

Yeast two-hybrid system을 이용한 Ref-1 (redox factor-1) 결합 단백질의 분리 및 동정

이수복 · 김규원¹ · 배문경 · 배명호 · 정주원 · 안미영 · 김영진*

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과, ¹서울대학교 약학대학 생화학교실

Received November 5, 2003 / Accepted November 26, 2003

Detection of Ref-1 (Redox factor-1) Interacting Protein Using the Yeast Two-hybrid System. Su-Bog Yee, Kyu-won Kim¹, Moon-Kyoung Bae, Myung-Ho Bae, Joo-Won Jeong, Mee-Young Ahn and Yung-Jin Kim*. Department of Molecular Biology, Pusan National University., 609-735, Korea, ¹College of Pharmacy, Seoul National University., 151-742, Korea – Redox factor-1 (Ref-1), known as a redox regulator, controls the DNA binding of AP-1 and is activated in HT29 colon cancer cells by hypoxia *in vitro*. REF-1 also increases the DNA binding affinity of Hypoxia-inducible Factor-1 α (HIF-1 α), HIF-like Factor (HLF) and early growth response-1 (Egr-1) which induce expression of the genes involved in angiogenesis, so that we speculate that REF-1 may play a role in hypoxia-induced angiogenesis. In this research we tried to detect novel proteins interacting with REF-1 using Yeast two-hybrid system using full-length REF-1 cDNA as bait. As result of such screening we detected 3 positive clones. DNA sequencing and GeneBank search revealed that one of the clones contained the same sequences as *M.musculus* cDNA for thioredoxin.

Key words – Redox-factor-1(REF-1), hypoxia, angiogenesis, Yeast Two-Hybrid assay

최근의 많은 보고들에 의하면 세포의 증식, 분화, 유전자 발현, 세포사 등 세포 내 다양한 현상들이 세포 내의 reduction-oxidation (redox) state에 의해 조절되고 있음이 밝혀지고 있다[1,5,10,11,20-26]. 세포의 redox 상태는 신호전달 그리고 유전자 발현과 직접적으로 관계하고 있으며, 유전자 발현과 신호전달 경로에 존재하는 단백질의 cystein의 CH₂-SH을 변형시키는 reactive oxygen species (ROS)의 활성화와 연관성이 매우 크다. ROS는 미토콘드리아의 ATP 생산으로부터 생성된 부산물로서 superoxide anion (O₂⁻), H₂O₂, hydroxyl radical (OH[•])와 같은 것들이 여기에 해당한다.

세포는 ROS의 양적증가에 대하여 세포의 redox 상태를 유지하는데 필요한 몇가지의 anti-oxidizing 혹은 reducing system을 가지고 있다. 즉 H₂O₂는 catalase에 의해 H₂O로 변환될 수 있으며, 모든 진핵세포에 존재하는 major cellular reductant인 glutathione (GSH)은 GSH peroxidase의 작용을 받아 H₂O나 다른 종류의 peroxidase를 H₂O로 환원시킬 수 있다. 또한 conserved active site sequence에 redox-active disulphide/dithiol을 가진 small multifunctional protein인 thioredoxin (TRX)은 H₂O₂를 포함한 ROS를 환원시킬 수 있는 능력을 가지고 있다. TRX는 redox protein인 REF-1을 통해[32] AP-1 heterodimer (Fos/Jun)를 활성화시킨다. 또한 p53 의존적인 p21의 발현이 TRX-REF-1 cascade에 의해 활성화되며[14], p53은 DNA 손상을 회복시키기 위한 시간을 세포에 제공하기 위해 G1 arrest를 유도한다. TRX는 oxidative stress로

인하여 생성되어 핵내로 이동된 후 REF-1과 결합하여 p53의 기능을 자극한다고 생각되고 있다[14]. 이는 REF-1이 p53의 activator로서 분리되었고, *in vivo*에서 p53을 transactivation 함이 관찰되었다는 보고[9]와 REF-1의 주된 역할이 redox mechanism을 통한 p53 활성화에 있으며, 이는 p53과 REF-1이 직접적으로 결합하여 이루어진다고 한 보고[13]에 의해서도 뒷받침된다.

