-102.

Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R. and Tjian, R.: p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267 (1995) 100-4.

Unger, T., Nau, M., Segal, S. and Minna, J.: p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *EMBO J.* 11 (1992) 1383-90.

Walker, K.K. and Levine, A.J.: Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 15335-40.

Wang, X., Forrester, K., Yeh, H., Feitelson, M., Gu, J. and Harris, C.: Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 2230-4.

Wang, X., Vermeulen, W., Coursen, J., Gibson, M., Lupold, S., Forrester, K., Xu, G., Elmore, L., Yeh, H., Hoeijmakers, J. and Harris, C.: The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes & Dev.* 10 (1996) 1219-32.

Wang, Y. and Prives, C.: Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* 376 (1995) 88-91.

Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. and Levine, A.J.: The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & Dev.* 7 (1993) 1126-32.

Yang, F., Moss, L.G. and Phillips, G.N., Jr.: The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 14 (1996) 1246-51.

Yew, P.R. and Berk, A.J.: Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* 357 (1992) 82-5.

Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. and Oren, M.: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352 (1991) 345-7.