

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

ANRI KIVIL

**TUUMORSUPRESSORVALGU p53 MÕJU VEISE PAPILLOOMIVIIRUSE  
TÜÜP 1 REPLIKATSIOONILE *IN VITRO***

MAGISTRITÖÖ

Juhendajad: *Ph.D* Ene Ustav  
*M.Sc* Meelis Kadaja

Tartu 2004

# Sisukord

<b>Sisukord</b> .....	<b>2</b>
<b>Kasutatud lühendid</b> .....	<b>3</b>
<b>Sissejuhatus</b> .....	<b>4</b>
<b>Kirjanduse ülevaade</b> .....	<b>6</b>
Papilloomiviirused ja veise papilloomiviirus tüüp 1 (BPV-1).....	6
Papilloomiviiruste genoomne struktuur .....	6
Papilloomiviiruste elutsükkel.....	9
Viiruse poolt kodeeritud replikatsioonifaktorid.....	10
Valk- Valk interaktsioonid BPV-1 replikatsiooni initsiatsioonil.....	13
Rakulised replikatsioonifaktorid ja eukarüootne DNA replikatsiooni initsiatsioon.....	14
Tuumorsupressorvalk p53.....	17
p53 struktuur .....	17
p53 funktsioon .....	18
p53 valk DNA replikatsiooni regulatsioonil.....	21
<b>Eksperimentaalne osa</b> .....	<b>24</b>
Töö eesmärk.....	24
<b>Materjalid ja meetodika</b> .....	<b>25</b>
Bakteritüved.....	25
Vektorid .....	25
Rakukultuurid .....	26
Rakuekstrakti valmistamine.....	26
Valkude ekspressiooni optimeerimine.....	27
BPV-1 E1 ning p53 mutantide ekspresseerimine .....	27
BPV-1 E1 valgu puhastamine.....	28
p53 mutantide puhastamine .....	29
Bradfordi test .....	29
<i>Western blot</i> .....	30
<i>In vitro</i> replikatsiooni katse .....	31
Oligote kineerimine ning puhastamine .....	31
Elektroforeetilise liikumise muutumise katse ( <i>band shift</i> ) .....	32
Valk-Valk komplekside ristsidumine glutaaraldehüüdiga.....	32
<b>Tulemused</b> .....	<b>34</b>
BPV-1 E1 valgu ekspressioon ja puhastamine .....	34
p53 valkude ekspressioon .....	35
p53 mutandi N39C362 puhastamine.....	36
N39C362Trp248 puhastamine .....	38
Puhastatud valkude aktiivsuse kontroll.....	40
N39C362Trp248 ning N39C362 valkude mõju DNA replikatsioonile BPV-1 <i>in vitro</i> replikatsioonisüsteemis.....	43
E1 kompleksi moodustumine N39C362 ja N39C362Trp248 juuresolekul .....	44
E1+E2 kompleksi moodustumine N39C362 ja N39C362Trp248 juuresolekul .....	46
<b>Arutelu</b> .....	<b>48</b>
<b>Kokkuvõte</b> .....	<b>52</b>
<b>Summary</b> .....	<b>53</b>
<b>Kasutatud kirjandus</b> .....	<b>54</b>

## Kasutatud lühendid

ATP –	adenosiintrifosfaat
ah –	aminohape
bp –	aluspaar ( <i>base pair</i> )
BPV-1 –	<i>Bovine Papilloma Virus type 1</i>
DTT –	ditiotreitool
DBD –	DNA-d siduv domeen
E1BS –	valgu E1 seostumisjärjestus
E2BS –	valgu E2 seostumisjärjestus
EBV –	<i>Epstein Barr Virus</i>
EDTA –	etüleendiamiintetraädikhape
GST –	Glutatioon-S-Transferaas
HPV –	<i>Human Papilloma Virus</i>
HSV –	<i>Herpes Simplex Virus</i>
IPTG –	isopropüül- $\beta$ -d-tiogalaktopüranosiid
LTag –	suur T antigeen
MME –	<i>Minichromosomal Maintenance Element</i>
ORF –	avatud lugemisraam
PCNA –	prolifereeruvate rakkude tuuma antigeen
PMSF –	fenüülmetüülsulfonüül fluoriid
PV –	papilloomiviirus
RPA –	replikatsioonivalk A
rpm –	pööret minutis
SDS –	naatriumdodetsüülsulfaat
SV40 –	<i>Simian virus 40</i>
TAE –	Tris/atsetaat/EDTA puhver
Tris –	trishüdrosümetüülaminmetaan
URR –	<i>Upstream Regulatory Region</i>

## Sissejuhatus

Replikatsiooni ning täpsemalt selle algust on viiruste (näiteks SV40 ja BPV-1) kui kindlalt defineeritud ja suhteliselt lihtsate mudelite abil uuritud juba kaua. Sõltub ju enamasti viirusi suuresti oma peremehest ning mitmed neist panevad oma hüveks tööle terve rakus oleva masinavärgi. Üks raku elutegevust kontrollivatest võtmevalkudest, mis osaleb rakulises vastuses mitmesugustele stressifaktoritele on tuumorsupressorvalk p53. p53 funktsiooniks on vastutada genoomi vigadeta ülekandumise eest tütarakkudesse ning teda aktiveerivad nii DNA kahjustused, ultraviolettkiirgus, stress kui ka paljud teised faktorid. Valgu efekt võib olla kaudne – aktiveeritakse/represseeritakse geenide transkriptsioon p53 reguleeritavatelt promotoritelt, mille tulemusel peatatakse rakutsükkel kuni reparatsioonisüsteemid kõrvaldavad kahjustused või suunatakse rakud apoptoosi. Teisalt on pidevalt ilmunud töid, milles näidatakse, et p53 võib raku elu ning surma mõjutada ka otseselt, transkriptsiooniliselt aktiveerumata, läbi interaktsioonide teiste rakuliste ja viiruslike faktoritega. Veel on teada, et p53 on võimeline interakteeruma otseselt või läbi partnervalgude mitmete DNA replikatsiooni initsiatsioonil või elongatsioonil osalevate rakuliste valkudega.

Enamik viirusi, kelle elutsükkel sisaldab kontrollitud replikatsiooni etappi, sealhulgas BPV-1, kasutavad replikatsiooni kontrollimiseks rakulisi valke. Multifunktsionaalne tuumorsupressorvalk p53 reguleerib otseselt ka papilloomiviirustega lähedalt suguluses olevate polüoomiviiruse ja SV40 replikatsiooni. Eelnevatest töödest (Lepik *et al.*, 1998) on teada, et hamstri ning inimese rakkudes *in vivo* süsteemis surub p53 spetsiifiliselt alla nii papilloomiviiruste kui polüoomiviiruste replikatsiooni, kuid ei suuda inhibeerida hiire rakkudes toimuvat viiruse replikoni paljunemist. Replikatsiooni inhibitsioon ei ole seotud p53 võimega peatada rakutsükkel või viia rakud apoptoosi, samuti ei suru ta alla E1 ning E2 replikatsioonivalgude ekspressiooni, seega võib spekulatsioon, et p53 mõjutab papilloomiviiruste replikatsioonikompleksi moodustumist otseselt. Kuigi on näidatud, et p53 on võimeline inhibeerima BPV-1 DNA replikatsiooni *in vitro*, on arusaamatu selle inhibitsiooni mehhanism (Kadaja, 2002).

Antud töös on kirjeldatud, kuidas mõjutab p53 BPV-1 DNA replikatsiooni *in vitro* süsteemis, kui kasutatud on hiire rakkudest puhastatud ekstrakte. Samuti on püütud uurida p53 mõju viiruse replikatsioonivalgu E1 aktiivsusele.

Käesolev töö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi mikrobioloogia ja viroloogia õppetooli juures. Tahaksin tänada oma juhendajaid Meelis Kadajat ja Ene Ustavit ning kõiki teisi, kes on mind möödunud aegadel jõu ja nõuga aidanud.

# Kirjanduse ülevaade

## Papilloomiviirused ja veise papilloomiviirus tüüp 1 (BPV-1)

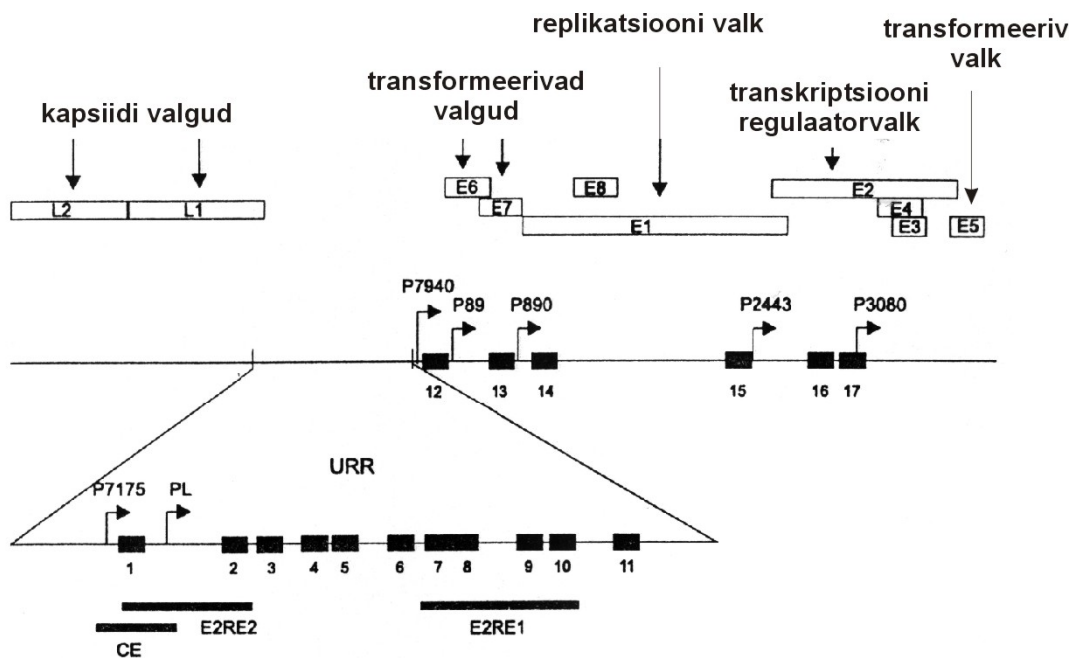
Papilloomiviirused (PV) on väikesed, kaheaahelalise tsirkulaarse DNA genoomiga (~8000 bp) viirused, mis nakatavad epiteelkoe basaalseid rakke. Viiruse genoom on pakitud ikosaedrilisse kapsiidi (55 nm), millel puudub membraanne ümbris. PV-d nakatavad paljusid erinevaid peremehi (linnud, imetajad) ning on väga liigi- ning koespetsiifilised. Praeguseks on leitud üle saja erineva papilloomiviiruse, mis nakatavad kuusteistkümmet peremeesorganismi (de Villiers *et al.*, 2004). Viirus jõuab rakuni läbi pindmiste nahavigastuste ning siseneb seni veel täpselt kindlaks tegemata retseptorite abil peremeesrakku. PV-d on võimelised seonduma mitmesuguste rakutüüpidega, kuid suudavad replitseeruda ainult epiteelkoes.

Veise papilloomiviirus tüüp1 kuulub nende papilloomiviiruste hulka, kes võivad paljuneda lisaks epiteelkoele ka fibroplastides. BPV-1 laiem peremeesring ning võime transformeerida näriliste rakuliine on ajalooliselt olnud üheks peamiseks põhjuseks, miks eukarüootse replikatsiooni modelleerimiseks on peale SV40 viiruse kasutatud ka sellel veise papilloomiviirusel põhinevat mudelit.

## Papilloomiviiruste genoomne struktuur

Papilloomiviiruste genoom jaotatakse varajaseks ning hiliseks piirkonnaks. Varajase ning hilise piirkonna vahel paikneb umbes 1000 bp suurune mittekodeeriv regioon, mida nimetatakse URR (*Upstream Regulatory Region*) või LCR (*Long Control Region*) alaks. Selles genoomi piirkonnas paiknevad viiruse DNA replikatsiooni

alguspunkt ehk *origin* ning mitmed transkriptsioonis ja replikatsioonis olulised reguleerivad järjestused. BPV-1 URR piirkonnas paikneb ka viiruse stabiilseks rakus säilumiseks vajalik MME (*Minichromosomal Maintenance Element*) piirkond, mis koosneb multimeriseerunud E2 valgu seondumiskohtadest. Genoomi varajasest regioonist kodeeritud kaheksa valku (E1-E8) osalevad viiruse transkriptsioonis, transformatsioonis ja replikatsioonis, hilises piirkonnas paiknevad geenid kodeerivad kaht viiruse kapsiidivalku (L1, L2) (Joonis 1).



**Joonis 1. BPV-1 genoomi struktuur.** Mustade kastidega on tähistatud genoomis asuvad 17 E2 valgu seondumissaiti (E2BS) ning täitmata kastidega kümme oletatavat avatud lugemisraami. Nooltega on näidatud promootorite paiknemine. Joonise alumisel osal on eraldi välja toodud URR piirkond, kus asetseb ka mitmest E2 valgu seondumisjärjestusest koosnev MME. Replikatsiooni alguspunkt asetseb E2BS 11 ning 12 vahel. CE – konstitutiivne enhanser. E2RE – E2 vastuselement. (Abroi 2004, järgi).

Kõik geenid transkribeeritakse ühelt viiruse genoomse DNA ahelalt, kusjuures mitmed ORF-id kattuvad. Varajasest genoomi piirkonnas paiknevate lugemisraamidelt sünteesitud viiruse mittestruktuursetest valkudest kuus (E1, E2, E4, E5, E6, E7) on suhteliselt hästi kirjeldatud, kuid kahe (E3 ja E8) funktsiooni ei teata.

**E1** on 600 kuni 700 aminohappe (ah) pikkune kõrgelt konserveerunud valk, mis omab järjestusspetsiifilist ning -mittespetsiifilist DNA-ga seondumise võimet, helikaasset ja ATP-aasset aktiivsust (Hughes and Romanos, 1993), (Yang *et al.*, 1993).

**E2** avatud lugemisraam kodeerib valku, mis omab sarnaselt E1-ga järjestusspetsiifiliselt DNA-ga seondumise võimet ning on peamiseks viiruse elutsükli regulaatoriks. E2 interakteerub mitmete rakuliste ning viiruslike valkudega, reguleerib transkriptsiooni ja replikatsiooni (Ustav and Stenlund, 1991) ning tagab BPV-1 genoomi säilumise jagunevates tütarakkudes (You *et al.*, 2004).

**E4** on ainus varajastest valkudest, mida ei ekspresseerita enne kui algab viiruse elutsükli viimane, produktiivne faas. E4 valk interakteerub rakkudes tsütokeratiiniga ning põhjustab selle lagundamise (Wang *et al.*, 2004).

**E5** on peamine BPV-1 transformeeriv valk. Ta seondub PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) retseptoriga ning takistab signaaliülekaneraja funktsioneerumist (Goldstein *et al.*, 1992).

**E6** valk on koos E7 valguga peamiseks transformeerivaks valguks HPV puhul. Ta interakteerub p53-ga ning seob rakulist ubikvitiini ligaasi E6AP. E6AP ubikvitinüleerib E6 sõltuvalt p53-e, mis seejärel suunatakse degradatsioonile proteosoomi (Scheffner *et al.*, 1993).

**E7** ORF kodeerib transformeerivat valku, mis seondub rakulise retinoblastoomi valguga (RB) ja suunab selle ubikvitiin-sõltuvalt degradatsiooni. Seda mehhanismi kasutab viirus retinoblastoomi valgu poolt inhibeeritava E2F-sõltuva transkriptsiooni aktiveerimiseks (Boyer *et al.*, 1996).

**L1** ning **L2** avatud lugemisraamid kodeerivad viiruse kapsiidivalke. Nende süntees indutseeritakse viiruse elutsükli viimases, produktiivses faasis. L1 on viiruse kapsiidi peamine valk, mis on võimeline siduma DNA-d ning interakteerub mikrotuubulitega. L2 on tõenäoliselt seotud viiruse DNA pakkimisega kapsiidi.



## Papilloomiviiruste elutsükkel

Viirus siseneb lameepiteeli basaalses kihis paiknevatesse rakkudesse läbi pindmiste nahavigastuste ning säilitab oma genoomi ekstrakromosomaalselt replitseeruva episoomina. Virionid sisenevad rakkudesse klatriin-sõltuva retseptor-vahendatud endotsütoosi teel. Kuigi retseptor, mille kaudu viirus rakku siseneb, ei ole veel identifitseeritud, on viiruspartiklite esmaseks rakkudele seondumiseks vajalik hepariin-sulfaadi olemasolu rakkupinnal (Joyce *et al.*, 1999). Peale rakumembraani läbimist transporditakse viiruspartiklid tuuma, kusjuures L2 valk interakteerub aktiiniga ning L1 valk tubuliiniga (Yang *et al.*, 2003). Enne tuuma sisenemist vabaneb viiruse genoom kapsiidist ning algab transkriptsioon viiruse varajaste geenide promootoritelt, mis on sõltuv rakulistest transkriptsioonifaktoritest, mida leidub vaid epidermise basaalses kihtides olevates jagunevates rakkudes. Papilloomiviiruste range liigi- ning koespetsiifilisus on tõenäoliselt reguleeritud transkriptsiooni, mitte replikatsiooni tasemel (Chiang *et al.*, 1992).

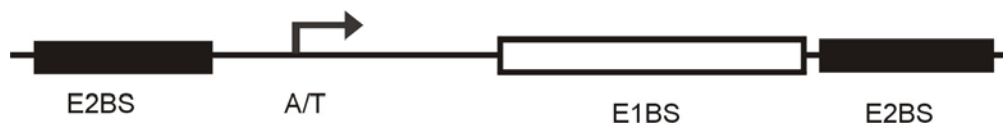
Viiruse replikatsioonitsükli saab jagada kolmeks erinevaks etapiks. Peale tuuma jõudmist toimub viiruse genoomi esmane kiire paljundamine ehk **amplifikatsiooniline replikatsioon**, milleks *in vivo* on vajalikud ning piisavad viiruse genoomi varajasest piirkonnast kodeeritud replikatsioonivalgud E1 ning E2 koos rakuliste replikatsioonifaktoritega (Ustav and Stenlund, 1991). Viiruse koopiaarv tõuseb ~50–100-ni raku kohta ning jääb seejärel stabiilselt sellele tasemele püsima, kuni rakud jõuavad epidermise ülemistesse kihtidesse. Selles elutsükli faasis toimub genoomi **stabiilne replikatsioon**. Viirus säilib latentse ekstrakromosomaalse plasmiidina ning replikatsioon initsieeritakse juhusliku valiku teel (*random choice replication*) – mõnda viirusgenoomi paljundatakse mitu korda, kuid teist üldse mitte (Ravnan *et al.*, 1992). Statistiliselt võttes on tulemuseks siiski viiruspopulatsiooni kahekordistumine. Täpset arusaama, kuidas viirus lülitub amplifikatsiooniliselt replikatsioonilt ümber stabiilsele, ei ole, kuid põhimõtteliselt võib mõlemat tüüpi replikatsioon toimuda rakus samaaegselt (Ilves *et al.*, 2003). BPV-1 stabiilse säilumise ning efektiivse jaotumise jagunevate tütarakkude vahel

tagab selles faasis MME piirkonda seondunud E2 valk, mis seondub ka mitootilistele kromosoomidele (Ilves *et al.*, 1999). BPV-1 valgu kinnitumist kromosoomidele vahendab omakorda E2-e partnervalg Brd4. Selline "hääletamine" kindlustab viirusgenoomi võrdse jagunemise (You *et al.*, 2004).

