

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

Kristiina Sild

**Veise papilloomiviiruse tüüp 1 E2 valgu tuumasiseste  
interaktsioonide ja lokalisatsiooni kirjeldamine**

MAGISTRITÖÖ

Juhendajad:  
Reet Kurg, *Ph.D*  
Mart Ustav, *Ph.D*

Tartu 2004

## SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS.....	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1. Papilloomiviiruste üldiseloomustus .....	6
2. Papilloomiviiruste genoomi struktuur ja organisatsioon.....	7
3. Papilloomiviiruste elutsükkel.....	9
4. BPV-1 E2 valgu üldiseloomustus.....	10
4.1 BPV-1 E2 valgu funktsioonid ja regulatsioon .....	12
4.1.1. E2 valk kui transkriptsiooni faktor .....	12
4.1.2. E2 valk kui replikatsiooni faktor .....	12
4.1.3. E2 valgu roll BPV-1 genoomi episomaalses säilumises.....	13
4.1.4. BPV-1 E2 valgu seondumist kromatiinile vahendavad rakulised faktorid.....	15
4.1.5. Fosforüleerimise roll E2 valgu stabiilsuse regulatsioonis .....	16
5. E1 valgu roll viiruse episomaalsel säilumisel .....	17
6. Teiste DNA viiruste interakteerumine mitootilise kromatiiniga .....	18
TÖÖ EESMÄRGID .....	20
EKSPERIMENTAALNE OSA .....	21
MATERJALID JA METOODIKA .....	21
1. Vektorid .....	21
2. Antikehad.....	21
3. Rakukultuurid ja söötmed.....	22
4. Plasmiidse DNA transformatsioon ja DNA puhastamine.....	23
5. Rakkude transfektsioon.....	23
6. Rakkude rikastamine rakutsükli mitoosi faasi .....	24
7. Rakutsükli analüüs .....	24
8. Rakkude biokeemiline fraktsioneerimine .....	25
9. Valgu kontsentratsiooni mõõtmine Bradfordi meetodil.....	26
10. Ultratsentrifuugimine glütserooli gradiendis .....	27
11. Geelfiltratsioon .....	27
12. Immunopretsipitatsioon (IP) .....	28
13. Valkude sadestamine TCA-ga .....	28
14. Polüakrüülamiidgeeli värvimine hõbedaga (silverstaining).....	28
15. Western blot analüüs ja tulemuste hindamine.....	29
16. Immunofluorestsentsanalüüs (IF) .....	30
TULEMUSED.....	31
1. BPV-1 E2 valgu lokaliseerimine raku tuumas.....	31
1.1. BPV-1 E2 valk on interfaasis seotud raku kromatiiniga.....	36
2. BPV-1 E2 valgu ja raku tuumastruktuuride vahelised interaktsioonid .....	38
3. BPV-1 E2 valk võib rakutsükli erinevates faasides olla seotud sama rakulise partneriga .....	43
4. BPV-1 E2 valgu mutantide ja raku tuumastruktuuride vahelised interaktsioonid .....	44
5. Lahustumatust tuumafraktsioonist 0.4M NaCl juuresolekul ekstraheeritava BPV-1 E2 valgu iseloomustamine.....	47
ARUTELU .....	52
KOKKUVÕTE.....	58
SUMMARY .....	59
KASUTATUD KIRJANDUS .....	60

## KASUTATUD LÜHENDID

- aa** – aminohape (*amino acid*)
- ATP** – adensiinrifosfaat
- BES** – *N,N*-bis(2-hüdroksüetüül)-2-aminoetaansulfonaat
- bp** – aluspaar (*base pair*)
- BPV-1** – veise papilloomiviiruse tüüp 1 (*bovine papillomavirus type 1*)
- Brd4** – bromodomeeni sisaldav valk 4
- BSA** – veise seerumi albumiin (*bovine serum albumine*)
- CHO** – hiina hamstri munasarjakasvaja rakkude liin (*Chinese hamster ovary*)
- ChIF** – kromosoomi immunofluorestsents
- CSK** puhver – *cytoskeleton* puhver
- DBD** – DNA-ga seonduv domeen (*DNA binding domain*)
- DNA** – desoksüribonukleiinhape
- Doc** – deoksükolaat
- DTT** – treo-1.4-dimerkapto-2.3-butaandiool, ditiotreitool
- E2TA** – transkriptsiooni aktiveeriv E2 valgu vorm
- E2TR** – transkriptsiooni represseeriv E2 valgu vorm
- EBNA-1** – *Epstein-Barr nuclear antigen 1*
- EBP2** – *EBNA-1 binding protein 2*
- EBV** – Epstein-Barri viirus
- ECL** – *enchanced chemo-luminescence*
- EDTA** – etüleendiamiintetraetaanhape
- EGTA** – etüleenglükool- bis(aminoetüleeter)tetraetaanhape
- FISH** – fluorestsents *in situ* hübridisatsioon
- FITC** – fluorestseiin-isotiotsüanaat
- HCMV** – inimese tsütomegaloviirus (*human cytomegalovirus*)
- HEPES** – *N*-2-hüdroksüetüülpiperasiin-*N'*-2-etaansulfoonhape
- HHV** – inimese herpesviirus (*human herpesvirus*)
- HMG valgud** – *high mobility group* valgud
- HPV** – inimese papilloomiviirus (*human papillomavirus*)
- HRP** – mädarõika peroksüdaas (*horse radish peroxidase*)
- HSV** – *herpes simplex virus*
- IF** – immunofluorestsents
- IP** – immunopretsipitatsioon (immunosadestamine)

**KSHV** – *Kapos'i sarcoma-associated herpesvirus*

**LANA-1** – latentsusega seotud tuuma antigeen 1 (*latency associated nuclear antigen 1*)

**LB sööde** – Luria-Bertani sööde

**LCR** – *long control region*

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

**NM** – tuumamaatriks (*nuclear matrix*)

**ORF** – avatud lugemisraam (*open reading frame*)

**ORI** – replikatsiooni alguspunkt (*origin*)

**PAAG** – polüakrüülamiidgeel

**PBS** – fosfaat puhverdatud soolalahus (*phosphate buffered saline*)

**PEL** – *primary effusion lymphoma*

**PEST** järjestus – proliini (**P**), glutamiinhappe (**E**), seriini (**S**) ja treoniini (**T**) rikas järjestus

**PI** – propiidiumjodiid

**PML** – promüelotsütoitse leukeemia valk

**PMSF** – fenüülmetüülsulfonüülfluoriid

**POD** – promüelotsütoitse leukeemia valgu onkogeneenne domeen

**PV** – papilloomiviirus

**PVDF** – polüvinülideenfluoriid

**RPA** – replikatsiooni valk A

**rpm** – pööret minutis (*round per minute*)

**SDS** – naatriumdodetsüülsulfaat

**TAP** – *tandem affinity purification*

**TBS** – Tris puhverdatud soolalahus (*tris buffered saline*)

**TCA** – trikloroäädikhape

**TR** – *terminal repeat*

**Tris** – trishüdrosümetüülaminmetaan

**Triton X-100** – t-oktüülfenoksüpolüetoksüetanool/ polüoksüetüleen (9.5) *p-t*-oktüülfenool

**Tween 20** – polüoksüetüleen (20) sorbitaanmonolauraat

**U** – ühik (*unit*)

**URR** – *upstream regulatory region*

## SISSEJUHATUS

Püsiva nakkuse toimumiseks peavad viirused olema võimelised oma genoomi peremeesrakkudes säilitama. Eukarüootsed viirused kasutavad oma geneetilise materjali säilitamiseks jagunevates rakkudes mitmeid erinevaid mehhanisme. Mõned viirused integreeruvad peremeesraku kromosoomidesse, mis võimaldab neil ära kasutada eukarüootse raku poolt tagatud segregatsioonimehhanisme. Osad DNA viirused, nende seas ka papilloomiviirused, säiluvad aga episomaalsete plasmiididena nakatunud raku tuumas.

Papilloomiviirused nakatavad basaalseid epiteelkoe rakke. Algele viirusgenoomi amplifikatsioonile järgneb viiruse elutsükli latentne faas, mille ajal viirus püsib nakatunud rakus konstantsel koopianumbril mitmete jagunevate rakkude põlvkondade vältel. Viirusgenoomide stabiilne ekstrakromosomaalne säilumine sõltub nende võimest kinnituda peremeesraku mitootilistele kromosoomidele, mis tagab vajaliku segregatsioonimehhanismi jagunevates rakkudes. Seda seondumist vahendab papilloomiviiruse transaktivaatorvalk E2.

Käesoleva töö teoreetiline osa annab ülevaate BPV-1 E2 valgu lokalisatsioonist mitootilistes rakkudes ja tema rollist viiruse episomaalse säilumismehhanismi tagamisel. Töö eksperimentaalses osas kirjeldatakse biokeemilise fraktsioneerimise meetodi abil BPV-1 E2 valgu raku tuumasisest lokalisatsiooni ja interaktsioone raku tuumastruktuuridega nii stabiilse kui transientse ekspressioonisüsteemi korral.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi viroloogia ja mikrobioloogia õppetooli juures. Nõuannete ja toetuse eest töö valmimisel soovin tänada oma juhendajat Reet Kurge. Samuti tahan tänada Margus Poogat, Aigi Ilvest ja kõiki teisi mind abistanud inimesi.

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1. Papilloomiviiruste üldisloomustus

Papilloomiviirused kuuluvad sugukonda *Papovaviridae*. Neid iseloomustab väike, 52-60nm diameetriga ikosaeedrilise sümmeetriaga ümbriseta kapsiid, mis sisaldab kaheahelalist kovalentselt suletud tsirkulaarset DNA genoomi pikkusega 7500-8000bp. Kõik papilloomiviiruste genoomis olevad avatud lugemisraamid paiknevad ühel ahelal. Kõigi papilloomiviiruste genoomne ülesehitus on äärmiselt sarnane (Howley, P. M, 2001).

Papilloomiviirused on väga liigispetsiifilised, neid esineb pea kõigil loomadel, aga ka lindudel. Eriti palju tüüpe on kirjeldatud inimesel - tänaseks on teada ligi 90 erinevat inimese papilloomiviiruse (HPV) tüüpi, millest kolmandik nakatavad anogenitaaltrakti limaskesti. Kindlad HPV tüübid, nagu HPV16 ja HPV18 on seotud emakakaela pahaloomuliste kasvajaite ja teiste tuumorite patogeneesiga (zur Hausen, H., 2002). Papilloomiviiruste klassifitseerimine erinevatesse tüüpidesse ja subtüüpidesse põhineb järjestuse homoloogial (Delius, H., 1994).

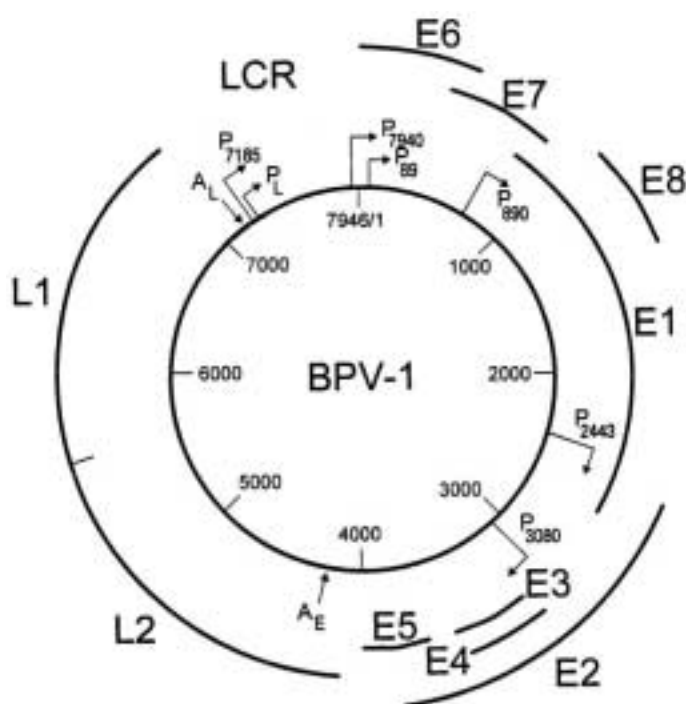
Ajaloolistel põhjustel on BPV-1 kujunenud peamiseks mudelsüsteemiks papilloomiviiruste molekulaarbioloogia uurimisel. BPV-1 kuulub fibropapilloomiviiruste hulka, mis omavad võimet indutseerida fibroblastide kasvajaite lisaks veistele ka teistes liikides, nagu hiired ja hamstrid, ning transformeerida veise fibroblaste ja mitmeid näriliste fibroblastiliine koekultuuri tingimustes (Moreno- Lopez, J., 1987).

## 2. Papilloomiviiruste genoomi struktuur ja organisatsioon

Papilloomiviirustel on ~8000bp pikkune kaheaahelaline tsirkulaarne DNA genoom. BPV-1 genoomi suurus on 7946bp. Kõik avatud lugemisraamid (ORF-id) paiknevad ühel DNA ahelal. Vastavalt asukohale genoomis jagatakse avatud lugemisraamid varasteks (*E-early*) ja hilisteks (*L-late*) (Howley, P. M., 2001). Nende ORF-ide funktsioonid on järgnevad:

**E1** ORF kodeerib replikatsiooni faktorit, mis on viiruse replikatsiooni initsiaatorvalk. Täispikk E1 on ATP-d siduv fosforüleeritud tuumavalk, mis seostub URR piirkonnas asuva replikatsiooni alguspunktiga (Sedman, T., 1997). Lisaks omab E1 valk ka helikaasset aktiivsust (Yang, L., 1993). E1 valk interakteerub täispika E2 valguga, mis suurendab E1 afiinsust replikatsiooni alguspunkti suhtes. **E2** ORF kodeerib peamist viiruselist transaktivaatorvalku, mis reguleerib nii DNA transkriptsiooni kui replikatsiooni. E2 valk osaleb BPV episomaalsel säilimisel ning võib lisaks omada veel rolli viiruse genoomi virionide assembleerumissaitidesse juhatamisel (Day, P. M., 1998). **E4** ORF asub täielikult E2 geeni sees, asudes teises lugemisraamis (joonis 1), sageli puudub tal initsiatsioonikoodon. E4 on hiline valk, mida ekspresseeritakse terminaalset diferentseerunud keratinotsüütides splaisitud transkriptidest koos teiste hiliste valkudega. E4 geeniproduktid interakteeruvad nakatunud raku tsütoskeletiga ja põhjustavad selle lagunemist (Doorbar, J., 1991). **E5** lugemisraam kodeerib rakke transformeerivat valku. See on kõige vähem konserveerunud ORF papilloomiviirustel üldse. E5 valk on väikseim seni teadaolev transformeeriv geeniprodukt. Transformeerunud rakkudes asub E5 valk Golgi kompleksis ja endoplasmaatilises retiikulumis. Tõenäoliselt on tema funktsiooniks rakuliste membraanseoseliste kasvuretseptorite aktiivsuse muutmine (DiMaio, D., 1994). **E6** ORF kodeerib sarnaselt E5 ORF-ile rakke transformeerivat valku. E6 valk sisaldab nelja DNA seoselistele valkudele omast Cys-X-X-Cys ("*zinc finger*") motiivi. E6 geeniprodukt moodustab komplekse p53-ga ja soodustab sellega viimase degradeerimist (Wernessen, B. A., 1990). **E7** avatud lugemisraam kodeerib samuti rakke transformeerivat valku. Halvaloomulisi kasvajaid põhjustavates HPV-des nagu HPV16, on E6 ja E7 valgud vajalikud ja piisavad peremeesrakkude immortaliseerimiseks. E7 on potentsiaalselt DNA-d siduv tuuma fosfoproteiin, mis

sarnaselt E6 valgule sisaldab Cys-X-X-Cys motiivi kordusi (Dyson, N., 1992). L1 ja L2 on hilised ORF-id, mis kodeerivad viiruse struktureid valke, mille ekspressioon toimub ainult viiruse replikatsiooni hilises faasis kõrge diferentseerumisastmega keratinotsüütides. Nende ekspressioon initsieeritakse E7 ORF-is asuvalt diferentseerumis-sõltuvalt promootorilt (p742), samuti on vajalikud diferentseerumise poolt indutseeritud muutused splaisingus ja polüadenüleerimissaitide kasutamises (Hummel, M., 1995). L1 on peamine kapsiidivalk, mis moodustab virioni väliskesta (Hagensee, M. E., 1994), L2 valk on ilmselt kapsiidi integraalne struktuurne komponent, mis osaleb DNA pakkimisel virionidesse (Hagensee, M. E., 1993). BPV-1 genoomi kaart on ära toodud joonisel 1.



**Joonis 1.** BPV- 1 genoomi kaart. Joonisel on näitatud varased (E) ja hilised (L) avatud lugemisraamid ning mittekodeeriv piirkond (LCR). Ära on toodud promootorite (P) ja polüadenüleerimissaitide (A) asukohad (Howley, P. M. 2001).

Papilloomiviiruste genoomis on umbes 1kb pikkune mittekodeeriv regioon **URR (LCR)**, milles avatud lugemisraamid puuduvad. Selles piirkonnas paiknevad replikatsiooni alguspunkt (ORI), enhanserjärjestused (Chin, M. T., 1989) ning teised replikatsiooni ja transkriptsiooni kontrolljärjestused. Samuti asub lühike mittekodeeriv ala varase ja hilise piirkonna vahel. Promootorid paiknevad üle terve genoomi. Papilloomiviiruste geeniekspressiooni regulatsioon toimub transkriptsiooni, splaisingu ja mRNA stabiilsuse tasemetel (Howley, P. M., 2001).

### 3. Papilloomiviiruste elutsükkel

Papilloomiviirused on väga liigi- ja koespetsiifilised. Produktiivse infektsiooni võib jagada varaseks ja hiliseks faasiks, mis on seotud epiteelraku diferentseerumise astmetega, mistõttu on ka viiruse täieliku elutsükli uurimine *in vitro* keeruline. Papilloomiviirused kuuluvad nende DNA viiruste hulka, mis on võimelised säilitama oma genoomi stabiilse ekstrakromosomaalse elemendina nakatunud rakkude tuumas (Howley, P. M., 2001).

Papilloomiviirused nakatavad soomusepiteeli basaalseid rakke, mis on ainsad jagunemisvõimelised soomusepiteeli rakud. Vahetult peale nakatumist transportitakse viirusgenoom basaalrakkude tuuma, kus toimub viiruselise DNA amplifikatsiooniline replikatsioon. Eksperimentaalsetes uuringutes jälgitakse enamasti transientset DNA replikatsiooni koekultuuri tingimustes, mis on kõige sarnasemaks süsteemiks amplifikatsioonilise replikatsiooni staadiumile peremeesrakus. Selles staadiumis tõuseb episomaalse PV genoomi koopiaarv 50–300 koopiani ühe raku kohta, replikatsiooniks on vajalikud E1 ja E2 valgud ja URR-is asuv minimaalne replikatsiooni ORI (Ustav, M., 1991a; Ustav, M., 1991b), mis koosneb E1 ja E2 valkude sidumiskohtadest ning A/T rikkast regioonist, mis võib hõlbustada ORI lahtikeerdumist (Ustav, M., 1991a; Ustav, E., 1993).

Järgmises, stabiilse replikatsiooni staadiumis võib viiruse genoom latentsena nakatunud raku tuumas säilida kuid või isegi aastaid. Viiruse koopiaarv raku kohta püsib muutumatuna, st PV genoom jaguneb raku genoomiga enamvähem sünkroonselt. Stabiilse replikatsiooni toimumiseks on vajalikud viiruse E1 ja E2 valgud ning

minimaalne replikatsiooni ORI ja URR piirkonnas paiknev nn. *minichromosome maintenance element*, mis koosneb kümnest E2 valgu seondumiskohast (Piiroo, M., 1996).

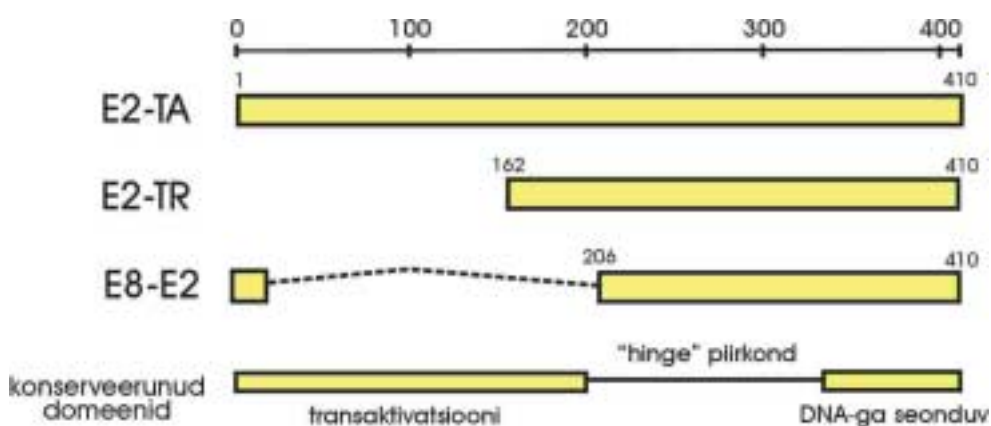
Viiruse elutsükli hiline produktiivne faas saab alguse, kui nakatunud rakud saavutavad naha loomuliku arengu käigus kõrge diferentseerituse astme ja jõuavad epiteeli pealmistesse kihtidesse, algab viiruse kontrollimatu vegetatiivne replikatsioon. Terminaalselt diferentseerunud keratinotsüütides tõuseb esmalt E1, E2, E5 geenide ekspressioon, väheneb E6 ja E7 ekspressioon, hiljem ilmuvad rakkudes L1 ja L2 valgud. Selles staadiumis pakitakse tuumas viiruspartiklid, mis koos surnud rakkudega jõuavad naha pinnale. On näidatud, et vegetatiivses staadiumis toimub viiruse DNA replikatsiooni ümberlülitumine bidirektsionaalselt  $\theta$  mudelilt veereva ratta mudelile (Flores, E. R., 1997). Viiruse DNA replikatsioon ja transkriptiooni induktsioon hiliselt promootorilt on sõltumatud protsessid, mis on seotud rakkude diferentseerumisega (Frattini, M. G., 1996; Ruesch, M. N., 1998). Vegetatiivse viiruse DNA replikatsiooni kohta on vähe andmeid, samuti pole palju teada viiruse kinnitumise, kattedest vabanemise ja genoomi raku tuuma transportimise mehhanismide kohta.