TRX와의 관계에서 상기한 바와 같이 Ref-1은 원래 apurinic/aprimidinic endonuclease activity를 나타내는[4, 19] DNA 회복 효소이다. Ref-1은 ubiquitous한 핵단백질로 activator protein-1 (AP-1)의 activator로 분리되었다. Ref-1은 Fos와 Jun[28,29]에 있는 cystein 잔기를 환원함에 의해 AP-1의 DNA binding activity를 활성화시킨다. Ref-1은 DNA repair activity와 nuclear redox activity를 모두 갖는 단백질인 것이다. Nuclear redox activity는 ATF/cAMP-response element-binding protein family인 AP-1, NF- κ B, Myb와 hypoxia-inducible factor (HIF-1 α)[29], Pax protein의 DNA binding activity를 유도한다.

본 연구는 위의 일련의 보고들을 근거로 생체 redox 조절 유전자의 연구에 그 초점을 두었고, 특히 Ref-1에 의해서 그 cystein 잔기의 redox상태가 조절되는 AP-1의 활성이 hypoxia를 유도한 HT29 colon cancer cell에서 높아진다는 보고와[31], hypoxia-induced angiogenesis를 upregulation시키는 것으로 알려진 HIF-1 α , HLF, Egr-1 등의 전사인자들의 DNA binding affinity를 Ref-1이 높인다는 보고[1,2,7]로부터 Hypoxia-induced angiogenesis에 Ref-1이 관련하고 있으리라고 예상하고 있다. 따라서 Ref-1과 결합하여 angiogenesis를 조절하는 미지의 단백질들을 검출하고 이들 새로운 단백질들의 기능을

*Corresponding author

Tel : 051-510-2176, Fax : 051-513-9258

E-mail : yjinkim@pusan.ac.kr

밝히는 작업이 redox state에 의해 조절되는 유전자의 연구에 많은 도움이 될 것으로 판단되어, REF-1의 full length cDNA를 yeast two-hybrid system의 bait로 사용하여 Ref-1과 상호작용하는 새로운 redox 인자를 검출하고자 하였다.

재료 및 방법

Mouse REF-1 full length cDNA의 subcloning

Mouse의 REF-1 gene을 갖고 있는 cDNA clone (provided by Dr. David J Chan, Entrez accession number U12273)으로 mouse REF-1의 full length cDNA를 PCR을 수행하여 증폭한 후, pBHA plasmid에 subcloning하고 restriction enzyme mapping (*EcoRI*, *BamHI*)과 DNA sequencing으로 확인하였다. PCR은 95°C · 1min, 55°C · 1min, 72°C · 1min로 30 cycles 시행하였으며 사용한 cDNA는 5-50ng, 각 primer는 30 pmole 농도로 하였다. 사용한 primer의 각 염기서열은 pREF-S (sense): 5'-GAATTCATGCCAAAGCGGGAAAGAAAGC-3', pREF-As(antisense): 5'-GGATCC TCACAGTGCTAGGT-AAAGGGTG-3'이다.

Ref-1 bait 제작과 bait의 Self-activation test

bait로 사용할 cDNA는 full length REF-1 cDNA (1 bp-954 bp)를 DNA binding domain을 가지는 pGBT9 vector (GAL4 system : Clontech)에 insertion 시켰다. 먼저 bait로 사용할 Ref-1이 DNA binding domain만으로도 reporter gene의 발현을 유도하는지의 여부를 조사하기 위해 HF7C yeast strain을 사용하여 self-activation test를 실시하였다. HF7C에 bait DNA와 GAL4 activation domain 만을 가지는 벡터인 pBHA와 pGBT9를 각각 transformation 시킨 뒤, histidine이 결핍된 최소배지에서의 성장여부 (histidine growth)와 β -galactosidase 활성을 조사하였다.