Epiteelkoe pindmistesse kihtidesse jõudnud ning lõplikult diferentseerunud keratinotsüütides käivitub viiruse elutsükli viimane, produktiivne faas. Genoomi **vegetatiivne replikatsioon** leiab tõenäoliselt aset veereva ratta mudeli järgi, mille käigus viiruse koopiaarv tõuseb ~1000-ni raku kohta (Dasgupta *et al.*, 1992). Paralleelselt DNA replikatsiooniga toimub transkriptsioon hiliste geenide promootoritelt, sünteesitakse kapsiidivalke L1 ning L2 virion assambleerub ning vabaneb.

## Viiruse poolt kodeeritud replikatsioonifaktorid

Papilloomiviiruste replikatsiooniks *in vivo* on vajalikud kolm viirusepoolset faktorit: replikatsiooni alguspunkti sisaldav *origin*piirkond ning valgud E1 ja E2. Minimaalse *origin*'i ehk järjestuse, millelt on võimalik alustada papilloomiviiruste replikatsiooni, moodustab ~60 aluspaari pikkune viiruse URR regioonis paiknev piirkond (Ustav and Stenlund, 1991) (Chiang *et al.*, 1992) (Del Vecchio *et al.*, 1992). Selles järjestuses paiknevad kuus E1 seondumisjärjestust (E1BS), A/T rikas piirkond ning kaks E2 dimeeri seondumissaiti (E2BS) (Joonis 2).

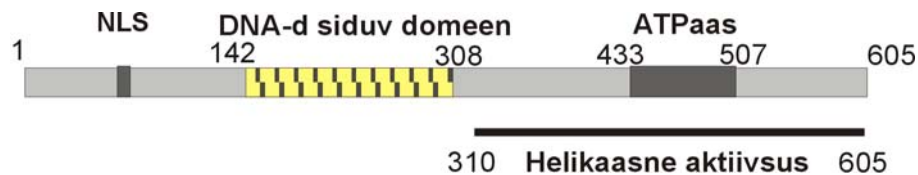


**Joonis 2. BPV-1 *origin*'i struktuur.** Mustade kastidega on tähistatud E2 valgu seondumiskohad (E2BS) ning valgega E1 valgu seondumissaidid (E1BS). Noolega on näidatud A/T rikas piirkond, kust algab ahelate lahtisulandumine.

E1BS-d moodustavad kuus omavahel osaliselt kattuvat heksanukleotiidset järjestust (AACAAAT), mis on olemas kõigis teadaolevates papilloomiviiruste replikonides. E1 monomeeride kooperatiivne seondumine tekitab DNA ahela ümber tihedalt kokkupakitud heksameerse E1 rõnga, struktuuri, mis on iseloomulik kõigile helikaasidele (Chen and Stenlund, 2001).

E2BS moodustav DNA konsensusjärjestus (ACCGN(4)CGGT) koosneb kahest kõrgelt konserveerunud sümmeetrilisest järjestusest, mis on üksteisest eraldatud neljanukleotiidilise vahejärjestusega. BPV-1 genoomist on leitud 17 E2BS, millest kaksteist paiknevad URR alas, kohas, kus asuvad nii replikatsiooni alguspunkt kui ka varajaste geenide promootorid. Peamine E2 vastuselement URR regioonis on E2RE1 (*E2 Response Element 1*), mis koosneb neljast kõrge afiinsusega E2BS-st ning aktiveerib transkriptsiooni kõigilt viiruse varajastelt promootoritelt (Joonis 1). Interaktsiooni tugevus E2 ja tema märklaudjärjestuse vahel võib erinevate viirustüüpide ning seondumissaitide puhul suuresti varieeruda. DNA tasemel mõjutab seondumissaidi tugevust E2BS mittekonserveerunud motiiv, mis on eriti oluline faktor HPV puhul (Li *et al.*, 1989). Hierarhiliste E2BS-e olemasolu võimaldab viirusel E2 valgu abil erinevatel eluetappidel kontrollida oma genoomi transkriptsiooni ning replikatsiooni (Steger *et al.*, 1996) (Joonis 1). *Origin*'i kolmas komponent, A/T rikas järjestus, on vajalik DNA ahelate algseks lahtisulatamiseks.

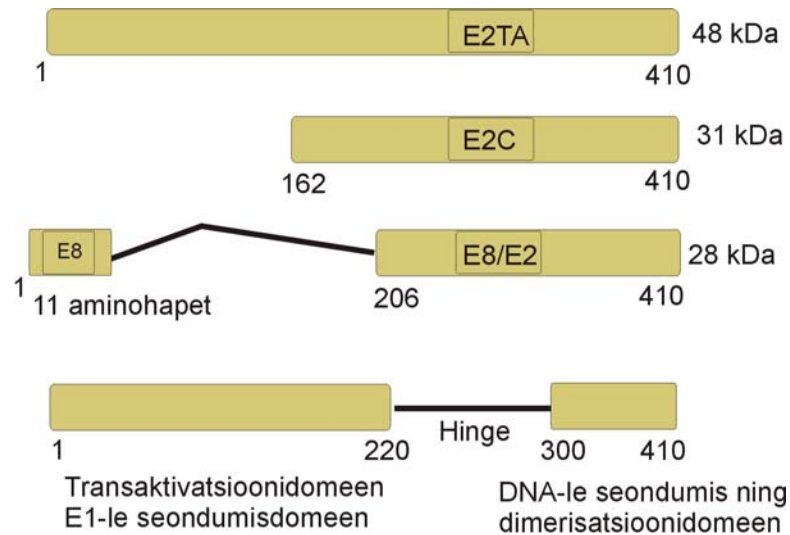
BPV-1 E1 valk (68 kDa) koosneb 605 aminohappejäägist ning on konserveerunud struktuuriga kõigis papilloomiviirustes. Teda võib jagada kolmeks domeeniks: aminotermiinalne (N-termiinalne) domeen (ah 1-130), kus asuvad tuumalokalisatsioonisignaali ning fosforüleerimissaidid; DNA-d siduv domeen (ah 142-308); ATPaasne/helikaasne domeen (ah 310-605) (Joonis 3).



**Joonis 3. E1 struktuur.** Joonisel on ära toodud E1 valgu ATPaasest, ning helikaasest aktiivsust kodeerivad piirkonnad ning DNA-d siduv domeen. NLS – tuumalokalisatsiooni signaal.

E1 aktiivsus on reguleeritud lisaks E2 valgule ka fosforüleerimisega, kuid on näidatud, et bakteriaalsest süsteemist puhastatud ning posttranslatsiooniliste modifikatsioonideta E1 valk on *in vitro* replikatsioonis samuti aktiivne (Lentz, 2002).

E2 valgu karboksüterminuses (C-terminuses) paiknev järjestuspetsiifiliselt DNA-ga seonduv ning N-terminuses asuv dimerisatsiooni eest vastutav domeen on kõigis papilloomiviirustes suhteliselt kõrgelt konserveerunud. Nende vahel paiknev hinge regioon ei ole aga konserveerunud ei oma pikkuse ega aminohappelise koostise poolest. Alternatiivse splaissingu tulemusena saadakse E2 ORF-lt kodeeritud mRNA-st kolm erineva pikkusega transkripti: täispikk E2TA (48 kDa) ning kaks lühemat – E2C (31 kDa) ja E8/E2 (28 kDa) (Lambert *et al.*, 1987) (Joonis 4). Lühematel vormidel on küll olemas hinge ning DBD (*DNA binding domain*) regioon, kuid puudub transaktivatsiooni eest vastutav N-terminaalne osa ja nad käituvad kui E2TA repressorid, heterooligomeriseerudes täispika E2 valguga (McBride *et al.*, 1991).



**Joonis 4. E2 valkude struktuur.** Joonisel on ära toodud BPV-1 E2 valkude skeemid.

## Valk- Valk interaktsioonid BPV-1 replikatsiooni initsiatsioonil

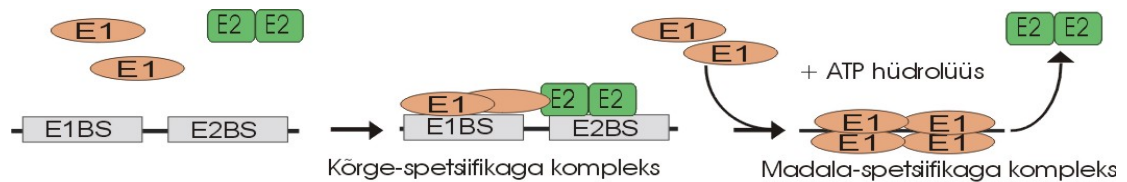
SV40-e, papilloomiviiruse ning polüoomiviiruse replikatsiooni alguse võib jagada kolmeks peamiseks etapiks: *origin*piirkonna äratundmine ning sellega seondumine; A/T rikka järjestuse lahtisulatamine; initsiatsiooniks vajalike rakuliste faktorite kohaletoomine (Stenlund, 2003). SV40-e ning polüoomiviirusel on replikatsiooniks vajalik üksainus valk – LTag (suur T antigeen), kuid BPV-1 puhul on nõutav kahe viirusliku valgu – E1 ning E2 olemasolu (Sedman and Stenlund, 1995).

Peale raku nakatumist on viirusvalkude kontsentratsioon esmalt väga madal ning replikatsiooni alustamiseks peab initsiaatorvalk spetsiifiliselt seonduma *origin*piirkonnaga. Samas, vastuoluliselt sellele eeldusele, seonduvad nii viiruslikud kui ka rakulised initsiaatorvalgud oma märklaudjärjestusele madala järjestusspetsiifikaga (Lorimer *et al.*, 1991). Sellele paradoksile on nüüdseks leitud lahendus, uurides BPV-1 replikatsiooni initsiatsiooni. Selgus, et kui lisada E2 valku, muutus E1-E2 kompleksi kooperatiivne seondumine *origin*'il paiknevatele E1 seondumisesaitidele kõrgelt spetsiifiliseks (Berg and Stenlund, 1997) (Sedman and Stenlund, 1995).

E1 omab kaht tüüpi DNA-le seondumise aktiivsust: esiteks – DNA duplexi lahtisulatamiseks vajalik mittespetsiifilise DNA-ga seondumise aktiivsus, mis paikneb valgu helikaases domeenis; teiseks – DBD poolt kodeeritud spetsiifiline *origin*'i äratundmisvõime. E1 helikaasse domeeni deleteerimine aktiveerib E1 mutandi võime seonduda *origin*'i piirkonnaga rohkem kui 1000 korda. Seega on täispika E1 valgu madal järjestusspetsiifika põhjustatud mittespetsiifiliselt DNA-d siduva E1 helikaasse domeeni tingitud negatiivsest efektist (Stenlund, 2003a).

E2 valk suurendab E1 võimet seonduda spetsiifiliselt *origin*'ile sama põhimõtte kaudu – supresseerides peale E1 helikaasse domeeniga interakteerumist selle negatiivse efekti (Gillitzer *et al.*, 2000).

Esmalt moodustub *origin*'ile järjestusspetsiifiline (E1)<sub>2</sub>-(E2)<sub>2</sub>-*origin* kompleks. E1 dimeer seondub erinevate struktuursete domeenide vahendusel kahele üksteisega külgnevale kaksikheeliksi suurele vaole, jäädes seotuks ka E2 dimeeriga. Seejärel toob järgmine E2 dimeer kohale teise E1 dimeeri, mis seondub DNA ahela teisel küljel asuvate E1BS-dega. Tetrameerse (E1)<sub>2</sub>-(E2)<sub>2</sub> kompleksi moodustumisel vabanevad ATP-sõltuvalt oma seondumissaitidelt ka E2 dimeerid (Joonis 5).



**Joonis 5. E1 tetrameerse kompleksi laadimine *origin*'ile.** Lähemalt loe tekstist. (Stenlund 2003, järgi)

Helikaasi assambleerumise käigus väheneb DNA ja E1 interaktsiooni tugevus pöördvõrdeliselt uute E1 molekulide lisandumisega, mis kindlustab helikaasi korrastatud *origin*'ile laadimise. Kompleksi lisanduvad E1 molekulid käituvad kiiludena, mis põhjustavad matriitsi järk-järgulise lahtisulandumise (Chen and Stenlund, 2002). Moodustunud tetrameersesse kompleksi lisanduvad uued E1 molekulid ning lõpuks assambleerub *origin*'il kaks heksameerset helikaasi (Sanders and Stenlund, 2001).

## Rakulised replikatsioonifaktorid ja eukarüootne DNA replikatsiooni initsiatsioon

Seda, et SV40 LTag ning papilloomiviiruste E1 valk on sama funktsiooniga oletati juba 20 aasta eest (Clertant and Seif, 1984). Valkude kristallstruktuuri uuringud näitavad, et paljud SV40 LTag struktuursed domeenid on sarnased BPV-1 E1 valguga,

kuigi aminohapete tasandil homoloogia puudub. Seega kasutavad mõlemad viirused DNA replikatsiooni initsiatsioonil ning rakuliste faktorite töö koordineerimisel suhteliselt analoogseid mehhanisme (Mansky *et al.*, 1997).

SV40 replikatsiooni initsiatsioonis osalevad faktorid on võrreldes BPV-1 põhineva mudeliga paremini iseloomustatud ning viiruse replikatsiooni on *in vitro* võimalik käivitada puhastatud rakulisi valke kasutades. Ka BPV-1 *in vitro* replikatsioonis osalevad faktorid on küllaltki hästi defineeritud, kuid viiruse genoomi efektiivseks replitseerimiseks on vaja veel seni identifitseerimata rakulisi kofaktoreid (Melendy *et al.*, 1995). Enamasti on töödes, mis käsitlevad BPV-1 *in vitro* replikatsiooni kasutatud hiire või inimese rakkudest puhastatud ekstrakti (Waga *et al.*, 1994).

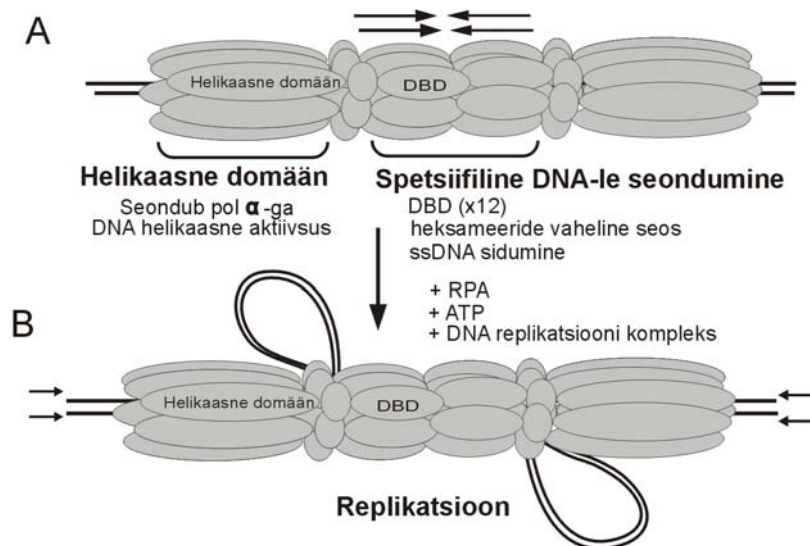
SV40 replikatsioon algab LTag kooperatiivse seondumisega neljale *origin*'il asuvalle seondumissaidile. Seejärel, kasutades ATP hüdroolüüsist saadavat energiat, sulatatakse lahti *origin*'i piirkonnas paiknev A/T rikas järjestus, millega seondub replikatsioonivalk A (RPA) (Peng and Acheson, 1998). Järgnevalt lisanduvad replikatsioonikompleksi teised rakulised faktorid. *In vitro* on SV40 replikatsiooni käivitamiseks vajalikud ning piisavad kümme raku poolt kodeeritud replikatsioonifaktorit: proliferereervate rakkude tuuma antigeen (PCNA), RPA, replikatsioonifaktor C (RFC), DNA ligaas I, RNAaas H, DNA topoisomeraasid I ning II (Topo I ja TopoII), polümeraas  $\alpha$ -primaas (Pol  $\alpha$ ), polümeraas  $\delta$  (Pol  $\delta$ ) ning 5'->3' eksonukleas (Waga *et al.*, 1994).

Esmalt tuuakse mõlemale lahtisulatatud DNA ahelale primaas, mis on seondunud Pol  $\alpha$ -ga. Primaas sünteesib lühikesed praimerid, millelt Pol  $\alpha$  alustab mõlemas suunas tütar-DNA ahelate sünteesi. Replikatsioonifaktor C on vajalik Pol  $\alpha$  aktiivsuse stimuleerimiseks.

Seejärel vahetatakse välja DNA-d replitseeriv polümeraas. PCNA seondub kasvava DNA ahela 3' otsale ning vahetab Pol  $\alpha$  välja Pol  $\delta$  vastu. PCNA moodustab ümber DNA trimeerse rõngakujulise struktuuri ning tõstab Pol  $\delta$  protsessiivsust nii, et edasine süntees juhtahelalt toimub tõrgeteta. DNA süntees "kõrval"-ahelalt toimub Pol  $\alpha$  ning RFC abil.

Topoisomeraas I on vajalik uue DNA sünteesi käigus tekkivate torsionaalsete pingete vähendamiseks. Topoisomeraas II aitab sünteesitud tütarahelatel üksteisest eralduda. Kolm ülejäänut vajalikku rakulist faktorit – 5'->3' eksonukleas, RNAaas H ning DNA-ligaas on vajalikud kovalentselt seotud DNA molekulide moodustumiseks.

Hiljuti ilmunud artiklites on seatud kahtluse alla SV40 replikatsiooni traditsiooniline mudel, kus DNA mõlemale ahelale laaditud heksameersed SV40 helikaasi kompleksid liiguvad mööda DNA-d eri suundades. Uued andmed näitavad, et LTag heksameerid keeravad kaheaahelalist DNA-d lahti üksteisest vabanemata (Alexandrov *et al.*, 2002) (Joonis 6).



**Joonis 6. SV40 kaksikheksameerne helikaas replikatsiooni initsiatsioonil.** Joonise **A** osal on näidatud replikatsiooni initsiatsioonil osaleva superkompleksi moodustumise viimane etapp. Nooltega on tähistatud neli E1BS. Joonise **B** osal on nooltega tähistatud DNA liikumise suund töötavas helikaasis (Stenlund 2003, järgi).

