

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MIKROBIOLOOGIA JA VIROLOOGIA ÕPPETOOL

KRISTINA MÄEMETS

**Rakulise valgu Brd4 mõju BPV-1 E2 valgu
funktsioonidele viiruse elutsükli**

Magistritöö

Juhendaja: Ivar Ilves, *PhD*

Tartu 2005

SISUKORD

SISSEJUHATUS	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1. Papillomiviiruste üldiseloomustus	6
2. BPV-1 genoom: struktuur ja kodeeritavad valgud	7
3. BPV-1 DNA replikatsioon	11
4. BPV-1 E2 valgud	13
5. BPV-1 E2 ja Brd4	17
6. Brd4	19
EKSPERIMENTAALNE OSA	22
TÖÖ EESMÄRGID	22
MATERJAL JA METOODIKA	23
TULEMUSED	35
1. Inimese ja hiire Brd4CTD ja Brd4E2BD seostuvad BPV-1 E2-ga	35
2. Brd4CTD ja Brd4E2BD ei mõjuta E2BS-e sisaldavate plasmiidide stabiilset säilumist jagunevates rakkudes	37
3. Inimese Brd4CTD surub alla BPV-1 genoomi replikatsiooni C127 rakkudes	41
4. Brd4CTD surub maha BPV-1 E2 sõltuva transkriptsiooni aktivatsiooni C127 rakkudes	43
5. Brd4CTD surub maha BPV-1 amplifikatsioonilise replikatsiooni transientses süsteemis	47
6. Brd4CTD ei mõjuta polüoomiviiruse transientset replikatsiooni	49
7. BPV-1 amplifikatsioonilise replikatsiooni maha surumine minimaalselt <i>originilt</i> ei sõltu Brd4CTD ja E2 omavahelisest interaktsioonist	52
ARUTELU	56
KOKKUVÕTE	62
SUMMARY	63
KASUTATUD KIRJANDUS	64

SISSEJUHATUS

Viiruste eesmärk on oma geneetilist materjali paljundada ja levitada. Seejuures parasiteerivad nad peremeesrakkude metabolismil, kasutades selle replikatsioonisüsteemi ja –valke. Jagunevates rakkudes latentselt püsivate viiruste jaoks on oluline, et peale jagunemist säiliks nende genoom võimalikult paljudes tütarakkudes. Mitmed viirused (näiteks retroviirused) integreerivad oma genoomi peremeesraku kromosoomi, ning kindlustavad nii selle edasikandumise. Mõned teised viirused (näiteks papilloomiviirus, Epstein-Barr viirus, inimese herpesviirus 8) eksisteerivad rakkudes ekstrakromosomaalsete plasmiididena, mis tütarakkudesse pääsemiseks on seondunud peremeesraku kromosoomidele.

Juba mõnda aega on viroloogia õppetoolis uuritud veise papilloomiviiruse tüüp 1 (BPV-1) genoomi stabiilset säilumist jagunevates rakkudes. Viiruse enda poolt on selles protsessis vastutavaks E2 valk, millel on lisaks roll BPV-1 DNA replikatsioonil ja viiruse varajaste geenide transkriptsiooni aktivatsioonil. Viiruse genoomi sidumine peremeesraku kromatiinile on ilmselt kompleksne protsess, milles lisaks BPV-1 E2 valgule osalevad ka mitmed rakulised faktorid. Praeguseks on leitud vähemalt üks potentsiaalne kandidaat, BET valkude perekonda kuuluv Brd4, mis võiks olla BPV-1 E2 retseptoriks peremeesraku kromosoomidel. Brd4 sisaldab N-terminuses bromodomääne, millega kinnitub mitootilisele kromatiinile ning C-terminaalse osa kaudu seostub ta BPV-1 E2 valguga.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kas Brd4 on vajalik BPV-1 stabiilseks säilumiseks jagunevates rakkudes ning kuidas ta mõjutab E2 valgute teisi funktsioone. Kirjanduse osas antakse ülevaade BPV-1 replikatsioonist, E2 valgust ja tema rollist viiruse elutsükli erinevatel etappidel ning rakulisest Brd4 valgust.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia instituudis mikrobioloogia ja viroloogia õppetoolis. Juhendamise eest olen väga tänulik Ivar Ilvesele ja Mart Ustavile. Kasulike nõuannete ja igakülgse abi eest tänan Aare Abroid, Toomas Sillat, Meelis Kadajat, Kadri Janiksoni ning kogu ülejäänud viroloogia ja mikrobioloogia õppetooli inimesi.

KASUTATUD LÜHENDID

µl - mikroliter

µg - mikrogramm

AMF1 - aktivatsioonidomääni moduleeriv faktor 1 (*activation-domain modulating factor 1*)

ATP – adenosintrifosfaat

bp – aluspaar (*base pair*)

BPV-1 – veise papilloomiviirus tüüp 1 (*Bovine Papilloma Virus type 1*)

C- - karboksü- (terminus valkudel)

CHO – hiina hamstri ovaarium (*Chinese Hamster Ovary*)

CMV – tsütomegaloviirus (*Cytomegalovirus*)

DTT – ditiotreitool

E1BS – valgu E1 seostumiskoht (*E1 binding site*)

E2BS – valgu E2 seostumiskoht (*E2 binding site*)

CAP – kromosoomidega seotud valk (*chromosome-associated protein*)

CBP – CREB-ga seostuv valk (*CREB-binding protein*)

CIAP – vasika soole aluseline fosfataas (*calf intestine alkaline phosphatase*)

CTD – C-terminaalne domään (*C-terminal domain*)

E2BD – E2-ga seostuv domään (*E2 binding domain*)

E2C – E2 repressor

E2TA – E2 transaktivaator

EBV – Epstein Barr viirus (*Epstein Barr Virus*)

EDTA – etüleendiamiintetraädikhape

E2TR – E2 transkriptsioonirepressor

EBNA-1 – Epstein Barr viiruse tuuma antigeen 1 (*Epstein-Barr nuclear antigene 1*)

EBP2 – EBNA1-ga seostuv valk 2 (*EBNA1 binding protein 2*)

EGFP – pika elueaga roheliselt fluorestseeruv valk (*enhanced green fluorescent protein*)

FACS – fluorestsents aktiveeritud rakusorter (*fluorescence activated cell sorter*)

GAP – GTPaasi aktiveeriv valk (*GTPase activating protein*)

GNAT – GCN5-ga seotud N-atsetüültransferaas (*GCN5-related N-acetyltransferase*)

GST – *Glutathione S Transferase*

HHV8- inimese herpesviirus 8 (*Human Herpes Virus 8*)

HPV – inimese papilloomiviirus (*Human Papilloma Virus*)

FR – tandeemkorduste pere (*family repeats*)

Hsp – kuumašoki promootor (*heat shock promoter*)

HUNKI – hormonaalselt ülesreguleeritud *Neu*-ga seotud kinaas 1 (*hormonally upregulated Neu-associated kinase1*)

IP- immuunosadestamine (*immunoprecipitation*)

kD - kilodalton

LCR – pikk kontrollregioon (*Long Control Region*)

MME – minikromosoomi säilituselement (*Minichromosomal Maintenance Element*)

LANA – latentsusega seotud tumaantigeen (*latency-associated nuclear antigen*)

MCAP – mitootiliste kromosoomidega seotud valk (*mitotic chromosome-associated protein*)

MeCBP - metüleeritud CpG saari siduv valk (*methyl CpG binding protein 2*)

N- - amino- (terminus valkudel)

ng – nanogramm

NLS – tuuma lokalisatsiooni signaal (*nuclear localization signal*)

ORF – avatud lugemisraam (*open reading frame*)

ori – replikatsiooni alguspunkt

PBS – fosfaat puhverdatud sool

NUT – testise tuumavalk (*nuclear protein in testis*)

P/CAF – p300/CBP-ga seotud faktor (*p300/CBP-associated factor*)

PCNA – proliferatsioonirakkude tumaantigeen (*proliferating cell nuclear antigen*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

RFC – replikatsioonifaktor C (*replication factor C*)

RPA – replikatsioonivalk A (*replication protein A*)

rpm – pööret minutis (*revolutions per minute*)

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecylsulphate*)

SSC – naatriumkloriidi ja naatriumsitraadi lahus

TAE – Tris/atsetaat/EDTA puhver

SPA-1 – signaal-indutseeritud proliferatsiooniga seotud valk 1 (*signal-induced proliferation-associated protein 1*)

SV40 – Simiani Viirus 40

TAF250 – TBP-ga seotud faktor (*TBP-associated factor 250*)

TAP – tandemafiinsuupuhastamine (*tandem affinity purification*)

TBP – *TATA box binding protein*

TE – Tris-EDTA puhver

Tris – trishüdrosümetüülaminometaan

URR – ülemine regulaatorpiirkond (*Upstream Regulatory Region*)

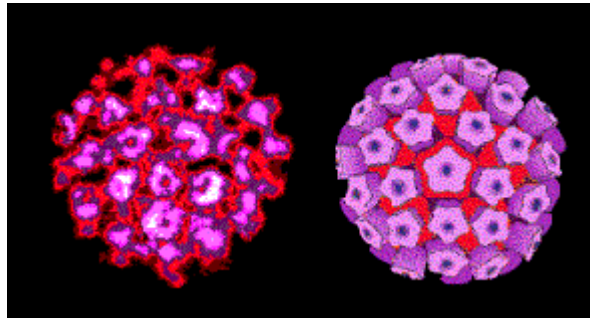
TFIIB – transkriptsioonifaktor II B (*transcription factor II B*)

wt – metsik tüüp (*wild type*)

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

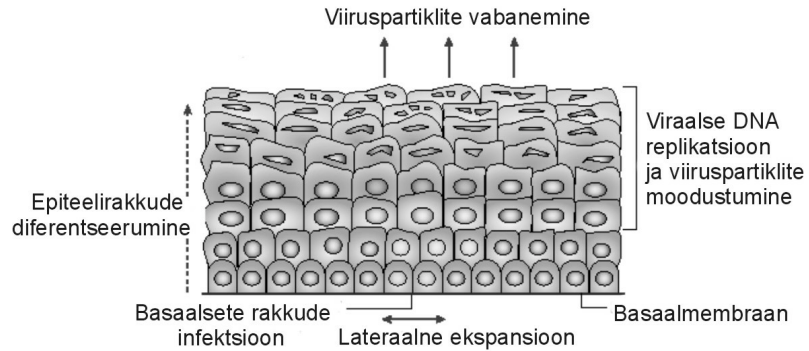
1. Papilloomiviiruste üldiseloomustus

Papilloomiviirused on väikesed DNA-viirused, mis moodustavad sugukonna *Papillomaviridae* (de Villiers *et al.*, 2004). Nad on looduses väga laialt levinud, nakatades paljude selgroogsete, sealhulgas inimese, epiteelkudesid. Praeguseks on identifitseeritud ligi 130 papilloomiviirust, neist enam kui 100-l on peremeheks inimene. Oma transformeerivate omaduste poolest on need viirused tuntud healoomuliste kasvajate (näiteks soolatüükad) tekitajatena. Seejuures on leitud seoseid ka teatud tüüpi papilloomiviiruste nakkuse ja pahaloomuliste kasvajate tekke vahel. Uurimuste kohaselt on üle 90% emakakaelavähi juhtudest seotud inimese papilloomiviiruse (HPV) tüüpide 16 ja 18 nakkusega.



Joonis 1. Värviline mudel papilloomiviiruse kapsiidist. Papilloomiviirused on ilma ümbriseta ikosaeedrilise kapsiidiga väikesed DNA viirused, mille partikli läbimõõt on 52-55 nm (bilbo.bio.purdue.edu/.../papova/papilloma/hpv_10810_big.gif).

Papilloomiviiruste replikatsioon, stabiilne püsimine rakkudes ning varaste ja hiliste geenide avaldumine on väga tihedalt seotud epiteelkoe rakkude diferentseerumisega (joonis 2). Nende viiruste elutsükli võib jagada kolmeks erinevaks staadiumiks.



Joonis 2. Viiruse elutsüklil on tihedalt seotud epiteelkoe rakkude diferentseerumisega. Nakatatakse basaalseid kude ning viiruspartiklite moodustumine ja vabanemine toimub juba lõplikult diferentseerunud rakkudest (zur Hausen, 2002 järgi).

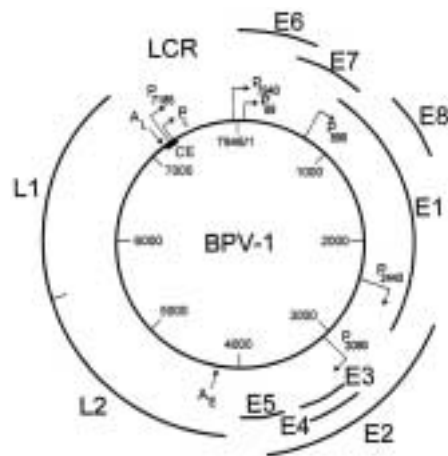
Esimeses faasis nakatab viirus basaalseid epiteelkoe rakke (vigastuste jms. tagajärjel). Jõudes peremeesraku tuuma, alustab ta seal oma DNA kiiret paljundamist (amplifikatsiooniline replikatsioon) tõstes selle koopianumbri kiiresti 50-100 ühikuni raku kohta. Amplifikatsioonilisele replikatsioonile järgneb papilloomiviiruse elutsükli teine faas ehk latentse replikatsiooni etapp, kus viiruse genoomi koopianumber püsib jagunevates rakkudes stabiilsena. Elutsükli viimasesse, vegetatiivse paljunemise faasi jõuab papilloomiviirus siis, kui peremeesrakud on diferentseerunud jõudnud epiteelkoe pealmistesse kihtidesse. Viiruse DNA-d paljundatakse umbes 1000 koopiani raku kohta, sünteesitakse kapsiidi valgud ning moodustuvad virioonid. Järgneb viiruspartiklite vabanemine rakkudest.

Kuna papilloomiviiruse jagunemine sõltub suuresti peremeesraku replikatsioonisüsteemist, on ta väga hea mudel eukarüootse replikatsiooni uurimiseks. Ajalooliselt on üheks kõige levinumaks viiruse elutsükli ja paljunemise uurimismudeliks kujunenud veise papilloomiviirus tüüp 1 (BPV-1), mis põhjustab veistel healoomulisi fibropapilloome (Howley and Lowy, 2001).

2. BPV-1 genoom: struktuur ja kodeeritavad valgud

BPV-1 genoom on 7947 aluspaari pikkune kaheahelaline ja tsirkulaarne DNA molekul, mis kodeerib 10 avatud lugemisraami (ORF) ühelt ahelalt (joonis 3) (Amtmann

et al., 1982; Engel *et al.*, 1983; Heilman *et al.*, 1982). Erinevatelt ORF-idelt ekspresseeritavad geenid on jagatud varasteks ja hilisteks sõltuvalt sellest, millises viiruse elutsükli faasis nad avalduvad. Varajases genoomi piirkonnas asub 8 avatud lugemisraami, millelt sünteesitakse transkriptsiooniks, transformatsiooniks ning replikatsiooniks vajalikud valgud (E1-E8). Genoomi hilises piirkonnas ekspresseeritakse kahte viriooni kapsiidivalku – väikest kapsiidivalku L1 (Cowser *et al.*, 1988; Engel *et al.*, 1983) ja suurt kapsiidivalku L2 (Jin *et al.*, 1990).



Joonis 3. BPV-1 genoomi kaart. Genoomiks on kaheaheelaline DNA, millelt transkriptsioon toimub päripäeva vaid ühelt ahelalt. Numbrid ringi sees märgivad nukleotiide, varased (E1-E8) ja hilised (L1, L2) ORF-d on toodud väljaspool ringi. Varajased promootorid on tähistatud P_n -ga, kus n tähistab nukleotiidi asukohta RNA ahelal. P_L on hiline promootor, mille initsiatsiooni koht asub nukleotiidide 7214 ja 7256 vahemikus. LCR (*Long Control Region*) sisaldab DNA replikatsiooni alguskohta (nukleotiidid 7911-22) ning konstitutiivset (CE) transkriptsiooni enhanseri (nukleotiidid 7162-7275). Varajane (A_E) ja hiline (A_L) polüadenüleerimissait asuvad nukleotiidide 4203 kuni 7175 vahemikus (Howley and Lowy, 2001).

E1 ORF on erinevate papilloomiviiruste seas konserveerunud järjestusega ning BPV-1 genoomis suurim. Sellelt kodeeritakse tuumas lokaliseeruvat 68 kD suurust valku. E1 on replikatsiooni initsiaatorvalk, millel on spetsiifiline ja mittespetsiifiline DNA-ga seostumise võime, helikaasne, ATPaasne (Yang *et al.*, 1993; Bream *et al.*, 1993; Muller *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1991), ATP-d siduv ja DNA-d lahtikeerav aktiivsus (Wilson *et al.*, 2002). Tema omadustele tuginedes võib valgu jagada kolme domääni (joonis 4):

- N-terminaalne osa (aminohapped 1-130) sisaldab NLS-i ja fosforüleerimissaite
- DNA-d siduv domään (aminohapped 142-308)
- ATPaasne ja helikaasne domään (aminohapped 310-605)



Joonis 4. BPV-1 replikatsioonivalgu E1 skeem.

Viiruse replikatsioonil on E1 vajalik nii DNA sünteesi initsiatsiooniks, seostudes spetsiifiliselt viiruse replikatsiooni *originile* (Wilson *and* Ludes-Meyers, 1991; Ustav *et al.*, 1991; Thorner *et al.*, 1993), kui elongatsiooniks (Liu *et al.*, 1995). DNA-le seondumine toimub heksameerse kompleksina (Sedman *and* Stenlund, 1997). BPV-1 E1 seostub E2-ga ning terve rea rakuliste valkudega nagu näiteks histoon 1 (H1) (Swindle *and* Engler, 1998), SWI/SNF5 (Lee *et al.*, 1999), tsükliin E/Cdk2 (Cueille *et al.*, 1998), Hsp40/Hsp70 (Liu *et al.*, 1998), Ubc 9 (Rangasamy *and* Wilson, 2000; Yasugi *et al.*, 1997). E1 seondumine polümeraas α primaasi p180 subühikuga on ilmselt vajalik selleks, et tuua viiruse replikatsiooni *originile* peremeesraku replikatsiooni initsiatsiooni kompleks (Park *et al.*, 1994; Bonne-Andrea *et al.*, 1995).

E2 ORF kodeerib valke, mis reguleerivad viiruse transkriptsiooni, replikatsiooni ning stabiilset säilumist peremeesrakkudes. Sellelt lugemisraamilt kodeeritakse kolme erineva pikkusega, kuid identse C-terminaalse osaga valku: E2TA, E2C ja E8/E2. Neist esimene on valgu täispikk vorm ning kaks viimast sama valgu lühemad vormid (E2 valgust ning tema funktsioonidest tuleb allpool pikemalt juttu peatükis “BPV-1 E2 valgud”).

E3 ORF. on olemas paljudes papilloomiviirustes, kuid ei sisalda translatsiooni initsiatsioonikoodonit AUG, mis tähendab, et sellelt lugemisraamilt ilmselt valku ei sünteesita.

E4 ORF. Paljudel papilloomiviirustel võib E4 lugemisraamilt sünteesitav valk moodustada liitvalgu E1-ga. Mutatsioonanalüüs, mis viidi läbi C127 rakkudega, kus puudub viiruse vegetatiivne replikatsioon, näitas, et BPV-1 E4 ei olnud vajalik viiruse

transformatsiooniks ja viirusliku DNA replikatsiooniks (Neary *et al.*, 1987; Hermonat and Howley, 1987). Samas on näidatud mitmete HPV tüüpide puhul, et E4 valgu ekspressioon korreleerub just viiruse vegetatiivse replikatsiooni faasiga (Doorbar *et al.*, 1996; Peh *et al.*, 2002).

E5 ORF. Kodeerib 44 aminohappe pikkust hüdrofoobset valku, mis on üks papilloomiviiruse onkogeenidest. E5 funktsioonid pole täpselt teada. Küll aga on kindlaks tehtud, et ta aktiveerib rakkudes PDGF β retseptorit, mille tulemusena viimane dimeriseerub ning initsieeritakse rakkude kasv (Lowy and Howley, 2001). Lisaks sellele moodustab E5 kompleksi vakuolaarse prooton-ATPaasiga ja takistab selle tööd. Tagajärjeks on Golgi kompleksi pH muutumine (Goldstein *et al.*, 1992).

E6 ORF. Sellelt lugemisraamilt ekspresseeritakse onkogeeni, mis on erinevate papilloomiviiruste seas kõige enam konserveerunud. Enim uuritud on rakulise tuumor-supressorvalgu p53 ja kõrge riskiga HPV E6 seostumine ning sellele järgnev p53 ubikvitiinsõltuv degradatsioon. Kirjeldatud on ka teisi E6 valgu märklaudu rakus, mille kaudu võidakse mõjutada peremeesraku signaaliradasid ja kontrollida rakkude proliferatsiooni (Mantovani and Banks, 2001).

E7 ORF. Sellelt lugemisraamilt kodeeritava 100 aminohappe pikkuse valgu enim uuritud aktiivsus on seostumine rakulise pRb valguga, selle inaktiveerimine ning lagundamine. Lisaks reguleerib E7 ka teiste rakuliste signaaliradade komponentide aktiivsusi (Huang and McCance, 2002; Zerfass-Thome *et al.*, 1996).

E8 ORF. Kodeerib lühikest valku, mis moodustab E2-e lühema vormiga hübriidvalgu. E2/E8 liitvalk surub alla transkriptsiooni ning replikatsiooni ekstrakromosomaalsetelt replikatsiooni *origin*'idelt (Stubenrauch *et al.*, 2001; Zobel *et al.*, 2003).

L1 ORF. Kodeerib papilloomiviiruse suurt kapsiidivalku, mis vastutab viiruspartikli stabiilsuse eest. BPV-1 virioonid seostuvad raku mikrotuubulitega L1 valgu vahendusel (Liu *et al.*, 2001).

L2 ORF. Kodeerib väikest kapsiidivalku, mis on vajalik infektsioosse viriooni moodustumiseks (Zhao *et al.*, 1998).

BPV-1 genoomi varase ja hilise regiooni vahele jääb regulatoorne ala URR (*upstream regulatory region*) ehk LCR (*long control region*) (joonis 3), mis on umbes 1000 aluspaari pikkune ning ei kodeeri ühtegi viirusvalku. URR sisaldab regulatoorseid

järjestusi (võimendus- ja polüadenüleerimisjärjestused), mis on vajalikud transkriptsiooni regulatsiooniks ja viiruse genoomi replikatsiooniks (Turek, 1994; Sailaja *et al.*, 1999) ning viiruse stabiilseks püsimiseks jagunevates rakkudes (Piirsoo *et al.*, 1996).

3. BPV-1 DNA replikatsioon

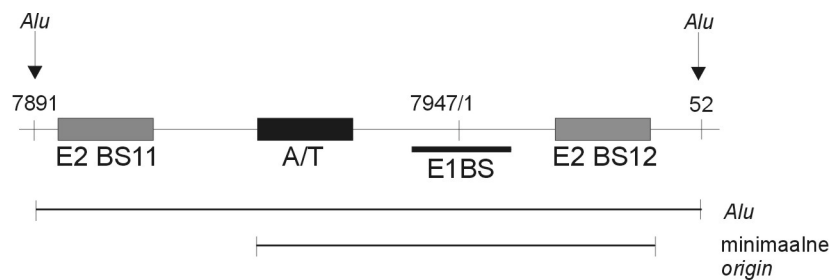
Papilloomiviirused replitseeruvad peremeesrakkudes ekstrakromosomaalsete plasmiididena ning kasutavad oma genoomi paljundamiseks põhiliselt raku replikatsioonisüsteemi ning rakulisi replikatsioonivalke, nagu näiteks replikatsioonivalk A (RPA), replikatsioonifaktor C (RFC), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), topoisomeraas I ja II, DNA polümeraas α primaasi kompleks ja DNA polümeraas δ (Muller *et al.*, 1995; Melendy *et al.*, 1995).

Viiruse enda poolt on replikatsiooniks vajalikud URR-s paiknev replikatsiooni alguspunkt ehk *origin* ning viirusvalgud E1 ja E2, mis mõlemad on võimelised seostuma spetsiifilistele DNA järjestustele BPV-1 genoomis (Yang *and* Botchan, 1990; Ustav *and* Stenlund, 1991; Ustav *et al.*, 1991). DNA sünteesi initsiatsioonil on olulised nii replikatsioonivalkude omavahelised interaktsioonid kui nende valkude seostumiskohad URR-s.