Prey로 사용할 cDNA library의 준비

Mouse 11-day Embryo MATCHMAKER cDNA library (Clontech)를 library titring과정을 통해 independent colony들의 수가 3.5×10^6 개 되도록 large scale로 증폭하였다.

Library 및 Ref-1 bait vector의 yeast Transformation

Two-hybrid bait vector 및 library를 HF7C에 transform하기 위하여 cotransformation 방법을 이용하였다. YPD (2% pepton, 1% yeast extract, 2% glucose)에 yeast를 2~3시간 동안 30°C에서 배양하여 적당한 농도(OD₆₀₀=0.2)가 되게 한 후, cell을 모았다. 이렇게 모인

cell을 증류수로 washing하고 TE/ LiAc에 resuspension한다. 이렇게 준비된 competent cell에 bait vector와 herring sperm carrier DNA, library vector, PEG/LiAc를 섞어 30°C에서 30분간 배양한다. 10% DMSO를 첨가하여 42°C에서 15분간

heat shock을 준 후 ice 상에서 1~2분 배양하여 다시 cell을 모아 증류수나 TE에 resuspension하여 histidine, leucine, tryptophan이 결핍된 SD plate (6.7% nitrogen base, 2% glucose, 선택된 아미노산)에 spreading하여 30°C에서 3일간 배양시켰다.

β -Galactosidase assay

plate에서 자란 yeast transformant를 nitrocellulose filter membrane에 transfer하여 이 filter를 액체 질소에 30초간 담겼다. 이 filter를 5-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (0.32 mg/ml) (X-gal)를 함유하는 Z buffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaHPO₄, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl)에 적셔놓은 3M paper에 올려 30°C 또는 상온에서 방치시킨다. 1~2시간내에 푸른색으로 변하는 colony를 선택하였다.

Positive cDNA clone의 recovery와 E. coli electroporation

β -Galactosidase 활성을 띠는 transformant에서 bait vector를 제거하기 위해 leucine이 결핍된 SD 액체배지에 넣어 30°C에서 16시간 이상 배양시킨다. 이렇게 배양된 yeast를 모아서 lysis buffer에 resuspension시키고, 동량의 phenol/chloroform 및 1/3의 glass bead를 첨가한 후 vortex하여 yeast cell을 파쇄시킨다. 상층액에 100% 에탄올을 첨가하여 yeast DNA를 분리하였다. 분리된 yeast DNA를 desalting solution (100 mM glucose · 1% agarose)에 5 μ l loading하고 얼음에서 1시간 30분 동안 반응시켜 salt를 없앤다. 이후 미리 제작한 electrocompetent cell (*HB101*) 40 μ l와 DNA를 섞는다. 이 mixture를 electroporation용 cuvette에 넣은 뒤, electroporator에서 2.5 kV의 pulse를 10초 동안 주고, 이 반응물에 1 ml의 LB media를 넣고 1시간 동안 37°C에서 regeneration 시켜준 뒤 LB-ampicillin plate에 spreading 하였다.

결 과

Yeast two-hybrid를 이용한 REF-1 binding cDNA clone의 탐색 및 분리

Yeast two-hybrid assay에서 bait로 사용할 full length REF-1 cDNA를 pBHA vector의 *EcoRI*/*BamHI* 자리에 ligation한 후 *HB101*에 transformation하고 ampicillin 저항성 transformant 5개를 무작위로 선발하여 *EcoRI*/*BamHI* digestion을 통하여 재조합 plasmid를 확인하였다. 그 결과 5개 plasmid 모두 full length REF-1 insert를 가지고 있음을 확인하였다 (Fig. 1). 다음 bait로 사용할 Ref-1이 DNA binding domain만으로도 reporter gene의 발현을 유도하는지의 여부를 조사하기 위해 HF7C yeast strain을 사용하여 self-activation test를 실시하였다. HF7C에 bait DNA와 GAL4 activation domain만 가지는 벡터인 pBHA와 pGBT9를 각각 transformation 시킨 뒤, histidine growth와 β -galactosidase 활성을 조사하였다. 그 결과 full-length REF-1 bait DNA를 포함하고 있는 vector

