

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

KAI RAUSALU

AKTIIVSETE HAPNIKUÜHENDITE OSA VEISE
PAPILLOOMIVIIRUSE TÜÜP 1 DNA-ST JA TEMA
ONKOVALGU E5 DNA-ST TINGITUD C127
RAKKUDE TRANSFORMATSIOONIS

MAGISTRITÖÖ

JUHENDAJA: DOTSENT ANN KILK

TARTU 2006

SISUKORD

LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1. Papillomiviirused - kasvajaid põhjustavad viirused.....	5
1.1.1. Papilloomiviirused.....	5
1.1.2. Veise papilloomiviirus tüüp 1.....	7
1.1.3. BPV-1 onkovalk E5 ja rakkude transformatsioon.....	8
1.1.4. BPV-1 E5 ja PDGF β retseptor.....	11
1.1.5. BPV-1 E5 ja vakuooli H ⁺ -ATPaas.....	12
1.1.6. BPV-1 E5 ja arahhidoonhappe metabolism.....	14
1.1.7. BPV-1 E5 ja fosfatidüülinositool-3-kinaas.....	16
1.2. Aktiivsed hapnikuühendid ja kasvajad.....	18
1.2.1 Aktiivsed hapnikuühendid.....	18
1.2.2. Antioksidandid.....	24
1.2.3. Superoksiidi dismutaas kui tuumorsupressor.....	26
1.2.4. Aktiivsed hapnikuühendid ja BPV-1 E5.....	28
1.3. Töö eesmärk.....	30
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	31
2.1. Materjalid ja meetodid.....	31
2.1.1. Rakkude kasvatamine.....	31
2.1.2. Rakkude transfekteerimine.....	31
2.1.3. Plasmiidid.....	31
2.1.4. Transformeerunud rakuliinide tegemine.....	32
2.1.5. Transformeerunud rakuliinide kontrollimine E5 DNA olemasolu suhtes.....	32
2.1.6. Transformeerunud rakuliinide kontrollimine E5 valgu olemasolu suhtes.....	33
2.1.7. Rakkude kasvu analüüsimine.....	34
2.1.8. Peroksiidide taseme mõõtmine TECAN “Genios Plus” plaadilugejaga.....	35
2.1.9. Rakutsükli analüüsimine voolutsütomeetriga “FACS Calibur”.....	36
2.2. Tulemused.....	38
2.2.1. E5 DNA olemasolu ja E5 valgu ekspressioon transformeerunud rakuliinides.....	38
2.2.2. Transformeerunud rakuliinide kasv.....	39
2.2.3. CuZnSOD mõju rakuliinide paljunemisele.....	40
2.2.4. E vitamiini mõju rakuliinide paljunemisele.....	42
2.2.5. Peroksiidide tase rakkude transformeerimisel BPV-1 E5-ga.....	44
2.2.6. Antioksidantide mõju peroksiidide tasemele.....	47
2.2.7. Antioksidantide mõju rakutsüklile.....	49
2.3. Arutelu.....	51
KOKKUVÕTE.....	58
SUMMARY.....	59
KIRJANDUSE LOETELU.....	60

LÜHENDID

AA (*arachidonic acid*) – arahhidoonhape
BPV-1 (*bovine papillomavirus type 1*) – veise papilloomiviirus tüüp 1
BSA (*bovine serum albumin*) – veise seerumalbumiin
CAT (*catalase*) – katalaas
CDK (*cyclin dependent kinase*) – tsükliin-sõltuv kinaas
CDKI (*cyclin dependent kinase inhibitor*) – tsükliin-sõltuva kinaasi inhibiitor
CO (*cyclooxygenase*) – tsüklooksügenaas
DCF (*dichlorofluorescein*) - diklorofluorestseiin
DCFDA (*dichlorofluorescein diacetate*) – diklorofluorestsiiin diatsetaat
DCFH (*dichlorodihydrofluorescein*) – diklorodihüdrofluorestsiiin
DTT - ditiotreitool
EGF (*epidermal growth factor*) – epidermaalne kasvufaktor
ETYA (*eicosatetraenoic acid*) – eikosatetraanhape
GPx (*glutathione peroxidase*) – glutatioon peroksüdaas
LO (*lipoxygenase*) – lipoksügenaas
MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) – mitogeen-aktiveeritav proteiinkinaas
MK-886 - (3-[1-(4-klorobensüül)-3-t-butüül-tio-5-isopropüülindool-2-üül]-2,2-dimetüül propaanhape
MMP (*matrix metallo proteinase*) – maatriksi metalloproteinaas
NDGA (*nordihydroguaiaretic acid*) – nordihüdroguareethape
NFκB (*nuclear factor κB*) – tuuma faktor κB
ORF (*open reading frame*) – avatud lugemisraam
PARP (*poly(ADP)ribose polymerase*) – polü(ADP)riboos polümeraas
PDGF (*platelet-derived growth factor*) – trombotsüütidest pärinev kasvufaktor
PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) – trombotsüütidest pärineva kasvufaktori retseptor
PI – propiidiidumjodiid
PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) – fosfatidüülinositool-3-kinaas
PKB/Akt (*protein kinase B*) – proteiinkinaas B e. proteiinkinaas Akt
PKC (*protein kinase C*) – proteiinkinaas C
PLA₂ (*phospholipase A₂*) – fosfolipaaas A₂
ROS (*reactive oxygen species*) – aktiivsed hapnikuühendid
SOD (*superoxide dismutase*) – superoksiidi dismutaas
STAT (*signal transducers and activators of transcription*) – signaali edastajad ja transkriptsiooni aktiveerijad
TNF (*tumor necrosis factor*) – tuumori nekroosi faktor
V-ATPaas (*vacuolar H⁺-ATPase*) – vakuooli H⁺-ATPaas
VEGF (*vascular endothelial growth factor*) – vaskulaarse endoteeli kasvufaktor
Wt (*wild-type*) – metsik-tüüp

SISSEJUHATUS

Papilloomiviirused on väikesed DNA genoomsed viirused, mis nakatavad epiteeli jagunevaid rakke ja põhjustavad kasvajate teket. Enamasti on need kasvajakasvaja healoomulised ja kaovad iseenesest, kuid mitte alati. Olemas on kõrge riskiga HPV tüved, mis põhjustavad vähki, nt. HPV16. Sellepärast on papilloomiviiruse toime ja sellega nakatunud rakkude kasvu uurimine oluline nii vähi tekke kui selle ravi jaoks.

Veise papilloomiviiruse tüüp 1 (BPV-1), mis tekitab limaskestade kasvajaid veistel, kasutatakse mudelsüsteemina uurimaks papilloomiviiruseid ja nende seoseid kasvajatega. BPV-1 transformeerib kultuuris ka hiire fibroblaste. BPV-1 peamine transformeeriv valk on E5, millel on mitmesugune mõju rakkudele.

Käesolevas töös püüan anda ülevaate BPV-1 E5 teadaolevatest toimetest rakkudele. Kuna transformatsiooni protsessis on oluline osa aktiivsetel hapnikuühenditel, siis tutvustan ka sellealast kirjandust. Uurisin aktiivsete hapnikuühendite osa BPV-1 DNA-st ja tema onkovaalgu E5 DNA-st tingitud rakkude transformatsioonis. Püüan vastata küsimusele, kuidas mõjutavad antioksüdandid CuZnSOD ning E vitamiin transformeerunud rakkude kasvu, ja kuidas muutub transformeerumisel peroksiidide tase rakkudes.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Papilloomiviirused – kasvajaid põhjustavad viirused

1.1.1. Papilloomiviirused

Papilloomiviirused kuuluvad sugukonda *Papillomaviridae* ja perekonda *Papillomavirus*. Kõik papilloomiviirused tekitavad mõningase latentsusperioodi järel peremeesorganismil kasvajaid, mis enamasti on healoomulised ja lühiajalised. Papilloomiviirused on liigi-spetsiifilised. Neid on leitud pea-aegu kõigil loomadelt ja lindudel. Kaks suuremat viiruste gruppi on loomade ja inimeste papilloomiviirused. Veise papilloomiviirustel (BPV) on teada 6 erinevat subtüüpi. Inimese papilloomiviirustel (HPV) on kirjeldatud väga palju subtüüpe (üle saja). Olemas on madala ja kõrge riskiga HPV-d, mis põhjustavad vastavalt hea- ja pahaloolumulisi papilloome. Madala riskiga HPV-d on nt. HPV1, mis tekitab soolatüükaid, HPV6, HPV11 – genitaalide papilloome, kondüloome. Kõrge riskiga HPV-d on HPV16, HPV18, need põhjustavad genitaalide papilloome, mis arenevad edasi vähiks. (Scheurer et al., 2005)

Papilloomiviiruse virionid on 52-55 nm diameetriga, ümbriseta, ikosaeedrilise sümmeetriaga. Virion koosneb 72 kapsomeerist (60 heksameeri ja 12 pentameeri). Papilloomiviirustel on kaks kapsiidivalku: L1 ja L2. L1 on peamine kapsiidivalk (Scheurer et al., 2005). Papilloomiviiruse virion on kujutatud joonisel 1.

Papilloomiviiruste genoom on kaheaahelaline superspiraliseeritud DNA rõngasmolekul, mis on ~8 kb pikk. Genoom jaguneb varaseks (E - *early*) ja hiliseks (L - *late*) piirkonnaks, mille vahel on mittekodeeriv ala (LCR). Mittekodeerivas alas asuvad replikatsiooni alguspunkt (ori) ja paljud replikatsiooni ning transkriptsiooni kontrolljärjestused. Papilloomiviirustel on kodeeriv ainult üks genoomi ahel. Transkriptsioon algab mitmetelt erinevatelt üle kogu genoomi paiknevatest promotoritelt. (Scheurer et al., 2005)

Papilloomiviirustel on 8 varase piirkonna avatud lugemisraami ehk ORF-i (*open reading frame*): E1-E8, ja 2 hilise piirkonna ORF-i: L1 ning L2. E1 on replikatsioonivalk, millel on DNA-d siduv, helikaasne, ATPaasne aktiivsus. E2 on

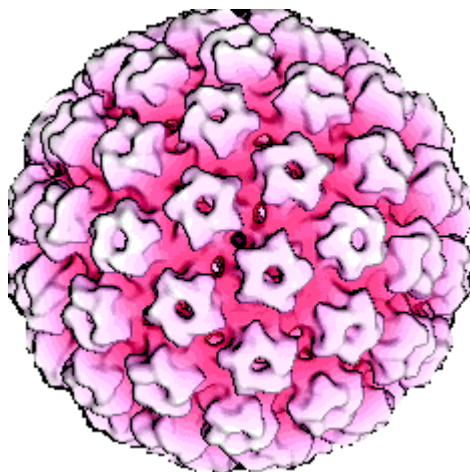
replikatsiooni ja transkriptsiooni regulaatorvalk. E3 funktsioon pole teada. E4 ekspresseerub koos hiliste valkudega. E5, E6, E7 on transformeerivad valgud. E5 aktiveerib kasvufaktorite retseptoreid. Inimese papilloomiviiruste peamised onkovalgud on E6 ja E7. HPV-de puhul on näidatud, et E6 soodustab rakulise valgu p53 lagundamist (Werness et al., 1990; Scheffner et al., 1990) ja E7 blokeerib rakulist valku pRb (Dyson et al., 1989). p53 ja pRb on tuumorsupressorvalgud. E8 on BPV-4 transformeeriv valk. L1 ja L2 on kapsiidivalgud.

Papilloomiviirused nakatavad epiteelkoe basaalseid rakke, mis on ainsana soomusepiteelis jagunemisvõimelised. Viiruse elutsükklis võib eristada kolme staadiumi.

1) Vahetult peale nakatumist ekspresseeruvad varased geenid. Toimub viiruse DNA amplifikatsiooniline replikatsioon, mille käigus viiruse koopiaarv tõuseb 50-100 koopiani raku kohta (Sousa et al., 1990).

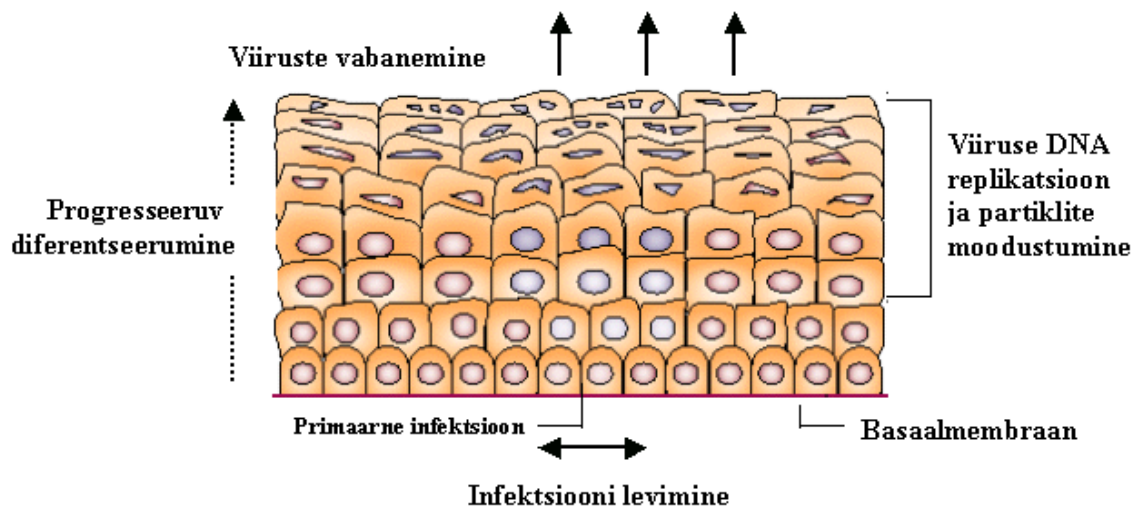
2) Viiruse stabiilne replikatsioon. Koopiaarv raku kohta jääb muutumatuks (Sousa et al., 1990).

3) Kolmas staadium toimub siis, kui nakatunud rakud jõuavad normaalse arengu käigus epiteeli pealmistesse kihtidesse ja saavutavad kõrge diferentseerumisastme. Toimub jälle aktiivne replikatsioon, nn. vegetatiivne replikatsioon. L1 ja L2 geeniekspressioon suureneb ning valmivad virionid (Sousa et al., 1990). Viirused eralduvad pidevalt väikestes kogustes nakatunud kohast nahal. (Joonis 2.).



Joonis 1. BPV-1 virion.

<http://bilbo.bio.purdue.edu/~baker/projects/papova/papilloma/bpv.html>

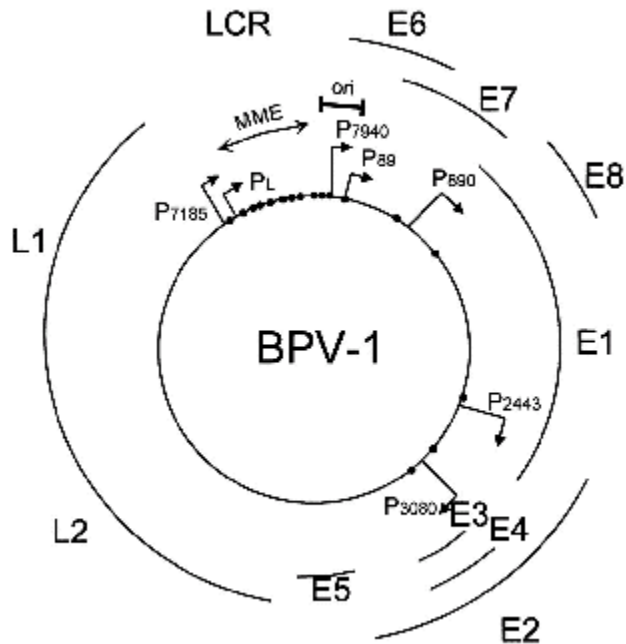


Joonis 2. HPV elutsükkel. Infektsiooniks peavad viirused kokku puutuma epiteeli basaalse rakkudega, näiteks vigastuse kaudu. Nakatunud rakk jaguneb ja viiruse populatsioon levib lateraalselt. Osa järeltulijaid migreerub ülemistesse diferentseeruvatesse rakukihtidesse, kus viiruse DNA replitseerub ja valgud ekspresseeruvad. Epiteeli pealmises kihis valmivad virionid ning viiruspartiklid vabanevad epiteeli pinnalt. (Modifitseeritud, zur Hausen, 2002)

1.1.2. Veise papilloomiviirus tüüp 1

Veise papilloomiviirus tüüp 1 (BPV-1) põhjustab fibropapilloome veistel ja indutseerib fookuste tekke immortaliseeritud hiire rakuliinides. BPV-1 kasutatakse palju mudelsüsteemina papilloomiviiruste transformatsiooni uurimiseks (Dvoretzky et al., 1980; Lancaster and Olson, 1982; Tada et al., 1989). BPV-1 genoom on kujutatud joonisel 3. Genoomi varane piirkond moodustab kaks kolmandikku genoomist, millest piisab rakkude transformeerimiseks. BPV-1 puhul on leitud, et E5 võib ka üksinda transformeerida hiire fibroblaste (Bergman et al., 1988). E5 geeni ekspresseeritakse nii viiruse elutsükli varases kui ka hilises staadiumis (Burnett et al., 1992). E5-e iseseisva transformatsioonivõime tõttu võib rakkudesse viia vaid E5-t, mitte kogu papilloomiviiruse genoomi, sisaldavaid vektoreid ning sel viisil on uuritud E5-e seoseid raku valkudega. Mitmed E5-e interaktsioonid raku valkudega on kirjeldatud sellises

testsüsteemis (Goldstein et al., 1992; Schapiro et al., 2000). Seega on võimalik uurida rakkude transformatsiooni BPV E5 valguga, kasutamata kogu viiruse genoomi.



Joonis 3. BPV-1 genoom. Näidatud on avatud lugemisraamid E1 kuni E8 ja L1 ning L2. Promootoreid tähistavad nooled, E2-spetsiifilised DNA sidumiskohad on tähistatud mustade täppidega. Samuti on näidatud LCR (*long control region*), kus on replikatsiooni alguspunkt (ori) ja MME (*minichromosome maintenance element*).

(<http://jvi.asm.org/content/vol72/issue3/images/large/jv0381722001.jpeg>)

1.1.3. BPV-1 onkovalk E5 ja rakkude transformatsioon

BPV E5 on lühike, hüdrofoobne, transmembraanne valk, mis koosneb 44 aminohappest (joonis 4.). BPV E5 on iseseisvalt võimeline transformeerima nii veise kui ka hiire fibroblaste. E5 lokaliseerub peamiselt endoplasmaatilise retiikulumi (ER) ja Golgi kompleksi membraanides (Burkhardt et al., 1989; Horwitz et al., 1988; Schlegel et al., 1986). Valgu N-terminuses on hüdrofoobne 33 aminohappeline segment, mis läbib membraane kui α -heeliks, ja C-terminuses on 14 aminohappeline hüdrofiilne segment. E5 eksisteerib rakus homodimeerina, mis on kokku seotud disulfiidsillaga üle Cys jääkide valgu C-terminaalses osas. E5-l pole teada ensümaatilisi aktiivsusi. Pigem moduleerib see

raku membraanseid proteiine, mis reguleerivad raku kasvu. E5 interaktsiooni PDGF β retseptoriga ja vakuooli H^+ -ATPaasi 16 kDa subühikuga vahendab E5 transmembraanne domään (DiMaio and Mattoon, 2001).

On tehtud palju BPV E5 mutante ja uuritud nende transformatsioonivõimet. PDGF β retseptori sidumiseks ja raku transformeerimiseks on vajalikud 4 konserveerunud aminohapet. Need on Gln17, Asp33, Cys37 ja Cys39. Gln17 on ainus hüdrofiilne aminohape valgu transmembraanses regioonis, Asp33 paikneb juxtamembraanses regioonis ja Cys-d C-terminaalses osas (Horwitz et al., 1988; Meyer et al., 1994; Nilson et al., 1995; Sparkowski et al., 1994; Sparkowski et al., 1996). Cys-d osalevad E5 dimeriseerumisel, nad moodustavad S-S-sildu. Kõigi papilloomiviiruste E5 valkudes on need Cys-d konserveerunud. Valgu C-terminaalse domääni süstimine C127 rakkudesse kutsub esile DNA sünteesi (Green and Loewenstein, 1987; Rawls et al., 1989). Seega asub E5 aktiivsait valgu selles piirkonnas. E5 aktiivsaiidi ja PDGF ühe regiooni aminohappelised järjestused on sarnased (Kulke and DiMaio, 1991; Petti et al., 1991). Seepärast arvati algul, et E5 asendab PDGF ja seob retseptori ekstratsellulaarset ala. Hiljem osutus see siiski ebaõigeks. Kui C-terminaalset peptiidi pikendada nii, et ta sisaldab ka osa E5 hüdrofoobsest domäänist, siis suureneb märgatavalt võime indutseerida DNA sünteesi. Hüdrofoobse segmendi võime toetada transformatsiooni sõltub selle naabruses olevast järjestusest. Mitte kõik hüdrofoobsed järjestused pole funktsionaalselt võrdsed. Phe-de arvust sõltub, kas transformeerimiseks on vaja Gln17 või ei ole. Gln pole vaja kui järjestuses on 0-2 Phe. E5-l ja tema mutantidel, mis transformeerivad, kui Gln on olemas, on 1-4 Phe. Igal juhul transformatsioonidefektsetel mutantidel on 4-6 Phe. Mitu Phe võivad sekkuda E5 õigesse membraani sisestamisse, E5 polüpeptiidi pakkimisse selle homodimeeri partneriga ja E5 võimesse ära tunda oma rakuline sihtmärk (Kulke et al., 1992).

Transformatsiooniks on vaja valgu hüdrofoobset tsentraalset tuuma ja spetsiifilisi C-terminaalseid aminohappeid. Juhuslik järjestus hüdrofoobsetest aminohapetest võib funktsionaalselt asendada E5 valgu hüdrofoobset tuuma, kui on olemas Gln17 (Kulke et al., 1992). Transformatsiooniks on väga oluline Gln17. Erinevad 17. positsiooni mutandid transformeerivad erineva efektiivsusega võrreldes muteerimata E5-ga – transformatsioonidefektsetest hüpertransformeerivateni. Mutandid, millel Gln on

asendatud Cys, Tyr, Pro või Arg-ga transformeerivad vähe või üldse mitte. Lys, Asp, Met ja Thr transformatsiooni efektiivsus on võrreldes *wt*-ga vähenenud. Trp, Asn ja His transformeerivad efektiivselt ning Ser ja Glu 2-3 korda efektiivsemalt kui *wt* E5. Efektiivselt transformeerivad mutandid saadakse, kui Gln17 asendatakse aminohapetega, mis saavad moodustada vesiniksidemeid. (Klein et al., 1998)

Immunofluorestsentsi järgi leiti, et mutatsioonid positsioonis 17 ei mõjuta E5 valguga lokaliseerimise rakus (Klein et al., 1998).

Üle 90% E5 valgust on rakus dimeerina. Nii on see ka mutantidel, millel Gln17 on asendatud laetud aminohapetega või Asn-ga. Teistel mutantidel, Ser-ga, Thr-ga 17. positsioonis, on palju vähem dimeeri ning mutant Ile-ga 17. positsioonis on peamiselt monomeeri kujul (Klein et al., 1998).

BPV-1 E5 indutseerib Tyr-de fosforüülimise nii küpsel PDGF β retseptoril kui ka selle eellasel, transformatsiooni-kompetentsed mutandid aga eelistatult küpsel PDGF β retseptoril. Eksisteerib korrelatsioon transformatsiooni aktiivsuse ja retseptori Tyr-de fosforüülituse ulatuse vahel. Kõik efektiivselt transformeerivad mutandid indutseerivad rohke retseptori Tyr-de fosforüülimise. Kõik mutandid, mis toetavad kompleksi teket PDGF β retseptoriga ja transformatsiooni, sisaldavad 17. positsioonis aminohappejääke, mis saavad moodustada vesiniksidemeid (Gln, Glu, Ser) Thr513-ga PDGF β retseptoris. Mutandid, milles on hüdrofoobsed aminohappejäägid külghelatega, mis ei moodusta vesiniksidemeid, on transformatsioonidefektsetes (Klein et al., 1998).

Tsüsteiinid E5-e hüdrofiilses regioonis, Cys37 ja Cys39, on olulised arahhidoonhappe (AA) metabolismi aktiveerimisel. E5-e mutandid, millel need puuduvad, ei ole võimelised AA metabolismi aktiveerima. Näib, et Cys-d, mis vastutavad E5 dimerisatsiooni eest, on vajalikud PLA₂ aktiivsuse ja AA metabolismi stimuleerimiseks (Väli et al., 2001).