E1, mis on viiruse replikatsiooni initsiaatorvalk, seostub preinitsiatsioonikompleksi moodustumise käigus replikatsiooni alguskohale seotuna E2 valguga. E1 ja E2 kompleksil on suurem afiinsus DNA suhtes kui E1-l üksinda (Sedman *and* Stenlund, 1995; Sedman *et al.*, 1997). ATP hüdroolüüsi energiat kasutades asendatakse E2 ning kompleksi lisandub E1 molekule, mis moodustavad heksameeri. (Sanders *and* Stenlund, 1998; Sedman *and* Stenlund, 1996). Tekkinud E1 struktuur keerab DNA kaksikahela lahti. Edasi moodustub replikatsiooni initsiatsioonikompleks, kuhu kuuluvad peamiselt rakulised faktorid. E1 on ka elongatsioonikompleksi koosseisus, kus ta töötab helikaasina.

BPV-1 replitseerub transformeerunud rakkudes multikoopialise tuuma plasmiidina, mis püsib jagunevates rakkudes pika aja vältel (Law *et al.*, 1981). See tähendab aga seda, et papilloomiviirustel peab olema efektiivne mehhanism oma

genoomi koopianumbri ja stabiilse jaotumise kontrollimiseks. Katsetest erinevate *origini* sisaldavate plasmiididega selgus, et BPV-1 lühiajaliseks amplifikatsiooniliseks replikatsiooniks piisab viirusvalkudest E1 ja E2 ning minimaalsest replikatsiooni *originist*. BPV-1 minimaalne replikatsiooni alguskoht (joonis 5) koosneb ühest E1 seostumiskohast (E1BS) ja sellest 5' suunas asuvast A/T-rikkast järjestusest ning vähemalt ühest E2 seostumiskohast (E2BS) (Ustav *et al.*, 1993; Ustav and Stenlund, 1991). A/T-rikas järjestus on vajalik DNA ahelate lahtisulatamise hõlbustamiseks DNA sünteesi initsiatsioonifaasis.



Joonis 5. Skemaatiline joonis BPV-1 *origini* regioonist. Minimaalne replikatsiooni alguskoht sisaldab ühte E1-e (E1BS) ja E2-e (E2BS) seostumiskohta ning A/T rikast regiooni. Üldse on BPV-1 URR-i piirkonnas E2 seostumiskohti kokku 12. Pildil on toodud ka eksperimentaalses osas kasutatud *Alu* restriksioonifragment, kus on võrreldes minimaalse *originiga* üks E2 seostumiskoht lisaks.

Plasmiidid, mis sisaldavad BPV-1 minimaalset *origini*, replitseeruvad transientselt rakkudes, milles ekspresseeritakse viirusvalke E1 ja E2, kuid aja jooksul, rakkude jagunemise käigus lähevad need DNA-d kaotsi. Selliste plasmiidide pikaajaliseks stabiileks säilimiseks on peale E1, E2 ja minimaalse *origini* vaja järjestust URR-st, mida on hakatud nimetama MME (*Minichromosome Maintenance Element*). Viimane koosneb mitmest kõrge afiinsusega E2 seostumiskohtast (Piirsoo *et al.*, 1996), mis viitab sellele, et E2-l on antud protsessis oluline roll. Ühes varasemas töös on arvatud, et lisaks E2-le võiks viiruse genoomi stabiilset säilimist reguleerida ka E1 (Lehman and Botchan, 1998). Kuna aga URR-i sisaldavad plasmiidid säilisid edukalt ka rakuliinis, kus ekspresseeritakse ainult BPV-1 E2 valku ning puudub E1 (Ilves *et al.*, 1999), siis järelikult on viirusgenoomi stabiilseks püsimiseks piisavad viirusfaktorid E2 ja MME.

Ühes hiljuti ilmunud uurimuses väidetakse, et BPV-1 E1 valk on vajalik viiruse stabiilse replikatsiooni tekkimiseks, mitte aga selle püsimiseks (Kim *and* Lambert, 2002). See tähendaks seda, et viirusliku DNA süntees stabiilses faasis toimub ainult rakuliste faktorite (sealhulgas rakulise helikaasi) abil. Sarnane replikatsioonimehhanism on näidatud kahe teise latentselt rakkudes püsiva ekstrakromosomaalse DNA viiruse puhul nagu HHV8 (inimese herpesviirus 8) ja EBV (Epstein Barr viirus) (Chaudhuri *et al.*, 2001; Dhar *et al.*, 2001; Schepers *et al.*, 2001). Seega pole praeguseks veel päris kindel, kas esialgne E1/E2 sõltuv DNA süntees papilloomiviiruse nakkuse algfaasis toimub sama mehhanismiga ning samade faktorite juuresolekul kui stabiilne replikatsioon viirusnakkuse latentse replikatsiooni faasis.

Lisaks on transientsel ja stabiilisel replikatsioonil erinev tundlikkus rakulise tuumor-supressorvalgu p53 suhtes, mis on võimeline alla suruma papilloomiviiruse amplifikatsioonilist replikatsiooni, stabiilset aga mitte (Lepik *et al.*, 1998; Ilves *et al.*, 2003). See asjaolu viitab omakorda erinevatele replikatsioonimehhanismidele.

Vegetatiivse replikatsiooni faas on vajalik selleks, et papilloomiviiruse DNA pakitaks virioonidesse. Viimane toimub lõplikult differentseerunud epiteelirakkudes. Kuna praeguseni puudub hea mudelsüsteem selle viiruse elutsükli etapi uurimiseks, siis on ka üsna vähe teada, missuguseid mehhanisme vegetatiivses replikatsioonis kasutatakse.

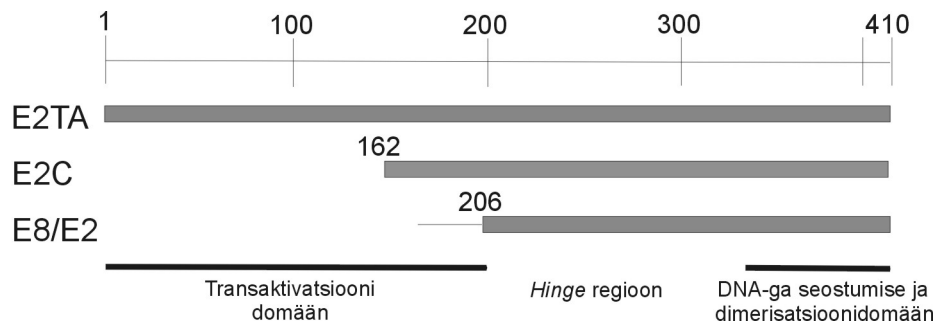
4. BPV-1 E2 valgud

BPV-1 E2 on multifunktsionaalne valk ning üks peamisi papilloomiviiruse elutsükli reguleerijaid. Ta osaleb viiruse geenide ekspressiooni reguleerimisel (Spalholz *et al.*, 1985), replikatsiooni initsieerimisel (Ustav *and* Stenlund, 1991; Yang *et al.*, 1991) ja vastutab viirusgenoomi pikaajalise püsimise eest rakus (Skiadopoulos *and* McBride, 1998; Lehman *and* Botchan, 1998; Bastien *and* McBride, 2000).

BPV-1 E2 on konserveerunud järjestusega. Tema avatud lugemisraamilt sünteesitakse kolme erineva pikkusega valku (joonis 6) (Hubbert *et al.*, 1988; Lambert *et*

al., 1989), mis saadakse tänu erinevale promootori kasutusele ja mRNA splaisingule (Lambert *et al.*, 1988; Vaillancourt *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1985).

Kõige pikem valk, E2TA (TA - *transactivator*), on 48 kD suurune (410 aminohapet) ning defineeritud kui transkriptsiooni aktivaator, mis on samuti vajalik viiruse DNA replikatsioonil (Spalholz *et al.*, 1985; Ustav and Stenlund, 1991). Struktuursete ja funktsionaalsete analüüside põhjal võib valgu jagada 3-ks osaks. N-terminaalses osas (≈200 aminohapet) on transaktivatsiooni domään, mis seob mitmeid rakulisi faktoreid ja viiruse replikatsiooni initsiaatorvalku E1. C-terminaalses osas (≈85 aminohapet) on DNA-ga seostumise ja dimerisatsioonidomään. Need kaks domääni on kõrgelt konserveerunud erinevate papilloomiviiruste hulgas. N- ja C-terminaalse osa vahele jääb proliinirikas *hinge* regioon, mille pikkus ja aminohappeline koostis on erinevatel papilloomiviirustel varieeruv.



Joonis 6. BPV-1 E2 valgu kolme erivormi struktuurid.

E2 valgu lühemad vormid E2C e. E2TR (31 kD) ja E8/E2 (28 kD) on defineeritud kui transkriptsioonirepressorid nende võime järgi inhibeerida täispika valgu transkriptsiooni aktiveerivat funktsiooni (Lambert *et al.*, 1987; Choe *et al.*, 1989). Mõlemal repressorvormil on olemas E2TA-ga identne DNA-d siduv ja dimerisatsioonidomään ning lisaks *hinge* regioon, kuid puudub transaktivatsioonidomään. See tähendab aga seda, et nad on võimelised seostuma DNA-ga ning omavahel dimeriseeruma. Lisaks homodimeeridele moodustavad transkriptsioonirepressorid E2TR ja E8/E2 heterodimeere E2TA-ga, mis on samuti transkriptsiooniliselt inaktiivsed. Seega repressseerivad E2 lühemad vormid transkriptsiooni konkureerides täispika valguga E2

seostumiskohtadele ning moodustades inaktiivseid heterodimeere E2TA-ga (McBride *et al.*, 1991).

Kõiki kolme E2 vormi ekspresseeritakse BPV-1-ga transformeerunud C127 rakkudes, kus nende valguvormide üldine suhe on 1(E2):10(E2C):3(E8/E2) (Hubbert *et al.*, 1988). See võib aga kõikuda sõltuvalt rakuliinist (Lambert *et al.*, 1989). Samuti on muutuv nende valkude tase erinevates rakutsükli etappides, olles kõige kõrgem S faasis ning kõige madalam G1 faasis (Yang *et al.*, 1991; Monini *et al.*, 1993).

E2 valgud (ka E2C ja E8/E2) lokaliseeruvad tuumas. NLS-i signaal arvatakse täispikas valgus olevat nii N- kui C-terminaalses osas (Skiadoupoulos *and* McBride, 1996).

C-terminaalse domääni kaudu (aminohapped 326-410) seostub E2 dimeerina DNA-l olevale konsensusjärjestusele ACC(N6)GGT (McBride *et al.*, 1991; Hawley-Nelson *et al.*, 1988). BPV-1 genoomis on selliseid seostumiskohti 17, neist 12 asuvad URR piirkonnas. E2 seostumiskohtade täpne järjestus ja afiinsus E2 suhtes on varieeruvad (Li *et al.*, 1989).

Nende järjestuste kaudu reguleerib E2 viiruse elutsükli, mõjutades varajaste geenide transkriptsiooni (McBride *et al.*, 1991; Spalholz *et al.*, 1985). Lisaks võib ta mõjutada ka selliseid promootoreid, mille initsiatsioonisaitide lähedusse on kloneeritud E2 seostumiskohad (Gauthier *et al.*, 1991; Hawley-Nelson *et al.*, 1988; Thierry *et al.*, 1990). Efektiivseks E2 vahendatud transkriptsiooni aktivatsiooniks on vaja vähemalt kahte E2BS-i (Harrison *et al.*, 1987; Haugen *et al.*, 1987; Hawley-Nelson *et al.*, 1988; Spalholz *et al.*, 1985) ning funktsionaalset E2 valgu N-terminaalset osa (Monini *et al.*, 1991; Thierry *et al.*, 1990). E2 võib promootoreid aktiveerida ka ilma seostumiskohtade olemasoluta, kuigi see protsess on umbes 10x madalam E2 sõltuvast aktivatsioonist ning ei vaja intaktset DNA-d siduvat domääni (Haugen *et al.*, 1988).

E2 võib interakteeruda mitmete peremeesraku basaalse transkriptsioonisüsteemi komponentidega ning stimuleerida transkriptsiooni selliste erinevate faktorite vahendusel nagu TBP (Steger *et al.*, 1995), TFIIB (Breiding *et al.*, 1997; Rank *and* Lambert, 1995), SP1 (Breiding *et al.*, 1997), p300 (Muller *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2000), AMF1 (Breiding *et al.*, 1997). Lisaks on BPV-1 E2 võimeline aktiveerima transkriptsiooni

Saccharomyces cerevisiae's, mis viitab sellele, et E2 interaktsioonid transkriptsioonifaktoritega on konserveerunud nähtus.

Täispikk E2 võib transkriptsiooni viiruslikelt promootoritelt ka represseerida, kui tema seostumine DNA-ga takistab transkriptsiooni initsiatsioonikompleksi moodustumist (Dostatni *et al.*, 1991; Stenlund *and* Botchan, 1990; Vande Pol *and* Howley, 1990).

Üheks olulisemaks E2 funktsiooniks BPV-1 elutsükliks on osalemine viiruse DNA replikatsiooni initsiatsioonil. E2 olemasolu on vajalik *in vivo*, kuigi *in vitro* on DNA sünteesi initsiatsioon võimalik E1 kõrgetel kontsentratsioonidel ka ilma E2-ta (peamiselt *ori*-sõltumatu replikatsioon) (Bonne-Andrea *et al.*, 1995; Bonne-Andrea *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1993). E2 lisamisel muutub replikatsioon aga *ori*-sõltuvaks, sest E1-E2 kompleksil on BPV-1 *origini* suhtes palju suurem afiinsus kui E1-l üksinda. Seega käitub E2 selles protsessis kui spetsiifilisuse faktor, mis takistab E1 mittespetsiifilist seondumist DNA-ga (näiteks rakuliste A/T rikaste järjestustega) (Bonne-Andrea *et al.*, 1997). E2-l on E1-ga kompleksi moodustamiseks vaja funktsionaalset N-terminaalset osa, mille kaudu ta seostub E1 helikaasse domääniga.

Lisaks preinitsiatsioonikompleksi moodustamisele E1-ga võib E2 viiruse replikatsiooni mõjutada ka seostudes peremeesraku replikatsioonivalkudega (näiteks RPA) või kromatiini struktuuri modifitseerivate faktoritega (näiteks p300/CBP, p/CAF) tuues neid viiruse replikatsiooni *originile* (Li *and* Botchan, 1993; Lefebvre *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 2000).

E2 funktsioonid on geneetiliselt lahutatavad erinevate punktmutatsioonidega. Mitmete katsetega on näidatud, et E2 roll replikatsiooni initsiatsioonil ei korreleeru tema võimega aktiveerida transkriptsiooni (Abroi *et al.*, 1996), need funktsioonid on teineteisest sõltumatud.

Mitmed tööd on kirjeldanud BPV-1 E2 valgu olulist rolli viiruse episomaalse genoomi säilimisel jagunevates rakkudes. Selle väite tõestuseks näidati, et nii täispikk E2 kui BPV-1 genoom on rakkudes seotud mitootiliste kromosoomidega (Ilves *et al.*, 1999; Lehman *and* Botchan, 1998; Skiadopoulou *and* McBride, 1998). Seejuures on E2TA kromosoomidele kinnitunud kõigis mitoosifaasides (Bastien *and* McBride, 2000). E2

repressorvormid E2C ja E8/E2 kromatiinile ei seonu (Skiadopoulos *and* McBride, 1998) ning E2TA-lt transaktivatsioonidomääni deleteerimine rikub ära tema võime kromosoomidele kinnituda (Skiadopoulos *and* McBride, 1998). Seejuures on valgu N-terminaalne transaktivatsioonidomään ka üksinda võimeline seostuma mitootilistele kromosoomidele ning valgu C-terminaalne osa pole selleks vajalik (Bastien *and* McBride, 2000).

Lisaks E2-le on viiruse genoomi stabiilseks säilimiseks vajalik URR-s asuv MME, mis koosneb mitmest kõrge afiinsusega E2 seostumiskohast (Piirsoo *et al.*, 1996). E2 juuresolekul seotakse MME-d sisaldav plasmiid mitootilisele kromatiinile (Ilves *et al.*, 1999). Veelgi enam, E2 kromatiinile seostumise võime on korrelatsioonis viiruse episomaalse DNA stabiilse säilimise võimega (Abroi *et al.*, 2004).

Seega seostub E2 mitootilistele kromosoomidele N-terminuse kaudu ja E2 seostumiskohtadele URR-s C-terminaalse osaga ning vahendab nii viiruse genoomi püsimist jagunevates rakkudes.

Siiani on olnud väga vähe teada rakulistest faktoritest, mis võiksid olla seotud BPV-1 stabiilse säilimisega. Hiljuti ilmunud uurimuse kohaselt võiks viiruse E2-e rakuliseks vahendajaks kromatiinile kinnitumisel olla bromodomääne sisaldav valk Brd4 (You *et al.*, 2004).

5. Brd4 ja BPV-1 E2

Mitmetel viirustel on aja jooksul välja kujunenud mehhanism oma DNA jaotamiseks ja stabiilseks säilitamiseks paljunevates rakkudes. Genoom kinnitatakse peremeesraku kromatiinile, mis tagab selle, et viiruse DNA on tuumades olemas ka peale rakkude pooldumist ja jaotub enam-vähem võrdselt tütar-tuumade vahel. Igal viirusel on selleks olemas tema enda poolt kodeeritud valk/valgud ning seostumiseks vajalikud järjestused genoomis. DNA kinnitumine peremeesraku kromosoomidele toimub valk-valk interaktsioonide kaudu. Papilloomiviirustel täidab seda rolli viiruse poolt kodeeritud multifunktsionaalne valk E2 (Skiadopoulos *and* McBride, 1998; Lehman *and* Botchan, 1998), mis seostub dimeerina C-terminaalse osa kaudu viiruse genoomis olevatele

spetsiifilistele järjestustele ning N-terminaalse osaga mitootilisele kromatiinile (Bastien and McBride, 2000; Ilves *et al.*, 1999). Kuna E2 ei saa N-terminusega kromatiinile seostuda otse, siis peab rakkudes olema mõni valk, mis seda interaktsiooni vahendab.

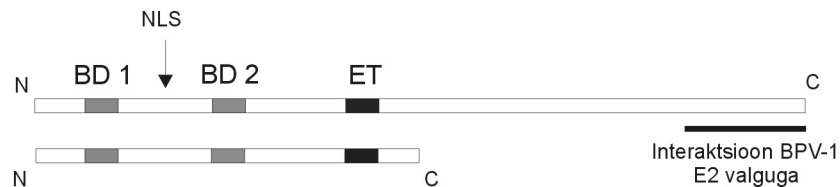
TAP (tandemafiinsuspahastamine) tehnoloogiat kasutades leidsid *You et al.* (2004) BPV-1 E2-ga rakkudes põhiliselt seotuna valgu, mis hilisemal mass-spektromeetria analüüsil osutus Brd4-ks. Kuna eelnevalt oli teada, et Brd4 sisaldab bromodomääne ning on seeläbi seotud kromatiiniga, osutus ta ideaalseks kandidaadiks BPV-1 genoomi kinnitumise vahendaja rolli.

Järgmise katsena vaadati selles töös Brd4 ja E2 paiknemist mitootilistel kromosoomidel C33A rakkudes, kus ekspresseeriti E2TA-d või E2C-d. Tulemuseks saadi, et Brd4 ja täispika E2 paiknemise muster on ühesugune, **st** nad asuvad kromatiinil sarnastes kohtades. Sama tulemus saadi C127 rakkudes, kuhu oli transfecteeritud kogu BPV-1 genoom. E2C kromatiinile aga ei kinnitunud, vaid paiknes rakutuumas hajusalt, samal ajal kui Brd4 oli lokaliseerunud kromosoomidel. Saadud andmed kinnitasid varasemaid töid, et E2 transaktivatsioonidomään on vajalik kromatiiniga seostumiseks (Bastien and McBride, 2000; Skiadopoulou and McBride, 1998) ning näitas, et sama piirkond valgus vastutab ka seostumise eest Brd4-ga. Viimast kinnitab ka hiljuti ilmunud BPV-1 E2 mutante kirjeldav töö, milles E2 mitootilist kromatiini siduv aktiivsus on korrelatsioonis tema võimega seostuda Brd4-ga (Baxter *et al.*, 2005). Kuigi kolokalisatsioonikatsed *You et al.* (2004) töös viidi läbi mitootiliste rakkudega, oli mõnedes rakkudes, mis ei olnud mitoosis, E2 ikka Brd4-ga seotud. See, kas E2 ja Brd4 on teineteisega seotud kogu rakutsükli vältel või mitte ning missuguses etapis E2 Brd4-ga interakteerub, on praeguseks teadmata.

Identifitseerimaks missugune osa Brd4-st on oluline interaktsiooniks E2-ga, kloneeriti erinevaid inimese Brd4 regioone kodeerivad konstruktid ning saadi, et E2 N-terminaalse osaga seostus valgust 139 aminohappe pikkune C-terminaalne osa. Seega asub interaktsiooniks vajalik järjestus selles Brd4 valgu piirkonnas (joonis 7).

BPV-1 genoomiga transformeerunud C127 rakkudes säilib viiruse genoom ekstrakromosomaalse episoomina (Law *et al.*, 1981). Kui blokeerida BPV-1 genoomi kinnitumine peremeesraku kromosoomidele, siis peaks aja jooksul viiruse DNA jagunevatest rakkudest ära kaduma ning vähenema viirusega transformeeruvate rakkude

hulk. Brd4 rolli uurimiseks selles protsessis kasutasid *You et al.* (2004) valgust ainult C-terminaalset osa (Brd4CTD: aminohapped 1047-1362+SV40 NLS), mis seostub E2-ga kuid mitte kromatiiniga ning millel ekspresseerituna BPV-1 genoomiga transfekteeeritud rakkudes, peaks viiruse DNA säilimisele olema dominant-negatiivne efekt.



Joonis 7. Rakulise bromodomääne sisaldava valgu Brd4 üldkseem. Brd4 kuulub BET valkude perekonda, mis sisaldavad bromodomääne (BD 1, BD 2) ja ekstraterminaalset (ET) valgu sidumise domääni. “Lühikesed” BET perekonna valgud näiteks Brd2 (Ring3) sisaldavad ainult bromodomääne ja ET osa. “Pikad” selle perekonna liikmed aga (ülemine osa) omavad suhteliselt pikka C-terminaalset osa, kus Brd4-l on ka BPV-1 E2 valku siduv järjestus.

Kõigepealt uuriti, kuidas Brd4CTD ekspressioon mõjutab E2TA lokalisatsiooni rakutuumas. Selgus, et Brd4CTD seostub täispika E2-ga ning rikub ära viirusvalgu kinnitumise kromosoomidele. Katsetes täispika BPV-1 genoomiga võrreldi fookuste tekkimise sagedust C127 rakkudega, kuhu oli transfekteeeritud Brd4CTD või kontrolliks tühi vektor. Tulemused näitasid, et transformatsiooniefektiivsus rakkudes, kus ekspresseeriti dominant-negatiivselt toimivat Brd4CTD-d, vähenes kontrollrakkudega võrreldes 90 %. Saadud andmete põhjal väideti, et Brd4 on E2 retseptoriks mitootilistel kromosoomidel.

Lisaks eelnevatele katsetele BPV-1 E2 valguga näidati, et Brd4 on võimeline interakteeruma ka HPV-16 E2-ga. Seetõttu arvati, et Brd4 kasutamine genoomi sidumiseks kromatiinile on laiemalt levinud ka teiste papilloomiviiruste hulgas.

6. Brd4

Brd4 kuulub BET valkude perekonda, mis on olemas nii loomades, taimedes kui seentes (Florence and Faller, 2001). Need valgud sisaldavad kahte N-terminaalset

bromodomääni ja ET ehk ekstraterminaalset valgu sidumise domääni (joonis 7) (Thorpe *et al.*, 1996). Bromodomään on konserveerunud motiiv, mis esineb paljudel tuumas olevatel regulatoorsetel faktoritel ning tervel real kromatiini modifitseerivatel valkudel nagu näiteks histooni atsetülaasid GNAT perekonnas, CBP/p300, üldised transkriptsioonifaktorid, kaasa arvatud TAFII250 ja kromatiini remodelleerivad faktorid SWI/SNF perekonnas (Haynes *et al.*, 1992; Jeanmougin *et al.*, 1997; Dhalluin *et al.*, 1999; Winston and Allis, 1999). Bromodomään koosneb neljast α -heeliksist ja seostub atsetüleeritud lüsiinidega histoonidel H3 ja H4 (Dhalluin *et al.*, 1999; Ornaghi *et al.*, 1999; Jacobson *et al.*, 2000; Hudson *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2000) ning mittehistoonsete valkudega (Maruyama *et al.*, 2002; You *et al.*, 2004).

