

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

Piia Uusen

**Papilloomiviiruse E2 valgu interaktsioon Daxx valguga ning
selle võimalik roll viiruse elutsükli**

Magistritöö

Juhendaja: Reet Kurg, *Ph. D*

TARTU
2007

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1. PAPILLOOMIVIIRUSTE ÜLDISELOOMUSTUS.....	6
1.1. Papilloomiviiruste genoomi struktuur ja organisatsioon	6
1.2. Papilloomiviiruste elutsükel.....	9
2. PAPILLOOMIVIIRUSTE E2 VALGU ISELOOMUSTUS	10
2.1. E2 valk transkriptsioonifaktorina.....	11
2.2. E2 valk replikatsioonifaktorina.....	13
2.3. E2 valgu roll papilloomiviiruste episomaalsel säilimisel.....	13
3. PML KEHADE ROLL DNA VIIRUSTE ELUTSÜKLIS	15
4. DAXX VALGU ISELOOMUSTUS.....	17
EKSPERIMENTAALNE OSA.....	19
1. TÖÖ EESMÄRGID	19
2. MATERJAL JA METOODIKA	20
2.1. Rakuliinid ja nende kasvatamine	20
2.2. Plasmiidid.....	20
2.3. Rakkude transfektsioon.....	22
2.4. Kasutatud antikehad ja nende epitoopide asetus.....	23
2.5. Immunofluorestsentsanalüüs.....	24
2.6. Subtsellulaarne fraktsioneerimine.....	24
2.7. Koimmunosadestamine.....	25
2.8. Ultratsentrifuugimine glütserooli gradiendis	26
2.9. Valkude sadestamine TCA-ga.....	27
2.10. <i>Western blot</i>	27
2.11. Transkriptsiooni katse.....	28
2.12. Episomaalse DNA eraldamine	29
2.13. <i>Southern blot</i>	30
3. TULEMUSED	31
3.1. Brd4 CTD relokaliseerib E2 valgu tuuma fookustesse	31
3.2. E2 valgu relokaliseerimiseks on vajalik selle N-terminaalne transaktivatsiooni domeen, mis vahendab interaktsiooni Brd4 CTD-ga.....	34
3.3. E2 kolokaliseerub fookustes Daxx valguga	37
3.4. E2, Brd4 CTD ja Daxx valgud võivad moodustada rakus kompleksi	41
3.5. Daxx valgu mõju uurimine E2BS-sõltuval E2 transkriptsiooni ning replikatsiooni funktsioonile.....	50
4. ARUTELU	55
KOKKUVÕTE.....	60
SUMMARY	61
KASUTATUD KIRJANDUS	63

KASUTATUD LÜHENDID

AMF-1 – aktivatsiooni domeeni moduleeriv faktor 1 (*activation domain modulation factor 1*)

ATP – adensiintrifosfaat (*adenosine triphosphate*)

ATRX – α -talasseemia/vaimse arengupeatuse sündroomi valk (*α -thalassemia/mental retardation syndrome protein*)

bp – aluspaar (*base pair*)

BPV-1 – veise papilloomiviirus tüüp 1 (*bovine papillomavirus type 1*)

Brd4 – bromodomeeni sisaldav valk 4 (*bromodomain-containing protein 4*)

Brd4 CTD – Brd4 valgu C-terminaalne domeen (*Brd4 C-terminal domain*)

BrdU – bromodesoksüüridiin (*bromodeoxyuridine*)

BSA – veise seerumi albumiin (*bovine serum albumine*)

CBP – cAMP vastuselementi siduv valk (*cAMP-responsive element binding protein*)

CMV – tsütomegaloviirus (*cytomegalovirus*)

CSK puhver – tsütoskeleti puhver (*cytoskeleton buffer*)

Daxx – surmadomeeniga assotsieerunud valk (*death domain-associated protein*)

DBD – DNA-ga seonduv domeen (*DNA binding domain*)

Doc – deoksükolaat (*deoxycholate*)

DTT – ditiotreitol (*dithiothreitol*)

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

EBV – Epstein-Barri viirus (*Epstein-Barr virus*)

EDTA – etüleendiamiintetraetaanhape (*ethylene diamine tetracetic acid*)

EGTA – etüleenglükooltetraetaanhape (*ethylene glycol tetraacetic acid*)

HA – hemaglutiniin (*hemagglutinin*)

hBrd4 CTD – inimese Brd4 valgu C-terminaalne domeen

hDaxx – inimese Daxx valk

HPV – inimese papilloomiviirus (*human papillomavirus*)

HRP – mädarõika peroksüdaas (*horse radish peroxidase*)

HSV – herpes simplex viirus (*herpes simplex virus*)

IF – immunofluorestsents (*immunofluorescence*)

IP – immunopretsipitatsioon (*immunoprecipitation*)

JNK – Jun N-terminaalne kinaas (*Jun N-terminal kinase*)

kDa – kilodalton

mBrd4 FL – hiire täispikk Brd4 valk

MKIIP2 – mitootilise kinesiini sarnane valk 2 (*mitotic kinesin-like protein 2*)

MME – minikromosoomi säilitamise element (*minichromosome maintenance element*)

MO – minimaalne replikatsiooni alguspunkt (*minimal origin*)

ORF – avatud lugemisraam (*open reading frame*)

ORI – replikatsiooni alguspunkt (*origin of replication*)

p/CAF – p300/CBP-assotsieerunud faktor (*p300/CBP-associated factor*)

PAAG – polüakrüülamiidgeel (*polyacrylamide gel*)

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

PIPES – piperasiin-N,N'-bis(2-etaansulfoonhape) [*piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)*]

PML – promüelotsüütide leukeemia valk (*promyelocytic leukemia protein*)

P-TEFb – positiivne transkriptsiooni elongatsiooni faktor b (*positive transcription elongation factor 1*)

PVDF – polüvinülideendifluoriid (*polyvinylidene difluoride*)

RPA – replikatsiooni valk A (*replication protein A*)

rpm – rootori pööret minutis

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

Sol. – lahustuv (*soluble*) fraktsioon

SV40 – inimahvide viirus 40 (*simian virus 40*)

TBP – TATA boksi siduv valk (*TATA-box binding protein*)

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

TCA – trikloroäädikhape (*trichloroacetic acid*)

TFIIB – transkriptsiooni faktor IIB (*transcription factor IIB*)

TGFβ – transformeeriv kasvufaktor β (*transforming growth factor β*)

URR – ülesvoolu paiknev regulaatorala (*upstream regulatory region*)

WB – *Western blot*

SISSEJUHATUS

Papilloomiviirused on väikesed DNA viirused, mis nakatavad epiteelkoe basaalseid, jagunemisvõimelisi rakke ning säilivad pärast esialgset genoomi amplifikatsiooni nakatunud rakkudes stabiilse koopiaarvuga episomaalsete plasmiididena. Papilloomiviirused kasutavad säilimiseks oma genoomi kinnitamist peremeesraku kromosoomidele, tagades seeläbi oma DNA säilimise tuumas ja leviku koes rakkude jagunemise käigus.

Papilloomiviiruse E2 valk on viiruse elutsükli peamine regulaator, mis osaleb viiruse DNA transkriptsioonil ja replikatsioonil ning vahendab viiruse genoomi stabiilset segregatsiooni. Oma funktsioonide täitmiseks interakteerub E2 mitmete viiruseliste ja rakuliste valkudega erinevates tuumakompartimentides. Rakulistest valkudest omab viiruse elutsükli keskset rolli Brd4 valk, mis on seotud rakulise kromatiiniga ning seeläbi vahendab E2 transkriptsiooni funktsiooni ning osade papilloomiviiruste puhul ka E2 segregatsiooni funktsiooni.

PML kehad on mittekromatiinsed tuumastruktuurid, mis arvatakse olevat papilloomiviiruse replikatsiooni ning assambleerimise toimumiskohad. Lisaks võimendab PML kehade olemasolu viiruse varajast transkriptsiooni.