Seni pole leitud absoluutset korrelatsiooni E5 ja tema mutantide võimete vahel aktiveerida mingit ühte valku ja transformeerida fibroblaste. BPV-1 E5 mõjutab ilmselt mitmeid raku valke ja transformatsioonis võivad osaleda ka mitmed aktiivsused. BPV-1 E5 ja tema mutandid võivad rakke transformeerida ka erinevate rakuliste märklaudade kaudu.

17S on hüpertransformeeriv E5 mutant. Glutamiin positsioonis 17 on asendatud seriiniga. Võrreldes *wt* E5-ga on 17S transformatsiooni aktiivsus C127 rakkudes 287% (Klein et al., 1998). Varasemate andmete järgi mutant 17S ei seo PDGFR, ei indutseeri PDGFR Tyr-de fosforülatsiooni ega aktiveeri PDGFR (Sparkowski et al., 1994), kuid uuemad andmed näitavad, et 17S siiski aktiveerib PDGF β retseptorit (Lai et al., 2005). On veel leitud, et 17S muudab Golgi kompleksi pH-d (Schapiro et al., 2000). Ilmselt interakteerub see mutant mitme erineva sihtmärgiga rakus.

N terminus

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
[Met	– Pro	– Asn	– Leu	– Trp	– Phe	– Leu	– Leu	– Phe	– Leu	– Gly	– Leu	– Val	
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Ala	– Ala	– Met	– Gln	– Leu	– Leu	– Leu	– Leu	– Leu	– Phe	– Leu	– Leu	– Leu	
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
Phe	– Phe	– Leu	– Val]	– Tyr	– Trp	– Asp	– His	– Phe	– Glu	– Cys	– Ser	– Cys
40	41	42	43	44									
Thr	– Gly	– Leu	– Pro	– Phe									

C terminus

Joonis 4. BPV-1 E5 aminohappeline järjestus. [...] – E5-e hüdrofoobne osa, lillaga on tähistatud PDFG β retseptori sidumiseks ja raku transformeerimiseks olulised aminohapped Gln17, Asp33, Cys37, Cys39.

1.1.4. BPV-1 E5 ja PDGF β retseptor

Transformatsiooniks BPV-1 E5-ga on vajalik PDGF β retseptori aktivatsioon. Rakud, milles puudub PDGF β retseptor, pole vastuvõtlikud E5 indutseeritud transformatsioonile. Retseptori türosiin-kinaas aktiveerib signaali kaskaadi proliferatiivseks signaaliks. Mõned E5 mutandid transformeerivad rakke või mõjutavad raku metabolismi ka aktiveerimata PDGF β retseptorit (Schapiro et al., 2000;

Suprynowicz et al., 2000; Väli et al., 2001). Seega eksisteerib veel alternatiivseid teid raku transformeerimiseks.

E5 ja PDGF β retseptor moodustavad rakkudes stabiilse kompleksi. Erinevalt PDGFst, mis seostub retseptori ekstratsellulaarse domääniga, interakteerub E5 retseptori transmembraanse ja juxtamembraanse domääniga. E5 seondumine indutseerib retseptori dimerisatsiooni ja mitme Tyr-i transautofosforüülimise retseptori dimeeri subühikute tsütoplasmaatilises domäänis. BPV E5/PDGF β retseptori kompleksi formeerumiseks on vaja elektrostaatilist sidet E5 Asp33 ja PDGF β retseptori juxtamembraanse Lys499 vahel ning vesiniksidet E5 Gln17 ja PDGF β retseptori Thr 513 vahel (DiMaio and Mattoon, 2001). E5 ei interakteeru PDGF β retseptoriga sarnase PDGF α retseptoriga, millel on erinev juxtamembraanne ja transmembraanne regioon. PDGF α retseptoril puuduvad nii positiivse laenguga aminohappejääk juxtamembraanses regioonis kui ka Thr513 membraanis (Goldstein et al., 1994; Petti and DiMaio, 1992; Staebler et al., 1995).

E5 dimeer eksisteerib membraanis paardunud transmembraansete α -heeliksitena, mis on organiseerunud sümmeetriliselt, paralleelselt vasakukäelise spiraali geomeetriaga (*left-handed coiled-coil geometry*). Igal dimeeril on sidumissaidid kahe PDGF β retseptori jaoks, mis selgitab retseptori dimerisatsiooni. See omakorda toob kinaasi domäänid teineteise lähedale, nii et saab toimuda transfosforüülimine. Imselt interakteerub PDGF β retseptori molekul Gln17-ga ühel ja Asp33-ga teisel E5 monomeeril (DiMaio and Mattoon, 2001).

1.1.5. BPV-1 E5 ja vakuoli H⁺-ATPaas

E5 seondub vakuoli H⁺-ATPaasi (V-ATPaas) 16 kDa poori moodustavale subühikule (Goldstein et al., 1992). V-ATPaas kontrollib Golgi kompleksi ja teiste raku organellide pH-d. Seondumine E5-ga inhibeerib V-ATPaas-i. Transformeerunud rakkudes on Golgi kompleksi hapestumine häiritud. Golgi kompleksi normaalne pH on 6.5. Transfekteeritud rakkudes, kus Golgi hapestumist ei toimu, on pH ~7.0 (Schapiro et al., 2000). Paljud kasvu reguleerivad valgud läbivad teel sihtkohta Golgi kompleksi, nii et

organellide vale pH võib mõjutada nende valkude aktiivsust ja transformatsioonile kaasa aidata.

E5 assotsieerub 16 kDa hüdrofoobse valguga. Kuus 16 kDa subühikut assambleeruvad, et moodustada H^+ selektiivne poor läbi membraani (Sun et al., 1987; Mandel et al., 1988; Forgac, 1992). See valmis ensüümkompleks vastutab paljude endomembraansete organellide luumeni hapestumise eest (Forgac, 1989). E5 assotsieerumine segab H^+ translokatsiooni läbi V-ATPaasi ja seega ka organellide hapestumist. Kuna E5 lokaliseerub peamiselt Golgi kompleksi membraanidel, on just Golgi kompleks ka kõige enam mõjutatud (Schapiro et al., 2000). Golgi kompleksi pH mõjutab seal protsessitavaid regulatoorseid valke.

E5 akumulereerub Golgi tsisternidesse. Ta ei muuda Golgi kompleksi morfoloogiat. Normaalselt pumbatakse H^+ aktiivselt Golgi kompleksi. E5 inhibeerib V-ATPaasi, transfektantidel on H^+ pumpamine tunduvalt vähenenud. Transformatsioonil on oluline, et E5 lokaliseerub Golgi kompleksi. Transformatsioonidefektsete mutandid ei leelista Golgi kompleksi. Seega peab E5 otseselt Golgi kompleksile ligi pääsema, et saaks muuta luumeni pH-d. (Schapiro et al., 2000)

Golgi kompleksi leelistumine võib initsieerida signaalid proliferatsiooniks, kuid Golgi kompleksi leelistumine võib olla ka transformatsiooni tagajärg mitte põhjus. Katsetes teiste transformeerivate valkudega (Sis, Src) jäi Golgi kompleksi pH happeliseks (Schapiro et al., 2000), nii et Golgi kompleksi pH muutus pole transformatsiooniga alati kaasnev nähtus.

16 kDa subühikul on oluline Glu143, mis on vajalik H^+ -pumba aktiivsuseks. Samuti on see vajalik seostumiseks E5-ga. V-ATPaasi 16 kDa subühiku 143. positsiooni mutandid indutseerivad olulise Golgi kompleksi leelistumise (Schapiro et al., 2000).

On olemas korrelatsioon E5 võime vahel transformeerida rakke ja seonduda V-ATPaasi 16 kDa subühikuga. Ainult seondumisest 16 kDa subühikuga ei piisa transformatsiooniks, kuid see suurendab E5 onkogeensust (Schapiro et al., 2000).

E5 mutantidel, millel on negatiivselt laetud aminohape (Glu, Asp) positsioonis 17, on tunduvalt vähenenud võime siduda V-ATPaasi 16 kDa subühikut, aga nad transformeerivad rakke. Mutandil, millel on 17. positsioonis polaarne seriin, on samuti vähenenud võime siduda 16 kDa proteiini võrreldes *wt* E5-ga, kuid ta on transformeeriv.

Kuigi võime siduda 16 kDa valku on vähenenud, peaks ta siiski muutma Golgi kompleksi pH-d, sest mingil määral ta ju ikkagi seob 16 kDa valku. Mutandid, millel on 17. positsioonis positiivselt laetud aminohape (Arg, His, Lys) seovad tugevalt 16 kDa valku, kuid nende transformatsioonivõime on madal. Laenguta aminohape 17. positsioonis mõjutab interaktsiooni 16 kDa proteiiniga ja transformatsiooni (Sparkowski et al., 1996). E5 Gln17 on oluline ka selle poolest, et interakteerub Glu-ga 16 kDa proteiini neljandas transmembraanses domäänis (Andresson et al., 1995).

E5 mutandid võib jaotada võime järgi siduda 16 kDa valku ja transformeerida rakke kolme rühma: (1) mutandid, mis seovad 16 kDa valku ja transformeerivad rakke, (2) mutandid, mis ei seo 16 kDa valku, kuid transformeerivad rakke, (3) mutandid, mis ei seo 16 kDa valku ega transformeeri rakke (Sparkowski et al., 1996).

Järelikult V-ATPaasi inaktiveerimine ja Golgi kompleksi pH muutus ei seleta täielikult E5 transformeerivat toimet.

1.1.6. BPV-1 E5 ja arahhidoonhappe metabolism

Rakkude mitootilise aktiivsusega kaasnevad muutused lipiidide, k.a. arahhidoonhappe (AA) metabolismis. Fosfolipaaas A₂ (PLA₂) vabastab AA membraanidest ja see konverteeritakse eikosanoidideks. AA edasiseks metaboliseerimiseks on kolm teed. Tsüklooksügenaasid (CO) katalüüsivad prostaglandiinide ja tromboksaanide sünteesi. Lipoksügenaasid (LO) katalüüsivad hüdroksüeikosatetraanhapete, lipoksiinide ja leukotrieenide produktsiooni. P450-monooksügenaasi süsteem toodab epoksühappeid ja dioole (Pachernik et al., 2002). Epidermaalne kasvufaktor (EGF) ja PDGF stimuleerivad PLA₂ (Lin et al., 1992). EGF suurendab samuti 12-LO aktiivsust (Liu et al., 1997b). 12-LO blokeerimine inhibeerib rakkude kasvu (Dethlefsen et al., 1994).

PLA₂ aktivatsiooni mehhanism pole veel selge. On näidatud, et PLA₂ võib reguleerida Ca²⁺ tase, ensüümi fosforüülimine ja muutused membraani koostises (Piomelli, 1993). Samuti võivad PLA₂ *in vitro* aktiveerida membraan-seoselised valgud ja väikesed transmembraansed peptiidid (Mingarro et al., 1995; Lehtonen et al., 1996).

E5 aktiveerib PLA₂ ja AA metabolismi. AA metabolismi stimuleerimisel on olulised Cys-d, mis vastutavad E5 dimerisatsiooni eest. E5 mutandid, millel neid Cys-e pole (C37S, C37SC39S), ja mutandid, millel puudub C-terminaalne regioon, on mittetransformeerivad ja ei stimuleeri PLA₂ aktiivsust ega AA metabolismi nagu *wt* E5 (Väli et al., 2001).

E5 võime stimuleerida AA metabolismi ei sõltu võimest seostuda PDGFR-ga. Transformatsioonidefektne E5 mutant D33V ei aktiveeri PDGFR, küll aga aktiveerib AA metabolismi (Väli et al., 2001). AA metabolismi aktivatsiooniks on vaja enam kui E5 hüdrofoobse domääni inkorporeerimine membraani. E5 mutant, mis sisaldab ainult hüdrofoobset domääni, ja on võimeline seostuma nii V-ATPaasi kui PDGFR-ga (Goldstein et al., 1992), ei aktiveeri AA metabolismi (Väli et al., 2001). E5 võime aktiveerida AA metabolismi ei ole piisav transformeerimiseks, kuid võib olla protsessi kaasatud.

Paljud ühendid, mis inhibeerivad AA metaboliseerivaid ensüüme, vähendavad proliferatsiooni ja/või muudavad rakkude diferentseerumist. Seega on nad potentsiaalsed vähivastased ravimid. Rakkude kasv pidurdub peale töötlemist LO inhibiitoritega. ETYA ja MK-886 lükkasid HaCaT rakkudel edasi G₁ faasi läbimist, eskuletiin ja NDGA aga S faasi läbimist. ETYA on üldine AA metabolismi inhibiitor (Pachernik et al., 2002). MK-886 on 5-LO inhibiitor. Ta võib ka inhibeerida PLA₂ ja vähendada AA produktsiooni (Datta et al., 1999). Tuumasisene fosfolipiidide tase mõjutab ribonukleoproteiinide seondumist tuumamaatriksile, mis omakorda mõjutab DNA replikatsiooni (Maraldi et al., 1993). DNA replikatsiooni seostatakse vähenenud fosfolipiidide tasemega raku tuumas. Lipoksügenaaside inhibeerimisel võib fosfolipiidide tase tuumas kasvada piisavalt suureks, et inhibeerida DNA replikatsiooni, mis väljenduks rakkude kogunemises S faasi (Pachernik et al., 2002).

LO inhibiitorite toimed tekivad rakkudes sageli apoptootilised muutused (Anderson et al., 1992; Ding et al., 1999; Ghosh and Myers, 1998). NDGA, MK-886 ja ETYA kõrgemad kontsentratsioonid põhjustasid HaCaT rakkudes PARP valgu lõikamist, mida peetakse apoptoosi tunnuseks (Pachernik et al., 2002).

1.1.7. BPV-1 E5 ja fosfatidüülinositol-3-kinaas

Fosfatidüülinositol-3-kinaasid (PI3K) on perekond ensüüme, mis fosforüülivad inositolli fosfolipiide spetsiifiliselt inositolringi 3D positsioonist. Fosforüülimise produktid osalevad raku kasvu, liikuvuse, memraanse liikluse ja glükoosi metabolismi regulatsioonis (Carpenter and Cantley, 1996; Shepherd et al., 1998; Toker and Cantley, 1997). Heterodimeersel (p85/p110) PI3K on võtmeroll kasvufaktorite poolt indutseeritud mitootilistes signaalides ja ta on oluline rakkude transformatsioonil *v-src*, *v-ros* ja polüoomiviiruse keskmise T-antigeeni poolt (Shepherd et al., 1998; Cantley et al., 1991; Downward, 1997; Kaplan et al., 1987; Soltoff et al., 1992). PI3K aktiveerimiseks on vaja fosforüülda Tyr 85-kDa reguloorsel subühikul (p85) (Kaplan et al., 1987; Soltoff et al., 1992; Carpenter and Cantley, 1990; Kazlauskas, 1994).

BPV-1 E5 tõstab PI3K aktiivsust NIH 3T3 rakkudes. PI3K aktivatsioon võib olla alternatiivne tee, mille kaudu mõned E5 mutandid transformeerivad rakke, kui nad ei aktiveeri PDGFR. Närilise fibroblastides on konstitutiivselt aktiivse PI3K ekspressioon piisav, et indutseerida transformatsiooni tunnuseid. PDGFR türosiinkinaas aktiveerib ka PI3K (Kaplan et al., 1987; Soltoff et al., 1992; Kazlauskas, 1994). Osa PI3K aktivatsioonist tuleneb seega PDGFR aktivatsioonist E5 poolt, kuid mõned E5 mutandid, mis ei aktiveeri PDGFR, aktiveerivad ikkagi PI3K (Suprynowicz et al., 2000). Ilmselt on PI3K aktiveerimiseks veel teine mehhanism.

PI3K produktid aktiveerivad mitmeid ensüüme, sealhulgas üks olulisi märklaudu on proteiinkinaas Akt e. PKB, mille aktivatsiooni seostatakse apoptoosi blokeerimisega. Rakusisese redoks-seisundi kõikumised võivad reguleerida hepatoomi rakkude kasvu Akt fosforüülimise ja PI3K/Akt signaaliraja kaudu (Shi et al., 2003). Mõned kasvavad toodavad aktiivseid hapnikuühendeid (ROS). Näiteks hepatoomi rakkudes pole DNA süntees aktiivne, kui vabade radikaalide tase on madal (Shi et al., 2003). Seega võib hepatoomis $O_2^{\cdot -}$ produtseerimine vahendada DNA sünteesi ja proliferatsiooni. ROS indutseerivad Akt kinaasi fosforüülimise. Oksüdatiivsel stressil, antioksidantidel ja Akt signaalirajal on oluline roll raku kasvu regulatsioonis (Shi et al., 2003). Kui hepatoomi rakke töödelda H_2O_2 -ga, siis H_2O_2 stimuleerib Akt fosforüülimist. Kui rakke enne H_2O_2 -ga stimuleerimist, töödeldi wortmanniiniga, mis on PI3K inhibiitor, siis Akt

fosforüülimine blokeeriti. Seetõttu võib oletada, et Akt fosforüülimine käib PI3K-sõltuva raja kaudu. Hepatoomi rakkude proliferatsioon suurenes, kui Akt fosforüülitati, ja vastupidi, proliferatsioon vähenes, kui Akt defosforüülitati. (Shi et al., 2003)

Kui BPV-1 E5 aktiveerib PI3K ja selle kaudu võidakse aktiveerida Akt, kas siis siin võiks olla osalised ka aktiivsed hapnikuühendid? Paljud viirusinfektsioonid aktiveerivad rakus tuuma faktor κ B (NF κ B). Seda teevad HIV-1, inimese T-rakulise leukeemia viirus tüüp 1, hepatiit B viirus, inimese herpesviiruse tüübid 1 ja 6, Newcastle'i haiguse viirus, Sendai viirus, Epstein-Barr viirus ja adenoviirus (Siebenlist et al., 1994). On näidatud, et BPV-1 E5 aktiveerib transkriptsiooni faktorit NF κ B COS rakkudes (Kilk et al., 1996). Ka aktiivsed hapnikuühendid osalevad signaaliradades, mis aktiveerivad NF κ B (Schreck et al., 1991; Schreck et al., 1992; Schulze-Osthoff et al., 1993; Schenk et al., 1994; Kopp and Ghosh, 1994; Suzuki and Packer, 1994). BPV-1 E5-ga transfekteeritud COS rakkudes blokeeris superoksiidi dismutaas NF κ B aktivatsiooni, mis näitab superoksiid radikaali osalust NF κ B aktivatsioonis (Kilk et al., 1996).

NF κ B eksisteerib rakus homo- või heterodimeerina p65 ja p50/p52 subühikutest. NF κ B reguleerib mitmete proliferatsiooniga, transformatsiooniga, apoptoosiga ja põletikuga seotud geenide ekspressiooni (Lenardo and Baltimore, 1989; Baeuerle and Henkel, 1994; Siebenlist et al., 1994; Fujita et al., 1992; Behl et al., 1994; Lin et al., 1995). Tsütoplasmas on NF κ B seotud inhibiitorvalguga I κ B. NF κ B-I κ B kompleks on inaktiivne (Beg and Baldwin, 1993). NF κ B aktiveerimiseks tuleb lagundada I κ B, misjärel aktiivne NF κ B liigub kiiresti tuuma, seondub DNA-le ja aktiveerib transkriptsiooni (Baeuerle and Baltimore, 1988; Devary et al., 1993; Henkel et al., 1993; Thanos and Maniatis, 1995). NF κ B aktiveerib ka oma inhibiitori I κ B α sünteesi (Sun et al., 1993). I κ B α seob NF κ B ja viib selle tuumast välja, hoides niimoodi ära NF κ B üleaktivatsiooni (Chiao et al., 1994).

Meie labori eelnevad tulemused on näidanud, et BPV-1 E5 mõjutab mitmetes rakuliinides superoksiidi taset, mõned katsed viitavad sellele, et antioksidandid nagu superoksiidi dismutaas ja E vitamiin mõjuvad ka E5 transformatsioonilisele toimele (Karo, 2005). Kuidas on lugu peroksiidide taseme ja antioksidantide mõjuga E5-ga transformeerunud rakkudes, sellele küsimusele on vaja veel vastust.

1.2. Aktiivsed hapnikuühendid ja kasvajakad

1.2.1. Aktiivsed hapnikuühendid

Aktiivsed hapnikuühendid (ROS - *reactive oxygen species*) on hapnikku sisaldavad molekulid, millel on suurem keemiline reaktiivsus kui molekulaarsel hapnikul (O_2). ROS pole ainult radikaalid, nagu superoksiid anioon ($O_2^{\bullet-}$) ja hüdroksüülradikaal (OH^{\bullet}), vaid ka molekulid, nagu aktiveeritud hapnik (1O_2) ja vesinikperoksiid (H_2O_2). On näidatud, et ROS-l on roll vähitekkes (Oberley and Buettner, 1979; Church et al., 1993; Zhang et al., 1999; Zhong et al., 1996; Liu et al., 1997a; Factor et al., 2000), põletikus (Wang et al., 2003), ateroskleroosis (Harrison et al., 2003), diabeedis (Aydin et al., 2001), neurodegeneratsioonis (Lebovitz et al., 1996) ja vananemises (Orr and Sohal, 1994; Furumoto et al., 1998).

ROS peetakse tavaliselt oksüdatiivse stressi indutseerijateks ja kõrgel tasemel nad ongi tsütotoksilised ja mutageensed. Kuid ROS-l on ka roll signaali ülekandes. ROS osalevad raku proliferatsiooni ja apoptoosi stimuleerimises või inhibeerimises ning raku vananemises (Pentland et al., 1992; Nakahara et al., 1998; Esposito et al., 1999; Dang and Semenza, 1999; Szatrowski and Nathan, 1991). ROS tase rakkudes muutub sünkroonis rakutsükliga (Takahashi et al., 2004). Aktiveeritud fagotsüüdid toodavad väga kõrgel tasemel $O_2^{\bullet-}$ ja H_2O_2 , mis osalevad peremehe kaitses. Paljud teised rakutüübid toodavad ka ROS, kuigi üldiselt madalamal tasemel (Burdon, 1995; Cross and Jones, 1991; Szatrowski and Nathan, 1991). Mitte-fagotsüütide ROS genereerimise funktsioon pole selge, kuid mõnel juhul korreleerub see proliferatsiooni ja kasvuga seotud signaaliteede aktiveerimisega.