Imetajatel on identifitseeritud viis geeni, mis kodeerivad BET perekonna valke (inimese ja hiire nomenklatuuri komitee järgi: *Brd1-Brd5*) (Beck *et al.*, 1992; Dey *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 1997; Rhee *et al.*, 1998; Thorpe *et al.*, 1997). Brd2 on varasemast tuntud kui transkriptsiooni mediaatorkompleksi komponent (Jiang *et al.*, 1998). Teda ekspresseeritakse proliferueeruvates hiirerakkudes ja inimese leukeemiarakkudes (Rhee *et al.*, 1998) ning tal võib olla kinaasne aktiivsus (Denis *et al.*, 1996; Denis *et al.*, 2000). Palju vähem on teada valkude Brd1, Brd3 ja Brd5 kohta. Brd4 on BET valkude perekonna uusim kirjeldatud liige, mida varasemas kirjanduses on nimetatud ka MCAP (*mitotic chromosome-associated protein*), CAP, HUNKI (Dey *et al.*, 2000).

Inimese Brd4 geen asub 19ndas kromosoomis ning sisaldab 19 eksonit. Sellelt järjestuselt kodeeritakse 152 kD suurust täispikka fosforüleeritavat tuumavalku, mida ekspresseeritakse pidevalt paljudes kudedes. Lisaks on Brd4-l olemas ka lühem isovorm, millel puuduvad eksonid 12-19.

Brd4 funktsioonid rakkudes pole veel päris selged. Hiire embrüod, mis on selle geeni suhtes nullsügoodid, ei ole eluvõimelised, viidates, et Brd4-l on rakkude arengus oluline roll (Houzelstein *et al.*, 2002). Arvatakse, et Brd4 seostub spetsiifiliselt atsetüleeritud histoonidele H3 ja H4, tunneb nii ära kindlad regioonid kromatiinil ning pääseb tänu sellele tütaruumadesse (Dey *et al.*, 2003). Brd4 on kromosoomidega seotud nii interfaasis kui mitoosis pea kogu DNA ulatuses, välja arvatud heterokromatiini ning tsentromeeri piirkond (Dey *et al.*, 2003). Seejuures on see interaktsioon nõrk (Dey *et al.*, 2003).

Funktsionaalse valgu inhibeerimine Brd4 vastaste antikehadega viib rakutsükli blokeerumisele üleminekul G2 faasist M faasi (Dey *et al.*, 2000). Brd4 üleekspressioon (ektoopiline ekspressioon) hiire fibroblastides ja HeLa rakkudes inhibeerib rakutsükli üleminekul G1-st S faasi (Maruyama *et al.*, 2002). Lisaks seostuvad nii endogeenne kui rakkudesse transfekteeeritud Brd4 RFC-ga (*replication factor C*). Viimane on konserveerunud 5-subühikuline kompleks ning vajalik DNA replikatsiooniks. Brd4 interakteerub otseselt selle kompleksi kõige suurema subühikuga, milleks on RFC140. Brd4 deletsioonanalüüsid näitasid, et seostumine RFC140-ga ning rakutsükli S faasi mineku inhibitsioon on mõlemad seotud valgu II bromodomääniga. Kui rakkudes ekspresseeriti transientselt koos Brd4 ja RFC-140-t, siis kadus ka Brd4 rakkude kasvu pidurdav efekt (Maruyama *et al.*, 2002).

Hiljuti identifitseeriti valk SPA-1, mis samuti seostub Brd4-ga. SPA-1 (*signal induced proliferation associated protein 1*) on GTPaasi aktiveeriv valk (GAP), mis osaleb rakkude proliferatsiooni reguleerivas signaali ülekande ahelas. Brd4-ga seostumine võimendab SPA-1 GTP-d hüdrolüüsivat aktiivsust. Kui muidu paikneb SPA-1 enamasti tsütoplasmas ja vaid vähesel määral tuumas, siis BRD4 üleekspressioon põhjustab SPA-1 liikumise tuuma ning rakutsükkel peatub. Ekspresseerides transientselt kahte valku korraga, rakutsükli inhibitsioon kaob, mis viitab sellele, et rakkude normaalseks arenguks on vajalik nende kahe valgu omavaheline õige tasakaal (Farina *et al.*, 2004).

Lisaks eelnevale on inimese Brd4 geen 19. kromosoomis ühe translokatsiooni sihtmärgiks (t(15;19)(q13;p13.1)), mille tagajärjeks on letaalne ülemise respiratoorse trakti kartsinoom noortel inimestel (French *et al.*, 2001). Hiljuti on selgunud, et kromatiini ebakorrekse rekombinatsiooni käigus moodustub Brd4 ja NUT geeni produktidest liitvalk, milles BRD4 10. eksonile on liitunud NUT valk alates 2.eksonist. Tekkinud onkovalk põhjustab vähki, mis allub halvasti ravile ning viib kiiresti surmani (French *et al.*, 2003).

Eelnevat arvesse võttes võib öelda, et Brd4 reguleerib rakkude kasvu ilmselt mitmete mehhanismide kaudu ning rakutsükli eri staadiumites.

EKSPERIMENTAALNE OSA

TÖÖ EESMÄRK

BPV-1 eksisteerib transformeerunud rakkudes multikoopialise ekstra-kromosomaalse plasmiidina (Law *et al.*, 1981). Selleks, et viiruse genoom oleks tütartuumades olemas ka peale rakkude jagunemist, kinnitatakse see peremeesraku kromatiini külge. Viiruse enda poolt on antud protsessiks vajalik E2 valk, mis osaleb ka BPV-1 DNA replikatsioonil ning viiruse varaste geenide transkriptsiooni aktivatsioonil. E2 seostub dimeerina C-terminaalse osaga viiruse genoomis olevatele spetsiifilistele järjestustele ning N-terminuse kaudu peremeesraku kromatiinile. Kuna BPV-1 E2 ei saa kromosoomidele kinnituda otse, on vaja rakulisi valke, mis seda interaktsiooni vahendaksid. Hiljuti ilmunud artikli järgi on üheks potentsiaalseks rakuliseks retseptoriks E2-le bromodomääne sisaldav valk Brd4 (You *et al.*, 2004).

Minu töö eesmärgiks oli uurida, kas Brd4 on vajalik BPV-1 stabiilseks säilimiseks jagunevates rakkudes ning kuidas ta mõjutab E2 valgu teisi funktsioone (transkriptsiooni aktiveerivat võimet ning rolli DNA sünteesi initsiatsioonil). Selleks kasutasin Brd4 valgust C-terminaalset osa (Brd4CTD), mis interakteerub küll E2-ga, aga ei seostu kromosoomidega. Kui Brd4 on E2 retseptor kromatiinil, peaks Brd4CTD E2-ga seostudes takistama viimase kinnitumist mitootilistele kromosoomidele. Juhul, kui täispikk Brd4 on vajalik E2 funktsioonide täitmiseks rakkudes või kui seostumine Brd4-ga takistab mõne olulise faktori/faktorite interaktsiooni E2-ga, võib Brd4CTD üleekspressioon mõjutada ka E2 funktsioone viiruse replikatsioonil ja transkriptsioonil.

MATERJAL JA METOODIKA

Rakuliinid, bakteritüved ja söötmed.

Kasutati CHO (*Chinese Hamster Ovary cell line*) ning CHO liinil põhinevat 4P11 rakuliini (ekspresseerib konstitutiivselt BPV-1 E1 ja E2 valke ning lisaks EBV EBNA-1 valku ja polüoomiviiruse viiruse *large-T* antigeeni); C127 (hiire rinnanäärme kasvaja rakuliin), Cos7 (SV40-ga transformeerunud Aafrika rohepärdiku neeru rakuliin), Jurkat (leukeemiahaige inimese perifeersest verest saadud T-lümfotsüüdid) rakuliine. Rakke kasvatati kas *Ham's F12* (CHO ja selle põhised rakuliinid) või IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's medium*, GibcoBRL) (kõik ülejäänud rakuliinid) söötmes, millele oli lisatud 10 % veise loote seerumit (Sebac) ning penitsilliini 100 IU/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml. Katsetes kasutatud rakke inkubeeriti 37° C ja 5 % CO₂ sisalduse juures.

Kloneerimiseks ja plasmiidide amplifitseerimiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α . Baktereid kasvatati 37° C juures LB söötmes.

Kasutatud plasmiidid

Koekultuurirakkudes plasmiiidi jaotumise katses kasutatud plasmiidid

Kasutati vektoreid pRetE2 ja pRetE39A, mis sisaldavad BPV-1 MME-d ja ekspresseerivad tsütomegaloviiruse (CMV) promootori alt destabiliseeritud (poolestusajaga umbes 1h) roheliselt fluorestseeruvat valku EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) ning *wild-type* või 39ndast positsioonist muteeritud BPV-1 E2 valke (Abroi *et al.*, 2004). Plasmiid pVP16E2 on saadud pRetE2 plasmiidist E2 avatud lugemisraami asendamisel hübriidvalgu VP16E2 avatud lugemisraamiga (Abroi *et al.*, 2003). Ekspresseeritavas valgus on BPV-1 E2-e transaktivatsioonidomään asendatud *Herpes Simplex* viiruse transaktivatsioonidomääniga (Li and Botchan, 1993). Plasmiid pFrebna (valmistatud K. Janiksoni poolt) ekspresseerib CMV promootori alt EGFP ja *Epstein Barr* viiruse EBNA1 valku ning sisaldab EBNA1 seostumiskohti (FR). Lisaks kasutati plasmide pFrebnaBrd4hCTD, pFrebnaBrd4hE2BD, pFrebnaBrd4mCTD ja pFrebnaBrd4mE2BD, millesse on kloneeritud hiire ja inimese Brd4 C-terminaalset osa

kodeerivad järjestused (vt. Brd4 järjestusi sisaldavate ekspressioonivektorite klonimine).

Koimmuunosadestamise katses kasutatud plasmiidid

Kasutati pCG ekspressioonivektoril põhinevaid plasmide pCGE2 ja pCGE2C, mis ekspresseerivad BPV-1 *wild-type* E2 ja E2C valku (Ustav *and* Stenlund, 1991) ning pCGE39A, mis ekspresseerib E2 mutanti E39A (Abroi *et al.*, 1996). Plasmiidid pQMBrd4hCTD, pQMBrd4hE2BD, pQMBrd4mCTD ja pQMBrd4mE2BD põhinevad samuti pCG ekspressioonivektoril, kuid neisse on lisatud BPV-1 E2 valgu 3F12 epitoop ning inimese ja hiire Brd4 C-terminaalset osa kodeerivad järjestused (vt. Brd4 järjestusi sisaldavate ekspressioonivektorite klonimine).

Replikatsioonikatses kasutatud plasmiidid

BPV-1 genoomi replikatsiooni katses kasutatud BPV-1 genoom oli pärit plasmidist pML BPV-1 (Lusky *and* Botchan, 1985). C127 rakkudes läbi viidud transientse replikatsiooni katses minimaalse replikatsiooni *originiga* on kasutatud pCGEag (ekspresseerib *wt* BPV-1 E1 valku), pCGE2 (ekspresseerib *wt* BPV-1 E2 valku) (Ustav *and* Stenlund, 1991) ning pCGE2 37/73 (ekspresseerib BPV-1 E2 valgu mutanti, mis ei seostu Brd4-ga ning on defektne transkriptsioonis) (Baxter *et al.*, 2005) vektoreid.

4P11 rakkudes läbi viidud transientse replikatsiooni katses kasutatud pUCAlu on BPV-1 *origini* sisaldav plasmid, mis põhineb pUC19 ekspressioonivektoril, mille *HincII* restriksioonisaite on klonitud *AluI* fragment (joonis 5) (Ustav *et al.*, 1991). Polüoomiviiruse replikatsioonikatses on lisaks pUCAlu vektorile kasutatud ka pUCPy *wt ori* ja pUCPy *min ori* konstrukte. Nende plasmiidide konstrueerimisel oli algvektoriks pUC18, kuhu kloneriti hiire polüoomiviiruse replikatsiooni *origin* enhanseriga (Py *wt ori*) või ilma enhanserita (Py *min ori*) (kloneerinud A. Abroi).

Lisaks eelpoolkirjeldatud konstruktidele on replikatsioonikatses kasutatud pUC18 vektorit, inimese ja hiire Brd4 järjestusi sisaldavaid plasmide (pQMBrd4hCTD, pQMBrd4hE2BD, pQMBrd4mCTD, pQMBrd4mE2BD) ning tühja vektori (valku mittekodeeriv vektor) kontrollina pCG75delXS-i. Plasmid pCG75delXS (kloneerinud I.

Ilves) sisaldab valgu 75 (vt T. Silla magistritöö) kodeerivat järjestust, millest on deleteeritud fragment *XbaI-SmaI* (valku 75 ei sünteesita).

Transkriptsiooni aktivatsiooni katses kasutatud plasmiidid

pRL-TK on plasmiid, mis sisaldab *Renilla reniformis*'est pärit lutsiferaasi ensüümi cDNA järjestust (Promega). pGL3E2BS konstrukti valmistamisel oli algvektoriks pGL3 plasmiid (Promega), mis sisaldas *Photinus pyralis*'e lutsiferaasi kodeerivat järjestust. Sellesse plasmidi kloneeriti 3 BPV-1 E2 seostumiskohta ning SV40 promootorjärjestus (kloneerinud T. Silla). Lisaks kasutati selles katses pCGE2, pQMBrd4hCTD, pQMBrd4hE2BS ja pCG75delXS plasmide (kirjeldatud eespool).

Brd4 järjestusi sisaldavate ekspressioonivektorite konstrueerimine

Brd4 järjestusi sisaldavate plasmiidide kloneerimiseks kasutati algvektorina pQM-Ntag/Aint, mis sisaldas 3F12 epitoopi, CMV promootorit, SV40 replikatsiooni alguspiirkonda (*ori*), polü-A signaali, ampitsilliini resistentsusgeeni ja β -globiini intronit (R. Kurg).

SV40 NLS-i (tuuma lokalisatsiooni signaal) kloneerimine pQM vektorisse

NLS pandi kokku kahest tellitud komplementaarsest praimerist (firma "Prologo"), mille otstesse olid disainitud restriksioonisaaidid NLS-i kloneerimiseks vektorisse.

Praimer I cg agatctgatatccccaagaagaacgcaaag

Praimer II cgagatctagcgctaactttgcgtttcttcttg

cgagatct(*BglII*)gatatc(*EcoRV*)cccaagaagaacgcaaagtt(*NLS*)agcgct(*Eco47III*)agatct(*BglII*)cg

Praimerite seostumisel tekkinud üleulatuvate otste täitmiseks kasutati Klenowi fragmenti. NLS lõigati otstest ensüümiga *BglII* ning kloneeriti pQM vektorisse *BamHI* restriksioonisaiti. Saadi plasmiid pQMNLS.

pQMBrd4hCTD, pQMBrd4hE2BD, pQMBrd4mCTD ja pQMBrd4mE2BD
plasmiidide kloneerimine

Brd4 valku ekspresseerivate plasmiidide kloneerimiseks telliti I.M.A.G.E. konsortsiumist kloonid, mis sisaldasid Brd4 C-terminaalse osa cDNA järjestusi (inimese kloon 380968: nukleotiidid 2601-4090, hiire kloon 6837518 nukleotiidid 1870-5700).

Vajalike järjestuste amplifitseerimiseks kloonidelt kasutati PCR meetodit ning järgmisi praimereid:

hCTD <i>sense</i>	cg gtatac cggcaccacaagtcggac
hE2BD <i>sense</i>	cg gtatac ttcgagcagttccgccgc
hCTD/hE2BD <i>antisense</i>	cg aagctt tcagaaaagattttcttcaa
mCTD <i>sense</i>	cg gtatac cggcaccacaagtcagac
mE2BD <i>sense</i>	cg gtatac ttgagcatttcgccgtg
hCTD/hE2BD <i>antisense</i>	cg aagctt cacctgggtgctctcaaaaaag

PCR-ga ülespaljundatud Brd4 kodeerivaid järjestusi lõigati ensüümidega *Bst*1107I ja *Hind*III ning kloneeriti pQM-NLS vektorisse, mida oli lõigatud ensüümidega *Hind*III ja *Eco*47III. Saadi plasmiidid pQMBrd4hCTD, pQMBrd4hE2BD, pQMBrd4mCTD ja pQMBrd4mE2BD.

pFrebnaBrd4hCTD, pFrebnaBrd4hE2BD, pFrebnaBrd4mCTD ja
pFrebnaBrd4mE2BD plasmiidide kloneerimine

Plasmiid pFrebna (K. Janiksoni magistritöö) ekspresseerib CMV promootori alt EGFP ja *Epstein Barr* viiruse EBNA1 valku ning sisaldab EBNA1 seostumiskohti (FR). Brd4 järjestuste kloneerimiseks pFrebna vektorisse kasutati eelnevalt valmistatud pQM vektoril põhinevaid Brd4 ekspressioonikonstrukte. pFrebna plasmiidi lõigati ensüümidega *Bgl*II ja *Eco*105I ning sellesse sisestati *Hind*III ja *Eco*105I-ga pQMBrd4 plasmiididest välja lõigatud Brd4 järjestused koos 3F12 epitoobi ja NLS-ga. Saadi plasmiidid pFrebnaBrd4hCTD, pFrebnaBrd4hE2BD, pFrebnaBrd4mCTD ja pFrebnaBrd4mE2BD.

Kloneerimine

Kloneerimise etapid teostati firma *MBI Fermentas* ensüümide ja puhvritega vastavalt tootjapoolsetele protokollidele. Restriksioonanalüüsidel kasutati iga ensüümi 5U reaktsiooni kohta 37 °C juures vähemalt üks tund. Reaktsioon viidi läbi ensüümidele sobivates puhvrites.

Vektori 5' fosfaatrühmade eemaldamine DNA fragmentide iseligeerumise vältimiseks toimus CIAP (vasika soole aluseline fosfataas) töötlusega, kus kasutati kuni 5U ensüümi restriksiooni puhvris.

3' üleulatuvate otste täitmiseks kasutati kuni 5U *Klenow* fragmenti restriksiooni puhvris.

DNA agarosgeelist puhastamine. DNA restriksioonifragmendid eraldati 0,8-1,2 % agarosgeelis, mis oli valmistatud TAE puhvris (40 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA).

Vajalike fragmentide puhastamiseks geelist kasutati *Ultra Clean DNA Purification Kit*'i (MO BIO) ja tootjapoolset protokollit.

DNA fragmentide ligatsioon. Agarosgeelist puhastatud vajalikke DNA fragmente võeti suhtes 1 osa vektorit ja 10 osa inserti. Fragmendid lüüsi 12 tunni jooksul 16 °C juures kasutades 5 Weiss ühikut (U) T4 DNA lüüsi ja vastava lüüsi puhvrit.

Bakterite transformatsioon kuumaehmatus (*heat shock*) meetodil. Saadud konstruktide paljundamiseks kasutati bakteri *E. coli* tüve DH5 α . Kompetentsus saavutati Inoue *et al.* poolt avaldatud protokollit järgi (Gene, 1990).

Kompetentsetele *E.coli* DH5 α rakkudele lisati ligatsioonisegu. Rakke inkubeeriti 30 minutit jään, siis 45 sekundit 42° C juures ning jahutati jään. Segule lisati 300 μ l LB söödet ning inkubeeriti 1 tund 37 °C juures loksutil. Rakud tsentrifuugiti lauafuugiga 2-3 minutit 5000 rpm ning eemaldati enamus söötmet. Rakud resuspendeeriti allesjäänud ligikaudu 100 μ l söötmet ning plaaditi LB tassidele, mis sisaldasid kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 μ g/ml või ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 μ g/ml.

Plasmiidse DNA eraldamine aluselise lüüsiga (minipreparatsioon). 2 ml-s LB söötmes, millele oli lisatud 100 µg/ml ampitsilliini või 50 µg/ml kanamütsiini, kasvatati rakke 37 °C juures 12-16 tundi. Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati aluselise lüüsi meetodit. Bakterid tsentrifuugiti lauafuugiga 13 000 rpm 2 minutit. Eemaldati sööde ning rakud suspendeeriti 100 µl külmas puhver A-s (25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM glükoos). Lisati 200 µl lüüsilahust (200 mM NaOH, 1% SDS), segati õrnalt, lisati 150 µl külma neutralisatsioonilahust (60 ml 5 M kaalium atsetaati, 11.5 ml jää-äädikhapet 100 ml vees) ning lüüsi inkubeeriti jääl 5 minutit. Pärast tsentrifuugimist 13 000 rpm 5 minutit tõsteti supernatant üle uude tuubi (*eppendorf*) ning sellele lisati 600 µl isopropanooli. Segu inkubeeriti toatemperatuuril 10 min ning tsentrifuugiti 13 000 rpm 5 min. Vedelik aspireeriti, DNA sadet pesti 1 ml 70 % etanooliga ja koguti tsentrifuugides 13 000 rpm 5 minutit. Etanool aspireeriti ning DNA lahustati 50 µl TE puhvril (10mM Tris-Cl, 0.1mM EDTA), mis sisaldas RNAasi lõpp-kontsentratsiooniga 20 µg/ml. Lahust inkubeeriti 30 min 65 °C juures.

Plasmiidse DNA eraldamine aluselise lüüsiga (midipreparatsioon). Suurema koguse DNA saamiseks pandi õiged kolooniad kasvama 50 ml LB-sse, millesse lisati 100 µg/ml ampitsilliini või 50 µg/ml kanamütsiini. Rakke kasvatati 12-16 tundi 37 °C juures loksutil. Plasmiidne DNA eraldati kasutades firma *Eppendorf Perfectprep Plasmid Midi Kit*'i ning tootjapoolset protokollit.

PCR (polümeraasi ahelreaktsioon)

PCR viidi läbi *Eppendorf Mastercycler Gradient* aparaadiga 50 µl lahuses. PCR reaktsioonisegu sisaldas 2 µl 10x PCR-i puhvrit (100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl, 0.8 % *Nonidet* p40; MBI Fermentas), 1,25 mM MgCl₂, nukleotiidide segu lõppkontsentratsiooniga 0,2 mM iga nukleotiidi, 50 pmol kumbagi praimerit, 1U *Taq* polümeraasi (puhastatud J. Sedmani poolt) ja 10 ng *template* DNA-d.

Amplifikatsioonireaktsioon toimus järgmistel tingimustel:

algne denaturatsioon: 95° C 3 minutit

denaturatsioon: 95° C 1 minut	
praimerite seondumine: 55° C 1 minut	} 22 tsüklit
ekstensioon: 72° C 2 minutit	
inkubatsioon: 72° C 5 minutit	

DNA transfektsioon koekultuurirakkudesse

Plasmiidid transfekkeeriti koekultuurirakkudesse elektroporatsiooni meetodil (Ustav *and* Stenlund, 1991). 90% konfluentsetelt tassidelt aspireeriti sööde, rakke pesti 1xPBS-ga, trüpsiniseeriti, suspendeeriti, koguti 50 ml koekultuurituubi. Jurkat rakuliini puhul, mis on suspensioonikultuur, koguti rakud ilma PBS-i pesu ja trüpsiniseerimiseta. Rakud tsentrifuugiti (*Eppendorf Centrifuge* 5810 R) 5 minutit 1000 rpm 20° C juures, aspireeriti sööde ning suspendeeriti söötmes, kuhu oli lisatud 1M NaBes puhvrit (pH 7.5) lõppkontsentratsioonini 5mM. Küvetis suspendeeriti 250 µl rakususpensiooni (ligikaudu 3-4 miljonit rakku ühe poratsiooni kohta) 50 µg kandja DNA-ga (lõhe spermi DNA) plasmiidsete DNA-dega ning elektroporeeriti (elektroporaator: *Gene Pulser II*, *Bio Rad*). Elektroporatsioonil kasutatud pinge ja mahtuvus olid CHO 4.15.5, 4P11 ja C127 rakuliinidel 220 V ja 975 µF, CHO rakuliinil 230 V ja 975 µF, Jurkat rakuliinil 210 V ja 1000 µF ning Cos7 rakuliinil 180 V ja 975 µF. Edasi pipeteeriti rakud 5ml-sse söötmesse, tsentrifuugiti ning aspireeriti sööde. Rakud resuspendeeriti ning jaotati 100 mm läbimõõduga tassidele (Jurkat rakud 60 mm läbimõõduga tassidele). Rakke kasvatati 37 °C juures ja 5% CO₂ tingimustes.