Antud töö teoreetiline osa annab ülevaate papilloomiviiruse E2 valgu funktsioonidest, PML kehade struktuurist ja funktsioonidest ning Daxx valgust, mis on PML kehade üks peamisi struktuurseid komponente. Töö eksperimentaalses osas uuritakse kromatiiniga assotsieerumisvõime kaotanud Brd4 C-terminaalse domeeni ekspressiooni mõju E2 valgu tuumasisesele lokalisatsioonile, E2 interaktsiooni Daxx valguga ning selle interaktsiooni tähtsust E2-vahendatud transkriptsioonis ja replikatsioonis.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi mikrobioloogia ja viroloogia õppetooli juures ning Tartu Ülikooli Tehnoloogia Instituudis. Asjaliku juhendamise ja toetuse eest soovin tänada oma juhendajat Reet Kurge.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. PAPILLOOMIVIIRUSTE ÜLDISELOOMUSTUS

Papilloomiviirused moodustavad sugukonna *Papillomaviridae*. Neile on iseloomulik väike, ikosaeedrilise sümmeetriaga ümbriseta kapsiid, millesse on pakitud umbes 8000 aluspaari pikkune kaheahelaline tsirkulaarne DNA genoom.

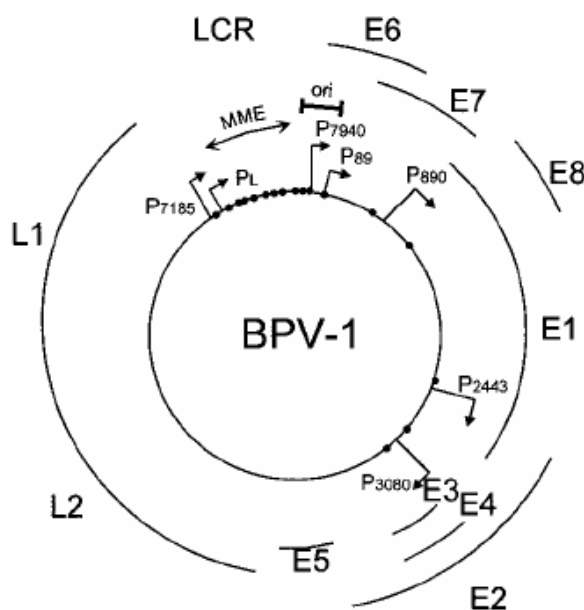
Papilloomiviirused on looduses laialt levinud, neid on kirjeldatud erinevatel imetajatel ja lindudel. Praeguseks on identifitseeritud üle 100 inimese papilloomiviiruse (HPV) tüübi. Papilloomiviirused on väga liigi- ja koespetsiifilised. Nad nakatavad epiteeli basaalseid rakke ja põhjustavad naha või limaskestast vohandeid, enamasti healoomulisi papilloome (Howley ja Lowy, 2001). Kõrge riskiga HPV tüübid, nagu HPV-16, HPV-18 ja HPV-31 on seotud mitmete tuumoritega, nende seas ka emakakaelavähiga (zur Hausen, 2002).

Veise papilloomiviirus tüüp 1 (BPV-1) on ajaloolistel põhjustel kujunenud papilloomiviiruste molekulaarbioloogia uurimise prototüübiks. BPV-1 põhjustab fibropapilloome, mis sisaldavad nii prolifereeruvaid epiteelirakke kui fibroblaste. Fibropapilloomiviirused omavad võimet indutseerida fibroblastide kasvajaid ka teistes liikides ning transformeerida näriliste rakke koekultuuri tingimustes (Law *et al.*, 1981).

1.1. Papilloomiviiruste genoomi struktuur ja organisatsioon

Kõigi papilloomiviiruste genoomne organisatsioon on väga sarnane. Nende genoomiks on umbes 8000 aluspaari pikkune kaheahelaline tsirkulaarne DNA molekul, kus kõik avatud lugemisraamid (ORF-id) paiknevad ühel DNA ahelal. Näitena on joonisel 1 toodud BPV-1 genoomi kaart. Vastavalt asukohale genoomis jagatakse avatud lugemisraamid varasteks (E – *early*) või hilisteks (L – *late*) (Howley ja Lowy, 2001).

Kodeerivate alade vahele jääb umbes 1000 aluspaari pikkune mittekodeeriv piirkond, mida nimetatakse LCR (*long control region*), URR (*upstream regulatory region*) või NCR (*noncoding region*). Vastav piirkond sisaldab transkriptsiooniks ja viiruse genoomi replikatsiooniks vajalikke *cis*-järjestusi (Turek, 1994).



Joonis 1. BPV-1 genoomi kaart. Näidatud on varased (E) ja hilised (L) avatud lugemisraamid. Promootorid (P) on tähistatud nooltega ning E2 valgu seondumiskohad mustade ringidena. Samuti on näidatud mittekodeeriv piirkond (LCR), replikatsiooni alguspunkt (ORI) ja säilituselement MME. (Howley ja Lowy, 2001)

Viiruse genoomi varastelt lugemisraamidelt kodeeritakse valke, mis on vajalikud viiruse DNA replikatsiooniks, transkriptsiooniks, segregatsiooniks ja rakkude transformatsiooniks.

E1 on replikatsiooni initsiaatorvalk, mis seostub URR piirkonnas asuva replikatsiooni alguspunktiga (Sedman *et al.*, 1997). E1 valk omab DNA helikaasset (Yang *et al.*, 1993; Seo *et al.*, 1993) ja DNA sõltuvat ATPaasset aktiivsust (MacPherson *et al.*, 1994).

E2 valk on viiruse elutsükli peamine regulaator, mis reguleerib nii viiruse DNA transkriptsiooni kui replikatsiooni ning osaleb viiruse genoomi stabiilsel säilimisel rakus

(McBride *et al.*, 1991). E2 on võimeline inhibeerima rakkude kasvu ning kaudselt indutseerima apoptoosi, represseerides HPV-positiivsetes rakkudes viiruseliste onkogeenide E6 ja E7 ekspressiooni ning võimaldades seeläbi rakulistel kontrollvalkudel, p53 ja pRB vastavalt, reguleerida rakutsükli (Dowhanick *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 2000). Kõrge riskiga HPV-de E2 valgud on võimelised indutseerima apoptoosi ka otseselt läbi p53 valguga interakteerumise ja seda nii HPV-transformeerunud kui HPV-mittettransformeerunud rakkudes (Webster *et al.*, 2000; Parish *et al.*, 2006). Lisaks võib E2 omada rolli viiruse genoomide virionide assambleerumissaitidesse juhatamisel (Day *et al.*, 1998).

E3 ORF-i poolt kodeeritavat valku pole senini leitud.

E4 ORF asub E2 geeni sees, kuid teises lugemisraamis. E4 on hiline valk, mida ekspresseeritakse terminaalset diferentseerunud keratinotsüütides (Doorbar *et al.*, 1997) ning mis põhjustab nakatunud raku keratiini võrgustiku lagunemist. On võimalik, et rakukeskkonda muutes hõlbustab E4 vegetatiivse replikatsiooni toimumist ning virionide valmimist ja rakust vabanemist (Howley ja Lowy, 2001).

E5 ORF kodeerib rakke transformeerivat valku, mis on väikseim seni teadaolev transformeeriv geeniprodukt. E5 valk interakteerub kasvufaktorite türosiinkinaasete retseptoritega ning aktiveerib neid, mõjutades seeläbi rakkude proliferatsiooni (Howley ja Lowy, 2001; Munger ja Howley, 2002).

Ka **E6** ja **E7** on transformeerivad valgud, mis blokeerivad või lagundavad raku kontrollvalke. HPV E6 ja E7 põhjustavad vastavalt p53 ja pRB taseme langemist rakus (Munger ja Howley, 2002).

Hilised lugemisraamid **L1** ja **L2** kodeerivad vastavalt peamist kapsiidivalku, mis moodustab virioni väliskesta, ja minoorset kapsiidivalku, mis võib olla oluline kapsiidi struktuuri stabiliseerimisel (Hagensee *et al.*, 1993) ning osaleda viiruse DNA pakkimisel virionidesse (Day *et al.*, 1998). Neid valke ekspresseeritakse vaid viiruse replikatsiooni hilises faasis kõrge diferentseerumisastmega keratinotsüütides (Baker ja Howley, 1987).