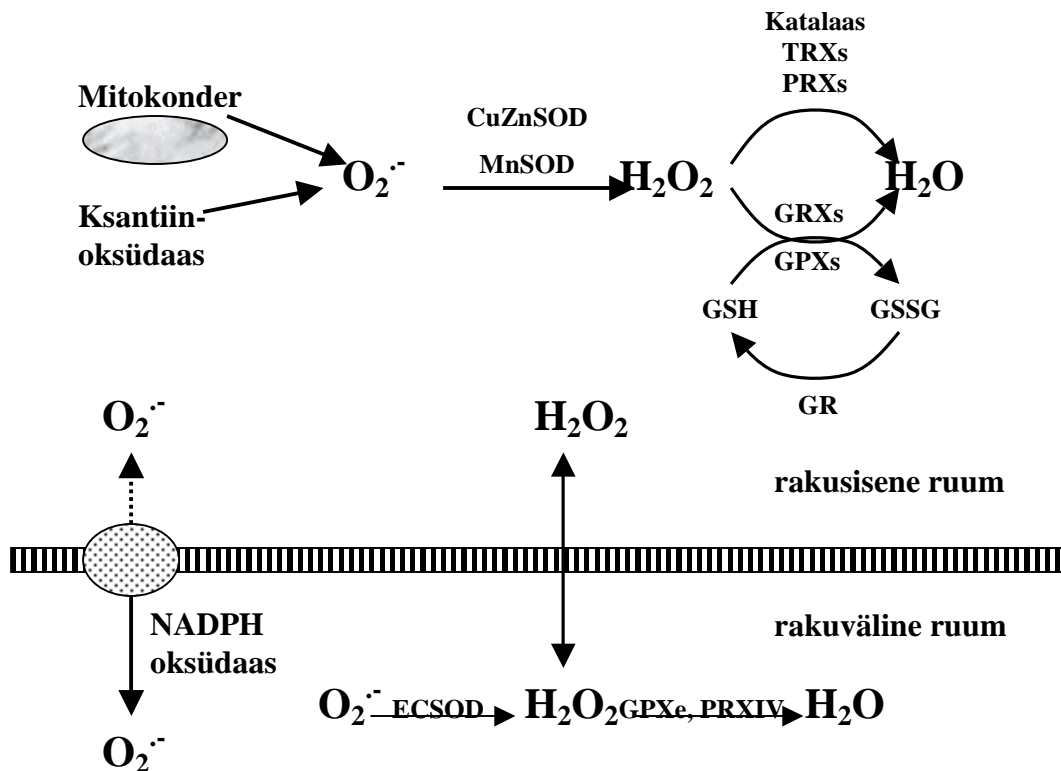
Samuti on märkimisväärne ROS produktsioon leitud inimese kasvajatest saadud rakuliinides (Szatrowski and Nathan, 1991). ROS stimuleerivad inimese hepatoomi rakuliini 7721 proliferatsiooni. MnSOD üleekspressioon vähendas rakusisest ROS taset ning MnSOD supresseerimine vastupidi suurendas ROS taset rakkudes ning soodustas proliferatsiooni PI3K/Akt signaaliraja kaudu. Akt stimuleeris proliferatsiooni c-fos ja c-

jun mRNA ekspressiooni suurendades. Akt omakorda aktiveeriti ROS poolt PI3K sõltuva signaaliraja kaudu, sest PI3K inhibeerimine takistas Akt aktivatsiooni. (Liu et al., 2002)

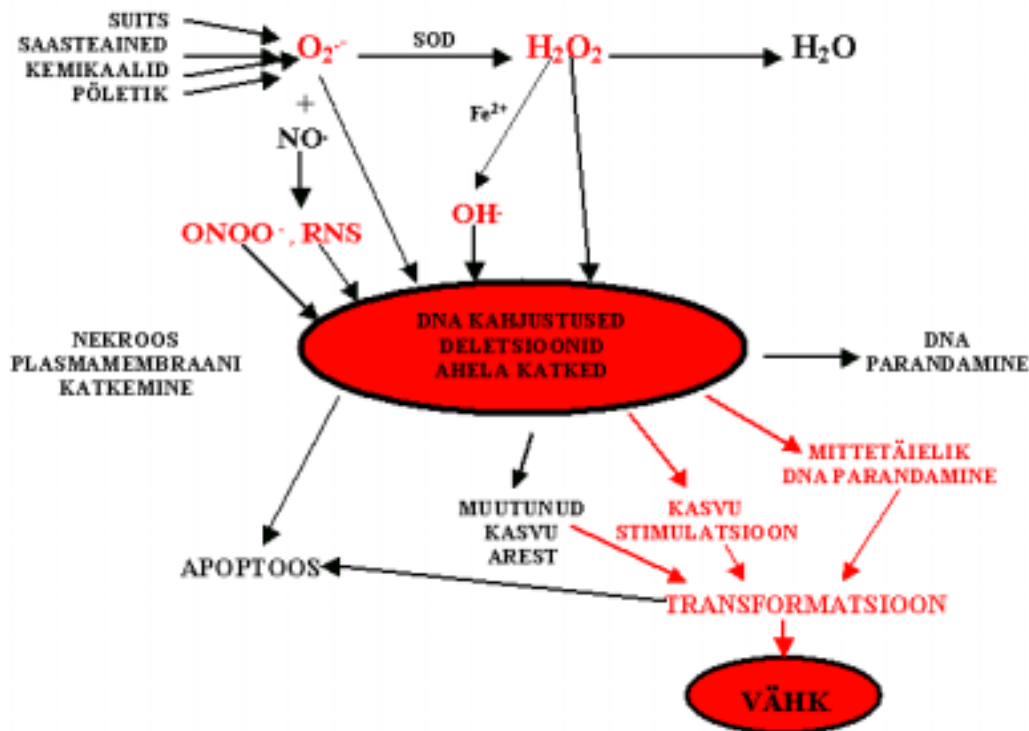
Kasvufaktorid, nt. PDGF ja EGF, põhjustavad H_2O_2 produktsiooni (Sundaresan et al., 1995; Bae et al., 1997). Vastused PDGF-le haaravad mitogeen-aktiveeritava proteiinkinaasi aktivatsiooni, DNA sünteesi ja kemotaksist. Need vastused inhibeeritakse, kui H_2O_2 taseme tõus on blokeeritud antioksidantidega (Sundaresan et al., 1995).

ROS ensümaatiline päritolu mitte-fagotsüteerivates rakkudes pole päris selge. Osa ROS-st on pärit mitokondritest. Paljudes rakkudes blokeerivad fagotsüütide NADPH oksüdaasi inhibiitorid ROS produktsiooni (Arnold et al., 2001). Imetajarakkudes võivad ROS toota mitmed metaboolsed rajad, nt. ksantiin/ksantiini oksüdaas, NADPH oksüdaas, mitokondriaalne elektron-transport-ahel, tsüklooksügenaasi rada (Fridovich, 1978).

ROS päritolu ja kõrvaldamist rakus illustreerivad joonised 5 ja 6.



Joonis 5. ROS teke ja kõrvaldamise teed rakus. $O_2^{\bullet-}$ toodavad rakus membraansed NADPH oksüdaasid ja ksantiin-oksüdaasid. Samuti tekib $O_2^{\bullet-}$ mitokondrites elektron-transport-ahelas. Erinevad SOD-d konverteerivad $O_2^{\bullet-}$ vesinikperoksiidiks. H_2O_2 konverteeritakse omakorda veeks katalaasi, tioredoksiinide (TRXs), peroksüredoksiinide (PRXs) ja glutaredoksiinide (GRXs) poolt. Glutatioonperoksüdaasid (GPXs) oksüdeerivad redutseeritud glutatiooni (GSH) oksüdeeritud glutatiooniks (GSSG), mille redutseerib tagasi GSH-ks glutatiooni reduktaas (GR). NADPH oksüdaaside poolt ekstratsellulaarsesse ruumi toodetud $O_2^{\bullet-}$ kõrvaldavad ekstratsellulaarne SOD (ECSOD) ning tekkinud H_2O_2 kahjutustavad ekstratsellulaarne glutatioonperoksüdaas (GPXe) ja peroksüredoksiin IV (PRX IV).



Joonis 6. ROS tekitavate keskkonnategurite mõju rakule. Mitmesugused keskkonnategurid, nagu sigaretsuits, saasteained, mutageensed kemikaalid ja ka krooniline põletik põhjustavad ROS ja aktiivsete-lämmastiku-ühendite (RNS – *reactive nitrogen species*) teket rakus. Oksüdatiivse stressi tulemusena tekivad DNA kahjustused, mis võidakse parandada. Raku kasv võidakse peatada ja suunata rakk apoptoosi. Normaalses tingimustes kahjustused kõrvaldatakse, kuid tasakaalustamata tingimustes võivad geneetilised muutused stimuleerida kasvu ning see koos DNA mittetäieliku parandamisega viia raku transformatsioonini. Kui transformeerunud rakke ei suunata apoptoosi, siis võib see viia vähi tekkeni.

NADH/NADPH oksüdaas, mis on peamine $O_2^{\bullet-}$ tootja rakkudes, on indutseeritav mitmete kasvufaktoritega. Roti aordi silelihasrakkudes (RASMC) tõusis ROS tase PDGF lisamise järel kaks korda ja rakkude arv kasvas 1.6 korda võrreldes rakkudega, millele PDGF ei lisatud (Kong et al., 2001).

Nox1 on $O_2^{\bullet-}$ tootev oksüdaas. See on fagotsüütides $O_2^{\bullet-}$ tootva NADPH oksüdaasi, *gp91phox*, katalüütilise subühiku homoloog, mis transformeerib rakke (Suh et al., 1999). *Nox1* põhjustab $O_2^{\bullet-}$ produtseerimist, suurenenud mitoosi kiirust ja tumorigeensust (Arnold et al., 2001). Silelihasrakkudes indutseerib PDGF *nox1* mRNA produktsiooni.

Nox1 üleekspressioon NIH 3T3 rakkudes suurendab $O_2^{\bullet-}$ genereerimist ja rakkude kasvu. Rakud on transformeerunud välimusega – pikenenud, kontaktinhibitsioon on kadunud. Samuti põhjustavad *nox1* ekspresseerivad NIH 3T3 rakud kasvajate teket tüümuseta hiirtel. Seega võib *Nox1* osaleda mitoosi regulatsioonis vastusena kasvufaktoritele, nagu nt. PDGF (Suh et al., 1999). Ka H_2O_2 reguleerib raku kasvu ja transformatsiooni. Lisaks muudab H_2O_2 paljude geenide ekspressiooni, k.a. geenid, mis on seotud transformatsiooni, vähi, rakutsükli regulatsiooni ja signaali ülekandega (Arnold et al., 2001).

Nox1-transfekteeritud rakkudes on suurenenud H_2O_2 tase. Kui neis rakkudes üleekspressseerida katalaasi, siis *Nox1* ekspressiooni tase ei muutu. H_2O_2 tase rakkudes langeb, kuid $O_2^{\bullet-}$ tase märgatavalt ei muutu. Katalaasi üleekspressseerivateel rakkudel kadus transformeerunud fenotüüp ning kui neid rakke süstiti tüümuseta hiirtele, siis ei põhjustanud nad kasvajate teket (Arnold et al., 2001). H_2O_2 sihtmärgid raku, mis on seotud kasvu ja transformatsiooniga pole selged. p42/p44 MAPK, p38 MAPK, p70^{S6k}, Akt/PKB, STAT, ja fosfolipaaas D signaalirajad on aktiveeritavad $O_2^{\bullet-}$ abil (Bae et al., 1999; Natarajan et al., 1993; Allen et al., 2000; Simon et al., 1998; Finkel, 1998).

Nox1 poolt toodetud ROS vahendavad võib-olla ka angiogeneesi. Angiogeneesiks nimetatakse veresoonte arengut kudedes. Mikroskoopiliste kasvajate teket peetakse üsna sagedaseks, kuid vähesed neist arenevad aktiivseteks kasvajateks. Kasvajal on vaja veresooni, kui ta kasvab suuremaks kui 1-2 mm (Folkman, 1971). Muutumaks aktiivselt suurenevaks kasvajaks, tuleb indutseerida angiogeneesi faktorid kasvajakoes, eriti vaskulaarse endoteeli kasvufaktor (VEGF), maatriksi metalloproteinaasid (MMP-d) ja VEGF retseptorid kasvavates endoteeli rakkudes (Arbiser et al., 2002).

Nox1 suurendab kasvajate vaskulaarsust ja indutseerib angiogeneesi molekulaarseid markereid, VEGF-i mRNA hulk raku suureneb ja indutseeritakse MMP aktiivsus. Kui võrrelda kasvajaid, mis on põhjustatud *Nox1* ekspresseerivate rakkude poolt, nende kasvajatega, mida põhjustasid *Nox1* mitte-ekspresseerivad rakud, siis esimestes on veresooned kogu kasvajas, teisel juhul ainult kasvaja perifeerias. Kui *Nox1* ekspresseerivates NIH 3T3 rakkudes koekspressseeriti katalaas, siis *Nox1* seotud VEGF ekspressioon langes kontrolli lähedasele tasemele, mis näitab, et H_2O_2 indutseerib VEGF. Kuigi *Nox1* reguleerib MMP, ei vähenenud MMP aktiivsus katalaasi koekspressiooni

korral. Seega on MMP aktivatsioon seotud kas erineva *Nox1*-st lähtuva signaaliga või on aktivatsiooniks vaja madalamal tasemel H_2O_2 , mille tase võib *Nox1* ekspresseerivates rakkudes olla veidi kõrgem kui muidu ka katalaasi koekspressiooni korral (Arbiser et al., 2002).

Kui rakud viibivad lühiajaliselt hüpoksia tingimustes, misjärel hapniku tase normaliseeritakse, siis see kiirendab tubulaarset morfogeneesi. Rakkudes tekivad ROS ja aktiveeritakse NFκB. Mõlemat inhibeerivad ROS-kõrvaldajad (Lelkes et al., 1998). Suuremates kontsentratsioonides H_2O_2 kahjustab endoteeli rakke (Shimizu et al., 1994), kuid väiksemates kontsentratsioonides stimuleerib fibroblastide proliferatsiooni (Burdon et al., 1990). Vähirakkudes toodetakse sageli ROS, seega võib H_2O_2 osaleda angiogeneesi initsieerimises (Szatrowski and Nathan, 1991). Endoteeli rakkudes, mida töödeldi H_2O_2 -ga, leiti et see stimuleerib angiogeneesi (Yasuda et al., 1999). NFκB on seotud H_2O_2 vahendatud signaalidega (Pahl and Baeuerle, 1994). H_2O_2 -indutseeritud angiogeneesi inimese mikrovaskulaarsetes rakkudes blokeeris täielikult NFκB *antisense* oligonukleotiidi lisamine (Shono et al., 1996). Teises uurimuses vähendasid NFκB *antisense* oligonukleotiidid rakkude adhesiooni ning tumorigeensust ja tulemuseks oli tuumori regressioon hiirtel (Higgins et al., 1993; Perez et al., 1994). NFκB ja Akt inhibeerimine vähendab märgatavalt angiogeneesi (Zhu et al., 2001).

Angiogeneesi regulatsioonis on oluline osa kasvufaktoritel, eriti vaskulaarse endoteeli kasvufaktoril (VEGF – *vascular endothelial growth factor*). VEGF-i ekspressiooni reguleerivad mitmed faktorid, nt. adenosiin, cAMP analoogid, $TNF\alpha$, interleukiin 1β (Thomas, 1996; Ferrara and Keyt, 1997; Brown et al., 1997). Tugev H_2O_2 -vahendatud VEGF ekspressioon on näidatud rotist pärinevates endoteeli rakkudes (Chua et al., 1998).

ROS osalevad ka apoptoosi indutseerimises. Surmasignaal antakse rakule läbi signaali kaskaadi, mis viib kaspasid aktivatsioonile. ROS vahendavad apoptoosi lipiidide peroksüdatsiooni ja lipiidsete hüdroperoksiidide tekke kaudu (Kane et al., 1995). ROS rollile apoptoosis viitab see, et SOD või SOD cDNA-d sisaldavad ekspressioonivektorid pärsivad rakkude apoptootilist surma (Greenlund et al., 1995).

1.2.2. Antioksidandid

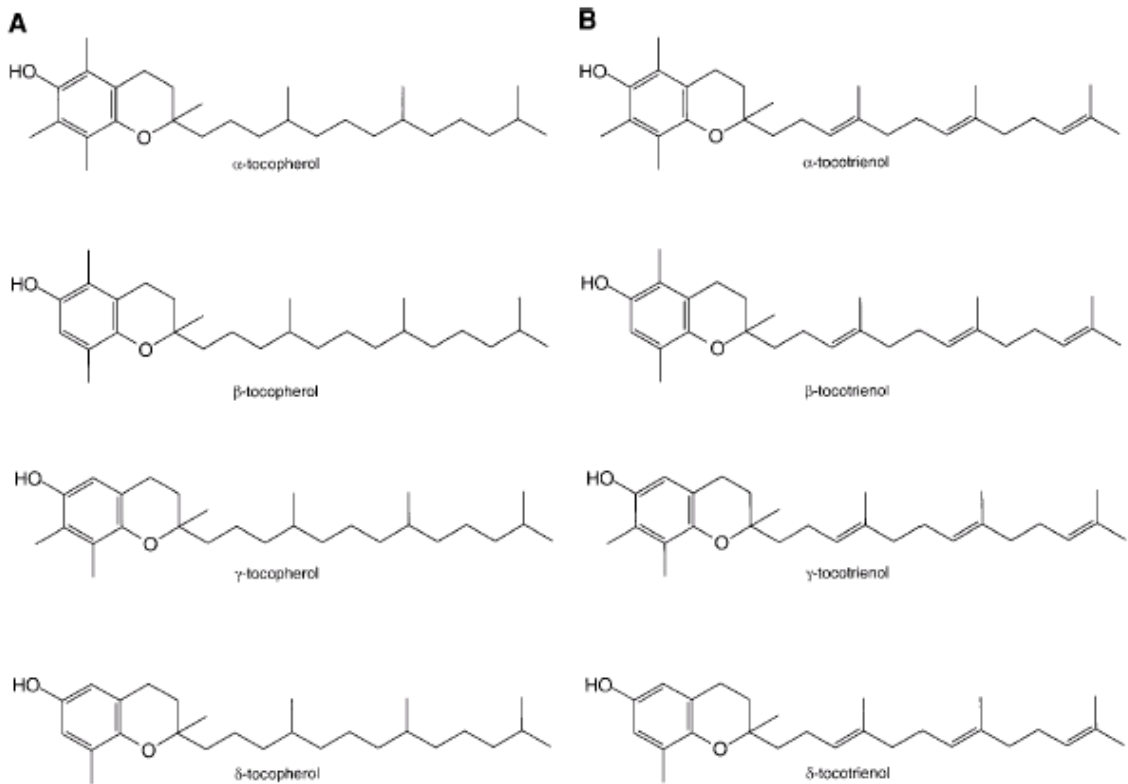
Antioksidandid on ained, mis kõrvaldavad rakus ROS. Selleks on rakus spetsiaalsed ensüümid ja ka madalmolekulaarsed antioksidandid. E-vitamiin on antioksidant, mis kaitseb raku lipiide oksüdeerumise eest.

Primaarsed antioksidantsed ensüümid, mis kaitsevad rakku oksüdatiivse kahjustuse eest, on superoksiidi dismutaas (SOD), katalaas (CAT), glutatioon peroksüdaas (GPx). CuZnSOD ja MnSOD konverteerivad superoksiidradikaali vesinikperoksiidiks. Katalaas ja glutatioon peroksüdaas muudavad H₂O₂ edasi veeks. Kasvajates on SOD ekspressioon sageli muutunud (Kinnula and Crapo, 2004; Zhang et al., 2002). Oluline on tasakaal SOD ning GPx ja/või CAT vahel. Liiga vähe SOD võrreldes GPx ja/või CAT võib viia O₂^{•-} akumulatsioonile, mis on toksiline. Teisest küljest, liiga palju SOD võrreldes GPx ja/või CAT võib põhjustada H₂O₂ kõrge taset rakus. H₂O₂ võidakse konverteerida hüdroksüülradikaaliks (OH[•]) Fentoni reaktsioonis, mida katalüüsivad metallioonid (Fe²⁺, Cu²⁺). OH[•] on väga reaktiivne ja võib tekitada rakus suuri oksüdatiivseid kahjustusi (Zhang et al., 2002).

Imetajatel on leitud vähemalt kolm SOD isovormi. MnSOD (M_r 88,000) on tetrameerne valk, mis lokaliseerub peamiselt mitokondrite maatriksis (Beckman et al., 1993). MnSOD ülesanne on kõrvaldada O₂^{•-}, mida genereerib ühe-elektroni leke elektron-transport-ahelast. CuZnSOD (M_r 32,000) on dimeerne valk, mis lokaliseerub tsütoplasmas (Chang et al., 1988), ja kõrvaldab O₂^{•-}, mis toodetakse endoplasmaatilise retiikulumi (ER) ja nii tsütosooli kui membraansete oksüdaaside poolt. Ekstratsellulaarne SOD (M_r 135,000) on tetrameerne valk, mida leidub ekstratsellulaarses ruumis (Marklund et al., 1982). See võib olla oluline membraan-seotud oksüdaaside toodetud O₂^{•-} kõrvaldamisel.

E vitamiin on rasvas lahustuv antioksidant, mis efektiivselt kaitseb rakke lipiidide peroksüdeerimise eest (Tappel, 1962; Burton and Ingold, 1986; Esterbauer et al., 1991). Vitamiin E on üldine nimetus, mida kasutatakse grupi tokoferoolide ja tokotrienoolide kohta. Looduses on E vitamiini aktiivsus kaheksal ühendil: α-, β-, γ- ja δ-tokoferoolil ning α-, β-, γ- ja δ-tokotrienoolil. Suurim bioloogiline aktiivsus on α-tokoferoolil; seda on looduses ka kõige rohkem. Toimides antioksidandina kantakse E vitamiinilt (α-

tokoferoolilt) H-aatom lipiidsele peroksüülradikaalile, tekivad lipiidne hüdroperoksiid ja α -tokoferoksuülradikaal. Seega kaitseb E vitamiin lipiide oksüdeerumise eest minnes ise oksüdeerunud vormi. Viimane redutseeritakse tagasi E vitamiiniks redutseeritud glutatiooni või C vitamiini poolt, või oksüdeeritakse edasi α -tokoferüülkinooniks. E vitamiini toime rakus sõltub teda taastavate süsteemide olukorrast rakus. E vitamiin võib rakke nii apoptoosi eest kaitsta kui ka ise apoptoosi esile kutsuda (Neuzil et al., 2001; Alleva et al., 2005; Zu and Ip, 2003). E vitamiini perekonda kuuluvatel ühenditel võib olla lipiidide oksüdatsiooni eest kaitsmise kõrval veel teisi bioloogilisi funktsioone, mida ei jaga ülejäänud E vitamiinid. Näiteks γ -tokoferool on tugev nukleofiil, mis kaitseb rakke elektrofiilsete mutageenide eest (Christen et al., 1997). Teatud tingimustes, sõltuvalt kättesaadavatest reaktsioonipartneritest, võib E vitamiin käituda ka pro-oksüdandina (Upston et al., 1999). Samuti on leitud, et E vitamiin osaleb raku signaaliradades. A-tokoferool inhibeerib silelihasrakkude proliferatsiooni (Boscoboinik et al., 1991; Chatelain et al., 1993), vähendab proteiinkinaas C aktiivsust (Boscoboinik et al., 1991), suurendab proteiin fosfataas 2A aktiivsust (Ricciarelli et al., 1998) ja kontrollib α -tropomüosiini geeni ekspressiooni (Azzi et al., 1998). On leitud, et E vitamiin inhibeerib monotsüütides $O_2^{\cdot-}$ tootva NADPH-oksüdaasi formeerumist (Cachia et al., 1998), inhibeerib NF κ B aktivatsiooni (Suzuki and Packer, 1993). E vitamiin võib reguleerida ka rakutsükli, takistades G_1 -S üleminekut, inhibeerides tsükliine ja aktiveerides CDKI-sid (Venkateswaran et al., 2002; Gysin et al., 2002). Tokoferoolid koosnevad kromaanringist ja süsivesiniksabast. Tokotrienoolide struktuur on sarnane tokoferoolidele, kuid neil on sabas kolm küllastumata sidet (Joonis 7.).



Joonis 7. α -, β -, γ - ja δ -tokoferoolide (A) ning α -trienuolide (B) struktuur (Brigelius-Flohe and Traber, 1999).

1.2.3. Superoksiidi dismutaas kui tuumorsupressor

Kui rakkudes üleekspresserida superoksiidi dismutaasi (SOD), siis peaks suurenenud peroksiidide tase rakule toksiline olema. Sageli on antioksidantsete ensüümide tase kasvajakakkudes muutunud. Võrreldes normaalsete rakkudega on transformeerunud rakkudes MnSOD aktiivsus sageli muutunud. Mitut tüüpi vähirakkudes on madal MnSOD ja katalaasi aktiivsus, sageli on madal CuZnSOD aktiivsus ja varieeruv glutatioonperoksüdaasi aktiivsus (Oberley and Buettner, 1979; Oberley and Oberley, 1988). Teistes kasvajates on vastupidi leitud suurenenud SOD-i ekspressioon (Janssen et al., 1999; Janssen et al., 2000; Punnonen et al., 1994). See vastuolu võib tuleneda kasvajate individuaalsetest erinevustest.

Antioksidantsete ensüümide taseme normaliseerimine võiks viia vähemalt osalisele vähiraku fenotüübi taandumisele. Mitmetes katsetes on näidatud, et MnSOD cDNA transfektsioon kasvaja rakkudes supresseerib kasvajatist fenotüüpi (Church et al., 1993; Safford et al., 1994; St. Clair et al., 1997; Yan et al., 1996; Zhong et al., 1996; Zhong et al., 1997; Liu et al., 1997a; Li et al., 1998). Kui H₂O₂ ei kõrvaldata, peaks vähirakud suurema H₂O₂ toksilisuse tõttu. H₂O₂ reageerib rakus mitmete molekulidega, nagu DNA ja valkude sulfhüdrüülgrupid. Täpne mehhanism, kuidas H₂O₂ rakke tapab, on teadmata (Darby Weydert et al., 2003).