Koimmuunosadestamine

Kõik koimmuunosadestamise etapid, inkubeerimised ja tsentrifuugimised viidi läbi jääl või 4° C juures. Konkreetse proovi lüüsimisel, kandjaga inkubeerimisel ja hilisemal kandja pesemisel kasutati järgmise koostisega immuunosadestamise (IP) puhvrit: 0,1M KCl, 20 mM TrisHCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 10 % glütserool, 1 mM PMSF, 0,1 %

Tween, 0,5 mM DTT, aprotiniin (2 ng/ μ l), leupeptiin (2 ng/ μ l) (You *et al.*, 2004). 5F10 sefarooskandjaid blokeeriti 5 % lõssilahusega (lõssipulber ja 1xPBS-0,05 % Tween20) 30 minutit 4° C juures segajal, pesti 1 kord 1 ml IP puhvriga. Edasi suspendeeriti magnetkandjad vajaminevas koguses puhvris ning kasutati koimmuunosadestamise katses.

48 h peale transfektsiooni aspireeriti koekultuuritassidel kasvavatelt COS7 rakkudelt sõõde, rakke pesti 3 korda 1xPBS-ga ning asetati jääle. Edasi lisati tassidele 1 ml PBS-EDTA-d (3mM EDTA 1xPBS-s) ning inkubeeriti jääs aeg-ajalt segades kuni rakud tulid tassi küljest lahti. Rakud suspendeeriti, pipeteeriti tuubidesse ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 5000 rpm 2 minutit. Supernatant aspireeriti ja rakud resuspendeeriti 200 μ l-s IP puhvris. Lahust lüüsitud rakkudega sonikeeriti (100 % võimsusega umbes 1 sekund) ning inkubeeriti jääs 10-15 minutit. 1/10 rakulüsaadist pipeteeriti uude tuubi ning sellele lisati 1 maht 2xSDS lüüsipuhvrit (50 mM TrisCl pH6.8, 100mM DTT, 2% SDS, 0.1% broomfenoolsinine, 10% glütserool), kuumutati 5 minutit 100° C temperatuuril ning säilitati kuni edasise analüüsini -20° C juures. Ülejäänud lüsaadile lisati 1ml IP puhvrit ning etiidiumbromiidi lõppkontsentratsioonini 200 μ g/ml, et lõhkuda DNA-valk interaktsioonid. Proove inkubeeriti jääs 20 minutit. Seejärel tsentrifuugiti lüsaate lauatsentrifuugis 10 minutit 13000 rpm, supernatant tõsteti uude tuubi ning sellele lisati 7.5 μ l 5F10 antikehaga seotud sefarooskandjaid. Rakulüsaati inkubeeriti koos kandjatega 1-1.5 tundi 4 °C juures segajal. Edasi pesti kandjaid 3 korda 200 μ l IP puhvriga (suspendeeriti puhvris ja tsentrifuugiti lauatsentrifuugis 2-3 minutit 4000 rpm). Seejärel kandjad resuspendeeriti 50 μ l-s 1xLaemmli puhvris (50 mM TrisHCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% broomfenoolsinine, 20% glütserool), kuumutati 10 minutit 100° C juures ning edasisel analüüsil lahutati valgud geelelektroforeesil polüakrüülamiidgeelis (vt Western blot).

Plasmiidi stabiilse jaotumise katse

Jurkat rakke transfecteeriti plasmiididega pRetE2, pRetE39A, pRetVP16:E2, pFrebna, pFrebnaBrd4hCTD, pFrebnaBrd4hE2BD, pFrebnaBrd4mCTD ja pFrebnaBrd4mE2BD.

Kontrolltransfektsioonina kasutati ainult *carrier* DNA-ga poreeritud rakke. Üheks transfektsiooniks võeti umbes 4 miljonit rakku ning elektroporatsioon viidi läbi eelpoolkirjeldatud meetodikat kasutades (vt DNA transfektsioon koekultuurirakkudesse). Peale transfektsiooni pandi rakud kasvama 60 mm läbimõõduga koekultuuritassile. Kindlate ajavahemike järel võeti kindel ruumala rakususpensiooni igast transfektsioonist läbivoolutsütomeetria analüüsiks kasutades selleks FACS-i (*flow cytometry cell sorter*). Ülejäänud rakkudele lisati nii palju värsket söödet, et kasvavate rakkude tihedus oleks vahemikus 0.3×10^6 - 1×10^6 rakku ml-s. FACS analüüsil määrati totaalne rakkude arv suspensioonis, lugedes vaid neid signaale, millel on rakkudele iseloomulikud suuruse ja pinnastruktuuri parameetrid. Iga seeria siseselt kasutati ainult *carrier* DNA-ga transfekteeritud rakkude fluorestsentshistogrammi mittespetsiifilise autofluorestsentsi määramiseks. Signaalid, mis olid tugevamad, kui 99.9% kontrollrakkude autofluorestsentsi signaalidest, loeti EGFP positiivseteks rakkudeks. Arvutati EGFP positiivsete rakkude arv ml-s ja totaalne rakkude arv ml-s, kasutades valemit:

$$\frac{(\text{rakkude arv} \times 1000)}{(\text{aeg} \times \text{analüüsitud ruumala}) \times \text{lahjendus}}$$

Mõõtmisel kasutati HI voolutuskiirust (60 µl/min), rakke analüüsiti 3 minutit. Positiivsete rakkude arv erinevates ajapunktides normaliseeriti esimeses ajapunktis mõõdetud positiivsete rakkude arvu suhtes, saades igale ajapunktile vastavad suhtelise EGFP taseme väärtused. Totaalset rakkude arvu aluseks võttes arvutati rakkude poolestusajad erinevates ajapunktides, esimene ajapunkt võeti nulliks ehk lähtepunktiks.

Ajapunkte võeti umbes 24 tunniste vahedega 6-7 päeva. Saadud andmeid analüüsiti kasutades *Microsoft Exceli* programmi.

Transientse replikatsiooni analüüs

Transfekteeritud rakkudest eraldati 48 ja 72 tundi peale transfektsiooni madalamolekulaarne DNA. Koekultuuritassidel kasvavaid rakke pesti 3 korda 1xPBS-ga aspireeriti vedelik ning asetati tassid jääle. Rakud lüüsi 0.6 ml-s Sol 1/Sol 2 (1:2) lahuses (Sol 1: 50 mM glükoos, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0; Sol 2: 0.2 M NaOH, 1% SDS) ning inkubeeriti 5 minutit. jää. Edasi lisati 0.3 ml Sol 3 lahust (100 ml-s 60 ml 5 M kaaliumatsetaati ja 11.5 ml jää-äädikhapet) kallutati tase kuni

kromosoom-membraankompleksi moodustumiseni. Plaadil olev materjal koguti kummispaatliga tuubidesse ja tsentrifuugiti lauafuugiga 4° C juures 20 min. Supernatant kanti uude tuubi ja sadestati 0.6 ml isopropanooliga 1 h -20 °C juures. Seejärel tsentrifuugiti proove 10 minutit. 4 °C juures, eemaldati supernatant ja võeti sade üles 0.2 ml-s Sol 4-s (Sol 4 e. T₂₀E₁₀N₁₀₀S_{0.2}: 20 mM TrisCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.2 % SDS, 100 mM NaCl), mis sisaldas 200 µg/ml-s proteinaas K-d. DNA lahuseid inkubeeriti 50 °C juures 1 h. Seejärel lisati proovidele 1 maht (200 µl) fenooli ja kloroformi lahust (1:1) ning segati. Lahuseid fuugiti lauafuugiga 5 minutit 13 000 rpm-i ning fuugimisel tekkinud vesifaas kanti üle uude tuubi. DNA sadestati kaks korda: esimesel korral 2 mahu 96% etanooli- ja 1/50 mahu NaCl-ga 1 h ning teisel korral 2.5 mahu 96% etanooliga ja 1/25 mahu NaCl-ga. Pärast fuugimist ja supernatandi eemaldamist pesti sadet 180 µl 70 % etanooliga eemaldati vesifaas ning lahustati sade 20 µl-s TE-s, mis sisaldas 10 µg/ml-s RNAas A-d. DNA proove inkubeeriti 0.5 h 68 °C juures.

Igast proovist võeti edasisele analüüsile 10 µl, mida lõigati uuritavat plasmidi lineariseeriva ensüümiga ja *DpnI* ensüümiga, mis lõikab ainult bakteriaalse päritoluga DNAd. Restriktsioon kestis 6-12 tundi 37° C juures. DNA lahutati geel-elektroforeesil 1 % agarosgeelis ning seejärel denatureeriti loksutades geeli denatureerivas lahuses (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 45 minutit ning seejärel neutraliseerivas lahuses (1 M Tris pH 7.4, 1.5 M NaCl) 10 minutit. DNA ülekanne filtrile (*Amersham Hybond-N⁺* nailonfilter) toimus 10xSSC puhvriga (1.5 M NaCl, 0.15 M Na-atsetaat) 12-18 tundi, kasutades kapillaarset ülekannet. Geelilt filtrile kantud DNA fikseeriti kovalentselt ultraviolettkiirguse abil (1200 J/m²). Edasi asetati filter hübridisatsioonitorusse ning pandi koos pre-hübridisatsiooni lahusega [10 ml-is lahuses: 20x SSC 3 ml, 50x Denhardt (1% Ficoll 400, 1% polüvinüülpürrolidoon, 1% veise seerumi albumiin FractionV, Sigma) 1 ml, 10% SDS 0.5 ml, H₂O 5.3 ml ja 2000 µg denatureeritud kandja DNAd] pooleks tunniks 65 °C juurde. Hübridiseerimisel kasutatud spetsiifiline kaheahelaline DNA proov sünteesiti kasutades matriitsina 100 ng lineariseeritud plasmidi, mille replikatsiooni sooviti jälgida. Proovi sünteesiks ja radioaktiivseks märkimiseks kasutati *Fermentas DecaLabel DNA Labeling Kit*'i ja α³²P-dCTP-d (Du Pont NEN). Vahetult enne hübridiseerimist denatureeriti radioaktiivne proov 5 minutit

100° C juures. Hübridisatsioon kestis 12-16 tundi 65 °C juures. Seejärel pesti filtrit 65° C juures 2x15 minutit esimese pesulahusega (2x SSC, 0.1 % SDS), 2x15 minutit teise pesulahusega (0.2xSSC, 0.1 % SDS) ning loputati 0.1xSSC lahuses. Filter kuivatati toatemperatuuril ning hübridiseerunud DNA detekteeriti eksponeerides filtrit röntgenfilmile või detekteerides signaali *PhosphoImager*´iga. Markerina foreesil kasutati 50-100 pg sama lineaarset DNAd, millega sünteesiti radioaktiivne proov.

Western blot

Koekultuuritassidel kasvanud rakud lüüsi *Laemmli* puhvris (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2 % SDS, 0.1 % broomfenool sinine, 10 % glütserool). Samas puhvris võeti üles ka immuunosadestamisel saadud valgud. Proove kuumutati 100° C juures 5 minutit ning valgud lahutati 10 % SDS-polüakrüülamiid geelis (Sambrook *and* Russell, 2001) ning kanti üle PVDF filtrile (*Millipore Immobilon*TM -P 0.45µm). Ülekanne toimus pingel 15 V 45 minutit poolkuiva ülekande (*Semi Dry*) puhvris (39 mM glütsiin, 48 mM Tris alus, 0.037 % SDS, 20 % etanool) *Bio-Rad Trans-blot SD transfer cell* aparaadiga. Vähendamaks mittespetsiifilisi signaale blokeeriti filter 1 tunni jooksul toatemperatuuril (või üleöö 4° C juures) 5 % lõssilahuses (lõssipulber ja 1xPBS-0,05 % Tween20). Edasi inkubeeriti filtrit peroksüdaasiga konjugeeritud 5E11HRP antikehaga (BPV-1 E2 valgu 3F12 ja 5E11 epitoope äratundev antikeha) (Kurg *et al.*, 1999). Inkubatsioon toimus 1 tunni jooksul 1 % lõssipulbri lahuses. Antikeha lõpp-kontsentratsioon inkubatsioonilahuses oli 0.1µg/ml. Seejärel pesti filtrit 4x10 minutit pesulahuses (50mM TrisHCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween20). Signaal detekteeriti kasutades ECLTM *Western Blotting Detection Kit*´i reagente (Amersham Pharmacia Biotech).

Transkriptsiooni aktivatsiooni uurimise katse

Transaktivatsiooni uurimiseks kasutati firma “Promega” *Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit*´i. CHO rakkudesse transfekteeeriti pRL-TK, pCGE2, pGL3E2BS, pQMBrd4hCTD, pQMBrd4hE2BS ja pCG75delXS plasmiidid. 36-48 h peale

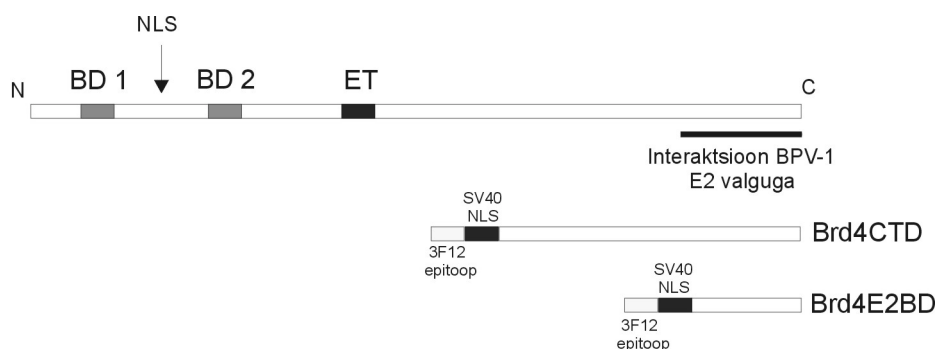
elektroporatsiooni eemaldati koekultuuri tassidel kasvavatelt rakkudelt sööde, rakke pesti 3 korda 1xPBS-ga ning asetati jääle. Rakud lüüsi 1xPLB-ga (*Passive lysis buffer*; 60 mm läbimõõduga tassile 400 µl puhvrit). Lüüsitud rakud koguti kummispaatliga tuubidesse ning homogeense suspensiooni saamiseks segati põhjalikult. Proovid külmutati -20° C juures ning sulatati uuesti. Külmutamise-sulatamise protsessi korrati 1-2 korda (vajalik rakkude täielikuks lüüsumiseks). Edasi võeti vajalik kogus luminomeetri tuube ning pipeteeriti neisse 20 µl rakulüsaate. Lüsaatidele lisati 100 µl LAR II lahust (*Luciferase Assay Reagent II*), mis on vajalik *Photinus pyralis*'e lutseferaasi aktiveerimiseks. Tuubid asetati luminomeetrisse (TD 20/20ⁿ *Luminometer*) ning mõõdeti tulemus. *Photinus pyralis*'e lutseferaasi aktiivsuse kustutamiseks ja *Renilla reniformis*'e lutsiferaasi aktiveerimiseks lisati samasse tuubi *Stop and Glo Reagent*'i, segati ning mõõdeti tulemus luminomeetriga. Saadud tulemuste analüüs viidi läbi kasutades *Microsoft Excel*'i programmi.

TULEMUSED

1. Inimese ja hiire Brd4CTD ja Brd4E2BD seostuvad BPV-1 E2-ga

Eelnevalt on *You et al.* (2004) näidanud BPV-1 E2 seostumist inimese täispika Brd4-ga *in vivo* ja Brd4CTD-ga *in vitro* (GST pull-down *in vitro* transleeritud valguga). Samad tulemused saadi hiire Brd4 valguga. Brd4 bioloogilise tähtsuse uurimiseks E2 funktsioonile vahendada viiruse genoomi kinnitumist mitootilistele kromosoomidele, kasutati inimese valgust C-terminaalset osa (Brd4CTD: aminohapped 1047-1362), kuna vajalikud järjestused interaktsiooniks E2-ga asuvad inimese Brd4-s just selles valgu piirkonnas. Seostudes BPV-1 E2-ga käitub Brd4CTD dominant-negatiivsena ning takistab E2 kinnitumist kromatiinile.

Antud artikli eeskujul kloneerisin inimese ja hiire Brd4 C-terminaalset osa kodeerivad järjestused (Brd4hCTD: aminohapped 1047-1362; Brd4mCTD: aminohapped 1049-1401) pCG vektorisse (vt Materjal ja meetoodika). Lisaks selle konstrueerisin plasmiidid, mis ekspresseerivad Brd4-st ainult E2-ga seostumiseks vajalikku osa (Brd4hE2BD: 1224-1362; Brd4mE2BD: 1259-1401) (vt Materjal ja meetoodika). Vastavatele valkudele on liidetud SV40 NLS (kuna täispika valgu tuuma lokalisatsiooni signaal asub N-terminaalses osas) ning 3F12 epitoop (valkude detekteerimiseks *Western blotil*).

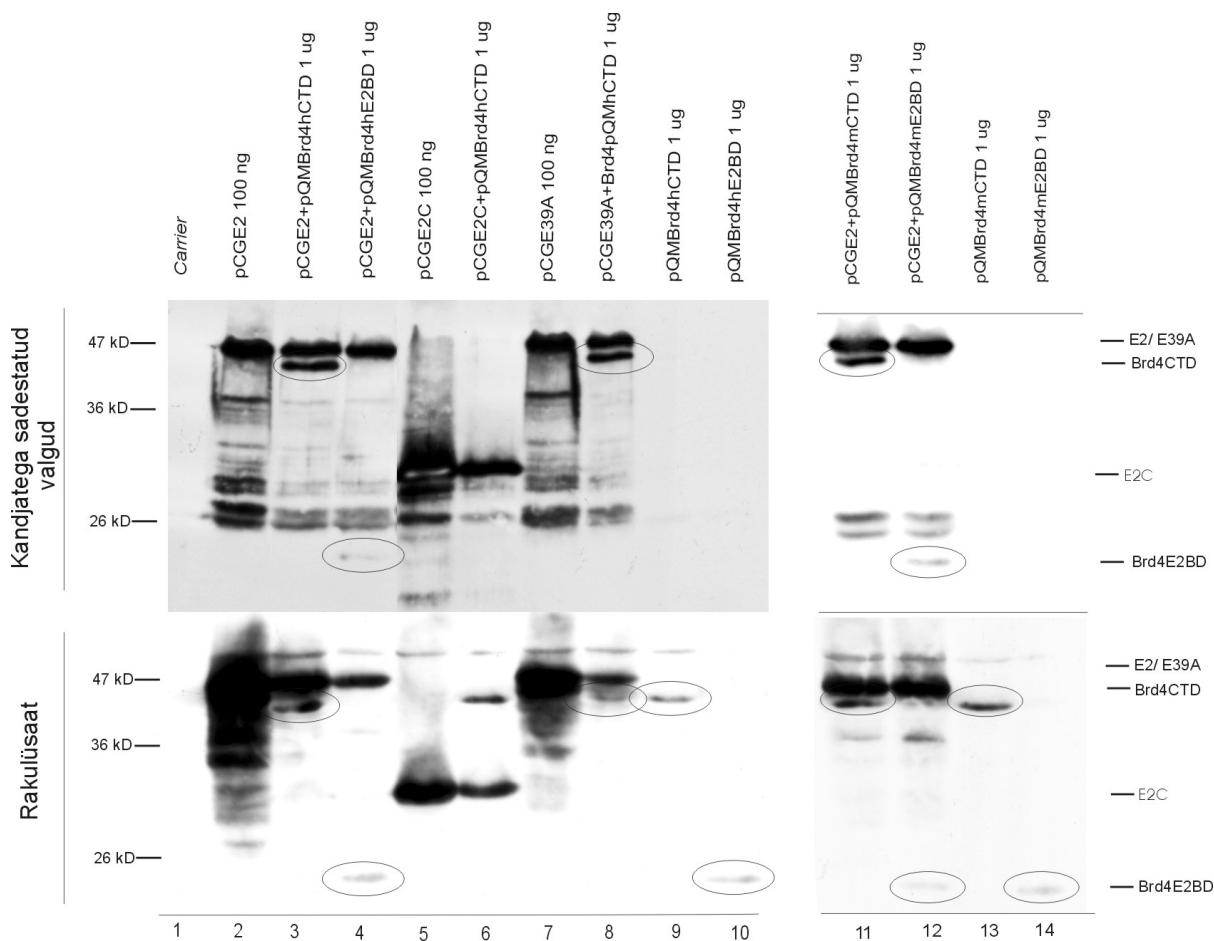


Joonis 8. Üldine skeem minu poolt kloneeritud ja katsetes kasutatud Brd4 valkude kohta. Kõige ülemine joonis kujutab täispikka valku ning alumised vastavalt Brd4CTD-d ja Brd4E2BD-d. Mõlema valgu otsa on kloneeritud tuuma lokalisatsiooni signaal (NLS) ja valkude detekteerimiseks *Western blotil* 3F12 epitoop.

Kontrollimaks minu poolt kloneeritud konstruktidelt ekspresseeritavate Brd4 valkude funktsionaalsust, kasutasin koimmuunosadestamise meetodit, kus vaatasin Brd4CTD ja Brd4E2BD seostumist BPV-1 E2-ga. E2 ja temaga antud tingimustes interakteeruvad valgud kinnituvad 5F10 epitoopi ära tundvate antikehadega seotud sefarooskandjatele ning need sadestatakse. Vastav epitoop asub E2 valgus C-terminaalses otsas, mis tähendab, et kandjatele kinnituvad nii täispikk E2 kui E2C. Viimane on antud katses kasutatud kui negatiivne kontroll, millega Brd4CTD ja Brd4E2BD ei peaks seostuma. E39A on E2 mutant, mis seostub kromatiinile halvemini võrreldes *wild type* valguga. Kuna edaspidi oli seda plaanis kasutada plasmidi kadumise katses negatiivse kontrollina, vaatasin ka E39A interaktsiooni Brd4CTD-ga.

Transfekteerisin Cos7 rakkudesse 100 ng E2, E2C, E39A ning 1000 ng hiire ja inimese Brd4 valke ekspresseerivaid konstrukte (vt Materjal ja metoodika) ning 50 µg *carrier* DNA-d. 48 tundi peale transfektsiooni lüüsisin rakud IP puhvris (vt Materjal ja metoodika) natiivsetes tingimustes ning sadestasin 5F10 sefarooskandjatega E2, E39A, E2C ja nendega seostuvad valgud. Sadestatud valgulüsaate analüüsisin *Western blot* meetodil. Signaalide detekteerimiseks kasutasin 5E11HRP antikeha (vt Materjal ja metoodika), mis tunneb ära 3F12 epitoobi E2, E2C, E39A valgus ning samuti ekspresseeritud Brd4CTD ja Brd4E2BD valkudes, kuhu oli vastav järjestus kloneeritud.

Nii inimese kui hiire Brd4CTD ja Brd4E2BD seostuvad wtE2-ga (joonisel 9 rajad 3, 4 ja 11, 12), Brd4CTD E2C-ga aga mitte (rada 6). Saadud andmed on kooskõlas *You et al.* (2004) varem näidatud tulemustega ning ühtlasi kinnitavad, et kloneeritud konstruktidelt ekspresseeritavad valgud seostuvad wt E2-ga. Kuna nii inimese kui hiire Brd4CTD ja Brd4E2BD valgud seostuvad E2-ga, siis on nende kahe valkudes E2-ga seostumise kohad kattuvad. E2 stabiilse säilimise mutant E39A on samuti võimeline interakteeruma Brd4hCTD-ga (rada 8) ning nende tulemuste põhjal mitte nõrgemini kui *wild type* E2. Kuna hiire ega inimese Brd4CTD ja Brd4E2BD ei jää kandjate külge üksinda (rajad 9, 10 ja 13, 14), siis on seostumine E2 vahendatud.