1.2. Papilloomiviiruste elutsükkel

Papilloomiviirused on väga liigispetsiifilised ning nakatavad epiteelkoe jagunemisvõimelisi basaalseid rakke. Produktiivse infektsiooni võib jagada varaseks ja hiliseks faasiks, mis on seotud epiteeli rakkude diferentseerumisastmega (Howley ja Lowy, 2001). Papilloomiviirused replitseeruvad ja säilivad peremeesrakkude tuumades ekstrakromosomaalselt, multikoopiaalsete plasmiidide ehk episoomidena (Law *et al.*, 1981).

Papilloomiviiruste DNA replikatsioonil eristatakse kolme erinevat staadiumit. Vahetult pärast esmast nakatumist toimub basaalses keratinotsüütides viiruse genoomi amplifikatsiooniline replikatsioon, mille käigus tõuseb viirusgenoomide arv 50 kuni 100 koopiani raku kohta (Howley ja Lowy, 2001). Replikatsiooniks on vajalikud viirusvalgud E1 ja E2 (Ustav ja Stenlund, 1991) ning URR piirkonnas asuv minimaalne replikatsiooni alguspunkt (MO – *minimal origin*), mis koosneb E1 ja E2 valkude seondumiskohtadest ning AT-rikkast piirkonnast (Ustav *et al.*, 1991; Ustav *et al.*, 1993). Eksperimentaalselt jälgitakse amplifikatsioonilist replikatsiooni transientses süsteemis koekultuuri tingimustes, mis on osutunud vastavale staadiumile peremeesrakus kõige sarnasemaks süsteemiks.

Latentse replikatsiooni staadiumis püsib viirusgenoomi koopiaarv raku kohta muutumatuna. Viirusgenoom replitseerub raku genoomiga sünkroonselt, keskmiselt üks kord rakutsükli jooksul ning säilib jagunevates rakkudes stabiilselt episoomina (Howley ja Lowy, 2001). Stabiilse replikatsiooni toimumiseks on lisaks E1 ja E2 viirusvalkudele ning MO-le vajalik URR piirkonnas asuv 12 E2 seondumiskohast (E2BS) koosnev nn *minichromosome maintenance element* ehk MME (Piirsoo *et al.*, 1996).

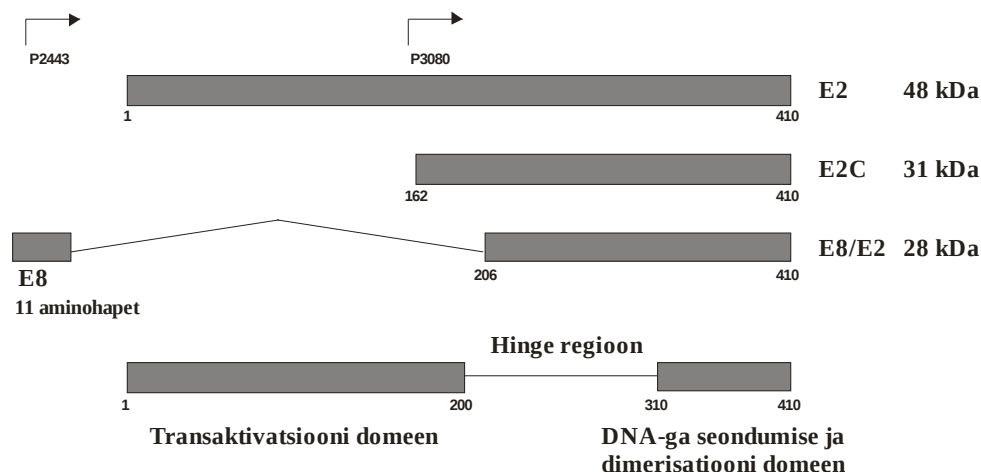
Kõrgelt diferentseerunud keratinotsüütides leiab aset viiruse elutsükli hiline faas. Algab viiruse DNA kontrollimatu vegetatiivne replikatsioon, nakatunud rakkude tuumades pakitakse sünteesitud genoomid valmivatesse viiruspartiklitesse, mis jõuavad koos surnud rakkudega naha pinnale (Howley ja Lowy, 2001). On näidatud, et selles staadiumis lülitub viiruse DNA replikatsioon bidirektsionaalselt θ mudelilt veereva ratta mudelile (Flores ja Lambert, 1997). Vegetatiivse replikatsiooni, viiruspartiklite assambleerumise ja vabanemise kohta on seni vähe andmeid. Selle uurimist raskendab keratinotsüütide vajalik kõrge diferentseerumisastme saavutamine koekultuuri tingimustes.

2. PAPILLOOMIVIIRUSTE E2 VALGU ISELOOMUSTUS

Papilloomiviiruste E2 geeni produktid on viiruse transkriptsiooni, replikatsiooni ja segregatsiooni peamised regulaatorid. BPV-1 E2 avatud lugemisraam kodeerib kolme valku (Hubbert *et al.*, 1988), nende struktuur ja konserveerunud domeenide asetus on toodud joonisel 2. Täispikk E2 valk on 48 kDa suurune transkriptsiooni aktivaator (Spalholz *et al.*, 1985), oluline replikatsiooni initsiatsioonil (Ustav ja Stenlund, 1991) ja viiruse genoomide efektiivsel segregatsioonil (Piirsoo *et al.*, 1996). Transkriptsioonilisi repressorvalke E2C ja E8/E2 kodeeritakse E2 lugemisraami 3' osa pealt (Choe *et al.*, 1989). Valku E2C suurusega 31 kDa ekspresseeritakse E2 ORF-is asuvalt promootorilt P₃₀₈₀. Teist repressorvalku E8/E2 (28 kDa) transleeritakse splaissitud mRNA-lt, kus osa E8 ORF-ist (11 aminohapet) on ühendatud E2 ORF-i C-terminaalse osaga (250 aminohapet). HPV-11, -16 ja -31 kodeerivad samuti E2 valgu repressorvorme ning need sarnanevad BPV-1 E8/E2 valgule (Chiang *et al.*, 1991; Doorbar *et al.*, 1990; Stubenrauch *et al.* 2000).

Papilloomiviiruste E2 valgud koosnevad kolmest domeenist (Giri ja Yaniv, 1988). N-terminaalne transaktivatsioonidomeen (järjestused 1-200), mis on olemas ainult täispikal E2 valgul, vastutab transkriptsiooni aktivatsiooni eest ning on vajalik E2 valgu replikatsiooni- ja segregatsiooni funktsioonide täitmiseks. See multifunktsionaalne domeen on võimeline interakteeruma nii mitmete rakuliste transkriptsioonifaktoritega kui ka viiruseliste E1 ja L2 valkudega (Day *et al.*, 1998; Heino *et al.*, 2000; Mohr *et al.*, 1990). C-terminaalne domeen (järjestused 310-410) on olemas kõigil kolmel E2 valgul ning see vastutab dimerisatsiooni ja järjestusspetsiifiliselt DNA-ga seondumise eest. Neid kahte konserveerunud domeeni ühendab "hinge" regioon (järjestused 200-310), mis on nii pikkuselt kui järjestuselt varieeruv (Giri ja Yaniv, 1988; McBride *et al.*, 1989; Allikas *et al.*, 2001). E2 valgud seonduvad dimeerina C-terminaalse DNA-ga seonduva domeeni (DBD) kaudu palindroomsele konsensusjärjestusele ACCN₆GGT (Androphy *et al.*, 1987). E2 dimeeride spetsiifilisi seondumiskohti leidub BPV-1 genoomis 17, millest 12 asuvad URR piirkonnas (Li *et al.*, 1989). HPV-del on seondumiskohti vähem, näiteks HPV-18, HPV-16 ja HPV-11 on neid 4 (Howley ja Lowy, 2001).

Papilloomiviiruste E2 valgu erinevad vormid moodustavad omavahel homo- ja heterodimeere. Kuna E2 valgu heterodimeeride bioloogiliste aktiivsuste uurimine on nii homo- kui heterodimeeride esinemise tõttu raskendatud, konstrueerisid Kurg *et al.* intramolekulaarsed dimeerid, kus täispikk E2 valk on polüpeptiidse linkeri abil liidetud E2 repressorvormiga. Selgus, et ühe transaktivatsiooni domeeniga E2 valgu heterodimeer käitub efektiivse transkriptsiooni aktivaatorina ning on võimeline toetama papilloomiviiruse *origin*'i replikatsiooni. Samas ei suuda see tagada E2 seondumiskohti sisaldavate plasmiidide stabiilset segregeerumist jagunevates rakkudes (Kurg *et al.*, 2006).