#### **4. BPV-1 E2 valgu üldiseloomustus**

BPV-1 E2 avatud lugemisraam kodeerib kolme raku tuuma lokaliseeruvat valku (Hubbert, N. L., 1988). Täispikk E2 valk suurusega 48kDa on transkriptiooniline aktivaator (E2TA), mis aktiveerib transkriptsiooni mitmetelt viiruse promootoritelt. Transkriptioonilist repressorvalku (E2TR) suurusega 31kDa ekspresseeritakse P<sub>3080</sub> promootorilt E2 ORF-is olevalt sisemiselt metioniinilt. Teist repressorvalku kodeerib splaisitud mRNA, kus osa E8 ORF-ist on fuseeritud E2 ORF-i 3' otsaga, selle mRNA transleerimisel tekib 28kDa valk (joonis 2).

410 aminohappe pikkune E2TA valk koosneb kolmest domeenist (Giri, I., 1988). N-terminaalne domeen (piirkond 1-192), mis on olemas ainult E2TA valgul, on vastutav transkriptsiooni aktivatsiooni eest ning ühtlasi vajalik E2 valgu replikatsiooni funktsioonide täitmiseks. See multifunktsionaalne domeen on samuti vajalik E2 valgu

interakteerumiseks mitmete rakuliste transkriptsioonifaktoritega (nagu TFIIB, SP1) ning papilloomiviiruse E1 ja L2 valkudega (Li, R., 1991; Yao, J. M., 1998; Mohr, I. J., 1990; Day, P. M., 1998; Heino, P., 2000). C-terminaalne domeen, mis on olemas kõigil kolmel E2 valgul, vastutab järjestusspetsiifiliselt DNA-ga seondumise ja dimerisatsiooni eest (piirkond 310-410). Erinevalt neist kahest papilloomiviiruste vahel konserveerunud domeenist on N- ja C-terminaalset domeeni ühendav kolmas domeen, nn. hinge regioon (piirkond 211-324), nii pikkuselt kui järjestuselt varieeruv ning transaktivatsiooni funktsiooniks mittevajalik (McBride, A. A., 1989b), kuid võib olla oluline replikatsiooni initsiatsiooni funktsiooniks (Kurg, R., 1999; Winokur P., 1992). Replikatsiooni initsiatsiooniks on vaja, et N- ja C-terminaalne domeen oleksid teineteisest teatud kaugusel (vähemalt 40 aminohapet) (McBride, A., 1997; Allikas, A., 2001).



**Joonis 2.** Kolme BPV-1 E2 valgu struktuur ja kõigil papilloomiviirustel konserveerunud E2 valgu piirkonnad.

BPV-1 E2 valgul on identifitseeritud kaks tuuma lokalisatsiooni signaali (NLS-i): piirkond 107-115 N-terminaalses domeenis ja piirkond 339-352 C-terminaalses domeenis (Skiadopoulos, M. H., 1996). Neist viimane vahendab E2 valgu aktiivtransporti raku tuuma (Allikas, A., 2001). N-terminaalses domeenis paiknev järjestus üksi lokalisatsiooni tuuma ei toeta (Allikas, A., 2001), kuna see järjestus ole ilmselt eksponeeritud valgu pinnale (Antson, A. A., 2000).

## **4.1 BPV-1 E2 valgu funktsioonid ja regulatsioon**

BPV-1 E2 valk omab vähemalt kolme erinevat funktsiooni. E2 valk on vajalik nii viiruse transkriptsiooniks kui replikatsiooniks ning samuti vahendab E2 BPV-1 genoomi seandumist mitootilistele kromosoomidele (Skiadopoulos, M. H., 1998; Lehman, C. W., 1998; Ilves, I., 1999; Bastien, N., 2000). E2 valgu transaktivatsiooni funktsioon on sõltumatu tema replikatsiooni initsiatsiooni funktsioonist (Abroi, A., 1996) ning samuti kromatiiniga seandumise funktsioonist (Abroi, A., 2004). E2 valgul võib lisaks olla oma roll ka virionide morfogeneesis (Day, P. M., 1998).

### **4. 1. 1. E2 valk kui transkriptsiooni faktor**

BPV-1 genoomis on 17 spetsiifilist E2 valgu seandumiskohta, kuhu E2 valk seostub dimeerina (Li, R., 1989). E2TA aktiveerib transkriptsiooni kõigilt BPV-1 varastelt promotoritelt (va P<sub>7185</sub>) kinnituses E2 seandumiskohtadele URR-is. E2TA valk stimuleerib transkriptsiooni arvatavasti läbi otseste või kaudsete interaktsioonide raku transkriptsiooni masinavärgi komponentidega. E2TR ja E8-E2 valgud represserivad transkriptsiooni blokeerides E2 seandumiskohti või moodustades E2TA-ga heterodimeere, mis transkriptsiooni ei aktiveeri (Spalholz, B. A., 1985).

### **4. 1. 2. E2 valk kui replikatsiooni faktor**

E2TA valk on samuti vajalik viiruse DNA replikatsiooni toimumiseks (Ustav, M., 1991a). Selleks aktiivsuseks on vajalik nii E2TA valgu DNA-ga seandumise domeen kui ka transaktivatsiooni domeen (Ustav, E., 1998). DNA replikatsiooni initsieerimiseks seondub E2 valk kooperatiivselt koos E1 valguga replikatsiooni ORI-le (Sedman, T., 1997). Samuti on E2 valk võimeline interakteeruma rakuliste replikatsiooni valkudega nagu replikatsiooni valk A (RPA) (Li, R., 1993) hõlbustades sellega initsiatsioonikompleksi tekkimist. Plasmiidid, mis sisaldavad minimaalset replikatsiooni ORI, suudavad transientselt replitseeruda rakkudes, mis ekspresseerivad E1 ja E2 valke, kuid replitseeritud DNA kaob aja möödudes neist rakkudest. Selliste

plasmiidide pikaajaliseks stabiilseks säilumiseks on lisaks vaja URR piirkonnas paiknevat *minichromosome maintenance* elementi, mis sisaldab mitmeid E2 valgu seondumiskohti (Pirsoo, M., 1996). *In vitro* katsetes on E2 samuti võimeline takistama nukleosoomi formeerumist ORI-1, mis muidu inhibeeriks DNA replikatsiooni initsiatsiooni (Li, R., 1994).

#### **4. 1. 3. E2 valgu roll BPV-1 genoomi episomaalses säilumises**

E2 valk on vajalik BPV-1 genoomi pikaajaliseks episomaalseks säilumiseks jagunevates rakkudes (Pirsoo, M., 1996). Nii E2TA valk kui ka viiruse genoom on seotud mitootiliste kromosoomidega raku jagunemise ajal, osaledes mehhanismis, mis tagab BPV-1 episomaalse stabiilse säilimise (Skiadopoulos, M. H., 1998; Lehman, C. W., 1998; Ilves, I., 1999; Bastien, N., 2000).

BPV-1 genoomi ja E2 valgu seondumine mitootiliste kromosoomidega tehti kindlaks kasutades kromosoomi immunofluorestsents (ChIF) meetodit ja fluorestsents *in situ* hübridisatsiooni (FISH) (Skiadopoulos, M. H., 1998; Lehman, C. W., 1998; Ilves, I., 1999; Bastien, N., 2000; Abroi, A., 2004). Viiruse DNA signaal moodustas FISH analüüsil mitootilistel kromosoomidel juhusliku täpilise mustri, mis polnud spetsiifiline ühegi kindla kromosoomi või kromosoomi piirkonna suhtes. E2 valgu rakusisene lokalisatsioon jälgituna ChIF meetodil oli sarnane BPV-1 genoomi omale. Edasistes uuringutes tehti kindlaks, et E2 valk on seotud mitootiliste kromosoomidega kõigi mitoosi faaside ajal (Bastien, N., 2000) ning E2TA valgu seondumine mitootilisele kromatiinile ei sõltu BPV-1 genoomi juuresolekust (Skiadopoulos, M. H., 1998). Samas töös näidati samuti, et E2TR ja E8/E2 valgud mitootilise kromatiiniga ei seondu, vaid paiknevad hajusalt raku tsütoplasmas. Samuti häirisid deletsioonid N-terminaalses transaktivatsiooni domeenis E2TA seondumist kromosoomidele, mis viitab sellele, et interakteerumine kromosoomidega on vahendatud transaktivatsiooni domeeni kaudu. E2TA valgu DNA-ga seondumise võime pole kromatiiniga assotseerumisel määrav, kuna DNA sidumise suhtes defektsete E2 mutantide ja metsiktüüpi E2 valgu seondumine mitootilise kromatiiniga oli eristamatult sarnane (Skiadopoulos, M. H.,

1998). Seega on E2 valgu ja mitootiliste kromosoomide vahelise interaktsiooni vahendajaks pigem rakuline valk, kui E2 otsene seondumine raku DNA-ga.

Täpsemalt defineeriti kromatiiniga assotseerumiseks vajalikud E2 piirkonnad Bastien et al. poolt, näidates, et transaktivatsiooni domeenist üksi piisab E2 valgu seondumiseks mitootilistele kromosoomidele (Bastien, N., 2000). E2 valgud, millel oli deleteeritud terve hinge regioon ja mis on võimelised aktiveerima transkriptsiooni ning võimendama E1 spetsiifilist ORI-le seondumist, kuid pole võimelised toetama DNA replikatsiooni (Winokur, P. L. 1992; 1996), assotseerusid mitootiliste kromosoomidega sama hästi kui metsiktüüpi E2 valk (Bastien, N., 2000; Allikas, A., 2001). Samuti assotseerusid kromosoomidega E2 valgud, mis olid mutantsed E2 spetsiifilise DNA-ga seonduva domeeni suhtes või sisaldasid ainult transaktivatsiooni domeeni (E2<sub>1-218</sub>) (Bastien, N., 2000). BPV-1 E2 valgu N-terminaalse domeeni mutatsioonanalüüs on näidanud, et E2 seondumises kromatiinile ei ole oluline mitte lineaarse E2 aa järjestuse seondumine rakulise retseptoriga, vaid vastavas interaktsioonis osalevad mitmed N-terminaalse domeeni pinnaelemendid, mis koos moodustavad retseptoriga seonduva ala (Abroi, A., 2004).

Kuigi BPV-1 puhul hinge regioon ja selles asuvad fosforüleerimiskohad pole vajalikud viiruse genoomi seondumiseks mitootiliste kromosoomidega (Bastien, N., 2000; Allikas, A., 2001), asuvad HPV-11 E2 valgul just hinge regioonis peamised determinandid tuumamaatriksiga assotsiatsiooniks (Zou, N., 2000).

HPV-11, HPV-16 ja HPV-18 E2 valkude puhul on IF analüüsi tasemel näidatud E2 seondumine mitoosi käävi fiibriga ja HPV-11 E2 valgu puhul veel seondumine tsentrosoomidega, mis võiks tagada mehhanismi nende viiruste genoomide efektiivseks jagunemiseks tütarakkude vahel (Van Tine, B. A., 2004).

Plasmiidid, mis sisaldavad ainult BPV-1 URR järjestust on võimelised sarnaselt täispikale BPV-1 genoomile seonduma peremeesraku kromatiiniga E2 valgu vahendusel (Ilves, I., 1999). BPV-1 URR plasmiidide seondumine kromatiiniga ei sõltu sellest, kas plasmiid on rakus stabiilselt või transientselt. FISH analüüsil lokaliseerusid nii stabiilse kui transientse BPV-1 URR plasmiidi signaalid juhusliku muustrina metafaasi kromosoomidele ning samamoodi interfaasi tuumades. Seega pole viirusgenoomi seondumine kromatiiniga pikaajalise selektsiooni tulemus, vaid sõltub tõenäoliselt E2

valgu piisava taseme saavutamiseks rakus. Samuti viitavad need tulemused võimalusele, et assotsiatsioon raku kromatiiniga võib püsida kogu rakutsükli vältel.

Kromosoomidele seondumine ja plasmidi replikatsioon on E2 valgust sõltuvad BPV-1 replikoni erinevad funktsioonid, kuna kromatiiniga assotseerusid ka plasmiidid, milles E1 valgu seondumiskoht oli defektne (Ilves, I., 1999). Plasmiidide seondumine kromatiiniga on aga sõltuv E2 valgu seondumiskohtade arvust: plasmiidid, mis ei sisaldanud BPV-1 URR järjestust või sisaldasid ainult minimaalset replikatsiooni ORI kahe E2 seondumiskohaga, ei olnud võimelised lokaliseeruma metafaasi kromosoomidele ega interfaasi tuuma. Samas seonduvad kromatiiniga plasmiidid, mis sisaldasid URR-ist ainult E2 valgu seondumiskohti või 10 sünteetilist E2 seondumiskohta. Sellest järeldati, et täispikk E2 valk *in trans* ja mitmed E2 valgu seondumiskohad episomaalsel DNA-l *in cis* on vajalikud ja piisavad BPV-1 URR plasmiidide seandumiseks kromatiiniga (Ilves, I., 1999).

#### **4. 1. 4. BPV-1 E2 valgu seandumist kromatiinile vahendavad rakulised faktorid**

Kuigi mitmetes töödes on varem näidatud, et nii E2TA valk kui viiruse genoom on seotud mitootiliste kromosoomidega raku jagunemise ajal, tagades nii BPV-1 stabiilse episomaalse säilimise (Skiadopoulos, M. H., 1998; Lehman, C. W., 1998; Ilves, I., 1999; Bastien, N., 2000), oli veel hiljuti väga vähe teada rakuliste faktorite kohta, mis seda seandumist võiksid vahendada. Oletati vaid seda, et ilmselt on tegu paljudes selgroogsetes konserveerunud faktoriga, kuna E2 seandumist kromatiiniga on jälgitud nii hiire, hamstri kui inimese rakuliinides.

Hiljuti Peter M. Howley grupi poolt avaldatud töös identifitseeriti E2 valguga *in vivo* assotseeruvate rakuliste valkude seast BPV-1 E2 valguga seonduv inimese Brd4 valk (bromodomeeni sisaldav valk 4), mis funktsioneerib kui E2 valgu ja viirusgenoomi retseptor mitootilisel kromatiinil. Antud töös kasutati BPV-1 E2 valguga *in vivo* interakteeruvate valkude identifitseerimiseks TAP (*tandem affinity purification*) meetodit, mille abil näidati otsene E2TA ja Brd4 valkude vaheline interaktsioon. Seondumine on vahendatud E2 valgu transaktivatsiooni domeeni poolt, kuna E2TR Brd4 valguga ei seondu. Brd4 ja E2 valkude kolokalisatsioon mitootilistel kromosoomidel näidati immunofluorestsents analüüsi meetodil (You, J., 2004). Brd4 on

~200kDa valk, mis sisaldab kahte bromodomeeni ja seondub mitootiliste kromosoomidega (Dey, A., 2000), kusjuures on näidatud Brd4 eelistatud seondumine atsetüleeritud kromatiiniga, eelkõige atsetüleeritud histoon H4-ga (Dey, A., 2003). BPV-1 E2 valguga seonduv 139 aminohappe (aa) pikkune regioon asub Brd4 C-terminaalses piirkonnas (aa 1224-1362). Lisaks BPV-1 E2 valgule seondub Brd4 ka HPV-16 E2 valguga (You, J., 2004), mis võib viidata sellele, et Brd4 on universaalne retseptor, mis vahendab papilloomiviiruste seondumist mitootilisele kromatiinile.

#### **4. 1. 5. Fosforüleerimise roll E2 valgu stabiilsuse regulatsioonis**

E2 valk sisaldab hinge regioonis kolme fosforüleerimiskohta seriini jääkide kohal positsioonides 298, 301 ja 235 (minoorne fosforüleerimiskoht); seriini jääk positsioonis 290 pole küll tegelik fosforüleerimiskoht, kuid selles positsioonis esineb mutatsioon fosforülatsioon- defektsete E2 valgu mutantide puhul (McBride, A. A., 1989a). Mutatsioon positsioonis 301 viib viiruse DNA koopiaarvu 10–20 kordsele tõusule (McBride, A. A., 1991), mis viitab E2 valkude osalemisele PV genoomi koopiaarvu regulatsioonis. Lehman et al. on näidanud, et BPV-1 DNA-ga transformeeritud rakkudes, mis sisaldavad mutatsioone mitmetes E2 valgu fosforüleerimiskohtades, pole E2TA võimeline mitootiliste kromosoomidega seonduma ja samuti on defektne viirusgenoomide segregatsioon (Lehman, C. W., 1998). Samas on teiste BPV-1 geeniproduktide puudumisel E2TA, mis sisaldab samu mutatsioone fosforüleerimiskohtades, võimeline seonduma mitootilistele kromosoomidele sama efektiivselt kui metsiktüüpi E2 valk (Bastien, N., 2000).

E2 valgu seriini jääke 298 ja 301 ümbritsev piirkond moodustab PEST järjestuse (proliini, glutamiinhappe, seriini ja treoniini rikas järjestus). PEST järjestuste fosforüleerimine omab rolli valkude suunamisel degradeerimisele kas kaltsium-sõltuvate kalpaiin proteaaside (Shumway, S. D., 1999) või ubikvitiin- sõltuva proteosoomse raja poolt (Rechsteiner, M., 1996). E2 valk kuulub degradeerimisele proteasoomses rajas (Penrose, K. J., 2000; Bellanger, S., 2001). Mutatsioon E2 seriini jäägis 301 tõstab valgu eluiga ja vähendab tunduvalt E2 ubikvitineerimist ning sellele järgnevat degradatsiooni proteosoomses rajas, mistõttu mõjutab fosforüleerimine eelkõige E2 valgu stabiilsust ja seeläbi ka eluiga. Seega võib E2 valgu fosforüleerimine

kaudselt mõjutada kromatiiniga seotud papilloomiviiruse genoomide arvu (Penrose, K. J., 2000).

## **5. E1 valgu roll viiruse episomaalsel säilumisel**

E1 valk lokaliseerub IF analüüsil interfaasi raku tuuma, kuid pole seotud mitootiliste kromosoomidega (Voitenleitner, C., 2002). Samas töös näidati ka, et metsiktüüpi E1 valk võib olla negatiivseks regulaatoriks E2 seondumisele kromatiiniga, kuid seda vaid juhul kui E1 ja E2 valkude suhe on 20:1, mis pole aga *in vivo* realiseeruv situatsioon. Negatiivne regulatsioon toimub sellisel juhul ilmselt läbi E1-E2 komplekside moodustumise, mis blokeerib E2 valgu transaktivatsiooni domeeni interaktsioonid kromatiiniga seondumist vahendava rakulise faktoriga. Selliste E1-E2 komplekside moodustumist mõjutab omakorda E2 valgu fosforüleeritus, kuna on näidatud, et E1 valk on võimeline seonduma ainult fosforüleerimata või hüpofosfolüeeritud E2 valguga (Lusky, M., 1991).

Hiljuti näidati, et HPV-16, 18 ja 31 võivad mitmetes inimese epiteelrakuliinides replitseeruda E1 valgu puudumisel ning et ka BPV-1 võib stabiilselt episomaalselt säiluda kasutades E1 valgust sõltumatut replikatsiooni, kuigi E1 on kindlasti vajalik amplifikatsioonilise replikatsiooni staadiumis (Kim, K., 2002). Ilmselt suudavad papilloomiviirused kasutada raku replikatsiooni masinavärki viiruse DNA E1 valgust sõltumatu replikatsiooni toetamiseks. Samuti on näidatud, et BPV-1 on võimeline nakatama *Saccharomyces cerevisiae* protoplaste ja madalal koopiaarvul episomaalselt replitseeruma neis nakatunud rakkudes, kusjuures antud süsteemi puhul võib stabiilne replikatsioon toimuda nii E1 kui E2 valgust sõltumatult (Angeletti, P. C., 2002; Zhao, K.- N., 2002). Siiski, meie laboris läbiviidud analoogsed katsed neid tulemusi ei kinnita (Silla, T., 2003).

## 6. Teiste DNA viiruste interakteerumine mitotootilise kromatiiniga

Mitmed episomaalselt replitseeruvad viirused peale BPV-1 seovad oma genoomi mitotootilistele kromosoomidele viiruse poolt kodeeritud valgu kaudu.

EBV (*Epstein-Barr virus*) nakatab ja immortaliseerib B lümfotsüüte (Rickinson, A. B., 1996). Viirusgenoom säilib rakkudes ekstrakromosomaalse elemendina. EBNA-1 (*Epstein-Barr nuclear antigen 1*) on EBV transkriptsiooni aktivaator ja replikatsiooni valk ning see on ainus viirusvalk, mida on vaja replikatsiooniks ja plasmiidide säilumiseks, mis sisaldavad replikatsiooni ORI *oriP*. *OriP* sisaldab mitmeid EBNA DNA sidumiskohti (Yates, J. L., 1985). EBNA-1 valk (Petti, L., 1990) ja EBV episoomid (Harris, A., 1985; Trescol-Biemont, M. C., 1987; Delecluse, H.-J., 1993) seonduvad samuti hajusalt mitotootiliste kromosoomidega. Kromosoomidele assotseerumist vahendab EBNA-1 seostumine eukarüootides kõrgelt konserveerunud rakulise valguga EBP2 (*EBNA-1 binding protein 2*). Seondumine toimub EBNA-1 aminohapete 325–376 vahelise piirkonna kaudu (Shire, K., 1999; Wu, H., 2000). EBNA-1 on kromatiiniga seotud kogu rakutsükli vältel ning võimeline siduma *oriP* sisaldavaid plasmide interfaasi kromatiiniga (Kanda, T., 2001).