Joonis 9. Inimese ja hiire Brd4CTD ja Brd4E2BD seostumine BPV-1 E2-ga. Cos7 rakke transfecteeriti *carrier* DNA-ga ning E2, E2C, E39A ja erinevaid Brd4 valke ekspresseerivate konstruktiividega. 48 tundi peale poratsiooni lüüsi rakud IP puhvril ning sadestati 5F10 sefarooskandjatega. 1/20 rakulüsaadist (alumine osa pildil) ning 1/2 koimmunosadestamisel saadud valgulüsaadist (ülemine osa pildil) lahutati 10 % SDS-polüakrüülamiidgeelis. Negatiivse kontrollina on kasutatud *carrier* DNA-ga transfecteeritud rakke (rada 1). Ainult Brd4CTD ja Brd4E2BD-ga poreeritud rakkude immuunosadestamisel saadud signaali puudumine (9, 10 ja 13, 14) kinnitab, et ekspresseeritud Brd4 valgud ei seostu kandjatega mittespetsiifiliselt.

2. Brd4CTD ja Brd4E2BD ei mõjuta E2BS-e sisaldavate plasmiidide stabiilset säilumist jagunevates rakkudes

E2 on vajalik MME-d sisaldavate plasmiidide seostumiseks kromatiinile ning seeläbi nende pääsemiseks tekkivatesse tütaruimadesse. Kui eeldada, et Brd4 on vajalik

retseptor E2 seostumiseks peremeesraku kromosoomidele, siis E2-ga interakteeruvad dominant-negatiivselt käituvad Brd4CTD ja Brd4E2BD peaksid takistama E2 seostumist kromatiinile ja BPV-1 genoomide jaotumist mitoosis. Sellist lähenemist kasutasid *You et al.* (2004) oma töös, kus vaadati Brd4CTD mõju BPV-1 genoomi stabiilsele säilumisele viiruse transformatsiooniefektiivsuse kaudu. Antud lähenemise puhul jääb aga selgusetuks, missugust protsessi Brd4CTD BPV-1 transformatsioonis tegelikult mõjutab, sest E2-ga seostudes võib ta mõjutada ka viiruse DNA sünteesi ja replikatsiooniks ning transformatsiooniks vajalike valkude ekspressiooni.

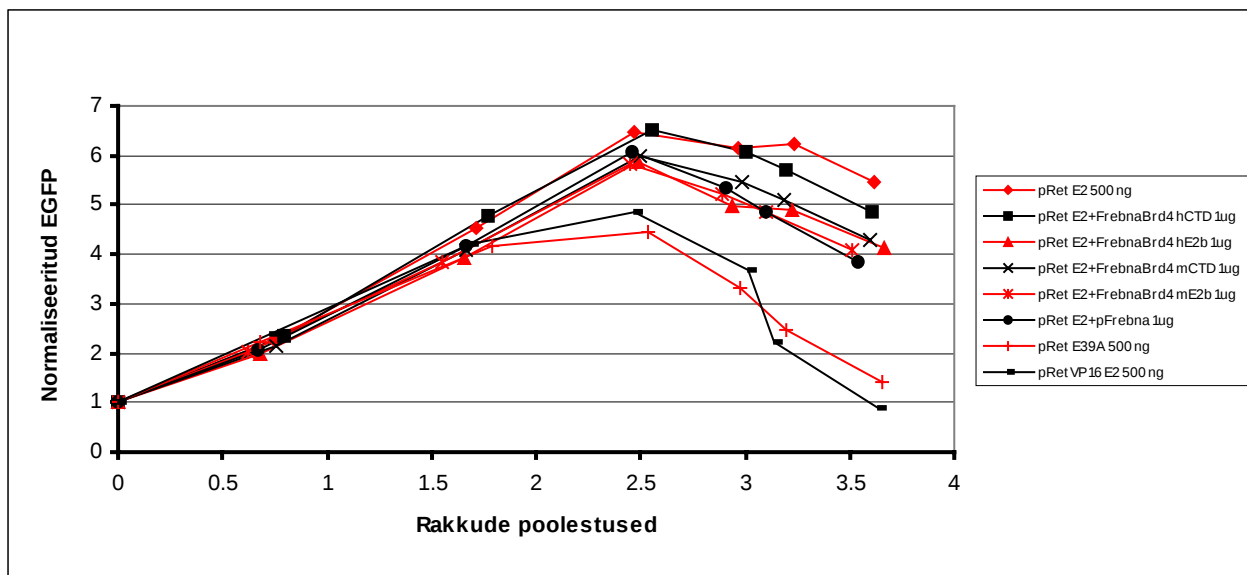
Uurimaks Brd4CTD ja Brd4E2BD mõju stabiilse säilimise protsessis, kasutasin meie laboris eelnevalt välja töötatud meetodit plasmidi püsimise jälgimiseks (*Abroi et al.*, 2004). pRetE2, mittereplitseeruv plasmid, mis sisaldab MME-d ning wt E2-te ja EGFP-d kodeerivaid järjestusi, säilib stabiilselt paljunevates Jurkat rakkudes (*Abroi et al.*, 2004). E2 seob MME-d sisaldava plasmidi kromatiinile ning tagab nii selle säilumise rakkude jagunemise käigus. Kuna antud plasmid ei replitseeru ning sellelt ekspresseeritakse EGFP-d, on võimalik viimase mõõtmisel näha, kui suures osas rakkudes on vastav vektor säilinud detekteeritaval tasemel. pRetE39A plasmidilt sünteesitakse mutantset E2 valku ning pRetVP16:E2 vektorilt ekspresseeritakse valku, milles E2 kromatiinile seostumiseks vajalik N-terminaalne osa on asendatud *Herpes Simplex* viiruse transaktivatsioonidomääniga (vt Materjal ja meetoodika). pRetE39A ja pRetVP16:E2 säiluvad jagunevates rakkudes halvemini kui pRetE2 ning on antud katses kasutatud negatiivsete kontrollidena. Selleks, et Brd4CTD ja Brd4E2BD valke ekspresseeritaks transfekteeeritud rakkudes samuti pika aja vältel, on vastavad järjestused kloonieeritud pFrebna vektorisse (vt Materjal ja meetoodika). Viimane sisaldab EBV stabiilse säilimise süsteemi, kus sünteesitav EBNA1 seob kromatiinile FR järjestust sisaldava plasmidi. pFrebna plasmid on selles katses nn spetsiifilisuse näitaja, et sellelt vektorilt ekspresseeritavatel teistel valkudel pole mingeid efekte E2-st sõltuvale stabiilsele säilumisele.

Jurkat rakke transfekteeeriti 500 ng pRetE2, pRetE39A, pRetVP16:E2, 1000 ng pFrebna ja pFrebnaBrd4hCTD, pFrebnaBrd4hE2BD, pFrebnaBrd4mCTD ja pFrebnaBrd4mE2BD vektoritega ning 50 µg *carrier* DNA-ga. Iga 24 tunni järel 6-7 päeva vältel võeti kindel kogus transfekteeeritud rakke, mõõdeti nende üldarv ning EGFP

positiivsete rakkude arv FACS-ga (vt Materjal ja meetoodika). Saadud tulemuste põhjal arvutati rakkude poolestused ning EGFP positiivsete rakkude arv taandati esimesele ajapunktile.

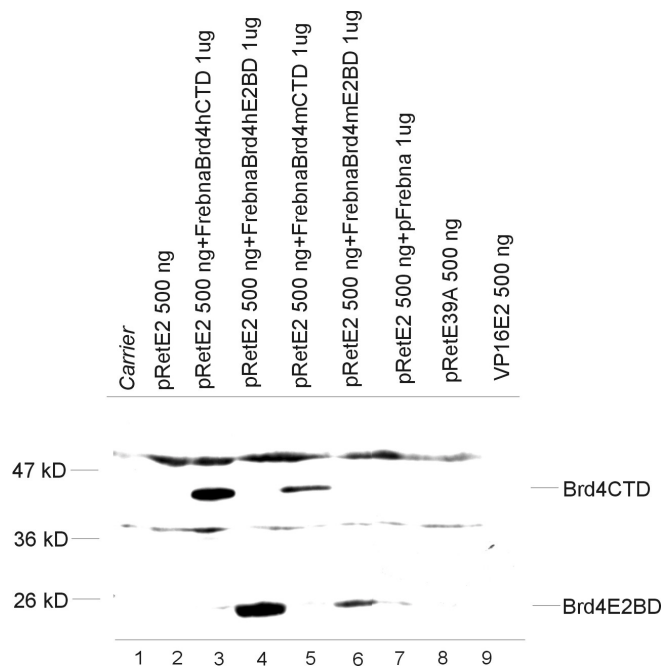
Peale kahte poolestust tekkis selge vahe stabiilselt säiluvate ja mittesäiluvate plasmiidide vahel: wtE2-te ekspresseeriv pRetE2 püsis rakkudes paremini kui pRetE39A ja pRetVP16:E2 (joonis 10). Seejuures ei mõjuta hiire ega ka inimese Brd4CTD ja Brd4E2BD E2 sõltuvat MME-d sisaldavate plasmiidide stabiilset säilumist. Samuti võib öelda, et pFrebna vektoril ei ole kõrvalefekte E2 vahendatud plasmiidide püsimisele.

Sama katset on korratud väiksema pRetE2 ja suuremate Brd4 ekspresseerivate konstruktide kontsentratsioonidega ning tulemused on osutunud samaks. Seejuures on antud katses kasutatud pRetE2 kontsentratsioon (500 ng) optimaalne plasmiidi stabiilse püsimise tekkeks (piisav % EGFP positiivseid rakke peale transfektsiooni). Väga suured plasmiidi tasemed aga mõjuvad halvasti rakkude kasvule.



Joonis 10. Plasmiidide säilimise katse Jurkat rakkudes. Jurkat rakke transfecteeriti pRetE2, pRetE39A, pRetVP16:E2, pFrebna ja Brd4 valke ekspresseerivate vektoritega ning *carrier* DNA-ga. Iga 24 tunni järel 6-7 päeva vältel võeti kindel kogus poreeritud rakke, mõõdeti nende üldarv ning EGFP positiivsete rakkude arv FACS-ga. Saadud tulemuste põhjal arvutati rakkude poolestused ning EGFP positiivsete rakkude arv võrrelduna vastava arvuga I ajapunktis. Autofluorestsentsi määramiseks kasutati ainult *carrier* DNA-ga transfecteeritud rakke.

Brd4 efekti puudumise tõttu tekkis küsimus, kas Brd4CTD ja Brd4E2BD valgud ekspresseeruvad nendes rakkudes piisaval tasemel, et E2 funktsioonile mõju avaldada. Selleks transfecteerisin Jurkat rakke sama skeemi järgi ning samadel tingimustel nagu eelpool kirjeldatud ning analüüsisin valkude ekspressiooni *Western blot* meetodil. 48 tundi peale elektroporatsiooni lüüsisin rakud *Laemmli* puhvris ning lahutasin 10 % SDS-polüakrüülamiidgeelis. Filtrile kantud valkude detekteerimiseks kasutasin 5E11HRP antikeha.



Joonis 11. Brd4CTD ja Brd4E2BD valkude ekspressiooni kontroll Jurkat rakkudes *Western blot* meetodil. Jurkat rakke transfecteeriti pRetE2, pRetE39A, pRetVP16:E2, pFrebna ja Brd4 valke ekspresseerivate vektoritega ning *carrier* DNA-ga. 48 tundi peale poratsiooni lüüsi rakud *Laemmli* puhvris ning lahutati 10 % polüakrüülamiidgeelis. Filtrile kantud valkude detekteerimiseks kasutasin 5E11HRP antikeha (tunneb ära nii E2 kui epitoobiga Brd4 valgud). Negatiivseks kontrolliks on ainult *carrier* DNA-ga transfecteeritud rakud. Inimese ja hiire Brd4CTD ja Brd4E2BD ekspressioon on näha radadel 3 ja 5 ning vastavad Brd4E2BD-d radadel 4 ja 6.

Brd4CTD ja Brd4E2BD valkude tasemed on suhteliselt kõrged võrrelduna E2-ga, mida nendel tingimustel pole üldse võimalik detekteerida (joonis 11) (kasutatud antikeha tunneb ära ka E2 valgu). Seega peaks Brd4 valke olema piisavas ülehulgas E2-ga seotud

funktsioonide mõjutamiseks. Brd4CTD ja Brd4E2BD aga ei oma efekti E2 funktsioonile vahendada plasmidi stabiilset säilimist. Seega tekkis küsimus, kas Brd4 üldse on E2 retseptor kinnitumiseks kromatiinile või ei võimalda antud katsesüsteem seda näha. *You et al.* (2004) poolt näidatud E2-st sõltuv Brd4CTD inhibeeriv toime BPV-1 transformatsiooniefektiivsusele pole seega eeldatavasti põhjustatud BPV-1 genoomi stabiilse säilimise mõjutamisest, vaid on seletatav mingite muude viiruse elutsükli protsesside mõjutamisega.

3. Inimese Brd4CTD surub alla BPV-1 genoomi replikatsiooni C127 rakkudes

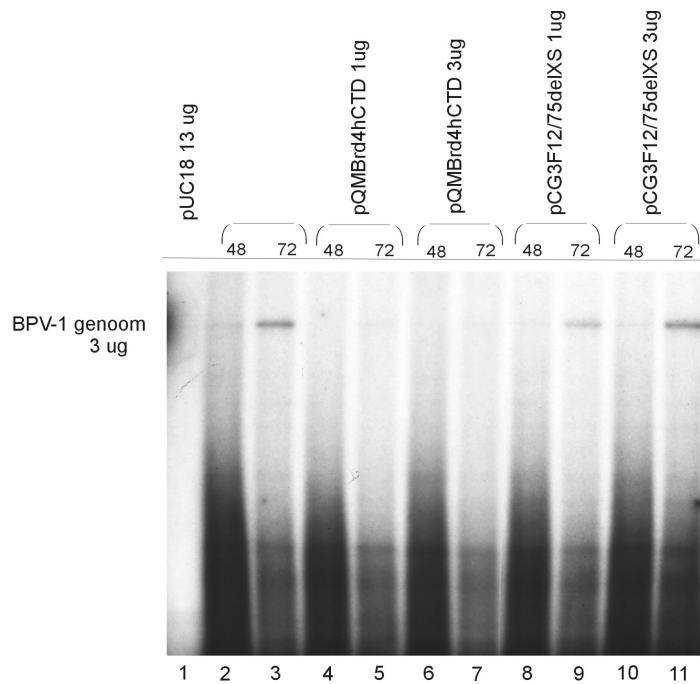
Kuna BPV-1 E2 seostub Brd4-ga N-terminaalse transaktivatsioonidomääni kaudu, mis on vajalik nii viiruse replikatsiooniks kui varaste geenide transkriptsiooniks, võib Brd4CTD seostumine mõjutada ka neid E2 funktsioone. Järgmisena vaatasin Brd4CTD mõju BPV-1 genoomi amplifikatsioonilisele replikatsioonile C127 rakuliinis.

Katses kasutasin BPV-1 kogu genoomi järjestust, mis oli eelnevalt välja lõigatud pMLBPV-1 plasmiidist. pUC18 on antud katses *DpnI* lõikuse ning pCG75delXS tühja vektori (valku mittekodeeriv plasmiid) kontrolliks. Brd4 ekspressiooniks viisin rakkudesse pQMBrd4hCTD, sest *You et al.* (2004) on Brd4 mõju uurimisel kasutanud samuti ainult inimese Brd4CTD-d.

C127 rakkudesse transfekteerisin 3 µg BPV-1 genoomi, 1 µg pUC18 ning 1 ja 3 µg pCG75delXS või pQMBrd4hCTD plasmide. 48 ja 72 tundi peale elektroporatsiooni eraldas rakkudest madalamolekulaarse DNA (vt Materjal ja meetoodika), mida lõikasin ensüümidega *HindIII* (lineariseerib genoomi) ja *DpnI* (fragmenteerib bakteriaalselt metüleeritud aga mitte eukarüootse metülatsioonimustriga replitseerunud DNA). Restrikteeritud proovid lahutasin geelelektroforeesil ning tulemused analüüsisin *Southern blot* meetodil. Replikatsioonisignaali detekteerimiseks kasutasin BPV-1 genoomi spetsiifilist radioaktiivset proovi.

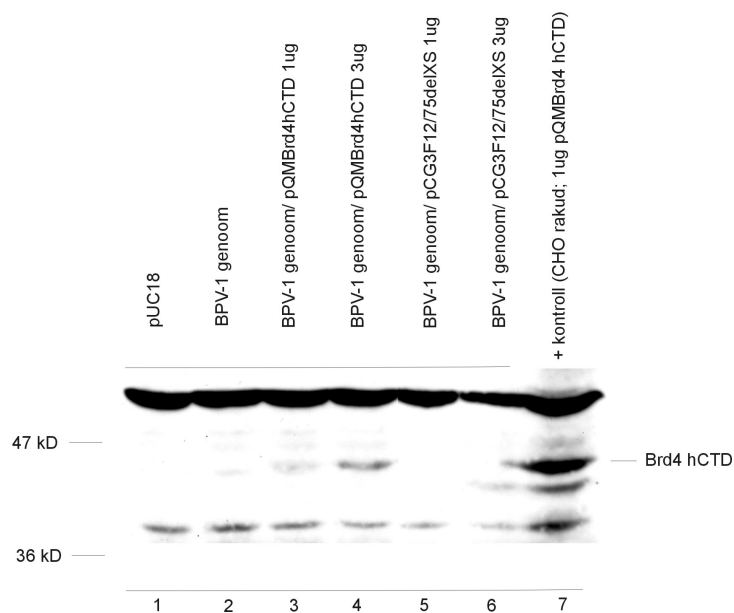
Brd4CTD surub antud süsteemis maha BPV-1 genoomi amplifikatsioonilise replikatsiooni (joonis 12). Negatiivseks kontrolliks on pUC18 plasmiidiga

transfekteeritud rakud (rada 1), kus puudub replikatsioonisignaali. Positiivne signaal on detekteeritav ainult BPV-1 genoomiga (rada 3) ning viiruse DNA ja tühja vektori kontrolliga poreeritud rakkudes (rajad 9 ja 11). Brd4CTD ekspresseerimisel C127 rakkudes genoomi replikatsiooni signaal puudub või on väga nõrk (rajad 4-7).



Joonis 12. Brd4CTD mõju BPV-1 genoomi replikatsioonile C127 rakkudes. C127 rakkudesse transfekteeriti BPV-1 genoom, pUC18, pCG75delXS ja pQMBrd4hCTD plasmiidid. 48 ja 72 tundi peale elektroporatsiooni eraldati rakkudest madalamolekulaarne DNA, mida lõigati ensüümidega *HindIII* (lineariseerib genoomi) ja *DpnI* (fragmenteerib bakteriaalselt metüleeritud DNA). Restrikteeritud proovid lahutati geelelektroforeesil ning tulemused analüüsisiti *Southern blot* meetodil. Replikatsioonisignaali detekteerimiseks kasutati BPV-1 genoomi spetsiifilist radioaktiivset proovi. Negatiivseks kontrolliks on pUC18 plasmiidiga transfekteeritud rakud (rada 1), kus puudub replikatsioonisignaali. Positiivne signaal on detekteeritav ainult BPV-1 genoomiga (rada 3) ning viiruse DNA ja tühja vektori kontrolliga poreeritud rakkudes (rajad 9 ja 11). Brd4CTD ekspresseerimisel C127 rakkudes genoomi replikatsiooni signaal puudub või on väga nõrk (rajad 4-7).

Selleks, et vaadata valkude ekspressiooni C127 rakkudes samades katsetingimustes, võtsin rakud ka *Western blot* analüüsiks. 72 tundi peale transfektsiooni lüüsisin rakud *Laemmli* puhvris ning lahutasin 10 % SDS-polüakrüülamiidgeelis. Filtrile kantud valkude detekteerimiseks kasutasin 5E11HRP antikeha.



Joonis 13. Brd4CTD ekspressiooni kontroll C127 rakkudes *Western blot* meetodil. C127 rakkudesse transfecteeriti BPV-1 genoom, pUC18, pCG75delXS ja pQMBrd4hCTD plasmiidid. 72 tundi peale transfectsiooni lüüsi rakud *Laemmli* puhvris ning lahutati 10 % polüakrüülamiidgeelis. Filtrile kantud valkude detekteerimiseks kasutati 5E11HRP antikeha. Negatiivse kontrollina on kasutatud pUC18-ga transfecteeritud rakke (rada 1) ning positiivse kontrollina CHO rakkudes ekspresseeritud Brd4CTD-d (rada 7). Brd4CTD ekspressioon on näha radadel 3 ja 4.

Brd4CTD ekspressioonitase C127 rakkudes ei ole väga kõrge (joonisel 13 rajad 3 ja 4), kuid ilmselt on see piisav viiruse replikatsiooni inhibeerimiseks. Antud tingimused ei ole aga piisava tundlikkusega, et detekteerida BPV-1 E2 valgu signaali.

4. Brd4CTD surub maha BPV-1 E2 sõltuva transkriptsiooni aktivatsiooni C127 rakkudes

Eelpool kirjeldatud katse näitas, et Brd4CTD surub edukalt maha BPV-1 genoomi replikatsiooni. Brd4CTD-ga seostumine võib takistada E2 interaktsiooni viiruse replikatsiooni peamise initsiatsioonivalguga E1, sest nii E1 kui Brd4-ga seostumiseks on E2-l vajalik N-terminaalne osa. Lisaks sellele ei ole E2 oluline mitte ainult viiruse DNA sünteesi initsiatsioonil, vaid ka viiruse varaste geenide, sealhulgas tema enda,

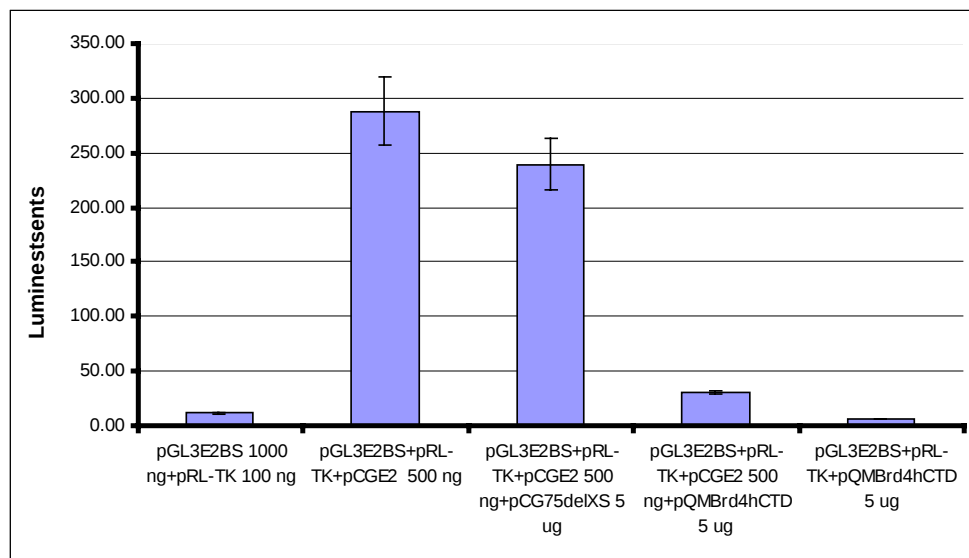
transkriptsiooni aktivatsioonil (McBride *et al.*, 1991; Spalholz *et al.*, 1985). Viimane võib tähendada aga seda, et BPV-1 genoomi replikatsiooni mahasurumine Brd4CTD poolt ei pruugi käia ainult E1 ja E2 mitteseostumise kaudu. Kui Brd4CTD interaktsioon E2-ga rikub ära ka BPV-1 varajaste geenide, sealhulgas replikatsioonivalkude, transkriptsiooni, siis võib see samuti mõjutada viiruse DNA sünteesi. Sellest tulenevalt kontrollisin järgmisena Brd4CTD mõju E2-sõltuvale transkriptsiooni aktivatsioonile.

Katse põhineb firma “Promega” *Dual-Luciferase Reporter Assay*¹, kus ühes süsteemis mõõdetakse kahe erineva reporterensüümi ekspressiooni. Vektorilt pRL-TK ekspresseeritakse *Renilla reniformis*’e lutsiferaasi ensüümi, mis täidab katses sisemise kontrolli ülesannet. pGL3 plasmiidilt sünteesitakse nn eksperimentaalset reporterensüümi, *Photinus pyralis*’e lutsiferaasi ensüümi, mis on seotud konkreetse katsesüsteemi tingimustega. Need kaks vektorit transfekteeeritakse üheaegselt samadesse rakkudesse ning peale rakkude lüüsi ja lutsiferaasi ensüümide aktiivsuse mõõtmist taandatakse eksperimentaalse reporteri aktiivsus sisemise kontrolli suhtes. Selline tulemuste normaliseerimine vähendab eksperimendi tulemuste kõikumist, mis võib olla tingitud erinevustest rakkude kasvus või transfektsiooni efektiivsuses. Minu poolt kasutatud katses on pGL3 plasmidi Toomas Silla poolt kloneeritud SV40 promootor koos kolme E2 seostumiskohaga (pGL3E2BS), mis tähendab, et *Photinus pyralis*’e lutsiferaasi geeni transkriptsioon peaks olema aktiveeritav BPV-1 E2 valgu poolt.