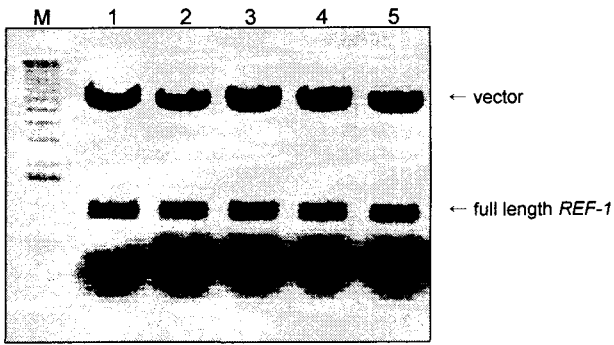


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the REF-1 recombinant plasmid. The plasmid DNAs were digested with *EcoRI* and *BamHI* prior to electrophoresis. M, 1 kb ladder; Lane 1~5, recombinant plasmid DNAs isolated from independent transformants.

와 GAL4 activation domain 만을 가지는 vector만으로는 self-activation 효과가 전혀 없음을 확인하였다(data not shown).

그리고 증폭한 prey cDNA library의 insert를 조사하기 위하여 transformant 6개를 무작위로 선택하여 plasmid DNA를 추출한 다음, *EcoRI*와 *XhoI*으로 잘라서 insert의 크기를 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 1 kb에서 0.5 kb 정도의 insert가 확인이 되어 cDNA library의 제조상태가 양호함을 확인하였다.

Ref-1 단백질과 binding하는 단백질을 탐색하기 위하여 bait인 Ref-1을 포함하는 plasmid와 Mouse 11-day Embryo MATCHMAKER cDNA library (Clontech)를 HF7C yeast

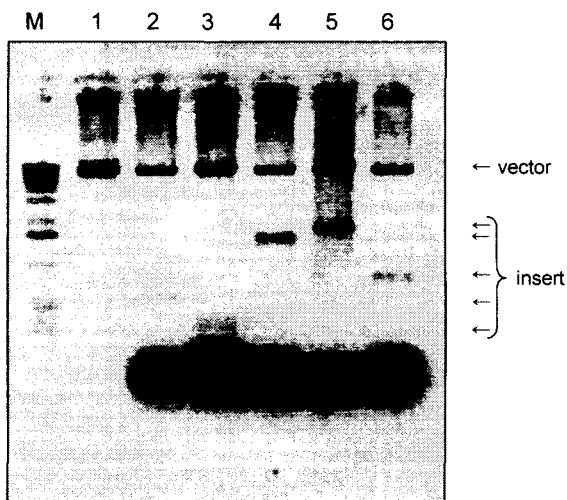


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids from amplified library. The plasmid DNAs were digested with *EcoRI* and *XhoI* prior to electrophoresis. M, 1 kb ladder; Lane 1~6, recombinant plasmid DNAs isolated from randomly selected colonies.

strain에 cotransform하여 histidine, leucine, tryptophan이 결핍된 SD plate에 도말하고, 30°C에서 배양하였다.

β-Galactosidase assay를 통한 REF-1과의 상호작용 조사

REF-1과 cotransform된 gene product가 Ref-1 단백질과 binding하면 Gal4 activation domain에 의해 β-galactosidase가 발현되게 된다. 발현된 β-galactosidase에 의해 배지에 함유된 5-bromo-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-gal)이 분해되어 colony가 푸른색을 띠게 된다. 이러한 방법을 이용하여 yeast transformant를 nitrocellulose filter membrane에 transfer하고, X-gal를 함유하는 Z buffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaHPO₄, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl)에 적서넣은 3M paper에 올려 30°C 또는 상온에서 방치시킨다. 1-2시간내에 푸른색으로 변하는 16개의 colony들을 1차적으로 선택하였다(Fig. 3).