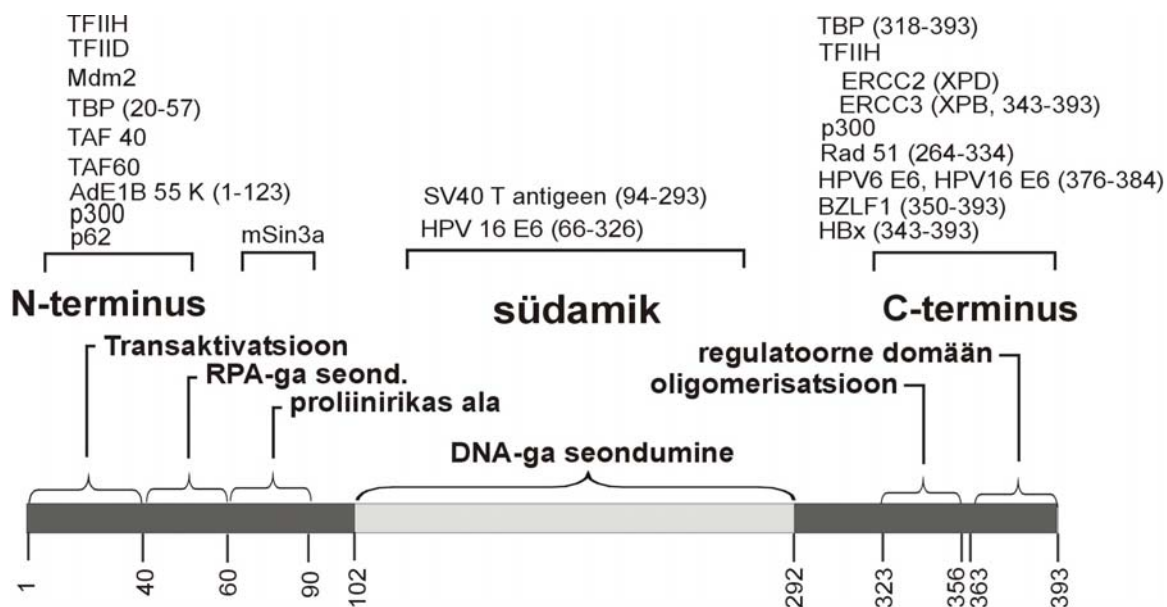
Ahelate lahtisulandumine toimub ainult üheaahelalist DNA-d siduva RPA juuresolekul, mis viitab sellele, et RPA võib olla DNA lahtikeeramises aktiivne osaleja. RPA interakteerub spetsiifiliselt ka BPV-1 E1 valguga (Loo and Melendy, 2004). Moodustunud kahest helikaasi subühikust koosnev kompleks jääb replikatsiooni edenedes üksteisega seotuks ning mitte helikaas ei liigu mööda DNA-d vaid vastupidi – DNA-d ”pumbatakse” läbi kaksikheksameeri (Smelkova and Borowiec, 1997), (Alexandrov *et al.*, 2002).



## Tuumorsupressorvalk p53

### p53 struktuur

Tuumorsupressorvalk p53 on järjestusspetsiifiliselt DNA-le seonduv rakuline regulaatorvalk, molekulmassiga 53 kDa (Kern *et al.*, 1991). Ta koosneb 393-st aminohappejäägist ning jaguneb viieks kõrgelt konserveerunud funktsionaalseks domeeniks: 1) N-terminaalne transaktiivatsiooni domeen (ah 1-40); 2) proliinirikas ala (ah 60-90); tsentraalne DNA-ga seondumise domeen (ah 102-292); 4) oligomerisatsioonidomeen (ah 323-356) ja 5) C-terminaalne regulatoorne domeen (ah 363-393) (Joonis 7).



**Joonis 7. Tuumorsupressorvalgu p53 skeem.** Joonisel on esitletud ka temaga seonduvad valgud. Numbrid tähistavad aminohappeid (Lepik 2000, järgi).

p53 N-terminaalsele transaktiivatsioonidomeenile seonduvad mitmed transkriptsioonifaktorid, kaasa-arvatud tema negatiivne regulaatorvalk mdm2.

Proliinirikkas alas paiknevad fosforüleeritavad aminohappejäägid on märklauaks oletatavatele SH3 ala sisaldavatele regulaatorvalkudele, mis mõjutavad p53-sõltuvat transkriptsiooni aktivatsiooni ning apoptoosi. Samuti seondub sinna mSin3a (Venot *et al.*, 1998).

p53 tsentraalne domeen vastutab valgu spetsiifilise seondumise eest kaheaheelise DNA-ga, mis on vajalik paljude p53 seondumisjärjestust sisaldavate geenide transkriptsiooni aktiveerimiseks. See domeen on kasvajates sageli muteerunud. Teatud “kuumad kohad” DBD struktuuris ehk aminohapped, mille mutatsioon põhjustab valgu permanentse inaktivatsiooni, on muteeritud eriti sagedasti (Hollstein *et al.*, 1991). Üks sellistest on 248 positsioonis asetsev arginiin, mis seondub DNA väikesesse vaku. Selle muteerimine kaotab p53 võime seonduda DNA-le.

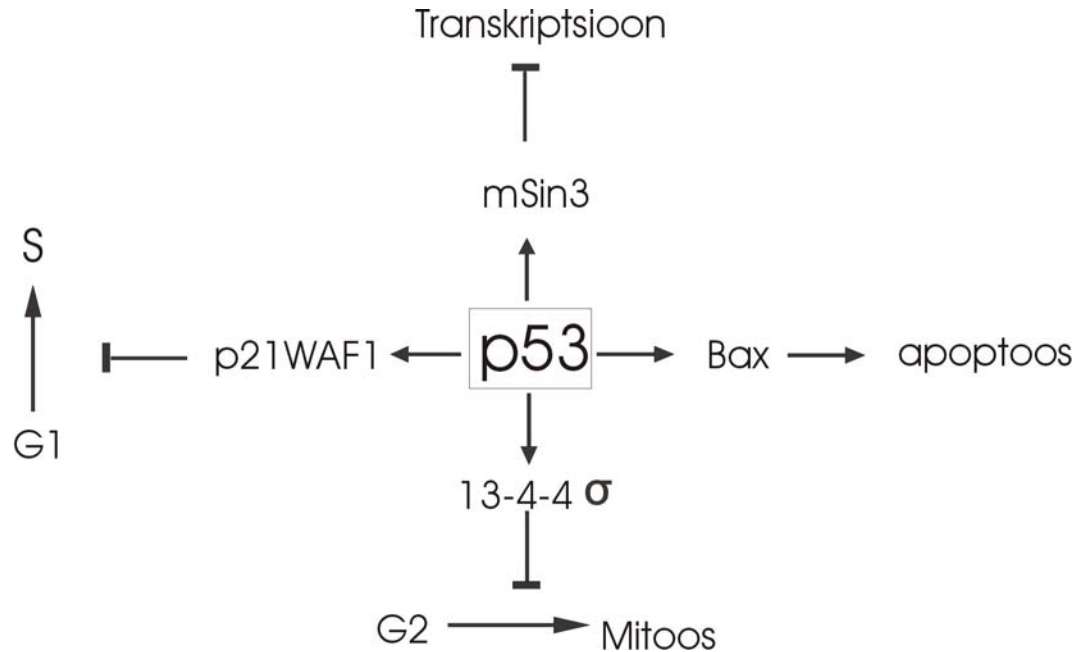
Valgu C-terminaalses osas paiknev oligomerisatsioonidomeen on vajalik valgu di- ning tetrameeride moodustumiseks. Kuigi ka monomeersel vormil on säilinud osa aktiivsusest on see võrreldes korrektse valguga oma funktsiooni täitmisel defektne.

C-terminaalne regulatoorne domeen moduleerib p53 seondumist DNA-le. Normaalses rakus ei ole p53 võimeline DNA-le seonduma ning tema aktiveerimiseks on vajalik modifitseerimine. Modifikatsioonideks võivad olla fosforüleerimine, atsetüleerimine ja glükosüleerimine. Fosforüleeritakse ka paljusid N-terminaalses osas paiknevaid aminohappeid (Meek, 1999). p53 C-terminaalne osa on võimeline ära tundma ning siduma kahjustatud DNA-d, sealhulgas üheaheelalist DNA-d.

### **p53 funktsioon**

p53 on üks tähtsamatest raku elutegevust reguleerivatest valkudest, mis osaleb vastuses mitmesugustele stressifaktoritele ja vastutab genoomi vigadeta ülekandumise eest tütarakkudesse.

p53 aktiveerivad nii DNA kahjustused, ultraviolettkiirgus, viirused, onkogeensed signaalid ja paljud teised faktorid. Valk võib mõjutada raku elu ning surma läbi erinevate mehhanismide (Joonis 8).



**Joonis 8. p53 valk "genoomi valvurina".** Joonisel on toodud mõned näited mehhanismidest, läbi mille p53 raku mõjutab. Lähemalt loe tekstist.

Enamasti peatatakse rakutsükkel G1/G2 faasis kuni DNA kahjustused on kõrvaldatud või suunatakse rakk apoptoosi. Leitud on rohkem kui 100 geeni, mille transkriptsiooni on aktiveeritud p53 võimeline mõjutama, kuid peab märkima, et erinevate geenide aktivatsioon/repressioon sõltub p53 kontsentratsioonist (Kristjuhan and Maimets, 1995). p53 tase normaalses rakus on äärmiselt madal, kuna valk degradeeritakse peale ekspressiooni kiiresti proteosoomis. Mitmesuguste stressifaktorite toimel toimub aga läbi post-translatsiooniliste modifikatsioonide valgu kiire stabiliseerumine. Võtmefaktor p53 lagundamisel on tema negatiivne regulaator protoonkogeen mdm2 mis seondub p53-le ning põhjustab selle ubikvitinüleerimise ja kiire lagundamise proteosoomis (Haupt *et al.*, 1997).

p53 aktiivsust kontrollitakse ka tema rakusisese lokaliseerimise kaudu – mehhanism, mida p53 inaktiveerimiseks kasutavad nii kasvajakud kui ka viirused (Jimenez *et al.*, 1999). Lokaliseerimine on kontrollitud mdm2 valguga ning p53 tuumalokaliseerimissignaali poolt (Momand *et al.*, 2000).

Üks olulisemaid p53 poolt aktiveeritud geenidest on p21WAF1, mille ekspressioon põhjustab tsükliin-sõltuvate kinaaside (CDK) inhibitsiooni. p21WAF1 takistab CDK-del fosforüleerimast tsükliini, sealhulgas retinoblastoomi valku (RB), mis on aga vajalik rakutsükli üleminekuks G1 faasi. Hüpo-fosforüleerituna moodustab RB kompleksi transkriptsioonifaktor E2F-ga ning RB valguga seondunult ei suuda E2F aktiveerida transkriptsiooni. Peale p21WAF1 inhibeeriva mõju lõppemist fosforüleerivad CDK-d retinoblastoomi valgu, mis vabastab E2F transkriptsioonifaktori. Vabanenud E2F on taas võimeline transkriptsiooni aktiveerima.

p21WAF1 transkriptsiooni aktiveerimine võib põhjustada rakutsükli peatumist ka üleminekul G2 faasist mitoosifaasi. Lisaks p21WAF1-le on kirjeldatud veel palju teisi p53 poolt aktiveeritavaid faktoreid, mis blokeerivad rakutsükli üleminekut mitoosi (N: 14-3-3 $\sigma$ , p53R2).

p53 võib suunata rakud apoptoosi. Esimene p53 poolt aktiveeritud apoptoosi põhjutav faktor, mis identifitseeriti oli Bax (Miyashita *et al.*, 1994). Hiljem on avastatud veel mitmeid teisi sarnase funktsiooniga p53 poolt reguleeritavaid gene. Bax antagonist on antiapoptootiline valk Bcl-2. Normaalses rakkudes lokaliseerub Bax tsütoplasmas, kuid peale p53 aktiveerimist lokaliseerub Bax mitokondri välismembraani ja oligomeriseerub. See põhjustab tsütokroom c ning AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) vabanemise mitokondrist, mis viib rakud apoptoosi (Eskes *et al.*, 2000).

p53 võib transkriptsiooni represserida. Prolinirikas domeen seondub rakulise korepressoriga mSin3a, mis toob p53 poolt represseritava geeni(de) lähedusse histooni deatsetülaasi I, mis muudab märklaudgeeni transkriptsioonifaktoritele raskemini ligipääsetavaks (Murphy *et al.*, 1999).

## p53 valg DNA replikatsiooni regulatsioonil

Lisaks rakutsükli ning apoptoosiga seotud märklaudgeenidele võib p53 stimuleerida transkriptsiooni geenidelt, mis kodeerivad replikatsiooni ning reparatsiooni mõjutavaid valke. Üks näide on ülalkäsitatud tsükliin-sõltuvate kinaaside inhibiitor p21WAF1, mis peatab rakutsükli ning seondub otseselt replikatsioonis osaleva valguga PCNA (Cayrol and Ducommun, 1998).

Peale p53 efekti erinevate geenide transkriptsioonis viitavad mitmed faktid ka sellele, et p53 võib olla rakkudes aktiivne transkriptsiooniliselt aktiveerumata. Näiteks, mõned p53 mutandid, mis on kaotanud võime aktiveerida transkriptsiooni on osaliselt säilitanud võime peatada rakutsükkel (Notterman *et al.*, 1998). Samas on teada vastupidiseid näiteid, kus transkriptsiooniliselt aktiivne p53 mutant ei suuda rakutsükli peatada (Munsch *et al.*, 2000).

Hiljutises töös näitas Jaks koos kaastöötajatega (Jaks *et al.*, 2001), et peale rakkude töötlemist DNA-d kahjustava aine kamptotetsiiniga oli G1 faasis rakutsükli peatamiseks vajalik mitte niivõrd p21WAF1 transaktivatsioon, kui just p53 akumulatsioon rakkudes. See osutab sellele, et p53 võib mõjutada rakku, kasutades transkriptsioonist sõltumatut mehhanismi. p53 interakteerub otseselt ka rakuliste helikaasidega (Blander *et al.*, 1999). Veel on C-terminaalselt kärbitud p53 võimeline blokeerima DNA replikatsiooni *Xenopus laevis*'e munarakkude lüsaadis, süsteemis, kus puudub transkriptsioon (Cox *et al.*, 1995).

On teada, et p53 blokeerib eukarüootse DNA replikatsiooni mudelsüsteemina kasutatava SV40 viiruse replikatsiooni, seondudes ainukese viiruse replikatsiooniks vajaliku valguga LTag-ga ning selle helikaasiga aktiivsust inhibeerides. Ka on näidatud, et p53 transporditakse nii HSV (*Herpes Simplex Virus*) (Wilcock and Lane, 1991) kui ka CMV (*Cytomegalovirus*) (Fortunato and Spector, 1998) viirustega nakatunud rakkude replikatsioonitsentritesse.

p53 on võimeline interakteeruma paljude rakuliste valkudega, mis mõjutavad DNA topoloogiat nagu helikaasid (läbi C-terminuse) (Blander *et al.*, 1999), topoisomeraasid (Gobert *et al.*, 1999) ning kromatiini remodelleeriv faktor SWI/SNF (Lee *et al.*, 2002). Ilmunud on ka üks hiljutine töö, kus leiti, et topoisomeraas I põhjustatud lõikeid mitmesuguste DNA kahjustuste naabruses parandatakse p53 poolt stimuleeritud rekombinatsioonilaadse protsessi abil (Stephan *et al.*, 2002).

p53 surub alla ka papilloomiviiruste amplifikatsioonilist replikatsiooni *in vivo* (Lepik *et al.*, 1998). Seejuures on blokeerimiseks vajalikud valgu RPA-sidumis-, proliinirikas-, DNA-sidumis- ja oligomerisatsioonidomeenid. Samad autorid näitasid, et p53 on võimeline samadel tingimustel ja samade domeenide abil alla suruma polüoomiviiruse *in vivo* replikatsiooni, kuid ei suuda inhibeerida rangelt üks kord rakutsükli toimuvat EBV (*Epstein-Barr Virus*) oriP sõltuvat replikatsiooni (Lepik and Ustav, 2000).

Võimalik, et p53 mõjutab replikatsiooni läbi E2 valgu, sest HPV-16 puhul on *in vitro* süsteemis näidatud p53 ning E2 valgu vaheline interaktsioon (Massimi *et al.*, 1999). p53 seondub ka üheaheelalist DNA-d siduva RPA valguga ning inhibeerib selle normaalse funktsioneerimise (Dutta *et al.*, 1993). Ka BPV-1 E1 valk seondub spetsiifiliselt RPA-ga, seega on võimalik, et p53 kasutab viiruse DNA replikatsiooni allasurumiseks just RPA-st sõltuvat mehhanismi (Loo and Melendy, 2004). Samas peab arvestama, et RPA-ga seondunult ei suuda p53 spetsiifiliselt seonduda DNA-ga (Miller *et al.*, 1995).

Hiljuti ilmunud töös näidati veelkord, et p53-l on negatiivne efekt vaid viiruse amplifikatsioonilisele replikatsioonile ning stabiilselt rakkudes säiluva BPV-1 URR reporterplasmidi replikatsiooni p53 ei mõjuta (Ilves *et al.*, 2003).

BPV-1 *in vitro* replikatsioonisüsteemis inhibeerib papilloomiviiruse replikatsiooni bakterist puhastatud p53 valk, millel puuduvad N-terminaalne transaktivatsioonidomeen ja C-terminaalne reguleeriv domeen. Kuid erinevalt *in vivo* süsteemist, omab *in vitro* viiruse replikatsioonile negatiivset efekti ka mutant, millel on lisaks deleteeritud RPA-ga seondumise domeen (Kadaja, avaldamata andmed).

On näidatud, et putuka rakkudest Sf-9 puhastatud p53 inhibeerib *in vitro* polüoomiviiruse replikatsiooni hiire FM3A rakuekstraktides, sealjuures on replikatsiooni blokeerimine sõltuv p53 võimest seonduda DNA-le (Miller *et al.*, 1995). Teises samas laboris tehtud töös leiti, et mutantne p53 valk, millel puudub N-terminaalne osa, kuid on olemas tsentraalne DBD ning C-terminaalne regulatoorne domeen, surub hiire FM3A rakkudest puhastatud ekstraktidega käivitatud polüoomiviiruste *in vitro* replikatsiooni samuti tugevalt alla (Zhou and Prives, 2003).

# Eksperimentaalne osa

## Töö eesmärk

Tuumorsupressorvalk p53 talitleb peamiselt kui transkriptsioonifaktor. "Genoomi valvurina" funktsioneerides, suudab ta veel lisaks interakteeruda vahetult DNA replikatsioonikompleksi komponentidega ning on võimeline mõjutama nende aktiivsusi. On tõestatud, et p53 suudab inhibeerida DNA replikatsiooni mitmete viiruste replikatsiooni *origin*'idelt. Kui SV40 puhul näidati p53 võimet inhibeerida viiruselise replikatsioonivalgu helikaasset aktiivsust, siis papilloomiviiruste puhul on replikatsiooni inhibitsioonimehhanism jäänud selgusetuks.