Hu grupp (Hu et al., 2005) leidis, et pahaloomulistes munasarja vähi kudedes on MnSOD ekspressiooni tase kõrgem kui normaalsetes kudedes. MnSOD ekspressiooni supresseerimisel tõusis O₂^{•-} tase, mis omakorda stimuleeris proliferatsiooni *in vitro* ning kasvajat agressiivsemat arengut *in vivo*. Kui SKOV3 rakke töödeldi rotenooniga, mis põhjustab O₂^{•-} produktsiooni kasvu rakkudes, siis tõusis rakkudes ka MnSOD ekspressioon. Seega võib suurenenud SOD ekspressioon olla ka raku kaitsemehhanism ROS stressile. Rohkem SOD-i vähendab O₂^{•-} taset ning sellega koos ka ROS poolt stimuleeritud rakkude kasvu. (Hu et al., 2005)

MnSOD leidub peamiselt eukarüootide mitokondrites. MnSOD kodeerib tuumageen. See sünteesitakse tsütosoolis suurema eellasmolekulina, imporditakse mitokondrisse, protsessitakse (Wispe et al., 1989). Inimesel lokaliseerub MnSOD geen 6. kromosoomis piirkonnas 6q25 (Church et al., 1992). Geeniproduct on polüadenüleeritud ja sel esineb alternatiivne splaissing. Splaissingu tulemusena saab ühe suure (4.2 kb) ja kolm väikest (1 kb) MnSOD mRNA-d (Church, 1990). MnSOD indutseerivad oksüdatiivse stressi mediaatorid, TNF, interleukiin 1, lipopolüsahhariidid (Wong and Goeddel, 1988). Samuti indutseeritakse MnSOD raku diferentseerumise ajal (Church et al., 1992; Allen, 1991)

CuZnSOD-i kodeerib inimestel 21. kromosoom. CuZnSOD paikneb piirkonnas 21q22. Downi sündroomiga inimestel on kolm 21. kromosoomi ning on leitud, et suurenenud geenidoosi tõttu on neil tõusnud CuZnSOD aktiivsus (De La Torre et al., 1996). Transgeensetel hiirtel, kellel on üleekspressioon inimese CuZnSOD, olid keelelihase patoloogilised muutused, mis sarnanesid Downi sündroomile iseloomulike patoloogiatega (Groner et al., 1990). Tõenäoliselt on CuZnSOD-i suurenenud aktiivsusel roll Downi sündroomi välja kujunemisel.

CuZnSOD mõjutab samuti kasvajate arengut. Kui CuZnSOD ekspresseerivad U18-9 kasvajakke süstiti hiirtele (*nude mice*), arenesid kasvajakud palju aeglasemalt kui vanemliini puhul. Seega inhibeeris CuZnSOD üleekspressioon tugevalt kasvajakakkude kasvu (Zhang et al., 2002).

Üsna hiljutised uurimised on näidanud, et SOD ekspressioon võib peatada ka rakutsükli G₁ faasis. SOD-ist tulenev O₂^{•-} taseme alanemine aeglustas SPC-A-1 rakkude kasvu ja peatas rakutsükli G₁ faasis. See efekt oli seotud Akt/p27^{kip1} signaalirajaga. Rakkudes defosforüüliti Akt kinaas ning ekspresseeriti p27^{kip1}, mis on tsükliin-sõltuva kinaasi inhibiitor. (Lu et al., 2006)

Oksüdeeritud LDL (*oxidised low-density lipoprotein*) (oxLDL) indutseeris HASMC (*human aortic smooth muscle cell*) rakkude proliferatsiooni. SOD ja CAT üleekspressioon inhibeerisid oxLDL mõju rakkude kasvule. Rakutsükli uurimisel selgus, et rakud kogunesid G₀/G₁ faasi ning kahanes G₂/M faasi rakupopulatsioon. Seega inhibeeris SOD üleminekut G₀/G₁ faasist S faasi (Lin et al., 2006). G₁ faasist edasiminekuks on vaja tsükliin D1/CDK4 ja tsükliin E/CDK2 aktiivsust (Sherr, 1994). Lin *et al.* katsetes selgus et oxLDL üksinda suurendas HASMC rakkudes tsükliin D1/CDK4 ja tsükliin E/CDK2 ekspressiooni, kuid SOD üle-ekspressiooni korral nende tsükliinide ja tsükliin-sõltuvate kinaaside (CDK) ekspressioon langes. Samuti suurenes SOD mõjul p21^{cip1} ja p27^{kip1} ekspressioon (Lin et al., 2006). p21^{cip1} ja p27^{kip1} on CDK inhibiitorid, mis reguleerivad rakkude sisenemist S faasi (Marone et al., 2002).

1.2.4. Aktiivsed hapniku ühendid ja BPV-1 E5

BPV-1 onkovalk E5 aktiveerib PDGF β retseptorit. Kasvufaktorite retseptorite aktivatsioon võib aga viia O₂^{•-} ja peroksiidide taseme muutustele rakus. Üle O₂^{•-} aktiveerib BPV-1 E5 NFκB (Kilk et al., 1996), transkriptsiooni faktori, mis aktiveerib mitmete raku paljunemisega seotud geenide transkriptsiooni. E5 aktiveerib ka arahhidoonhappe metabolismi, mis võib omakorda olla seotud peroksiididega (Väli et al., 2001).

BPV-1 E5 valg mõjutab superoksiidi taset C127 rakkudes (Kilk et al., 2006). BPV-1 E5-e transformeerivad mutandid vähendasid $O_2^{\bullet-}$ taset. Türfostiin 25 lisamine tõstis $O_2^{\bullet-}$ hulga rakkudes kontrolli tasemele. Mittetransformeerivad E5-e mutandid $O_2^{\bullet-}$ taset võrreldes kontrolliga ei muutnud. Seega korreleerus $O_2^{\bullet-}$ taseme muutus BPV-1 E5-e mutantide transformatsiooni võimega. Türfostiin 25 inhibeerib kasvufaktorite (EGF, PDGF) retseptoreid. Sellest tulenevalt võib oletada, et $O_2^{\bullet-}$ taseme muutus võib olla tingitud kasvufaktorite retseptorite aktivatsioonist. E5 ja selle transformeerivad mutandid toimivad läbi kasvufaktorite retseptorite.

Selleks, et kindlaks teha, kas NADPH oksüdaasid on E5-ga transfekteeritud rakkudes aktiivsed, kasutati neopteriini, mis inhibeerib membraanseid NADPH oksüdaase. Neopteriini juuresolekul $O_2^{\bullet-}$ tase langes. Mitte transformeerivate mutantide puhul oli langus väiksem kui transformeerivate E5-e mutantide korral. (Kilk et al., 2006)

Võib öelda, et BPV-1 E5 ja transformeerivad E5-e mutandid muudavad $O_2^{\bullet-}$ taset rakkudes aktiveerides kasvufaktorite retseptorite kaudu NADPH oksüdaase. Võime vähendada superoksiidi taset korreleerus E5 mutantide transformatsioonivõimega. Näib, et transformatsiooni aktiivsus korreleerub $O_2^{\bullet-}$ ära kasutamise võimega. (Kilk et al., 2006)

E5 võib aktiveerida arahhidoonhappe metabolismi (Väli et al., 2001). On teada, et mõned oksügenaasid suudavad kasutada superoksiidi substraadina (Hirata and Hayaishi, 1975). AA metabolismi inhibiitorite lisamine blokeeris E5 ja selle transformeerivate mutantide toime $O_2^{\bullet-}$ tasemele. Seega võivad lipoksügenaas ja tsüklooksügenaas osaleda $O_2^{\bullet-}$ kasutamises transformatsiooni protsessis (Kilk et al., 2006).

Meie uurimisgrupi seni avaldamata tulemused (Karo, 2005) näitavad, et BPV-1 täisgenoomiga ja E5 hüpertransformeerivate mutantidega (17S, 17E) rakkude transformatsioonis on olulised $O_2^{\bullet-}$ ja lipiidised peroksüülradikaalid, sest nii CuZnSOD kui ka E vitamiin pärsivad fookuste teket. Seega alandavad antioksidandid BPV-1 ja E5-e mutantide transformeerivat toimet. Mehhanismid, kuidas tsütosoolis töötav CuZnSOD ja membraanides asuv E vitamiin rakkude transformatsiooni takistavad, pole selged ja vajavad edasist uurimist.

1.3. Töö eesmärk

Arvestades kirjanduses olevaid andmeid aktiivsete hapnikuühendite osast rakkude transformatsioonile tekkis küsimus, kuidas on olukord selles osas BPV-1-ga rakkude transformeerimisel. BPV transformatsiooni uurimise mudeliks on hiire fibroblastid C127. Antud töö eesmärgiks oligi uurida aktiivsete hapnikuühendite osa rakkude transformatsioonil BPV-1 täisgenoomiga, onkovalgu E5 ja tema mutandi 17S DNA-ga. Mutant 17S valiti kui kõrge transformatsiooni võimega ja võib-olla ka mitmeid erinevaid teid aktiveeriv mutant. Miks pärsivad antioksidandid CuZnSOD ja E vitamiin BPV transformatsiooni võimet? Kuidas mõjutavad antioksidandid transformeerunud rakkude kasvu? Kuidas muutub rakkudes peroksiidide tase?

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Materjalid ja meetodid

2.1.1. Rakkude kasvatamine

Töös kasutati hiire fibroblastide rakuliini C127 (*Mouse Mammary Fibroblast Tumour Cells*). Rakke kasvatati IMDM (*Isocove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes (Gibco), millele oli lisatud 10% veise looteserumit ja streptomütsiini (0.1 mg/ml) ning penitsilliini (100 ühikut/ml) (Gibco). Rakke kasvatati temperatuuril 37°C 5% CO₂ juuresolekul 60 mm või 100 mm diameetriga plaatidel või 24- ja 96-auguga plaatidel.

2.1.2. Rakkude transfekeerimine

Plasmiidne DNA viidi C127 rakkudesse elektroporatsiooni teel. Rakud pesti PBS-ga (*Phosphate Buffered Saline*), trüpsiiniga koekultuuri plaadi pealt lahti 0.25% trüpsiiniga (Gibco) ja koguti. Tagamaks neutraalset pH-d elektroporatsiooniküvetis, lisati 250 µl söötmele BesNa (N,N-bis-[2-hüdroksüetüül]-2-aminoetaan sulfoonhape) lõppkontsentratsioonini 5 mM. Elektroporatsioon C127 rakkudega viidi läbi järgmistel tingimustel: 220 V, 975 µF, toatemperatuuril. Kasutati "Bio-Rad Gene Pulser II" elektroporaatorit. BPV-1 täigenoom viidi rakkudesse lineariseeritult, pCG plasmiidid rõngasmolekulina.

2.1.3. Plasmiidid

Rakuliinide tegemiseks kasutati BPV-1 DNA-d, BPV-1 *wt* E5-t ja E5 mutanti 17S (saadud Dr. D. DiMaio käest, *Yale University*, USA). *Wt* E5, 17S ja töös kasutatud

CuZnSOD olid klonereeritud plasmidi pCG. See on eukarüootne ekspressioonivektor, mis replitseerub nii prokarüootides kui ka eukrüootides. Vektor sisaldab CMV promootorit, mille kontrolli all on *wt* E5, 17S või CuZnSOD, ja ampitsilliini resistentsuse geen, et vektorit oleks võimalik bakteris paljundada. BPV-1 genoom oli klonereeritud plasmidi MLB 401. See plasmid sisaldab lisaks BPV-1 genoomile veel plasmidi ML2, mis on üks pBR322 derivaate, BPV-1 DNA lõigati sealt enne poratsiooni välja *Bam*HI-ga. Plasmide paljundati *E. coli* tüves DH5 α . Seleksiooniks kasutati ampitsilliini sisaldavaid LB plaate ja söödet. Plasmidne DNA eraldati “*Eppendorf Perfectprep Plasmid Midi*” kitiga vastavalt tootja juhendile ja DNA kontsentratsioon mõõdeti “*Ultrospec 3100 pro UV/Visible*” spektrofotomeetriga.

2.1.4. Transformeerunud rakuliinide tegemine

C127 rakke transfekeeriti 50 ng BPV-1 DNA-d, 250 ng *wt* E5, ja 250 ng 17S ekspresseeriva plasmidiga. BPV-1 täisgenoomi sisaldav plasmid MLB 401 lõigati kõigepealt *Bam*HI ensüümiga lineaarseks ja seejärel kasutati seda C127 rakkude transfekeerimiseks. Lõikamise produkt puhastati kasutades “*PCR Product Purification Spin Kit/250*”. Peale elektroporeerimist külvati rakud 60 mm diameetriga plaatidele. Rakke kasvatati umbes kuu aega, fookuste tekkimiseni, vahetades söödet kaks korda nädalas. Fookustest võeti pipetiotsaga rakke ja külvati 96-auguga plaadile (rakud + 100 μ l söödet/auku). Rakke kasvatati augus konfluentsuseni ja külvati siis 35 mm diameetriga plaatidele ning sealt edasi 60 mm ja 100 mm diameetriga plaatidele. Saadud rakuliine kasvatati edaspidi nagu eelnevalt kirjeldatud.

2.1.5. Transformeerunud rakuliinide kontrollimine E5 DNA olemasolu suhtes

Rakke kasvatati 100 mm plaatidel 50-70% konfluentsuseni. Seejärel rakud pesti PBS-ga, trüpsiiniga, koguti 15 ml tuubi ja tsentrifuugiti 5 min 1000 pööret/min. Supernatant aspireeriti. Sademest võeti pipetiotsaga rakke ja resuspendeeriti 5 μ l deioniseeritud vees

500 µl mahuga PCR tuubides. PCR segu lõppmaht oli 30 µl. PCR segu koostis: 10.7 µl H₂O, 3 µl 10x puhver, 3 µl BSA (1 mg/ml), 1.2 µl 25 mM MgCl₂, 3 µl 2 mM dNTP, 2 µl E5 5' praimer (90 ng/µl), 2 µl E5 3' praimer (90 ng/µl), 0.1 µl Taq polümeraas (5 ühikut/µl). PCR segu segati kokku jääl. PCR reaktsioon viidi läbi "ependorff Mastercycler" PCR masinas. E5 DNA amplifitseerimiseks kasutatud PCR tsükkel: 95°C 5 min, 94°C 30 s, 42°C 30 s, 72°C 30 s, korrata 94°C - 42°C - 72°C tsüklit 35 korda, 72°C 10 min. PCR produktid analüüsiti elektroforeesil 2% agarosgeelis 1xTBE-s, millele oli lisatud etiidiumbromiidi. Geel pildistati UV valguses.

2.1.6. Transformeerunud rakuliinide kontrollimine E5 valgu olemasolu suhtes

E5 valk eraldati rakkudest immunopretsipitatsiooniga. Rakke kasvatati 100 mm plaatidel 50-70% konfluentsuseni. Pesti PBS-ga ja kasutati 2 ml PBS/3 mM EDTA-t plaadi kohta rakkude kogumiseks 15 ml tuubi. Rakud tsentrifugeeriti 5 min 1000 pööret/min, pesti 5 ml PBS-ga ja tsentrifugeeriti veelkord. Supernatant aspireeriti ning rakud resuspendeeriti 200 µl RIPA – SDS 150 mM NaCl puhvris. Lisati 10 µl 10% SDS (lõppkonts. 0.5%). Lisati 800 µl RIPA – SDS 150 mM NaCl puhvrit (SDS lõppkonts. 0.1%). Rakud sonikeeriti Bandelin "SONOPULS" sonikaatoriga. Peale sonikeerimist rakus tsentrifugeeriti 15 min 13000 pööret/min 4°C juures. Supernatant tõsteti puhtasse 1.5 ml tuubi. Lisati 2 µl E5 vastast küüliku polükloonaalset antikeha ja inkubeeriti loksutades 1 h 4°C juures. Seejärel lisati 25 µl *Protein G Sepharose*'i ja inkubeeriti veel 1h 4°C juures, loksutades. Peale inkubeerimist tsentrifugeeriti 1 min 1000 pööret/min. Sadet pesti kolm korda RIPA – SDS 150 mM NaCl puhvriga, kaks korda RIPA – SDS 0.5 M NaCl puhvriga ja veel kolm korda RIPA – SDS 150 mM NaCl puhvriga, iga pesu vahel tsentrifugeerides 1 min 1000 pööret/min. Lõpuks resuspendeeriti sade 40 µl 2xLaemmli puhvris, millele oli lisatud DTT (1 ml 2xLaemmli puhvri kohta 100 µl 1 M DTT-d). Enne foreesi kuumutati proove 10 min 100°C juures.

Proovid kanti 15% SDS-polüakrüülamiidgeelile. Elektroforees tehti "Hoefler" foreesiaparaadis 1xSDS jooksupuhvris. Esimesed 20 min toimus forees 70 V juures,

edasi umbes 1h 120 V juures. Valgud kanti geelist PVDF membraanile ülekandemasinas tingimustel 15 V, 15 min. Membraani blokiti üleöö blokilahuses [5% lõss/PBS–0.05% Tween20]. Järgmisel päeval loksutati membraani 10 min samas blokilahuses. Seejärel inkubeeriti membraani E5 vastase küüliku polükloonaalse antikehaga [1:1000 lahjendus, 10 ml 1% lõss/PBS–0.05% Tween20 + 10 µl E5 antikeha] 1 h toatemperatuuril loksutades. Peale inkubeerimist E5 antikehaga pesti membraani toatemperatuuril loksutades kolm korda 10 min Western'i pesulahusega [50 ml 1 M Tris pH 7.5, 30 ml 5 M NaCl, 1 ml Tween20, H₂O 1000 ml-ni]. Seejärel inkubeeriti membraani sekundaarse antikehaga (*anti-rabbit*, peroksüdaasiga konjugeeritud) [1:10000 lahjendus, 10 ml 1% lõss/PBS–0.05% Tween20 + 1 µl antikeha] 1 h toatemperatuuril loksutades. Sekundaarse antikehaga inkubeerimise järel pesti membraani Western'i pesulahusega kolm korda 10 min toatemperatuuril loksutades.

Membraan nõrutati kuivaks ja sellele pipeteeriti 1 ml “*Enhanced Chemiluminescence Kit*” 1:1 kokkusegatud lahused I ja II. Kokkusegatud lahust hoiti membraanil 1 min. Seejärel keerati membraan kilesse ja pandi ECL kassetti ning eksponeeriti filmile.

2.1.7. Rakkude kasvu analüüsimine

C127 rakke ja transformeerunud rakuliine kasvatati 100mm plaatidel 50-70% konfluentsuseni. Seejärel rakud pesti PBS-ga, trüpsiiniga ja koguti 15 ml tuubi. Rakud loendati kasutades Bürkeri rakuloendamiskambrit Nikon TMS mikroskoobiga. Soovitav arv rakke külvati 24-auguga plaadile (300 µl/ auku). 24 h, 48 h ja 72 h pärast loendati rakkude arv ning Excel programmiga tehti kasvukõverate graafikud. Rakke külvati plaatidele erinevates kogustes, et näha kas eksponentsiaalses kasvufaasis ja konfluentsuse tingimustes on antioksidantidel erinev või samasugune mõju rakkude kasvule. Rakke mõjutati erinevate antioksidantidega, E vitamiiniga ja CuZnSOD-ga.

E vitamini mõju uurimiseks lisati söötmesse E vitamini (d- α -tokoferoolatsetaat, Sigma) lõppkontsentratsiooniga 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M ja 400 μ M. Rakud loendati taas 24 h, 48 h ja 72 h järel. Külvati 2.5×10^4 või 3.5×10^4 rakku.

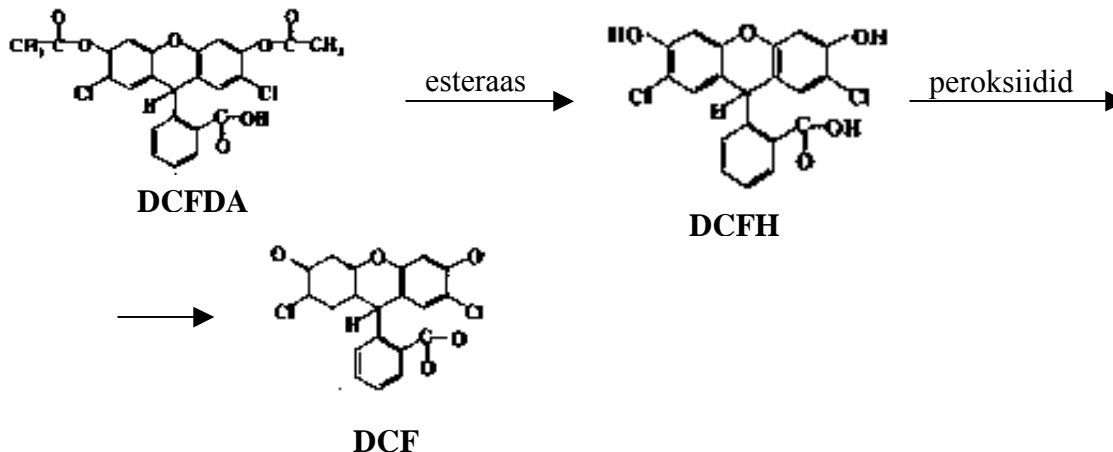
CuZnSOD toime uurimiseks elektroporeeriti rakke erineva koguse CuZnSOD ekspresseeriva plasmiidiga (50 ng, 100ng ja 500 ng pCGCuZnSOD). Rakkude arv loeti jällegi 24 h, 48 h ja 72 h ajapunktidel. Algselt võeti rakke poreerimiseks 3×10^4 või 8×10^4 .

Antioksidantide mõju väljendati kui rakkude arvu muutus võrreldes kontrolliga, mis võeti 100%-ks. Inhibitsiooni protsent väljendab seda, mitu protsenti antud katses antioksidant rakkude paljunemist pärssis kontrolliga võrreldes (kontroll 0%).

2.1.8. Peroksiidide taseme mõõtmine TECAN “Genios Plus” plaadilugejaga

C127 rakke ja transformeerunud rakuliine kasvatati 100mm plaatidel 50-70% konfluentsuseni. Rakud pesti PBS-ga, trüpsiiniga ja koguti 15 ml tuubi. Rakud loendati ning külvati 2×10^4 või 6×10^4 rakku 96-auguga plaadile auku (100 μ l/auku). 24 h või 72 h pärast mõõdeti peroksiidide tase. Selleks lisati rakkudele DCFDA-d (Serva) lõppkontsentratsiooniga 20 μ M ja inkubeeriti 30 min pimedas 37°C juures. Peale inkubeerimist DCFDA-ga mõõdeti fluorestsentsi intensiivsus otse mikrotiiterplaadil TECAN “Genios Plus” fluorimeetriga, eksitatsiooni lainepikkus 485nm, emissiooni lainepikkus 535nm (Rosenkranz et al., 1992) (Wan et al., 1993).

Diklorofluorestsüandiidatsetaat (DCFDA) on mittefluorestseeruv ühend, mis võib vabalt rakkudesse siseneda. Rakkudes hüdrolyüsitskse DCFDA esteraasi poolt ja tekib mittefluorestseeruv diklorodihüdrofluorestsüin (DCFH). H_2O_2 ja teiste peroksiidide toimel oksüdeerub diklorodihüdrofluorestsüin diklorofluorestsüiniks (DCF), mis fluorestseerub (Boissy et al., 1989). (Joonis 8.).



Joonis 8. DCFDA tööpõhimõte. Diklorofluorestsindiatsetaat (DCFDA) on mittefluorestseeruv ühend, mis pääseb läbi raku membraanist. Raku esteraasid lõikavad seda kahe ester-sideme juurest, tekib suhteliselt polaarne ja raku membraani mitte-läbiv ühend, diklorodihüdrofluoretsiin (DCFH). See mitte-fluorestseeruv ühend akumulereerub raku ning kui see oksüdeeritakse, näiteks H_2O_2 poolt, tekib fluorestseeruv diklorofluoretsiin (DCF).

Peroksiidide taset mõõdeti ka lühiajalises katses, peale C127 rakkude transfektoerimist BPV-1 või E5 DNA-ga. C127 rakke kasvatati 100 mm plaadil 50-70% konfluentsuseni. Rakud koguti ning transfektoeriti 100 ng BPV-1 *wt* E5 või E5 mutanti 17S ekspresseerivate plasmiididega. Peale transfektoerimist külvati rakud 96-auguga mikrotiiterplaadile, 100 μ l/auku, mis sisaldas *ca* 1.6×10^4 raku. Seejärel kasvatati rakke mikrotiiterplaadil 24 h 37°C 5% CO_2 juures. 24 h pärast lisati mikrotiiterplaadi aukudesse DCFDA, lõppkontsentratsioonini 20 μ M ja inkubeeriti 30 min pimedas 37°C juures. Peale inkubeerimist mõõdeti TECAN fluorimeetriga DCF fluorestsents otse 96-auguga plaadil.

2.1.9. Rakutsükli analüüsimine voolutsütomeetriga “FACS Calibur”

Uuriti E vitamiini ja CuZnSOD mõju rakutsüklile. C127 rakke ja transformeerunud rakuliine kasvatati 100 mm plaatidel 50-70% konfluentsuseni. E vitamiini toime uurimiseks rakud trüpsiiniga 2 ml 0.25% trüpsiiniga. Rakususpensioon jagati kaheks ning

külvati uutele 100 mm plaatidele, lisades või mitte lisades söötmle E vitamiini lõppkontsentratsiooniga 400 μM . CuZnSOD toime uurimiseks rakud koguti ja transfekteriti niisama või 500 ng CuZnSOD ekspresseeriva plasmiidiga ja külvati 100 mm plaatidele.