Inimese herpesviirus 8 (HHV8) ehk KSHV (*Kapos'i sarcoma-associated herpesvirus*) kuulub sarnaselt EBV-le herpesviiruste gamma algruppi, mis koondab lümfotroopseid herpesviirusi. HHV8 genoom säilib rakus tsirkulaarse episoomina (Cesarman, E., 1995). LANA-1 (*latency associated nuclear antigen 1*) on viirusvalk, mille täpne funktsioon ei ole veel teada (Kellam, P., 1997). HHV8 episoomid ja LANA-1 kolokaliseeruvad defineeritud punktidenä interfaasi tuumades ja mitotootilistel kromosoomidel PEL (*primary effusion lymphoma*) rakkudes, episoomide puudumisel paikneb LANA-1 difuusselt raku tuumas või mitotootilistel kromosoomidel (Ballestas, M. E., 1999). Seega vahendab LANA-1 viiruse DNA seostumist mitotootilistele kromosoomidele lokaliseerudes spetsiifiliselt episoomi juuresolekul (Ballestas, M. E., 1999). HHV8 stabiilseks episomaalseks säilumiseks on vajalik LANA-1 valk ja TR (*terminal repeat*) järjestus, kus asub 20 aluspaari pikkune LANA-1 seostumiskoht (Ballestas, M. E., 2001). LANA-1 lokalisatsiooni raku tuuma kindlustab unikaalne signaal valgu piirkonnas 24-30, spetsiifilist interaktsiooni interfaasi kromatiini ja mitotootiliste kromosoomidega vahendab regioon 5-22 (Piolot, T., 2001).

HCMV (inimese tsütomegaloviirus) kuulub herpesviiruste perekonna beeta alagruppi, viiruse latentne arengufaas toimub ilmselt luuüdis. Kuigi selle viiruse elutsükli kohta pole palju teada, on siiski näidatud, et HCMV IE1 (*immediate-early 1*) valk on võimeline seonduma mitoetilistele kromosoomidele ja võib selle omaduse kaudu sarnaselt EBV EBNA-1 valgule vahendada viiruse episoomide säilimist nakkuse latentse faasis (Lafemina, R. L., 1989).

## TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva töö esimeses osas antakse ülevaade BPV-1 E2 valgu rollist papilloomiviiruse elutsüklis. E2 on multifunktsionaalne valk, mis lisaks osalemisele PV transkriptsiooni ja replikatsiooni funktsioonides on vajalik BPV-1 genoomide pikaajaliseks episomaalseks säilimiseks jagunevates rakkudes. FISH ja IF meetodeid kasutades on näidatud E2 valgu ja BPV-1 genoomide seondumine mitootiliste kromosoomidega (Skiadopoulos, M. H., 1998; Lehman, C. W., 1998; Ilves, I., 1999; Bastien, N., 2000).

Antud töö eksperimentaalse osa eesmärgiks on **uurida BPV-1 E2 valgu raku tuumasisest lokalisatsiooni ja interaktsioone raku tuumastruktuuridega eelkõige rakutsükli interfaasi rakkudes**, kuna vaatamata sellele, et on näidatud BPV-1 E2 assotsiatsioon mitootiliste kromosoomidega, on vähe andmed E2 valgu lokalisatsiooni ja raku siseste interaktsioonide kohta interfaasi ajal. Eksperimentaalses töös kasutatakse eelkõige rakkude biokeemilise fraktsioneerimise meetodit, fraktsioneerimistulemuste võrdlusena on kasutatud ka mitootilisi E2 valku stabiilselt ekspresseerivaid rakke.

# EKSPERIMENTAALNE OSA

## MATERJALID JA METOODIKA

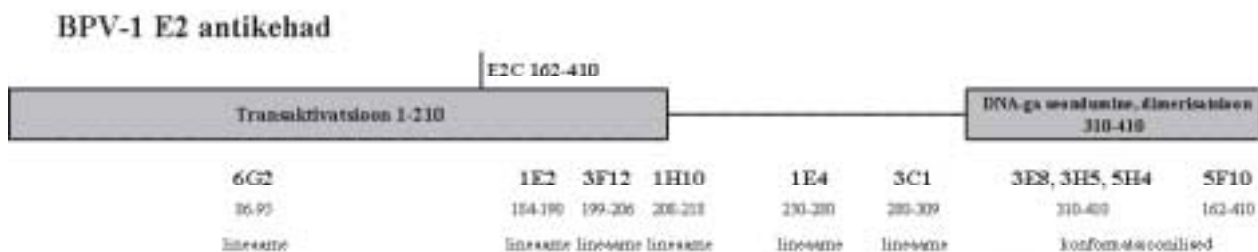
### 1. Vektorid

Kõik töös kasutatud eukarüootsed ekspressioonivektorid põhinesid pCG vektoril (Tanaka, M., 1990). E2TA ekspressioonivektor **pCGE2**, E2TR valku ekspresseeriv **pCGE2C** (sisaldab BPV-1 E2 piirkonda 162-410) ning **pCGE2N** (sisaldab BPV-1 E2 piirkonda 1–218 ehk E2TA N-terminaalset transaktivatsooni domeeni) vektorid on varem kirjeldatud (Ustav, M., 1991a; Allikas, A., 2001). Vektor **pCGE2 $\Delta$ Nco** kodeerib E2 valku, milles on deleteeritud aa 91-162 (Ustav, M., 1991b). E2 N-terminaalse osa deletsioonmutandid **pCGE2 $\Delta$ 1-23**, **pCGE2 $\Delta$ 1-85**, **pCGE2 $\Delta$ 1-112**, **pCGE2 $\Delta$ 1-142** ja **pCGE2 $\Delta$ 1-183** ning C-terminaalse osa deletant **pCGE2(1-309)** on varem kirjeldatud (Kurg, R. 1999). Lisaks on kasutatud kimäärseid E2 valke ekspresseerivaid vektoreid **pCGVP16/E2**, mis sisaldab 80 C-terminaalset aa VP16 valgust fuseerituna E2 C-terminaalse osaga (Li, R., 1993) ja **pCGE2/EBNA**, kust ekspresseeritakse valku, mis sisaldab aa 1-248 E2 valgust ja aa 450-641 EBV EBNA1 valgust (Kivimäe, S., 2001).

### 2. Antikehad

BPV-1 E2 spetsiifilise signaali detekteerimiseks kasutati varem kirjeldatud BPV-1 E2 antikehi (joonis 4) (Kurg et al 1999). E2TA, E2C (ehk E2TR), E2 $\Delta$ Nco, E2 $\Delta$ 1-23, E2 $\Delta$ 1-85, E2 $\Delta$ 1-112, E2 $\Delta$ 1-142, E2 $\Delta$ 1-183, E2(1-309), E2/EBNA ja VP16/E2 valkude detekteerimiseks *Western blot* analüüsil kasutati 1E2, 1H10, 1E4 ja

3F12 antikehade segu. E2N valgu detekteerimisel jäeti sellest segust välja 1E4 antikeha. Kõiki primaarseid antikehasid kasutati lõppkontsentratsiooniga 1 µg/ml.



**Joonis 3.** BPV-1 E2 valgu vastased antikehad. Joonisel on iga antikeha puhul ära toodud antikeha epitoop E2 valgul.

Sekundaarse antikehana *Western blot* analüüsil kasutati peroksüdaasiga konjugeeritud hiire IgG vastast antikeha lahjendusega 1:10 000 (LabAs, Tartu).

IF analüüsil kasutati E2TA detekteerimiseks 5H4, 1E4, 1H10 antikehade segu lõppkontsentratsiooniga 3µg/ml, sekundaarse antikehana kasutati *anti-mouse-FITC* antikeha lahjendusega 1:250 (LabAs, Tartu).

IP läbiviimisel kasutati magnetkandjaga seotud 3E8 antikeha, *Western blot* analüüsil, kus detekteeriti IP-ga välja püütud E2 valku, kasutati HRP-ga otsekonjugeeritud 5E11 antikeha (3F12 antikeha derivaat).

### 3. Rakukultuurid ja söötmed

Eksperimentaalses töös kasutati järgmisi rakuliine: **CHO** (*Chinese Hamster Ovary*) rakuliini ja selle derivaati **CHOBgl40** rakuliini, mis ekspresseerib BPV-1 E1 ja E2 valku ja sisaldab konstantsel koopianumbril replitseeruvat BPV-1 URR plasmidi pNeoBgl40 (Piirsoo, M., 1996). Rakke kasvatati F12 (*Ham's Nutrient Mixture F12*) söötmes, mis sisaldas 10% veise loote seerumit ("Sebak") ning penitsilliini 100U/ml ja streptomütsiini 0.1mg/ml. Rakkude inkubatsioon toimus 37°C juures 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas.

Lisaks on töös veel kasutatud **cos7** rakuliini (aafrika rohepärdiku neeru rakud, kuhu on integreeritud SV40 genoom); rakke kasvatati IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes, mis sisaldas 10% veise loote seerumit ("Sebak") ning penitsilliini 100U/ml ja streptomütsiini 0.1mg/ml. Rakkude inkubatsioon toimus 37°C juures 5% CO<sub>2</sub> keskkonnas.

#### **4. Plasmiidse DNA transformatsioon ja DNA puhastamine**

Transformatsiooniks kasutati 200µl kompetentseid *Escherichia coli* tüve DH5α rakke, mis sulatati jääl ja inkubeeriti seejärel jääl koos sobiva vektoriga 10 minuti jooksul. Vektori rakku sisestamise kergendamiseks tehti kuumašokk 4 minuti vältel 37°C juures, seejärel inkubeeriti rakke veel ühe minuti jooksul jääl. Transformatsioonisegule lisati Luria-Bertani (LB) sööde (1% bakto-trüpton, 0,5% bakto-pärmi ekstrakt, 1% NaCl (pH 7.0), kuhu oli lisatud ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100µl/ml ja inkubeeriti 1 tund 37°C juures. Seejärel külvati rakud LB<sup>AMP</sup> tassile. Rakke kasvatati 12–16 tundi 37°C juures. Üksikuid kolooniad LB<sup>AMP</sup> tassidelt kasvatati 2ml LB söötmes (+ Amp 100µl/ml) 37°C juures 6–8 tundi. Seda juuretiskultuuri kasutati 75ml LB (+ Amp 100µl/ml) inokuleerimiseks. 75ml kultuuri inkubeeriti 14–16 tundi 37°C juures kuni OD<sub>600</sub> 1.5 ... 2.0 saavutamiseni. Plasmiidne DNA eraldati seejärel kasutades *Eppendorf Perfectprep® Plasmid Midi kit*-i vastavalt tootjapoolsele protokollile.

#### **5. Rakkude transfektsioon**

Plasmiidid transfekteeriti rakkudesse elektroporatsiooni meetodil. 100 millimeetrise diameetriga semikonfluentseks kasvanud koekultuuri tassilt (~ 3 miljonit rakku tassil) aspireeriti sööde, rakke pesti PBS- iga ja võeti seejärel trüpsiini abil plastikult lahti ning koguti 15ml tsentrifuugi topsi, milles oli 5ml söödet. Rakud tsentrifuugiti seejärel 10 minutit 1000 rpm 20°C juures (Eppendorf 5810R

tseentrifuugiga) ning aspireeriti sööde. Seejärel rakud resuspendeeriti söötmes, mis sisaldas 5mM Na-BES puhvrit (pH 7.5). Elektroporatsiooni küvetis segati 250µl rakususpensiooni, 50µg lõhe spermi DNA-d ja 0.04 - 1µg plasmiidset DNA-d ning elektroporeeriti kasutades BioRad Gene Pulser II poraatorit. Kasutatud pinge oli CHO rakkude puhul 220V ning cos7 rakkude puhul 180V ja mahtuvus mõlemal juhul 975µF. Rakud kanti küvetist 3ml-i söötmesse ja tseentrifuugiti 5 minutit 1000 rpm 20°C juures ning aspireeriti sööde. Lisati 7ml söödett, suspendeeriti ja külvati 100mm tassidele.

## **6. Rakkude rikastamine rakutsükli mitoosi faasi**

CHOBgl40 rakkude rikastamiseks rakutsükli mitoosi faasi inkubeeriti rakke 3–6 tundi kolhitsiiniga (lõppkontsentratsioonil 100ng/ml). Mitootilised rakud eraldati 100mm koekultuuri tassidelt *shake-off* meetodil (Wu, J.-R., 1997).

## **7. Rakutsükli analüüs**

Rakkude läbivoolu tsütomeetria analüüsi (FACS) teostamiseks pesti rakud PBSiga, koguti kokku EDTA (3mM)–PBSis, fikseeriti võrdse ruumala 96% etanooli (-20°C) lisamisega ning inkubeeriti vähemalt 1h 4°C juures. Rakud ( $\sim 5 \times 10^5$  rakku) sadestati tsestriguugides 5 minutit 3200rpm 4°C juures (Heraeus Biofuge *fresco*), resuspendeeriti 400µl PBSis, mis sisaldas 1mM MgCl<sub>2</sub> ja 100µg/ml RNaseA-d ning inkubeeriti 37°C juures 45 minutit. DNA värvimiseks lisati propiidiumjodiidi lõppkontsentratsioonini 50µg/ml ja inkubeeriti 10 minutit jääl. Kasutades *FACSCalibur* (Becton-Dickinson Biosciences) läbivoolutsütomeetrit koguti vähemalt 30 000 raku signaalid, mis analüüsiti programmi *CellQuest* abil.

## 8. Rakkude biokeemiline fraktsioneerimine

Rakkude biokeemilise fraktsioneerimise üldskeem on ära toodud joonisel 5A. 100 mm koekultuuri tassidel kasvanud rakud pesti PBS-iga ja koguti tassidelt trüpsiniseerimisega kokku. Rakke pesti 2x PBS-iga, rakkude arvukus määrati Bürkeri homotsütomeetriga loendamisel. Rakud ( $\sim 2 \times 10^6$  rakku ühe fraktsioneerimise kohta) suspendeeriti 100  $\mu$ l CSK (*cytoskeleton*) puhvris [10mM HEPES pH 7.3, 300mM sahharoos, 100mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA pH 8.0, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 5ng/ $\mu$ l aprotiniin, 5ng/ $\mu$ l leupeptiin], mis sisaldas 0.5% Triton X-100. Peale 15 minutilist inkubatsiooni jääl eraldati rakkude tuumad lahustuvast fraktsioonist tsentrifuugides 7500rpm 3 minutit 4°C (Heraeus Biofuge *fresco*). Lahustuv fraktsioon (fraktsioon Sol) koguti ja lüüsi Laemmlis puhvrit lisades. Lahustumatu tuumafraktsioon (fraktsioon NS) resuspendeeriti 50  $\mu$ l CSK puhvris ning seejärel kas lüüsi kohe Laemmlis puhvri lisamisega või inkubeeriti täiendavalt 25 minutit jääl ja seejärel tsentrifuugiti 7500rpm 3 minutit 4°C. Supernatant koguti ja lüüsi Laemmlis puhvris kui fraktsioon S. Sadet pesti 1xCSK puhvris, tsentrifuugiti 7500rpm 3 minutit 4°C, eemaldati supernatant ning sade (fraktsioon P) resuspendeeriti 50  $\mu$ l CSK puhvris ja lüüsi Laemmlis puhvri lisamisega. Fraktsioneerimata rakkude lüüsi saamiseks lüüsi rakud ( $\sim 2 \times 10^6$  rakku) kohe Laemmlis puhvris peale PBS-is resuspendeerimist. Laemmlis puhvris lüüsitud erinevad rakufraktsioonid analüüsi *Western blot* meetodil BPV-1 E2 valgu vastaste antikehadega.

Alternatiivselt resuspendeeriti CSK-0.5% Triton X-100 sisaldavas puhvris lüüsitud lahustumatud tuumakomponendid (fraktsioon NS) 50  $\mu$ l CSK puhvris, mis sisaldas vastavalt lõppkontsentratsioonid 0.1M, 0.2M, 0.3M või 0.4M NaCl. Proove inkubeeriti 25 minutit jääl ja seejärel tsentrifuugiti 7500rpm 3 minutit 4°C. Supernatant koguti ja lüüsi Laemmlis puhvris kui fraktsioon S. Sadet pesti 1xCSK puhvris, tsentrifuugiti 7500rpm 3 minutit 4°C, eemaldati supernatant ning sade (fraktsioon P) resuspendeeriti 50  $\mu$ l CSK puhvris ja lüüsi Laemmlis puhvri lisamisega. Laemmlis puhvris lüüsitud erinevad tuumafraktsioonid analüüsi *Western blot* meetodil BPV-1 E2 valgu vastaste antikehadega.

Teises alternatiivses katses resuspendeeriti CSK-0.5% Triton X-100 sisaldavas puhvris lüüsitud lahustumatud tuumafraktsioonid (NS) kas DNAasi(Promega) (20ng/ $\mu$ l

või 2ng/μl) või RNAasA (1μg/μl või 0.1μg/μl) sisaldavas 50μl CSK puhvris, inkubeeriti 15min toatemperatuuril ja seejärel tsentrifugeeriti 7500rpm 3 minutit 4°C. Supernatant koguti ja lüüsi Laemmli puhvris kui fraktsioon S. Sadet pesti 1xCSK puhvris, tsentrifugeeriti 7500rpm 3 minutit 4°C, eemaldati supernatant ning sade (fraktsioon P) resuspendeeriti 50μl CSK puhvris ja lüüsi Laemmli puhvri lisamisega. Laemmli puhvris lüüsitud erinevad tuumafraktsioonid analüüsiti *Western blot* meetodil BPV-1 E2 valgu vastaste antikehadega

Fraktsioneerimiskatsete tulemuste analüüsiks IF meetodil viidi fraktsioneerimised läbi eelpool kirjeldatud viisil rakutsükli mitoosi faasi sünkroniseeritud CHOBl40 rakkudel shake-off meetodil kogutud mitootiliste rakkudega ( $5 \times 10^5$  rakku ühe fraktsioneerimiskatse kohta). Erinevatel fraktsioneerimisetappidel kogutud lahustumatud fraktsioonid resuspendeeriti 100μl PBS-is ja kanti alusklaasidele. Peale 15 min inkubatsiooni toatemperatuuril fikseeriti fraktsioonid klaasidel metanool-atsetooni lahusega (1:1 vol) 15 min -20°C. Rakutsükli interfaasis olevate CHOBl40 rakkude fraktsioneerimisel kasutati katteklaasidel semikonfluentseks kasvatatud rakke. Katteklaasidel kasvanud rakud fraktsioneeriti jääl, igas fraktsioneerimisetapis kasutatud vastava CSK puhvri maht oli 500μl. Lahustunud fraktsioonid eraldati klaasidelt PBS-is pestes, seejärel fikseeriti fraktsioonid klaasidel metanool-atsetooni lahusega (1:1 vol) 15 min -20°C.

## **9. Valgu kontsentratsiooni mõõtmine Bradfordi meetodil**

Erinevatel fraktsioneerimise astmetel vabanevate kogu raku valkude kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks kasutati Bradfordi meetodit (Bradford, M. M., 1976). Erinevates fraktsioonides olevate valkude kontsentratsioon mõõdeti 620nm juures 1x Bradfordi reagenti (0.01% w/v Coomassie brilliant blue R-250, 5% v/v etanool, 4.25% v/v fosforhape) suhtes, valkude kontsentratsioon leiti kasutades standardina veise seerumi albumiini kaliibrimiskõverat.

## 10. Ultratsentrifuugimine glütserooli gradiendis

Antud katses kasutati CHO, CHO Bgl40, cos7 või 50ng pCGE2 vektoriga transfekteeritud cos7 rakke. Eelnevalt fraktsioneeritud rakkudelt ( $3 \times 10^7$  rakku) 0.4M NaCl juuresolekul lahustumatust kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist ekstraheeruvate valkude lüsaadid (à 250µl) kanti 5ml lineaarsetele 10-35% glütserooli gradientidele (10mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1mM EDTA, 100mM NaCl) ja tsentrifuugiti 45 000 rpm 4h 4°C juures *Beckman SW55* rootoris. Paralleelsetes katsetes tsentrifuugiti 10-35% glütserooli gradientides *E. coli* lüsaadist puhastatud E2 või markervalgud apoferritiin (440kDa), alkoholi dehüdrogenaas (150 kDa) ja BSA (68 kDa). Peale fuugimist jagati gradiendid 16 fraktsiooni, millest valgud sadestati TCA-ga ja analüüsiti *Western blot* meetodil. Alternatiivselt viidi lahutatud fraktsioonides enne analüüsi läbi immunosadestamine, millele järgnes *Western blot* analüüs. Markervalkude puhul lahutati TCA-ga sadestatud fraktsioonid 12% SDS-PAAG foreesil ja värviti Coomassie brilliant blue R-250-ga.

## 11. Geelfiltratsioon

Geelfiltratsiooniks kasutati Sepharose 6 (Pharmacia) kolonni, mis tasakaalustati 5 kolonni mahu puhvriga, mis sisaldas 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA ja 100mM NaCl. Kolonnile kanti eelnevalt fraktsioneeritud CHO Bgl40 rakkudelt ( $2 \times 10^7$  rakku) 0.4M NaCl juuresolekul lahustumatust kromatiini- tuumamaatriksi fraktsioonist ekstraheeruvate valkude lüsaat (à 200µl) ning voolutati kolonni tasakaalustamiseks kasutatud puhvriga. Koguti 500µl suurused fraktsioonid, millest valgud sadestati TCA-ga ja analüüsiti *Western blot* meetodil. Samuti analüüsiti *E. coli* lüsaadist puhastatud E2 või markervalgud apoferritiin (440kDa), alkoholi β-amülaas (220 kDa) ja BSA (68 kDa). Markervalkude puhul lahutati TCA-ga sadestatud fraktsioonid 12% SDS-PAAG foreesil ja värviti Coomassie brilliant blue R-250-ga.