Käesoleva töö üldisemaks eesmärgiks on kirjeldada p53 mõju BPV-1 replikatsioonile *in vitro*, kasutades selleks BPV-1 *in vitro* replikatsioonisüsteemi ning BPV-1 replikatsioonivalgu E1 aktiivsusi kirjeldavaid biokeemilisi meetodeid. Selleks plaaniti:

- 1) puhastada BPV-1 *in vitro* DNA replikatsioonisüsteemi komponendid: BPV-1 helikaas E1 ning FM3A rakuekstrakt
- 2) puhastada bakteriaalselt ekspresseeritud p53 valgu mutandid, mis minimaalsete erinevuste juures omaksid DNA replikatsioonilei *in vivo* erinevat efekti.
- 3) uurida puhastatud p53 mutantide efekti BPV-1 *in vitro* replikatsioonile
- 4) uurida p53 valgu efekti viiruselise replikatsioonivalgu E1 DNA sidumisvõimele



## Materjalid ja metoodika

### Bakteritüved

Plasmiidide paljundamiseks kasutati *E. coli* tüve *DH5 $\alpha$*  (*supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ *M15*) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*). Valku ekspresseeriti *E. coli* tüves BL21(DE3) CodonPlus RIL (B F<sup>-</sup> *ompT* *hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal*  $\lambda$ (DE3) *endA* Hte [*argU* *ileY* *leuW* Cam<sup>r</sup>]), (*Stratagene*), milles on *lac* promootori alt ekspresseeritav T7 RNA polümeraasi geen ja arginiini, isoleutsiini ja leutsiini tRNAsid kodeerivad geenid (koodonid AGA, AGG, CUA). Sarnane rakutüvi BL21(DE3) CodonPlus RP (*Stratagene*) (B F<sup>-</sup> *ompT* *hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal*  $\lambda$ (DE3) *endA* Hte [*argU* *proL* Cam<sup>r</sup>]) erineb eelmisest selle poolest, et ta sisaldab arginiini ja proliini tRNA (koodonid AGA, AGG, CCC) geene. Ekspressiooni optimeerimise katsetes kasutati ka *E. coli* BL21 (DE3) pLysS [F<sup>-</sup> *ompT* *hsdS*<sub>B</sub> [r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>] *gal* *dcm* (Cm<sup>R</sup>) bakteritüve; (*Novagen*). Baktereid kasvatati LB, SOB või 2xYT söötmetes. Transformantide selekteerimiseks lisati söötmele ampitsilliini lõppkontsentratsioonini 100  $\mu$ g/ml. Kompetentsete rakkude valmistamisel kasutati SOB söödet, millele lisati MgCl<sub>2</sub> lõppkontsentratsioonini 20 mM.

### Vektorid

Eksperimentides on kasutatud järgmisi konstrukte. BPV-1 E1 valgu ekspresseerimiseks kasutati vektorit pET11c-GST-E1 (Melendy, et al., 1995). Mutantseid p53 vorme ekspresseeriti pET11c-GST-N39C362 ning pET11c-GST-N39C362Trp248 plasmiididelt (Kadaja, 2002). *In vitro* replikatsioonis kasutati E1 matriitsina BPV-1 minimaalset *origin*'i sisaldvat pUC7914-27 vektorit (Ustav *et al.*, 1991).

## **Rakukultuurid**

Töös kasutati rakuekstrakti valmistamiseks hiire rinnanäärme kartsinoomi rakuliini FM3A. Rakke kasvatati IMDM söötmes, kuhu oli lisatud penitsilliini 100 U/ml, streptomütsiini 0.1mg/ml ning 5% veise loote seerum. Rakke kasvatati 37°C juures *spinner*kultuuris.

## **Rakuekstrakti valmistamine**

Rakuekstrakt valmistati 1 liitris IMDM söötmes kasvanud FM3A rakkudest, mis olid saavutanud tiheduse ~0.5 miljonit rakku/ml söötmes. Rakud koguti tsentrifuugides 4°C juures 15' 1500 rpm *Eppendorf 5810 R* tsentrifuugis ning pesti seejärel kaks korda 1/20 mahu jääkülma PBS-ga. Seejärel hinnati rakusademe ruumala ning rakud suspendeeriti 5 x ruumalas hüpotoonilises puhvrts [20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF] ja tsentrifuugiti 1000 rpm 10'. Aspireeriti supernatant, resuspendeeriti rakud algse rakusademe ruumala 3 x mahu hüpotoonilise puhvriga ning hoiti 10' jääl. Järgnevalt kanti rakud eelnevalt jahutatud homogenisaatorisse ning lüüsi 20-30 löögiga. Rakkude lüüsumise jälgimiseks värviti 10 µl lüsaati trüpaansinise (lüüsunud rakkude tuumad värvuvad siniseks) ning vajadusel korrati homogeniseerimist, hoiti 30' jääl ning tsentrifuugiti eelnevalt jahutatud SS-34 rootoriga 60 sekundit. Kogu tsentrifuugimiseks kulunud aeg jäi alla kolme minuti. Sadestatud rakutuumadelt eemaldati tsütosooliekstrakt, millele lisati 5M NaCl lõppkontsentratsioonini 100 mM. Lahust tsentrifuugiti tund aega ultratsentrifuugis *Sorvall Sw-55* rootoriga 4°C juures 45000 rpm. Eraldatud supernatanti dialüüsi kaks korda 90' S-100 dialüüsi puhvrts [20 mM HEPES- KOH pH 7.5, 10 mM NaCl, 1mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF], villiti laiali, külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati -70°C juures.

### **Valkude ekspressiooni optimeerimine**

Leidmaks sobivamaid ekspressioonitingimusi, indutseeriti valgusüntees kõigepealt väikeses mahus (10ml). Ekspressiooniks efektiivseima IPTG kontsentratsiooni, temperatuuri ning induksiooniaja leidmiseks analüüsiti kultuuri erinevatel ajapunktidel. Hindamaks ekspressioonitaset ning valgu seondumist glutatioon-sefarooskandjatele (GS- kandjad) inkubeeriti rakulüsaati koos 20 µl GS -kandjatega pool tundi segajal. Kandjad sadestati tsentrifuugimisega ning pesti kaks korda 25 x mahu puhver B-ga (varieerides NaCl või detergendisaldust). Kandjatelt eemaldati täielikult pesupuhver, lisati 20 µl 2 x SDS foreesipuhvrit ja kuumutati 100°C juures 10'. Valgud detekteeriti *Western blot* meetodil või värvides geeli *Coomassie brilliant blue R250* värviga.

### **BPV-1 E1 ning p53 mutantide ekspresseerimine**

Suuremahuliseks E1 ja p53 puhastamiseks ekspresseeriti valke BL21(DE3) RP bakteritüves, neljas kuni kaheksas liitris 2xYT söötmes. Kompetentseid BL21(DE3)RP rakke transformeeriti ekspressioonikonstruktiga ning plaaditi tassile. Värske kolooniaga inokuleeriti 200 ml 2xYT söödelt, kuhu oli lisatud ampitsilliini 200µg/ml ning kasvatati 37°C juures kuni optilise tiheduseni  $OD_{600} = 0.6-1$ . Eelkultuuriga inokuleeriti neli liitrit 2xYT söödelt ning tihedusel  $OD_{600} = 0.6 - 0.8$  indutseeriti valgusüntees 0.5 mM IPTG-ga. Rakke indutseeriti 10-12 tundi 21°C juures ning seejärel jahutati kultuur jääl. Rakususpensiooni tsentrifuugiti GS-3 rootoriga 4°C juures 10' 6000 rpm, suspendeeriti pesulahuses [20 mM Tris pH 8.0. 200 mM NaCl] ja tsentrifuugiti veelkord 10' 6000 rpm. Saadud bakterimass resuspendeeriti 30 ml puhvril B [50 mM Tris-HCl pH 8.0 4°C juures, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glütserool, 5 mM DTT, 1 mM PMSF], külmutati vähemalt 30' vedelas lämmastikus ning säilitati -70°C juures.

## BPV-1 E1 valgu puhastamine

Külmutatud rakususpensioon sulatati jääl ning lisati mitteioonset detergenti NP-40 lõppkontsentratsioonini 0.1%. Suspensioon jagati 8 ml kaupa 15 ml-sse Falconi topsidesse ning sonikeeriti jääl, neli korda 10 sekundit 40% tsükliga, 0.7 kordse võimsusega, kasutades CP300 sonikaatorit (*Cole-Parmer Instruments Co.*). Lüsati tsentrifuugiti 10' 12000 rpm Sorvall SS-34 rootoris 4°C juures. Supernatant eraldati rakumembraanidest ning lahustumatutest komponentidest ning lisati NaCl lõppkontsentratsioonini 1M ning DNA sadestamiseks 0.5%-ni polüetüleenamiini. Lahust hoiti 20' *end-over-end* segajal ning tsentrifuugiti SS-34 rootoril 4°C juures 12000 rpm 10'. Valkude sadestamiseks lisati 80% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ning tsentrifuugiti lahust 45' 25000g. Supernatant eemaldati ning valgusade lahustati 30 ml-s puhver B-s. Seejärel lisati lahusele 2 ml eelnevalt puhver B-ga pestud glutatioon-sefarooskandjaid ning inkubeeriti 4°C juures kaks tundi segajal. Kandjad sadestati *Eppendorf 5810 R* tsentrifuugis, 5' 1000 rpm ning eemaldati supernatant. Vabanemaks mittespetsiifiliselt seondunud bakteriaalsetest valkudest, pesti kandjaid kaks korda 10 kordse kandjate mahu puhver B-ga (0.2 M NaCl), seejärel kaks korda 10 kordse mahu 1 M NaCl sisaldava puhver B-ga ning veelkord kaks korda 10 kordse mahu puhver B-ga. Arvestades, et järgmises töö etapis tuleb trombiini (*Amersham Pharmacia Biotech*) abil liitvalgust eemaldada GST märgis, ei lisatud eluatsiooni- ega pesupuhvritesse proteaasi inhibiitorit PMSF-i. Kandjatelt valgu elueerimiseks kasutati 40 mM redutseeritud glutatiooni, mis oli lahustatud puhver B-s ning eri fraktsioonide valgusisalduse kontrollimiseks 1xBradfordi reagenti (Biorad), võrreldes värvusreaktsiooni intensiivsust kindla kontsentratsiooniga markervalgu veise seerumi albumiin (BSA) standardiga. Piikfraktsioonile lisati CaCl<sub>2</sub> lõppkontsentratsioonini 2.5 mM ning GST märgise eemaldamiseks inkubeeriti liitvalku 80 ühiku (U) trombiiniga 2 tundi jääl. Trombiinilõikus peatati 1 mM PMSF-i lisamisega ning vabanemaks väljasadenenud valgust tsentrifuugiti lahust 10' 13000 rpm *ependorfi* lauafuugiga. Supernatant lahustati 20 x ruumalas puhvis S [50 mM fosfaatpuhver pH 7.1 1 mM EDTA, 10 % glütserool, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF]. Valgulahus pakiti 2 ml-le S-kandjatele, mis olid eelnevalt pestud ja tasakaalustatud S – puhvriga ning valgud elueeriti kasutades astmelist, 50 mM sammuga NaCl gradienti (150 mM – 500 mM). E1 valku sisaldavad piikfraktsioonid lahjendati 6-kordses ruumalas Q-puhvis [25

mM Tris-HCl pH 8.8, 1 mM EDTA, 10% glütserool, 90 mM NaCl, 5 mM DTT 1 mM PMSF] ning pakiti 0.4 ml-le Q- kandjatele. Kolonni pesti 2 ml puhver Q-ga, mis sisaldas 200 mM NaCl-i ja valk elueeriti kandjatelt 2 ml 0.5 M NaCl-i sisaldava puhver Q-ga. Eluaat fraktsioneeriti 2 tilga haaval, piikfraktsioonid villiti laiali ning külmutati vedelas lämmastikus.

### **p53 mutantide puhastamine**

p53 valkude puhastamise esimene etapp järgib kuni liitvalgu GS-kandjatelt elueerimiseni täielikult E1 valgu puhastamise protokoll. Valgud elueeriti GS-kandjatelt 40 mM redutseeritud glutatiooniga, piikfraktsioonid koguti kokku ja GST märgis lõigati trombiiniga GST-p53 liitvalgult lahti. Lõikus kestis 15 tundi 4°C juures, kasutati 20-40 U trombiini. Trombiin inaktiveeriti 1 mM PMSF-ga, valgulahust tsentrifugeeriti 10' 13000 rpm *eppendorf* i lauatsentrifuugis ja lahjendati 10 x ruumalal puhvriga Q. Seejärel pakiti valgud 2 ml Q- kandjatele ning elueeriti Q- puhvriga [25 mM Tris-HCl pH 8.8, 1 mM EDTA, 10% glütserool, 90 mM NaCl, 5mM DTT, 1 mM PMSF] kasutades astmelist, 50 mM sammuga NaCl gradienti (150 mM – 500 mM). Piikfraktsioonides olevat p53 (43kDa) dialüüsiti 200 kordse ruumalaga dialüüsilahuses [20 mM Tris.HCl pH 8.0 4°C, 20% w/vol sahharoos, 10% glütserool, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF] 5-6 tundi. Peale dialüüsi villiti valgulahus laiali ning külmutati vedelas lämmastikus.

### **Bradfordi test**

Määramaks totaalset valgu kontsentratsiooni lahuses lisati 100 µl 1xBradfordi reagentidele 5-20 µl uuritavat valgulahust ning võrreldi värvusreaktsiooni intensiivsust kindla kontsentratsiooniga BSA-ga. Valgu kontsentratsiooni täpsemaks hindamiseks mõõdeti 585 nm juures erinevate BSA kontsentratsioonidega Bradfordi lahuse optiline tihedus (OD) ning seejärel analüüsitava valgu lahjendused. Kasutades saadud OD näite

joonestati programmiga Exel BSA kontsentratsiooni kõver ning arutati selle järgi totaalse valgu kontsentratsioon uuritavas lahuses.

### ***Western blot***

Valgud denatureeriti 2 x SDS puhvril [0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 20% glütserool, 4 % SDS, 200mM DTT, broomfenoolsinine], kuumutades 10' 100°C. Seejärel lahutati valgud 10% SDS-poliüakrüülamiidgeelis (SDS-PAAG) 1 x SDS puhvril [0.125 M Tris, 0.96 M glütsiin, 0.5% SDS]. Valkude ülekande geelist eelnevalt metanooliga märgatud PVDF filtrile toimus 30-60 minuti jooksul konstantsel pingel 15V, kasutades Bio-Rad Trans-blot® SD SEMI-DRY Transfer Cell aparati. Filtrile kantud valgud blokeeriti 1 tund toatemperatuuril või 4°C juures üleöö 5% w/vol lõssilahuses [PBS, 0.1 % Tween-20]. Primaarse antikehana p53 ekspressiooni detekteerimiseks kasutati p53 DBD domeeni vastast antikeha 240. BPV-1 E1 valgu detekteerimiseks antikeha nr.1 lahjendusega 1:1000. Filtrit loksutati toatemperatuuril tund aega antikeha lahuses [240 antikeha lõppkontsentratsioon 0.7 µg/ml, 2% lõssipulber w/vol, PBS, 0.1 % Tween-20] ning pesti 1 x 15' ning 3 x 5' pesulahuses [50 mM Tris -HCl pH 7.5, 30 mM NaCl, 0.1 % Tween-20]. Sekundaarse antikehana kasutati kas aluselise fosfataasi või peroksüdaasiga konjugeeritud IgG (lahjendused vastavalt 1: 5000 ning 1: 10000), inkubeeriti filtrit tund aega 2 % w/vol lõssilahuses antikeha juuresolekul ning pesti seejärel 1 x 15' ning 4 x 5' pesulahusega. Lisati 10 ml aluselise fosfataasi puhvrit kuhu oli lisatud 66 µl NBT ja 33 µl BCIP. Filtrit inkubeeriti kuni valgutriipude nähtavaks muutumiseni ja reaktsioon peatati loputades filtrit 20 mM EDTAd sisaldavas PBS [NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g/l, pH 7,4] puhvril. Vesinikperoksüdaasiga konjugeeritud antikeha signaali detekteeriti ECL™ lahustega (*Amersham Pharmacia Biotech*), järgides tootjapoolset protokollit.

### ***In vitro* replikatsiooni katse**

*In vitro* replikatsioonis kasutati matriits-DNA-na pUC7914-27 plasmidi. Reaktsioonimaht oli 25 µl ning replikatsioonisegu koosnes järgmistest komponentidest: 40 mM HEPES-KOH pH 8.0; 3 mM ATP; 0.2 mM CTP, GTP, UTP; 0.1 mM dATP, dGTP, dTTP; 25 µM dCTP; 2µCi α[32P]dCTP [10mCi/ml, ~3000 Ci/mmol, *Amersham Pharmacia Biotech*], 40 mM kreatiinfosfaat (Serva); 8 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.5 mM DTT; 12 µl FM3A rakekstrakti. Replikatsioonisegu inkubeeriti 37°C juures tund aega, reaktsioon peatati 65°C 30' jooksul stopplahusega [1% SDS, 200 mM NaCl, 20 mM EDTA, porteiinaas K lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml]. Järgnevalt eraldati fenool-kloroform töötlusega vesifaasis olevad nukleiinhapped proteolüütiliselt lõigatud valke sisaldavast fenoolifaasist ning DNA sadestati 350 µl 96% etanooliga, kuhu oli lisatud 0.45 M ammoniumatsetaat ning glükogeeni lõppkontsentratsiooniga 1%. Sadet pesti 180 µl 70% etanooliga ning lahustati seejärel 20 µl TE puhvris [10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA], millele oli lisatud RNAaas A lõppkontsentratsiooniga 20 µg/ml. Lahust inkubeeriti 30' 37°C ning DNA lahutati järgnevalt 0.8% agarosgeelis TAE puhvris. Geel kuivatati ning replikatsioonisignaali mõõdeti ja kvantiteeriti kasutades *Phosphoimager*'i ning tarkvara ImageQuANT.

### **Oligote kineerimine ning puhastamine**

Oligo märgiti 20 µl-s reaktsioonisegus, kus oli 10 pmooli oligot, 2 µl T4 kinaasipuhvrit A, 10 U T4 kinaasi, 5 µl γ[<sup>32</sup>P] ATP-d. Reaktsioon kestis 37°C juures 90', peatati 50 mM EDTA lisamisega kuumutades lahust 65°C juures 20'.

Kineeritud pUC18 universaalsed praimerid sadestati 6 µl küllastatud NH<sub>4</sub>OAc, 2 µl dekstraani ja 100 µl 96% etanooliga. Sadestatud oligoid pesti 180 µl 70% etanooliga ja lahustati 20 µl TE puhvris. Seejärel amplifitseeriti PCR (polümeraasi ahelreaktsioon) meetodil pUC7914-27 plasmidis asuv BPV-1 replikatsiooni minimaalne *origin*. Amplifitseeritud fragmendi puhastamiseks voolutati seda 10% PAAG-il 0.5 x TBE

puhvril, mähiti geel kilesse ning eksponeeriti 5' *Phosphoimager*'i plaadile. Korrektse pikkusega DNA fragment lõigati geelist välja ning purustati, lisati 200 µl STE puhvrit [100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0. 0.1 mM EDTA] külmutati –20°C juures 20' ning hoiti tund aega 30°C termostaadis. Eraldati supernatant ning tseentrifuugiti ultratsentrifuugis Sorvall Sw-55 rootoriga 30000 rpm 30'. Saadud substraadi kontsentratsioon oli 5-10 fmol/µl.