C127 rakkudesse transfekteeriti 100 ng pRL-TK, 1000 ng pGL3E2BS, 500 ng pCGE2, 5 µg pQMBrd4hCTD või pCG75delXS plasmide (vt Materjal ja metoodika) ning 50 µg *carrier* DNA-d. 48 tundi peale transfektsiooni rakud lüüsi ning lüsaatidest mõõdeti luminomeetriga kahe erineva lutsiferaasi aktiivsused (vt Materjal ja metoodika). Saadud tulemused analüüsiti kasutades *Microsoft Excel*’i programmi.

Brd4CTD surub spetsiifiliselt alla E2 sõltuva transkriptsiooni aktivatsiooni ja ei mõjuta oluliselt basaalselt transkriptsiooni C127 rakkudes (joonis 14). Võrreldes negatiivse kontrolliga (esimene tulp) on E2 aktiveeriv toime tema seostumiskohti sisaldavale SV40 promootorile, mis kontrollib *Photinus pyralis*’e lutsiferaasi sünteesi, märgatav (võrdle esimene ja teine tulp). Kui tühi vektor (pCG75delXS) ei mõjuta oluliselt E2 sõltuvat transkriptsiooni aktivatsiooni (kolmas tulp), siis Brd4CTD lisamine surub selle täielikult alla (neljas tulp). Viiendas tulbas on näidatud Brd4CTD efekt E2-st

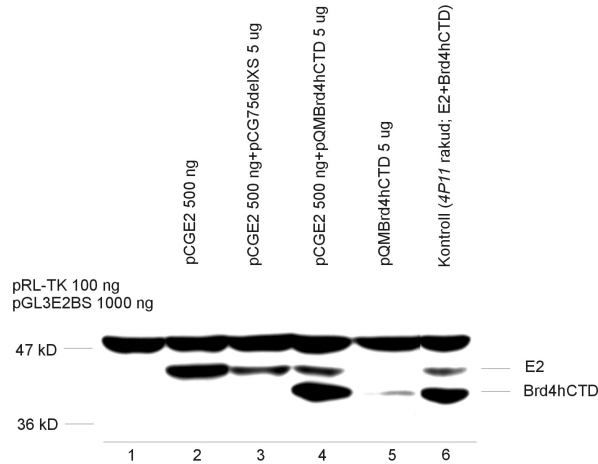
sõltuva reporteri basaalsele transkriptsioonile. Kuna katse tulemused on taandatud E2-st sõltumatu *Renilla reniformis*’e lutsiferaasi ekspressioonile, siis on tegemist E2-st sõltuva transaktivatsiooni spetsiifilise allasurumisega mitte aga üldise transkriptsiooni vähenemisega. Eksperimenti on korratud kolm korda ning esitatud tulemus on nende keskmine. Sama katse on Toomas Silla poolt läbi viidud tingimustes, kus SV40 promootori asemel on BPV-1 natiivne (P2) promootor (andmed esitamata) ning selle tulemused kattuvad minu eksperimendis näidatuga.



Joonis 14. Brd4CTD mõju E2 sõltuval transkriptsiooni aktivatsioonile. C127 rakkudesse transfekkeeriti pRL-TK, pGL3E2BS, pCGE2, pQMBrd4hCTD, pCG75delXS ja carrier DNA-d. 48 tundi peale transfektsiooni rakud lüüsi ning lüsaatidest mõõdeti luminomeetriga kahe erineva lutsiferaasi aktiivsused (vt Materjal ja meetodika). Saadud tulemused analüüsiti *Microsoft Excel*’i programmiga. Antud pildil esitatud tulemus on kolme katse keskmine. Negatiivse kontrollina on kasutatud ainult lutsiferaasi ekspresseerivate konstruktidega transfekkeeritud rakke (esimene tulp). Teises tulbas on näha E2 aktiveeriv toime tema seostumiskohti sisaldavale SV40 promootorile, mis kontrollib *Photinus pyralis*’e lutsiferaasi sünteesi. Tühja vektori (pCG75delXS) kontroll E2 sõltuval transkriptsiooni aktivatsioonile on näidatud kolmandas tulbas, Brd4CTD selle neljandas tulbas ning Brd4CTD efekt E2-st sõltuva reporteri basaalsele transkriptsioonile on toodud viiendas tulbas.

Valkude ekspressiooni vaatamiseks on samast transfektsiooniseeriast võetud rakud ka *Western blot* analüüsiks. 48 tundi peale elektroporatsiooni lüüsisin rakud

*Laemml*i puhvril ning lahutasin 10 % SDS polüakrüülamiidgeelis. Filtrile kantud valkude detekteerimiseks kasutasin 5E11HRP antikeha.



Joonis 15. Transkriptsioonikatses kasutatud valkude ekspressiooni kontroll. C127 rakkudesse transfecteeriti pRL-TK, pGL3E2BS, pCGE2, pQMBrd4hCTD, pCG75delXS ja *carrier* DNA-d. 48 tundi peale transfectsiooni lüüsisiti rakud *Laemml*i puhvril ning lahutati 10 % polüakrüülamiidgeelis. Filtrile kantud valkude detekteerimiseks kasutati 5E11HRP antikeha. Negatiivse kontrollina on kasutatud ainult lutsiferaasi ekspresseerivate konstruktidega transfecteeritud rakke (rada 1) ning positiivse kontrollina 4P11 rakke, kus ekspresseeritakse endogeenselt BPV-1 E2 ja transientselt Brd4CTD-d (rada 6). E2 signaalid on näha radadel 2-4 ja Brd4CTD radadel 4 ja 5.

Võrreldes E2 valgu ekspressioonitaset üksinda (joonis 15 rada 2) ja koos tühja vektori kontrolliga (pCG75delXS) (rada 3) ning Brd4CTD-ga radadel (rada 4) on näha, et valgu tase on natuke madalam. See võib olla tingitud CMV promootorit sisaldavate plasmiidide omavahelisest konkurentsist üldiste transkriptsioonifaktorite pärast. Kui võrrelda Brd4CTD valgu taset üksinda rakkudes transfecteerituna (rada 5) ning koos E2-ga (rada 4), siis on näha, et E2 juuresolekul on Brd4CTD tase palju kõrgem. Viimane võib olla tingitud E2 võimest aktiveerida transkriptsiooni erinevatelt promootoritelt ka mittespetsiifiliselt (Haugen *et al.*, 1988).

Seda, et analüüsivat materjali on geelile kantud võrdselt, kinnitab mittespetsiifiline bänd kõikidel radadel, mis jookseb foreesil E2 valgust veidi kõrgemal.

5. Brd4CTD surub maha BPV-1 amplifikatsioonilise replikatsiooni transientses süsteemis

Brd4CTD surub maha BPV-1 genoomi replikatsiooni ning E2 sõltuva transkriptsiooni aktivatsiooni C127 rakkudes. Viimane tulemus kinnitab seda, et viiruse DNA sünteesi inhibeerimine ei ole ilmselt seotud ainult replikatsioonimehhanismidega kuna transkriptsiooni inhibeerides võib Brd4CTD alla suruda ka E2-st sõltuva BPV-1 replikatsioonivalkude sünteesi.

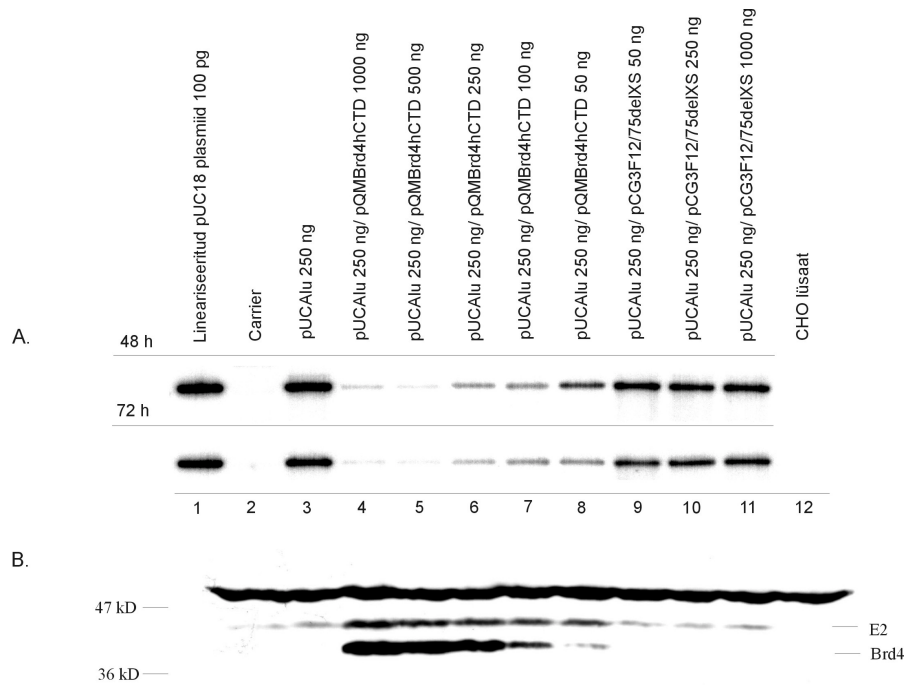
Sellest tulenevalt vaatasin järgmisena Brd4CTD mõju BPV-1 replikatsioonile transientses süsteemis, kus viiruse replikatsioonivalke E1 ja E2 ekspresseeritakse raku genoomi integreeritud järjestustelt pidevalt. See tähendab seda, et viirusvalkude ekspressioon ei ole otseses sõltuvuses BPV-1 E2 valgust. Kui sellistesse rakkudesse (näiteks CHO4.15 ja 4P11 rakuliinid) transfekteerida BPV-1 replikatsiooni *origini* sisaldav vektor, siis hakkab see replitseeruma, imiteerides viiruse genoomse DNA sünteesi.

Antud katses kasutasin replitseeruva vektorina pUCAlu plasmidi (vt Materjal ja meetoodika), mis sisaldab BPV-1 URR-st *AluI* fragmenti (vt joonis 5). pCG75delXS on tühja vektori kontroll ning pQMBrd4hCTD ekspresseerib inimese Brd4CTD-d.

Transfekteerisin 4P11 rakkudesse 250 ng pUCAlu, erinevas kontsentratsioonis pCG75delXS (50, 250 ja 1000 ng) ja pQMBrd4hCTD (50, 100, 250, 500 ja 1000 ng) plasmide ning 50 µg *carrier* DNA-d. 48 ja 72 tundi peale poratsiooni eraldas rakkudest madalamolekulaarse DNA, mida lõikasin ensüümidega *HindIII* (lineariseerib *origini* sisaldava plasmidi) ja *DpnI* (fragmenteerib bakteriaalselt metüleeritud DNA). Restrikteeritud proovid lahutasin geelelektroforeesil ning tulemused analüüsisin *Southern blot* meetodil. Replikatsioonisignaali detekteerimiseks kasutasin pUC18-ga valmistatud radioaktiivset proovi. Markeriks foreesil on 100 pg lineariseeritud pUC18 plasmidi (rada 1).

Brd4CTD surub alla BPV-1 amplifikatsioonilise replikatsiooni transientses süsteemis (joonis 16 A) ning see on sõltuv Brd4CTD kontsentratsioonist: mida suurem on Brd4CTD tase, seda tugevam on replikatsiooni inhibitsioon (võrdle rajad 4-8). Negatiivseks kontrolliks on *carrier* DNA-ga (rada 2) ning positiivseks ainult pUCAlu

vektoriga transfecteeritud rakud (rada 3). Tühja vektori kontrolli lisamine (pCG75delXS), sõltumata selle kontsentratsioonist, pUCAlu replikatsiooni oluliselt ei mõjuta (rajad 9-11).



Joonis 16. A. Brd4CTD surub maha BPV-1 amplifikatsioonilise replikatsiooni transientses süsteemis. 4P11 rakkudesse transfecteeriti pUCAlu, pCG75delXS, pQMBrd4hCTD ning *carrier* DNA-d. 48 ja 72 tundi peale poratsiooni eraldati rakkudest madalamolekulaarne DNA, mida lõigati ensüümidega *Hind*III (lineariseerib *origini* sisaldava plasmidi) ja *Dpn*I (fragmenteerib bakteriaalselt metüleeritud DNA). Restrikteeritud proovid lahutati geelelektrofooresil ning tulemused analüüsiti *Southern blot* meetodil. Replikatsioonisignaali detekteerimiseks kasutati pUC18-ga valmistatud radioaktiivset proovi. Negatiivseks kontrolliks on ainult *carrier* DNA-ga ning positiivseks ainult pUCAlu vektoriga transfecteeritud rakud. Markeriks foreesil on 100 pg lineariseeritud pUC18 plasmidi. Erinevate Brd4CTD kontsentratsioonide kasutamine näitab, et inhibitsioon on sõltuv Brd4CTD tasemest (rajad 4-8). Tühja vektori kontrolli (pCG75delXS) lisamine, sõltumata selle kontsentratsioonist, pUCAlu replikatsiooni oluliselt ei mõjuta.

B. E2 ja Brd4CTD valkude ekspressiooni kontroll 4P11 rakkudes *Western blot* meetodil. Rakud valgusünteesi analüüsiks võeti replikatsioonikatsega samast transfectiooniseeriast 72 tundi peale poratsiooni. *Laemmli* puhvril lüüsitud valgud lahutati 10 % SDS- polüakrüülamiidgeelis ning filtrile kantud valkude detekteerimiseks kasutati 5E11HRP antikeha. Kuna 4P11 rakkudes ekspresseeritakse E2 valku endogeenselt, siis on negatiivse kontrollina kasutatud CHO lüsaati (rada 12).

Valkude ekspressiooni vaatamiseks on samast transfektsiooniseeriast võetud rakud ka *Western blot* analüüsiks. 72 tundi peale elektroporatsiooni lüüsisin rakud *Laemmli* puhvris ning lahutasin 10 % SDS-polüakrüülamiidgeelis. Filtrile kantud valkude detekteerimiseks kasutasin 5E11HRP antikeha.

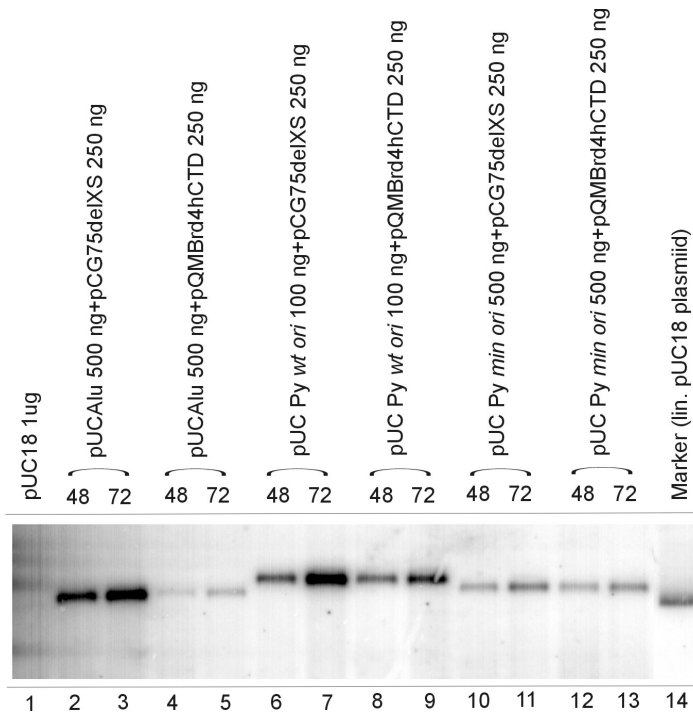
Kui võrrelda endogeense E2 valgu taset (joonisel 16 B rajad 2, 3, 9, 10, 11) rakkudega, kuhu on Brd4CTD juurde transfekteeritud (rajad 4-8), siis on näha, et see on viimastes kõrgem. Antud efekt on sõltuv Brd4CTD kontsentratsioonist: mida suurem on Brd4CTD tase, seda tugevam on E2 signaal. Kuna endogeense E2 ekspressioon 4P11 rakkudes on *Heat shock* promootori kontrolli all, vaatasin eraldi katsena Brd4CTD mõju vastavale promootorile (tulemused näitamata). Selgus, et Brd4CTD efekt viimasele puudub. Seega võib E2 taseme suurenemine olla tingitud hoopis sellest, et seostumine Brd4CTD-ga stabiliseerib valgu ning takistab E2 lagundamist.

6. Brd4CTD ei mõjuta polüoomiviiruse transientset replikatsiooni

Eelnevate katsetega näitasin, et Brd4CTD mõjutab nii BPV-1 genoomi kui *origini* sisaldavate plasmiidide transientset replikatsiooni. Kontrollimaks kas Brd4CTD mõju on BPV-1 ja tema valgu E2 spetsiifiline või üldisem, uurisin Brd4CTD toimet polüoomiviiruse transientsele replikatsioonile. Selleks kasutasin 4P11 rakuliini, milles lisaks BPV-1 valkudele E1 ja E2 ekspresseeritakse hiire polüoomiviiruse replikatsiooniks vajalikku *largeT* antigeeni (vt Materjal ja meetoodika). Kui viia neisse rakkudesse vastava viiruse *origini* sisaldav plasmiid, siis hakkab see replitseeruma imiteerides polüoomiviiruse DNA sünteesi.

Transfekteerisin 4P11 rakkudesse 500 ng pUCAlu, 100 ng pUCPy *wt ori*, 500 ng pUCPy *min ori*, 1000 ng pUC18, 250 ng pQMBrd4hCTD või pCG75delXS plasmide ning 50 µg *carrier* DNA-d (vt Materjal ja meetoodika). pUCAlu on BPV-1 minimaalset *origini* ning pUCPy *wt ori* ja pUCPy *min ori* vastavalt hiire polüoomiviiruse *wild type* ja minimaalset replikatsiooni alguspunkti sisaldavad vektorid. pUC18 on katses *DpnI* lõikuse ja pCG75delXS tühja vektori kontrolliks.

48 ja 72 tundi peale transfektsiooni eraldasid rakkudest madalamolekulaarse DNA, mida lõikasin ensüümidega *Hind*III (lineariseerib replitseerunud *origini* sisaldavad plasmiidid) ja *Dpn*I (fragmenteerib bakteriaalselt metüleeritud DNA). Restrikteeritud proovid lahutasin geelelektroforeesil ning tulemused analüüsisin *Southern blot* meetodil (vt Materjal ja meetoodika). Replikatsioonisignaali detekteerimiseks kasutasin pUC18-ga valmistatud radioaktiivset proovi.

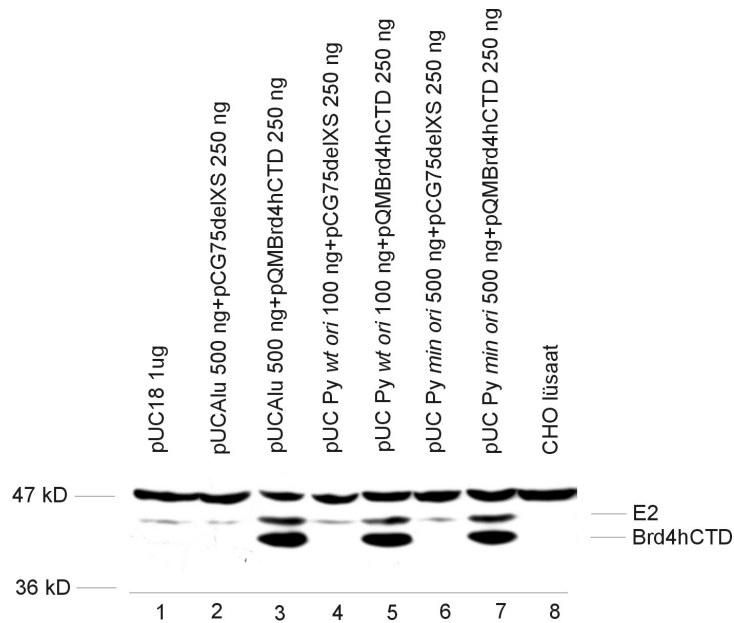


Joonis 17. Brd4CTD mõju polüoomiviiruse replikatsioonile transientses süsteemis. 4P11 rakkudesse transfekteeriti pUCAlu, pUCPy wt ori, pUCPy min ori, pUC18, pQMBrd4hCTD, pCG75delXS ja carrier DNA-d. 48 ja 72 tundi peale poratsiooni eraldati rakkudest madalamolekulaarne DNA, mida lõigati ensüümidega *Hind*III (lineariseerib *origini* sisaldava plasmidi) ja *Dpn*I (fragmenteerib bakteriaalselt metüleeritud DNA). Restrikteeritud proovid lahutati geelelektroforeesil ning tulemused analüüsiti *Southern blot* meetodil. Replikatsioonisignaali detekteerimiseks kasutati pUC18-ga valmistatud radioaktiivset proovi. Negatiivseks kontrolliks on pUC18-ga transfekteeritud rakud (rada 1), kus replikatsioonisignaali puudub ning markeriks foreesil 100 pg lineariseeritud pUC18 plasmid (rada 14). Brd4CTD mõju positiivse kontrollina on kasutatud pUCAlu replikatsiooni (rajad 2-5). Polüoomiviiruse *origini* sisaldavate plasmiidide replikatsioon ning selle tundlikkus Brd4CTD suhtes on toodud radadel 6-13.

Brd4CTD ei mõjuta oluliselt hiire polüoomiviiruse replikatsiooni minimaalselt ega *wild type originilt* (joonisel 17 rajad 6-13), samal ajal kui efekt BPV-1 ori sisaldava

plasmidi sünteesile on märgatav (rajad 2-5). Antud katse põhjal võib seega öelda, et Brd4CTD mõju replikatsioonile on BPV-1 spetsiifiline, samas ei saa päris kindlalt väita, et see oleks E2-st sõltuv.

Näitamaks, et Brd4CTD kasutatud süsteemis ekspresseerub, on samast transfektsiooniseeriast võetud rakud ka *Western blot* analüüsiks. 72 tundi peale poratsiooni lüüsisin rakud *Laemmli* puhvril ning lahutasin 10 % polüakrüülamiidgeelis. Filtrile kantud valkude detekteerimiseks kasutasin 5E11HRP antikeha.



Joonis 18. E2 ja Brd4CTD valkude ekspressiooni kontroll 4P11 rakkudes *Western blot* meetodil. 4P11 rakkudesse transfekteriti pUCAlu, pUCPy *wt ori*, pUCPy *min ori*, pUC18, pQMBrd4hCTD, pCG75delXS ja *carrier* DNA-d. 72 tundi peale poratsiooni. *Laemmli* puhvril lüüsitud rakud lahutati 10 % SDS- polüakrüülamiidgeelis ning filtrile kantud valkude detekteerimiseks kasutati 5E11HRP antikeha. Kuna 4P11 rakkudes ekspresseeritakse E2 valku endogeenselt, siis on negatiivse kontrollina kasutatud CHO lüsaati (rada 8). E2 signaal on näha radadel 1-9 ning Brd4CTD radadel 3, 5 ja 7.

Rakkudes, kus Brd4CTD surub maha pUCAlu plasmidi replikatsiooni, ekspresseerub valk samal tasemel kui seal, kus ta polüoomiviiruse replikatsiooni ei mõjuta (joonis 18, rajad 3, 5 ja 7). Seega ei saa Brd4CTD efekti puudumine

polüoomiviiruse replikatsioonile olla tingitud erinevusest selle valgus tasemes, vaid antud valgus mõju on BPV-1 spetsiifiline.