## 12. Immunopretsipitatsioon (IP)

Peale glütserooli gradiendis fuugimist jaotati gradiendid 16-neks fraktsiooniks, millest võeti kokku fraktsioonid 3-8 ja 9-11. Neid liitfraktsioone inkubeeriti 20µl 3E8 antikehaga seotud magnetkandjatega. Antikehaga seotud magnetkandjaid oli eelnevalt pestud 3x IP puhvril (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 400mM NaCl) ja seejärel blokeeritud 30min 4°C juures kas cos7 või CHO rakkudes 0.4M NaCl juuresolekul lahustumatust tuumafraktsioonist ekstraheeritavate valkude fraktsiooniga ning seejärel uuesti pestud IP puhvriga. Liitfraktsioone inkubeeriti antikehaga seotud magnetkandjatega *end-over-end* segajal 4°C juures kolm tundi. Seostamise ajaks lisati fraktsioonidele EDTA lõppkontsentratsioonini 1mM, 1mM DTT, 2 ng/µl aprotiniini, 2 ng/µl leupeptiini. Peale seostamist pesti kandjaid kolm korda IP puhvril. Kandjatele lisati 50µl Laemmli puhvrit ja lüsaadid lahutati 12% SDS-PAAG foreesil. Pool materjalist analüüsiti ühekihilisel *Western blotil* kasutades peroksüdaasiga konjugeeritud antikeha 5E11 lõppkontsentratsiooniga 1 µg/ml, teine pool analüüsiti hõbedaga värvides.

## 13. Valkude sadestamine TCA-ga

Valkude sadestamiseks lisati glütserooli gradiendi või geelfiltratsiooni fraktsioonidele 0.01% NaDoc ja 10% TCA ning inkubeeriti fraktsioone 30 min toatemperatuuril. Seejärel fraktsioonid fuugiti 13000 rpm 3 minutit 4°C (Heraeus Biofuge *fresco*), sademed pesti atsetooniga ja lüüsiti seejärel Laemmli puhvril.

## 14. Polüakrüülamiidgeeli värvimine hõbedaga (*silverstaining*)

Hõbedaga värvimiseks lahutati valgud esmalt 12% SDS-PAAG foreesil. Peale foreesi pesti geeli 2x5min toatemperatuuril 10% etanooliga valkude fikseerimiseks. Sellele sammule järgnes geeli inkubeerimine 0.1% AgNO<sub>3</sub> lahuses poole tunni jooksul.

Peale destilleeritud veega pesu inkubeeriti geeli ~10 min ilmutuslahuses (3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.02% formaldehüüd) ja peatati seejärel reaktsioon geeli 1% äädikalahuses inkubeerimisega (~10 min jooksul). Peale 3x3 min destilleeritud vees pesemist inkubeeriti geeli lühidalt (~5 min jooksul) Farmeri nõrgendis (1% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 1.6% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>x5H<sub>2</sub>O), pesti destilleeritud veega kuni kollase värvuse kadumiseni geelist ja seejärel värviti geel veel teistkordselt hõbedaga.

## 15. Western blot analüüs ja tulemuste hindamine

Valgud lahutati 12% SDS-PAAG elektroforeesil 1xSDS puhvris (0.125M Tris, 0.96M glütsiin, 0.5% SDS). Enne foreesile kandmist kuumutati lüsaate 10 minutit 100° C juures ja tsentifuugiti 5 minutit 13 000 rpm (Heraeus Biofuge *pico*). Enne valkude ülekannet inkubeeriti geeli ja eelnevalt metanoolis märjatud PVDF filtrit (Millipore Immobilon™-P) 10 minuti jooksul poolkuivas ülekandepuhvris (48mM Tris, 39mM glütsiin, 0.037% SDS, 20% etanool). Ülekanne toimus 1 tund 15V juures (Biorad TransBlot SD) . Filter blokeeriti üleöö 5% lõssipulbri lahusega 0.05% Tween20-TBS-is 4°C juures. Antikehade seostamine toimus 2% lõssipulbrit sisaldava TBS-0.05% Tween20 lahuses toatemperatuuril. Signaal detekteeriti *Amersham Pharmacia Biotech*'i ECL™ detektsiooni lahustega.

Kuna fraktsioneerimiste kontrollimiseks puudusid sobivad antikehad (nagu histoon H1 vastane antikeha), lõigati enne valkude ülekandmist PVDF (polüvinülideenfluoriid) membraanile ära PAAG-i alumine osa, mis värviti *core*-histoonide ja H1 visualiseerimiseks kasutades Coomassie Brilliant Blue G-250. Samuti võimaldas see samm hinnata materjali hulkade samaväärsust geeli erinevatel radadel. E2 positiivse markerina kasutati *Escherichia coli*'st puhastatud BPV-1 E2 valku.

*Western blot* analüüsil saadud tulemuste hindamisel kasutati UVP GelWorks 1D Intermediate *version 3.0* programmi (Nonlinear Dynamics Ltd).

## 16. Immunofluorestsentsanalüüs (IF)

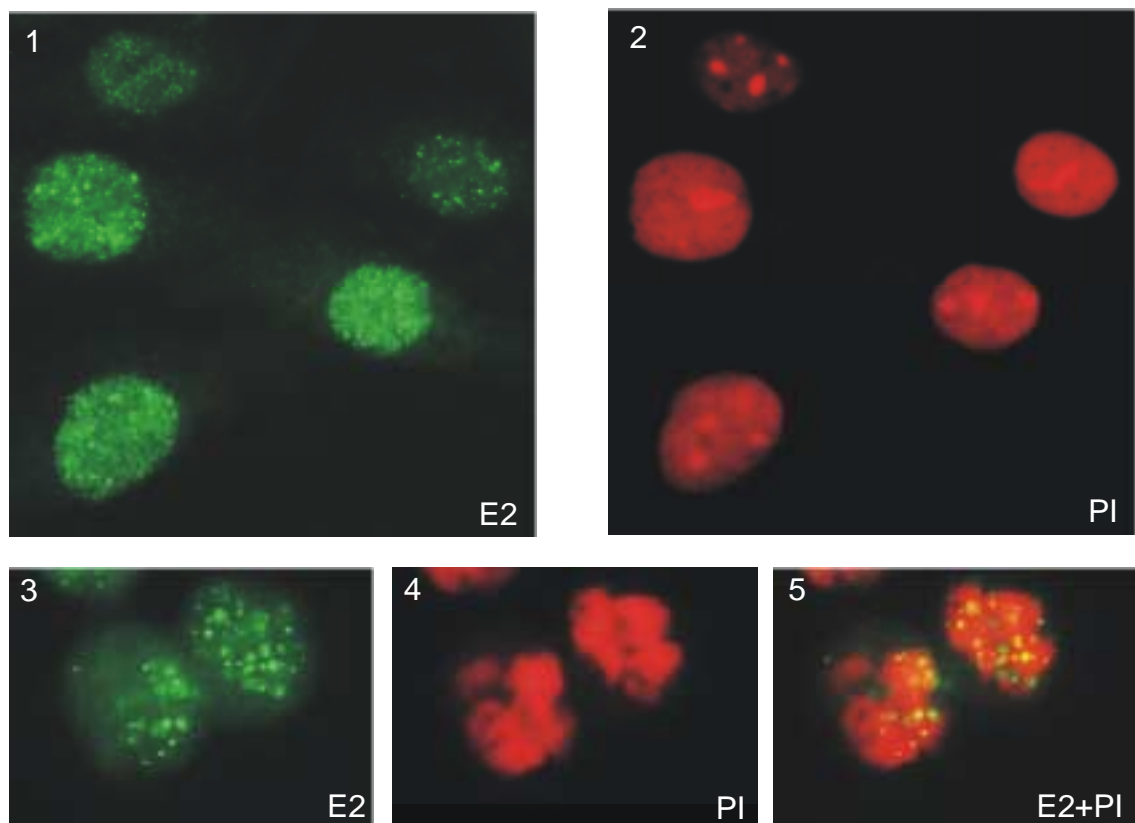
Rakud fikseeriti katte- või alusklaasidel metanool:atsetoon lahusega (1:1 vol) - 20°C juures 15 minutit. Seejärel eemaldati fiksaator ja lasti klaasidel kuivada. Järgnevalt pesti klaase PBS-iga ning blokeeriti 1% BSA lahusega PBS-is 30 minuti jooksul toatemperatuuril. Seejärel inkubeeriti primaarsete antikehadega 1 tund 1% BSA-PBS-is ja pesti siis 3x10 minutit PBS pesulahuses. Seejärel inkubeeriti klaase sekundaarse *anti-mouse*-FITC antikehaga (LabAs, Tartu) 1 tund 1% BSA-PBS-is, millele järgnes pesu 4x10 minutit PBS-iga. DNA visualiseerimiseks lisati viimase PBS pesu ajaks propiidiidijodiidi (PI) lõppkontsentratsioonis 50µg/ml ja inkubeeriti 10 minutit. Katteklaasid pesti destilleeritud veega ning asetati alusklaasidele lisades 15µl sulundusvedelikku. Preparaadid analüüsiti sobivate filtritega ja DX70 CCD kaameraga varustatud Olympus BX41 fluorestsentsmikroskoobi abil. Preparaatide pildistamisel kasutati 100x objektiivi suurendust. Saadud IF piltide analüüsil E2 ja PI signaalide kokkulangevuse määramiseks kasutati Adobe Photoshop *version 6.0* programmi (Adobe Systems, Mountain View, CA).

# TULEMUSED

## 1. BPV-1 E2 valgu lokaliseerimine raku tuumas

Seni ilmunud töödes on IF ja FISH meetodeid kasutades näidatud, et BPV-1 E2 valk ja BPV-1 genoomid lokaliseeruvad interfaasis raku tuuma ja on mitoosi faasis detekteeritavad juhusliku täpilise mustrina peremeesraku kromosoomidel (Skiadopoulos, M. H., 1998, Ilves, I., 1999, Allikas, A., 2001, Voitenleitner, C., 2002, Abroi, A., 2004).

Mudelsüsteemina E2 valgu lokaliseerimise ja interaktsioonide uurimisel kasutasin oma töös peamiselt CHO Bgl40 rakuliini, mis sisaldab minimaalseid *cis*- (täispikka BPV-1 URR piirkonda sisaldav ekstrakromosomaalne plasmiid pNeoBgl40) ja *trans*-faktoreid (E1 ja E2 valgud genoomi integreeritud kassetidelt), mis tagavad viiruse episomaalse püsimise peremeesrakus konstantse koopianumbriga läbi mitme rakutsükli, mimikeerides nii papilloomiviiruse replikatsiooni tema elutsükli latentse faasi ajal (Päärsoo, M., 1996). Eelkatsena E2 valgu lokaliseerimise kontrollimiseks antud rakuliinis kasutati katteklaasidel semikonfluentseks kasvatatud ja seejärel klaasidele fikseeritud CHO Bgl40 rakke. IF analüüsil oli E2 spetsiifiline signaal detekteeritav difuussete täppidena interfaasi rakkude tuumas (joonis 4. 1-2), rakutsükli mitoosi faasis olevate CHO Bgl40 rakkude puhul oli E2 spetsiifiline signaal jälgitav täpilise mustrina mitootilistel kromosoomidel (joonis 4. 3-5). Antud tulemused korreleeruvad varem avaldatud andmetega BPV-1 E2 rakusisese lokaliseerimise kohta nii rakutsükli mitoosi faasis kui ka interfaasis.



**Joonis 4.** BPV-1 E2 valgu lokaliseerimine CHO Bgl40 interfaasi rakkudes (1-2) ja rakutsükli mitoosi faasi rakkudes (3-5). E2 lokaliseerimine detekteeriti E2 spetsiifiliste antikehadega (1,3), paralleelselt visualiseeriti CHO Bgl40 rakkude DNA propiidiumjodiidiga (PI) värvides (2,4). Mitootiliste rakkude puhul on ära toodud E2 ja PI signaali kattuvus (5)

BPV-1 E2 valgu tuumasisese lokaliseerimise detailsemaks uurimiseks interfaasi rakkudes kasutati rakkude biokeemilise fraktsioneerimise meetodit. Antud meetodi erinevaid modifikatsioone on varem kasutatud näiteks imetajate ORC (*origin recognition complex*) valkude ja SWI/SNF (*mating type switching/ sucrose nonfermenting*) kompleksi valkude tuumasisese kompartmentaliseerimise kirjeldamiseks (Okuno, J., 2001; Reyes, J. S., 1997), aga on ilmunud ka kaks tööd, kus biokeemilise fraktsioneerimise meetodeid kasutades uuritakse PV E2 valgu rakkusisest lokaliseerimist (Hubbert, N. L., 1988; Zou, N., 2000).

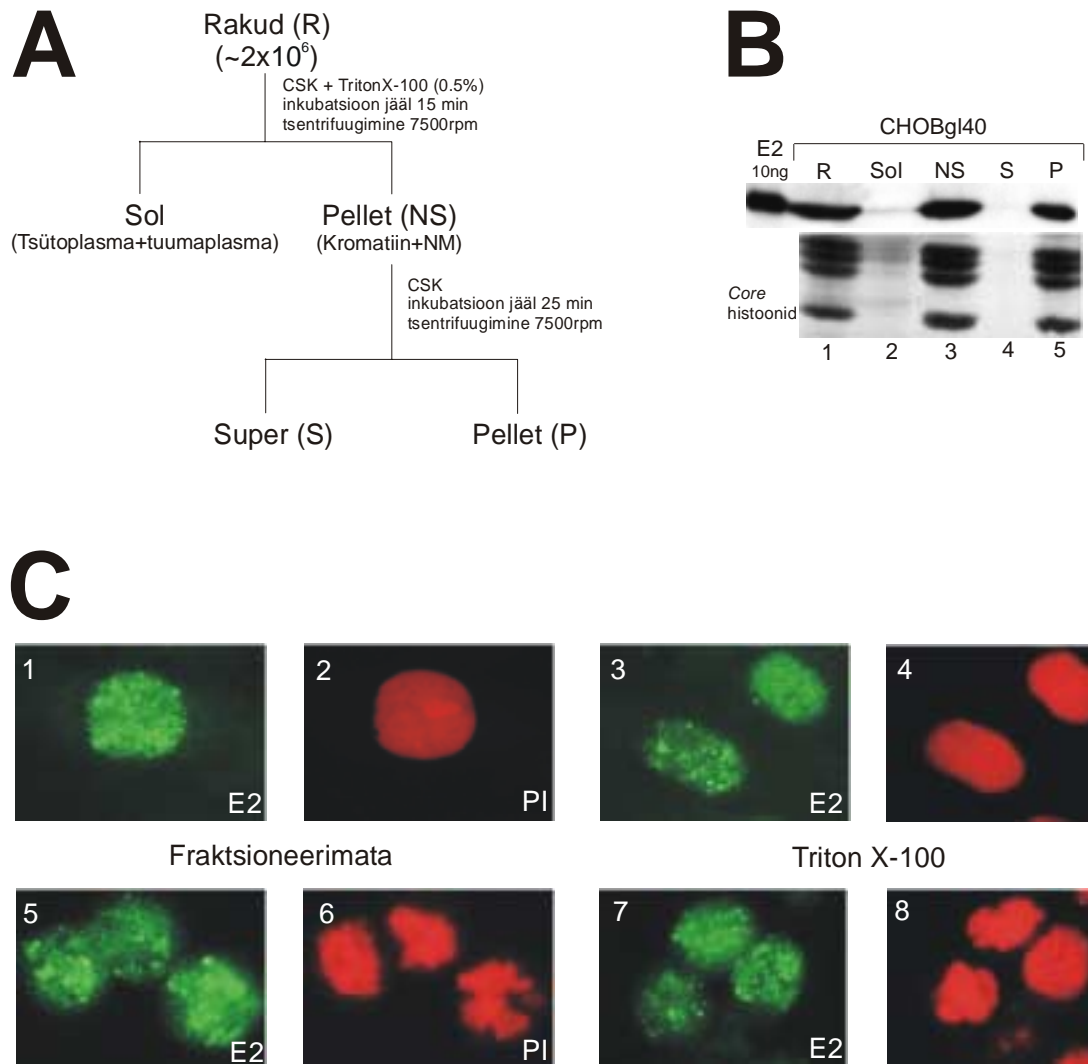
Põhiosa eksperimentaalsest tööst viidi läbi CHO Bgl40 rakuliiniga, samas kasutati edasises töös lisaks CHO Bgl40 rakuliinile veel E2TA ja erinevate E2TA

mutantseid valke kodeerivate plasmiididega poreeritud CHO rakuliini, kuna enamus seni ilmunud töödest, kus on jälgitud E2 valggu rakusisest lokaliseerimisele on läbi viidud mitte E2 valgu stabiilselt, vaid transientselt ekspresseerivates rakuliinides. Varem läbiviidud katsed on näidanud, et sarnaselt stabiilselt E2TA valgu ekspresseerivatele rakuliinidele on E2TA spetsiifiline signaal ka transientselt ekspresseerivates rakuliinides korral detekteeritav raku tuumas (Allikas, A., 2001).

E2 valggu tuumasisese lokaliseerimise edasiseks uurimiseks kasutatud biokeemilise fraktsioneerimise skeem on ära toodud joonisel 5A. Esimese sammuna fraktsioneerimisel lüüsi  $2 \times 10^6$  CHO Bgl40 rakku 0.5% Triton X-100 sisaldavas CSK puhvril, peale 15 minutist inkubatsiooni jääl eraldati lahustuvad valgud tsentrifuugides ja lüüsi Laemmli puhvril (see fraktsioon nimetati Sol (*soluble*) fraktsiooniks). Mitteioonse detergendiga lahustumatute tuumavalkudega fraktsioon (fraktsioon NS (*non-soluble*)) resuspendeeriti CSK puhvril ning paralleelsetes katsetes kas lüüsi kohe Laemmli puhvril või inkubeeriti täiendavalt 25 minutit jääl, eraldati supernatant (S) tsentrifuugides, sade (P-*pellet*) resuspendeeriti CSK puhvril ja seejärel lüüsi mõlemad fraktsioonid Laemmli puhvril.

Joonisel 5B on näha, et valdav osa E2 spetsiifilisest signaalist detekteeriti lahustumatus tuumafraktsioonis NS (rada 3). Täpsem analüüs UVP GelWorks 1D Intermediate *version 3.0* (Nonlinear Dynamics Ltd) programmi abil näitas, et mitteioonse detergendiga oli ekstraheeritav ~10% rakus olevast E2 hulgast (rada 2), ~90% rakus olevast E2 valgust oli detekteeritav mittelahustuvas tuumafraktsioonis NS (rada 3). Mittelahustuva tuumafraktsiooni täiendav inkubeerimine jääl ei põhjustanud E2 vabanemist fraktsioonist (rajad 4 ja 5). Rajal 1 on näha fraktsioneerimata CHO Bgl40 rakkude lüsaadi ( $2 \times 10^6$  rakku) E2 spetsiifiline signaal. BPV-1 E2 positiivse markerina on selle ja kõigi edasiste fraktsioneerimiste *Western blot* analüüsidel kasutatud *Escherichia coli*'st puhastatud BPV-1 E2 valgu (joonis 5B E210ng).

Kasutades CHO Bgl40 rakkude asemel transientselt E2 ekspresseerivates rakuliinides (CHO rakud, mida poreeriti 500ng pCGE2 vektoriga), saadi fraktsioneerimisel sarnane tulemus ehk valdav enamus E2 valgust oli detekteeritav lahustumatus kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonis.



**Joonis 5.** Rakkude biokeemilise fraksioneerimise üldskeem (A) ja vastavate CHOBgl40 fraksioonide *Western blot* (B) ja IF (C) analüüs BPV-1 E2 spetsiifiliste antikehadega. Paneelil C on näidatud paaride kaupa fraksioneerimata interfaasi (C 1-2) ja mitootiliste rakkude (C 5-6) ning mitteioonse detergendiga ekstraheeritud interfaasi (C 3-4) ja mitootiliste rakkude (C 7-8) IF analüüsi tulemused. Piltidel C 1,3,5,7 on BPV-1 E2 valgu spetsiifiline signaal. Rakkude DNA visualiseerimiseks värviti CHOBgl40 rakud propiidiumjodiidiga (C 2,4,6,8).

Erinevatel fraksioneerimise astmetel vabanevate rakuliste valkude summaarse kontsentratsiooni määramisel Bradfordi meetodil selgus, et  $\sim 60$ - $65\%$  kõigist raku valkudest olid ekstraheeritavad mitteioonse detergendiga. Lahustumatute valkude fraksioon sisaldas ka *core* histoone (histoon H2A-H2Bdimeerid ja H3-H4 tetrameerid), mida edaspidises töös on kasutatud kui kromatiini fraksiooni markerit. Kuna puudusid sobivad histoonide vastased antikehad, on geeli alumine osa enne valkude ülekannet

PVDF membraanile ära lõigatud ja värvitud Coomassie Brilliant Blue R-250 värviga valkude visualiseerimiseks (joonis 5B alumine osa).

Fraktsioon NS sisaldab kahte lahustumatut fraktsiooni: kromatiini, mis koosneb DNA-st ja DNA-ga assotsieerunud histoonsetest ja mittehistoonsetest valkudest ning tuumamaatriksit (*nuclear matrix/ nuclear scaffold*), mis on fibrogranulaarne struktuur, mida klassikaliselt biokeemiliselt defineeritakse kui tuuma seda osa, mis jääb alles peale tuumade töötlemist DNAasi-ga ja seejärel kõrgel soolakontsentratsioonil või liitium-3,5-dijodosalitsülaadiga ekstraheerimist (Pederson, T. 1998).