CON oligo, mis sisaldas p53 DNA-le seondumise konsensusjärjestust (5' GAT CCG GAC ATG CCC GGG CAT GTC CGG ATC 3' ) hübridiseerimiseks lisati peale kineerimisreaktsiooni lõppu 50 µl 2x hübridisatsioonipuhvrit [100 mM NaCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 7.5]. Segu kuumutati 100°C juures 5' ning jahutati aeglaselt termostaadis. Oligo sadestati 1/25 mahu 5M NaCl ja 2 mahu 96% etanooliga ning lahustati 20 µl TE (10 mM Tris/1 mM EDTA) puhvril.

#### **Elektroforeetilise liikumise muutumise katse (*band shift*).**

*Shift*'i katse toimus 10 µl mahus ning koosnes järgmistest reaktsioonikomponentidest: 5 x Laiminsi puhver [50 mM Tris pH 7.5, 500 mM KCl, 50 mM DTT, 15% glütserool, BSA 1mg/ml], NaCl lõppkontsentratsioonini 100 mM, 2 ng/ul pUC18 plasmidi, 0.7 µg/µl BSA, kineeritud fragmenti lisati 5 fmol reaktsiooni kohta. Valgud seondati minimaalse *origin*'i fragmendiga inkubeerides lahust 20' toatemperatuuril. Seejärel seoti DNA-ga kompleksis olevad valgud toatemperatuuril 20' jooksul omavahel 0.02% glutaaraldehüüdiga. Glutaaraldehüüd inaktiveeriti stopplahusega (40 mM Tris pH 7.5, 1x DNA laadimisvärvi). Kompleksid lahutati 1.2% TAE-agaroosgeelis, geel kuivatati ning signaal detekteeriti *Phosphoimager*'i kasutades.

#### **Valk- Valk komplekside ristsidumine glutaaraldehüüdiga**

N39C362 ning N39C362Trp248 komplekside moodustumise jälgimiseks inkubeeriti valke 15' toatemperatuuril puhver B-s (millele oli lisatud 1 mM PMSF ning 5 mM DTT) ning seejärel lisati glutaaraldehüüdi lõppkontsentratsioonini 10%, 3%, 0.1%



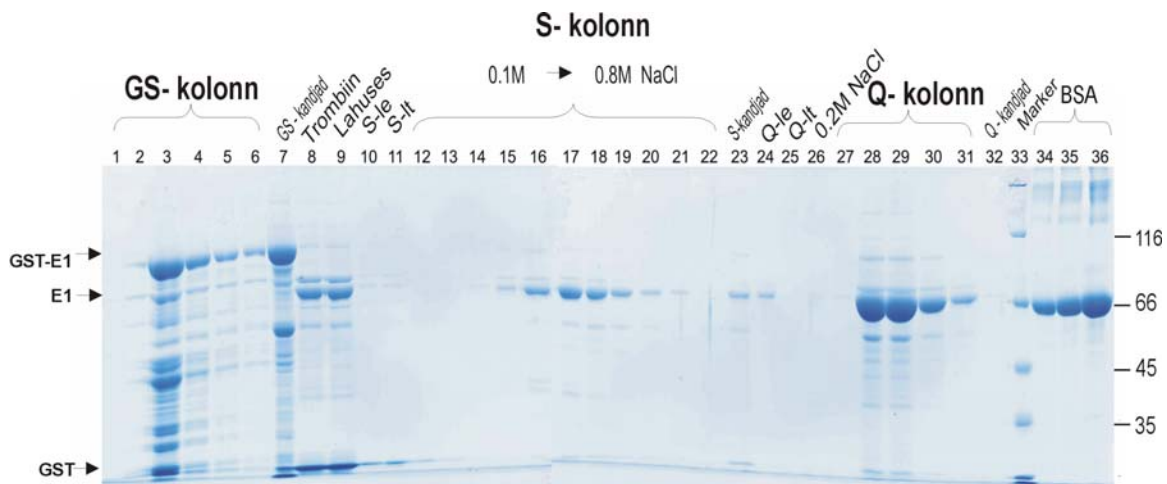
ning 0.03%. Valkude denatureerimiseks lisati 2 x SDS foosesipuhvrit ning kuumutati 100°C juures 10'. Kompleksid lahutati denatureerivates tingimustes 10% SDS-PAAG-s ning detekteeriti *Western blot* meetodil.

Standartsete molekulaarbioloogia meetodite kirjeldused vt. (Sambrook, 1989).

## Tulemused

### BPV-1 E1 valgu ekspressioon ja puhastamine

BPV-1 E1 valku ekspresseeriti pET11c plasmiidilt GST-E1 liitvalguna bakteritüves *E.coli* BL21 RP. Ekspressiooni- ning puhastamistingimuste aluseks võeti varem kirjeldatud protokollid (vt. materjal ja meetoodika) (Sedman, 1997 #91). E1 valgu puhastamisel seoti E1-GST liitvalk esmalt 1ml glutatioon-sefarooskandjatega, elueeriti 40 mM redutseeritud glutatiooni lahusega (Joonis 9, rajad 1-6). E1 valgust eraldati GST märgis trombiini töötlusega. Kuna liiga pikk trombiinilõikus põhjustab E1 valgu lahusest väljasadenemise, siis oli vajalik trombiinitöötlus väga täpselt optimeerida. Antud töös eemaldati märgis 2 tunni jooksul 80 ühiku trombiiniga (Joonis 9, rada 8). Valgu edasiseks puhastamiseks seoti 20 kordses S-puhvril (vt. materjal ja meetoodika) (Joonis 9, rada 10) lahjendatud valk S-sefarooskandjatele ning elueeriti NaCl gradiendis (Joonis 9, rajad 12-22). Piikfraktsioonid, mis elueerusid alates 350 mM NaCl juuresolekul (Joonis 9, rajad 16-18) lahjendati 6 korda puhvriga Q (vt. materjal ja meetoodika) ning pakiti 0.4 ml Q-sefarooskandjatele, pesti 200 mM NaCl-ga ning elueeriti seejärel 2 ml 500 mM NaCl-ga (Joonis 2, rajad 27-31). Valgu puhtusastmeks hinnati foreesil ligikaudu 90 % (Joonis 2, rada 29). *Western blot* meetodil kinnitati, et puhastatud valk on tõepoolest BPV-1 E1 Valgu totaalset kontsentratsiooni hinnati Bradfordin meetodil (vt. materjal ja meetoodika). Antud puhastamisel õnnestus valk puhastada kontsentratsiooniga 1 µg/µl.

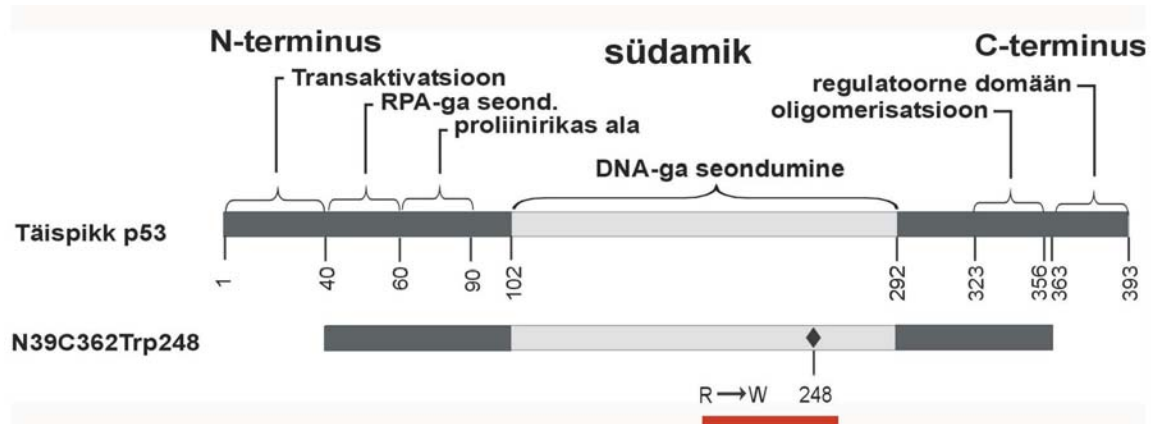


**Joonis 9.** Bakteriaalselt ekspresseeritud BPV-1 E1 valgu puhastamine ning analüüs SDS-PAAG-s, mis värviti *Coomassie Blue* värviga. Geelile on kantud igast fraktsioonist 10 µl. Rajad 1-6: GST-E1 valgu eluatsioon 0.5 ml fraktsioonidena GS-kandjatele 40 mM redutseeritud glutatiooni lahusega. Geelile on kantud iga kolmas fraktsioon; 7: GS-kandjad peale elueerimist; 8: E1-GST lahus peale 2h trombiiniga lõikust; 9: Trombiiniga töödeldud E1 valgu lahus peale lahuse tsentrifuugimist *ependorfi* lauafuugiga täispöoretel  $10^3$ ; 10: S-sefarooskolonnile kantud E1 valgu lahus, mis on lahjendatud S-puhvriga 20 korda; 11: S-sefarooskandjatele mittekinnitunud valgulahus; 12–22: NaCl gradiendis valgu elueerimine S-sefarooskandjatele 0.5 ml fraktsioonidena. Geelile on kantud iga kolmas fraktsioon; 23: S-sefarooskandjad peale elueerimist; 24: Q-sefarooskolonnile kantud S-sefarooskolonnilt elueeritud piikfraktsioonid, mis on lahjendatud 6 korda Q-puhvriga; 25: Q-sefarooskandjatele mittekinnitunud valgulahus; 26: Q-sefarooskolonni pesu 0.2 M NaCl lahusega; rajad 27 –31: Q-sefarooskandjatele E1 valgu elueerimine 0.1 ml fraktsioonidena. Geelile on kantud iga kolmas fraktsioon; 32: valgu suurusmarker; 33-35: BSA 2.5, 5 ja 10 µg.

### p53 valkude ekspressioon

p53 valgu mõju uurimiseks BPV-1 replikatsioonile *in vitro* valiti mutandid N39C362 ning N39C362Trp248. N39C362 on minimaalne p53 valgu deletsioonmutant, mis suudab efektiivselt inhibeerida BPV-1 *origin*'i sisaldava plasmidi replikatsiooni inimese rakkudes (Lepik *et al.*, 1998). N39C362Trp248 erineb N39C362 deletsioonmutandist vaid üheainsa aminohappejäägi poolest positsioonis 248. Mutatsioon p53 valgu 248 positsioonis muudab seal asuva arginiini trüptofaaniks ning seega kaotab N39C362Trp248 võime seonduda järjestusspetsiifiliselt DNA-ga. Selle tulemusena ei ole

p53 valgu mutant N39C362Trp248 enam võimeline inhibeerima BPV-11 *origin*'i sisaldava plasmidi replikatsiooni inimese rakkudes (Joonis 10) (Lepik, *et al.*, 1998).



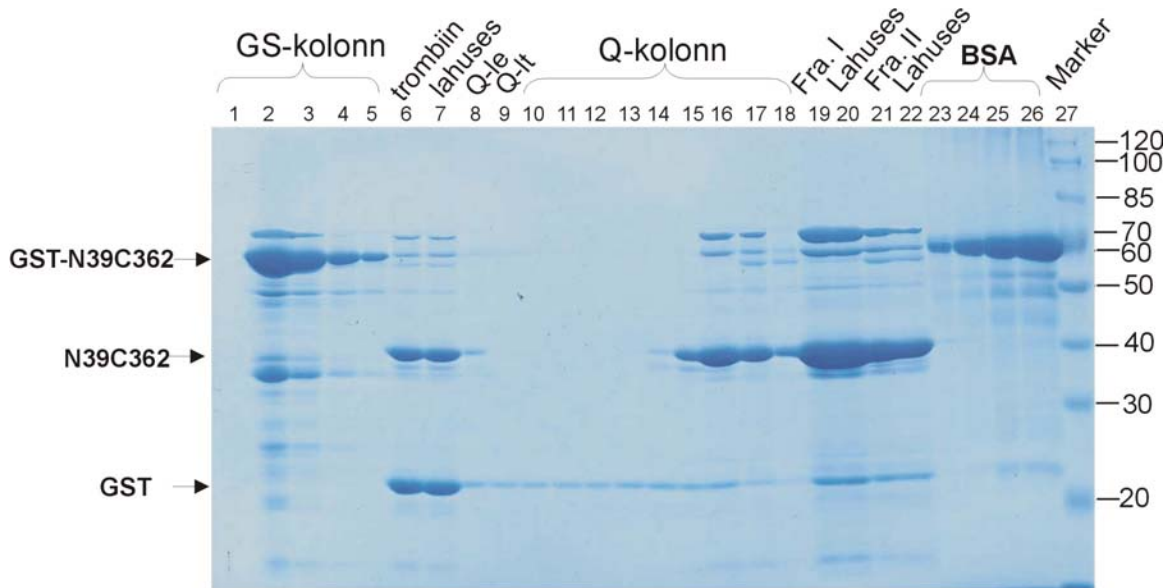
**Joonis 10. Täispika p53 ning trankeeritud N39C362Trp248 struktuur.** N39C362Trp248-l on deleteeritud N-terminuses asuv transaktivatsiooni- ning C-terminuses paiknev Reguleeriv domeen. Lisaks on 248 positsioonis asendatud arginiin (R) trüptofaaniga (W), mis rikub ära mutandi võime seonduda DNA-le (Lepik 2000, järgi).

GST-p53 valku ekspresseeriti pET11c plasmiidilt bakteritüves *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus RP. Enne suuremahulist p53 valkude puhastamist tehti kindlaks p53 ekspressiooni optimaalsed tingimused. GST-p53 liitvalgu süntees pET11c vektoritel indutseeriti bakterikultuuri erinevatel tihedustel, temperatuuridel, IPTG kontsentratsioonidel. Eelkatsetes prooviti valke ekspresseerida ka *E. coli* tüvedes BL21 (DE3) pLysS ning BL21(DE3) CodonPlus RIL (vt. materjal ja meetodika). GST-p53 liitvalgu ekspressiooni analüüsiti erinevatel ajapunktidel *Western blot* meetodil ning värvides SDS-PAAG geeli *Coomassie blue* värviga. p53 valkude N39C362 ning N39C362Trp248 ekspressioon saavutas maksimumi 10-12 tunni jooksul. Rakkude indutseerimiseks osutus optimaalseks 0.5 mM kontsentratsiooniga IPTG, kui kultuur oli saavutanud tiheduse  $OD_{600} = 0.6$ . Sobivaimaks ekspressioonitemperatuuriks oli 21°C (andmed ei ole esitatud).

### **p53 mutandi N39C362 puhastamine**

Kumbki puhastatud p53 valgust ei olnud võimeline seonduma S-kandjatega (esitamata andmed), seepärast puhastati valgud läbi glutatioon- ning Q-sefarooskolonni. Tulemused olid võrreldes E1 valgu puhastamisega tagasihoidlikumad, kuna ei

õnnestunud vabaneda ~75 kDa suurusest bakteriaalsest valgust, mis seondus koos p53-ga nii GS- kui Q-sefarooskandjatele, samuti ei seostunud see valk S-sefarooskandjatele. Optimeerimist vajav etapp puhastamisel oli eluatsioon glutatioon-sefarooskandjalt. Järgides tootjapoolset (*Amersham Pharmacia Biotech*) protokollit kasutati esmalt 10 mM redutseeritud glutatiooni kontsentratsiooniga eluatsioonipuhvrit, kuid sellistel tingimustel jäi kandjatele seondunuks ligi pool kandjatel seostunud liitvalgust (esitamata andmed). Eluatsiooniefektiivsuse suurendamiseks lisati eluatsioonipuhvrise 1% mitteioonset Triton-X-100 detergenti (*Sigma*) ning prooviti eluatsiooni erinevatel pH-del, kuid erilise eduta. Vähendades eluatsioonikiirust kiiruselt 0.4 ml/minutis kiiruseni 0.1 m/minutis ja tõstes redutseeritud glutatiooni kontsentratsiooni 40 mM-ni saavutati valkude efektiivsem kandjalt vabanemine (esitamata andmed).



**Joonis 11. N39C362 puhastamine ning analüüs SDS-PAAG-il, mis värviti *Coomassie Blue* värviga.** Geelile on kantud igast fraktsioonist 5 µl. Rajad 1-5: GST-p53 valgu eluatsioon 0.5 ml fraktsioonidena GS-kandjalt 40 mM redutseeritud glutatiooni lahusega. Geelile on kantud iga kolmas fraktsioon; 6: GST-p53 lahus peale 15 h trombiiniga lõikust; 7: Trombiiniga töödeldud GST-p53 valgu lahus peale lahuse tsentrifugimist *eppendorfi* lauafuugiga täispöoretel 10'; 8: Q-sefarooskandjatele kantud GST-p53 valgu lahus, mis on lahjendatud Q-puhvriga kümme korda; 9: Q-sefarooskandjatele mittekinnitunud valgulahus; 10-18: NaCl gradiendis valgu elueerimine Q-sefarooskandjalt 0.5 ml fraktsioonidena. Geelile on kantud iga kolmas fraktsioon; 19: piikfraktsioonid 19-22 Q kolonnilt, peale valgulahuse kuuetunnist dialüüsimist; 20: fraktsioonid 19-22 peale valgulahuse tsentrifugimist *eppendorfi* lauafuugiga täispöoretel 10'; 21: piikfraktsioonid 23-25 Q kolonnilt, peale valgulahuse kuuetunnist dialüüsimist; 22: fraktsioonid 23-25 peale valgulahuse tsentrifugimist *eppendorfi* lauafuugiga täispöoretel 10'; rajad 23-26: BSA 1, 2, 4, 8 µg; 27: valgu suurusmarker.