Joonis 2. BPV-1 E2 regulaatorvalkude struktuur ning E2 valgu domeenide asetus. Täispikka E2 valku ekspresseeritakse promootorilt P₂₄₄₃, repressorvalke E2C ja E8/E2 vastavalt P₃₀₈₀ ja P₂₄₄₃ promootorilt. (Howley ja Lowy, 2001 põhjal)

2.1. E2 valk transkriptsioonifaktorina

Täispikk BPV-1 E2 aktiveerib transkriptsiooni BPV-1 varastelt promootoritelt, kinnitudes E2 seondumiskohtadele URR piirkonnas (McBride *et al.*, 1991; Szymanski ja Stenlund, 1991). N-terminaalne transaktivatsioonidomeen vahendab nii otseseid kui kaudseid interaktsioone mitmete rakuliste transkriptsiooni masinavärgi komponentidega (nagu TFIIB, TBP, Sp1, AMF-1, p/CAF, p300/CBP, RNA polümeraas II) (Rank *et al.*,

1995; Steger *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1991; Benson *et al.*, 1997; Breiding *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2000). Aktivatsioonidomeeni puudumise tõttu käituvad E2C ja E8/E2 valkude homodimeerid transkriptsiooni repressoritena, blokeerides E2 seondumiskohti (Barsoum *et al.*, 1992; Choe *et al.*, 1989; Lambert *et al.*, 1989; Spalholz *et al.*, 1985). Ühe transaktivatsiooni domeeniga E2 heterodimeerid on aga võimelised efektiivselt aktiveerima transkriptsiooni E2-sõltuvatelt promootoritelt (Kurg *et al.*, 2006).

E2 aktiveeritud transkriptsiooni vahendab peamiselt rakuline valk Brd4 (Ilves *et al.*, 2006; Schweiger *et al.*, 2006). Brd4 (200 kDa) sisaldab N-terminuses kahte bromodomeeni, mis on vajalikud kromatiiniga seondumiseks, ühte ekstraterminaalset domeeni teadmata funktsiooniga ning pikka C-terminaalset domeeni (Dey *et al.*, 2000). Brd4 seondub eelistatult atsetüleeritud kromatiiniga, eelkõige histoonidega H3 ja H4 (Dey *et al.*, 2003; You *et al.*, 2004). BPV-1 E2 valguga seondub Brd4 C-terminaalselt paikneva 139 aminohappelise regiooni kaudu (aminohapped 1224-1362). Mitmed erinevad loomade ja inimese papilloomiviiruste E2 valgud interakteeruvad Brd4-ga, kuigi erineva efektiivsusega. Selle interaktsiooni lõhkumisel kaotab E2 oma transaktivatsiooni funktsiooni, viidates, et Brd4 on vajalik kõigi papilloomiviiruste E2-vahendatud transaktivatsiooniks (McPhillips *et al.*, 2006). E2 valk stabiliseerib Brd4 assotsiatsiooni kromatiiniga ning selleks on vajalik E2 transkriptsiooniliselt kompetentne transaktivatsioonidomeen, aga mitte DNA-ga seondumise funktsioon (McPhillips *et al.*, 2005). Brd4 C-terminaalse domeeni (Brd4 CTD) ekspressioon on dominant-negatiivse mõjuga, inhibeerides efektiivselt kõigi papilloomiviiruste E2-vahendatud transaktivatsiooni (McPhillips *et al.*, 2006; Schweiger *et al.*, 2006; Ilves *et al.*, 2006; Kurg *et al.*, 2006).

Brd4 stimuleerib RNA polümeraas II-sõltuvat transkriptsiooni interakteerudes läbi bromodomeenide elongatsioonifaktoriga P-TEFb, võimaldades viimase kontakti Mediator kompleksiga ning RNA polümeraas II C-terminaalse domeeni fosforüleerimist (Yang *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2005). Brd4 võib käituda ka transkriptsiooni korepressorina andes HPV-11 E2 valgule võime inhibeerida viiruseliste onkovalkude E6 ja E7 ekspressiooni, mis omakorda antagoniseerivad p53 ja pRB aktiivsust. Brd4 on seega võimeline tooma promootoralale erinevaid transkriptsioonifaktoreid moduleerimaks selle aktiivsust (Nishiyama *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006).

2.2. E2 valk replikatsioonifaktorina

E2 valk on oluline ka viiruse DNA replikatsiooni initsiatsioonil (Ustav *et al.*, 1991). Papilloomiviiruste DNA replikatsiooniks on vajalikud replikatsiooni alguspunkt *in cis* ja viirusvalgud E1 ja E2 *in trans* (Chiang *et al.*, 1992; Ustav ja Stenlund, 1991). *In vivo* tingimustel transientseks ja stabiilseks replikatsiooniks vajalik minimaalne *origin* koosneb AT-rikkast alast ning valkude E1 ja E2 seondumiskohast (Ustav *et al.*, 1991). Replikatsiooni initsiatsiooniks seondub E2 valk koos E1 valguga replikatsiooni alguspunktile URR piirkonnas (Sedman ja Stenlund, 1995; Sedman *et al.*, 1997). Seejärel toimub ATP-sõltuvalt E2 vabanemine ja E1 molekulide lisandumine replikatsiooni alguspunktile. E1 molekulidest moodustub topeltheksameerne helikaasse aktiivsusega kompleks, mis on võimeline DNA-d bidireksionaalselt lahti keerama (Sanders ja Stenlund, 1998; Sedman ja Stenlund, 1998). E2 valk käitub replikatsiooni initsiatsioonil abifaktorina, kuna E1-E2 heterodimeer omab replikatsiooni alguspunkti suhtes kõrgemat afiinsust ja järjestusspetsiifilisust kui E1 üksinda (Sedman ja Stenlund, 1995; Sedman *et al.*, 1997). Samuti on E2 võimeline seonduma rakuliste replikatsioonifaktoritega nagu replikatsiooni valk A (RPA) (Li ja Botchan, 1993) ning vähendama nukleosoomide poolt põhjustatud replikatsiooni repressiooni (Li ja Botchan, 1994).

2.3. E2 valgu roll papilloomiviiruste episomaalsel säilimisel

BPV-1 replitseerub näriliste rakkude tuumades ekstrakromosomaalse multikoopialise plasmiidina ning säilib rakkudes stabiilselt pika aja jooksul (Law *et al.*, 1981). Viiruse latentseks replikatsiooniks on vajalikud E1 ja E2 valgud ning peale minimaalse *origin*'i ka MME element, mis sisaldab mitmeid E2 seondumiskohti (Piirsoo *et al.*, 1996).

Nii E2 valk kui BPV-1 genoom on mitoosi faasis seotud kondenseerunud kromosoomidega, tagades sedasi viiruse episomaalseks säilimiseks vajaliku mehhanismi (Bastien ja McBride, 2000; Ilves *et al.*, 1999; Lehman ja Botchan, 1998; Skiadopoulos ja

McBride, 1998; Abroi *et al.*, 2004). Kromosoomi IF katsed on näidanud, et BPV-1 E2 valk seondub mitootilistele kromosoomidele ka ilma BPV-1 genoomita (Abroi *et al.*, 2004; Skiadopoulos ja McBride, 1998) ning et BPV-1 genoomi seandumine mitootilistele kromosoomidele on vahendatud E2 valgu poolt. E2C ning E8/E2 vormid üksinda ei ole võimelised kromatiinile seonduma (Skiadopoulos ja McBride, 1998). Nii DNA sidumise suhtes defektne kui ilma C-terminaalse domeenita E2 lokaliseeruvad mitootilistele kromosoomidele, samamoodi käitub ka “hinge” regioonita E2 valk (Bastien ja McBride, 2000; Allikas *et al.*, 2001). Samas vaid N-terminaalset domeeni omav E2 jagab täispika E2-ga identset assotsieerumisvõimet (Bastien ja McBride, 2000; Abroi *et al.*, 2004), kusjuures deletsioonid vastavas domeenis häirivad E2 seandumist kromosoomidele. Seega on E2 assotsiatsiooniks mitootilise kromatiiniga vajalik vaid N-terminaalne transaktivatsiooni domeen ning seda vahendab arvatavasti mõni rakuline valk, kuna E2 DNA sidumise võime pole kromosoomidele seandumisel määrav.