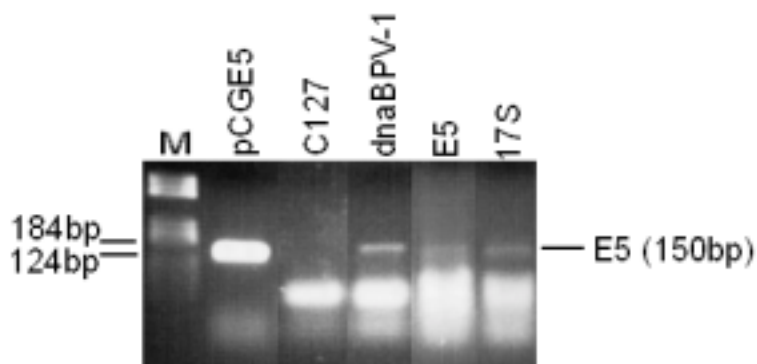
Rakke kasvatati 48 h ning seejärel rakud trüpsiiniti ja koguti 15 ml tuubi (ka sööde plaatidelt koguti). Rakususpensioon tsentrifugeeriti 5 min 1000 pööret/min eppendorfi "5810 R" tsentrifugeeriga. Supernatant aspireeriti ja sade resuspendeeriti 50 μl 1xPBS-s. Pidevalt *vortex*'ides lisati tilkhaaval 150 μl jääkülma 96% etanooli ja hoiti üleöö 4°C juures. Järgmisel päeval pesti PBS-ga, st. lisati 3 ml PBS ja tsentrifugeeriti 5 min 1000 pööret/min. Supernatant aspireeriti ja sade resuspendeeriti 0.5 ml PBS/1 M MgCl_2 -s, millele oli lisatud RNAasA-d (lõppkontsentratsioon 100 $\mu\text{g/ml}$). Hoiti 1 h 37°C juures ning pesti PBS-ga. Peale tsentrifugeerimist resuspendeeriti rakud 0.5 ml PBS-s, millele oli lisatud propiidiinjodiidi (PI) lõppkontsentratsiooniga 20 $\mu\text{g/ml}$. Rakke hoiti 10 min jääl ja seejärel mõõdeti PI fluorestsentsi vooltsütomeetriga "FACS Calibur". Mõõtmiseks kasutati programmi "CellQuest". PI fluorestseerub oranžilt, seega mõõdeti FL2-A aknas.

PI läheb rakkudesse ja seostub DNA-ga. Fluorestsentsi tugevus sõltub seega DNA hulgast rakkudes. G_2/M faasis olevates rakkudes on kaks korda rohkem DNA-d kui G_0/G_1 faasis olevates rakkudes ning S faasis olevates rakkudes on vahepealne kogus DNA-d.

2.2. Tulemused

2.2.1. E5 DNA olemasolu ja valgu ekspressioon transformeerunud rakuliinides

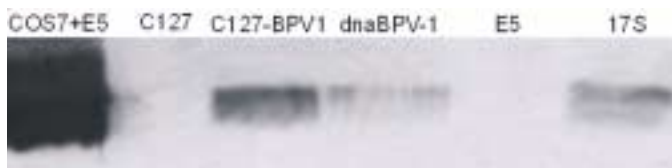
C127 rakke transformeeriti nagu eelpool kirjeldatud 50 ng BPV-1 täisgenoomi, 250 ng BPV-1 *wt* onkovalku E5 ja 250 ng mutantset onkovalku 17S ekspresseerivate plasmiididega. Saadud rakuliine nimetati vastavalt dnaBPV-1, E5 ja 17S. Neid transformeerunud rakuliine kontrolliti kõigepealt E5 DNA olemasolu suhtes. Erinevate rakuliinide rakkudest amplifitseeriti PCR-ga E5 DNA. Positiivseks kontrolliks oli pCGE5 plasmiid ning negatiivseks kontrolliks transformeerimata C127 rakud. PCR produktid analüüsiti geel-elektroforeesil. Nagu jooniselt 9 näha, on E5 DNA olemas BPV-1 DNA-ga transformeerunud rakuliinis, *wt* E5-ga transformeerunud rakuliinis ning 17S-ga transformeerunud rakuliinis.



Joonis 9. E5 DNA olemasolu transformeerunud rakuliinides. M - marker; pCGE5 - plasmiid, mis on positiivne kontroll; C127 – transformeerumata rakud, mis on negatiivne kontroll; dnaBPV-1 - BPV-1 täisgenoomi sisaldava plasmiidiga transformeerunud rakuliin; E5 - *wt* E5 ekspresseeriva plasmiidiga transformeerunud rakuliin; 17S - 17S ekspresseeriva plasmiidiga transformeerunud rakuliin.

dnaBPV-1, E5 ja 17S rakuliine kontrolliti ka E5 valgu ekspresseerumise suhtes. Selleks rakud koguti, lüüsi, E5 valk sadestati antikehadega ning immuno-sadestatud valgud analüüsiti *Western blot* meetodil. Positiivseks kontrolliks olid 300 ng *wt* E5 ekspresseeriva plasmiidiga transfekteeeritud COS7 rakud, kus pCG plasmiidilt E5 valku tugevalt ekspresseerub. COS7 rakke elektroporeeriti tingimustel 180 V, 975 μ F.

Negatiivseks kontrolliks olid C127 rakud. Teise positiivse kontrollina kasutasin BPV-1-ga transformeerunud rakuliini, mille kohta on teada, et see sisaldab episoomina mitu koopiat BPV-1 genoomi (Kurg et al., 2005). E5 ekspresseeriva plasmiidiga transfekteeritud COS7 rakkudes ekspresseerub E5 valk väga tugevalt. COS7 rakud ekspresseerivad konstitutiivselt SV40 suurt T-antigeeni. Kuna pCG plasmiid sisaldab suure T *ori*, replitseerub plasmiid COS rakkudes ja E5 valgu ekspressiooni tase kõrge. C127 rakkudes on E5 valgu ekspressioon oluliselt madalam nii pCG vektorilt kui ka BPV genoomilt, kuid dnaBPV-1 ja 17S rakuliinides on näha E5 valgu ekspressioon, aga E5 rakuliinis seda ei detekteeritud. E5 DNA selles rakuliinis on, kuigi nõrga triibuna nähtav (joonis 9.) ja rakud paljunesid kiiremini kui C127 rakud (joonis 11.), seega tõenäoliselt E5 valk ikkagi ekspresseerub, kuigi detekteerida seda ei õnnestunud. (Joonis 10).

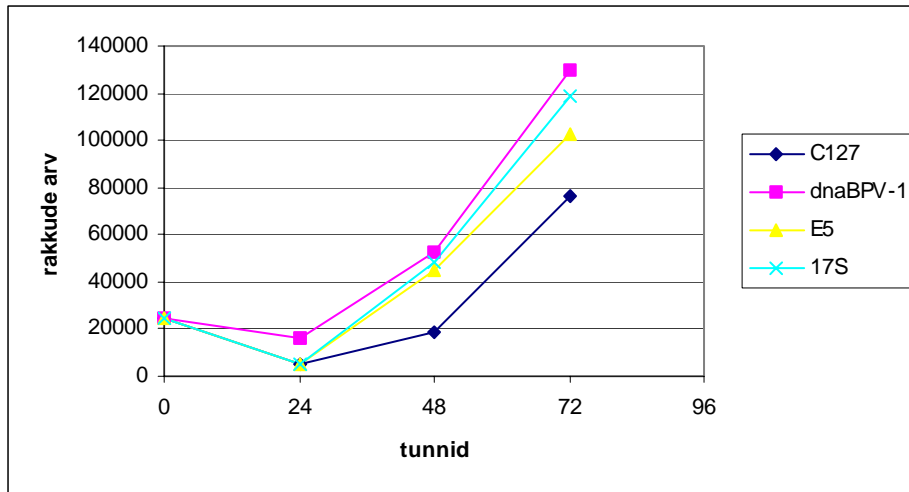


Joonis 10. E5 valgu ekspressioon transformeerunud rakuliinides. COS7+E5 – 300 ng pCGE5 plasmiidiga transfekteeritud COS7 rakud, positiivne kontroll; C127 – transformeerimata rakud, negatiivne kontroll; C127-BPV1 – meie laborist saadud BPV-1 DNA-ga transformeerunud rakuliin, mis sisaldab episoomina mitu koopiat BPV-1, teine positiivne kontroll; dnaBPV-1 – enda tehtud BPV-1 täisgenoomi sisaldav transformeerunud rakuliin; E5 – *wt* E5 ekspresseeriva plasmiidiga tehtud transformeerunud rakuliin; 17S – E5 valgu mutanti 17S ekspresseeriva plasmiidiga tehtud transformeerunud rakuliin.

2.2.2. Transformeerunud rakuliinide kasv

Omavahel võrreldi C127 rakkude ja transformeerunud rakuliinide kasvu. Kõiki rakuliine külvati võrdne arv rakke (2.5×10^4 rakku/auku) 24-auguga plaadile. Rakkude arv loendati kolmel järgneval päeval (24 h, 48 h ja 72 h ajapunktid) Bürkeri rakuloendamiskambriga ning Exel programmiga koostati kasvukõverate graafikud. Tüüpilised kasvukõverad on ära toodud joonisel 11. Transformeerunud rakuliinid

paljunevad kiiremini kui C127 rakud. 72 h ajapunktis oli C127 rakke keskmiselt 8×10^4 , kuid transformeerunud rakuliinide rakke $1,1 \times 10^5$.



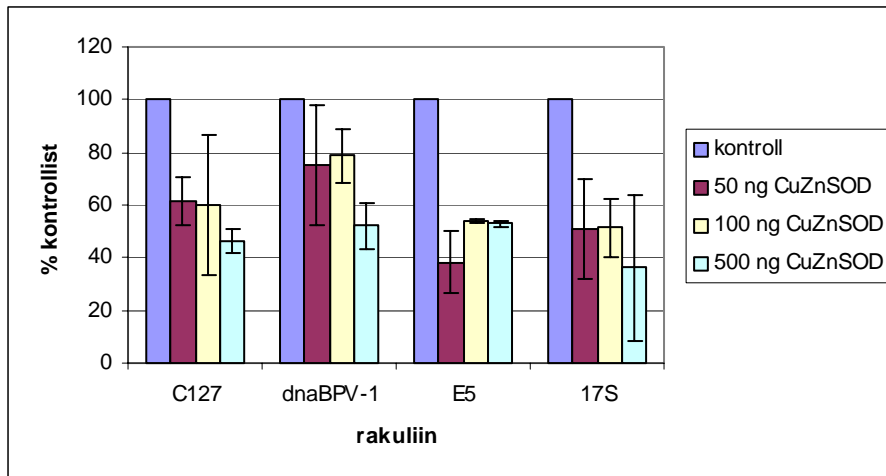
Joonis 11. C127 rakkude ja transformeerunud rakuliinide (dnaBPV-1, E5, 17S) kasv. Esimesel päeval rakud külvati, $2,5 \times 10^4$ rakku/auku 24-auguga plaadile. Kolmel järgneval päeval (24 h, 48 h ja 72 h pärast) rakud koguti ja loendati.

2.2.3. CuZnSOD mõju rakkude paljunemisele

E5 valgu toimel võib transformeerunud rakuliinides suurenda ROS tase, mis võib käivitada kasvu soodustava signaaliraja. Aktiivsete hapnikuühendite rolli uurimiseks transformeerunud rakuliinide kiiremas proliferatsioonis mõjutati dnaBPV-1, E5 ja 17S rakuliine antioksidantidega, nimelt CuZnSOD-i ja E vitamiiniga.

C127 rakke ja transformeerunud rakuliine transfekteeriti 50 ng, 100 ng ja 500 ng CuZnSOD ekspresseeriva plasmiidiga. Peale elektroporatsiooni külvati rakud 24-auguga plaadile. Erinevaid rakuliine võeti elektroporatsiooniks võrdne arv, 3×10^4 rakku augu kohta. Rakkude arv loendati 24 h, 48 h ja 72 h pärast. Erineva kogusega CuZnSOD ekspresseeriva plasmiidiga elektroporeeritud rakkude kasvu võrreldi niisama elektroporeeritud rakkude kasvuga (kontroll). CuZnSOD ekspresseeriva plasmiidiga transfekteerimine pärssis rakkude paljunemist. Kõige suuremad erinevused rakkude arvus olid kolmandal päeval (72 h pärast), seega kasutati just seda ajapunkti, et arvutada, kui

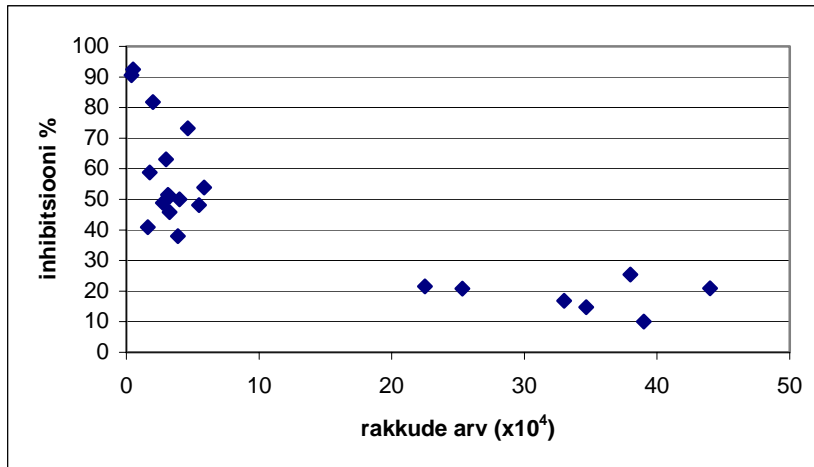
palju pärssib CuZnSOD paljunemist (joonis 12.). 50 ng ja 100 ng pCGCuZnSOD mõjul moodustas C127 rakkude arv vastavalt 61% ja 60% kontrollist, 500 ng pCGCuZnSOD mõjul 46% kontrollist. Transformeerunud dnaBPV-1 rakuliin kasvas 50 ng ja 100 ng pCGCuZnSOD-ga transfekteerituna vastavalt 75% ja 78%-ni kontrollist, 500 ng pCGCuZnSOD-ga transfekteeritult 52%-ni kontrollist. E5 rakuliin kasvas 50 ng pCGCuZnSOD mõjul 38%-ni kontrollist ning 100 ng ja 500 ng pCGCuZnSOD mõjul vastavalt 54% ja 53%-ni kontrollist. 17S rakuliinile mõjus pCGCuZnSOD kõige enam, 50 ng ja 100 ng toimetel kasvasid rakud 51%-ni ja 500 ng pCGCuZnSOD toimetel 36%-ni kontrollist. Kõige rohkem pärssis kõigi rakuliinide kasvu 500 ng pCGCuZnSOD-ga transfekteerimine.



Joonis 12. CuZnSOD mõju rakkude paljunemisele. Rakke elektroporeeriti ilma (kontroll) või koos erineva koguse (50 ng, 100 ng, 500 ng) CuZnSOD ekspresseeriva plasmiidiga. 72 h pärast arutati kuivõrd erinev on CuZnSOD-ga mõjutatud rakkude paljunemine võrreldes mõjutamata rakkudega. Joonisel on kolme katse keskmine.

Selleks, et kindlaks teha, kas SOD kasvu pärssiv toime on sõltuv rakkude tihedusest plaadil, külvati võrdluseks 24-auguga plaatidele 8×10^4 rakku. Kuna eksponentsiaalselt kasvavatele rakkudele mõjus kõige rohkem pärssivalt 500 ng pCGCuZnSOD-ga transfekteerimine, kasutati sama plasmiidikogust. 72 h pärast loendatud rakkude arvu järgi arutati kasvu inhibeerimise protsent CuZnSOD-ga transfekteeritud rakkudes. Hõredamatel plaatidel, kui rakud on eksponentsiaalses kasvu faasis, oli CuZnSOD kasvu

inhibeeriv toime suurem: ulatudes 38%-st kuni 92%-ni, enamasti jäädes 40-60% piiresse. Samal ajal kui tihedamatel plaatidel ulatus inhibeerimine ainult 10-25%-ni. Joonisel 13 on kokku võetud SOD inhibeeriv toime rakkude kasvule ja selle sõltuvus rakkude arvust plaadil. Nagu näha, inhibeerib Cu/ZnSOD eelkõige aktiivselt paljunevaid rakke, kus kontakt-inhibitsioon veel rakkude kasvu ei pidurda (joonis 13.).

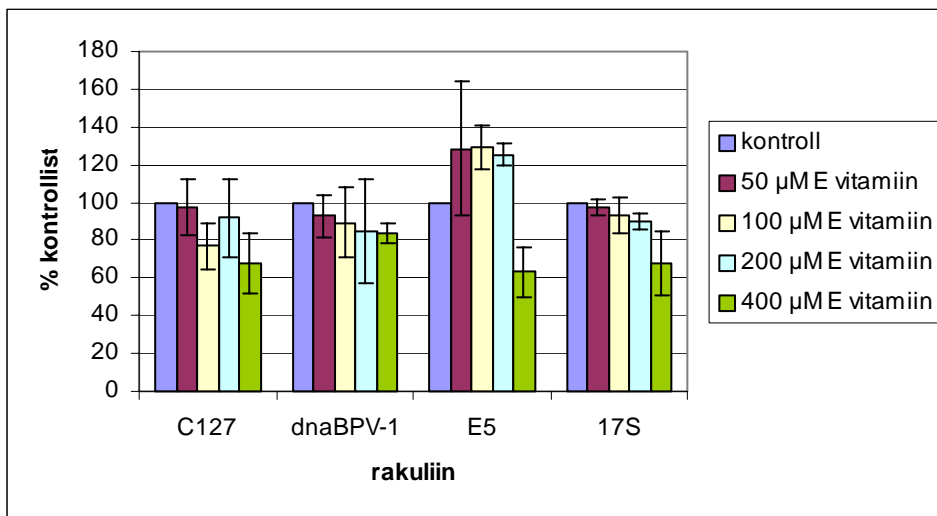


Joonis 13. CuZnSOD kasvu inhibeeriv mõju sõltuvalt rakkude arvust. Inhibitsiooni % arvutamisel arvestati, et CuZnSOD-ga mõjutamata rakkude inhibitsiooni % on 0. SOD-i paljunemist pärssiva toime suuruse järgi arvutati inhibitsiooni %.

2.2.4. E vitamiini mõju rakkude paljunemisele

C127 rakke ja transformeerunud rakuliine (dnaBPV-1, E5, 17S) külvati 24-auguga plaatidele võrdne arv (2.5×10^4 rakku/auku) ning söötmesse ei lisatud või lisati erinev kogus E vitamiini (d- α -tokoferoolatsetaat), lõppkontsentratsiooniga 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M. Rakud loendati 24 h, 48 h ja 72 h pärast. Suurim oli rakkude arvu erinevus kolmandal päeval 72 h pärast. Sellepärast arvutati E vitamiini mõju 72 h ajapunkti rakkude arvu järgi. 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M E vitamiini lisamine söötmesse pärssis C127 rakkude kasvu vastavalt 97%, 77%, 91% ja 68%-ni kontrollist. dnaBPV-1 rakuliinile mõjus E vitamiin kõige vähem, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M E vitamiin inhibeerisid kasvu vastavalt 93%, 89%, 84% ja 82%-ni kontrollist. E5 rakuliini paljunemisele toimisid väiksemad E vitamiini kogused isegi stimuleerivalt. 50 μ M, 100

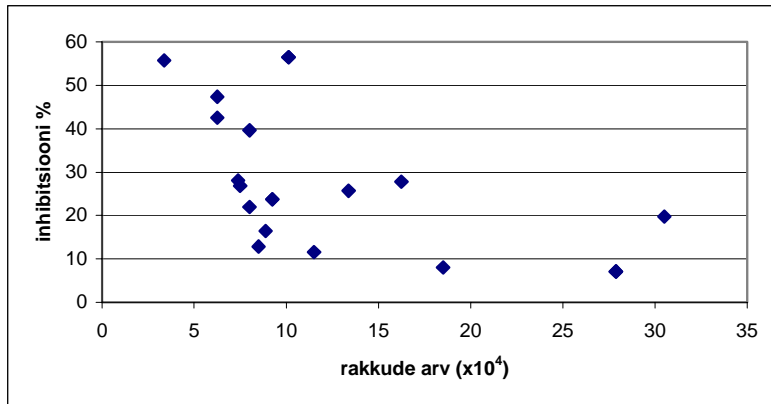
μM , 200 μM E vitamiin suurendasid rakkude arvu võrreldes kontrolliga vastavalt 128%, 128% ja 125%ni. 400 μM E vitamiin mõjus E5 rakuliini paljunemisele siiski inhibeerivalt, rakkude arv oli 63% kontrollist. 17S rakuliini paljunemisele 50 μM , 100 μM , 200 μM E vitamiin praktiliselt mõju ei avaldanud, rakkude arv oli vastavalt 97%, 93% ja 90% kontrolliga võrreldes. 400 μM E vitamiin pärssis 17S rakuliini paljunemist 67%-ni kontrollist. Kõige enam pärssis rakkude kasvu 400 μM E vitamiin, kuid väiksemad kogused inhibeerisid kasvu väga vähe või isegi soodustasid (E5 rakuliini). (Joonis 14.).



Joonis 14. E vitamiini mõju rakkude paljunemisele. 24-auguga plaadile külvati 2.5×10^4 rakku/auku. Söötmesse ei lisatud (kontroll) või lisati E vitamiini lõppkontsentratsioonini 50 μM , 100 μM , 200 μM ja 400 μM . 72 h pärast arvutati kuivõrd erinev on E vitamiiniga mõjutatud rakkude paljunemine võrreldes mõjutamata rakkudega. Joonisel on kolme katse keskmine.

E vitamiini mõju uurimiseks erineva rakutiheduse juures külvati 24-auguga plaatidele 3.5×10^4 rakku/auku ning ei lisatud või lisati E vitamiini lõppkontsentratsioonini 400 μM . Rakud loendati kolmel järgneval päeval. Suurim erinevus rakkude arvus oli 72 h pärast, seega kasutati neid arve E vitamiini kasvu pärssiva toime võrdlemiseks (joonis 15.). Nagu CuZnSOD-i, nii ka E vitamiini inhibeeriv

toime oli suurem aktiivselt jagunevatele rakkudele. Rakkude tiheduse kasvades plaadil muutus E vitamiini kasvu pärssiv mõju nõrgemaks.

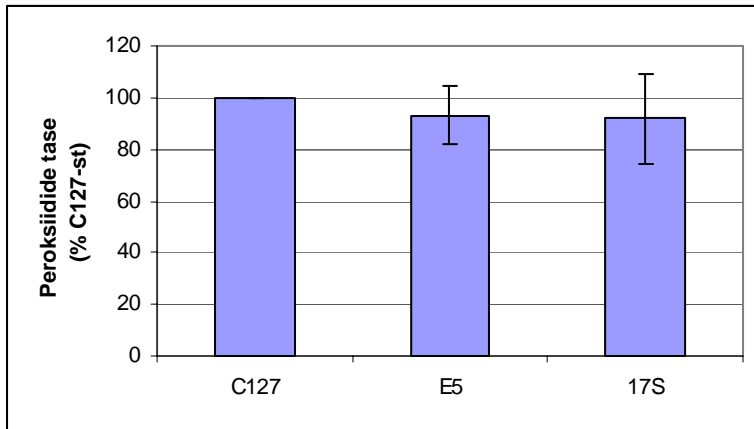


Joonis 15. Rakukultuuri tihedus ja E vitamiini kasvu inhibeeriv toime. Erinev hulk rakke kasvas kas ilma E vitamiinita söötmes või 400 μM E vitamiini juuresolekul. Inhibitsiooni protsent näitab, kui palju antud katses E vitamiin rakkude kasvu pärssis.

2.2.5. Peroksiidide tase rakkude transformeerumisel BPV-1 E5-ga

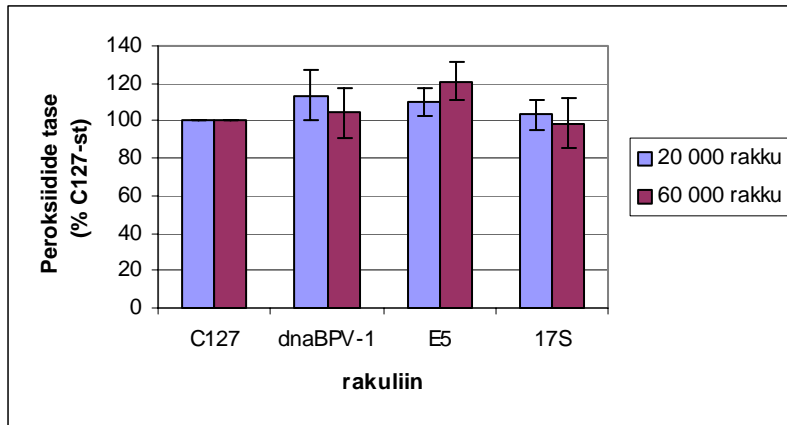
Kuna SOD lisamine mõjutas rakkude kasvu ja on teada, et SOD tõstab vesinkperoksiidi taset rakus, otsustasime mõõta ka peroksiidide hulka rakkudes.