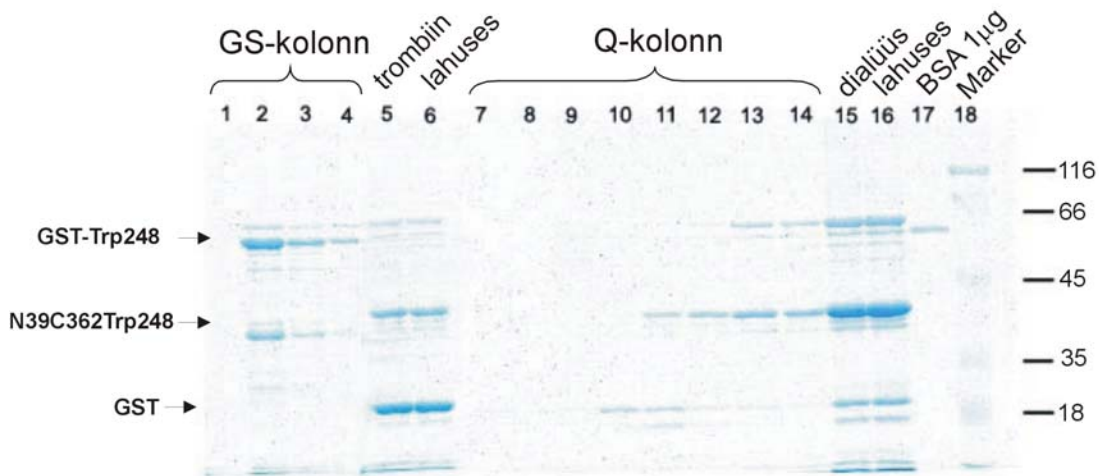
Valgu puhastamisel kasutatud kromatograafiameetoditele eelnevalt sadestati valgulüsaadist DNA polüetüleenimiiniga (täpsemalt peatükis materjal ja meetodika). Sellele järges GS-affiinsuskromatograafia, mille käigus elueeriti GST-N39C362 liitvalk GS-sefarooskolonnilt 40mM redutseeritud glutatiooni lahusega (Joonis 11, rajad 1-5). GST märgise eemaldamiseks trombiinilõikusega kasutati olenevalt piikfraktsioonides oleva valgu hulgast 20-40 U trombiini (Joonis 11, rada 6). Kirjandusest on teada, et GST märgis on abiks valkude puhastamisel kui tegemist on raskestilahustuva valguga, ning selle eemaldamine võib edasist natiivset puhastamist mõjutada, kuid trombiiniga GST märgiselt eemaldatud p53 püsib erinevalt E1 valgust stabiilselt lahuses ka peale 15 tunni pikkust lõikust (Joonis 11, rada 7). Kuigi lõikus kestis tavaliselt 15 tundi, jäi osa liitvalgust siiski alati lõikamata vormi. Lisaks lõikamata liitvalgule jäi lahusesse ka teatud hulk GST märgist ning kontamineerivat ~75 kDa bakteriaalset valku. Seejärel lahjendati valku kümme korda puhvriga Q (vt. materjal ja meetodika)(Joonis 11, rada 8) ning pakiti 1 ml eelnevalt Q puhvriga tasakaalustatud Q-sefarooskandjatele. Enamus kolonnile kantud valgust kinnitus Q-sefarooskandjatele (Joonis 11, rada 9). Peale kolonni pesemist Q puhvriga elueeriti valk NaCl gradiendis (Joonis 11, rajad 10-18). Q-sefarooskandjalt elueerunud valgu piikfraktsioon jagati kaheks – fraktsioonid 19-22 (Fra.I) ja 23-25 (Fra.II) ning dialüüsiti seejärel kuus tundi dialüüsipuhvril (vt. materjal ja meetodika), et vabaneda üleliigsest NaCl-st ning suurendada valgu kontsentratsiooni. Peale valgulahuse kuuetunnist dialüüsimist võeti mõlemast dialüüsikotist proovid (Joonis 11, rada 19, Fra. I; rada 21 Fra II). Seejärel tsentrifuugiti mõlemat valgulahust *ependorfi* lauafuugiga täispöoretel 10'. Kummastki fraktsioonist ei sadenenud N39N362 valk dialüüsi jooksul lahusest välja (Joonis 11, rada 20. Fra. I; rada 22 Fra II). Valgu puhtusastmeks foreesil hinnati ligikaudu 80% ning Bradfordi meetodiga mõõdetud totaalse valgu kontsentratsiooniks fraktsioonides 19-22 (Fra.I) ja 23-25 (Fra.II) vastavalt 0.9 ja 2.7 µg/µl.

### **N39C362Trp248 puhastamine**

N39C362Trp248 valku puhastati sama protokolliga järgi, mida kasutati ka N39C362 puhastamiseks. Kuigi valk ekspresseerus ligikaudu kaks korda paremini kui N39C362 mutant, jäi suur osa N39C362Trp248-st lahustumatusse fraktsiooni (andmed on

esitamata). Selle tagajärjel seonud glutatioon-sefarooskandjatele ka vähem rekombinantset GST-N39C362Trp248 liitvalku. Lisaks madalale lõppkontsentratsioonile kontamineeris p53 mutandi lahust veel tundmatu ~75 kDa bakteriaalne valk, millest N39C362Trp248 valgu puhastamise käigus vabaneda ei õnnestunud.

Joonisel 12 on SDS-PAAG-il analüüsitud erinevatest N39C362Trp248 puhastamisetappidest võetud proove. Esmalt elueeriti GST-p53 liitvalk 40 mM redutseeritud glutatiooniga (Joonis 12, rajad 1-4). Elueerunud valgulahus koguti 0.5 ml fraktsioonidena ning foreesile kanti proov igast kolmandast fraktsioonist. Piikfraktsioonile lisati 20-40 U trombiini ning 15 tunni jooksul lõigati liitvalgu küljest lahti GST märgis (Joonis 12, rada 5). Peale lahuse tsentrifugimist 10' jooksul *ependorfi* lauatsentrifuugis (Joonis 12, rada 6) lahjendati valgulahust 10 mahu puhviga Q ning pakiti kolonnile (vt. materjalid ja meetodika). Seondunud N39C362Trp248 elueeriti kolonnilt NaCl gradiendiga (Joonis 12, rajad 7-14). Valgusisaldust elueerunud lahuses kontrolliti Bradfordini meetodiga ning piikfraktsioone (19-23) dialüüsi kuus tundi dialüüsipuhvrts (Joonis 12, rada 15). Peale dialüüsi lõppemist tsentrifugiti lahust 10', et vabaneda väljasadenenud valgust (Joonis 12, rada 16). Valgu kontsentratsiooni hindamiseks kanti foreesile ka 1µg BSA-d (Joonis 12, rada 17). Bradfordini meetodiga mõõdeti valgu totaalseks kontsentratsiooniks 0.8 µg/µl.

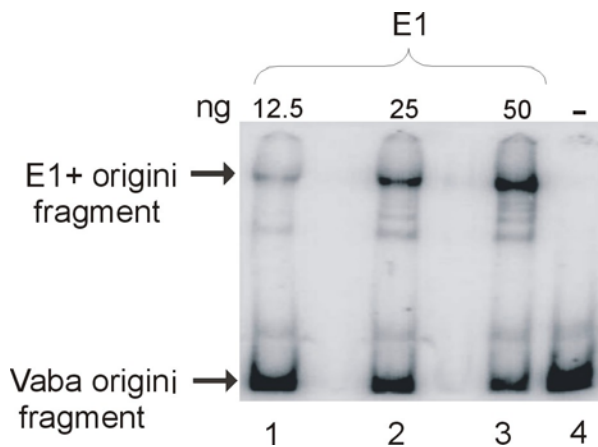


**Joonis 12. N39C362Trp248 puhastamine ning analüüs SDS-akrüülamiidgeelis, mis värviti**

**Coomassie Blue värviga.** Geelile on kantud igast fraktsioonist 10 µl. Rajad 1-4: GST-p53 valgu eluatsioon 0.5 ml fraktsioonidena GS-kandjatel 40 mM redutseeritud glutatiooni lahusega. Geelile on kantud iga kolmas fraktsioon; 5: GST-p53 lahus peale 15h trombiiniga lõikust; 6: Trombiiniga töödeldud GST-p53 valgu lahus peale lahuse tsentrifuugimist *ependorfi* lauafuugiga täispööretel 10'; 7-14: NaCl gradiendis valgu elueerimine Q- sefarooskandjatel 0.5 ml fraktsioonidena. Geelile on kantud iga kolmas fraktsioon; 15: piikfraktsioonid 19-23 Q kolonnilt, peale valgulahuse kuuetunnist dialüüsimist; 16: fraktsioonid 19-23 peale valgulahuse tsentrifuugimist *ependorfi* lauafuugiga täispööretel 10'; 17: BSA 1 µg; 18: valgu suurusmarker.

### Puhastatud valkude aktiivsuse kontroll

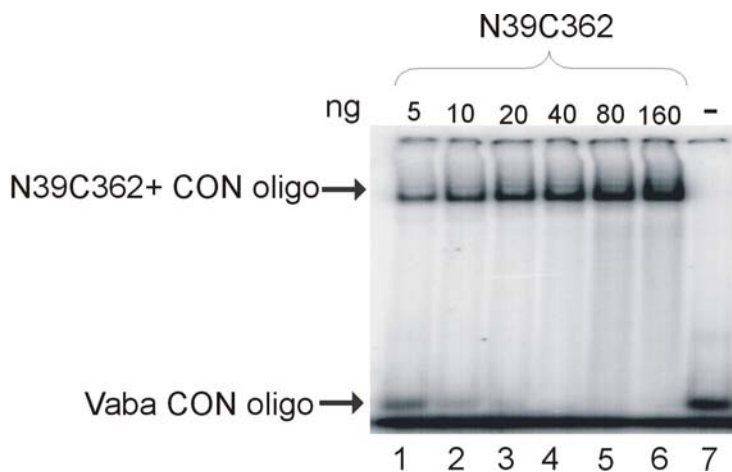
Järgnevalt tehti kindlaks, kas puhastatud valgud on funktsionaalsed. E1 valgu funktsionaalsuse kontrollimiseks amplifitseeriti kineeritud oligotega pUC7914-29 plasmiidilt BPV-1 *origin* regioon. ~200 bp pikkune DNA fragment puhastati ning seda kasutati E1 *shift assay*'s. Jooniselt 13 on näha radioaktiivselt märgitud *origin*'i liikuvuses nihet E1 valgu lisamisel (rajad 1, 2, 3). Seega puhastatud BPV-1 E1 valk seondus pUC7914-29 plasmiidilt amplifitseeritud BPV-1 *origin*'iga. Seega on antud valgul säilinud DNA sidumisfunktsioon ning ta on suure tõenäosusega võimeline ka funktsioneerima viiruselise helikaasina BPV-1 *in vitro* replikatsioonisüsteemis.



**Joonis 13. Puhastatud BPV-1 E1 valk on võimeline seonduma BPV-1 *origin* fragmendile.** Puhastatud N39C362 mutant omab järjestusspetsiifiliselt DNA-le seodumise võimet. *Origin*'i fragment kineeriti radioaktiivse fosforhappejäägiga <sup>32</sup>P. Märgitud fragmenti inkubeeriti toatemperatuuril 20' koos valgulahuse erinevate lahjendustega. Seejärel analüüsiti oligo liikuvust mittedenatureerival geelektroforeesil 6% akrüülamiidgeelis. Rada 1: lisatud on 12.5 ng E1 valku; rada 2, Lisatud on 25 ng E1 valku; rada 3, Lisatud on 50 ng E1 valku; rada 4, E1 valku ei lisatud reaktsioonisegusse.



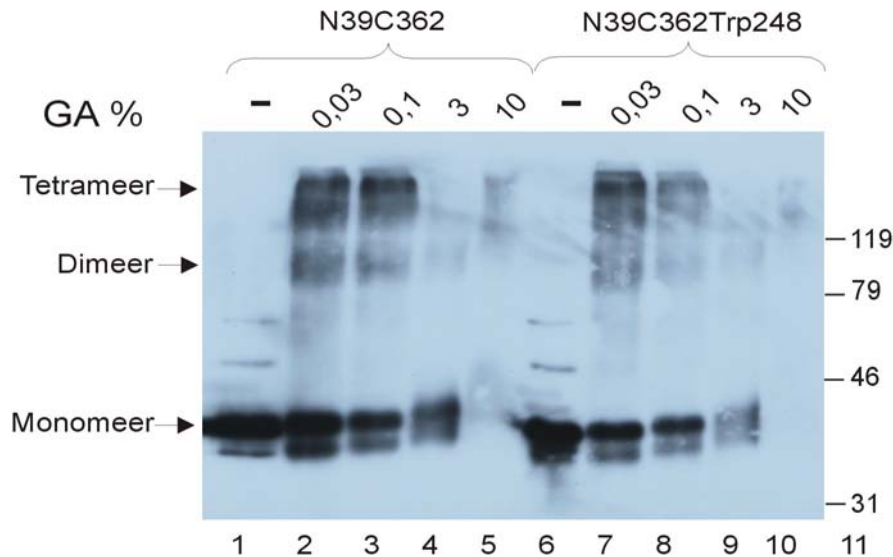
*Shift*'i katses püüti leida kinnitust ka sellele, et puhastatud N39C362 omab DNA-le seondumise võimet. Puhastatud N39C362 seob kineeritud CON oligot, mis sisaldab p53 seondumisjärjestust (vt. materjalid ja meetodika). Eksperimendi tulemused on näidatud joonisel 14. Radadelt 1-6 on näha CON oligo liikuvuse nihe akrüülamiidgeelis N39C362 valgu lisamisel. Seega võib järeldada, et N39C362 on säilinud DNA sidumisfunktsiooni ning omab arvatavasti ka funktsionaalset konformatsiooni.



**Joonis 14. N39C362 seondub CON oligole.** Rajad 1-6: *Shift*'i katsesse on lisatud N39C362 mutanti, valgu kontsentratsioon on näidatud joonisel; Rada 7: *Shift*'i katsesse ei lisatud N39C362. Joonisel on ära näidatud radioaktiivse oligoga kompleksis olev N39C362 ning valguga seondumata oligo.

DNA sidumise domeenis mutatsiooni sisaldava N39C362Trp248 mutandi funktsionaalsust *shift*'i katse abil kontrollida ei ole võimalik, sest valk ei suuda CON oligole seonduda. Kuna N39C362Trp248 valgul on oligomerisatsioonidomeen intaktne, siis otsutati, N39C362Trp248 aktiivsuse kinnitamiseks teostada glutaaraldehüüdiga ristsidumine. Glutaaraldehüüdil on võime kovalentselt seonduda kahe valgus oleva lüsiiniga ning takistada kõrgemat järku valgu struktuuride lagunemist denatureerivates tingimustes. See annab võimaluse vaadelda funktsionaalsete valk-valk interaktsioonide olemasolu ehk puhastatud p53 valkude võimet moodustada di- ja tetrameere. N39C362 ning N39C362Trp248 monomeeri molekulmass on ~43 kDa, dimeeri molekulmass seega

~86 kDa ning tetrameeril ~172 kDa. Eksperimendi tulemused on demonstreeritud joonisel 15.



**Joonis 15. N39C362Trp248 ning N39C362 oligomeeride moodustumine.** Valgud ristseoti glutaaraldehüüdiga ning detekteeriti *Western blot* meetodil ECL lahustega. Rajad 1-5: ristseotud on N39C362 valku; rajad 6-10: ristseotud on N39C362Trp248. Glutaaraldehüüdi (GA) lõppkontsentratsioon on näidatud joonisel. Nooltega on tähistatud mono-, di- ning tetrameerid. Rada 11: valgu suurusmarker

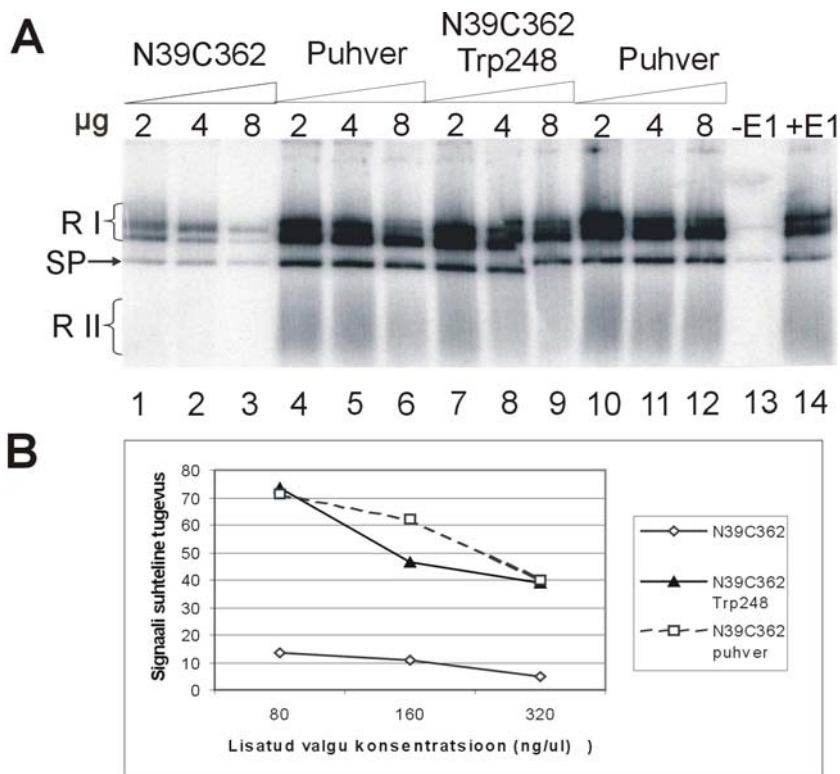
Joonis 15 radadel 1-5 paikneb N39C362 ning radadel 6-10 N39C362Trp248 valk. p53 mutandid ristseoti glutaaraldehüüdiga (vt. materjalid ja meetodika) kõigil radadel välja arvatud 1 ja 6. Seejärel kuumutati reaktsioonisegu 10 minutit ning lahutati SDS-akrüülamiidgeelis. Ristsidumata valgud (Joonis 15, rajad 1 ja 6) denatureerusid kuumutamisel täielikult, samas kui liiga kõrge glutaaraldehüüdi lõppkontsentratsiooni (3 ja 10%) kasutamine takistas p53 spetsiifilisel 240 antikehal valguga seondumist (Joonis 15, rajad 4-5 ja 9-10). Samas võib näha, et 0.1 ning 0.03% lõppkontsentratsiooniga glutaaraldehüüdi lisamisel moodustasid N39C362 (Joonis 15, rajad 2-3) ja N39C362Trp248 (Joonis 15, rajad 7-8) nii di- kui tetrameerseid komplekse. Seega omavad need valgud funktsionaalseid oligomerisatsioonidomeene ning on järelikult aktiivses konformatsioonis. Komplekside olemasolu detekteeriti *Western blot* meetodil. Oluline on märkida, et erinevate mutantide oligomerisatsioon toimus ühesugustel

tingimustel samaväärselt, mis annab võimaluse paralleelselt võrrelda nende valkude mõju BPV-1 replikatsioonile *in vitro*, kui kasutada võrdseid valkude kontsentratsioone.

### **N39C362Trp248 ning N39C362 valkude mõju DNA replikatsioonile BPV-1 *in vitro* replikatsioonisüsteemis**

Olles kinnitanud puhastatud p53 mutantide aktiivset konformatsiooni asuti uurima, kuidas mõjutab BPV-1 *in vitro* replikatsiooni efektiivsust valkude sissetiitrimine (Joonis 15). Negatiivse kontrollina kasutati puhvrit, milles p53 valku puhastamisel dialüüsiti. Samas peab arvestama, et dialüüsipuhver ei sisaldanud GST-d ega ka tundmatut 75 kDa bakteriaalset valku.