Positive clone의 insert 확인

푸른색을 띠는 colony에서 bait vector를 제거하기 위해 leucine이 결핍된 SD 액체배지에 넣어 배양시킨 후 cell을 모은 다음 glass bead를 넣고 vortex하여 yeast cell을 파쇄시키고 상층액속에 포함되어 있는 plasmid를 electrocompetent cell (HB101)에 electroporation시키고 LB-ampicillin plate에 spreading하였다. Transformant들로부터 plasmid를 추출하여 *EcoRI/XhoI* digestion으로 insert의 크기를 확인하였다. 그 결과 insert의 크기가 0.4, 0.7, 1.0 kb 세 종류로 분류되었다(Fig. 4). 또한 이들 세 종류의 insert들을 갖는 plasmid들을 각각 REF-1 plasmid와 HF7C yeast strain에 cotransform하여 β-galactosidase 활성을 보임을 다시 확인하였다(data not shown).

DNA sequencing을 통한 탐색한 cDNA clone의 분석

Ref-1 protein과 binding하는 clone으로 확인된 0.4, 0.7, 1.0 kb insert의 DNA 염기서열을 결정하고 그 염기서열을 Gene-Bank에서 검색한 결과 0.7 kb insert와 1.0 kb insert는 알려져

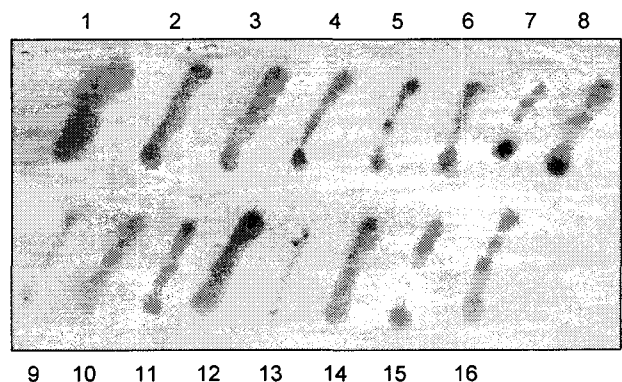


Fig. 3. Screening of REF-1 binding proteins using yeast two-hybrid assay.

Sixteen blue colonies were patched on the plate containing X-gal, and incubated for 2 hrs.

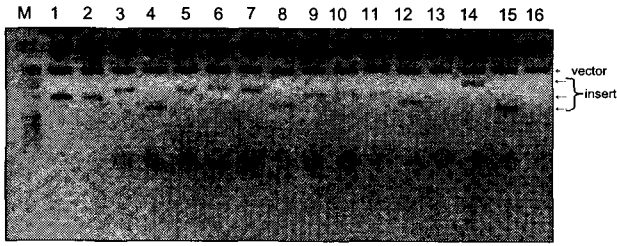


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids from 16 blue colonies.

The plasmid DNAs from the blue colonies were first transformed into HB101, and plasmid DNAs were isolated, and digested with *EcoRI* and *XhoI* prior to electrophoresis. M, 1 kb ladder; Lane 1~16, recombinant plasmid DNAs digested with *EcoRI* and *XhoI*.

지 않은 염기서열이었으나, 0.4 kb insert (p-clone1)의 염기서열은 Thioredoxin (TRX)과 일치함을 확인하였다(Fig. 5).

고찰

세포의 redox 상태는 유전자 발현과 신호전달 경로상에 존재하는 단백질의 cysteine의 CH₂-SH를 변형시키는 ROS (reactive oxygen species)의 활성화와 연관성이 매우 크다. ROS는 mitochondria의 산화적 인산화 반응의 부산물로 생성되는데, 그 종류로는 superoxide (O₂), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (OH·) 등이 있다. 생성된 ROS는 세포 내 단백질 및 유전자에 산화반응을 일으키는 산화스트레스 반응

을 유도할 뿐만 아니라, 나아가 세포노화 및 사멸, stroke, heart attack, acute inflammation [3,18] 등과 같은 다양한 병리현상에 관여하는 것으로 알려져 있다. 고농도의 ROS는 세포에 독성으로 작용하며, 세포내 구성성분-단백질, 지질, 핵산에 비가역적 산화적 손상을 초래한다.