Läbiviidud biokeemilise fraktsioneerimise katsete tulemustest selgus, et E2TA valk on nii stabiilse kui transientse ekspressioonisüsteemi korral seotud raku tuuma kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooniga, raku lahustuvate valkude fraktsiooni lokaliseerus ~10% kogu rakus olevast E2 valgust. E2TA lokaliseerumine raku tuumas on varem näidatud BPV genoomiga transformeeritud C127 rakkudega läbiviidud analoogsetes fraktsioneerimiskatsetes, kus vähemalt 75% E2TA valgust leiti olevat assotsieerunud mitteioonse detergendiga lahustumatus tuumafraktsioonis (Hubbert, N. L., 1988). See tulemus korreleerub käesolevas töös kasutatud mudelsüsteemide fraktsioneerimistulemustega. Seega peegeldab meie poolt kasutatav mudelsüsteem (CHOBgl40 rakuliin) päris hästi tegelikkust mitte ainult varem kirjanduses näidatud plasmiidide säilitamise omaduse suhtes (Piiroo, M., 1996), vaid on adekvaatne ka E2 valgu rakusiseste interaktsioonide uurimisel.

Eelpoolkirjeldatud fraktsioneerimine viidi läbi samuti katteklaasidel ~70% konfluentsuseni kasvatatud CHOBgl40 rakkude puhul, mis võimaldas erinevate fraktsioneerimisastmete jälgimist IF meetodil fluorestsentsmikroskoobi abil (joonis 5C). Analüüsiti nii interfaasi (joonis 5C 1-4) kui ka rakutsükli mitoosi faasi (joonis 5C 5-8) sünkroniseeritud CHOBgl40 rakke. Mitootiliste rakkude puhul kasutati 100mm tassidel kasvatatud sünkroniseeritud rakkudelt *shake-off* meetodil (Wu, J.-R., 1997) saadud mitootilisi rakke, mis peale fraktsioneerimist fikseeriti alusklaasidele. Ekstraheerimine 0.5% Triton X-100 sisaldava CSK puhvriga (joonis 5C 3-4 ja 7-8) ei mõjutanud E2 spetsiifilise signaali intensiivsust või jaotumist võrreldes signaali intensiivsusega ja jaotumisega fraktsioneerimata rakkudes (joonis 5C 1-2 ja 5-6).

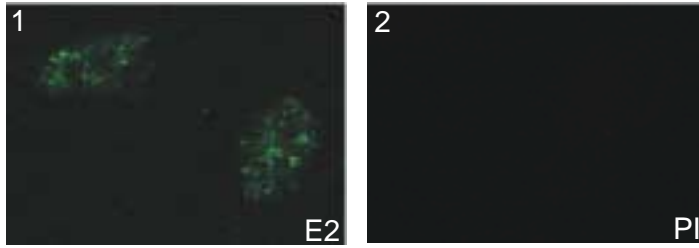
Rakkude biokeemilise fraktsioneerimise katsete tulemustest selgus, et BPV-1 E2 valk ei paikne interfaasi rakkude tuumas mitte difuusselt, vaid enamuse E2 valgust on

tuumas seotud mitteioonse detergendiga lahustumatutesse tuumakompartimentidesse ehk siis on seotud kromatiini või tuumamaatriksi valkudega.

### **1.1. BPV-1 E2 valk on interfaasis seotud raku kromatiiniga**

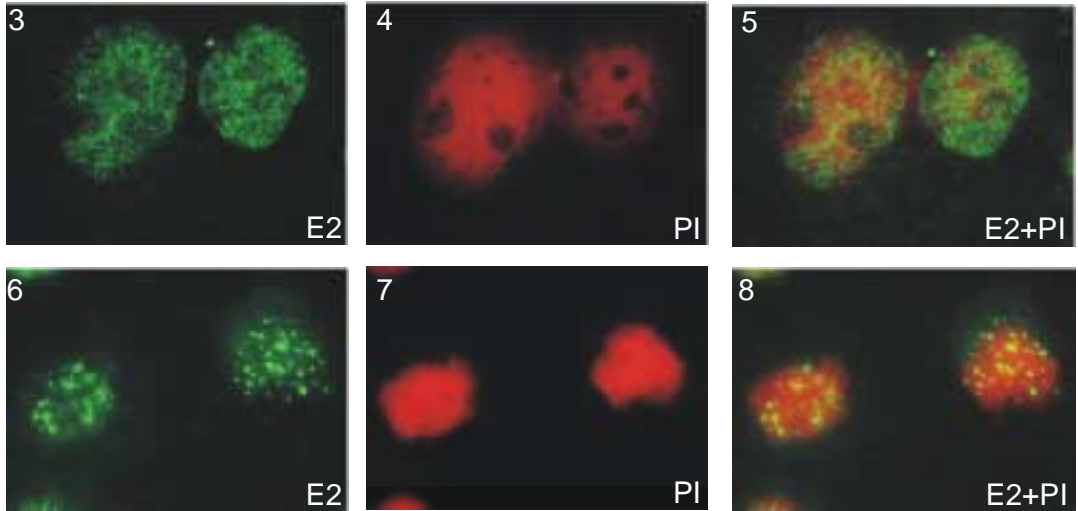
Kuna mitteioonse detergendi juuresolekul jäävad lahustumatuks raku tuuma komponentidest nii tuumamaatriks kui kromatiin, siis püüti edasises analüüsis uurida, kumma komponendiga E2 valk raku seotud on. Esimeses lahenduses uuriti kõigepealt E2 valguga interaktsioone raku DNA ja RNA-ga. Selleks inkubeeriti mitteioonse detergendiga ekstraheeritud rakutuumi (NS fraktsiooni) vastavalt DNAasi või RNAasiga 15 minutit toatemperatuuril ning eraldati seejärel lahustunud ja lahustumatu fraktsioon tsentrifuugides. Joonisel 6 on näha saadud fraktsioonide IF analüüsi tulemused, kus selgus, et RNAasi töötlus ei mõjutanud E2 spetsiifilise signaali intensiivsust ei mitotoiliste (joonis 6A 6-8) ega interfaasis olevate CHO Bgl40 rakkude puhul (joonis 6A 3-5), kuigi interfaasi rakkude puhul oli PI-ga värvitud tuumades jälgitav tuumakeste kadumine (joonis 6A 4). Samuti näitas RNAasi juuresolekul inkubeeritud fraktsioonide *Western blot* analüüs, et RNAasi mõjul E2 valk lahustumatust tuumafraktsioonist ei vabane (joonis 6C rajad 3 ja 5). Seevastu DNAasi juuresolekul inkubeeritud CHO Bgl40 interfaasi rakkude puhul oli IF analüüsil näha E2 signaali ~50% vähenemine (joonis 6A 1-2), kusjuures PI signaal ei olnud peale DNAasi töötlust detekteeritav (joonis 6A 2). Samuti oli fraktsioonide *Western blot* analüüsil näha E2 vabanemine lahustumatust tuumafraktsioonist DNAasi mõjul (joonis 6B rada 3 ja 5). Võrdlusena kasutati antud katsetes ilma DNAasi või RNAasi juuresolekuta CSK puhvril vastavatel tingimustel (15min ruumitemperatuuril) inkubeeritud kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioone (joonis 6B ja C rajad 1-2). Kuna E2 valk DNAasi mõjul osaliselt kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist vabanes, viitavad need andmed sellele, et vähemalt mingi osa kogu raku tuuma lokaliseeruvast BPV-1 E2 valgust on interfaasi rakkudes seotud kromatiiniga.

CSK+DNAas 20ng/μl

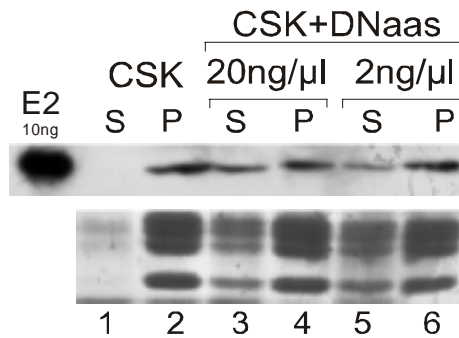


**A**

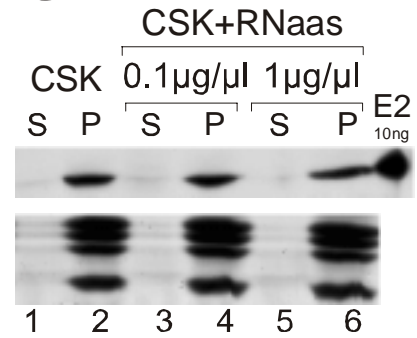
CSK+RNAas 1μg/μl



**B**



**C**



**Joonis 6.** CHO Bgl40 rakkude tuuma mittelahustuva kromatiini- tuumamaatriksi fraktsioonide DNAasi ja RNAasi töötuse analüüs jälgituna IF (A) ja Western blot (B ja C) meetoditel BPV-1 E2 vastaste antikehadega. Piltidel A 1,3,6 on BPV-1 E2 spetsiifiline signaal, rakkude DNA visualiseerimiseks värviti CHO Bgl40 rakud propiidiumjodiidiga (A 2,4,7). Samuti on ära toodud E2 ja PI signaali kattuvus (A 5,8). A 1-5 CHO Bgl40 interfaasi, A 6-7 rakutsükli mitoosi faasi rakud.

Meie laboris MNaasi töötuse abil läbi viidud kromatiini subfraktsioneerimise katsetes on selgunud, et kromatiiniga seotud BPV-1 E2 lokaliseerub nii nukleaasi tundlikusse kromatiini fraktsiooni kui ka nukleaasile mitte tundlikusse fraktsiooni (Kurg, R., publitseerimata andmed). Esimene neist kahest fraktsioonist sisaldab histoon H1-ga seotud kromatiini; teine tuumamaatriksit, aga ka aktiivselt transkribeeritavat kromatiini, mis pole ilmselt nukleaasile tundlik, kuna on seotud suurte valkkompleksidega nagu näiteks RNA polümeraasiga (Rose, S. M., 1984).

## **2. BPV-1 E2 valgu ja raku tuumastruktuuride vahelised interaktsioonid**

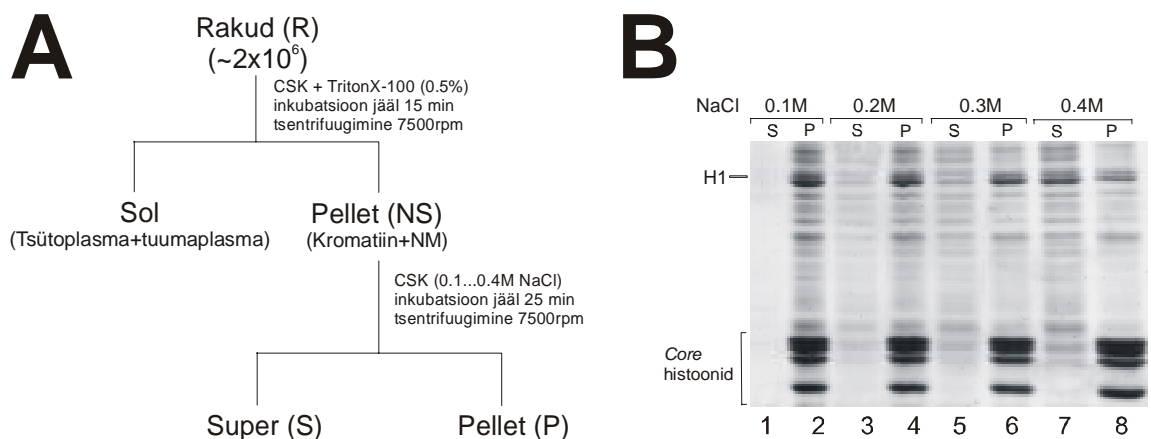
Tuumafraktsioone erinevatel soolakontsentratsioonidel ekstraheerides on vastavalt interaktsioonide tugevusele võimalik lahutada kromatiini ja tuumamaatriksiga assortseeruvad valgud. Kromatiiniga seotud valgud on defineeritud kui 0.45M NaCl või 100mM MgCl<sub>2</sub> juuresolekul lahustumatust tuumafraktsioonist ekstraheeruvad valgud. Vastavaid soolakontsentratsioone kasutatakse näiteks selliste kromatiini komponentide nagu histoon H1, mitmete transkriptsioonifaktorite ja HMG (*high mobility group*) valkude ekstraheerimiseks. Histoon H1 ja *core* histoonid vabanevad kromatiinilt erinevatel NaCl kontsentratsioonidel - histoon H1 elueerub kromatiinilt tüüpiliselt 0.3...0.45M NaCl juuresolekul, H2A-H2B dimeerid ~0.8M NaCl ja H3-H4 tetrameerid ~1.2M NaCl tingimustes (Li, W., 1993). Biokeemiliselt defineeritakse tuumamaatriksit klassikaliselt kui tuuma seda fraktsiooni, mis jääb alles peale DNAasi töötlust ja 2M NaCl- ga ekstraheerimist (Pederson, T. 1998).

Fraktsioneerimiste kontrollina ongi kõigi läbiviidud katsete puhul kasutatud histoone kromatiini fraktsiooni markerina. Kuna sobivad histoone vastased antikehad puudusid, lõigati enne valkude ülekannet PVDF membraanile ära geeli alumine osa, kus valgud visualiseeriti Coomassie Brilliant Blue G-250 värviga. See samm võimaldas hinnata nii lüsaatide hulga samaväärsust geeli erinevatel radadel kui ka välistada võimalus, et jälgitavad efektid on rakkude ebaspetsiifilise lüüsi tulemus.

E2 valgu ja lahustumatu tuumafraktsiooni vaheliste interaktsioonide uurimiseks resuspendeeriti 0.5% Triton X-100 sisaldava puhvriga töödeldud lahustumatud

tuumafraktsioonid paralleelsetes katsetes CSK puhvrites, mis sisaldasid NaCl lõppkontsentratsioonidest vastavalt 0.1M, 0.2M, 0.3M ja 0.4M (joonis 7A). Vastavatel soolakontsentratsioonidel ekstraheerunud valgud eraldati lahustumatust tuumafraktsioonist tsentrifugimises ning erinevate fraktsioonide valgulüsaadid analüüsiti *Western blot* meetodil E2 spetsiifiliste antikehade abil. Läbiviidud katsetes oli samuti jälgitav histoon H1 vabanemine ~0.4M NaCl juuresolekul (joonis 7B).

Katsed viidi läbi vähemalt neljas korduses ja analüüsiti nii *Western blot* kui ka IF meetodeil. *Western blot* analüüsi tulemusi hinnati UVP GelWorks 1D Intermediate *version 3.0* programmi abil, tulemuste tõlgendamisel arvestati keskmise tulemusega. Samuti mõõdeti vastavate fraktsioneerimiste käigus vabaneva raku totaalvalgu kontsentratsioon Bradfordi meetodil.



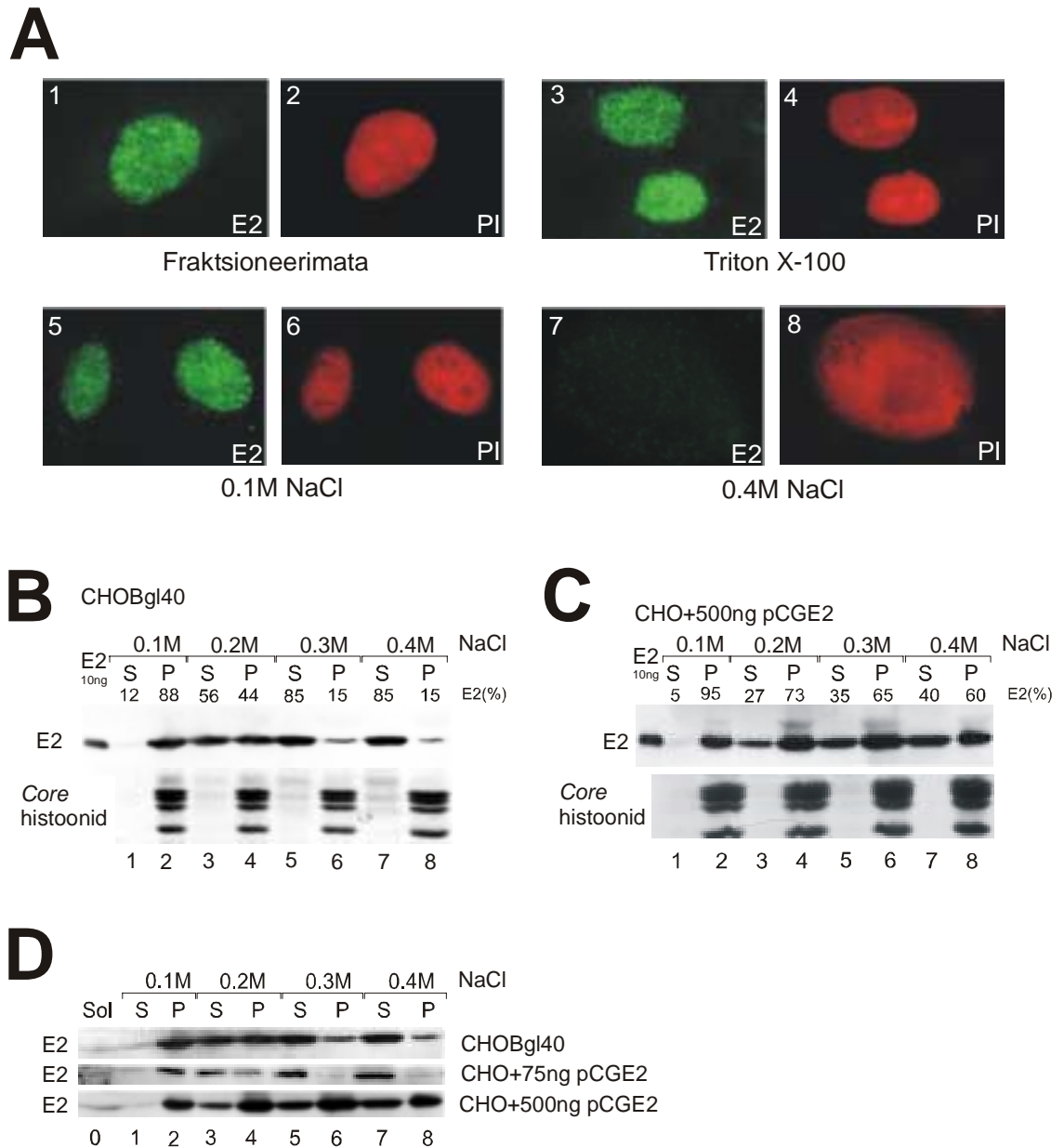
**Joonis 7.** Subnukleaarse fraktsioneerimise üldskeem (A) ja histoonide elueerumine NS fraktsioonist erinevatel NaCl kontsentratsioonidel CSK puhvris inkubeerimisel (12% SDS-PAAG, värvitud Coomassie Brilliant Blue-ga) (B).

Bradfordi meetodil raku totaalvalgu kontsentratsiooni mõõtmisel selgus, et kui mitteioonse detergendi abil ekstraheeritav ~60-65% raku kogu valgu hulgest, siis 0.4M NaCl sisaldavas CSK puhvris inkubeerimisel ekstraheerus täiendavalt pool raku kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni jäänud valkudest ehk ~20% totaalvalgust.

Algsel 0.1M NaCl kontsentratsioonil NS fraktsiooni ekstraheerides oli CHOBgl40 rakuliinis E2 valgust lahustuv ~10% kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonis olevast E2 valgust (joonis 8B rada 1), 0.2M NaCl juuresolekul vabanes fraktsioonist ~55% E2 valgust (joonis 8B rada 3). 0.3M NaCl sisaldavas puhvril inkubeerimisel vabanes fraktsioonist ~85% E2 valgust ja jäi lahustumatu fraktsiooniga seotuks ~15% E2 valgust, 0.4M NaCl juuresolekul vabanes fraktsioonist 0.3M NaCl sarnaselt samuti ~85% E2 valgust (joonis 8B rada 5-6 ja 7-8). Katteklasil kasvatatud rakkude puhul analoogse fraktsioneerimise läbiviimisel oli näha, et 0.1M NaCl sisaldavas CSK puhvril inkubeeritud klasil (joonis 8A 5-6) E2 spetsiifilise signaali intensiivsus ei vähenenud võrreldes mitteioonse detergendiga ekstraheeritud rakkude (joonis 8A 3-4) või fraktsioneerimata rakkudega (joonis 8A 1-2). 0.4M NaCl sisaldava CSK puhvril inkubeerimisel E2 vabanes tuumastruktuuridelt (joonis 8A 7-8), IF analüüsil polnud E2 signaal praktiliselt detekteeritav, mõningatel juhtudel oli jälgitav rakkude tuumapiirkondadega korreleeruv nõrk täpilise mustril moodustav signaal.

Kuna 0.45M NaCl kontsentratsioonil ekstraheerimist kasutatakse tavaliselt erinevate kromatiinikomponentide, nagu näiteks transkriptsioonifaktorite, histoon H1 ja HMG valkude ekstraheerimiseks ja tuumamaatriksi komponendid ei ole soolatuundlikud, siis võib antud eksperimentide tulemuste põhjal väita, et BPV-1 E2 seondub interfaasis rakulise kromatiiniga ja on 0.3M NaCl juuresolekul kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist 85% ulatuses ekstraheeritav (joonis 8B rada 5).

Stabiilselt E2 valku ekspresseeriva CHOBgl40 rakuliini asemel 500ng pCGE2 vektoriga poreeritud CHO rakkude fraktsioneerimise analüüsil selgus, et kuigi E2 valk jäi sarnaselt CHOBgl40 rakuliinile 0.1M NaCl kontsentratsioonil valdavalt lahustumatusse fraktsiooni (~95% lahustumatus tuumafraktsioonis olevast E2 valgust)(joonis 8C rada 2), vabanes 0.4M NaCl kontsentratsioonil tuuma lahustumatust fraktsioonist alla poole kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooniga assotsieerunud E2 valgu hulgast (~40%) (joonis 8C rada 7).