Joonisel 16A on võimalik näha, et kummagi p53 mutandi dialüüsimiseks kasutatud puhvri lisamisel (eelkõige aga selles oleval NaCl) *in vitro* replikatsiooni aktiivsus küll vähenes, aga mitte oluliselt. Võrrelda tuleb siin radasid 4-6 ning 10-12 rajaga 14, kus replikatsioonisegusse ei ole lisatud midagi peale replikatsioonisüsteemi komponentide. Samuti ei omanud replikatsioonile märkimisväärset mõju p53 mutandi N39C362Trp248 lisamine (Joonis 16A, rajad 7 –9). p53 mutant N39C362 inhibeerib *in vitro* replikatsiooni aga tunduvalt (Joonis 16A, rajad 1-3). Kuna radioaktiivsete nukleotiidide lülitumine sünteesitavasse DNA ahelasse on täielikult sõltuv E1 olemasolust replikatsioonisegusse (Joonis 16A, rada 13) võib kindlalt väita, et signaal ei ole põhjustatud raku reparatsioonisüsteemide tööst. Joonise 16 B osal on graafiliselt kujutatud p53 ning puhvri lisamisel tekkivat efekti *in vitro* replikatsioonile. Selgus, et 2 µg N39C362 valgu lisamine (Joonis 16A, rada 1) surus replikatsioonisignaali võrreldes rajaga 4, kus replikatsioonisegusse oli lisatud võrdne maht N39C362 dialüüsipuhvrit, rohkem kui 5 korda alla. Sama koguse N39C362Trp248 lisamine (joonis 16A, rada 7) vähendas replikatsioonisignaali võrreldes reaktsiooniga, kuhu oli lisatud võrdne maht N39C362Trp248 dialüüsipuhvrit, kõigest 20% (Joonis 16A, rada 10).

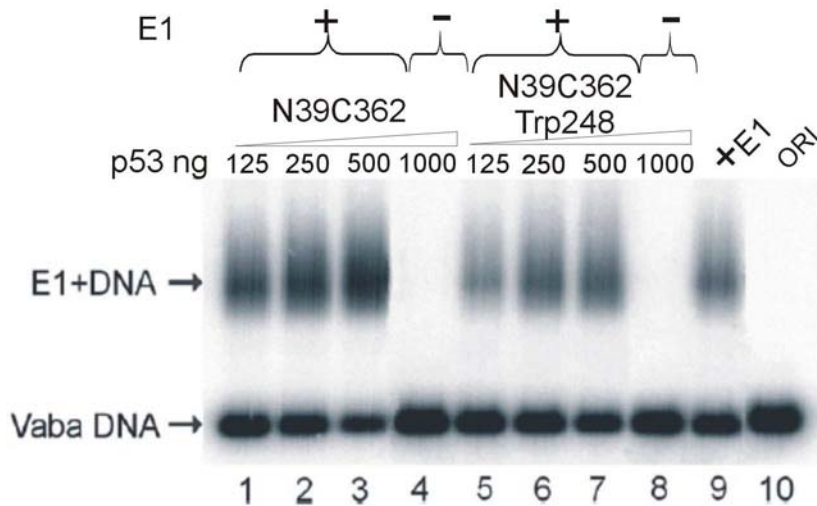


**Joonis 16. N39C362Trp248 ning N39C362 mõju BPV-1 *in vitro* replikatsioonile. A.** Replikatsioonisegusse lisatud p53 valkudekogused on Joonisel näidatud, dialüüsi puhvrit lisati kontrollidesse võrdses mahus. Kasutatud mittekommertsiaalsete reagentide kontsentratsioonid on: matriits DNA, 2 ng/μl; FM3A tsütoplasmaekstrakt, 0,5 μg/μl; E1 valku 4ng/μl. Rajad 1-3: N39C362; rajad 4-6: N39C362 puhver; rajad 7-9: N39C362 Trp248; rajad 10-12: N39C362 Trp248 puhver; rada 13: negatiivne kontroll; rada 14: positiivne kontroll. SP-superspiraliseerunud plasmiid, RI ja RII replikatsiooni vahevormid. **B.** Replikatsioonisignaali kvantiteeriti *Phosphorimager*'iga ning kokkuvõtlikud tulemused on esitatud graafikul.

### E1 kompleksi moodustumine N39C362 ja N39C362Trp248 juuresolekul

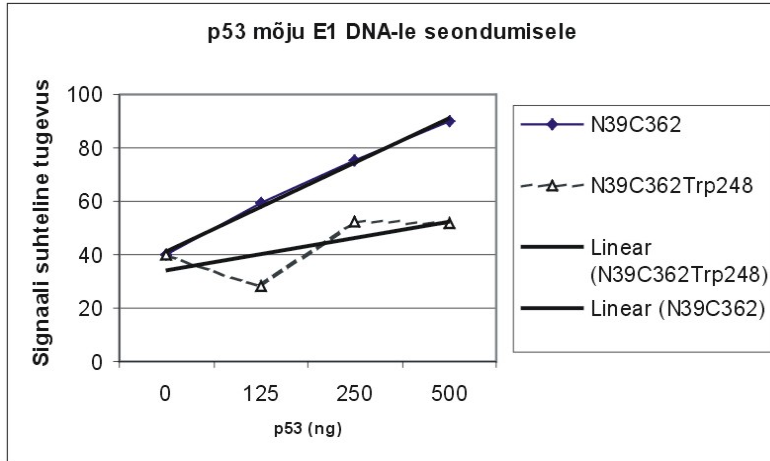
Järgnevalt vaadati, kas p53 lisamine mõjutab radioaktiivse *origin*'i fragmendiga seotud E1 valgu liikumist. Jooniselt 17 on näha, et N39C362 mutandi lisamisel suutis E1 *origin* fragmendiga efektiivsemalt seonduda (rajad 1-3) kui N39C362Trp248 lisamisel (joonis 17, rajad 5-7). Joonisel 17 olevaid radasid 1-3 ning 5-7 tuleb võrrelda positiivse kontrolliga rajaga 9, kus reaktsioonisegule on lisatud ainult E1 valk. Negatiivne kontroll (Joonis 17, rada 10), kus reaktsioonisegusse ei lisatud E1 valku, ei mõjutanud ka *origin*'i fragmendi liikumist. Samuti ei mõjutanud *origin*'i fragmendi liikuvust see, kui

reaktsioonisegusse lisati 1µg kumbagi p53 mutanti, kuid puudus *origin*'i fragmenti spetsiifiliselt äratundev E1 valk (Joonis 17, rada 4, lisatud on 1µg N39C362; rada 8, lisatud on 1µg N39C362). Samuti ei mõjutanud *origin*'i fragmendi liikumist reaktsioonisegusse ekvivalentse mahu dialüüsipuhvri lisamine (Joonis 17A, rada 10).



**Joonis 17. E1-DNA kompleksi moodustumine p53 juuresolekul.** *Shift*'i reaktsiooni tiitriti sisse p53 mutante N39C362 (rajad 1-4) ja N39C362Trp248 (rajad, 5-8), mille kogus on näidatud joonisel. Radadele 1-3, 5-7 ja 9 lisati 50 ng BPV-1 E1 valku. Rajal kümme asub negatiivne kontroll, kus reaktsioonisegust puudusid nii p53 kui ka E1 valk. Nooltega on näidatud DNA-ga kompleksis olev E1 valk ning vaba *origin*'i fragment.

Valguga seondunud *origin*'i fragmendi radioaktiivne signaal kvantiteeriti *Phosphorimager*'iga ning E1-DNA kompleksi moodustumise aktiivsuse muutus peale N39C362 ning N39C362Trp248 mutantide reaktsioonisegusse lisamist on graafiliselt toodud joonisel 18. Mõlemad mutantsed p53-d suurendavad E1 valgu DNA-le seondumise aktiivsust võrreldes reaktsiooniga, kuhu on lisatud vaid E1 valk. Siiski, N39C362 mutant, mis suudab spetsiifiliselt DNA-ga seonduda, stimuleerib E1-DNA kompleksi moodustumist võrreldes N39C362Trp248 valguga peaaegu kaks korda efektiivsemalt (Joonis 18).

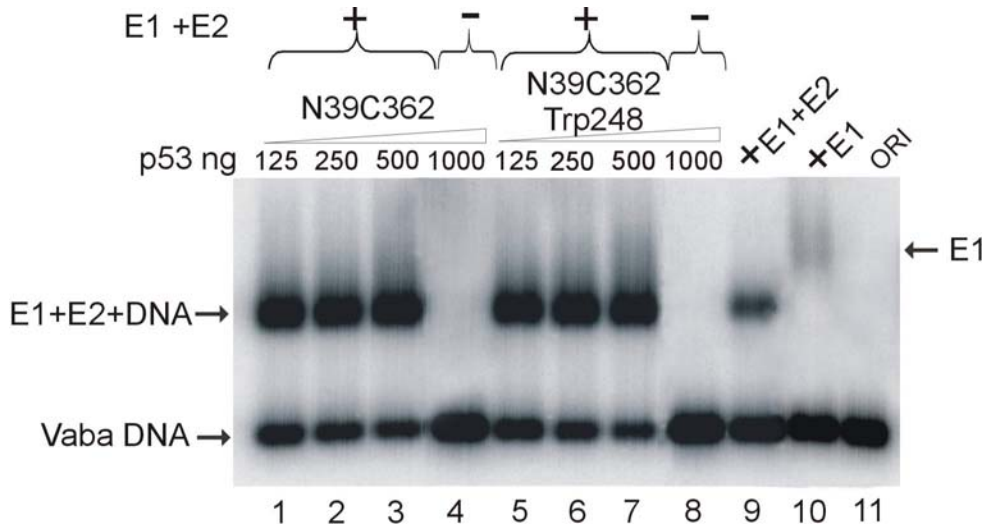


**Joonis 18. N39C362 ja N39C362Trp248 mõju E1 seondumisele *origin* fragmendile.** Andmed jooniselt 17 kvantiteeriti *Phosphoimager*'iga. Katkendliku joonega on kujutatud N39C362Trp248 ning sirgega N39C362 lisamisel BPV-1 E1 valguga seondunud *origin*'i signaali suhtelise aktiivsuse muutust. Lisatud p53 mutantide kogus on toodud joonisel.

### E1+E2 kompleksi moodustumine N39C362 ja N39C362Trp248 juuresolekul

E2 suurendab E1 võimet järjestuspetsiifiliselt DNA-le seonduda. Selles katses vaadati, kas p53 lisamisel shifti reaktsioonisegusse on mingisugust efekti, kui lisaks E1-le on shifti reaktsiooni lisatud ka E2 valku. Jooniselt 19 võib näha, et mõlema mutandi lisamine võimendab tugevalt E1-E2 kompleksi järjestuspetsiifilist DNA-le seondumist. Radadel 1-4 on sisse tiitritud N39C362 mutanti ning radadel 5-8 N39C362 mutanti. E1 valku lisati 25 ng ning E2 valku 10 ng. E1 ning E2 valgu puudumisel (Joonis 19, rajad 4 ja 8) ei omanud *origin* fragmeni liikuvusele mingisugust efekti ka p53 mutantide lisamine (rajale 4 on lisatud 1  $\mu$ g N39362 mutanti ning rajale 8 1  $\mu$ g N39C362Trp248 valku). Kui reaktsioonile lisati ainult E1 valku (Joonis 19 rada 10) *shift*'us oligo 3 korda halvemini kui E2 juuresolekul (võrrelda tuleb radasid 9, kus reaktsiooni on lisatud nii E1 kui ka E2 valk ning 10. kus on lisatud ainult E1 valku). Signaal radadel, kus E1-E2 valgule oli lisatud ka p53 mutante võimendus võrreldes positiivse kontrolliga rajal 9 enam kui 3 korda (positiivne kontroll asub rajaga 9, kus reaktsioonisegule on lisatud ainult E1 ning E2 valgud). Negatiivne kontroll (Joonis 19, rada 11), kus reaktsioonisegusse ei lisatud E1 ega E2 valku, ei mõjutanud ka *origin*'i fragmendi liikumist. Erinevalt E1 shifti katsest,

kus N39C362 lisamisel võimendus signaal kiiremini kui N39C362Trp248 lisamisel ei täheldatud selles eksperimendis sarnast efekti. Tõenäoliselt oli reaktsioon jõudnud platoole.



**Joonis 19. p53 mõju E1-E2-DNA kompleksi moodustumisele.** *Shift*'i reaktsiooni tiitriti p53 mutante N39C362 (rajad 1-4) ja N39C362Trp248 (rajad, 5-8). Radadele 1-3, 5-7 ning 9 on lisatud E1 ning E2 valku vastavalt 25 ning 10 ng. Rajal 10 on reaktsioonisegusse lisatud ainult E1 valku (25 ng). Rajal 11 asub negatiivne kontroll. Nooltega on näidatud origin'i fragmendiga kompleksis olevad valgud ning vaba DNA. ORI – *origin*'i fragment.

## Arutelu

Tuumorsupressorvalk p53 on olnud intensiivse uurimise objektiks nüüdseks juba üle kahekümne viie aasta, olles üheks võtmefiguuriks raku kaitses mitmesuguste väliste tegurite eest, nt. viirused jne. Peamiselt funktsioneerib ta transkriptsioonifaktorina aktiveerides või represserides mitmeid raku geene. Lisaks transkriptsiooni aktivatsioonile on p53 võimeline raku ellu sekkuma ka otseselt, läbi valk-valk või valk-DNA interaktsioonide (Lee, *et al.*, 2002), (Stephan, *et al.*, 2002).

On näidatud, et p53 on võimeline alla suruma nii inimese kui ka hamstri rakkudes toimuvat papilloomiviiruse replikonidel põhinevat replikatsiooni (Lepik *et al.*, 1998). Kuigi blokeerimise mehhanismi ei ole suudetud seletada, leiti, et selleks on vajalikud p53 valgu intaktset RPA-sidumis-, proliinirikas, DNA-sidumis- ning oligomerisatsioonidomeenid. Praeguseks on teada, et hiire rakkudes ei oma metsiktüüpi p53 valk ning ka p53 erinevad mutantsed vormid papilloomiviiruse replikatsioonile mingisugust efekti (Lepik and Ustav, 2000). Selle põhjused on jäänud ebaselgeks.

Käesoleva töö üldisemaks eesmärgiks oli kirjeldada p53 mõju BPV-1 replikatsioonile *in vitro* ning lisaks veel BPV-1 replikatsioonivalgu E1 aktiivustele. Selleks otsustati kasutada minimaalset osa p53-e valgust, mis on võimeline inhibeerima papilloomiviiruse replikatsiooni *in vivo*. Selleks on p53 valgu deletsioonmutant N39C362, millel on deleteeritud N-terminaalne transaktivatsioonidomeen ja C-terminaalne regulatoorne domeen. Seega puuduvad sellest p53 valgust domeenid, millega seonduvad enamuse p53-ga intrakteeruvatest valkudest (Joonis 7). Samas on N39C362-l endiselt säilinud viiruse DNA replikatsiooni inhibeeriv mõju. Niimoodi sooviti vältida uuritavasse p53 aktiivsusesse mittepuutuvaid kõrvalefekte. Negatiivse kontrollina otsustati kasutada mutanti N39C362Trp248, mis ei ole võimeline blokeerima papilloomiviiruste replikatsiooni *in vivo* (Lepik *et al.*, 1998). N39C362Trp248 mutandil on võrreldes N39C362 mutandiga veel lisaks punktmutatsioon DNA-sidumisdomeenis, mistõttu on see valk kaotanud järjestusspetsiifilise DNA sidumisvõime.



p53 mutandid otsustati ekspresseerida ning puhastada bakterist, sest valdav enamus p53 aktiivsusi mõjutatavatest posttranslatsioonilistest modifikatsioonidest langevad domeenidesse, mis N39C362 deletsioonmutandil puuduvad.

p53 mutandi N39C362 tiitrimine replikatsioonisegusse näitas, et see valk inhibeerib DNA replikatsiooni BPV-1 *in vitro* replikatsioonisüsteemis (Joonis 16). See tulemus on kooskõlas andmetega, mis on saadud *in vivo* katsetest. Negatiivsete kontrollide, N39C362Trp248 ning dialüüsipuhvri, lisamisel reaktsioonisegusse oli efekt tunduvalt nõrgem. Teatava nõrga efekti esinemist võib seletada soolade kontsentratsioonide muutumisega p53 valgu puhvri lisamisel replikatsioonisegusse. Eriti tundlik on BPV-1 *in vitro* replikatsioonisüsteem NaCl kontsentratsiooni suhtes. Selle eksperimendi tulemusel võib väita, et p53 on võimeline inhibeerima ka BPV-1 *in vitro* DNA replikatsiooni. Lisaks viitavad tulemused sellele, et inhibitsiooniks on vajalik intaktne p53 DNA-sidumisdomeen.

Huvipakkuv on ka asjaolu, et p53 omab mõju BPV-1 *in vitro* replikatsioonile kui on kasutatud FM3A rakkudest pärit rakuekstrakte. FM3A on hiire rakuliin, ning olemasolevate andmete põhjal ei suuda p53 supresseerida papilloomiviiruse *in vivo* replikatsiooni hiirest pärit rakkudes (Lepik ja Ustav, 2000). Nende tulemuste põhjal võib spekuloida, et p53 on küll võimeline inhibeerima hiirest pärit replikatsioonivalkudega teostatud BPV-1 replikatsiooni, kuid kompartmentaliseeritud rakutuumas vajab p53 veel mingit lisafaktorit. Selleks faktoriks võib olla lokaliseerumine BPV-1 replikatsiooni initsiatsioonikompleksi lähedusse. Selle tõestuseks tuleks tulevikus näidata N39C362 valgu lokaliseerumine BPV-1 replikatsiooni kompleksi suhtes võrdlevalt inimese ning hiire rakkudes. Edasi diskuteerides, p53 valgu lokaliseerumine papilloomiviiruse replikatsioonikompleksi lähedusse võib olla vahendatud RPA poolt. TÜ Mikrobioloogia ja viroloogia õppetoolis tehtud eksperimendid on näidanud, et ka p53 deletsioonmutant N61C362 inhibeerib BPV-1 *in vitro* DNA replikatsiooni (M. Kadaja, avaldamata andmed). Samas puudub antud valgul mõju BPV-1 replikatsioonile *in vivo*. Võrreldes p53 mutandi N39C362-ga, on N61C362-l deleteeritud veel 21 aminohapet N-terminusest ehk RPA seondumisdomeen (Joonis 7). Need tulemused viitavad asjaolule, et RPA-ga seondumine on antud juhul oluline rakutuumas, kuid mitte *in vitro* DNA

replikatsioonisegus. Antud hüpoteesi tõestuseks tuleks aga kindlaks teha fakt, et inimese p53 valk interakteerub inimese, kuid mitte hiire RPA kompleksiga.

Jooniselt 17 on näha, et N39C362 mutandi lisamisel E1 *shift*-i reaktsiooni suureneb *origin*'iga seondunud E1 valgu hulk N39C362 kontsentratsioonist sõltuvalt. Seega – kas võimendub oluliselt E1 *origin*'ile seondumisaktiivsus või muutub palju stabiilsemaks E1-DNA kompleks. Samas N39C362Trp248 efekt jäi suhteliselt tagasihoidlikuks.