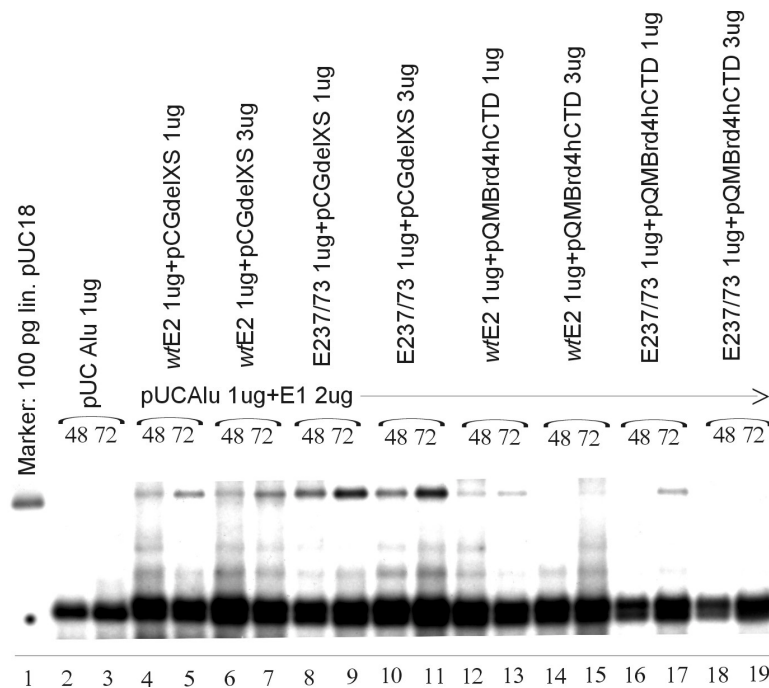
7. BPV-1 amplifikatsioonilise replikatsiooni maha surumine minimaalselt *origin*ilt ei sõltu Brd4CTD ja E2 omavahelisest interaktsioonist

Eelnevate katsetega näitasin, et Brd4CTD surub maha BPV-1 genoomi ja transientses süsteemis läbi viidud amplifikatsioonilise replikatsiooni. Viimane katse kinnitab, et antud efekt on küll BPV-1 spetsiifiline, kuid ei anna täielikku selgust selle kohta, et see oleks sõltuv E2-st ja tema seostumisest Brd4CTD-ga. Hiljuti ilmunud kirjanduse andmete põhjal on meie laboris kloneeritud BPV-1 E2 mutant, E2 37/73, mis seostub BPV-1 E1 valguga ning osaleb viiruse replikatsiooni initsiatsioonil *wild type* E2-ga võrdsel tasemel. Seejuures ei ole antud mutant võimeline seostuma mitootiliste kromosoomidega ning samuti Brd4-ga (Baxter *et al.*, 2005). Seega, kui transfekteerida rakkudesse E2 37/73 kõrvuti *wild type* E2-ga ning vaadata Brd4CTD mõju nende valkude poolt vahendatud replikatsioonile, peaks olema selge, kas Brd4CTD efekt BPV-1 replikatsioonile on sõltuv tema interaktsioonist E2-ga.

Brd4CTD efekti uurimiseks antud protsessis kasutan transientset süsteemi C127 rakkudes. Replitseeruvaks vektoriks on BPV-1 minimaalset *origini* sisaldav plasmiid pUCAlu ning viimase sünteesiks vajalikud valgud E1 ja E2 või E2 37/73 ekspresseeritakse vektoritelt pCGE2, pCGE2 37/73 ja pCGEag (vt Materjal ja meetoodika).

Transfekteerisin C127 rakkudesse 1 μ g pCGE2, 1 μ g pCGE2 37/73, 2 μ g pCGEag, 1 ja 3 μ g pQMBrd4hCTD või pCG75delXS ja 1 μ g pUCAlu plasmide ning 50 μ g *carrier* DNA-d. 48 ja 72 tundi peale transfektsiooni eraldas rakkudest madalamolekulaarse DNA, mida lõikasin ensüümidega *Hind*III (lineariseerib replitseerunud *origini* sisaldavad plasmiidid) ja *Dpn*I (fragmenteerib bakteriaalselt metüleeritud DNA). Restrikteeritud proovid lahutasin geelelektroforeesil ning tulemused analüüsisin *Southern blot* meetodil (vt Materjal ja meetoodika). Replikatsioonisignaali detekteerimiseks kasutasin pUC18-ga valmistatud radioaktiivset proovi.

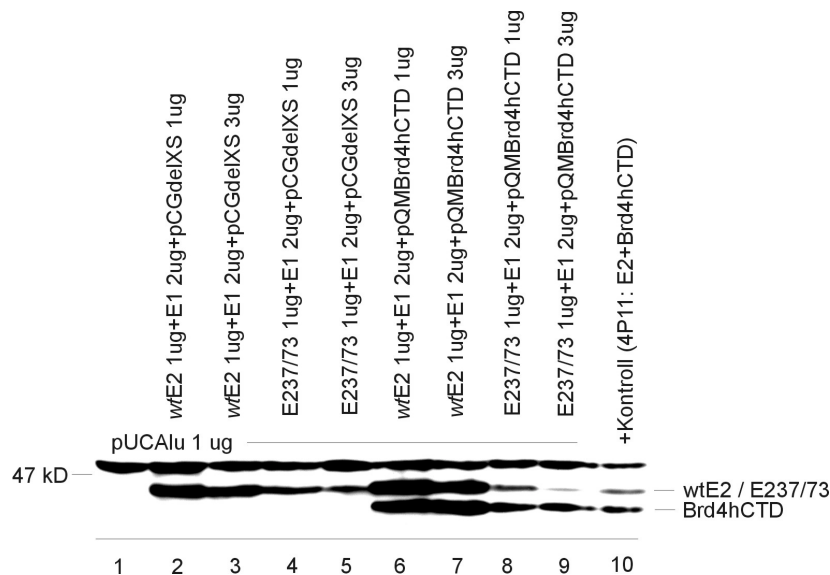
Brd4CTD surub antud katsesüsteemis maha nii metsiktüüpi kui Brd4-ga mitteseostuva E2-e sõltuva BPV-1 replikatsiooni (joonis 19). Negatiivse kontrollina on kasutatud ainult pUCAlu vektoriga transfecteeritud rakke (rajad 2 ja 3), kus replikatsioonisignaali puudub. Radadel 4-11 on näha, et E2 37/73 initsieerib DNA sünteesi viiruse *origin*ilt isegi paremini kui *wild type* E2 (võrdle rajad 4-7 ja 8-11). Brd4CTD lisamisel inhibeeritakse DNA süntees BPV-1 *origin*ilt sõltumata sellest, millise E2-ga on rakke transfecteeritud.



Joonis 19. Brd4CTD mõju *wild type* E2 ja E2 37/73 sõltuval BPV-1 replikatsioonile C127 rakkudes *Southern blot* meetodil. Rakkudesse transfecteeriti pCGE2, pCGE2 37/73, pCGEag, pQMBrd4hCTD, pCG75delXS ja pUCAlu plasmidid ning *carrier* DNA. 48 ja 72 tundi peale transfectsiooni eraldati rakkudest madalamolekulaarne DNA, mida lõigati ensüümidega *HindIII* (lineariseerib replitseerunud *origin*i sisaldavad plasmidid) ja *DpnI* (fragmenteerib bakteriaalselt metüleeritud DNA). Restrikteeritud proovid lahutati geleelektroforeesil ning tulemused analüüsiti *Southern blot* meetodil. Replikatsioonisignaali detekteerimiseks kasutati pUC18-ga valmistatud radioaktiivset proovi. Negatiivse kontrollina on kasutatud ainult pUCAlu vektoriga transfecteeritud rakke (rajad 2 ja 3) ning markeriks foreesil on 100 pg lineariseeritud pUC18 plasmidi (rada 1). pUCAlu replitseerimiseks on teistel radadel (4-19) analüüsitud rakkudesse transfecteeritud E1 ja E2 või E2 37/73. Brd4CTD-ga poreeritud rakud on radadel 12-19.

Seega võib selle katse põhjal öelda, et Brd4CTD efekt BPV-1 replikatsioonile on ilmselt seotud mingite teiste DNA sünteesiks vajalike protsesside mõjutamisega, kuna see ei sõltu E2 võimest seostuda Brd4-ga.

Valkude ekspressiooni kontrollimiseks on samast transfektsiooniseeriast võetud rakud ka *Western blot* analüüsiks. 72 tundi peale elektroporatsiooni lüüsisin rakud *Laemmli* puhvris ning lahutasin 10 % SDS-poliüakrüülamiidgeelis. Filtrile kantud valkude detekteerimiseks kasutasin 5E11HRP antikeha.



Joonis 20. Valkude ekspressioonikontroll *Western blot* meetodil. Rakkudesse transfekteeriti pCGE2, pCGE2 37/73, pCGEag, pQMBrd4hCTD, pCG75delXS ja pUCAlu plasmiidid ning *carrier* DNA. 72 tundi peale elektroporatsiooni lüüsi rakud *Laemmli* puhvris ning lahutati 10 % SDS-poliüakrüülamiidgeelis. Filtrile kantud valkude detekteerimiseks kasutati 5E11HRP antikeha. Negatiivse kontrollina on kasutatud ainult pUCAlu plasmiidiga transfekteeritud (rada 1) ning positiivse kontrollina Brd4CTD-ga poreeritud 4P11 rakke (rada 10). E2 ja E2 37/73 ekspressioon on näha radadel 2-10 ja Brd4CTD signaal radadel 6-10.

Negatiivseks kontrolliks on ainult pUCAlu plasmiidiga transfekteeritud rakud (joonisel 20 rada 1) ning positiivseks kontrolliks Brd4CTD-ga poreeritud 4P11 rakud (rada 10). E2 ja E2 37/73 ekspressioon on näha radadel 2-10 ja Brd4CTD signaal radadel 6-10. Tulemus näitab, et *wild type* E2 ekspresseerub E2 37/73 mutandiga võrreldes kõrgemal tasemel, kuigi tugevama replikatsioonisignaali andis just viimane (joonis 19

rajad 8-11). Rakkudes, kuhu on kotransfekteeritud metsiktüüpi E2 ja Brd4CTD (joonis 20 rajad 6 ja 7), on mõlema valgu signaalid tugevamad kui E2-ga üksi poreeritud rakkudes (rajad 2 ja 3) või Brd4CTD-l koos E2 37/73-ga (rajad 8 ja 9). Ilmselt on see tingitud E2 võimest aktiveerida transkriptsiooni mittespetsiifiliselt. Sellele viitab ka asjaolu, et rakkudes, kuhu on kotransfekteeritud E2 37/73 (mis on transkriptsiooniliselt defektne) ja Brd4CTD, jääb viimase tase madalamaks (võrdle rajad 6, 7 ja 8, 9). Välistatud ei ole ka see, et E2 seostumine Brd4CTD-ga stabiliseerib mõlemaid valke ning takistab nende. Kuna E2 37/73 Brd4-ga ei interakteeru, siis ei suurene ka Brd4CTD tase. Igal juhul võib öelda, et efektid replikatsioonile ei ole seotud valkude taseme muutustega.

ARUTELU

Mitmed eukarüootsetes rakkudes latentselt püsivad viirused kinnitavad oma genoomi mittekovalentselt mitootilistele kromosoomidele. EBV, HHV8 ja BPV-1 puhul on selleks protsessiks vajalikud *cis* ja *trans* elemendid suhteliselt hästi kirjeldatud. Need viirused kodeerivad järjestus-spetsiifiliselt DNA-ga seostuvaid valke, mis tunnevad ära DNA motiive viiruse replikatsiooni *origini* läheduses.

Papilloomiviiruste hulgas on kinnitumine kromatiinile ja genoomi segregatsioon mitoosis kõige paremini uuritud BPV-1-l. Peremeesraku kromatiinile seostumise rolli täidab selle viiruse puhul multifunktsionaalne valk E2 (Skiadopoulos *and* McBride, 1998; Lehman *and* Botchan, 1998). Ta seostub dimeerina C-terminaalse osa kaudu viiruse genoomis olevatele spetsiifilistele järjestustele (MME) (Piirsoo *et al.*, 1996) ning N-terminaalse osaga mitootilisele kromatiinile (Bastien *and* McBride, 2000; Ilves *et al.*, 1999). Kuigi BPV-1 stabiilseks säilimiseks vajalikud viirusfaktorid on üsna hästi kirjeldatud, ei ole väga palju teada rakulistest “retseptoritest”, mis seda interaktsiooni vahendaksid.

Leidmaks rakulisi partnervalke, mille abil BPV-1 E2 kinnitab viiruse genoomi peremeesraku kromosoomidele, kasutasid You *et al.* (2004) TAP tehnoloogiat ning identifitseerisid BPV-1 E2-ga seotuna rakulise valgu Brd4. See on bromodomääne sisaldav BET perekonna liige, mis kinnitub N-terminuse kaudu mitootilistele kromosoomidele. E2-ga seostumiseks vajalik domään asub valgus C-terminaalses osas ning Brd4 kolokaliseerub E2-ga mitootilistel kromosoomidel. BPV-1 genoomiga transformeerunud C127 rakkudes säilib viiruse genoom ekstrakromosomaalse episoomina (Law *et al.*, 1981). Kui blokeerida viiruse DNA kinnitumine peremeesraku kromosoomidele, peaks aja jooksul BPV-1 genoom jagunevatest rakkudest ära kaduma ning vähenema viirusega transformeeruvate rakkude hulk. Kontrollimaks, kas Brd4 on vajalik BPV-1 genoomi säilimiseks, ekspresseerisid You *et al.* (2004) rakkudes Brd4 C-terminaalset osa (Brd4CTD), mis seostub küll E2-ga aga ei kinnitu kromatiinile. Brd4CTD peaks olema dominant-negatiivse efektiga E2 sõltuvale viirusgenoomi kromosoomseondumisele juhul, kui Brd4 on E2 retseptoriks kromatiinil. Katse

tulemusena nähti BPV-1 transformatsiooniefektiivsuse vähenemist 90 % võrreldes kontrollrakkudega ning järeldati, et see on tingitud viiruse genoomi mittekinnitumisest kromatiinile.

Viiruse võime rakke transformeerida ei sõltu aga ainult tema omadusest rakkudes stabiilselt püsida. See on kompleksne protsess, mis hõlmab ka viiruse replikatsiooni, DNA sünteesiks ja transformatsiooniks vajalike valkude ekspressiooni. Kuna BPV-1 E2 osaleb peale stabiilse säilimise ka viiruse DNA sünteesi initsiatsioonil ning selle varajaste geenide (sealhulgas replikatsioonivalkude) transkriptsiooni aktivatsioonil, on *You et al.* (2004) artiklis kasutatud lähenemise puhul raske öelda, mis põhjusel transformatsiooniefektiivsus väheneb. Dominant-negatiivselt käituv Brd4CTD võib E2-ga seostudes rikkuda ka muid E2 aktiivsusi, sest sama piirkond E2 valgus on vajalik ka replikatsiooni initsiatsioonil ja transkriptsiooni aktivatsioonil. Sellest tulenevalt oli minu töö eesmärgiks uurida lihtsustatud süsteemides Brd4CTD mõju E2 erinevatele funktsioonidele.

E2 on vajalik MME-d sisaldavate plasmiidide seostumiseks kromatiinile ning seeläbi nende pääsemiseks tekkivatesse tütaruumadesse (Päärsoo *et al.*, 1996). Kui eeldada, et Brd4 on vajalik retseptor E2 interaktsiooniks peremeesraku kromosoomidega, siis dominant-negatiivselt käituv Brd4CTD peaks takistama E2-l kromatiinile seostuda. Minu poolt läbi viidud MME-d sisaldavate plasmiidide jaotumise katse aga näitas, et kasutatud tingimustes ei mõjuta Brd4CTD E2 vahendatud stabiilset säilimist (joonis 10), kuigi selle valgu ekspressioon on E2 suhtes piisavas ülehulgas (joonis 11). Saadud tulemus võib olla tingitud sellest, et antud katsesüsteem ei ole sobiv sellise mehhanismi uurimiseks või pole Brd4 vajalik retseptor E2 seostumiseks kromatiinile. Arvestades kirjeldatud katse tulemusi ning teisi E2 funktsioone BPV-1 elutsüklis, tekkis kahtlus, et Brd4-l võib viirusega seotud protsessides olla hoopis mõni muu roll.

Kuna E2 osaleb ka BPV-1 replikatsiooni initsiatsioonil, siis vaatasin Brd4CTD mõju viiruse DNA sünteesile. Selgus, et Brd4CTD surub alla BPV-1 genoomi replikatsiooni (joonis 12). Antud katses on viiruse DNA sünteesiks vajalike valkude ekspressioon sõltuv E2 transkriptsiooni aktiveerivast toimest. Seepärast uurisin Brd4CTD mõju BPV-1 replikatsioonile ka transientses süsteemis, kus vastavaid valke ekspresseeritakse 4P11 rakkudes endogeenselt E2-st sõltumatult ning replitseeruvaks

DNA-ks on BPV-1 replikatsiooni *origini* sisaldav vektor. Selgus, et Brd4CTD surub BPV-1 replikatsiooni alla ka transientselt ning see on sõltuv Brd4CTD kontsentratsioonist: kõrgema Brd4CTD taseme korral on ka inhibitsioon tugevam. Seda, et Brd4CTD toime replikatsioonile on BPV-1 spetsiifiline, näitas Brd4CTD mõju puudumine hiire polüoomiviiruse minimaalset ja *wild type origini* sisaldavate plasmiidide replikatsioonile (joonis 17).

BPV-1 replikatsiooni initsiatsioonil moodustavad viirusvalgud E1 ja E2 kompleksi ning seostuvad viiruse replikatsiooni *originiga*. Kuna E2 N-terminus on vajalik interaktsiooniks nii E1 kui Brd4CTD-ga, siis esialgu tundus, et Brd4CTD inhibeerib BPV-1 replikatsiooni seostudes E2-ga ja takistades E1-E2 kompleksi moodustumist. Selleks, et uurida kas BPV-1 replikatsiooni maha surumine on sõltuv E2 ja Brd4CTD interaktsioonist, kasutasin transientses replikatsioonikatses E2 mutanti E2 37/73, mis ei seostu mitootiliste kromosoomidega ega Brd4-ga, kuid töötab viiruse DNA sünteesi initsiatsioonil (Baxter *et al.*, 2005). Eksperimendi tulemusena selgus, et Brd4CTD surub BPV-1 *origini* sisaldava plasmidi replikatsiooni maha ka siis kui replikatsiooni initsiatsioonil osalev E2 Brd4-ga ei seostu (joonis 19). Kirjanduses ilmunud andmed kirjeldavad täispika Brd4 valggu võimet mõjutada raku replikatsiooni ning inhibeerida rakutsükli seostudes RFC-ga. Kuna selles protsessis on oluline valggu II bromodomaän ning mina kasutan oma katsetes Brd4-st ainult C-terminaalset osa, siis peaks see efekt olema välistatud. Sama kinnitab ka Brd4CTD-ga läbi viidud rakutsükli analüüs (I. Ilves; personaalne kommunikatsioon), mis viitab, et Brd4CTD-l ei ole efekti raku üldisele replikatsioonimehhanismile. Seega peab BPV-1 replikatsiooni inhibitsioon olema seotud mingite teiste viiruse DNA sünteesiks vajalike protsesside mõjutamisega, mis ei ole sõltuvad E2-st.

BPV-1 E2-e puhul on kirjeldatud, et ta aktiveerib viiruse elutsükli algfaasis varajaste geenide (sealhulgas replikatsioonivalkude) ekspressiooni. Transkriptsiooni aktivatsiooniks, nagu ka seostumiseks E1 ja Brd4-ga, on vajalik valgust N-terminaalne osa. Kuna BPV-1 genoomi replikatsioonil on võimatu teineteisest eristada E2 rolli replikatsioonil ja selleks vajalike viirusvalkude taseme mõjutamisel, siis lisaks eelpoolkirjeldatud replikatsioonile vaatasin Brd4CTD mõju E2 sõltuvale transkriptsioonile. Selgus, et Brd4CTD surub alla E2 vahendatud transkriptsiooni

aktivatsiooni ning ei mõjuta E2-st sõltuva reporteri basaalsel transkriptsiooni (joonis 14). Kuna eksperimendi tulemused on taandatud E2-st sõltumatu *Renilla reniformis* e lutsiferaasi ekspressioonile, siis on tegemist E2 spetsiifilise allasurumisega mitte aga üldise transkriptsiooni vähenemisega. Siinkohal ei ole päris selge, kas transkriptsioon inhibeeritakse seepärast, et Brd4CTD interaktsioon E2-ga takistab mõne teise olulise faktori seostumist või on E2-vahendatud transkriptsiooni aktivatsiooniks vajalik täispikk Brd4 ning Brd4CTD takistab selle seondumist E2-ga.

Nii transkriptsiooni kui replikatsioonikatsete juurde tehtud valkude ekspressioonianalüüsid näitavad, et kotransfektsioonil võivad E2 ja Brd4CTD mõningatel juhtudel muuta vastastikku teineteise tasemeid (joonised 15, 16B, 18, 20). C127 rakkudes läbi viidud transkriptsioonikatses on E2 valgu ekspressioonitase võrrelduna üksinda ja koos tühja vektori kontrolliga ning Brd4CTD-ga natuke madalam (joonis 15), mis võib olla tingitud CMV promootorit sisaldavate plasmiidide omavahelisest konkurentsist üldiste transkriptsioonifaktorite pärast. Kui võrrelda Brd4CTD valgu taset üksinda rakkudesse transfekterituna ning koos E2-ga, siis on näha, et E2 juuresolekul on Brd4CTD tase palju kõrgem. Nagu eelpool kirjeldatud, on BPV-1 täispikk E2 valk transkriptsiooni aktivaator, mis võib mõjutada geenide transkriptsiooni promootoritelt, kus on olemas E2 seostumiskohad (McBride *et al.*, 1991; Spalholz *et al.*, 1985) ning mittespetsiifiliselt ka ilma E2BS-de olemasoluta (Haugen *et al.*, 1988). Kaudne efekt transkriptsioonile on ilmselt seotud tema võimega interakteeruda peremeesraku basaalse transkriptsioonisüsteemi komponentidega (vt Kirjanduse ülevaade). Seega võib Brd4CTD taseme suurenemine E2 juuresolekul olla tingitud viimase võimest aktiveerida transkriptsiooni mittespetsiifiliselt. Seda kinnitab ka asjaolu, et Brd4CTD kotransfektsioonil E2 37/73-ga, mis on defektne transkriptsioonil, jääb valgu ekspressioon madalamaks võrrelduna koos *wild type* E2-ga (joonis 20).

4P11 rakkudes läbi viidud BPV-1 ja polüoomiviiruse transientse replikatsiooni katses tõuseb aga ka E2 valgu tase Brd4CTD juuresolekul (joonised 16B, 18). Siinkohal võib olla tegemist transkriptsiooni aktivatsiooniga, kuigi praeguseks pole andmeid selle kohta, et Brd4 oleks rakkudes kuidagi seotud transkriptsioonimehhanismidega. Kuna E2 ekspressioon 4P11 rakkudes on *Heat shock* promootori kontrolli all, vaatasin Brd4CTD mõju vastavale promootorile (tulemused näitamata). Selgus, et Brd4CTD efekt viimasele

puudub. Seega on E2 taseme suurenemine Brd4CTD juuresolekul tingitud pigem sellest, et E2 ja Brd4CTD omavaheline seostumine stabiliseerib valke ja takistab E2 lagundamist. See võimalus vajaks aga kindlasti lähemat uurimist.

Kuna Brd4CTD-l on suhteliselt tugev inhibeeriv mõju BPV-1 elutsükli varastele etappidele (replikatsioon ja varaste geenide transkriptsioon), siis võib eeldada, et valk on viiruse elutsükli kas otseselt vajalik või on tal selles oluline reguleeriv roll. Otseselt E2-ga on seotud Brd4CTD võime maha suruda E2 poolt aktiveeritud transkriptsiooni, mis võib tähendada, et ta mõjutab ka viiruse replikatsiooni- ja onkovalkude ekspressiooni viirusgenoomilt. Brd4CTD efektid replikatsioonile on küll BPV-1 spetsiifilised, kuid ilmselt E2-st sõltumatud. Missuguste mehhanismidega need protsessid täpselt toimuvad, vajab lähemat uurimist.

Papilloomiviirused on transformeerivate omadustega ning on leitud seoseid nende nakkuse ja halvaloomuliste kasvaja tekke vahel. Seepärast võiks Brd4CTD tugevat inhibeerivat toimet selle viiruse elutsükli varasele etapile tulevikus ära kasutada viirusvastaste ravimite disainimisel.