**Joonis 8.** Erinevatel soolakontsentratsioonidel kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist ekstraheeritava E2 valgu analüüs *Western blot* (B,C,D) ja IF (A) meetoditel BPV-1 E2 spetsiifiliste antikehadega. Piltidel A 1,3,5,7 on BPV-1 E2 spetsiifiline signaal, CHOBgl40 rakkude DNA visualiseerimiseks värviti CHOBgl40 rakud propiidiumjodiidiga (A 2,4,6,8). Paneelidel B ja C on ära toodud erinevatel soolakontsentratsioonidel kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist ekstraheeritava E2 valgu hulk protsentides (nelja katse keskmine tulemus), jooniste alumisel osal on näidatud fraksioneerimise markerina kasutatud Coomassie Brilliant Blue-ga värvitud *core* histoonid.

Selline erinev E2 valgu ja kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni vahelise interaktsiooni soolasõltuvus võiks viidata E2 valgu erinevale kompartmentalisatsioonile raku tuumas CHO Bgl40 rakuliinis ja pCGE2 vektoriga transfekteeritud CHO rakkudes. Stabiilses rakuliinis oli E2 0.3M NaCl juuresolekul kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist valdavalt (~85% ulatuses) ekstraheeritav, transientse E2 valgu ekspressioonisüsteemi korral oli samadel tingimustel ekstraheeritav vaid ~35% kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooniga seotud E2 valgust.

Edasised katsed näitasid siiski seda, et kuigi transientselt ekspresseeritav E2 ekstraheerub erinevatel soolakontsentratsioonidel vähem kui stabiilselt ekspresseeritav E2, kaovad eelpoolkirjeldatud erinevused E2 NS fraktsioonist ekstraheerumise osas juhul, kui CHO rakke transfekteerida väiksema koguse pCGE2 vektoriga. Joonisel 8D on ära toodud 75ng pCGE2 vektoriga transfekteeritud CHO rakkude erinevatel soolakontsentratsioonidel ekstraheerimise analüüs võrrelduna CHO Bgl40 ja 500ng pCGE2 vektoriga transfekteeritud CHO rakkudega läbiviidud katsete tulemustega.

Nende katsete tulemused viitavad võimalusele, et E2 valgu üleekspressiooni korral moodustub kaks erinevat E2 fraktsiooni: esimene on kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist ekstraheeritav samadel tingimustel, kui stabiilselt ekspresseeruv E2, teine fraktsioon pole aga soolatundlik. See võib viidata sellele, et E2 valgu kromatiinile seondumist vahendav rakuline komponent on küllastatav ehk kui valku ekspresseeritakse rohkem, kui on võimalikke seondumiskohti rakus, toimub E2 valgu kompartmentaliseerumine raku tuumas kusagile mujale. E2 valku stabiilselt ekspresseerivates rakkudes on E2 ekspressioonitase tunduvalt madalam kui E2 transientse üleekspressiooni korral.

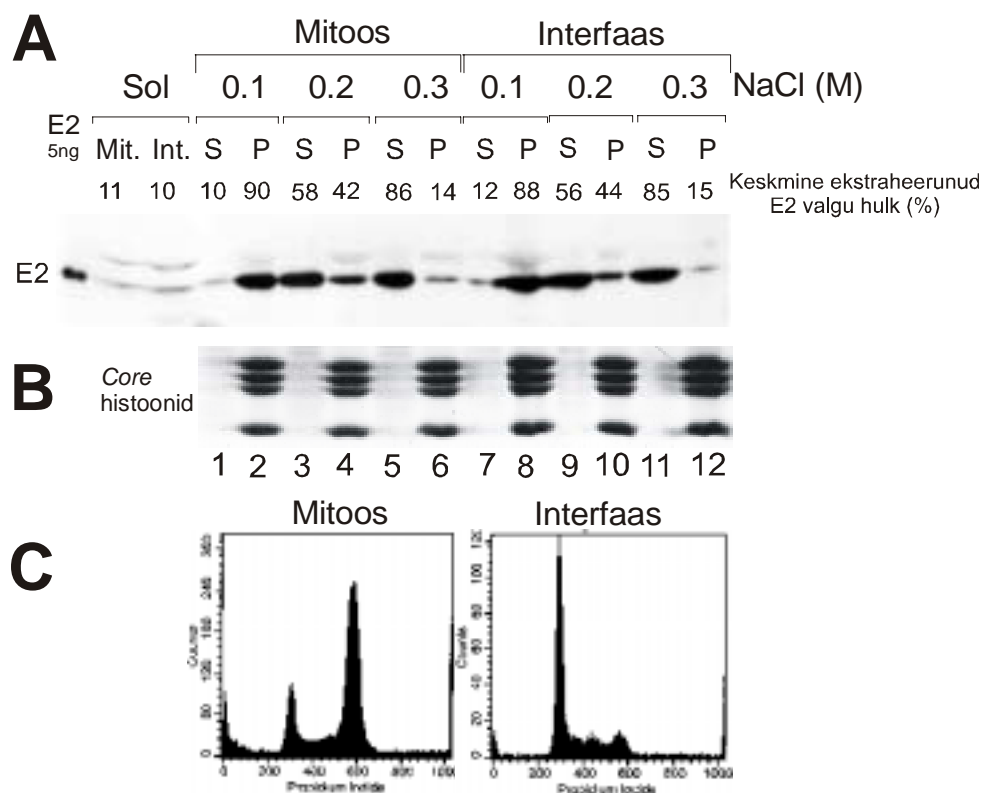
Meie laboris on läbi viidud analoogsed fraktsioneerimiskatsed ka CHO49 rakuliiniga, mis ekspresseerib E2 võrreldes CHO Bgl40 rakuliiniga palju madalamal tasemel ja BPV-1 genoomiga transformeeritud C127 rakuliiniga, kus E2 valgu tase rakus võiks vastata E2 natiivsele tasemele peremeesrakkudes. Mõlema rakuliini puhul leiti fraktsioonide analüüsil, et E2 valk on detekteeritav kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonis ja on sealt 0.4M NaCl abil ekstraheeritav (Kurg, R., publitseerimata). Need tulemused korreleeruvad CHO Bgl40 rakuliini fraktsioneerimisel saadud tulemustega, seega on see rakuliin E2 valgu tuumasiseste interaktsioonide uurimiseks

mudelsüsteemina adekvaatne, kuna E2 valgu ekspressioonitase rakus on piisavalt madal.

### **3. BPV-1 E2 valk võib rakutsükli erinevates faasides olla seotud sama rakulise partneriga**

Selleks, et võrrelda E2 valgu afiinsust kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni suhtes rakutsükli erinevates faasides, blokeeriti stabiilselt E2 valku ekspresseerivad CHO Bgl40 rakud mitoosi metafaasi kolhitsiini töötamise abil, millele järgnes mitootiliste rakkude *shake-off*, koekultuuri tassidele jäänud rakud koguti kui interfaasis olevate rakkude populatsioon. Osa mõlemast rakupopulatsioonist analüüsiti FACS meetodil. Mitootilised ja interfaasi CHO Bgl40 rakud fraktsioneeriti ekstraheerides kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioone eelpoolkirjeldatud viisil paralleelselt 0.1M, 0.2M ja 0.3M NaCl sisaldavas CSK puhvril. Erinevusi mitootilistest ja interfaasi rakkudest pärineva E2 valgu ekstraheeritavuses kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist erinevatel soolakontsentratsioonidel ei täheldatud, nii mitootiliste kui interfaasi rakkude puhul oli E2 valk 0.3M NaCl sisaldavas puhvril lahustumatust fraktsioonist 85% ulatuses ekstraheeritav (joonis 9 rajad 5 ja 11). Tulemuste tõlgendamisel arvestati kolme katse keskmise tulemusega.

Lähtudes nendest tulemustest võiks BPV-1 E2 olla nii interfaasi kui mitootiliste rakkude tuumades assotsieerunud ühe ja sama rakulise partneriga, kuna erinevate soolakontsentratsioonide mõju E2 valgu ekstraheeritavusele kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist on sarnane nii rakutsükli interfaasi kui ka mitoosi faasis olevate rakkude puhul. Alternatiivselt on muidugi võimalik, et mitoosis ja interfaasis on E2 valgu rakulised partnerid küll erinevad, aga nende interaktsiooni tugevus E2 valguga on äärmiselt sarnane, sest nii mitoosi kui interfaasi rakkude puhul oli 0.3M NaCl sisaldava CSK puhvril inkubeerimisel kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist ekstraheeritav ~85% antud fraktsioonis olnud E2 valgu hulga.

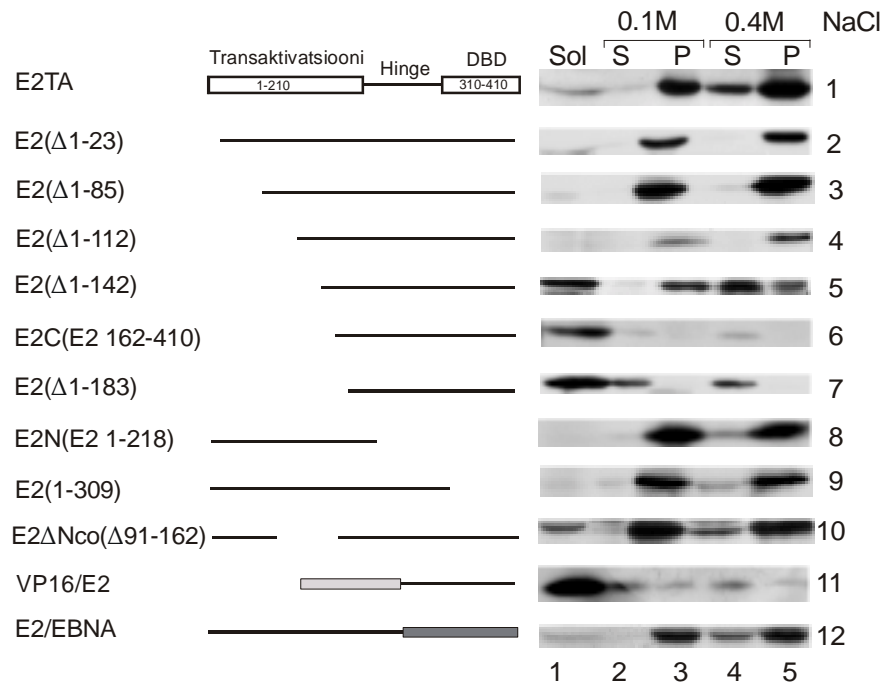


**Joonis 9.** CHO Bgl40 mitootiliste ja interfaasi rakkude kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni erinevatel soolakontsentratsioonidel fraktsioneerimise *Western blot* analüüs BPV-1 E2 vastaste antikehadega (A). Joonise alumisel osal on ära toodud rakutsükli FACS analüüsi tulemused (C). Fraktsioneerimise markerina on kasutatud Coomassie Brilliant Blue-ga värvitud histoonid (B).

#### 4. BPV-1 E2 valgu mutantide ja raku tuumastruktuuride vahelised interaktsioonid

Selleks, et kindlaks määrata, millised E2 valgu piirkonnad on antud katsetes kasutatud biokeemilise fraktsioneerimise kriteeriumide alusel E2 tuumasisesse lokaliseerimise eest vastutavad, viidi eelpoolkirjeldatud fraktsioneerimiskatsed läbi ka mitmete BPV-1 E2 mutantsete valkudega. Antud katse läbiviimiseks transfektsiooni rakke 500ng erinevaid BPV-1 E2 valgu mutante kodeerivate pCG vektoritega ja fraktsioneeriti rakud 24h peale poratsiooni. Eelnevalt täispika E2 valguga läbiviidud E2TA ja kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni vaheliste interaktsioonide analüüsi tulemustest lähtuvalt kasutati kromatiini-tuumamaatriksi inkubeerimisel CSK puhvrit, mis sisaldas kas 0.1M või 0.4M NaCl. Saadud tulemusi võrreldi 500ng pCGE2

vektoriga transfekteritud CHO rakkude fraktsioneerimiskatsetest saadud tulemusega (joonis 10 rida 1).



**Joonis 10.** Erinevaid BPV-1 E2TA mutante kodeerivate pCG vektoritega transfekteritud CHO rakkude fraktsioneerimiskatsete tulemuste *Western blot* analüüs BPV-1 E2 vastaste antikehadega. Joonise vasakul poolel on skemaatiliselts ära toodud vastava E2 mutandi kodeeritav piirkond E2TA valgust, joonise paremal poolel on toodud vastavate valkude biokeemilisel fraktsioneerimisel saadud E2 valgu jaotumine raku lahustuvate tuumavalkude fraktsiooni (Sol) ja lahustumatust kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist 0.1M või 0.4M NaCl juuresolekul ekstraheerunud valkude fraktsiooni vahel.

Joonisel 10 on näha, et E2C valk (E2TR), mis sisaldab E2 aa 162-410, oli rakkudest ekstraheeritav juba mitteioonse detergendifga (joonis 10 rada 1 rida 6). E2C valgule sarnaselt lokaliseerusid samasse fraktsiooni kimäärne VP16/E2 valk (sisaldab E2 C-terminaalset domeeni ja *Herpes simplex* viiruse VP16 valgu transaktivatsiooni-domeeni) (joonis 10 rada 1 rida 11) ja E2 184-410 aa kodeeriv E2Δ1-183 valk (joonis 10 rada 1 rida 7). Erinevalt E2C valgust lokaliseerus E2TA valgu transaktivatsiooni domeeni kodeeriv valk E2N (E2 1-218) raku tuuma kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni (joonis 10 rada 3 rida 8). Kimäärne E2/EBNA valk, mis sisaldab E2 transaktivatsioonidomeeni ja EBV EBNA1 valgu DBD domeeni ja E2(1-309) valk (sisaldab E2 N-terminaalset domeeni ja hinge regiooni) fraktsioneerusid saraselt E2N

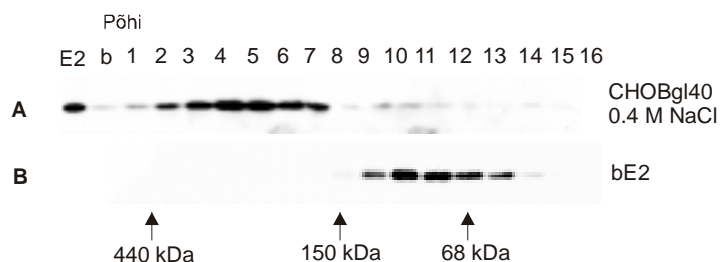
valgule (joonis 10 rada 3 read 12 ja 9). Kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni ekstraheerimisel 0.4M NaCl juuresolekul oli täispika E2 valguga sarnaselt fraktsioonist ekstraheeritav vaid kimäärne E2/EBNA valk (joonis 10 rada 4 rida 12)

Nendest katsetest saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et E2TA N-terminaalne transaktiivatsiooni domeen, aga mitte C-terminaale DBD domeen on vajalik E2 valguga interaktsiooniks kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooniga. Kuna DBD domeen ei osale antud interaktsiooni vahendamisel, on antud tulemused kooskõlas arvamusega, et E2 seondumist kromatiinile vahendab mingi valguline faktor ja E2 valk otse rakulisele DNA-le ei seonu.

Lisaks eelpoolkirjeldatud mutantidele viidi katsed läbi veel mitmete teiste E2 valguga mutantidega, nende katsete tulemused olid aga mõnevõrra vastuolulised. E2 $\Delta$ Nco valk (mis sisaldab sisemist deletsiooni E2TA aa 91-162) fraktsioneerus sarnaselt E2N valguga kromatiini tuumamaatriksi fraktsiooni ja oli E2N valguga võrreldaval määral sellest fraktsioonist 0.4M NaCl juuresolekul ekstraheeritav (joonis 10 rida 10). Samas leidis seda mutanti ka Sol fraktsioonis, kuigi seda vähesel määral võrreldes kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooniga (joonis 10 rada 1 ja 3 rida10). E2 $\Delta$ Nco valguga puhul võib antud juhul olla tegu üleekspressioonist tingitud efektiga. E2N mutantidele sarnaselt käitusid fraktsioneerimiskatsetes veel E2TA deletandid E2 $\Delta$ 1-23, E2 $\Delta$ 1-85 ja E2 $\Delta$ 1-112 (joonis 10 rada 3 read 2, 3 4), mis lokaliseerusid samuti kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni, kuid samas oli E2 $\Delta$ 1-23, E2 $\Delta$ 1-85 ja E2 $\Delta$ 1-112 mutantide analüüsil oli näha, et nende deletantide puhul ei toimu E2 mutantse valguga vabanemist kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist 0.4M NaCl juuresolekul (joonis 10 rada 4 read 2, 3, 4). E2 $\Delta$ 1-142 valgust ~50% lokaliseerus lahustuvasse Sol fraktsiooni (tsütoplasma + tuumaplasma) ja ~60% lahustumatusse kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni jäänud valgust oli ekstraheeritav 0.4M NaCl juuresolekul puhvril (joonis 9 rida 5). Antud valkude puhul on võimalik, et deletsioonid E2 N-terminaalse domeeni alguses häirivad valguga pakkumist ja seetõttu toimub tekkinud agregaatide ladustamine rakkudes kuhugi vähem soolatuundlikesse tuumakompartimentidesse. Kirjanduse andmetel põhjustab juba E2TA esimese 23 aa deleteerimine täieliku kromosoomidega seostumise võime kadumise E2 valgul (Abroi, A., 2004). Samuti on varem täheldatud E2 valguga N-terminaalse struktuuri muutusi antud deletsioonide korral (Kurg, R., 1999).

## 5. Lahustumatust tuumafraktsioonist 0.4M NaCl juuresolekul ekstraheeritava BPV-1 E2 valgu iseloomustamine

Meie laboris on varem püütud määrata CHO Bgl40 rakkudes 0.4M NaCl juuresolekul kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist vabaneva E2 valgu suurust, kasutades selleks glütserooli gradiendi sedimentatsiooni profiili analüüsi. Selleks fraktsioneeriti CHO Bgl40 rakud antud töös juba eelpool kirjeldatud viisil ja 0.4M NaCl juuresolekul kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist vabanenud valgud lahutati ultratsentrifuugides läbi 10-40% glütserooli gradiendi. Seejärel jagati 5ml gradient 16-ks fraktsiooniks, milles E2 valgu jaotuvus määrati *Western blot* meetodil (joonis 11A).

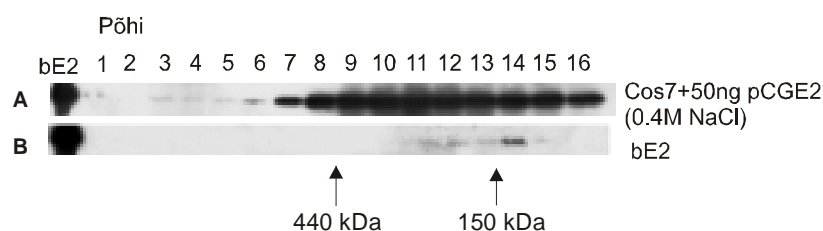


**Joonis 11.** CHO Bgl40 rakkudes 0.4M NaCl juuresolekul ekstraheeruvate valkude (A) ja bakteriaalselt puhastatud BPV-1 E2 valgu (B) glütserooli gradiendi (10-40%) sedimentatsiooni profiili analüüs *Western blot* meetodil BPV-1 E2 valgu vastaste antiikehadega. Glütserooli gradiendis ultratsentrifuugimise aeg oli 14h (Kurg, R., publitseerimata).

Paralleelsel gradiendil analüüsitud bakteriaalselt puhastatud E2 valk detekteeriti *Western blot* analüüsil fraktsioonides 9-14 (joonis 11B rajad 9-14). E2 valk on lahuses dimeerina molekulmassiga 98kDa ja bakteriaalselt puhastatud E2 sedimenteerub gradiendis vastavalt sellele molekulmassile. Nagu näha joonisel 11, leiti 0.4M NaCl juuresolekul vabanenud valkude analüüsil, et kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist vabanenud E2 liikus läbi glütserooli gradiendi aeglasemalt kui dimeerne E2 valk ja moodustas laia piigi (joonis 11A rajad 1-8). Need tulemused näitasid, et soolaga lahustumatust tuumafraktsioonist ekstraheeritud E2 ei sedimenteeru glütserooli gradiendil vaba dimeerse valgu kiirusega – enamuse E2 valgust detekteeriti fraktsioonides, mis vastavad ~300kDa kompleksile, samuti lokaliseerus osa signaalist

tetrameersele E2 valgule (192kDa) vastavatesse fraktsioonidesse (joonis 11). Nendest katsetest võib järeldada, et E2 vabaneb kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist kompleksis mingite valkudega või oligomeerina. Kuna sarnane tulemus saadi ka ainult E2 valku sisaldavat CHO49 rakuliini kasutades, siis ilmselt BPV-1 E1 valku antud kompleksis pole (Kurg, R., publitseerimata).