Kuigi antud tulemuse põhjal ei saa teha põhjanevaid järeldusi, annab see siiski aluse huvitavaks diskussiooniks. On teada, et E1 valgul on nõrk järjestusspetsiifiline DNA-le seondumiseaktiivsus. Peamiseks põhjuseks on see, et E1 peab lisaks *origin*'i ära tundmisele töötama ka helikaasina. Ehk teiste sõnadega, liiga stabiilsel järjestusspetsiifilisel DNA-ga seondumisel nõuaks väga palju energiat *origin*'ist lahti "rebimine" ja helikaasina töö alustamine. Seega on saavutatud evolutsiooniliselt teatav tasakaal E1 järjestusspetsiifilise DNA-le seondumise ja helikaasina funktsioneerumise vahel. *Origin*'i äratundmisel aitab E1 valku aga teine viiruse valk E2, mis transkriptsiooni aktivaatorina omab tugevat järjestusspetsiifilist DNA-ga seondumisaktiivsust. E2 suurendab E1 *origin*'i spetsiifilist seondumist mitme suurusjärgu võrra. Papilloomiviiruse replikatsiooni initsiatsioonil seonduvad E1-E2 valk kooperatiivselt *origin*'ile, järgnevalt E2 valk vabaneb ning E1 moodustab heksameerse kompleksina rõnga ümber DNA kaksikheeliksi.

Juhul kui p53 stabiliseerib E1 valgu seondumist replikatsiooni *origin*'ile, siis rikub ta eelpool kirjeldatud tasakaalu ning selle tulemusena väheneb DNA-le seondunud E1 valkude võime alustada tööd helikaasina. See võib olla aga mehhanismiks, millega p53 inhibeerib BPV-1 replikatsiooni. Jooniselt 17 on näha, et p53 ei seonu iseseisvalt BPV-1 *origin*'ile, samas tundub aga p53-e DNA-le seondumisaktiivsus olevat oluline, kuna N39C362Trp248 mõju E1 valgu DNA-ga seondumisele on tunduvalt väiksem. Antud oletust kinnitab ka fakt, et on täheldatud E1-oligo kompleksi mõningast "laiali määrduvist" N39C362 juurseolekul (M. Kadaja, esitamata andmed). Tugev *supershift* ei pruugi olla detekteeritav aga põhjusel, et E1 kaksikheksameerne kompleks on N39C362 tetrameeriga võrreldes tunduvalt massiivsem. Kuid siiski, kirjeldatud mehhanismi paikapidavust peab kinnitama edasine uurimistöö.

Keerulisemaks muudab olukorra veel seegi, et E1-E2 kooperativne seondumine on intensiivsem nii N39C362 kui ka N39C362Trp248 juuresolekul (Joonis 18). Samuti on efekt näha juba palju madalamatel p53 kontsentratsioonidel ning antud eksperimendis tõenäoliselt jõudnud platoole. Seda fenomeni on raske seletada, kuid ehk pole teise transkriptsioonifaktori juuresolekul enam oluline p53 enda DNA-ga seondumise võime.

Huvitav oleks ka teada, millist efekti omab p53 E1-DNA kompleksi moodustumisele siis, kui reaktsiooni lisada ATP-d. Funktsionaalse heksameerse helikaasi moodustumiseks peab *origin*'i piirkonnale seondunud E1-E2 kompleks ATP sõltuvalt dissotsieeruma ning andmed, kas ning kuidas p53 mõjutab E1-E2 kompleksi lagunemist võiksid tuua selgust p53 efekti olemusse.

Täielikult ei saa välistada ka hüpoteesi, et E1 DNA-ga seondumine võib-olla mõjutatud p53 puhastamisel lahusesse jäänud ~75 kDa bakteriaalsest valgust. Kinnitamaks, et efekt on p53 spetsiifiline, oleks kontrolliks vaja sarnase protokolliga järgi puhastada valk, millel puuduks võime mõjutada replikatsiooni. Samuti peaks kontrollima metsiktüüpi p53 efekti *in vitro* replikatsioonile.

## Kokkuvõte

p53 võib raku ellu sekkuda nii kaudselt – aktiveerides transkriptsiooni mitmetelt geenidelt kui ka otseselt, läbi valk-valk ning valk-DNA interaktsioonide. On teada, et p53 sekkub otseselt polüoomiviiruse ja SV40 replikatsiooni seondudes viiruse replikatsioonivalguga ning inhibeerides selle helikaasset aktiivsust. *In vivo* süsteemis surub p53 alla ka inimese ning hamstri rakkudes toimuvat papilloomiviiruse ning polüoomiviiruste replikatsiooni, kuid ei suuda inhibeerida hiire rakkudes toimuvat viiruse replikoni paljunemist. Inhibitsiooni mehhanism on jäänud saladuseks.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida tuumorsupressorvalgu p53 mõju BPV-1 replikatsioonile *in vitro*, kasutades hiire rakkudest puhastatud ekstrakti. Selleks puhastati BPV-1 *in vitro* replikatsiooni komponendid (BPV-1 E1 valk ning FM3A tsütoplasmaekstrakt) ning bakteris ekspresseeritud p53 valgu mutandid. Seejärel testiti p53 efekti BPV-1 *in vitro* replikatsioonisüsteemile.

Selgus, et p53 mutant N39C362, millel on N-terminaalsest otsast deleteeritud transaktivatsioonidomeen ning C-terminaalsest otsast regulatoorne domeen, surub BPV-1 *in vitro* replikatsiooni tugevalt alla. Sarnase struktuuriga, kuid DNA-sidumisvõimetu p53 mutant N39C362Trp248 seda teha ei suutnud. See on veelkordseks kinnituseks, et p53 mõjutab papilloomiviiruse replikatsiooni otseselt, aktiveerimata transkriptsiooni. Samuti võib arvata, et oluline on p53 DNA-sidumisaktiivsus.

N39C362 mutandi lisamisel E1 *shift*'i reaktsiooni suureneb *origin*'iga seondunud E1 valgu hulk N39C362 kontsentratsioonist sõltuvalt, kuid N39C362Trp248 mutandi lisamisel sellist efekti ei teki. Võimalik, et p53 stabiliseerib E1-DNA kompleksi moodustumist või suurendab E1 valgu spetsiifilist DNA-ga seonudmise aktiivsust.

## Summary

Tumor suppressor protein p53 is a central coordinator of cellular defence mechanisms. By modulating the transcription of genes of several regulatory proteins in response to different genotoxic stress conditions, p53 can lead to the block of cellular proliferation or induction of apoptosis. But p53 may play transcription independent roles in cells as well.

Previously have demonstrated, that p53 suppresses *in vivo* the transient amplificational replication of papillomaviruses and polyomaviruses in various human and hamster cell lines but can not interfere replication in the mouse cell lines.

The goal of this work was to study what kind of effect has p53 to the papillomavirus *in vitro* replication in extracts purified from mouse cells. For that reason, the components of *in vitro* replication system (mouse FM3A extract and BPV-1 E1 protein) and bacterially expressed p53 mutants were purified.

*In vitro* replication was strongly inhibited by one of the mutant p53 protein – N39C362, but another mutant – N39C362Trp248, which is incapable to interact with DNA can not suppress BPV-1 *in vitro* replication. This result shows that *in vitro* p53 can suppress papillomaviruses amplificational replication and for that intact RPA-binding, proline-rich, oligomerisation and DNA-binding domains are necessary.

When N39C362 mutant protein was added to E1 shift assay, the yield of shifted oligo was significantly increased compared with reaction where DNA-binding defective p53 mutant (N39C362Trp248) was added. The exact mechanism how p53 interferes the papillomavirus amplificational replication remains to be determined.

## Kasutatud kirjandus

**Abroi, A (2004).** The determinants for the native activities of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein are separable, doktoritöö.

**Alexandrov, A. I., Botchan, M. R. and Cozzarelli, N. R. (2002).** Characterization of simian virus 40 T-antigen double hexamers bound to a replication fork. The active form of the helicase. *J Biol Chem* **277**, 44886-97.

**Dasgupta, S., Zabielski, J., Simonsson, M. & Burnett, S. (1992).** Rolling-circle replication of a high-copy BPV-1 plasmid. *J Mol Biol* **228**, 1-6.

**Del Vecchio, A. M., Romanczuk, H., Howley, P. M. and Baker, C. C. (1992).** Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol* **66**, 5949-58.

**de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & zur Hausen, H. (2004).** Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**, 17-27.

**Berg, M. and Stenlund, A. (1997).** Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *J. Virol.* **71**. 3853-3863.

**Blander, G., Kipnis, J., Leal, J. F. M., Yu, C.-E., Schellenberg, G. D. and Oren, M. (1999).** Physical and Functional Interaction between p53 and the Werner's Syndrome Protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 29463-29469.

**Boyer, S., Wazer, D. and Band, V. (1996).** E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* **56**, 4620-4624.

**Cayrol, C. and Ducommun, B. (1998).** Interaction with cyclin-dependent kinases and PCNA modulates proteasome-dependent degradation of p21. *Oncogene* **17**, 2437-44.

**Chen, G. and Stenlund, A. (2001).** The E1 Initiator Recognizes Multiple Overlapping Sites in in the Papillomavirus Origin of DNA Replication. *J. Virol.* **75**, 292-302.

**Chen, G. and Stenlund, A. (2002).** Sequential and Ordered Assembly of E1 Initiator Complexes on the Papillomavirus Origin of DNA Replication Generates Progressive Structural Changes Related to Melting. *Mol. Cell. Biol.* **22**. 7712-7720.

**Chiang, C., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T., Broker, T. and Chow, L. (1992).** Viral E1 and E2 Proteins Support Replication of Homologous and Heterologous Papillomaviral Origins. *PNAS* **89**, 5799-5803.

**Clertant, P. and Seif, I. (1984).** A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature* **311**. 276-9.

**Cox, L. S., Hupp, T., Midgley, C. A. and Lane, D. P. (1995).** A direct effect of activated human p53 on nuclear DNA replication. *Embo J* **14**, 2099-105.

**Dutta, A., Ruppert, J. M., Aster, J. C. and Winchester, E. (1993).** Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* **365**, 79-82.

**Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. and Martinou, J. C. (2000).** Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**, 929-35.

**Fortunato, E. A. and Spector, D. H. (1998).** p53 and RPA are sequestered in viral replication centers in the nuclei of cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol* **72**, 2033-9.

**Gillitzer, E., Chen, G. and Stenlund, A. (2000).** Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding. *EMBO J.* **19**, 3069-3079.

**Gobert, C., Skladanowski, A. and Larsen, A. K. (1999).** The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *PNAS* **96**, 10355-10360.

**Goldstein, D., Andresson, T., Sparkowski, J. and Schlegel, R. (1992).** The BPV-1 E5 protein, the 16 kDa membrane pore-forming protein and the PDGF receptor exist in a complex that is dependent on hydrophobic transmembrane interactions. *EMBO J.* **11**, 4851-4859.

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

**Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C. C. (1991).** p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53.

**Hughes, F. & Romanos, M. (1993).** E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5817-5823.

**Ilves, I., Kivi, S. & Ustav, M. (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**, 4404-12.

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

**Jaks, V., Joers, A., Kristjuhan, A. and Maimets, T. (2001).** p53 protein accumulation in addition to the transactivation activity is required for p53-dependent cell cycle arrest after treatment of cells with camptothecin. *Oncogene* **20**, 1212-9.

**Jimenez, G. S., Khan, S. H., Stommel, J. M. and Wahl, G. M. (1999).** p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses. *Oncogene* **18**, 7656-65.

**Joyce, J. G., Tung, J.-S., Przysiecki, C. T., Cook, J. C., Lehman, E. D., Sands, J. A., Jansen, K. U. and Keller, P. M. (1999).** The L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 11 Recombinant Virus-like Particles Interacts with Heparin and Cell-surface Glycosaminoglycans on Human Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 5810-5822

**Kadaja, M. (2002).** Veise papilloomiviiruse in vitro DNA replikatsioonüsteemi kasutamine p53 valgu bioloogiliste aktiivsuste uurimiseks, magistritöö.

- Kern, S. E., Kinzler, K. W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C. and Vogelstein, B. (1991).** Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* **252**, 1708-11.
- Kristjuhan, A. and Maimets, T. (1995).** Protein p53 modulates transcription from a promoter containing its binding site in a concentration-dependent manner. *Eur J Biochem* **234**, 827-31.
- Lambert, P. F., Spalholz, B. A. and Howley, P. M. (1987).** A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell* **50**, 69-78.
- Lee, D., Kim, J. W., Seo, T., Hwang, S. G., Choi, E.-J. and Choe, J. (2002).** SWI/SNF Complex Interacts with Tumor Suppressor p53 and Is Necessary for the Activation of p53-mediated Transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 22330-22337.
- Lentz, M. R. (2002).** A carboxyl-terminal serine of the bovine papillomavirus E1 protein is phosphorylated in vivo and in vitro. *Virus Res* **83**, 213-9.
- Lepik, D., Ilves, I., Kristjuhan, A., Maimets, T. and Ustav, M. (1998).** p53 Protein Is a Suppressor of Papillomavirus DNA Amplificational Replication. *J. Virol.* **72**, 6822-6831.
- Lepik, D. and Ustav, M. (2000).** Cell-Specific Modulation of Papovavirus Replication by Tumor Suppressor Protein p53. *J. Virol.* **74**, 4688-4697.
- Lepik, D (2000).** Modulation of viral DNA replication by tumor supressor protein p53, doktoritöö.
- Li, R., Knight, J., Bream, G., Stenlund, A. and Botchan, M. (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**, 510-26.
- Loo, Y.-M. and Melendy, T. (2004).** Recruitment of Replication Protein A by the Papillomavirus E1 Protein and Modulation by Single-Stranded DNA. *J. Virol.* **78**, 1605-1615.
- Lorimer, H. E., Wang, E. H. and Prives, C. (1991).** The DNA-binding properties of polyomavirus large T antigen are altered by ATP and other nucleotides. *J Virol* **65**, 687-99.
- Mansky, K. C., Batiza, A. and Lambert, P. F. (1997).** Bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen share regions of sequence similarity required for multiple functions. *J Virol* **71**, 7600-8.
- Massimi, P., Pim, D., Bertoli, C., Bouvard, V. and Banks, L. (1999).** Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene* **18**, 7748-54.
- McBride, A. A., Romanczuk, H. & Howley, P. M. (1991).** The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* **266**, 18411-4.
- Meek, D. W. (1999).** Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* **18**, 7666-75.
- Melendy, T., Sedman, J. and Stenlund, A. (1995).** Cellular factors required for papillomavirus DNA replication. *J. Virol.* **69**, 7857-7867.
- Miller, S., Farmer, G. and Prives, C. (1995).** p53 inhibits DNA replication in vitro in a DNA-binding-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6554-6560.



- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M. and Reed, J. C. (1994).** Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* **54**, 3131-5.
- Momand, J., Wu, H. H. and Dasgupta, G. (2000).** MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* **242**, 15-29.
- Munsch, D., Watanabe-Fukunaga, R., Bourdon, J. C., Nagata, S., May, E., Yonish-Rouach, E. and Reisdorf, P. (2000).** Human and mouse Fas (APO-1/CD95) death receptor genes each contain a p53-responsive element that is activated by p53 mutants unable to induce apoptosis. *J Biol Chem* **275**, 3867-72.
- Murphy, M., Ahn, J., Walker, K. K., Hoffman, W. H., Evans, R. M., Levine, A. J. and George, D. L. (1999).** Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* **13**, 2490-501.
- Notterman, D., Young, S., Wainger, B. and Levine, A. J. (1998).** Prevention of mammalian DNA reduplication, following the release from the mitotic spindle checkpoint, requires p53 protein, but not p53-mediated transcriptional activity. *Oncogene* **17**, 2743-51.
- Peng, Y.-C. and Acheson, N. H. (1998).** Polyomavirus Large T Antigen Binds Cooperatively to Its Multiple Binding Sites in the Viral Origin of DNA Replication. *J. Virol.* **72**. 7330-7340.
- Ravnan, J., Gilbert, D., Ten Hagen, K. and Cohen, S. (1992).** Random-choice replication of extrachromosomal bovine papillomavirus (BPV) molecules in heterogeneous, clonally derived BPV-infected cell lines. *J. Virol.* **66**, 6946-6952.
- Sambrook, J., Fritsch, G. F., Maniatis, T., (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanders, C. M. and Stenlund, A. (2001).** Mechanism and Requirements for Bovine Papillomavirus, Type 1. E1 Initiator Complex Assembly Promoted by the E2 Transcription Factor Bound to Distal Sites. *J. Biol. Chem.* **276**, 23689-23699.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. and Howley, P. M. (1993).** The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495-505.
- Sedman, J. and Stenlund, A. (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**, 6218-6228.
- Smelkova, N. V. and Borowiec, J. A. (1997).** Dimerization of simian virus 40 T-antigen hexamers activates T-antigen DNA helicase activity. *J Virol* **71**. 8766-73.
- Steger, G., Ham, J. and Yaniv, M. (1996).** E2 proteins: modulators of papillomavirus transcription and replication. *Methods Enzymol* **274**, 173-85.
- Stenlund, A. (2003a).** E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding. *EMBO J.* **22**. 954-963.
- Stenlund, A. (2003).** Initiation of DNA replication: lessons from viral initiator proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 777-85.

- Stephan, H., Grosse, F. and Soe, K. (2002).** Human topoisomerase I cleavage complexes are repaired by a p53-stimulated recombination-like reaction in vitro. *Nucl. Acids. Res.* **30**, 5087-5093.
- Ustav, M. and Stenlund, A. (1991).** Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J.* **10**, 449-457.
- Ustav, M., Ustav, E., Szymanski, P. and Stenlund, A. (1991).** Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J.* **10**, 4321-4329.
- Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L. and Debussche, L. (1998).** The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *Embo J* **17**, 4668-79.
- Waga, S., Bauer, G. and Stillman, B. (1994).** Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J. Biol. Chem.* **269**, 10923-10934.
- Wang, Q., Griffin, H., Southern, S., Jackson, D., Martin, A., McIntosh, P., Davy, C., Masterson, P. J., Walker, P. A., Laskey, P., Omary, M. B. and Doorbar, J. (2004).** Functional Analysis of the Human Papillomavirus Type 16 E1 {wedge}E4 Protein Provides a Mechanism for In Vivo and In Vitro Keratin Filament Reorganization. *J. Virol.* **78**, 821-833.
- Wilcock, D. and Lane, D. P. (1991).** Localization of p53, retinoblastoma and host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells. *Nature* **349**, 429-31.
- Yang, L., Mohr, I., Fouts, E., Lim, D., Nohaile, M. and Botchan, M. (1993).** The E1 Protein of Bovine Papilloma Virus 1 is an ATP-Dependent DNA Helicase. *PNAS* **90**, 5086-5090.
- Yang, R., Yutzy, W. H., IV, Viscidi, R. P. and Roden, R. B. S. (2003).** Interaction of L2 with beta -Actin Directs Intracellular Transport of Papillomavirus and Infection. *J. Biol. Chem.* **278**, 12546-12553.
- You, J., Croyle, J. L., Nishimura, A., Ozato, K. and Howley, P. M. (2004).** Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral
- Zhou, J. and Prives, C. (2003).** Replication of damaged DNA in vitro is blocked by p53. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3881-3892.