Arvatavasti toimub BPV-1 episoomide stabiilne säilimine jagunevates rakkudes järgmise mehhanismi alusel. E2 valk vahendab viirusgenoomide interakteerumist kromosoomidega, seondudes oma C-terminaalse domeeni abil URR piirkonnas asuvatele E2 seandumiskohtadele ning N-terminaalse domeeni kaudu ühe või mitme rakulise faktoriga kromatiinis. Selline mehhanism tagab viirusgenoomi edasi levimise jagunevas koes, säilimise tuumades ning enam-vähem võrdse jaotumise tütarakkude vahel. BPV-1 E2 ühe partnervalguna on identifitseeritud kahte bromodomeeni sisaldav ning eelistatult atsetüleeritud kromatiiniga seostuv valk Brd4 (You *et al.*, 2004). Brd4 ja E2 kolokaliseeruvad nii mitootilistel kromosoomidel kui interfaasis (McPhillips *et al.*, 2005). Brd4-ga interakteerumise suhtes defektsed E2 mutandid ei ole ka võimelised mitootiliste kromosoomidega seonduma (Baxter *et al.*, 2005).

Senini arvati, et BPV-1 ja HPV-d kasutavad episoomide stabiilse säilimise tagamiseks erinevaid võtteid, kuna HPV-11, HPV-16 ja HPV-18 puhul on immunofluorestsents analüüsi teel näidatud E2 valkude seandumist mitoosi kääviga ning HPV-11 E2 puhul ka seandumist tsentrosoomidega (Van Tine *et al.*, 2004). McPhillips *et al.* aga näitasid, et nii mitmete loomade kui inimese papilloomiviiruste E2 valgud seonduvad Brd4-ga. Samas pole see interaktsioon vajalik kõigi uuritud papilloomiviiruste stabiilseks segregeerumiseks, kuna mutatsioonid, mis lõhuvad E2 interaktsiooni Brd4-ga, ei

mõjuta osade E2 valkude (HPV-11, HPV-16, HPV-31 ja HPV-57 E2 valgud) võimet assotsieeruda kromatiiniga. Seega, kuigi kõik papilloomiviirused kinnitavad oma genoomi rakuliste kromosoomide külge, et saavutada selle stabiilne segregatsioon, kasutavad nad selleks erinevaid rakulisi partnervalke (McPhillips *et al.*, 2006).

Brd4 CTD ekspressioon konkureerib endogeense Brd4 valguga E2 sidumise pärast, relokaliseerides viimase mitootilistelt kromosoomidelt (You *et al.*, 2004). See omakorda kiirendab viiruse DNA kadumist mitootilistelt kromosoomidelt ning BPV-1-transformeerunud rakkude fenotüübi taandumist (You *et al.*, 2005).

Peale Brd4 on leitud veel kaks potentsiaalset E2 partnervalku – ChlR1 ja MKlp2 (*mitotic kinesin-like protein 2*). ChlR1 on DNA helikaas, mis osaleb tütarchromatiidide kohesioonil. E2 ja ChlR1 kolokaliseeruvad varajases mitoosis. ChlR1 valguga assotsieerumine on vajalik E2 segregatsioonifunktsiooniks, kuna E2 mutant, mis ei interakteeru ChlR1 valguga, või ChlR1 deleteerimine ei taga ka viiruse genoomide efektiivset segregatsiooni. Samas seob see E2 mutant Brd4 valku, viidates, et E2-Brd4 interaktsioon pole piisav E2 valguga assotsieerumiseks mitootiliste kromosoomidega (Parish *et al.*, 2006). MKlp2 on kinesiini-sarnane tsentraalse mitoosikävi mootorvalk ning vajalik tsütokineesi lõpule viimiseks. MKlp2 kolokaliseerub ja assotsieerub E2 valguga mitoosi ajal ning ka viiruse genoomid on kompleksis MKlp2 valguga vaid selles rakutsükli etapis (Yu *et al.*, 2007). Seega vajab papilloomiviiruste stabiilne säilimine jagunevates rakkudes mitme rakulise faktori osalust ning need faktorid võivad igas mitoosi etapis olla erinevad.

3. PML KEHADE ROLL DNA VIIRUSTE ELUTSÜKLIS

PML (*promyelocytic leukemia protein*) kehad on distinktsed tuumasisesed interkromatiinsed struktuurid. Nad arvatakse olevat mitmete tuumafaktorite transientsed deponeerimispaigad ning osalevat transkriptsiooni regulatsioonis (Doucas, 2000), kasvu supressioonis (Gottifredi ja Prives, 2001) ja apoptoosis (Wang *et al.*, 1998). Neid tuntakse ka POD-idenaga (*PML oncogenic domains*) ja ND10 (*nuclear domains 10*) nime all. PML kehade peamiseks struktuurseks komponendiks on PML valk (Ishov *et al.*, 1999), lisaks sisaldavad need veel valke, nagu Sp100, mis mõjutab transkriptsiooni ja kromatiini

dünaamikat (Seeler *et al.*, 1998); SUMO-1, mis modifitseerib PML ja Sp100 valke (Zhong *et al.*, 2000); Daxx, mis osaleb apoptoosis ja transkriptsiooni repressioonil (Li *et al.*, 2000; Torii *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2000); ning tuumorsupressorit p53 (Gottifredi ja Prives, 2001).

PML kehad on dünaamilised struktuurid, mille hulk ja suurus rakutüübiti varieerub. Nad on tõenäoliselt seotud tuumamaatriksiga ning reguleeritud rakutsükli poolt (Maul *et al.*, 2000; Sternsdorf *et al.*, 1997). Lisaks on PML kehad seotud mitmete DNA viiruste varajase replikatsiooniga. Arvatakse, et PML kehad võivad olla olulised viiruse replikatsiooni limiteerimisel ning käituda viirusevastase kaitsemehhanismina, kuna näiteks HSV (*herpes simplex virus*) ICP0 (Everett ja Maul, 1994), CMV (*cytomegalovirus*) IE1 (Korioth *et al.*, 1996), adenoviiruse E4orf3 (Carvalho *et al.*, 1995) ja EBV (*Epstein-Barr virus*) BZLF1 (Adamson ja Kenney, 2001) valgud indutseerivad PML kehade struktuuri lõhkumise. Samas võivad PML kehad sisaldada ka olulisi faktoreid, mis vabanevad nende struktuuride lagundamisel (Burkham *et al.*, 2001). Alternatiivselt võivad PML kehad omada ka positiivset rolli viiruse replikatsioonis, sest SV40 ja HPV-11 replitseeruvad PML kehtes või nende vahetus läheduses ilma neid reorganiseerimata (Tang *et al.*, 2000; Swindle *et al.*, 1999).

Ekspressseerides HPV-11 E1 ja E2 valke *in trans* lokaliseeruvad HPV-11 replikatsiooni *origin*'i sisaldavad plasmiidid PML kehade lähedusse (Swindle *et al.*, 1999). PML kehad pole aga ainult viiruse replikatsiooni potentsiaalsed toimumiskohad, vaid võivad olla olulised ka viiruse morfogeneesis. HPV-16 ja -33 ning BPV-1 minoorne kapsiidivalk L2 akumulereb samuti nendes struktuurides ning relokaliseerib sinna ka L1 ja E2 valgud (Day *et al.*, 1998; Florin *et al.*, 2002). L2-sõltuv kolokaliseerumine tõstab virioni komponentide lokaalset kontsentratsiooni, mis omakorda võib soodustada viiruse pakkimist. L2 interakteerub E2 valguga ning E2 rolliks viiruse morfogeneesis on tõenäoliselt viiruse genoomi toomine assambleerimiskohtadesse, seondudes viimasega kõrge afiinsusega ja järjestusspetsiifiliselt (Heino *et al.*, 2000; Day *et al.*, 1998). Lisaks muudab L2 valk PML kehade struktuuri, eemaldades transkriptsiooni aktivaatori Sp100 ja kontsentreerides sinna transkriptsiooni repressori Daxx (Florin *et al.*, 2002). L2 ja Daxx valkude interaktsioon arvataksegi olevat L2 akumulereumise põhjuseks PML kehtesse (Becker *et al.*, 2003). Daxx valgu akumulereimine PML kehtesse ja Sp100 eemaldamine

neist võib olla oluline viiruse replikatsiooni ja transkriptsiooni repressioonil ning kromatiini kondenseerumisel, mis omakorda hõlbustab viiruse genoomi pakkimist kapsiidi (Florin *et al.*, 2002). Lisaks on näidatud, et efektiivne transkriptsioon viiruse varases elutsüklis vajab PML kehade olemasolu (Day *et al.*, 2004).