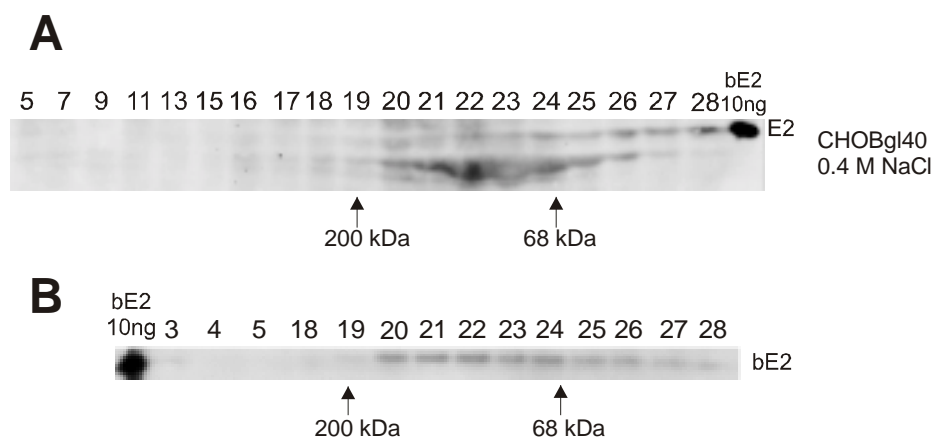
Antud tulemustest lähtuvalt analüüsisin edasises töös lisaks CHO Bgl40 rakuliinile 50ng pCGE2 vektoriga transfekteeritud cos7 rakuliini. Poreeritud cos7 rakud võeti kasutusele sellepärast, et edasises töös taheti analüüsida valkkomplekse ning kuna transfekteeritud cos7 rakkude puhul on E2 ekspressioonitase rakus kõrgem kui CHO Bgl40 rakuliinis, siis on lähtuvalt suuremast materjalihulgast lihtsam võimalike komplekside analüüsi läbi viia. Samuti on cos7 rakkude puhul võimaliku kompleksi komponentide identifitseerimine kergem kui CHO rakkude puhul, kuna hamstri valgud on vähem uuritud kui ahvi omad. E2 valguga transfekteeritud rakkude 0.4M NaCl juures lahustuvate valkude lahutamisel 10–35% glütserooli gradiendil saadud fraktsioonide analüüsil selgus, et tugeva üleekspressiooni tingimustes leidub E2 valku praktiliselt kõigis kogutud fraktsioonides, suuremal määral fraktsioonides 7–16 (joonis 12A). Paralleelsel gradiendil analüüsitud bakteriaalselt puhastatud E2 valk detekteeriti *Western blot* analüüsil fraktsioonides 11-15, tugevaim signaal oli detekteeritav fraktsioonis 14, mis vastab umbes dimeerse E2 valgu liikumiskiirusele glütserooli gradiendis (joonis 12B rajad 11-15)



**Joonis 12.** 50ng pCGE2 vektoriga transfekteeritud cos7 rakkudes 0.4M NaCl juuresolekul ekstraheeruvate valkude (A) ja bakteriaalselt puhastatud BPV-1 E2 valgu (B) glütserooli gradiendi (10-35%) sedimentatsiooni profiili analüüs *Western blot* meetodil BPV-1 E2 valgu vastaste antikehadega. Vastavid lüsaate ultratsentrifuugiti 4h.

Lisaks 0.4M NaCl juuresolekul lahustuvate tuumafraktsioonide analüüsimisele glütserooli gradiendil viidi läbi nimetatud fraktsiooni lahutamine geelfiltratsioonil

Sepharose 6 kolonnil. Võrdlevalt lahutati geelfiltratsioonil veel bakteriaalselt puhastatud E2 valk ja erinevate markerite segu. Kogutud fraktsioonid (à 500µl) sadestati TCA-ga ja analüüsiti *Western blot* meetodil BPV-1 E2 vastaste antikehadega (joonis 13).



**Joonis 13.** CHO Bgl40 rakkudes 0.4M NaCl juuresolekul ekstraheeruvate valkude (A) ja bakteriaalselt puhastatud BPV-1 E2 valgu (B) Superose 6 maatriksil läbi viidud geelfiltratsioonil saadud fraktsioonide analüüs *Western blot* meetodil BPV-1 E2 valgu vastaste antikehadega. Markerina *Western blot* analüüsil on kasutatud bakteriaalselt puhastatud E2 valku, joonisel on märgitud analüüsitud fraktsioonide numbrid.

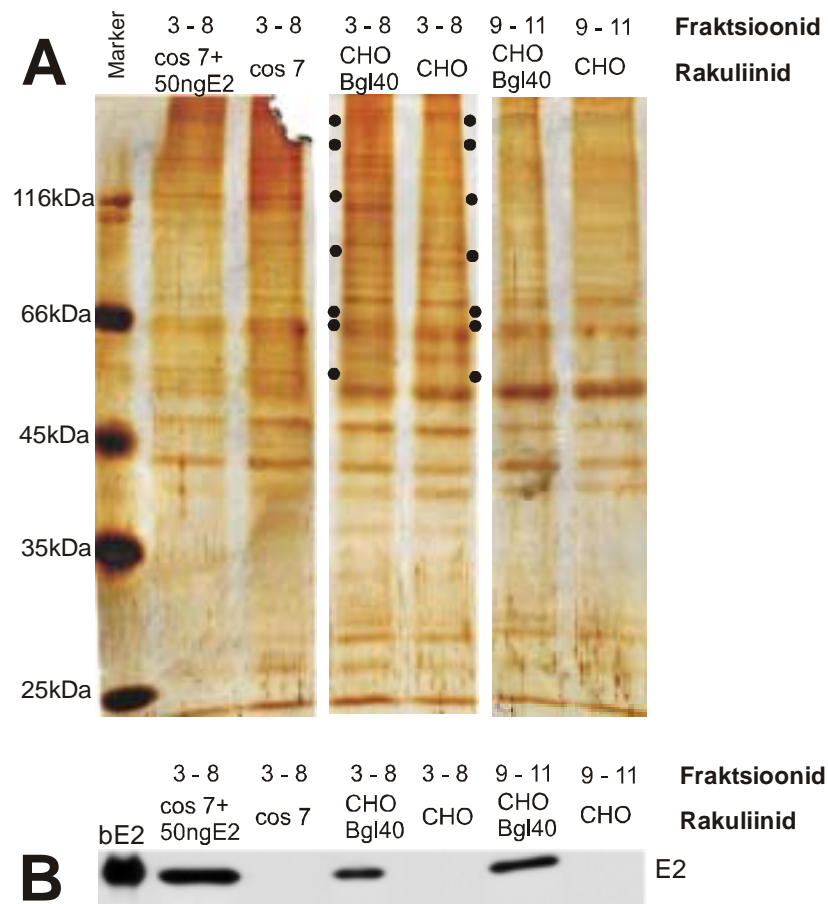
*Escherichia coli*'st puhastatud BPV-1 E2 valgu geelfiltratsioonilt saadud fraktsioonide analüüsil oli E2 signaal detekteeritav fraktsioonides 20–26, kus kasutatud markerite põhjal võiksid lokaliseeruda alla 200kDa valgud (joonis 13B). Kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist 0.4M NaCl juuresolekul ekstraheeruvate valkude lüsaadi geelfiltratsioonil saadud fraktsioonide analüüs näitas, et sarnaselt bakteriaalsele E2 valgule oli E2 signaal detekteeritav alla 200kDa valkude fraktsioonis, samuti oli geelil näha E2 valgu laguprodukte fraktsioonides 20–25 (joonis 13A).

Need tulemused näitasid, et glütserooli gradientide sedimentatsiooni profiili analüüsil kõrgema molekulmassiga valkude fraktsioonides detekteeritav E2 signaal polnud antud tingimustes geelfiltratsioonil detekteeritav. See võiks viidata võimalusele, et juhul kui E2 vabaneb kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist kompleksis mingite

teiste valkudega, siis E2 interaktsioon selle kompleksiga on liiga nõrgad, et seda kompleksi geelfiltratsioonil saaks eraldada.

Kuna geelfiltratsioonil kõrgema molekulmassiga valkude fraktsioonides polnud E2 signaal detekteeritav, siis kasutati edasiseks analüüsiks glütserooli gradiendil lahutatud valgulüsaate. Selleks lahutati 5-milliliitrisel 10-35% glütserooli gradiendil võrdlevalt kas pCGE2 vektoriga transfekteeritud *cos7* ja transfekteerimata *cos7* rakuliini või CHO Bgl40 ja CHO rakuliini kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist 0.4M NaCl juuresolekul ekstraheeruvate valkude lüsaat (à 250µl). Gradient jagati taas 16-neks fraktsiooniks, millest edasiseks analüüsiks koguti kokku fraktsioonid 3-8 ja 9-11, kus viid läbi immunosadestamine (IP) 3E8 antikehaga seotud magnetkandjate abil. Immunosadestatud proovid sadestati TCA-ga ja lahutati 12% SDS-PAAG foreesil, pool materjalist analüüsiti *Western blot* meetodil (joonis 14B), teine pool lahutatud valkudest värviti hõbedaga (joonis 14A). Hõbedaga värvitud geeli analüüsil Adobe® Photoshop® *version* 6.0 programmi abil olid näha mõned erinevused saadud valgumustris E2 valku sisaldava ja mittesisaldava rakuliini vahel. CHO Bgl40 ja CHO rakuliini 3-8 fraktsioonide puhul on nähtud erinevused joonisel 14 ära märgitud musta täpiga

Saadud tulemus näitas, et immunosadestamisel sadenevad E2 valguga koos peamiselt suuremad valgud, samuti olid erinevused värvunud valkude puhul näha just suuremate valkude piirkonnas. Seetõttu peaks edaspidises analüüsis hõbedaga värvimise jaoks valgud lahutama ilmselt mitte kangemal kui 10% SDS-PAAG foreesil. Samuti polnud immunosadestamine kasutatud tingimustel väga efektiivne, kuna E2 valguga kaasa sadenenud valkude hulk on päris suur. Seetõttu võiks lisaks lahjemale geelile ilmselt proovida IP läbiviimisel kasutada ka erinevaid kandjaid, mis võibolla võimaldaks hõbededega värvimisel nähtud valkude hulka vähendada.



**Joonis 14.** Glütserooli gradiendil analüüsiti erinevatest rakuliinidest 0.4M NaCl juuresolekul ekstraheerunud valkude lüsaat. Gradient jagati 16-neks fraktsiooniks, millest edasiseks analüüsiks koguti kokku fraktsioonid 3-8 ja 9-11, milles viid läbi immunosadestamine 3E8 antikehaga seotud magnetkandjate abil. Immunosadestatud proovidest pool on peale 12% SDS-PAAG foreesil lahutamist värvitud hõbedaga (A), teine pool materjalist analüüsiti *Western blot* meetodil BPV-1 E2 vastaste antikehadega (B). Mustade täppidega on näidatud kohad, kus nähti erinevusi E2 sisaldava ja mittesisaldava rakuliini vahel.

Antud katsed näitasid, et BPV-1 E2 valk ei vabane kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist 0.4M NaCl juuresolekul mitte vaba dimeerina, vaid on suuremas kompleksis. Seejuures pole interaktsioonid antud kompleksi komponentide vahel ilmselt tugevad, kuna kuigi see kompleks on stabiilne glütserooli gradiendil, toimub valkude lahutamisel geelfiltratsioonil ilmselt kompleksi lagunemine. Edasises uurimistöös vajab täpsemat selgitamist, kas E2 seondub tuumastruktuuridega kui vaba tetrameer või kui tetrameer kompleksis mingite rakuliste valkudega või hoopis kui rakuliste valkudega seotud E2 valgu dimeer.

## ARUTELU

BPV-1 E2 valk omab viiruse elutsüklis tähtsat rolli. Lisaks osalemisele papilloomiviiruse transkriptsiooni ja replikatsiooni funktsioonides, on E2 valk oluline BPV-1 genoomi pikaajaliseks episomaalseks säilimiseks jagunevates rakkudes.

Papilloomiviiruse E2TA valk lokaliseerub raku tuuma, IF analüüsil on E2 spetsiifiline signaal jälgitav täpilise muustrina interfaasi raku tuumas ja mitootiliste rakkude kromosoomidel. Käesoleva töö eesmärgiks oli BPV-1 E2 valgu tuumasisesse lokaliseerumise ja interaktsioonide kirjeldamine peamiselt rakutsükli interfaasi rakkudes, aga võrdlusena on töös kasutatud ka mitoosi faasi rakke, kuna enamusi seni ilmunud E2 lokaliseerumise käsitlevatest töödest on tehtud mitoosi faasi rakkudega (Skiadopoulos, M. H., 1998; Lehman, C. W., 1998; Ilves, I., 1999; Bastien, N., 2000; Abroi, A., 2004).

BPV-1 E2TA lokaliseerumise uurimiseks olen oma eksperimentaalses töös kasutanud peamiselt biokeemilise fraktsioneerimise meetodit. Fraktsioneerimiskatsete tulemustest selgus, et valdavalt on BPV-1 E2 valk interfaasi rakkude tuumas seotud mitoteioonse detergendiga lahustumatutesse tuumakompartimentidesse ehk siis on seotud kromatiini või tuumamaatriksi valkudega nii E2 stabiilse kui transientse ekspresioonisüsteemi korral. Kuigi E2 valgu spetsiifiline signaal on vähesel määral detekteeritav ka mitoteioonse detergendiga ekstraheeritavas raku lahustuvaid valke sisaldavas fraktsioonis, on valdav enamusi rakkudes olevast E2 valgu hulgast seotud siiski kromatiini või tuumamaatriksiga. Lahustumatuid tuuma valke sisaldava fraktsiooni edasise analüüsi tulemusel selgus, et E2 on vähemalt osaliselt seotud kromatiiniga, kuna E2 vabanemise osaliselt DNAasi juuresolekul antud valke sisaldavast fraktsioonist. DNAasi juuresolekul kromatiini ja tuumamaatriksi valke sisaldavast fraktsioonist mitte ekstraheeritav E2 võib olla seotud mõne tuumamaatriksi valguga, kuid kindlasti pole BPV-1 E2 valk tuumamaatriksi integraalne osa, sest klassikalise biokeemilise definitsiooni järgi pole tuumamaatriksi valgud nukleaasidele tundlikud ega ka kõrge soolakontsentratsiooni juures tuumast ekstraheeritavad (Pederson, T., 1998). E2 valk seevastu on tuumastruktuuridelt valdavalt ekstraheeritav 0.3M NaCl juuresolekul, mis viitab pigem E2 seotusele kromatiiniga, kuna enamik kromatiini koosseisu kuuluvaid valke on 0.45M NaCl juuresolekul tuumast ekstraheeritavad. Muidugi on samas võimalik, et E2 on seotud suhteliselt nõrkade interaktsioonidega mingi tuumamaatriksi

valguga ja on sellelt valgult 0.3M NaCl juuresolekul ekstraheeritav. Lisaks oli eksperimentaalses töös jälgitav, et mingi väike osa E2 valgust jäi alati tuumastruktuuridega seotuks ka peale 0.4M NaCl juuresolekul ekstraheerimist.

HPV-11 E2 valgu puhul on varem näidatud, et HPV-11 E2 valk erinevalt BPV-1 E2 valgust ei seonu mitte mitootilistele kromosoomidele, vaid mitoosi käävidele, et tagada viirusgenoomide jagunemine tütarakkude vahel (Van Tine, B.A., 2004). Lähtuvalt HPV-11 ja BPV-1 E2 valkude vahelisest erinevusest seondumises mitootilise kromatiiniga on võimalik, et HPV-11 ja BPV-1 kasutavad erinevaid strateegiaid viirusgenoomide jaotumiseks tütarakkude vahel ja omavad erinevaid rakulisi partnereid, mis seda säilumiskompleksi vahendavad.

Samuti on HPV-11 E2 valgu puhul näidatud E2 seondumine tuumamaatriksiga, kusjuures determinandid selle seondumise vahendamiseks asuvad HPV-11 E2 valgu hinge regioonis (Zou, N., 2000). Käesolevas töös kasutatud biokeemilise fraktsioneerimise meetodika E2 valgu tuumalokalisatsiooni määramiseks on sarnane Zou et al töös kasutatud meetodikale. Peamiseks erinevuseks on vaid mudelsüsteemide valik – Zou et al teevad oma järeldused kasutades cos7 rakkudes transientselt ekspresseeritavat HPV-11 E2 valku, minu töös on mudelsüsteemina kasutatud eelkõige E2 valku stabiilselt ekspresseerivat rakuliini. HPV-11 E2 valk leiti olevat kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonis sarnaselt minu töös läbiviidud fraktsioneerimiskatsetele BPV-1 E2 valguga, kuid kui BPV-1 E2 on E2 valku stabiilselt ekspresseerivate CHO Bgl40 rakkude puhul juba 0.3M NaCl juuresolekul kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist ekstraheeritav, siis HPV-11 E2 valk jääb peale DNAasi töötlust ja ekstraheerimist 0.25M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> juuresolekul antud fraktsiooniga seotuks. Samuti leiti, et HPV-11 E2 valgud, millel puudub hinge regioon, lokaliseeruvad küll raku tuuma, aga pole seal enam tuumamaatriksiga seotud. Seevastu BPV-1 E2 valgu puhul lokaliseerub kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni ka ainult E2 N-terminaalset transaktiivatsiooni domeeni sisaldav mutante valk ja interaktsioon antud fraktsiooniga on seejuures tugevam kui täispika E2 valgu puhul. Antud katse on otseselt võrreldav Zou et al tööga, kuna BPV-1 mutantsete valkude analüüsil kasutati samuti E2 transientset ekspressioonisüsteemi. Seega on võimalik, et HPV-11 ja BPV-1 E2 valkude rakusisene lokaliseerimine ja interaktsioonid tuumastruktuuridega on erinevad, samuti nagu determinandid, mis seda vahendavad. Samas tuleks seda väidet muidugi kontrollida

ühesuguste ekspressioonisüsteemide korral, kuna vähemalt BPV-1 E2 valgu puhul oli minu töös näha, et E2 ekspressioonitase rakus mõjutab olulisel määral E2 valgu kompartmentalisatsiooni raku tuumas.

BPV-1 E2 valk pole ilmselt madala ekspressioonitaseme korral tuumamaatriksiga seotud, kuna tuumamaatriksi komponendid pole kõrgel soolakontsentratsioonil ekstraheeritavad (Pederson, T., 1998). Katsetulemused näitasid siiski aga ka seda, et E2 valgu üleekspressiooni korral moodustub kaks erinevat E2 fraktsiooni: esimene neist on kromatiini-tuumamaatriksi valkude fraktsioonist ekstraheeritav samadel tingimustel, kui stabiilselt ekspresseeruv E2, teine fraktsioon pole aga soolatundlik. Antud tulemused viitavad võimalusele, et E2 valgu kromatiinile seondumist vahendav rakuline komponent on küllastatav, ehk kui valku ekspresseeritakse rohkem, kui on võimalikke seondumiskohti rakus, toimub E2 valgu kompartmentaliseerimine raku tuumas kuskile mujale, kuna E2 valku stabiilselt ekspresseerivates rakkudes on E2 ekspressioonitase tunduvalt madalam kui E2 transientse üleekspressiooni korral. Samuti on muidugi võimalik, et E2 üleekspressiooni tingimustes tekivad valgu agregaadid, mis siis ladestuvad tuumamaatriksisse või kuhugi mujale. Läbiviidud fraktsioneerimiste tulemused näitavad, et üleekspressiooni tingimustes on E2 kromatiini-tuumamaatriksi valkude fraktsioonist raskemini NaCl-ga ekstraheeritav kui stabiilse ekspressiooni tingimustes. HPV-11 E2 valgu puhul on biokeemiliste fraktsioneerimistega näidatud E2 seondumine tuumamaatriksiga transientse ekspressioonisüsteemi korral (Zou, N., 2000), samuti on HPV-11 puhul näidatud E1 ja E2 valkude ning POD-ide (promüelotsütoitse leukeemia onkogeensed domeenid, nim. ka PML kehakesed) kolokalisatsioon IF meetodil (Swindle, C. S., 1999).

POD-id on seotud tuumamaatriksi fraktsiooniga rakus ja on äärmisel vastupidavad detergendi, RNAasi ja DNAasiga ekstraheerimise suhtes (Seeler, J.-S., 1999), samuti on kirjeldatud paljude erinevate viiruste produktide akumulendumist nendesse tuumakehakestesse. On võimalik, et üleekspresseeritud BPV-1 E2 lokaliseerub samuti POD-idesse, kuid see väide vajab veel eksperimentaalset kontrollimist. Kirjanduse andmetel on PV hiline viirusvalk L2 võimeline BPV-1 E2 valku POD-idesse lokaliseerima, interakteerudes selleks otseselt E2 valguga (Day, P. M., 1998, Heino, P., 2000). POD-id võivad olla PV virionide moodustumise asukohaks

rakutuumas, samuti arvatakse, et E2 kaasamine nendesse domeenidesse võib soodustada DNA pakkimist ja virionide moodustumist tänu E2 võimele järjestuspetsiifiliselt seonduda papilloomiviiruse DNAGA (Day, P. M., 1998). E2 lokalisatsiooni POD- idesse on kirjeldatud siiski vaid L2 valgu ekspresseerivates transientsetes süsteemides.

Kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni ja E2 valgu vaheliste interaktsioonide analüüsimisel kasutatud erinevatel soolakontsentratsioonidel ekstraheerimine näitas, et BPV-1 E2 seondub nii interfaasis kui mitoosi faasis kromatiini-tuumamaatriksi valke sisaldava fraktsiooniga ja on 0.3M NaCl juuresolekul sealt ühtemoodi ekstraheeritav. Lähtudes nendest tulemustest võiks BPV-1 E2 olla nii interfaasi kui mitootiliste rakkude tuumades assotsieerunud ühe ja sama rakulise partneriga, kuna erinevate soolakontsentratsioonide mõju E2 valgu ekstraheeritavusele kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist on sarnane nii rakutsükli interfaasi kui ka mitoosi faasis olevate rakkude puhul. Alternatiivselt on muidugi võimalik, et mitoosis ja interfaasis on E2 valgu rakulised partnerid küll erinevad, aga nende ja E2 valgu vahelise interaktsiooni tugevus on äärmiselt sarnane, kuna erinevused E2 ekstraheeritavuse suhtes olid rakutsükli mitoosi faasi ja interfaasi vahel äärmiselt väikesed.

E2 ja tema erinevate mutantidega läbiviidud fraktsioneerimiskatsetest võib järeldada, et E2 lokaliseerub nii transientse kui stabiilse süsteemi puhul interfaasi rakkudes valdavalt mitteioonse detergendiga lahustumatusse tuumafraktsiooni (kromatiin + tuumamaatriks) ja see seondumine on vahendatud E2 N-terminaalse transaktivatsiooni domeeni, mitte aga C-terminaalse DBD domeeni poolt. Varem kirjanduses avaldatud andmete põhjal lokaliseerub ka BPV täisgenoomi sisaldavas C127 rakuliinis ekspresseeruv E2 valk samasse fraktsiooni (Hubbert, N. L., 1988). Seega pole E2 lokalisatsioon rakus sõltuv ekspressiooniks kasutatavast rakuliinist ega E2 geeni ees asuvast promootorist, vaid on ainult sellele valgule iseloomulik omadus. Teiselt poolt on ka näidatud, et ainult E2 transaktivatsiooni domeenist piisab E2 valgu seondumiseks mitootiliste kromosoomidega (Bastien, N., 2000). Kuna meie poolt läbiviidud katsetes kasutati sünkroniseerimata rakke, kus mitoosi faasis olevate rakkude hulk on hinnanguliselt ~5–10%, siis võib väita, et E2 N-terminaalne domeen vahendab valgu seostumist kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni ka interfaasi rakkudes. Kuna vaid DBD domeenist kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni lokaliseerumiseks ei piisa,

siis toetavad need tulemused seisukohta, et E2 ei seonu otse kromatiiniga, vaid see seondumine on vahendatud mingi raku valgulise faktori poolt.