You et al. (2004) artikli põhiidee on, et Brd4 on BPV-1 E2 seostumiseks peamine retseptor kromatiinil. Minu töös eelpoolkirjeldatud katsed viitavad aga sellele, et antud väide vajab veel põhjalikku uurimist. Viiruse DNA replikatsiooni mahasurumisega, kas otse või läbi selleks vajalike valkude sünteesi inhibitsiooni, on seletatav *You et al.* (2004) transformatsioonikatses, kus Brd4CTD ekspresseerimisel vähenes BPV-1-ga nakatatud rakkude fookuste arv 90 % võrreldes kontrollrakkudega. Kui blokeerida ära viirusgenoomi replikatsioon elutsükli algfaasis ja DNA replikatsiooniks või transformatsiooniks vajalike valkude süntees, siis on loogiline, et väheneb ka transformatsiooniefektiivsus. See tähendab aga seda, et antud artiklis kasutatud meetod ei ole hea Brd4 rolli uurimiseks BPV-1 mitootilises jagunemises.

Väljastada ei saa ka võimalust, et rakulisi partnervalke seostumiseks kromosoomidega võib viirustel olla mitmeid. Seega, kui lisaks Brd4-le on BPV-1 E2 jaoks olemas ka teised retseptorid, siis võivad need Brd4CTD dominant-negatiivset efekti kompenseerida.

Analoogne lähenemine on kasutusel ka EBV ja HHV8 puhul, mis säilivad samuti jagunevates rakkudes stabiilselt madala koopiaarvuliste ekstrakromosomaalsete

plasmiididena. Sarnaselt BPV-1-le vajab episoomide kinnitumine peremeesraku kromatiinile viiruse poolt genoomis olevat *cis*-järjestust ning *trans*-faktorina valke EBNA1 (EBV) ja LANA (HHV8). Kuigi kõik eelpoolnimetatud viirused kasutavad rakkudes püsimiseks sarnast mehhanismi, ei seostu nad kromatiinile ilmselt samade raku valkude vahendusel. HHV8 puhul on rakulisteks retseptoriteks pakutud histooni H1, DEK, MeCBP (*methyl CpG binding protein 2*) ja Brd2 ning EBV-l EBP2 (*EBNA1 binding protein 2*).

See, kas Brd4 on BPV-1 E2 valgu retseptoriks kromatiinil või on neid rakulisi partnervalke veel, vajab kindlasti edasist uurimist.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö kirjanduse osas on antud ülevaade BPV-1 replikatsioonist, E2 valgust ja tema rollist viiruse elutsükli erinevatel etappidel ning rakulisest Brd4 valgust.

Eelnevalt oli teada, et BPV-1 stabiilseks säilimiseks ja genoomi kinnitumiseks kromatiinile on vajalik viirusvalk E2 ning permeesraku faktorid, mis seda interaktsiooni vahendaksid. *You et al.* (2004) avaldatud artikli järgi on üheks võimalikuks E2 retseptoriks raku kromosoomidel bromodomääne sisaldav valk Brd4.

Minu töö eesmärgiks oli uurida, kas Brd4 on vajalik BPV-1 stabiilseks säilimiseks jagunevates rakkudes ning kuidas ta mõjutab E2 valgust teisi funktsioone (transkriptsiooni aktiveerivat võimet ning rolli DNA sünteesi initsiatsioonil). Brd4 mõju uurimiseks kasutasin eelpooltoodud artikli eeskujul valgust C-terminaalset osa (Brd4CTD), mis ei seostu kromosoomidega, kuid interakteerub E2-ga ning millel peaks E2 funktsioonidele olema dominant-negatiivne efekt.

Katsete tulemusena selgus, et Brd4CTD ei mõjuta BPV-1 E2 vahendatud plasmidi stabiilset säilumist jagunevates rakkudes. Antud valgust üleekspressioonil surutakse aga maha nii viiruse genoomi kui transientses süsteemis läbi viidud DNA amplifikatsiooniline replikatsioon. Kuna Brd4CTD ei mõjuta polüoomiviiruse replikatsiooni, siis on antud valgust efekt BPV-1 spetsiifiline. Seejuures ei ole replikatsiooni inhibitsioon sõltuv E2 ja Brd4CTD interaktsioonist, vaid toimub mingite teiste, viiruse DNA sünteesiks vajalike protsesside mõjutamisega. Samuti selgus, et Brd4CTD surub alla BPV-1 E2 sõltuva transkriptsiooni aktivatsiooni, mis võib seega mõjutada nii viiruse replikatsiooni- kui onkovalkude ekspressiooni viirusgenoomilt.

Kuna Brd4CTD-l on suhteliselt tugev inhibeeriv mõju BPV-1 elutsükli varastele etappidele (replikatsioon ja varaste geenide transkriptsioon), siis võib eeldada, et valk on viiruse eluks vajalik või on tal selles reguleeriv roll. Brd4CTD efektid on BPV-1 spetsiifilised, kuid missuguste mehhanismidega need protsessid toimuvad, pole veel selge. See, kas Brd4 on E2 retseptoriks kromatiinil ning vahendab BPV-1 genoomi kinnitumist mitootiliste kromosoomidega, vajab kindlasti veel lähemat uurimist.

SUMMARY

The papillomaviruses are a group of small DNA viruses that infect basal epithelial cells in higher vertebrates, including humans. Like many other viruses that persistent latently in cells, they exist as extrachromosomal plasmids bound to mitotic chromosomes for stable maintenance. This process has been best studied for BPV-1.

As a result of previous studies it is known, that multifunctional E2 protein is needed for virus to bind BPV-1 genomes to host chromatin in a process that is mediated by some cellular factors. According to the article by *You et al.*, (2004) one possible E2 receptor on cellular chromosomes is bromodomain containing protein Brd4.

The purpose of present work was to study if Brd4 is necessary for stable maintenance of BPV-1 in dividing cells and how this cellular protein affects other functions of E2 (transcription activation and replication initiation). To study the effects of Brd4 I used the C-terminal domain of this protein (Brd4CTD), as described in article mentioned above, that does not interact with chromosomes, but still binds with E2 and therefore has a dominant-negative effect on Brd4-dependent activities of E2.

The results of my experiments show that Brd4CTD does not affect E2-dependent stable maintenance of MME containing plasmids in proliferating cells. Overexpression of Brd4CTD inhibits amplificational replication of virus genome and BPV-1 replication origin containing plasmids in transient system. However, inhibition of viral replication is not dependent on E2, but happens when Brd4CTD affects some other processes that are important for DNA synthesis of virus. Influence of Brd4CTD is specific to BPV-1, because it does not affect replication of polyomavirus replication origin containing plasmids in transient system. Brd4CTD also inhibits specifically E2-dependent transcription activation.

In conclusion, Brd4CTD has quite strong influence on early stages of BPV-1-s lifecycle. So one can assume that this protein is important in papillomavirus life or it has important regulating role. Influences of Brd4CTD are specific to BPV-1, but the mechanisms of those processes still need to be studied. Our data show that the claim about the role of Brd4 in the BPV-1 E2-dependent chromatin attachment and mitotic segregations clearly needs additional proof.

KASUTATUD KIRJANDUS

Abroi A. 2004. The determinants for the native activities of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein are separable. Tartü Ülikool.

Abroi, A., I. Ilves, et al. (2004). "Analysis of chromatin attachment and partitioning functions of bovine papillomavirus type 1 E2 protein." J Virol **78**(4): 2100-13.

Abroi, A., R. Kurg, et al. (1996). "Transcriptional and replicational activation functions in the bovine papillomavirus type 1 E2 protein are encoded by different structural determinants." J Virol **70**(9): 6169-79.

Amtmann, E. and G. Sauer (1982). "Bovine papilloma virus transcription: polyadenylated RNA species and assessment of the direction of transcription." J Virol **43**(1): 59-66.

Bastien, N. and A. A. McBride (2000). "Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes." Virology **270**(1): 124-34.

Baxter, M. K., M. G. McPhillips, et al. (2005). "The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein, Brd4." J Virol **79**(8): 4806-18.

Beck, S., I. Hanson, et al. (1992). "A homologue of the Drosophila female sterile homeotic (fsh) gene in the class II region of the human MHC." DNA Seq **2**(4): 203-10.

Bonne-Andrea, C., S. Santucci, et al. (1995). "Bovine papillomavirus E1 protein can, by itself, efficiently drive multiple rounds of DNA synthesis in vitro." J Virol **69**(5): 3201-5.

Bonne-Andrea, C., F. Tillier, et al. (1997). "Bovine papillomavirus type 1 DNA replication: the transcriptional activator E2 acts in vitro as a specificity factor." J Virol **71**(9): 6805-15.

Bream, G., C. Ohmsted, et al. (1993). "Characterization of human papillomavirus type 11 E1 and E2 proteins expressed in insect cells." J Virol **67**(5): 2655-63.

Breiding, D. E., F. Sverdrup, et al. (1997). "Functional interaction of a novel cellular protein with the papillomavirus E2 transactivation domain." Mol Cell Biol **17**(12): 7208-19.

Choe, J., P. Vaillancourt, et al. (1989). "Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs." J Virol **63**(4): 1743-55.

Cowsert, L., W. Pilacinski, et al. (1988). "Identification of the bovine papillomavirus L1 gene product using monoclonal antibodies." Virology **165**(2): 613-5.

Cueille, N., R. Nougarede, et al. (1998). "Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and cyclin E-Cdk2." J Virol **72**(9): 7255-62.

de Villiers, E. M., C. Fauquet, et al. (2004). "Classification of papillomaviruses." Virology **324**(1): 17-27.

Denis, G. V. and M. R. Green (1996). "A novel, mitogen-activated nuclear kinase is related to a Drosophila developmental regulator." Genes Dev **10**(3): 261-71.

Denis, G. V., C. Vaziri, et al. (2000). "RING3 kinase transactivates promoters of cell cycle regulatory genes through E2F." Cell Growth Differ **11**(8): 417-24.

- Dey, A., F. Chitsaz, et al. (2003). "The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8758-63. Epub 2003 Jul 2.
- Dey, A., J. Ellenberg, et al. (2000). "A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition." Mol Cell Biol **20**(17): 6537-49.
- Dhalluin, C., J. E. Carlson, et al. (1999). "1H, 15N and 13C resonance assignments for the bromodomain of the histone acetyltransferase P/CAF." J Biomol NMR **14**(3): 291-2.
- Doorbar, J., E. Medcalf, et al. (1996). "Analysis of HPV1 E4 complexes and their association with keratins in vivo." Virology **218**(1): 114-26.
- Engel, L., C. Heilman, et al. (1983). "Transcriptional organization of bovine papillomavirus type 1." J Virol **47**(3): 516-28.
- Farina, A., M. Hattori, et al. (2004). "Bromodomain protein Brd4 binds to GTPase-activating SPA-1, modulating its activity and subcellular localization." Mol Cell Biol **24**(20): 9059-69.
- Florence, B. and D. V. Faller (2001). "You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators." Front Biosci **6**: D1008-18.
- French, C. A., I. Miyoshi, et al. (2001). "BRD4 bromodomain gene rearrangement in aggressive carcinoma with translocation t(15;19)." Am J Pathol **159**(6): 1987-92.
- French, C. A., I. Miyoshi, et al. (2003). "BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma." Cancer Res **63**(2): 304-7.
- Gauthier, J. M., N. Dostatni, et al. (1991). "Two DNA-bound E2 dimers are required for strong transcriptional activation and for cooperation with cellular factors in most cells." New Biol **3**(5): 498-509.
- Gilbert, D. and S. Cohen (1987). "Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle." Cell **50**(1): 59-68.
- Goldstein, D. J., R. Toyama, et al. (1992). "The BPV-1 E5 oncoprotein expressed in Schizosaccharomyces pombe exhibits normal biochemical properties and binds to the endogenous 16-kDa component of the vacuolar proton-ATPase." Virology **190**(2): 889-93.
- Harrison, S., K. Gearing, et al. (1987). "Multiple cis-active elements in the long control region of bovine papillomavirus type 1 (BPV-1)." Nucleic Acids Res **15**(24): 10267-84.
- Haugen, T., T. Cripe, et al. (1987). "Trans-activation of an upstream early gene promoter of bovine papilloma virus-1 by a product of the viral E2 gene." EMBO J **6**(1): 145-52.
- Haugen, T., L. Turek, et al. (1988). "Sequence-specific and general transcriptional activation by the bovine papillomavirus-1 E2 trans-activator require an N-terminal amphipathic helix-containing E2 domain." EMBO J **7**(13): 4245-53.
- Hawley-Nelson, P., E. Androphy, et al. (1988). "The specific DNA recognition sequence of the bovine papillomavirus E2 protein is an E2-dependent enhancer." EMBO J **7**(2): 525-31.
- Haynes, S. R., C. Dollard, et al. (1992). "The bromodomain: a conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins." Nucleic Acids Res **20**(10): 2603.
- Heilman, C., L. Engel, et al. (1982). "Virus-specific transcription in bovine papillomavirus-transformed mouse cells." Virology **119**(1): 22-34.

Houzelstein, D., S. L. Bullock, et al. (2002). "Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4." Mol Cell Biol **22**(11): 3794-802.

Howley, P. (1987). The role of papillomaviruses in human cancer. Important Adv Oncol, UNITED STATES.

Howley, P. M. and D. R. Lowy (2001). *Papillomavirinae: the viruses and their replication*. Field's Virology. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, USA, Lippincott Williams and Wilkins. **2**: 2197-2264.

Huang, S. M. and D. J. McCance (2002). "Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF." J Virol **76**(17): 8710-21.

Hubbert, N., J. Schiller, et al. (1988). "Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(16): 5864-8.

Hudson, B. P., M. A. Martinez-Yamout, et al. (2000). "Solution structure and acetyl-lysine binding activity of the GCN5 bromodomain." J Mol Biol **304**(3): 355-70.

Ilves, I., M. Kadaja, et al. (2003). "Two separate replication modes of the bovine papillomavirus BPV1 origin of replication that have different sensitivity to p53." Virus Res **96**(1-2): 75-84.

Ilves, I., S. Kivi, et al. (1999). "Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites." J Virol **73**(5): 4404-12.

Jacobson, R. H., A. G. Ladurner, et al. (2000). "Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module." Science **288**(5470): 1422-5.

Janikson K. 2004. Episomaalsete DNA viiruste replikatsiooni- ja segregatsioonifunktsiooni uurimine. Tartu Ülikool.

Jeanmougin, F., J. M. Wurtz, et al. (1997). "The bromodomain revisited." Trends Biochem Sci **22**(5): 151-3.

Jiang, Y. W., P. Veschambre, et al. (1998). "Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8538-43.

Jin, X., L. Cowser, et al. (1990). "Bovine serological response to a recombinant BPV-1 major capsid protein vaccine." Intervirology **31**(6): 345-54.

Jones, M. H., M. Numata, et al. (1997). "Identification and characterization of BRDT: A testis-specific gene related to the bromodomain genes RING3 and Drosophila fsh." Genomics **45**(3): 529-34.

Kim, K. and P. F. Lambert (2002). "E1 protein of bovine papillomavirus 1 is not required for the maintenance of viral plasmid DNA replication." Virology **293**(1): 10-4.

Lambert, P., N. Hubbert, et al. (1989). "Genetic assignment of multiple E2 gene products in bovine papillomavirus-transformed cells." J Virol **63**(7): 3151-4.

Lambert, P., B. Spalholz, et al. (1987). "A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator." Cell **50**(1): 69-78.

Law, M., D. Lowy, et al. (1981). "Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(5): 2727-31.

- Lee, D., H. Sohn, et al. (1999). "Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA." Nature **399**(6735): 487-91.
- Lefebvre, O., G. Steger, et al. (1997). "Synergistic transcriptional-activation by the papillomavirus E2 protein occurs after DNA binding and correlates with a change in chromatin structure." J Mol Biol **266**(3): 465-78.
- Lehman, C. and M. Botchan (1998). "Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation [see comments]." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4338-43.
- Lepik, D., I. Ilves, et al. (1998). "p53 protein is a suppressor of papillomavirus DNA amplificational replication." J Virol **72**(8): 6822-6831.
- Li, R. and M. Botchan (1993). "The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication." Cell **73**(6): 1207-21.
- Li, R., J. Knight, et al. (1989). "Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome." Genes Dev **3**(4): 510-26.
- Liu, J., S. Kuo, et al. (1995). "The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication." J Biol Chem **270**(45): 27283-91.
- Liu, J. S., S. R. Kuo, et al. (1998). "Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication." J Biol Chem **273**(46): 30704-12.
- Liu, W. J., Y. M. Qi, et al. (2001). "Association of bovine papillomavirus type 1 with microtubules." Virology **282**(2): 237-44.
- Mantovani, F. and L. Banks (2001). "The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression." Oncogene **20**(54): 7874-87.
- Maruyama, T., A. Farina, et al. (2002). "A Mammalian bromodomain protein, brd4, interacts with replication factor C and inhibits progression to S phase." Mol Cell Biol **22**(18): 6509-20.
- McBride, A. and P. Howley (1991). "Bovine papillomavirus with a mutation in the E2 serine 301 phosphorylation site replicates at a high copy number." J Virol **65**(12): 6528-34.
- Melendy, T., J. Sedman, et al. (1995). "Cellular factors required for papillomavirus DNA replication." J Virol **69**(12): 7857-67.
- Monini, P., I. Blitz, et al. (1993). "Cooperative DNA binding of the bovine papillomavirus E2 transcriptional activator is antagonized by truncated E2 polypeptides." J Virol **67**(9): 5668-76.
- Monini, P., S. Grossman, et al. (1991). "Cooperative binding of the E2 protein of bovine papillomavirus to adjacent E2-responsive sequences." J Virol **65**(4): 2124-30.
- Muller, A., A. Ritzkowski, et al. (2002). "Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300." J Virol **76**(21): 11042-53.
- Muller, F., Y. Seo, et al. (1994). "Replication of bovine papillomavirus type 1 origin-containing DNA in crude extracts and with purified proteins." J Biol Chem **269**(25): 17086-94.
- Muller, M., L. Gissmann, et al. (1995). "Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species." J Virol **69**(2): 948-54.

- Neary, K., B. Horwitz, et al. (1987). "Mutational analysis of open reading frame E4 of bovine papillomavirus type 1." J Virol **61**(4): 1248-52.
- Ornaghi, P., P. Ballario, et al. (1999). "The bromodomain of Gcn5p interacts in vitro with specific residues in the N terminus of histone H4." J Mol Biol **287**(1): 1-7.
- Owen, D. J., P. Ornaghi, et al. (2000). "The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p." Embo J **19**(22): 6141-9.
- Park, P., W. Copeland, et al. (1994). "The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8700-4.
- Peh, W. L., K. Middleton, et al. (2002). "Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease." J Virol **76**(20): 10401-16.
- Peng, Y. C., D. E. Breiding, et al. (2000). "AMF-1/Gps2 binds p300 and enhances its interaction with papillomavirus E2 proteins." J Virol **74**(13): 5872-9.
- Piirsoo, M., E. Ustav, et al. (1996). "Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator." EMBO J **15**(1): 1-11.
- Rangasamy, D. and V. G. Wilson (2000). "Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein." J Biol Chem **275**(39): 30487-95.
- Rank, N. and P. Lambert (1995). "Bovine papillomavirus type 1 E2 transcriptional regulators directly bind two cellular transcription factors, TFIID and TFIIB." J Virol **69**(10): 6323-34.
- Ravnan, J., D. Gilbert, et al. (1992). "Random-choice replication of extrachromosomal bovine papillomavirus (BPV) molecules in heterogeneous, clonally derived BPV-infected cell lines." J Virol **66**(12): 6946-52.
- Rhee, K., M. Brunori, et al. (1998). "Expression and potential role of Fsrp1, a murine bromodomain-containing homologue of the Drosophila gene female sterile homeotic." J Cell Sci **111**(Pt 23): 3541-50.
- Sailaja, G., R. M. Watts, et al. (1999). "Many different papillomaviruses have low transcriptional activity in spite of strong epithelial specific enhancers." J Gen Virol **80**(Pt 7): 1715-24.
- Sanders, C. M. and A. Stenlund (1998). "Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor." Embo J **17**(23): 7044-55.
- Sedman, J. and A. Stenlund (1995). "Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro." EMBO J **14**(24): 6218-28.
- Sedman, J. and A. Stenlund (1996). "The initiator protein E1 binds to the bovine papillomavirus origin of replication as a trimeric ring-like structure." EMBO J **15**(18): 5085-92.
- Sedman, T., J. Sedman, et al. (1997). "Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus." J Virol **71**(4): 2887-96.
- Silla T. 2003. Veise papilloomiviiruse tüüp 1 segregatsiooni uurimine pärmis *Saccharomyces cerevisiae*. Tartu Ülikool.

- Skiadopoulos, M. and A. McBride (1996). "The bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator and repressor proteins use different nuclear localization signals." J Virol **70**(2): 1117-24.
- Skiadopoulos, M. and A. McBride (1998). "Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin." J Virol **72**(3): 2079-88.
- Spalholz, B., Y. Yang, et al. (1985). "Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product." Cell **42**(1): 183-91.
- Steger, G., J. Ham, et al. (1995). "The bovine papillomavirus 1 E2 protein contains two activation domains: one that interacts with TBP and another that functions after TBP binding." EMBO J **14**(2): 329-40.
- Stenlund, A. and M. Botchan (1990). "The E2 trans-activator can act as a repressor by interfering with a cellular transcription factor [published erratum appears in Genes Dev 1990 Mar;4(3):476]." Genes Dev **4**(1): 123-36.
- Stubenrauch, F., T. Zobel, et al. (2001). "The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31." J Virol **75**(9): 4139-49.
- Swindle, C. and J. Engler (1998). "Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1." J Virol **72**(3): 1994-2001.
- Thierry, F., N. Dostatni, et al. (1990). "Cooperative activation of transcription by bovine papillomavirus type 1 E2 can occur over a large distance." Mol Cell Biol **10**(8): 4431-7.
- Thorner, L., D. Lim, et al. (1993). "DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects." J Virol **67**(10): 6000-14.
- Thorpe, K. L., S. Abdulla, et al. (1996). "Phylogeny and structure of the RING3 gene." Immunogenetics **44**(5): 391-6.
- Thorpe, K. L., P. Gorman, et al. (1997). "Chromosomal localization, gene structure and transcription pattern of the ORFX gene, a homologue of the MHC-linked RING3 gene." Gene **200**(1-2): 177-83.
- Turek, L. (1994). "The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer." Adv Virus Res **44**: 305-56.
- Ustav, M. and A. Stenlund (1991). "Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames." EMBO J **10**(2): 449-57.
- Ustav, M., E. Ustav, et al. (1991). "Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1." EMBO J **10**(13): 4321-9.
- Vaillancourt, P., T. Nottoli, et al. (1990). "The E2 transactivator of bovine papillomavirus type 1 is expressed from multiple promoters." J Virol **64**(8): 3927-37.
- Vande Pol, S. and P. Howley (1990). "A bovine papillomavirus constitutive enhancer is negatively regulated by the E2 repressor through competitive binding for a cellular factor." J Virol **64**(11): 5420-9.
- Wilson, V. and J. Ludes-Meyers (1991). "A bovine papillomavirus E1-related protein binds specifically to bovine papillomavirus DNA." J Virol **65**(10): 5314-22.
- Wilson, V. G., M. West, et al. (2002). "Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features." Virus Genes **24**(3): 275-90.

- Winston, F. and C. D. Allis (1999). "The bromodomain: a chromatin-targeting module?" Nat Struct Biol **6**(7): 601-4.
- Yang, L. and M. Botchan (1990). "Replication of bovine papillomavirus type 1 DNA initiates within an E2-responsive enhancer element." J Virol **64**(12): 5903-11.
- Yang, L., I. Mohr, et al. (1993). "The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5086-90.
- Yang, L., I. Mohr, et al. (1991). "Transcription factor E2 regulates BPV-1 DNA replication in vitro by direct protein-protein interaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **56**: 335-46.
- Yang, Y., H. Okayama, et al. (1985). "Bovine papillomavirus contains multiple transforming genes." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(4): 1030-4.
- Yasugi, T., J. Benson, et al. (1997). "Mapping and characterization of the interaction domains of human papillomavirus type 16 E1 and E2 proteins." J Virol **71**(2): 891-9.
- You, J., J. L. Croyle, et al. (2004). "Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes." Cell **117**(3): 349-60.
- Zerfass-Thome, K., W. Zwerschke, et al. (1996). "Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein." Oncogene **13**(11): 2323-30.
- Zhao, K., X. Sun, et al. (1998). "DNA packaging by L1 and L2 capsid proteins of bovine papillomavirus type 1." Virology **243**(2): 482-91.
- Zobel, T., T. Iftner, et al. (2003). "The papillomavirus E8-E2C protein represses DNA replication from extrachromosomal origins." Mol Cell Biol **23**(22): 8352-62.