4. DAXX VALGU ISELOOMUSTUS

Daxx identifitseeriti esmakordselt kui valk, mis seob transmembraanse Fas retseptori tsütosoolset „surma-domeeni“ ja osaleb seeläbi apoptoosirajas, mis hõlmab endas Jun N-terminaalse kinaasi (JNK) aktivatsiooni (Yang *et al.*, 1997). Daxx interakteerub ka TGFβ (*transforming growth factor β*) tüüp II retseptori tsütosoolse domeeniga ning reguleerib TGFβ-indutseeritud JNK aktivatsiooni (Perlman *et al.*, 2001). Daxx lokaliseerub nii tuumas kui tsütoplasmas. Tuumas on Daxx assotsieerunud nii PML kehadega kui heterokromatiinsete regioonidega (Ishov *et al.*, 1999). Daxx valgu lokaliseerimine PML kehadesse ja selle interaktsioon Pml valguga on vajalikud esimese pro-apoptootiliseks funktsiooniks. Pml valk osaleb samuti raku programmeeritud surmas, lisaks on Pml^{-/-} rakkudes Daxx valgu pro-apoptootiline aktiivsus inhibeeritud (Wang *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2000). Arvatakse, et tuumas olles moduleerib Daxx Fas-indutseeritud apoptoosis osalevate geenide ekspressiooni (Torii *et al.*, 1999). Seda, et PML kehadesse lokaliseerumine on seotud Daxx valgu pro-apoptootilise funktsiooniga, kinnitab ka selle kontsentreerimine PML kehadesse ultravioletkiirguse ja oksüdatiivse stressi mõjul (Khelifi *et al.*, 2005).

Lisaks mitmetele töödele, mis kirjeldavad Daxx valgu funktsioneerimist raku surmas, on leitud, et Daxx omab ka potentsiaalseid anti-apoptootilisi omadusi. Embrüonaalses arengus omab Daxx valk kaitsvat rolli, kuna selle puudumine lõppeb embrüo surmaga (Michaelson *et al.*, 1999). Daxx ekspressiooni mahasurumine RNA interferentsi teel suurendab apoptoosi ning sensibiliseerib rakke Fas, ultravioletkiirguse ja TNFα (*tumor necrosis factor α*) poolt induktsioonile (Michaelson *et al.*, 2003; Chen ja Chen, 2003). Arvatakse, et see Daxx valgu fraktsioon, mis esineb vabalt

nukleoplasmas ja pole assotsieerunud PML kehadega, omab anti-apoptootilisi omadusi, ning PML kehadega seotud fraktsioon aktiveerib raku surma (Salomoni ja Khelifi, 2006).

Rakutsükli S faasis on Daxx leitud interakteeruvat heterokromatiinsete regioonidega, sealjuures ka tsentromeerse DNA-ga. Nendes regioonides on Daxx kompleksis ATRX valguga (*α -thalassemia/mental retardation syndrome protein*) ning vabaneb sealt G₂ faasis (Ishov *et al.*, 2004). Daxx valgu puudumine rakkudes kiirendab S faasi läbimist ning põhjustab binukleaarsete rakkude teket (Ishov *et al.*, 2004). Daxx-ATRX kompleksi funktsiooniks pakutakse kromatiini remodelleerimist S faasis (Xue *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2004). Daxx interakteerub ka CENP-C valguga (*centromere protein-C*) interfaasis. Seega lisaks tsentromeeride rollile detekteerida mitoosikäävi kahjustusi mitoosis, võivad nad Daxx valguga assotsieerumisel olla olulised ka apoptootiliste stiimulite äratundmisel interfaasis (Pluta *et al.*, 1998).

Daxx valk osaleb ka transkriptsiooni reguleerimisel, käitudes enamjaolt korepressorina. Daxx repressseerib mitmeid transkriptsiooni faktoreid, nagu Pax3, ETS1, E2F1, NF- κ B, p53 ja p73 (Salomoni ja Khelifi, 2006). Lisaks interakteerub Daxx mitmete valkudega, mis osalevad transkriptsiooni vaigistamisel, nagu histooni deatsetülaas II, *core* histoonid ja DEK valk (Hollenbach *et al.*, 2002). Pml^{-/-} rakkudes on Daxx seotud heterokromatiinsete regioonidega, mis sisaldavad kromatiini repressseeritud olekus. Daxx valgu lokaliseerimine PML kehadesse arvatakse inhibeerivat selle transkriptsiooni repressseerimise võimet (Li *et al.*, 2000). PML kehades tõstab Daxx näiteks oluliselt p53-vahendatud transkriptsiooni. Daxx interakteerub mitmete kinaasidega ning võib seeläbi mõjutada p53 fosforüleerimist (Zhao *et al.*, 2003).

EKSPERIMENTAALNE OSA

1. TÖÖ EESMÄRGID

Papilloomiviiruse E2 valk omab viiruse elutsükli tähtsat rolli, kuna reguleerib viiruse DNA transkriptsiooni ja replikatsiooni ning osaleb viiruse genoomi stabiilsel säilimisel jagunevates rakkudes. Kõigi papilloomiviiruste transkriptsiooniks on vajalik viirusvalgu E2 interaktsioon rakulise Brd4 valguga. Selle interaktsiooni lõhkumisel ei ole E2 enam võimeline transkriptsiooni reguleerima (McPhillips *et al.*, 2006). On näidatud, et rakulise kromatiiniga assotsieerumisvõime kaotanud Brd4 C-terminaalse domeeni ekspressioon inhibeerib efektiivselt kõigi papilloomiviiruste E2 valkude transkriptsiooni funktsiooni (McPhillips *et al.*, 2006; Schweiger *et al.*, 2006; Ilves *et al.*, 2006; Kurg *et al.*, 2006). Lisaks on E2 ja Brd4 valkude vaheline interaktsioon vajalik mõnede papilloomiviiruste stabiilseks säilimiseks, vahendades viiruse genoomide assotsiatsiooni rakulise kromatiiniga mitoosi etapis (McPhillips *et al.*, 2006). Brd4 CTD ekspressioon kiirendab BPV-1 DNA kadumist mitootilistelt kromosoomidelt ning rakkude transformeerunud fenotüübi taandumist (You *et al.*, 2005).

Antud töö eesmärgiks oli uurida

- 1) kuidas muudab Brd4 CTD ekspressioon papilloomiviiruse E2 valgu tuumasisest lokalisatsiooni ning selle interaktsioone erinevate tuumastruktuuridega,
- 2) E2 interaktsiooni rakulise Daxx valguga, PML kehade ühe peamise struktuurse komponendiga,
- 3) E2 ja Daxx valkude vahelise interaktsiooni võimalikku tähtsust papilloomiviiruse elutsükli.

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Rakuliinid ja nende kasvatamine

Katsetes kasutati rakuliine COS7 (Aafrika rohepärdiku neeru rakuliin), CHO (Hiina hamstri munasarja rakuliin), CHO Bgl40 (Hiina hamstri munasarja rakuliin, mis ekspresseerib BPV-1 E1 ja E2 valke ning sisaldab BPV-1 URR piirkonda kandvat pNeoBgl40 plasmidi), HeLa (HPV18 positiivne inimese emakakaela kasvaja rakuliin) ja HaCat (inimese primaarsed immortaliseeritud keratinotsüüdid). CHO ja CHO Bgl40 rakuliine kasvatati F12 (*Ham's Nutrient Mixture F12*) ning COS7, HeLa ja HaCat rakuliine IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, „Difco”) söötmes. Söötmetele lisati 10% veise loote seerumit („Sebak“) ning penitsilliini 100 U/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml. Rakke inkubeeriti 37°C juures 5% CO₂ keskkonnas.