그러나 최근 ROS가 단순히 생체구조에 산화적 손상을 유발할 뿐만 아니라, 생리학적으로 낮은 농도의 ROS는 세포내 신호전달, 전사조절, 세포사와 같은 과정에 중요하게 작용함이 밝혀졌다[23]. 낮은 농도의 ROS는 정상 세포 기능의 integral component를 형성하며, 대사과정과 nuclear factor *kB* (NF *kB*), activator protein 1 (AP-1)을 활성화시키는 신호전달에서 필수적인 second messenger로 작용하며[26], 세포성장과 분화, 감염, 면역반응에서 유전자 발현을 조절하는 것으로 밝혀지고 있다. 세포 내 신호전달과 유전자 발현 조절에 관여하는 몇몇 분자들은 산화적 손상을 일으키는 정도보다 낮은 농도의 ROS에 의해서도 민감하게 조절된다. 따라서 현재 많은 분자생물학적 연구부분에서 산화환원 상태의 감지기에 대해 초점이 맞춰지고 있다. 이러한 산화환원 감지 특성은 이들 단백질 cysteine 잔기의 CH₂-SH group에서의 전자흐름으로 설명된다. 산화제에 의한 protein disulfide bond 형성은 단백질의 불안정화를 초래하고 hydrophobic domain의 노출을 초래한다. 세포내 단백질의 thiol group은 산화에 대해 강력한 buffer 역할을 하는데, 이것은 높은 농도의 glutathione, thioredoxin 등이 세포내부가 환원적 환경으로 유지되도록 하는 것으로부터 생각될 수 있으며, 높은 thiol-disulfide oxidation potentials를 가진 protein thiol group만이 redox에 민감한 것으로 알려져 있다.

p-clone.1 :	1	ccatttccatctcgttctcgtgagacgcgtgtggctccctccccgcaacagccaaaatgg	60
MMTRX :	19	ccatttccatctcgttctcgtgagacgcgtgtggctccctccccgcaacagccaaaatgg	78
p-clone.1 :	61	tgaagctgatcgagagcaaggaagcttttcaggaggccctggccgcccgggagacaagc	120
MMTRX :	79	tgaagctgatcgagagcaaggaagcttttcaggaggccctggccgcccgggagacaagc	138
p-clone.1 :	121	ttgtcgtggaggacttctcgtcactggtgtggaccttgcaaatgatcaagcccttct	180
MMTRX :	139	ttgtcgtggaggacttctcgtcactggtgtggaccttgcaaatgatcaagcccttct	198
p-clone.1 :	181	tccattccctctgtgacaagtattccaatgtgggttcccttgaagtggatgtggatgact	240
MMTRX :	199	tccattccctctgtgacaagtattccaatgtgggttcccttgaagtggatgtggatgact	258
p-clone.1 :	241	gccaggatgttgctgcagactgtgaagtcaaatgcatgccgaccttccagttttataaaa	300
MMTRX :	259	gccaggatgttgctgcagactgtgaagtcaaatgcatgccgaccttccagttttataaaa	318
p-clone.1 :	301	agggtcaaaagtgggggagtctccgggtgctaacaaggaaaagcttgaagcctctatta	360
MMTRX :	319	agggtcaaaagtgggggagtctccgggtgctaacaaggaaaagcttgaagcctctatta	378
p-clone.1 :	361	ctgaatatgcctaataatcat	378
MMTRX :	379	ctgaatatgcctaataatcat	396

Fig. 5. Comparison of nucleotide sequence of p-clone1 and *M. musculus* thioredoxin cDNA. upper row: p-clone1 sequence; lower row: *M.musculus* thioredoxin cDNA (1bp-378 bp).