Peroksiidide taset mõõdeti E5 mutante ekspresseerivate plasmiididega transfekteeritud C127 rakkudes. Rakke transfekteeriti 100 ng pCGE5 ja 100 ng pCG17S plasmiidiga või elektroporeeriti niisama (kontroll C127 rakud) ning külvati 96-auguga plaadile, $1,6 \times 10^4$ rakku/auku. Peroksiidide tase mõõdeti 24 h pärast. Katse tulemused olid kõikuvad, kuid kui nende tulemused kokku võeti, siis *wt* E5 ja 17S ekspresseeriva plasmiidiga transfekteerimine peroksiidide taset oluliselt ei mõjutanud, see oli kontrolliks olevate C127 rakkudega pea-aegu samal tasemel. (Joonis 16.).



Joonis 16. Peroksiidide tase *wt* E5 ja 17S ekspresseeriva plasmiidiga transfekteeritud C127 rakkudes võrrelduna transfekteerimata C127 rakkudega. Joonisel on 14 katse keskmine.

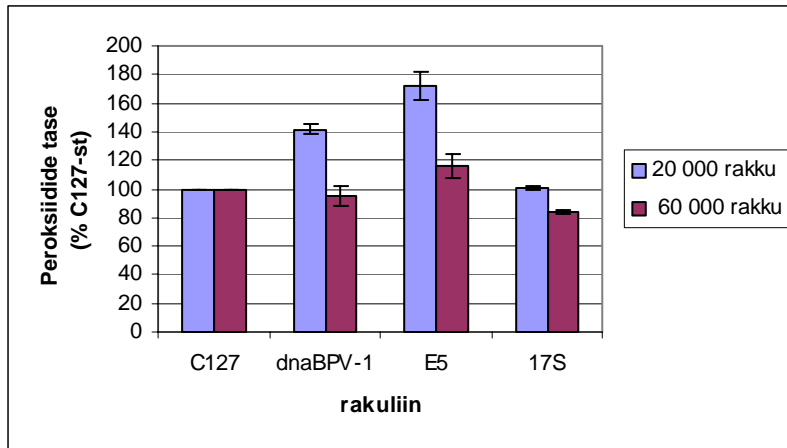
Peroksiidide taset mõõdeti ka transformeerunud rakuliinides. 24 h pärast oli peroksiidide tase hõredamalt külvatud (2×10^4 rakku/auku) transformeerunud dnaBPV-1 ja E5 rakuliinides ning tihedamalt (6×10^4 rakku/auku) külvatud E5 rakuliinis C127 rakkudega võrreldes natuke tõusnud, vastavalt 113%, 110% ja 121%. Hõredamalt külvatud 17S ning tihedamalt külvatud dnaBPV-1 ja 17S rakkudes oli peroksiidide tase võrreldes C127 rakkudega praktiliselt muutumata (103%, 104% ja 98% vastavalt). Seega oli 24 h peale rakkude külvamist peroksiidide tase nii tihedamalt kui hõredamalt külvatud rakkudes sarnane C127 rakkudega. (Joonis 17.).



Joonis 17. Peroksiidide tase C127 rakkudes ja transformeerunud rakuliinides (dnaBPV-1, E5 ja 17S). Mõõdetud 24 h pärast rakkude külvamist. Joonisel on kolme katse keskmine.

Peroksiidide tase mõõdeti ka 72 h peale rakkude külvamist. Hõredamalt (2×10^4 rakku/auku) külvatud dnaBPV-1 ja E5 rakuliinides oli peroksiidide tase võrreldes C127 rakkudega tõusnud (141% ja 171% vastavalt). 17S rakuliinis ja tihedamalt külvatud (6×10^4 rakku/auku) dnaBPV-1 ja E5 rakuliinides polnud peroksiidide tasemes olulisi erinevusi võrreldes C127 rakkudega. Tihedamalt (6×10^4 rakku/auku) külvatud dnaBPV-1 rakuliinis oli peroksiidide tase võrreldes C127 rakkudega vähesel määral langenud (94%), E5 rakuliinis veidi tõusnud (116%) ja 17S rakuliinis langenud (83%). (Joonis 18.).

Seega oli 72 h peale rakkude külvamist kiiremini kasvavates transformeerunud rakuliinides, kui rakud aktiivsemalt paljunesid, peroksiidide tase tõusnud võrreldes C127 rakkudega.

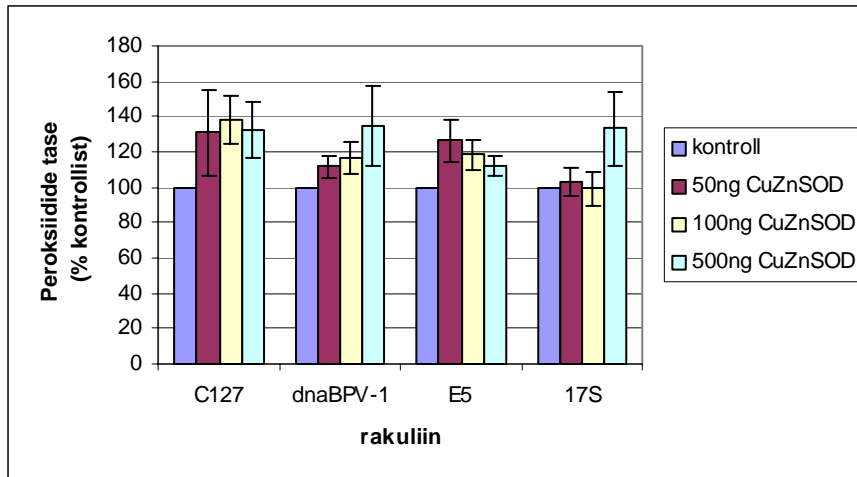


Joonis 18. Peroksiidide tase C127 rakkudes ja transformeerunud rakuliinides (dnaBPV-1, E5 ja 17S). Mõõdetud 72 h peale rakkude külvamist. Joonisel on kolme katse keskmine.

2.2.6. Antioksidantide mõju peroksiidide tasemele

Antioksidandid pärssisid transformeerunud rakuliinide kasvu ning dnaBPV-1 ja E5 rakuliinis oli peroksiidide tase võrreldes C127 rakkudega tõusnud. Sellepärast soovisin teada saada, kas CuZnSOD ja E vitamiin mõjutavad transformeerunud rakuliinides peroksiidide taset.

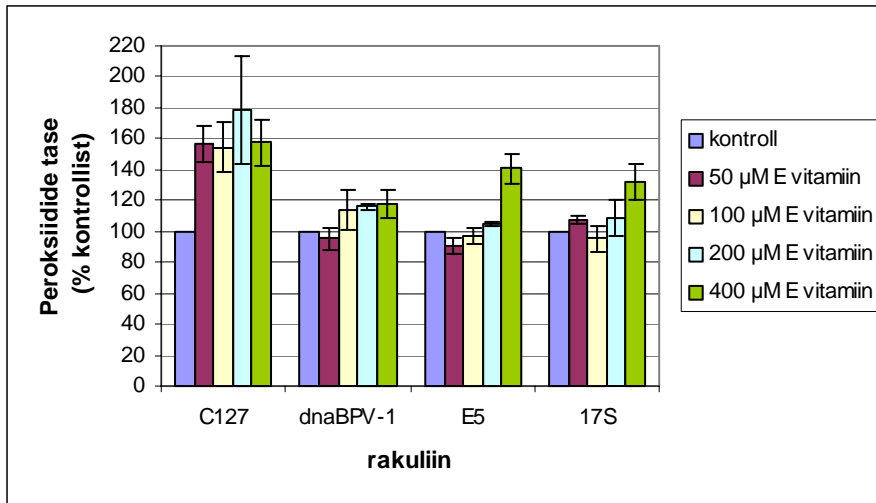
CuZnSOD mõju uurimiseks transfekteeriti C127 rakke ning dnaBPV-1, E5 ja 17S rakuliine erineva koguse (50 ng, 100 ng, 500 ng) CuZnSOD ekspresseeriva plasmiidiga. Külvati keskmiselt 2×10^4 rakku ning 24 h pärast mõõdeti DCF fluorestsents. C127 rakkudes tõusis CuZnSOD ekspresseeriva plasmiidiga transfekteerimise järel peroksiidide tase (131-138% võrreldes kontrolliga), samuti dnaBPV-1 (111-134%) ja E5 rakuliinis (126-112%). 17S rakuliinis tõusis peroksiidide tase 500 ng pCGCuZnSOD-ga transfekteerimise järel (133%). (Joonis 19.).



Joonis 19. CuZnSOD ekspresseeriva plasmiidiga transfekteerimise mõju peroksiidide tasemele. Rakkudesse viidi erinev kogus pCGCuZnSOD ning võrreldi peroksiidide taset ilma pCGCuZnSOD-ta elektroporeeritud kontroll-rakkudega. Joonisel on ühe transfektsiooni kolme paralleeli keskmine.

E vitamiini mõju uurimiseks külvati keskmiselt 3×10^4 rakku/auku 96-auguga plaadile ning söötmesse ei lisatud või lisati erinev hulk E vitamiini (lõppkontsentratsioon 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM). 24 h pärast mõõdeti peroksiidide tase rakkudes, mille söötmele oli lisatud E vitamiini, nende rakkude suhtes, mille söötmele ei lisatud E vitamiini (kontroll). Transformeerunud rakuliinides väiksemad E vitamiini kogused (50 μM , 100 μM , 200 μM) mõjutasid peroksiidide taset vähe. dnaBPV-1 rakuliinis oli selliste E vitamiini koguste mõjul peroksiidide tase võrreldes kontrolliga vastavalt 95%, 113% ja 115%, E5 rakuliinis 90%, 96% ja 104% ning 17S rakuliinis 106%, 95% ja 109%. 400 μM E vitamiin tõstis peroksiidide taset kõigis rakuliinides, dnaBPV-1 rakuliinis kõige vähem, 117%, teistes rakuliinides rohkem, E5 rakuliinis 140%, 17S rakuliinis 131%. Üldse kõige suuremat peroksiidide tõusu võis täheldada C127 rakkudes, kus kõik E vitamiini kogused tõstsid peroksiidide hulka märgatavalt, 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM E vitamiin vastavalt 156%, 154%, 178% ja 157% võrreldes kontrolliga. (Joonis 20.).

Mõlemad antioksüdandid, nii CuZnSOD kui E vitamiin, suurendasid peroksiidide taset rakkudes. E vitamiinil oli väiksem toime kui CuZnSOD-l, ainult 400 μM E vitamiin mõjus peroksiidide tasemele transformeerunud rakuliinides.



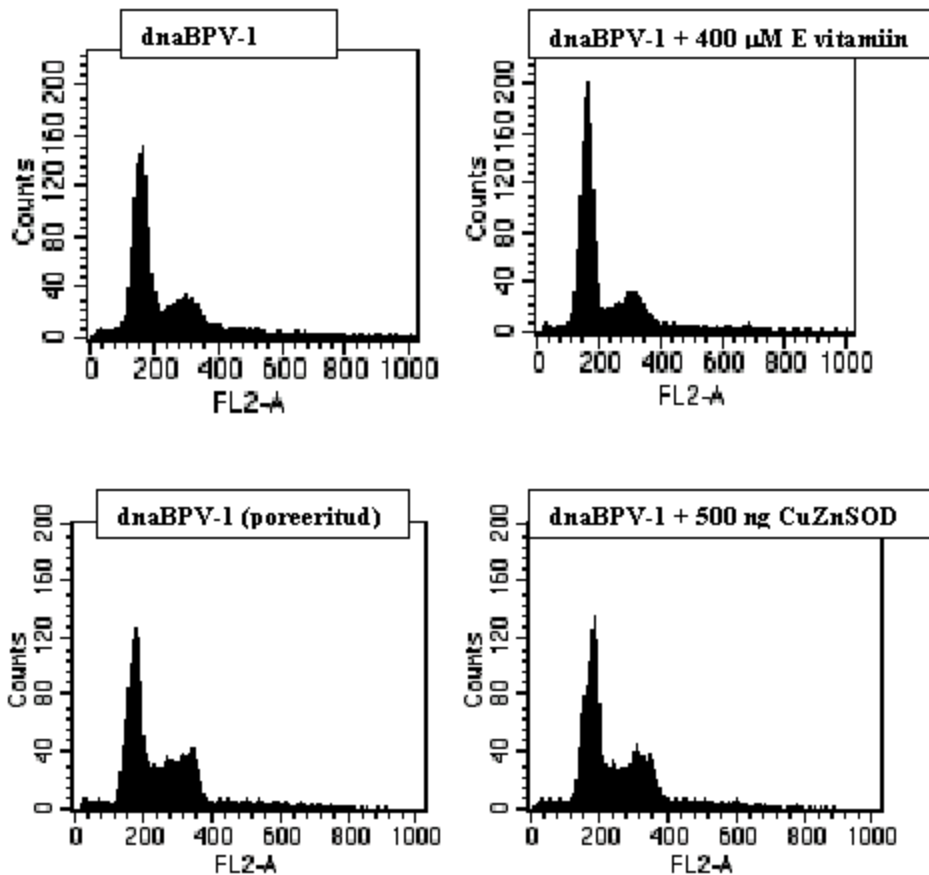
Joonis 20. E vitamiini mõju peroksiidide tasemele. Söötmesse lisati E vitamiini lõppkontsentratsioonides 50 μM, 100 μM, 200 μM, 400 μM. Peroksiidide taset võrreldi rakkudega, mille söötmesse ei lisatud E vitamiini. Joonisel on ühe katse kolme paralleelse proovi keskmine.

3.2.7. Antioksidantide mõju rakutsüklile

C127 rakke ning dnaBPV-1, E5 ja 17S rakuliinide mõjutati antioksidantidega, 400 μM E vitamiini ja 500 ng pCGCuZnSOD-ga, et näha, kas need mõjutavad rakutsükli. E vitamiiniga ja E vitamiinita söötmes kasvanud rakkude ning pCGCuZnSOD-ta ja pCGCuZnSOD-ga transfekteeritud rakkude tüüpilised rakutsükli pildid on joonisel 21.

E vitamiini ning CuZnSOD toime rakutsükli eri faasides olevate rakkude hulga on toodud tabelites 1. ja 2. G₀/G₁, S ja G₂/M faasis olevate rakkude protsendid ei anna kokku 100%, sest eri faasides olevate rakkude protsendi arvutamisel arvestati ainult graafikul piikides olevaid rakke, enne G₀/G₁ ja peale G₂/M piiki olevaid rakke ei arvestatud.

400 μM E vitamiini söötmesse lisamisel, kasvas G₀/G₁ faasis olevate rakkude arv ja langes S ning G₂/M faasis olevate rakkude arv (tabel 1.). Samasugune mõju oli ka CuZnSOD ekspresseeriva plasmidi rakkudesse viimisel. CuZnSOD toimel suurenes G₀/G₁ faasis olevate rakkude arv ja vähenes S ning G₂/M faasis olevate rakkude arv (tabel 2.).



Joonis 21. E vitamiini ja CuZnSOD mõju rakutsüklile. BPV-DNA-ga transformeeritud rakkudesse elektroporeeriti 500 ng pCGSOD või lisati söötmesse 400 μ M E vitamiin. Rakke kasvatati 48 tundi. Rakutsükli hinnati PI seostumise järgi. Graafikute x-teljel on PI fluorestsentsi intensiivsus (suhtelised ühikud), y-teljel on rakkude arv.

Tabel 1. 400 μ M E vitamiini mõju rakutsüklile.

Nimi	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
C127	59,45	15,67	14,89
C127 + E vitamiin	61,3	13,85	12,29
dnaBPV-1	55,24	12,32	19,23
dnaBPV-1+ E vitamiin	66,68	9,19	13,74
E5	68,86	8,53	15,84
E5+ E vitamiin	75,37	6,13	10,31
17S	61,14	9,76	16,76
17S+ E vitamiin	72,67	7,21	10,82

Tabel 2. 500 ng pCGCuZnSOD mõju rakutsüklile.

Nimi	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
C127	48,38	16,65	18,51
C127 + CuZnSOD	50,86	14,84	15,1
dnaBPV-1	45,61	20,57	21,66
dnaBPV-1+ CuZnSOD	48,06	18,64	19,62
E5	47,26	19,87	21,57
E5+ CuZnSOD	49,01	17,17	19,62
17S	46,45	19,5	21,37
17S+ CuZnSOD	50,88	17,7	19,39

2.3. Arutelu

Vähirakkudel on sageli täheldatud normaalsete rakkudega võrreldes kiiremat paljunemist ning muutunud aktiivsete hapnikuühendite taset (Szatrowski and Nathan, 1991). ROS-1 on roll nii raku proliferatsiooni reguleerivates signaaliradades kui ka tsütotoksilistes protsessides. Meie labori avaldamata andmete järgi inhibeerivad antioksidandid BPV-1 E5-st tingitud rakkude transformeerumist. E vitamiin ja SOD pärssisid kolooniate teket BPV-1 täisgenoomiga ja onkovalgu E5 hüpertransformeerivate mutantidega (17S, 17E) transfekteeritud C127 rakkudes (Karo, 2005). 400 µM E vitamiin alandas BPV-1 täisgenoomiga transfekteeritud rakkude fookuste arvu 75% ja pCG17S-ga transfekteeritud rakkude fookuste arvu 40%. 500 ng pCGCuZnSOD toimel alanes fookuste arv BPV-1 täisgenoomiga transfekteeritud rakkudes 65% ning pCG17S-ga transfekteeritud rakkudes 20% (Karo, 2005). Sellest tuleneski minu uurimisteema, kuidas mõjutavad antioksidandid BPV-1 onkovalguga E5 transformeerunud rakuliine.

Antioksidantide kolooniate teket pärssiva mõju tõttu võib oletada, et BPV-1 transformatsioonis on ROS olulised, käivitades kasvu soodustava signaaliraja. BPV-1 täisgenoomiga, BPV-1 onkovalguga E5 ja mutantse onkovalguga 17S transformeerunud rakuliinid kasvasid kiiremini kui transformeerumata C127 rakud (joonis 11.). Sellepärast julgengi arvata, et E5-ga transfekteeritud rakkudes E5 ka avaldub, kuigi seda näidata ei õnnestunud. Ka varasemate andmete järgi on E5 transformatsiooniks vajalik kogus raku väga madal (Burnett et al., 1992). E5 transformeerivate mutantidega transfekteeritud

C127 rakkudes on madalam $O_2^{\bullet-}$ tase kui kontroll-rakkudes (Kilk et al., 2006), mis viitab sellele et $O_2^{\bullet-}$ kasutatakse ära kasvu soodustamiseks.

Selleks, et kindlaks teha ROS roll rakkude transformatsioonis, mõjutati transformeerunud rakuliine antioksidantidega, CuZnSOD-i ja E vitamiiniga.

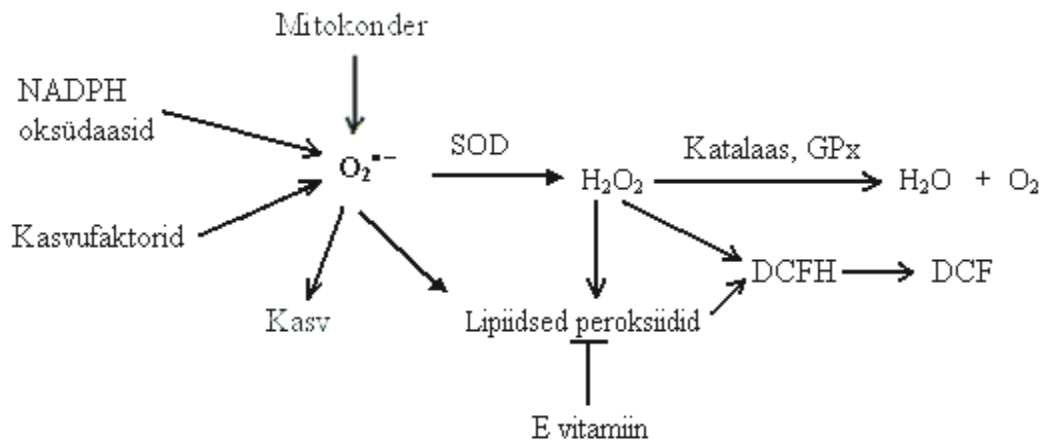
pCGCuZnSOD erinevate koguste toimetel langes rakuliinide kasvu kiirus SOD-ga mõjutamata rakkudega võrreldes. Võrdluseks tõin välja 72h ajapunkti, kus rakud aktiivselt paljunesid (joonis 12.) ja plaat ei olnud veel konfluentne. Kõige rohkem pärssis eksponentsiaalselt kasvavate rakkude kasvu 500 ng CuZnSOD (36% kuni 53% kontrollist, joonis 12.). SOD inhibeeris kasvu ühtmoodi nii C127 rakkudes kui transformeerunud rakuliinides.

Kuna rakkude paljunemine sõltub rakkude tihedusest plaadil, siis vaatasin, kuidas mõjutab SOD konfluentsel plaadil kasvavaid rakke. Kui kõik SOD-ga katsed kokku võtta, võib öelda, et SOD-i kasvu inhibeeriv mõju oli suurem (38-92%) aktiivselt paljunevatele eksponentsiaalses kasvufaasis olevatele rakkudele (joonis 13.). SOD muudab rakus $O_2^{\bullet-}$ H_2O_2 -ks. Seega võib paljunemiskiiruse langus olla tingitud $O_2^{\bullet-}$ hulga vähenemisest või vesinikperoksiidi kogunemisest. ROS vähenemine võib rakus lõpetada kasvu stimuleeriva signaaliraja toimimise. Suur rakutihedus võib paljunemist pärssida näiteks kontaktinhibitsiooni kaudu, mis seletaks SOD-i väiksemat kasvu inhibeerivat mõju (10-25%) suure rakutiheduse juures. Kui rakud ei paljune, siis ka paljunemise inhibiitorid ei toimi, kui pole tegemist rakkude suremisega. Ilmselt antud juhul SOD ei stimuleeri rakkude surma, vaid pidurdab just paljunemist. Seda, et SOD-i üle-ekspressioon inhibeerib rakkude kasvu nii *in vitro* kui *in vivo* on leitud mitmetes kasvajarakkudes (Liu et al., 1997a; Li et al., 1998; Safford et al., 1994; Zhong et al., 1996; Zhong et al., 1997; Yan et al., 1996).

E vitamiini lisamine söötmesse pärssis samuti rakkude proliferatsiooni, aga ainult suuremas koguses (400 μ M E vitamiin alandas rakkude arvu 63-83%-ni võrreldes kontrolliga) (joonis 14.). Väiksemad E vitamiini kogused kasvule inhibeerivalt ei mõjunud ja E5 rakuliinile toimisid hoopis kasvu stimuleerivalt (joonis 14.). Sarnaselt SOD-ga inhibeeris ka E vitamiin nii C127 kui ka transformeerunud rakkude kasvu. Samuti oli E vitamiini kasvu pärssiv toime suurem aktiivsemalt paljunevates rakkudes ning kahanes rakutiheduse kasvades (joonis 15.). Kirjanduse andmetel võib E vitamiin

inhibeerida rakkude proliferatsiooni. Kasvu inhibeerimist on seostatud PKC aktiivsuse inhibeerimisega, ka rakutsükli takistamisega (Venkateswaran et al., 2002; Gysin et al., 2002; Boscoboinik et al., 1991; Chatelain et al., 1993).

Oletades seost ROS ning transformatsiooni vahel ja teades, et transformeerivad E5 mutandid alandavad rakkudes $O_2^{\bullet-}$ taset, soovisin teada, kas transformeerunud rakkudes on muutunud peroksiidide tase. $O_2^{\bullet-}$ toimel võivad rakus tekkida lipiidised peroksiidid ning SOD muudab $O_2^{\bullet-}$ H_2O_2 -ks. Superoksiidi tekkimisteid ja edasist saatust rakus, ning antioksidantseid ensüüme on kujutatud joonisel 22.