2.2. Plasmiidid

BPV-1 E2 ekspressioonivektoritena kasutati eelnevalt kirjeldatud plasmide pCGE2 (ekspresseerib täispikka BPV-1 E2 valku), pCGE2C (sisaldab BPV-1 E2 piirkonda 162-410) ja pCGE2N (sisaldab BPV-1 E2 piirkonda 1-218) (Ustav ja Stenlund, 1991; Allikas *et al.*, 2001).

HPV-18 E2 valku ekspresseeriti plasmiididelt pQMHPV18E2 ja pQMHPV18E2codon ning HPV-11 E2 valku plasmiididelt pQMHPV11E2 ja pQMHPV11E2codon. pQMHPV18E2 ja pQMHPV11E2 plasmiidid sisaldavad E2 kodeeriva alaga samas raamis paiknevat N-terminaalset epitoop *tag*'i E2Tag (BPV1-E2 valgu aminohapped 199-208).

pQMHPV18E2codon plasmidi konstrueerimiseks kasutati HPV-18 E2 sünteetilist N-terminaalset geeni osa (1-426 bp) pGA4 vektoris („GENEART AG”). Viimast lõigati ensüümidega *Hind*III ja *Mun*I ning saadud geeni fragment viidi vektorisse pQMHPV18E2, mida oli restrikteeritud samade ensüümidega. Saadud konstrukt sisaldab SV40 *origin*'i ja

ekspresseerib CMV promootori alt esimese 426 aluspaari suhtes koodon-optimeeritud HPV-18 E2 valku, mille N-terminuses paikneb E2Tag.

pQMHPV11E2codon plasmidi konstrueerimiseks kasutati HPV-11 E2 sünteetilist N-terminaalset geeni osa (1-480 bp) pGA4 vektoris („GENEART AG”). Viimast lõigati ensüümidega *HindIII* ja *BcuI* ning saadud geeni fragment viidi vektorisse pQMHPV11E2, mida oli restrikteeritud samade ensüümidega. Saadud konstrukt sisaldab SV40 *origin*’i ja ekspresseerib CMV promootori alt esimese 480 aluspaari suhtes koodon-optimeeritud HPV-11 E2 valku, mille N-terminuses paikneb E2Tag.

pCGBrd4CTD plasmid sisaldab N-terminuses E2Tag-i, SV40 T-antigeeni tuuma lokaliseerimise signaali ja kodeerib inimese Brd4 (hBrd4 CTD) valgu viimast 315 aminohapet (Ilves *et al.*, 2006).

pQMHADaxx plasmidi konstrueerimisel kasutati inimese Daxx valgu (hDaxx) täispikka cDNA kloonu pDONR201 vektoris („RZPD”, *Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, GmbH*). hDaxxi kodeeriv ala amplifitseeriti PCR meetodi abil praimeritega DaxxF (5’ AGCGGATCCATGGCCACCGCTAAC 3’) ja DaxxR (5’ GATAGATCTCTAATCAGAGTCTGAGAGC 3’), millesse on disainitud vastavalt *BamHI* ja *BglII* restriktasidide äratundmisjärjestused. Ülespaljundatud järjestust töödeldi Klenow fragment polümeraasiga, et täita 5’ üleulatuvad otsad, ning lõigati *BamHI* ensüümiga. Saadud produkt sisestati vektorisse pQMHA, mida oli eelnevalt lõigatud ensüümidega *SmaI* ja *BamHI*. Saadud konstrukt sisaldab SV40 *origin*’i järjestust ning CMV promootori kontrolli all hDaxx valgu kodeerivat ala, mille N-terminuses paikneb hemaglutiniini (HA) tag.

pQMNTag/B-MCAP plasmidi konstrueerimiseks kasutati pärmivektorit pADNS-Brd4, mis ekspresseerib hiire täispikka Brd4 valku (mBrd4 FL) (Brannon *et al.*, 2005). Pärmivektoris oleva Brd4 ala kloneerimiseks imetajavektoris pQM-NTag/B, lõigati esimest ensüümidega *Kpn2I* ja *NotI* ning 3’ otsad täideti Klenow fragment polümeraasiga. Saadud produkt sisestati *SmaI* ensüümiga restrikteeritud pQM-NTag/B vektorisse. Tulemuseks oli konstrukt, mis sisaldab SV40 *origin*’i ning ekspresseerib CMV promootori alt hiire Brd4 valku, mille N-terminusse on liidetud E2Tag.

Kõik antud töös kloneerimisel kasutatud reaktsioonipuhvrid ja ensüümid pärinevad firmalt *MBI Fermentas*. Kõik konstrueeritud plasmiidid on kontrollitud sekveneerimise teel.

Transkriptsiooni katses kasutati kommertsiaalset plasmidi pRL-Tk, mis sisaldab *Renilla reniformis*'est pärit lutsiferaasi ensüümi cDNA järjestust („Promega“), ning T. Silla poolt konstrueeritud E2-sõltuvat reporterplasmidi pGL3E2BS, mis sisaldab kolme kõrge afiinsusega E2BS9, kolme 21 aluspaari pikkust GC-rikast kordusjärjestust ning enhanser elemendita SV40 varajast promootorit *Photinus pyralis*'e lutsiferaasi geeni ees, ning reporterplasmidi pGLP2, mis sisaldab *Photinus pyralis*'e lutsiferaasi geeni ees BPV-1 URR piirkonda (7476-94 bp BPV-1 genoomis).

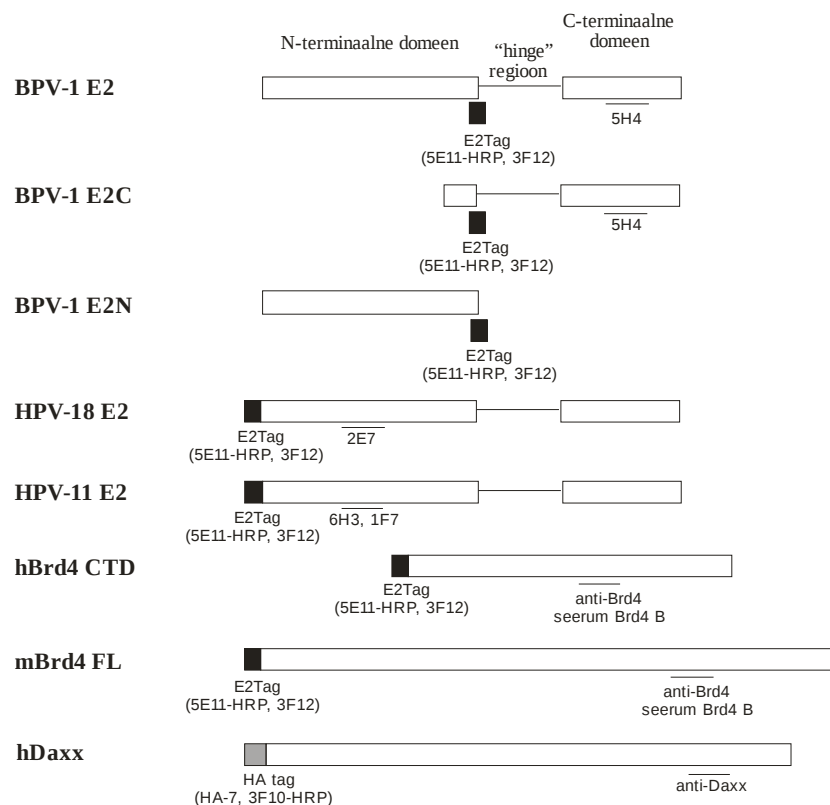
Replikatsiooni katses kasutati replitseeritava plasmiidina BPV-1 minimaalset *origin*'i sisaldavat plasmidi pUC/Alu. BPV-1 E1 ekspressioonivektorina kasutati pCGEag plasmidi (Ustav ja Stenlund, 1991).