Hiljuti kirjanduses avaldatud andmetel interakteerub BPV-1 E2 valk Brd4 valguga, mis on rakuliseks retseptoriks, mis vahendab E2 valgu seondumist mitootiliste kromosoomidega. Brd4 omakorda on rakus seotud eelistatult atsetüleeritud kromatiiniga (You, J., 2004). Histonide atsetüleerimine on üks võimalikest kromatiini kondensatsiooni ja seega geeniekspressiooni reguleerimise võimalikest viisidest (Lusser, A., 2002). Brd4 on E2 valgu rakuliseks interaktsioonipartneriks hea kandidaat juba seetõttu, et on assortseerunud raku kromatiiniga nii interfaasis kui mitoosis ning on kromatiinilt ~200mM soolakontsentratsioonil ekstraheeritav (Dey, 2003).

Varasemad tööd E2 valgu tuumalokalistasiooni uurimisel on näidatud, et transaktiivatsiooni domeenis asuv NLS (piirkond 107-115) üksi pole funktsionaalne ja ilma C-terminaalses domeenis asuva tuuma lokaliseerimise signaalita (piirkond 339–352) E2 valgud tuumas ei lokaliseeru (Allikas, A., 2001). Allikas et al läbiviidud katsetes oli E2N signaal IF analüüsil jälgitav hajutatult üle kogu raku. NLS on eelkõige vajalik aktiivtranspordiks raku tuuma nende valkude korral, mis on suuremad kui 45kDa (Jans, D. A., 1996), väiksemad valgud, mille hulka kuuluvad ka antud katsetes kasutatud E2 mutandid, NLS vahendatud aktiivtransporti ei vaja. Samuti võivad ilma NLS-ta valgud tuuma pääseda rakkude jagunemise ajal, kui tuumamembraan on kadunud. Meie poolt teostatud pCGE2N vektoriga transfekteeritud CHO rakkude biokeemiline fraktsioneerimine näitas, et ainult transaktiivatsiooni domeeni sisaldav E2 mutant lokaliseerub valdavalt kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni, samas kui E2TR valk (sisaldab E2TA C-terminaalset domeeni, kus asub aktiivtransporti vahendav NLS ja hinge piirkonda) on valdavalt mitteioonse detergendifraktsiooniga rakust ekstraheeritav. Seega võib väita, et E2 transport raku tuuma ja valgu lokaliseerimine kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooni on teineteisest lahutatavad funktsioonid ja vastavad omadused on determineeritud valgu erinevate järjestuste või piirkondade poolt. Tõenäoliselt kogu tuuma pääsenud E2N valk on võimeline assortseeruma kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooniga ja pole sealt edasise töötamise käigus enam ekstraheeritav. E2C valk aga transporditakse küll aktiivselt tuuma, kuid ei ole võimeline kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooniga assortseeruma ja seega võib kaduda rakkude jagunemisel.

0.4M NaCl juuresolekul kromatiini-tuumamaatriksi valkude fraktsioonist vabanenud E2 valgu edasiseks iseloomustamiseks läbiviidud katsed näitasid, et E2 sedimenteerub glütserooli gradiendil teisiti kui võiks oodata dimeerse E2 valgu puhul. Vajab edasist selgitamist, kas E2 seondub tuumastruktuuridega kui vaba tetrameer või kui tetrameer kompleksis mingite rakuliste valkudega või hoopis kui rakuliste valkudega seotud E2 valgu dimeer. E2 valgu puhul on näidatud, et dimeerid võivad omavahel interakteeruda ja moodustada tetrameere (Gauthier, J., 1991) ning et selline tetrameeride moodustamise võime võib olla oluline E2 transaktivatsioonifunktsiooni täitmiseks (Abroi, A., 1996).

Ilmselt pole E2 valk rakus siiski seotud mitte mingi kindla tuumakompartmendiga, vaid on sarnaselt raku oma valkudele mobiilne ja seondub oma funktsioonide täitmiseks vajalike mitmete erinevate tuumakompartmentidega ja valkkompleksidega, sest kuna E2 valgu näol on tegemist PV elutsüklis olulise multifunktsionaalse valguga, siis peab E2 olema võimeline rakus seonduma mitmete erinevate interaktsioonipartneritega viiruse elutsüklis vajalike funktsioonide täitmiseks.

## KOKKUVÕTE

Antud töö eesmärgiks oli BPV-1 E2 valgu raku tuumasisese lokaliseerimise ning E2 valgu ja raku tuumastruktuuride vaheliste interaktsioonide iseloomustamine eelkõige rakutsükli interfaasis olevate rakkude puhul.

Käesoleva töö kirjanduslikus osas anti ülevaade BPV-1 E2 valgu rollist viiruse elutsükli, suuremat tähelepanu pöördi E2 valgu rollile viiruse episomaalse säilimismehhanismi tagamisel. Töö eksperimentaalses kasutati biokeemilise fraktsioneerimise meetodeid, et iseloomustada BPV-1 E2 valgu lokaliseerimise ja interaktsioone raku. Eksperimentaalse töö tulemused olid järgmised:

1. BPV-1 E2 valk lokaliseerub interfaasi raku tuuma, kus ta on assotsieerunud mitetoonse detergendiga lahustumatu kromatiini-tuumamaatriksi valke sisaldava tuumafraktsiooniga. Antud assotsiatsioon on vahendatud E2 N-terminaalse transaktiivatsiooni domeeni poolt.
2. BPV-1 E2 valk on stabiilses rakuliinis assotsieerunud raku kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooniga nii interfaasi kui ka rakutsükli mitoosi faasis olevates rakkudes ning seda interaktsiooni võib vahendada sama rakuline partner.
3. BPV-1 E2 valgu lokaliseerimine raku tuumas sõltub tema ekspresseerimisest raku, üleekspresseerimise tingimustes moodustub raku mitu erinevat E2 valgu fraktsiooni.
4. 0.4M NaCl juuresolekul vabaneb BPV-1 E2 valk kromatiini-tuumamaatriksi valke sisaldavast fraktsioonist mitte kui vaba dimeer, vaid on kompleksis mingite teiste valkudega.

## SUMMARY

For effective persistence in host cells, viruses must acquire some sort of strategy for stable maintenance of their genomes in cells. Some DNA viruses, like papillomaviruses and lymphotropic herpes viruses, maintain their genomes as stable episomal plasmids in host cell nuclei during the viral latency period. Stable extrachromosomal maintenance is dependent on their ability to attach to the host cell chromatin, as it provides an appropriate segregation mechanism for viruses in dividing cells. Papillomavirus E2 transactivation protein is the viral factor that mediates viral genome tethering to the mitotic chromosomes.

The theoretical part of this work gives an overview about the importance of E2 protein in viral life cycle and also characterizes subcellular localization of the papillomaviral E2 protein in mitotic cells and its role in providing segregation mechanism for viral episomes.

In experimental part of the work BPV-1 E2 protein subnuclear localization in interphase nuclei was investigated and characterized. For that, several biochemical fractionation experiments were carried out, which led us for following conclusions:

1. BPV-1 E2 protein localizes in interphase cell nuclei where E2 protein is associated with non-ionic detergent insoluble nuclear fraction, which consists of cellular chromatin and nuclear matrix. This association is mediated by E2 N-terminal transactivation domain.
2. BPV-1 E2 protein is attached to host cell chromatin throughout the whole cell cycle and the same cellular partner may mediate this specific interaction.
3. The localization of BPV-1 E2 protein in host cell nuclei depends on E2 expression level – when over expressed, E2 localizes into different cellular compartments.
4. In presence of 0.4M NaCl BPV-1 E2 protein dissociates from chromatin-nuclear matrix enriched fraction in complex with some other protein(s) or as a higher oligomer, but not as a free dimeric protein. Interactions between the components of this complex are not very strong.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Abroi, A., Ilves, I., Kivi, S., et al. Analysis of chromatin attachment and partitioning functions of bovine papillomavirus type 1 E2 protein. *J Virol* 2004;78:2100-2113.

Abroi, A., Kurg, R., Ustav, M. Transcriptional and replicational activation functions in the bovine papillomavirus type 1 E2 protein are encoded by different structural determinants. *J Virol* 1996;70:6169-6179.

Allikas, A., Örd, D., Kurg, R., et al. Roles of the hinge region and the DNA binding domain of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein in initiation of DNA replication. *Virus Res* 2001;75:95-106.

Angeletti, P. C., Kim, K., Fernandes, F. J., et al. Stable replication of papillomavirus genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 2002;76:3350-3358.

Antson, A. A., Burns, J. E., Moroz, O. V., et al. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature* 2000;403:805-809.

Ballestas, M. E., Chatis, P. A., Kaye, K. M. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* 1999;284:641-644.

Ballestas, M. E., Kaye, K. M. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 mediates episome persistence through cis-acting terminal repeat (TR) sequence and specifically binds TR DNA. *J Virol* 2001;75:3250-3258.

Bastien, N., McBride, A. A. Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology* 2000;270:124-134.

Bellanger, S., Demeret, C., Goyat, S., et al. Stability of the human papillomavirus type 18 E2 protein is regulated by a proteasome degradation pathway through its amino-terminal transactivation domain. *J Virol* 2001;75:7244-7251.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:1873-1882.

Cesarman, E., Chang, Y., Moore, P. S., et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 1995;332:1186-1191.

Chin, M. T., Broker, T. R., Chow, L. T. Identification of a novel constitutive enhancer element and an associated binding protein: Implications for human papillomavirus type 11 enhancer regulation. *J Virol* 1989;63:2967-2976.

Day, P. M., Roden, R. B. S., Lowy, D. R. et al. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* 1998;72:142-150.

Delecluse, H.-J., Bartnizke, S., Hammerschmidt, W., et al. Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt's lymphoma cell lines. *J Virol* 1993;67:1292-1299.

- Delius, H., Hofmann, B. Primer- directed sequencing of human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:13-32.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., et al. The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8758-8763.
- Dey, A., Ellenberg, J., Farina, A., et al. A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition. *Mol Cell Biol* 2000;20:6537-6549.
- DiMaio, D., Petti, L., Hwang, E.-S. The E5 transforming proteins of the papillomaviruses. *Seminars in Virology* 1994;5:369-379.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., et al. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cyokeratin results in collapse of epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991;352:824-827.
- Dyson, N., Guida, P., Munger, K. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interactions with same set of cellular proteins. *J Virol* 1992;66:6893-6902.
- Flores, E. R., Lambert, P. F. Evidence for a switch in mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol* 1997;71:7167-7179.
- Frattini, M. G., Lim, H. B., Laimins, L. A. *In vitro* synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation- dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3062-3067.
- Gauthier, J., Dostatni, N., Lusky, M. et al. Two DNA-bound E2 dimers are required for strong transcriptional activation and for cooperation with cellular factors in most cells. *New Biol* 1991;3:498-509.
- Giri, I., Yaniv, M. Structural and mutational analysis of E2 *trans*-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J* 1988;7:2823-2829.
- Hagensee, M. E., Olson, N. H., Baker, T. S., et al. Three- dimensional structure of vaccinia virus- produced human papillomavirus type 1 capsids. *J Virol* 1994;68:4503-4505.
- Hagensee, M. E., Yaegashi, N., Galloway, D. A. Self- assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 1993;67:315-322.
- Harris, A., Young, B. D., Griffin, B. E. Random association of Epstein-Barr virus genomes with host cell metaphase chromosomes in Burkitt's lymphoma-derived cell lines. *J Virol* 1985;56:328-332.
- Heino, P., Zhou, J., Lambert, P. F. Interaction of the papillomavirus transcription/replication factor, E2, and the viral capsid protein, L2. *Virology* 2000;276:304-314.
- Howley, P. M. Papillomaviruses and their replication, p. 2197-2230. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 2001, 4th ed. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, Pa.

- Hubbert, N. L., Schiller, J. T., Lowy, D. R., et al. Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5864-5868.
- Hummel, M., Lim, H. B., Laimins, L. A. Human papillomavirus type 31b late gene expression is regulated through protein kinase C- mediated changes in RNA processing. *J Virol* 1995;69:3381-3388.
- Ilves, I., Kivi, S., Ustav, M. 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* 1999;73:4404-4412.
- Jans, D. A., Hubner, S. Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev* 1996;76:651-685.
- Kanda, T., Otter, M., Wahl, G. M. Coupling of mitotic chromosome tethering and replication competence in Epstein-Barr virus-based plasmids. *Mol Cell Biol* 2001;21:3567-3588.
- Kellam, P., Boshoff, C., Whitby, D., et al. Identification of a major latent nuclear antigen, LANA-1, in the human herpesvirus 8 genome. *J Hum Virol* 1997;1:19-29.
- Kim, K., Lambert, P. F. E1 protein of bovine papillomavirus 1 is not required for the maintenance of viral plasmid DNA replication. *Virology* 2002;293:10-14.
- Kivimäe, S., Allikas, A., Kurg, R., et al. Replication of a chimeric origin containing elements from Epstein-Barr virus ori P and bovine papillomavirus minimal origin. *Virus Res* 2001;75:1-11.
- Kurg, R., Parik, J., Juronen, E., et al. Effect of bovine papillomavirus E2 protein-specific monoclonal antibodies on papillomavirus DNA replication. *J Virol* 1999;73:4670-4677.
- Lafemina, R. L., Pizzorno, M. C., Mosca, J. D., et al. Expression of the acidic nuclear immediate-early protein (IE1) of human cytomegalovirus in stable cell lines and its preferential association with metaphase chromosomes. *Virology* 1989;172:584-600.
- Lehman, C. W., Botchan, M. R. Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4338-4343.
- Li, R., Botchan, M. The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell* 1993;73:1207-1221.
- Li, R., Botchan, M. Acidic transcription factors alleviate nucleosome-mediated repression of DNA replication of bovine papillomavirus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7051-7055.
- Li, R., Knight, J. D., Bream, G., et al. Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome. *Genes Dev* 1989;3:510-526.
- Li, R., Knight, J. D., Jackson, S. P., et al. Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell* 1991;65:493-505.
- Li, W., Nagaraja, S., Delcuve, G. P., et al. Effects of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability. *Biochem J* 1993;296:737-744.

- Lusky, M., Fontane, E. Formation of the complex of bovine papillomavirus E1 and E2 proteins is modulated by E2 phosphorylation and depends upon sequences within the carboxyl terminus of E1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:6363-6367.
- Lusser, A. Acetylated, methylated, remodeled: chromatin states for gene regulation. *Curr Opin Plant Biol* 2002;5:437-443.
- McBride, A. A., Bolen, J. B., Howley, P. M. Phosphorylation sites of the E2 transcriptional regulatory proteins of bovine papillomavirus type 1. *J Virol* 1989a;63:5076-5085.
- McBride, A. A., Byrne, J. C., Howley, P. M. E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimmers through the common carboxyl-terminal domain: Transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989b;86:510-514.
- McBride, A. A., Howley, P. M. Bovine papillomavirus with a mutation in the E2 serine 301 phosphorylation site replicates at a high copy number. *J Virol* 1991;65:6528-6534.
- McBride, A. A., Myers, G. The E2 proteins: An update. In "Human Papillomaviruses 1997" (G. Myers, C. Baker, K. Munger, F. Sverdrup, A. McBride, and H.-U. Bernard, Eds.), Los Alamos National Laboratory 1997, Los Alamos, NM.
- Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., et al. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 1990;250:1694-1699.
- Moreno-Lopez, J., Ahola, H., Eriksson, A., et al. Reindeer papillomavirus transforming properties correlate with a highly conserved E5 region. *J Virol* 1987;61:3394-3400.
- Okuno, Y., McNairn, A. J., den Elzen, N., et al. Stability, chromatin association and functional activity of mammalian pre-replication complex proteins during the cell cycle. *EMBO J* 2001;20:4263-4277.
- Pederson, T. Thinking about a nuclear matrix. *J Mol Biol* 1998;277:147-159.
- Penrose, K. J., McBride, A. A. Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *J Virol* 2000;74:6031-6038.
- Petti, L., Sample, C., Kieff, E. Subnuclear localization and phosphorylation of Epstein-Barr virus latent infection nuclear proteins. *Virology* 1990;176:563-574.
- Piirsoo, M., Ustav, E., Mandel, A., et al. Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J* 1996;15:1-11.
- Piilot, T., Tramier, M., Coppey, M., et al. Close but distinct regions of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen 1 are responsible for nuclear targeting and binding to human mitotic chromosomes. *J Virol* 2001;75:3948-3959.
- Rechsteiner, M., Rogers, S. W. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 1996;21:267-271.

- Reyes, J. C., Muchardt, C., Yaniv, M. Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J Cell Biol* 1997;137:263-274.
- Rickinson, A. B., Kieff, E. in *Fields Virology* 1996, eds. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (Lippincott, Philadelphia), pp. 2397-2446.
- Rose, S. M., Garrard, W. T. Differentiation-dependent chromatin alterations precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes. *J Biol Chem* 1984;259:8534-8544.
- Ruesch, M. N., Stubenrauch, F., Laimins, L. A. Activation of papillomavirus late gene transcription and genome amplification upon differentiation in semisolid medium is coincident with expression of involucrin and transglutaminase but not keratin-10. *J Virol* 1998;72:5016-5024.
- Sedman, T., Sedman, J., Stenlund, A. Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J Virol* 1997;71:2887-2896.
- Seeler, J.-S., Dejean, A. The PML nuclear bodies: actors or extras? *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:362-367.
- Shire, K., Ceccarelli, D. F., Avolio-Hunter, T. M. EBP2, a human protein that interacts with sequences of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is important for plasmid maintenance. *J Virol* 1999;73:2587-2597.
- Shumway, S. D., Maki, M., Miyamoto, S. The PEST domain of I $\kappa$ B $\alpha$  is necessary and sufficient for in vitro degradation by  $\mu$ -calpain. *J Biol Chem* 1999;274:30874-30881.
- Silla, T. Veise papilloomiviiruse tüüp 1 segregatsiooni uurimine pärmis *Saccharomyces cerevisiae*. Magistritöö. 2003 Tartu Ülikool
- Skiadopoulos, M. H., McBride, A. A. The bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator and repressor proteins use different nuclear localization signals. *J Virol* 1996;70:1117-1124.
- Skiadopoulos, M. H., McBride, A. A. Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J Virol* 1998;72:2079-2088.
- Spalholz, B. A., Yang, Y. C., Howley, P. M. Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* 1985;42:183-191.
- Swindle, C. S., Zou, N., van Tine, B. A., et al. Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol* 1999;73:1001-1009.
- Tanaka, M., Herr, W. Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2: interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation. *Cell* 1990;60:375-386.
- Trescol-Biemont, M. C., Biemont, C., Daille, J. Localization polymorphism of EBV DNA genomes in the chromosomes of Burkitt lymphoma cell lines. *Chromosoma* 1987;95:144-147.
- Ustav, M., Stenlund, A. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* 1991a;10:449-457.

- Ustav, M., Ustav, E., Szymanski, P., et al. Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J* 1991b;10:4321-4329.
- Ustav, E., Ustav, M., Szymanski, P., et al. The bovine papillomavirus origin of replication requires a binding site for the E2 transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:898-902.
- Ustav, E., Ustav, M. E2 protein as the master regulator of extrachromosomal replication of the papillomaviruses. *Papillomavirus Report* 1998;9:145-152.
- Van Tine, B. A., Dao, L. D., Wu, S.-Y., et al. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4030-4035.
- Voitenleitner, C., Botchan, M. E1 protein of bovine papillomavirus type 1 interferes with E2 protein-mediated tethering of the viral DNA to mitotic chromosomes. *J Virol* 2002;76:3440-3451.
- Wernessen, B. A., Levin, A. J., Howley, P. M. Association of human papillomaviruses types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248:76-79.
- Winokur, P. L., McBride, A. A. Separation of the transcriptional activation and replication functions of the bovine papillomavirus-1 E2 protein. *EMBO J* 1992;11:4111-4118.
- Winokur, P. L., McBride, A. A. The transactivation and DNA binding domains of the BPV-1 E2 protein have different roles in cooperative origin binding with the E1 protein. *Virology* 1996;221:44-53.
- Wu, H., Ceccarelli, D. F. J., Frappier, L. The DNA segregation mechanism of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *EMBO J* 2000;1:140-144.
- Wu, J.-R., Gilbert, D. M. The replication origin decision point is a mitogen independent, 2-aminopurine sensitive, G<sub>1</sub>-phase step that precedes restriction point control. *Mol Cell Biol* 1997;17:4312-4321.
- Yang, L., Mohr, I., Fouts, E., et al. The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5086-5090.
- Yao, J. M., Breiding, D. E., Androphy, E. J. Functional interaction of the bovine papillomavirus E2 transactivation domain with TFIIB. *J Virol* 1998;72:1013-1019.
- Yates, J. L., Warren, N., Sugden, B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 1985;313:812-815.
- You, J., Croyle, J. L., Nishimura, A., et al. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 2004;117:349-360.
- Zhao, K.-N., Frazer, I. Replication of bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) DNA in *Saccharomyces cerevisiae* following infection with BPV-1 virions. *J Virol* 2002;76:3359-3364.

Zou, N., Lin, B. Y., Duan, F., et al. The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association. *J Virol* 2000;74:3761-3770.

zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342-350.