Joonis 22. Aktiivsed hapniku ühendid ja antioksidantsed ensüümid. $O_2^{\bullet-}$ tekib mitokondrites elektronide lekkest elektron-transport-ahelast. Mitmed kasvufaktorid võivad aktiveerida NADPH oksüdaase, mis toodavad $O_2^{\bullet-}$. ROS kõrvaldavad rakus antioksidantsed ensüümid SOD, katalaas, GPx. $O_2^{\bullet-}$ võidakse ära kasutada kasvuks. Superoksiidi dismutaas muudab $O_2^{\bullet-}$ vesinikperoksiidiks, mis omakorda muudetakse edasi veeks katalaasi ja glutatioon peroksüdaaside poolt. $O_2^{\bullet-}$ ning H_2O_2 võivad oksüdeerida lipiide, nii et tekivad lipiidised peroksiidid. Lipiidide peroksüdatsiooni takistab E vitamiin. H_2O_2 ja lipiidised peroksiidid oksüdeerivad ka DCFH fluorestseeruvaks DCF-ks, mille fluorestsentsi saab mõõta ning selle kaudu määrata peroksiidide taset rakus.

24 h peale rakkude külvamist peroksiidide tasemes suuri muutusi polnud (joonis 17.). See on kooskõlas minu bakalaureusetöö tulemusega, kus C127 rakkude transfekteerimine pCGE5 ja pCG17S-ga peroksiidide taset kokkuvõttes ei mõjutanud (joonis 16.). Seega 24 h jooksul transformeerunud rakuliinides peroksiidide tase kas ei muutunud või oli muutus selle meetodiga detekteerimiseks liiga väike või lühiajaline. Kui rakus on H_2O_2

kõrvaldavad süsteemid (katalaas, glutatioon peroksüdaasid) nii aktiivsed, et H_2O_2 konverteeritakse kohe veeks, siis ei saa peroksiidid raku koguneda. Ka siis kui rakkudes endis olevast SOD-st piisab, et kogu tekkiv $O_2^{\bullet-}$ vesinikperoksiidiks muuta, ei suurene H_2O_2 hulk enam SOD-i lisamisel.

Kui peroksiidide tase mõõdeti 72 h peale rakkude külvamist, oli dnaBPV-1 ja E5 rakuliinis peroksiidide tase tõusnud, vastavalt 141% ja 171% C127 rakkudega võrreldes (joonis 18.). DCFDA oksüdeerub H_2O_2 ja lipiisete peroksiidide toimel. Seega on dnaBPV-1 ja E5 rakuliinides hõredama rakutiheduse juures tõusnud H_2O_2 või lipiisete peroksiidide või mõlema tase. 17S rakuliinis peroksiidide tase ei suurenenud, kuid kirjanduse andmeil võib 17S rakkude transformeerimiseks kasutada ka muid teid peale PDGF β retseptorist lähtuva raja (Sparkowski et al., 1996), erinevalt *wt* E5-st, mis aktiveerib peamiselt PDGF β retseptorit. Kui BPV-1 täisgenoomiga ja *wt* E5-ga transformeerimisel kasutatakse PDGF β retseptorist lähtuvat rada ja sellega kaasneb peroksiidide taseme tõus ning 17S transformeerib teist teed pidi, siis see võib seletada, miks 17S transformeerunud rakuliinis peroksiidide tase ei muutunud. Teiselt poolt pärssis SOD selle rakuliini kasvu (joonis 18.), nii et superoksiidi kasutatakse paljunemiseks ka 17S rakuliinis.

Antioksidandid pärssisid C127 rakkude transformeerumist (Karo, 2005) ning BPV-1 onkovaaluga transformeerunud rakuliinide kasvu (joonised 12. ja 14.). Samuti selgus, et dnaBPV-1 ja E5 rakuliinides 72 h jooksul peroksiidide tase tõuseb võrreldes C127 rakkudega (joonis 18.). Sellepärast tekkis küsimus, kas SOD ja E vitamiin mõjutavad ka peroksiidide taset transformeerunud rakuliinides. Erinevused rakkude kasvus hakkasid ilmnema 24 h peale külvamist (joonis 11.), seega mõõdeti antioksidantidega mõjutatud rakkude peroksiidide tase 24 h ajapunktil, mitte 72 h pärast, kui peroksiidide tase oli mõõdetavalt suurenenud dnaBPV-1 ja E5 rakuliinides (joonis 18.).

Erineva koguse (50 ng, 100 ng, 500 ng) pCGCuZnSOD rakkudesse viimine suurendas üldiselt peroksiidide taset rakkudes (joonis 19.). Kõige suurem oli peroksiidide taseme tõus C127 rakkudes (131-138% võrreldes kontrolliga), mis võib olla tingitud sellest, et C127 rakkudes ei kasutata nii palju $O_2^{\bullet-}$ kasvuks kui transformeerunud rakuliinides. Sel juhul on rakkudes rohkem $O_2^{\bullet-}$ SOD-le kättesaadav ning see

konverteeritakse H_2O_2 -ks. CuZnSOD töötab ainult tsütosoolis, membraanides olevat superoksiidi ta kätte ei saa.

dnaBPV-1 rakuliinis suurenes peroksiidide tase CuZnSOD mõjul korrelatsioonis rakkudesse viidud pCGCuZnSOD hulgaga. 17S rakuliinis suurendas peroksiidide taset märgatavalt vaid 500 ng pCGCuZnSOD, mille toimet peroksiidide tase kasvas 133%-ni kontrolliga võrreldes. See oli üsna ootuspärane tulemus, kui rakkudesse viidi rohkem SOD-i, siis muudeti ka rohkem $O_2^{\bullet-}$ H_2O_2 -ks. E5 rakuliinis suurenes peroksiidide tase rohkem hoopis 50 ng pCGCuZnSOD toimet. Samas erinevate SOD-i koguste mõju oli üsna sarnane, nii et võib-olla piisas E5 rakuliinis 50 ng SOD-st, et kogu kättesaadav $O_2^{\bullet-}$ H_2O_2 -ks muuta ning SOD-i hulga suurendamine enam peroksiidide tasemele olulist mõju ei avaldanud. (Joonis 19.).

500 ng pCGCuZnSOD rakkudesse viimine inhibeeris rakkude kasvu (joonis 12.) ning üldiselt suurendas peroksiidide taset rakkudes (joonis 19.). Seega võib SOD-i kasvu inhibeeriv mõju tuleneda sellest, et see vähendab $O_2^{\bullet-}$ hulka rakus. Kui $O_2^{\bullet-}$ stimuleerib paljunemist, siis selle taseme langusega kaasneb ka kasvu inhibeerimine.

E vitamiini väiksemad kogused transformeerunud rakuliinides peroksiidide taset oluliselt ei mõjutanud, kuid 400 μM E vitamiin tõstis peroksiidide taset (joonis 20.). Kõige vähem mõjutas 400 μM E vitamiin dnaBPV-1 rakuliini, milles selle toimet peroksiidide tase oli kontrolliga võrreldes 117%, E5 ja 17S rakuliinides tõstis peroksiidide tase rohkem, vastavalt 140% ja 131%. Sarnaselt CuZnSOD-ga oli ka E vitamiinil kõige suurem mõju C127 rakkudele, ja üllatavalt tõstis see peroksiidide hulka. Kõigi E vitamiini koguste toimet kasvas C127 rakkudes peroksiidide tase 154-178%-ni (joonis 20.). Ilma E vitamiinita on peroksiidide tase 24-ndal tunnil igal pool peaaegu ühesugune (joonis 17.) ja 72 tunni pärast kõrgem hoopis transformeerunud rakkudes (joonis 18.).

On näidatud, et transformeerumata C127 rakkudes on superoksiidi rohkem kui E5-ga transfekteeritud rakkudes (Kilk et al., 2006). $O_2^{\bullet-}$ võib oksüdeerida lipiide ja ka E vitamiini. E vitamiin on üldiselt küll antioksidant, mis takistab lipiidide peroksidatsiooni, kuid see võib rakus toimida ka pro-oksidandina, kui E vitamiini redutseerivad süsteemid on vähe aktiivsed, näiteks kui rakus on vähe C vitamiini. Kui E vitamiin oksüdeeritakse ning selle oksüdeerumise käigus tekivad aktiivsed ühendid, on ka need võimelised DCFH-i DCF-ks oksüdeerima. Siis suureneks ka DCF fluorestsents,

mida peetakse peroksiidide taseme indikaatoriks. Nii et E vitamiin, takistades membraanides lipiidide oksüdeerumist, oksüdeerub ise, katkestades sellega radikaalide poolt käivitatud lipiidide lagunemise.

Antioksidantide kasvu inhibeeriv toime tekitab küsimuse, kas need mõjutavad kuidagi rakutsükli. Üsna hiljutised kirjanduse andmed viitavad, et SOD inhibeerib transformeerunud rakkude kasvu, takistades rakutsükli (Lin et al., 2006; Lu et al., 2006). On leitud, et ka E vitamiin mõjutab rakutsükli. γ -tokoferooli toimel vähenes S faasis olevate rakkude hulk ning tsükliin D1 ja E tase rakkudes oli langenud, samas oli suurenenud p27^{kip1} ja p21^{cip1} tase (Gysin et al., 2002). Eesnäärme kartsinoomi rakkudes indutseeris E vitamiin rakutsükli aresti, kahanes S faasis olevate rakkude protsent ning suurenes p27^{kip1} tase (Venkateswaran et al., 2002).

Seda kinnitavad ka minu andmed. 500 ng pCGCuZnSOD toimel kogunesid rakud G₀/G₁ faasi ning kahanes S ning G₂/M faasis olevate rakkude hulk (tabel 2.). Ka 400 μ M E vitamiini toimel vähenes S ja G₂/M faasis olevate rakkude protsent (tabel 1.).

Lin *et al.* artiklis (Lin et al., 2006) seostati CuZnSOD-st tingitud rakutsükli peatamine tsükliin D1, tsükliin E, CDK2 ja CDK4 vähenenud ekspressiooni ning tsükliin-sõltuvate kinaaside inhibiitorite p21^{cip1} ja p27^{kip1} ekspressiooni tõusuga. SOD-st tulenev O₂^{•-} taseme langus takistas SPC-A-1 rakuliinis (kopsu adenokartsinoom) rakutsükli G₁ faasis ning aeglustas rakkude kasvu, millega seostus Akt kinaasi defosforüülimine ning p27^{kip1} ekspressioon (Lu et al., 2006).

Rakusisese redoksseisundi kõikumised võivad reguleerida hepatoomi rakkude proliferatsiooni PI3K/Akt signaaliraja kaudu (Liu et al., 2002; Shi et al., 2003). PI3K/Akt signaaliraja aktiveerimist on seostatud ka E5-ga. PI3K aktiivsus tõuseb E5-e toimel NIH 3T3 rakkudes. PDGFR kinaas aktiveerib PI3K (Kazlauskas, 1994) ning E5 aktiveerib omakorda PDGFR-i (Petti et al., 1991). PI3K-d aktiveerivad ka need E5 mutandid, mis ei aktiveeri PDGFR-i (Suprynowicz et al., 2000).

Nagu eelpool öeldud inhibeerisid CuZnSOD ja E vitamiin dnaBPV-1, E5 ja 17S rakuliinide kasvu ning takistasid rakutsükli G₁ faasist edasiminekul. SOD-i kasvu pärssiv efekt võib olla tingitud PI3K/Akt raja kaudu tulevast signaalist, mistõttu suureneb G₀/G₁ faasis olevate rakkude protsent ning kahaneb S ja G₂/M faasis olevate rakkude protsent. Rakkude kasvu stimuleeriva rajaga on seotud ka O₂^{•-}, sest E5 valgu transformeerivad

mutandid alandavad $O_2^{\bullet-}$ taset rakkudes (Kilk et al., 2006). PI3K/Akt rada võidakse rakkudes aktiveerida üle $O_2^{\bullet-}$, nii et kui SOD alandab $O_2^{\bullet-}$ taset, siis ei saa seda enam kasutada kasvu stimuleerimiseks.

E vitamiin inhibeerib $O_2^{\bullet-}$ tootmist monotsüütides; leiti et α -tokoferool takistab NADPH oksüdaasi formeerumist; selle tsütosoolse subühiku p47^{phox} translokatsioon membraani ja fosforüülimine olid takistatud ning ka PKC oli inhibeeritud (Cachia et al., 1998). Võimalik, et E vitamiin takistab rakkudes $O_2^{\bullet-}$ tootmist ning ühes sellega ka kasvu stimuleerimist, ja et selle signaalirajaga on seotud ka PKC. Nii PKC, PKB/Akt kui ka NADPH oksüdaasi aktiveerimiseks on vaja need ensüümid rakus membraanile viia ja see toimub mitmete rasvhapete või nende metaboliitide abil. Võib-olla takistab E vitamiin just nende ensüümide membraanile seostumist. See oletus vajaks lähemat uurimist.

Samas inhibeerisid CuZnSOD ja E vitamiin kõigi rakkude kasvu, C127 rakkudele ning transformeerunud rakuliinidele neil erinevat toimet polnud (joonised 12. ja 14.). Ühtlasi oli SOD-i ja E vitamiini kasvu inhibeeriv toime suurem aktiivselt paljunevates rakkudes (joonised 13. ja 15.). CuZnSOD-i paljunemist takistav toime oli suurem kui E vitamiinil. Samuti oli antioksüdantide toime rakutsüklile sarnane C127 rakkudes ja transformeerunud rakuliinides (tabel 1. ja 2.). Neist tulemustest võib järeldada, et SOD ja E vitamiin mõjusid rakkude paljunemisele takistades rakutsükli, ja et rakutsükli kulgemiseks on vaja superoksiidi.

Varasemate avaldamata andmete järgi pärssisid CuZnSOD ja E vitamiin tugevalt kolooniate teket BPV-1 onkovaaluga E5 transfekteeritud rakkudes (Karo, 2005). Kuigi SOD ja E vitamiin pärssisid tugevalt kolooniate teket, siis nende mõju rakuliinide kasvule oli väiksem. See võib olla tingitud sellest, et kolooniad tekivad plaatidele konfluentsuse tingimustes, kus edasi kasvavad transformeerunud rakud. Kuna E vitamiini ja SOD-i kasvu inhibeeriv toime oli suurem aktiivselt kasvavates rakkudes (joonised 13. ja 15.), siis võisid SOD ja E vitamiin kolooniate tekkele pärssivalt mõjuda, sest takistasid nende rakkude kasvu, mis muidu oleksid veel edasi paljunenud ja koloonia moodustanud.

CuZnSOD ja E vitamiin mõjusid enam just aktiivselt paljunevatele rakkudele. Normaalsed rakud organismis tavaliselt ei paljune või on nende paljunemine kontrollitud. Seega *in vivo* võiksid CuZnSOD ja E vitamiin kasvu inhibeerivalt mõjuda just kasvajakakkudele, mis aktiivselt paljunevad.

KOKKUVÕTE

Selle töö eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutavad antioksüdandid, CuZnSOD ja E vitamiin, C127 rakkude kasvu, mis on transformeeritud BPV-1 täisgenoomi, *wt* onkovoalku E5 ja E5 mutanti 17S ekspresseerivate plasmiididega. Veel uuriti, kuidas muutub transformeerunud rakuliinides peroksiidide tase ning kuidas mõjutavad peroksiidide taset ja rakutsükli CuZnSOD ja E vitamiin.

Transformeerunud rakuliinid kasvasid kiiremini kui C127 rakud. CuZnSOD ja E vitamiin inhibeerisid paljunemist aktiivselt kasvavates rakkudes. Suure rakutiheduse juures oli antioksüdantide kasvu inhibeeriv mõju väiksem.

CuZnSOD toimel suurenes G_0/G_1 faasis olevate rakkude osa ning vähenes S ja G_2/M faasis olevate rakkude arv. Ka E vitamiini toimel alanes S ja G_2/M faasis olevate rakkude protsent ning kasvas G_0/G_1 faasis olevate rakkude protsent.

Antud tööst võib järeldada, et CuZnSOD ja E vitamiin pärsivad aktiivselt jagunevate rakkude paljunemist. Rakkude aktiivseks paljunemiseks on vaja aktiivseid hapnikuühendeid, eelkõige superoksiidi. Rakutsükli kulgemiseks S faasi on vaja superoksiidi ja membraanides toimuvaid oksüdatiivseid muutusi.

SUMMARY

The purpose of this work was to study, how antioxidants, CuZnSOD and vitamin E, influence the growth of C127 cells, which are transformed by plasmids expressing BPV-1 DNA, wt E5 oncoprotein and mutant E5 protein 17S. Level of peroxides in transformed cell lines and the effect of CuZnSOD and vitamin E on the level of peroxides and on cell cycle was also studied.

The transformed cell lines grew faster than C127 cells. CuZnSOD and vitamin E inhibited cell proliferation in actively dividing cells. The growth-inhibiting effect of antioxidants was reduced at large cell densities.

CuZnSOD increased the amount of cells in G₀/G₁ phase and decreased the number of cells in S and G₂/M phases. Vitamin E also decreased the percentage of cells in S and G₂/M phases and increased the percentage of cells in G₀/G₁ phase.

It can be concluded, that CuZnSOD and vitamin E inhibit the growth of actively proliferating cells. Active proliferation of cells needs reactive oxygen species, foremost the superoxide. Cell cycle progression into S phase needs superoxide and oxidative changes in membranes.

KIRJANDUSE LOETELU

- Allen, R.** 1991. Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation. *Proc Soc Exp Biol Med.* 196:117-29.
- Allen, R. G., and M. Tresini.** 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 28:463-99.
- Alleva, R., M. Benassi, M. Tomasetti, N. Gellert, F. Ponticelli, B. Borghi, P. Picci, and J. Neuzil.** 2005. Alpha-tocopheryl succinate induces cytostasis and apoptosis in osteosarcoma cells: the role of E2F1. *Biochem Biophys Res Commun.* 331:1515-21.
- Anderson, K., F. Ondrey, and J. Harris.** 1992. ETYA, a pleotropic membrane-active arachidonic acid analogue affects multiple signal transduction pathways in cultured transformed mammalian cells. *Clin Biochem.* 25:1-9.
- Andresson, T., J. Sparkowski, D. Goldstein, and R. Schlegel.** 1995. Vacuolar H(+)-ATPase mutants transform cells and define a binding site for the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Biol Chem.* 270:6830-7.
- Arbiser, J. L., J. Petros, R. Klafter, B. Govindajaran, E. R. McLaughlin, L. F. Brown, C. Cohen, M. Moses, S. Kilroy, R. S. Arnold, and J. D. Lambeth.** 2002. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:715-20.
- Arnold, R. S., J. Shi, E. Murad, A. M. Whalen, C. Q. Sun, R. Polavarapu, S. Parthasarathy, J. A. Petros, and J. D. Lambeth.** 2001. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA.* 98:5550-5555.
- Aydin, A., H. Orhan, A. Sayal, M. Ozata, G. Sahin and A. Isimer.** 2001. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemc control. *Clin Biochem.* 34:65-70.
- Azzi, A., E. Aratri, D. Boscoboinik, S. Clement, N. K. Ozer, R. Ricciarelli and S. Spycher.** 1998. Molecular basis of alpha-tocopherol control of smooth muscle cell proliferation. *Biofactors.* 7:3-14.
- Bae, G., D. Seo, H. Kwon, H. Lee, S. Hong, Z. Lee, K. Ha, Lee HW, and J. Han.** 1999. Hydrogen peroxide activates p70(S6k) signaling pathway. *J Biol Chem.* 274:32596-602.
- Bae, Y., S. Kang, M. Seo, I. Baines, E. Tekle, P. Chock, and S. Rhee.** 1997. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 272:217-21.
- Baeuerle, P., and D. Baltimore.** 1988. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell.* 53:211-7.
- Baeuerle, P., and T. Henkel.** 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 12:141-79.
- Beckman, J., M. Carson, C. Smith, and W. Koppenol.** 1993. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature.* 364:584.
- Beg, A., and A. J. Baldwin.** 1993. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev.* 7:2064-70.

- Behl, C., J. B. Davis, R. Lesley, and D. Schubert.** 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*. 77:817-827.
- Bergman P., M. Ustav, J. Sedman, J. Moreno-Lopez, B. Vennstrom, and U. Pettersson.** 1988. The E5 gene of bovine papillomavirus type 1 is sufficient for complete oncogenic transformation of mouse fibroblasts. *Oncogene*. 2:453-9.
- Boissy, R., L. Trinkle, and J. Nordlund.** 1989. Separation of pigmented and albino melanocytes and the concomitant evaluation of endogenous peroxide content using flow cytometry. *Cytometry*. 10:779-87.
- Boscoboinik, D., A. Szewczyk, and A. Azzi.** 1991. Alpha-tocopherol (vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity. *Arch Biochem Biophys*. 286:264-9.
- Brigelius-Flohe, R., and M. Traber.** 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*. 13:1145-55.
- Brown, L., M. Detmar, K. Claffey, J. Nagy, D. Feng, A. Dvorak, and H. Dvorak.** 1997. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS*. 79:233-69.
- Burdon, R., V. Gill, and C. Rice-Evans.** 1990. Oxidative stress and tumour cell proliferation. *Free Radic Res Commun*. 11:65-76.
- Burdon, R. H.** 1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med*. 18:775-94.
- Burkhardt, A., M. Willingham, C. Gay, K. T. Jeang, and R. Schlegel.** 1989. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology*. 170:334-339.
- Burnett, S., N. Jareborg, and D. DiMaio.** 1992. Localization of bovine papillomavirus type 1 E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:5665-9.
- Burton, G. W., and K. U. Ingold.** 1986. Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res*. 19:194-201.
- Cachia, O., J. Benna, E. Pedruzzi, B. Descomps, M. Gougerot-Pocidallo, and C. Leger.** 1998. alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem*. 273:32801-5.
- Cantley, L., K. Auger, C. Carpenter, B. Duckworth, A. Graziani, R. Kapeller, and S. Soltoff.** 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell*. 64:281-302.
- Carpenter, C., and L. Cantley.** 1990. Phosphoinositide kinases. *Biochemistry*. 29:11147-56.
- Carpenter, C., and L. Cantley.** 1996. Phosphoinositide 3-kinase and the regulation of cell growth. *Biochim Biophys Acta*. 1288:M11-6.
- Chang, L., J. Slot, H. Geuze, and J. Crapo.** 1988. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol*. 107:2169-79.
- Chatelain, E., D. Boscoboinik, G. Bartoli, V. Kagan, F. Gey, L. Packer, and A. Azzi.** 1993. Inhibition of smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity by tocopherols and tocotrienols. *Biochim Biophys Acta*. 1176:83-9.

- Chiao, P., S. Miyamoto, and I. Verma.** 1994. Autoregulation of I kappa B alpha activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:28-32.
- Christen, S., A. Woodall, M. Shigenaga, P. Southwell-Keely, M. Duncan, and B. Ames.** 1997. gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:3217-22.
- Chua, C., R. Hamdy, and B. Chua.** 1998. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 25:891-7.
- Church, S., D. Farmer, and D. Nelson.** 1992. Induction of manganese superoxide dismutase in cultured human trophoblast during in vitro differentiation. *Dev Biol.* 149:177-84.
- Church, S. L.** 1990. Manganese superoxide dismutase: nucleotide and deduced amino acid sequence of a cDNA encoding a new human transcript. *Biochim. Biophys. Acta.* 1087:250-252.
- Church, S. L., J. W. Grant, L. A. Ridnour, L. W. Oberley, P. E. Swanson, P. S. Meltzer, and J. M. Trent.** 1993. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:3113-7.
- Cross, A., and O. Jones.** 1991. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta.* 1057:281-98.
- Dang, C., and G. Semenza.** 1999. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci.* 24:68-72.
- Darby Weydert, C., B. Smith, L. Xu, K. Kregel, J. Ritchie, C. Davis, and L. Oberley.** 2003. Inhibition of oral cancer cell growth by adenovirusMnSOD plus BCNU treatment. *Free Radic Biol Med.* 34:316-29.
- Datta, K., S. Biswal, and J. Kehrer.** 1999. The 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) inhibitor, MK886, induces apoptosis independently of FLAP. *Biochem J.* 340:371-5.
- De La Torre, R., A. Casado, E. Lopez-Fernandez,, D. Carrascosa, V. Ramirez, and J. Saez.**1996. Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy 21. *Experientia.* 52:871-3.
- Dethlefsen, S. M., D. Shepro, and P. A. D'Amore.** 1994. Arachidonic acid metabolites in bFGF-, PDGF-, and serum-stimulated vascular cell growth. *Exp Cell Res.* 212:262-73.
- Devary, Y., C. Rosette, J. A. DiDonato, and M. Karin.** 1993. NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science.* 261:1442-5.
- DiMaio, D., and D. Mattoon.** 2001. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene.* 20:7866-73.
- Ding, X., C. Kuszynski, T. El-Metwally, and T. Adrian.** 1999. Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 266:392-9.
- Downward, J.** 1997. Role of phosphoinositide-3-OH kinase in Ras signaling. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 31:1-10.