또한 thioredoxin에 의해서 REF-1의 활성이 조절된다는 보고 [25]에 비추어 Redox regulator로 알려져 있으며 angiogenesis 관련 전사인자들의 DNA binding activity를 높이는 것으로 알려진 Ref-1과 thioredoxin이 상호작용함은 angiogenesis가 세포내 redox state에 영향을 받고 있음을 시사한다. 이러한 산화환원 상태를 조절하는 유전자와 세포의 산화환원 상태에 따라 활성이 조절되는 단백질의 유전자에 대한 연구는 산화 스트레스에 대한 생체 방어기작을 연구하는데 기초 자료를 제공할 뿐만 아니라, 산화 스트레스로 인한 질병의 원인 규명 및 치료 등에도 크게 도움이 될 것이다.

요 약

본 연구는 redox regulator로 알려진 Ref-1 (Redox factor-1) 과 결합하는 새로운 단백질을 protein-protein interaction의 원리를 이용한 방법인 yeast two-hybrid assay로 검색, 동정하고, 검색된 단백질의 *in vitro*, *in vivo* 기능을 규명하는 데 그 목적을 두고, mouse 11-day Embryo cDNA library를 prey로, full length REF-1을 bait로 하여 yeast strain 인 HF7C에 cotransformation시킨 후 histidine, leucine, tryptophan이 결핍된 SD plate에서 키워 자란 yeast transformants를 β-galactosidase assay하여 screening하여 분리한 세 개의 clone 중 한 clone이 DNA sequencing으로 확인한 결과 mouse thioredoxin임을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 Post-Doc 연구지원비에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Bae, S. K., M. H. Bae, M. Y. Ahn, M. J. Son, Y. M. Lee, M. K., Bae, O. H. Lee, B. C. Park, and K. W. Kim. 1999. Egr-1 mediates transcriptional activation of IGF-II gene in response to hypoxia. *Cancer Res.* **59(23)**, 5989-5994.
2. Carrero, P., K. Okamoto, P. Coumailleau, S. O'Brien, H. Tanaka, and L. Poellinger. 2000. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol. Cell. Biol.* **20(1)**, 402-415.
3. Davis, D. W., D. A. Weidner, A. Holian, and D. J. McConkey. 2000. Nitric oxide-dependent activation of p53 suppresses bleomycin-induced apoptosis in the lung. *J. Exp. Med.* **192(6)**, 857-870.
4. Demple, B., T. Herman, and D. S. Chen. 1991. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 11450-11454.
5. Finkel, T. 1998. Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin.*

- Cell Biol.* **10**, 248-253.
6. Hirota, K., M. Matsui, S. Iwata, A. Nishiyama, K. Mori, and J. Yodoi. 1997. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and REF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 3633-3638.
7. Huang, R. P. and E. D. Adamson. 1993. Characterization of the DNA-binding properties of the early growth response-1 (Egr-1) transcription factor: evidence for modulation by a redox mechanism. *DNA Cell Biol.* **12(3)**, 265-273.
8. Iyer, V. R., M. B. Eisen, D. T. Ross, G. Schuler, T. Moore, J. C. F. Lee, J. M. Trent, L. M. Staudt, J. Jr. Hudson, M. S. Boguski, D. Shalon, D. Lashkari, D. Botstein, and P. O. Brown. 1999. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science.* **283(5398)**, 83-87.
9. Jayaraman, L., K. G. Murthy, C. Zhu, T. Curran, S. Xanthoudakis, and C. Prives. 1997. Identification of redox/repair protein REF-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev.* **11**, 558-570.
10. Kamata, H. and H. Hirata. 1999. Redox regulation of cellular signaling. *Cell Signal.* **11**, 1-14.
11. Kim, K. W., S. K. Bae, O. H. Lee, M. H. Bae, M. J. Lee, and B. C. Park. 1998. Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **58(2)**, 348-351.
12. Lee, O. H., Y. M. Kim, Y. M. Lee, E. J. Moon, D. J. Lee, J. H. Kim, K. W. Kim, and Y. G. Kwon. 1999. Sphingosine 1-Phosphate Induces Angiogenesis: Its Angiogenic Action and Signaling Mechanism in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264(3)**, 743-750.
13. Meira, L. B., D. L. Cheo, R. E. Hammer, D. K. Burns, A. Reis, and E. C. Friedberg. 1997. Genetic interaction between HAP1/REF-1 and p53. *Nat. Genet.* **17**, 145-149.
14. Nakamura, H., K. Nakamura, and J. Yodoi. 1997. Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 351-369.
15. Nakayama, H., I. C. Scott, and J. C. Cross. 1998. The transition to endore-duplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev. Biol.* **199(1)**, 150-163.
16. O'Reilly, M. S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W. S. Lane, E. Flynn, J. R. Birkhead, B. R. Olsen, and J. Folkman. 1997. Endostatin, an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* **88(2)**, 277-285.
17. Perou, C. M., S. S. Jeffrey, M. van de Rijn, C. A. Rees, M. B. Eisen, D. T. Ross, A. Pergamenschikov, C. F. Williams, S. X. Zhu, J. C. Lee, D. Lashkari, D. Shalon, P. O. Brown, and D. Botstein. 1999. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96(16)**, 9212-9217.
18. Richeux, F., M. Cascante, R. Ennamany, D. Sanchez, A. Sanni, D. Saboureau, and E. E. Creppy. 2000. Implications of oxidative stress and inflammatory process in the cytotoxicity of capsaicin in human endothelial cells: lack of DNA strand breakage. *Toxicology.* **147(1)**, 41-49.
19. Seki, S., K. Akiyama, S. Watanabe, M. Hatsushika, S. Ikeda,