- Dvoretzky, I., R. Shober, S. K. Chattopadhyay, and D. R. Lowy.** 1980. A quantitative in vitro focus assay for bovine papilloma virus. *Virology*. 103:369-75.
- Dyson, N., P. Howley, K. Munger, and E. Harlow.** 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 243:934-7.
- Esposito, L., S. Melov, A. Panov, B. Cottrell, and D. Wallace.** 1999. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:4820-5.
- Esterbauer, H., M. Dieber-Rotheneder, G. Striegl, and G. Waeg.** 1991. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr*. 53:314S-321S.
- Factor, V., D. Laskowska, M. Jensen, J. Voitach, N. Popescu, and S. Thorgeirsson.** 2000. Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:2196-201.
- Ferrara, N., and B. Keyt.** 1997. Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *EXS*. 79:209-32.
- Finkel, T.** 1998. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 10:248-53.
- Folkman, J.** 1971. Transplacental carcinogenesis by stilbestrol. *N Engl J Med*. 285.
- Forgac, M.** 1989. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev*. 69:765-96.
- Forgac, M.** 1992. Structure and properties of the coated vesicle (H⁺)-ATPase. *J Bioenerg Biomembr*. 24:341-50.
- Fridovich, I.** 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*. 201:875-80.
- Fujita, T., G. Nolan, S. Ghosh, and D. Baltimore.** 1992. Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kappa B. *Genes Dev*. 6:775-87.
- Furumoto, K., E. Inoue, N. Nagao, E. Hiyama, and N. Miwa.** 1998. Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci*. 63:935-48.
- Ghosh, J., and C. Myers.** 1998. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:13182-7.
- Goldstein, D. J., T. Andresson, J. J. Sparkowski, and R. Schlegel.** 1992. The BPV-1 E5 protein, the 16 kDa membrane pore-forming protein and the PDGF receptor exist in a complex that is dependent on hydrophobic transmembrane interactions. *Embo J*. 11:4851-9.
- Goldstein, D. J., W. Li, L. M. Wang, M. A. Heidaran, S. Aaronson, R. Shinn, R. Schlegel, and J. H. Pierce.** 1994. The bovine papillomavirus type 1 E5 transforming protein specifically binds and activates the beta-type receptor for the platelet-derived growth factor but not other related tyrosine kinase-containing receptors to induce cellular transformation. *J Virol*. 68:4432-41.
- Green, M., and P. M. Loewenstein.** 1987. Demonstration that a chemically synthesized BPV1 oncoprotein and its C-terminal domain function to induce cellular DNA synthesis. *Cell*. 51:795-802.

- Greenlund, L. J., T. L. Deckwerth, and E. M. Johnson, Jr.** 1995. Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron*. 14:303-15.
- Groner, Y., O. Elroy-Stein, K. B. Avraham, R. Yarom, M. Schickler, H. Knobler, and G. Rotman.** 1990. Down syndrome clinical symptoms are manifested in transfected cells and transgenic mice overexpressing the human Cu/Zn-superoxide dismutase gene. *J Physiol (Paris)*. 84:53-77.
- Gysin, R., A. Azzi, and T. Visarius.** 2002. Gamma-tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *FASEB J*. 16:1952-4.
- Harrison, D., K. Griendling, U. Landmesser, B. Hornig, and H. Drexler.** 2003. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 91:7A-11A.
- Henkel, T., T. Machleidt, I. Alkalay, M. Kronke, Y. Ben-Neriah, and P. A. Baeuerle.** 1993. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature*. 365:182-5.
- Higgins, K., J. Perez, T. Coleman, K. Dorshkind, W. McComas, U. Sarmiento, C. Rosen, and R. Narayanan.** 1993. Antisense inhibition of the p65 subunit of NF-kappa B blocks tumorigenicity and causes tumor regression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:9901-5.
- Hirata, F., and O. Hayaishi.** 1975. Studies on indoleamine 2,3-dioxygenase. I. Superoxide anion as substrate. *J Biol Chem*. 250:5960-6.
- Horwitz, B. H., A. L. Burkhardt, R. Schlegel, and D. DiMaio.** 1988. 44-amino-acid E5 transforming protein of bovine papillomavirus requires a hydrophobic core and specific carboxyl-terminal amino acids. *Mol Cell Biol*. 8:4071-8.
- Hu, Y., D. Rosen, Y. Zhou, L. Feng, G. Yang, J. Liu, and P. Huang.** 2005. Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *J Biol Chem*. 280:39485-92.
- Janssen, A. M., C. B. Bosman, L. Kruidenier, G. Griffioen, C. B. Lamers, J. H. van Krieken, C. J. van de Velde, and H. W. Verspaget.** 1999. Superoxide dismutases in the human colorectal cancer sequence. *J Cancer Res Clin Oncol*. 125:327-35.
- Janssen, A. M., C. B. Bosman, W. van Duijn, M. M. Oostendorp-van de Ruit, F. J. Kubben, G. Griffioen, C. B. Lamers, J. H. van Krieken, C. J. van de Velde, and H. W. Verspaget.** 2000. Superoxide dismutases in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 6:3183-92.
- Kane, D. J., T. J. Sarafian, R. Anton, H. Hahn, E. B. Gralla, J. S. Valentine, and D. E. Bredesen.** 1995. Bcl-2 inhibition of neuronal death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*. 262:1274-1277.
- Kaplan, D., M. Whitman, B. Schaffhausen, D. Pallas, M. White, L. Cantley, and T. Roberts.** 1987. Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity. *Cell*. 50:1021-9.
- Karo, L.** 2005. Veiste papilloomiviiruse tüüp 1 ja tema E5 valgu poolt aktiveeritavate transformatsiooniteede uurimine. Bakalaureusetöö.

- Kazlauskas, A.** 1994. Receptor tyrosine kinases and their targets. *Curr Opin Genet Dev.* 4:5-14.
- Kilk, A., K. Rausalu, and M. Ustav.** 2006. Bovine papillomavirus type 1 oncoprotein E5 stimulates the utilization of superoxide radicals in the mouse fibroblast cell line C127. *Chem Biol Interact.* 159:205-12.
- Kilk, A., T. Talpsepp, U. Vali, and M. Ustav.** 1996. Bovine papillomavirus oncoprotein E5 induces the NF kappa B activation through superoxide radicals. *Biochem Mol Biol Int.* 40:689-97.
- Kinnula, V., and J. Crapo.** 2004. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med.* 36:718-44.
- Klein, O., G. W. Polack, T. Surti, D. Kegler-Ebo, S. O. Smith, and D. DiMaio.** 1998. Role of glutamine 17 of the bovine papillomavirus E5 protein in platelet-derived growth factor beta receptor activation and cell transformation. *J Virol.* 72:8921-32.
- Kong, G., L. Shang, and K. Kyung-Soo.** 2001. Inhibition of rac1 reduces PDGF-induced reactive oxygen species and proliferation in vascular smooth muscle cells. *J. Korean Med. Sci.* 16:712-718.
- Kopp, E., and S. Ghosh.** 1994. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science.* 265:956-9.
- Kulke, R., and D. DiMaio.** 1991. Biological properties of the deer papillomavirus E5 gene in mouse C127 cells: growth transformation, induction of DNA synthesis, and activation of the platelet-derived growth factor receptor. *J Virol.* 65:4943-9.
- Kulke, R., B. H. Horwitz, T. Zibello, and D. DiMaio.** 1992. The central hydrophobic domain of the bovine papillomavirus E5 transforming protein can be functionally replaced by many hydrophobic amino acid sequences containing a glutamine. *J Virol.* 66:505-11.
- Kurg, R., K. Sild, A. Ilves, M. Sepp, and M. Ustav.** 2005. Association of bovine papillomavirus E2 protein with nuclear structures in vivo. *J Virol.* 79:10528-39.
- Lai, C., A. Edwards, and D. DiMaio.** 2005. Productive interaction between transmembrane mutants of the bovine papillomavirus E5 protein and the platelet-derived growth factor beta receptor. *J Virol.* 79:1924-9.
- Lancaster, W., and C. Olson.** 1982. Animal papillomaviruses. *Microbiol Rev.* 46:191-207.
- Lebovitz, R., H. Zhang, I. H. Voge, J. J. Cartwright, L. Dionne, N. Lu, S. Huang, and M. Matzuk.** 1996. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:9782-7.
- Lehtonen, J. Y., J. M. Holopainen, and P. K. Kinnunen.** 1996. Activation of phospholipase A2 by amyloid beta-peptides in vitro. *Biochemistry.* 35:9407-14.
- Lelkes, P., K. Hahn, D. Sukovich, S. Karmioli, and D. Schmidt.** 1998. On the possible role of reactive oxygen species in angiogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 454:295-310.
- Lenardo, M., and D. Baltimore.** 1989. NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell.* 58:227-9.

- Li, N., T. Oberley, L. Oberley, and W. Zhong.** 1998. Overexpression of manganese superoxide dismutase in DU145 human prostate carcinoma cells has multiple effects on cell phenotype. *Prostate*. 35:221-33.
- Lin, K., S. Lee, R. Narayanan, J. Baraban, J. Hardwick, and R. Ratan.** 1995. Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-kappa B. *J Cell Biol*. 131:1149-61.
- Lin, L., A. Lin, and J. Knopf.** 1992. Cytosolic phospholipase A2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:6147-51.
- Lin, S., S. Shyue, M. Shih, T. Chu, Y. Chen, H. Ku, J. Chen, K. Tam, and Y. Chen.** 2006. Superoxide dismutase and catalase inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced human aortic smooth muscle cell proliferation: Role of cell-cycle regulation, mitogen-activated protein kinases, and transcription factors. *Atherosclerosis*. Apr 4; [Epub ahead of print].
- Liu, R., L. W. Oberley, and T. D. Oberley.** 1997a. Transfection and expression of MnSOD cDNA decreases tumor malignancy of human oral squamous carcinoma SCC-25 cells. *Hum. Gene Ther*. 8:585-595.
- Liu, S., X. Lin, D. Shi, J. Cheng, C. Wu, and Y. Zhang.** 2002. Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways. *Arch Biochem Biophys*. 406:173-82.
- Liu, Y., B. Chen, C. Chen, T. Arakawa, T. Yoshimoto, S. Yamamoto, and W. Chang.** 1997b. Epidermal growth factor enhances transcription of human arachidonate 12-lipoxygenase in A431 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1344:38-46.
- Lu, M., X. Gong, Y. Lu, J. Guo, C. Wang, and Y. Pan.** 2006. Molecular Cloning and Functional Characterization of a Cell-permeable Superoxide Dismutase Targeted to Lung Adenocarcinoma Cells: INHIBITION CELL PROLIFERATION THROUGH THE Akt/p27kip1 PATHWAY. *J Biol Chem*. 281:13620-7.
- Mandel, M., Y. Moriyama, J. Hulmes, Y. Pan, H. Nelson, and N. Nelson.** 1988. cDNA sequence encoding the 16-kDa proteolipid of chromaffin granules implies gene duplication in the evolution of H⁺-ATPases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:5521-4.
- Maraldi, N. M., S. Santi, N. Zini, A. Ognibene, R. Rizzoli, G. Mazzotti, R. Di Primio, R. Bareggi, V. Bertagnolo, C. Pagliarini, and et al.** 1993. Decrease in nuclear phospholipids associated with DNA replication. *J Cell Sci*. 104:853-9.
- Marklund, S. L., N. G. Westman, E. Lundgren, and G. Roos.** 1982. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res*. 42:1955-61.
- Marone, M., G. Bonanno, S. Rutella, G. Leone, G. Scambia, and L. Pierelli.** 2002. Survival and cell cycle control in early hematopoiesis: role of bcl-2, and the cyclin dependent kinase inhibitors P27 and P21. *Leuk Lymphoma*. 43:51-7.

- Meyer, A. N., Y. F. Xu, M. K. Webster, A. E. Smith, and D. J. Donoghue.** 1994. Cellular transformation by a transmembrane peptide: structural requirements for the bovine papillomavirus E5 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:4634-8.
- Mingarro, I., E. Perez-Paya, C. Pinilla, J. R. Appel, R. A. Houghten, and S. E. Blondelle.** 1995. Activation of bee venom phospholipase A2 through a peptide-enzyme complex. *FEBS Lett.* 372:131-4.
- Nakahara, H., T. Kanno, Y. Inai, K. Utsumi, M. Hiramatsu, A. Mori, and L. Packer.** 1998. Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Radic Biol Med.* 24:85-92.
- Natarajan, V., M. Taher, B. Roehm, N. Parinandi, H. Schmid, Kiss. Z, and G. JG.** 1993. Activation of endothelial cell phospholipase D by hydrogen peroxide and fatty acid hydroperoxide. *J Biol Chem.* 268:930-7.
- Neuzil, J., T. Weber, A. Schroder, M. Lu, G. Ostermann, N. Gellert, G. C. Mayne, B. Olejnicka, A. Negre-Salvayre, M. Sticha, R. J. Coffey, and C. Weber.** 2001. Induction of cancer cell apoptosis by alpha-tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements. *FASEB J.* 15:403-15.
- Nilson, L. A., R. L. Gottlieb, G. W. Polack, and D. DiMaio.** 1995. Mutational analysis of the interaction between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and the endogenous beta receptor for platelet-derived growth factor in mouse C127 cells. *J Virol.* 69:5869-74.
- Oberley, I. W., and G. R. Buettner.** 1979. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res.* 39:1141-1149.
- Oberley, L., and T. Oberley.** 1988. Role of antioxidant enzymes in cell immortalization and transformation. *Mol Cell Biochem.* 84:147-53.
- Orr, W., and R. Sohal.** 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science.* 263:1128-30.
- Pachernik, J., A. Hampl, K. Soucek, M. Kovarikova, Z. Andrysik, J. Hofmanova, and A. Kozubik.** 2002. Multiple biological effects of inhibitors of arachidonic acid metabolism on human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 293:626-33.
- Pahl, H. L., and P. A. Baeuerle.** 1994. Oxygen and the control of gene expression. *Bioessays.* 16:497-502.
- Pentland, A., A. Morrison, S. Jacobs, L. Hruza, J. Hebert, and L. Packer.** 1992. Tocopherol analogs suppress arachidonic acid metabolism via phospholipase inhibition. *J Biol Chem.* 267:15578-84.
- Perez, J., K. Higgins-Sochaski, J. Maltese, and R. Narayanan.** 1994. Regulation of adhesion and growth of fibrosarcoma cells by NF-kappa B RelA involves transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol.* 14:5326-32.
- Petti, L., and D. DiMaio.** 1992. Stable association between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and activated platelet-derived growth factor receptor in transformed mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6736-40.
- Petti, L., L. A. Nilson, and D. DiMaio.** 1991. Activation of the platelet-derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *Embo J.* 10:845-55.
- Piomelli, D.** 1993. Arachidonic acid in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 5:274-80.

- Punnonen, K., M. Ahotupa, K. Asaishi, M. Hyoty, R. Kudo, and R. Punnonen.** 1994. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 120:374-7.
- Rawls, J. A., P. M. Loewenstein, and M. Green.** 1989. Mutational analysis of bovine papillomavirus type 1 E5 peptide domains involved in induction of cellular DNA synthesis. *J Virol.* 63:4962-4.
- Ricciarelli, R., A. Tasinato, S. Clement, N. Ozer, D. Boscoboinik, and A. Azzi.** 1998. alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem J.* 334:243-9.
- Rosenkranz, A., S. Schmaldienst, K. Stuhlmeier, W. Chen, W. Knapp, and G. Zlabinger.** 1992. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J Immunol Methods.* 156:39-45.
- Safford, S., T. Oberley, M. Urano, and D. St Clair.** 1994. Suppression of fibrosarcoma metastasis by elevated expression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 54:4261-5.
- Schapiro, F., J. Sparkowski, A. Adduci, F. Supryniewicz, R. Schlegel, and S. Grinstein.** 2000. Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Cell Biol.* 148:305-15.
- Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley.** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63:1129-36.
- Schenk, H., M. Klein, W. Erdbrugger, W. Droge, and K. Schulze-Osthoff.** 1994. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:1672-6.
- Scheurer, M. E., G. Tortolero-Luna, and K. Adler-Storthz.** 2005. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer.* 15:727-46.
- Schlegel, R., M. Wade-Glass, M. S. Rabson, and Y. C. Yang.** 1986. The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide. *Science.* 233:464-7.
- Schreck, R., K. Albersmann, and P. A. Baeuerle.** 1992. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun.* 17:221-37.
- Schreck, R., P. Rieber, and P. Baeuerle.** 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10:2247-58.
- Schulze-Osthoff, K., R. Beyaert, V. Vandevorde, G. Haegeman, and W. Fiers.** 1993. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *Embo J.* 12:3095-104.
- Shepherd, P., D. Withers, and K. Siddle.** 1998. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J.* 333:471-90.
- Sherr, C.** 1994. Growth factor-regulated G1 cyclins. *Stem Cells.* 12:47-57.
- Shi, D.-Y., Y.-R. Deng, S.-L. Liu, Y.-D. Zhang, and L. Wei.** 2003. Redox stress regulates cell proliferation and apoptosis of human hepatoma through Akt protein phosphorylation. *FEBS Letters.* 542:60-64.

- Shimizu, S., M. Nomoto, T. Yamamoto, and K. Momose.** 1994. Reduction by NG-nitro-L-arginine of H₂O₂-induced endothelial cell injury. *Br J Pharmacol.* 113:564-8.
- Shono, T., M. Ono, H. Izumi, S. Jimi, K. Matsushima, T. Okamoto, K. Kohno, and M. Kuwano.** 1996. Involvement of the transcription factor NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 16:4231-9.
- Siebenlist, U., G. Franzoso, and K. Brown.** 1994. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol.* 10:405-55.
- Simon, A., U. Rai, B. Fanburg, and B. Cochran.** 1998. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol.* 275:C1640-52.
- Soltoff, S., C. Carpenter, K. Auger, R. Kapeller, B. Schaffhausen, and L. Cantley.** 1992. Phosphatidylinositol-3 kinase and growth regulation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 57:75-80.
- Sousa, R., N. Dostatni, and M. Yaniv.** 1990. Control of papillomavirus gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 1032:19-37.
- Sparkowski, J., J. Anders, and R. Schlegel.** 1994. Mutation of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein at amino acid 17 generates both high- and low-transforming variants. *J Virol.* 68:6120-3.
- Sparkowski, J., M. Mense, J. Anders, and R. Schlegel.** 1996. E5 oncoprotein transmembrane mutants dissociate fibroblast transforming activity from 16-kilodalton protein binding and platelet-derived growth factor receptor binding and phosphorylation. *J Virol.* 70:2420-30.
- Szatrowski, T., and C. Nathan.** 1991. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 51:794-8.
- St. Clair, D. K., X. S. Wan, M. Kuroda, S. Vichitbandha, E. Tsuchida, and M. Urano.** 1997. Suppression of tumor metastasis by manganese superoxide dismutase is associated with reduced tumorigenicity and elevated fibronectin. *Oncol. Rep.* 4:753-757.
- Staebler, A., J. Pierce, S. Brazinski, M. Heidaran, W. Li, R. Schlegel, and D. Goldstein.** 1995. Mutational analysis of the beta-type platelet-derived growth factor receptor defines the site of interaction with the bovine papillomavirus type 1 E5 transforming protein. *J Virol.* 69:6507-17.
- Suh, Y. A., R. S. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, A. B. Chung, K. K. Griendling, and J. D. Lambeth.** 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature.* 401:79-82.
- Sun, S. C., P. A. Ganchi, D. W. Ballard, and W. C. Greene.** 1993. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science.* 259:1912-5.
- Sun, S. Z., X. S. Xie, and D. K. Stone.** 1987. Isolation and reconstitution of the dicyclohexylcarbodiimide-sensitive proton pore of the clathrin-coated vesicle proton translocating complex. *J. Biol. Chem.* 262:14790-14794.
- Sundaresan, M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani, and T. Finkel.** 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science.* 270:296-9.

- Supryniewicz, F. A., J. Sparkowski, A. Baege, and R. Schlegel.** 2000. E5 oncoprotein mutants activate phosphoinositide 3-kinase independently of platelet-derived growth factor receptor activation. *J Biol Chem.* 275:5111-9.
- Suzuki, Y., and L. Packer.** 1993. Inhibition of NF-kappa B activation by vitamin E derivatives. *Biochem Biophys Res Commun.* 193:277-83.
- Suzuki, Y., and L. Packer.** 1994. Inhibition of NF-kappa B transcription factor by catechol derivatives. *Biochem Mol Biol Int.* 32:299-305.
- Zhang, H. J., T. Yan, T. D. Oberley, and I. W. Oberley.** 1999. Comparison of effects of two polymorphic variants of manganese superoxide dismutase on human breast MCF-7 cancer cell phenotype. *Cancer Res.* 59:6276-6283.
- Zhang, Y., W. Zhao, H. J. Zhang, F. E. Domann, and L. W. Oberley.** 2002. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res.* 62:1205-12.
- Zhong, W., I. W. Oberley, T. D. Oberley, T. Yan, F. E. Domann, and D. K. St. Clair.** 1996. Inhibition of cell growth and sensitization to oxidative damage by overexpression of manganese superoxide dismutase in rat glioma cells. *Cell Growth Differ.* 7:1175-1186.
- Zhong, W., L. Oberley, T. Oberley, and D. St Clair.** 1997. Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Oncogene.* 14:481-90.
- Zhu, L., S. Fukuda, G. Cordis, D. Das, and N. Maulik.** 2001. Anti-apoptotic protein survivin plays a significant role in tubular morphogenesis of human coronary arteriolar endothelial cells by hypoxic preconditioning. *FEBS Lett.* 508:369-74.
- Zu, K., and C. Ip.** 2003. Synergy between selenium and vitamin E in apoptosis induction is associated with activation of distinctive initiator caspases in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 63:6988-95.
- zur Hausen, H.** 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2:342-50.
- Tada, A., H. Sekine, T. Yamamoto, A. Fuse, and B. Simizu.** 1989. Characterization of bovine papillomavirus type 1-transformed clones which show distinct transformed phenotypes. *J Gen Virol.* 70:1593-9.
- Takahashi, Y., Y. Ogra, and K. T. Suzuki.** 2004. Synchronized generation of reactive oxygen species with the cell cycle. *Life Sci.* 75:301-11.
- Tappel, A. L.** 1962. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitam. Horm.* 20:493-510.
- Thanos, D., and T. Maniatis.** 1995. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell.* 80:529-32.
- Thomas, K.** 1996. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem.* 271:603-6.
- Toker, A., and L. Cantley.** 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature.* 387:673-6.
- Upston, J., A. Terentis, and R. Stocker.** 1999. Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *FASEB J.* 13:977-94.

- Wan, C., E. Myung, and B. Lau.** 1993. An automated micro-fluorometric assay for monitoring oxidative burst activity of phagocytes. *J Immunol Methods*. 159:131-8.
- Wang, L., D. Medan, R. Mercer, D. Overmiller, S. Leornard, V. Castranova, X. Shi, M. Ding, C. Huang, and Y. Rojanasakul.** 2003. Vanadium-induced apoptosis and pulmonary inflammation in mice: Role of reactive oxygen species. *J Cell Physiol*. 195:99-107.
- Venkateswaran, V., N. Fleshner, and L. Klotz.** 2002. Modulation of cell proliferation and cell cycle regulators by vitamin E in human prostate carcinoma cell lines. *J Urol*. 168:1578-82.
- Werness, B., A. Levine, and P. Howley.** 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 248:76-9.
- Wispe, J., J. Clark, M. Burhans, K. Kropp, T. Korfhagen, and J. Whitsett.** 1989. Synthesis and processing of the precursor for human manganosuperoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta*. 994:30-6.
- Wong, G., and D. Goeddel.** 1988. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science*. 242:941-4.
- Väli, Ü., A. Kilk, and M. Ustav.** 2001. Bovine papillomavirus oncoprotein E5 affects the arachidonic acid metabolism in cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 33:227-35.
- Yan, T., L. Oberley, W. Zhong, and D. St Clair.** 1996. Manganese-containing superoxide dismutase overexpression causes phenotypic reversion in SV40-transformed human lung fibroblasts. *Cancer Res*. 56:2864-71.
- Yasuda, M., Y. Ohzeki, S. Shimizu, S. Naito, A. Ohtsuru, T. Yamamoto, and Y. Kuroiwa.** 1999. Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life Sci*. 64:249-58.
- <http://bilbo.bio.purdue.edu/~baker/projects/papova/papilloma/bpv.html>
- <http://jvi.asm.org/content/vol72/issue3/images/large/jv0381722001.jpeg>