- and K. Tsutsui, 1991. cDNA and deduced amino acid sequence of a mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) with significant homology to Escherichia coli exonuclease III. *J. Biol. Chem.* **266**, 20797-20802.
20. Semenza, G. L. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8(5)**, 588-594.
 21. Sen, C. K., and L. Packer. 1996. Antioxidant and detox regulation of gene transcription. *FASEB.* **10**, 709-720.
 22. Sen, C. K. 1998. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1747-1758.
 23. Sen, C. K., 2000. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr. Top. Cell Regul.* **36**, 1-30.
 24. Takagi, Y., A. Mitsui, A. Nishiyama, K. Nozaki, H. Sono, Y. Gon, N. Hashimoto and J. Yodoi. 1999. Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96(7)**, 4131-4136.
 25. Ueno, M., H. Masutani, R. J. Arai, A. Yamauchi, K. Hirota, T. Sakai, T. Inamoto, Y. Yamaoka, J. Yodoi, and T. Nikaido. 1999. Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol. Chem.* **274(50)**, 35809-35815.
 26. Vollgraf, U., M. Wegner, and C. Richter-Landsberg. 1999. Activation of AP-1 and nuclear factor-kappaB transcription factors is involved in hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes. *J Neurochem.* **73(6)**, 2501-2509.
 27. Walker, L. J., R. B. Craig, A. L. Harris, and I. D. Hickson. 1994. A role for the human DNA repair enzyme HAP1 in cellular protection against DNA damaging agents and hypoxic stress. *Nucleic Acids Res.* **22(23)**, 4884-4489.
 28. Xanthoudakis, S., and T. Curran, 1992. Identification and characterization of REF-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.* **11**, 653-665.
 29. Xanthoudakis, S., G. Miao, F. Wang, Y. C. E. Pan, and T. Curran. 1992. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.* **11(9)**, 3323-3335.
 30. Xanthoudakis, S., R. J. Smeyne, J. D. Wallace, and T. Curran. 1996. The redox/DNA repair protein, REF-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93(17)**, 8919-8923.
 31. Yao, K. S., S. Xanthoudakis, T. Curran, and P. J. O'Dwyer. 1994. Activation of AP-1 and of a nuclear redox factor, REF-1, in the response of HT29 colon cancer cells to hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* **14(9)**, 5997-6003.
 32. Yodoi, J., and T. Tursz, 1991. ADF, a growth-promoting factor derived from adult T cell leukemia and homologous to thioredoxin: involvement in lymphocyte immortalization by HTLV-I and EBV. *Adv. Cancer Res.* **57**, 381-411.