2.3. Rakkude transfektsioon

Plasmiidid transfekteriti koekultuurirakkudesse elektroporatsiooni meetodil. 100 mm läbimõõduga poolkonfluentseks kasvanud koekultuuri tassidelt aspireeriti sööde, rakke pesti PBS-ga, trüpsineeriti, suspendeeriti ja koguti koekultuuri tuubi. Rakud tsentrifuugiti pöoretel 1000 rpm 5 minutit 20°C juures (*Eppendorf Centrifuge 5810 R*) ja resuspendeeriti söötmes, kuhu oli lisatud 1M NaBES puhvrit (pH 7.5) lõppkontsentratsiooniga 5 mM. Küvetis segati 250 µl rakususpensiooni (10^6 rakku) 50 µg *carrier*'i (lõhe spermi DNA) ja plasmidse DNA-ga ning elektroporeeriti (*BioRad Gene Pulser II*). Kasutatud pinged ja mahutavused olid järgmised : COS7 rakuliinil 180V ja 975µF; CHO, CHOBgl40 ja HeLa rakuliinidel 220V ja 975µF; HaCat rakuliinil 210V ja 975µF. Rakud kanti küvetist 3 ml söötmesse ja tsentrifuugiti pöoretel 1000 rpm 5 minutit 20°C juures (*Eppendorf Centrifuge 5810 R*). Rakud resuspendeeriti 1 ml söötmes ning kanti koekultuuri tassidele, mis sisaldasid vajalikus koguses söödet. Immunofluorestsentsanalüüsi tarbeks oli eelnevalt tassidele pandud 18x18 mm läbimõõduga katteklaasid. Rakke inkubeeriti 37°C/5%CO₂.

2.4. Kasutatud antikehad ja nende epitoopide asetus

Antikeha 5H4 (Kurg *et al.*, 1999) tunneb ära BPV-1 E2 ja BPV-1 E2C valkude C-terminuse. Antikehad 5E11-HRP ja 3F12 (Kurg *et al.*, 1999) tunnevad ära E2Tag-i (aminohapped 199-208 BPV-1 E2 valgus) BPV-1 E2, BPV-1 E2C ja BPV-1 E2N valkudes ning HPV-18 E2, HPV-11 E2, hBrd4 CTD ja mBrd4 FL N-terminuses. Antikeha 2E7 (Tehnoloogia Instituut, Tartu Ülikool) tunneb ära HPV-18 E2 valgu N-terminuse ning antikehad 6H3 ja 1F7 (Tehnoloogia Instituut, Tartu Ülikool) HPV-11 E2 valgu N-terminuse. Antikeha α -Brd4 („Abgent”) ja polüseerum Brd4 B (Tehnoloogia Instituut, Tartu Ülikool) tunnevad ära hBrd4 CTD ja mBrd4 FL C-terminuse. Antikehad HA-7 („Sigma”) ja 3F10-HRP („Roche”) tunnevad ära HA tag'i hDaxx valgu N-terminuses ning antikeha α -Daxx („Santa Cruz Biotechnology”) tunneb ära hDaxx valgu C-terminuse.



Joonis 3. Antud töös kasutatud antikehade epitoopide asetus.

2.5. Immunofluorestsentsanalüüs

CHOBgl40 rakkudesse transfekeeriti 500 ng pCGBrd4CTD plasmidi ning CHO rakkudesse 250 ng pCGE2, pCGE2C, pCGBrd4CTD ja pQMNTag/B-MCAP plasmidi ning 1000 ng pQMHPV18E2 ja pQMHPV11E2 plasmidi. 24 tunni pärast pesti katteklaasidele kinnitunud rakud PBS-iga ning fikseeriti 3 ml külma (-20°C) metanooli-atsetooni seguga (1:1) 15 minutit. Klaase pesti uuesti PBS-iga ning blokeeriti 1 ml 0.1% BSA-PBS lahusega 30 minutit ruumitemperatuuril. Primaarsed antikehad lisati 200 µl 0.1% BSA-PBS lahusesse ning inkubeeriti üks tund. BPV-1 E2 ja E2C valgu vastast antikeha 5H4 ning E2Tag-i vastast antikeha 3F12 kasutati lõppkontsentratsiooniga 5 µg/ml, HPV-18 E2 vastast antikeha 2E7 lõppkontsentratsiooniga 10 µg/ml, hBrd4 CTD ja endogeense Brd4 valgu vastast antikeha α-Brd4 lahjendusega 1:50, mBrd4 FL vastast polüseerumit Brd4 B lahjendusega 1:1000 ning endogeense Daxx valgu vastast antikeha α-Daxx lahjendusega 1:100. Klaase pesti 3x10 minutit PBS-iga. Sekundaarsete antikehadena kasutati hiire või küüliku immunoglobuliin (IgG) vastast Alexa Fluor 488- või Alexa Fluor 568-ga konjugeeritud antikeha („Invitrogen”), mida lisati 200 µl 0.1% BSA-PBS lahusesse lahjendusega 1:1000, ning inkubeeriti üks tund pimedas ruumitemperatuuril. Klaase pesti 3x10 minutit PBS-iga ning asetati 76x26 mm läbimõõduga alusklaasidele, millele oli eelnevalt lisatud 25 µl sulundusvedelikku [0.5 M Tris (pH 8.0), 50% glütserool]. Rakkude analüüsimiseks kasutati *Nikon Eclipse TE2000-U* konfokaalmikroskoopi.

2.6. Subtsellulaarne fraktsioneerimine

CHOBgl40 rakkudesse transfekeeriti 500 ng pCGBrd4CTD plasmidi. 24 tunni pärast pesti rakke PBS-iga ning suspendeeriti PBS/3 mM EDTA puhvriss. Rakususpensioonid koguti mikrotsentrifuugituubidesse ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis pööretel 4000 rpm 5 minutit 4°C juures. Seejärel pesti rakke 1 ml PBS-iga ning tsentrifuugiti nagu eelnevalt. Rakud suspendeeriti 100 µl CSK puhvriss [10 mM PIPES (pH 6.8), 300 mM sahharoos, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT,

proteaasi inhibiitorid], millele oli lisatud 0.5% Triton X-100, inkubeeriti jääl 10 minutit ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis pööretel 7500 rpm 5 minutit 4°C juures. Lahustuv fraktsioon (fraktsioon Sol.) kanti üle uude mikrotsentrifuugituubi ning sellele lisati 20 µl 5xLaemmli puhvrit [250 mM Tris (pH 6.8), 10% SDS, 50% glütserool, 0.5% broomfenoolsinine]. Lahustumatu tuumafraktsioon resuspendeeriti 100 µl CSK puhvris, jaotati kaheks ning tsentrifuugiti nagu eelnevalt. Esimesel juhul resuspendeeriti sade 50 µl CSK puhvris ning teisel juhul 50 µl CSK puhvris, millele oli lisatud 0.3 M NaCl. Pärast 10 minutit jääl inkubeerimist tsentrifuugiti nagu eelnevalt ning saadud supernatantidele (fraktsioonid 0.1 M NaCl S ja 0.4 M NaCl S) lisati 10 µl 5x Laemmli puhvrit. Sademed resuspendeeriti 50 µl CSK puhvris (fraktsioonid 0.1 M NaCl P ja 0.4 M NaCl P), millele lisati 10 µl 5xLaemmli puhvrit. Valgüsaadid analüüsiti *Western blot* meetodil.

2.7. Koimmunosadestamine

COS-7 rakkudesse transfecteeriti joonisel 7 toodud katses 200 ng pCGBrd4CTD, 100 ng pCGE2 ning 250 ng pQMHPV18E2 ja pQMHPV11E2 plasmidi ning edasistes katsetes 250 ng pCGE2, pCGE2C ja pCGE2N plasmidi, 100 ng pCGBrd4CTD plasmidi ning 500 ng pQMHPV18E2, pQMHPV18E2codon, pQMHPV11E2, pQMHPV11E2codon, pQMNTag/B-MCAP ja pQMHADaxx plasmidi. 24 tundi hiljem pesti rakud PBS-iga ning suspendeeriti PBS/3mM EDTA puhvris. Rakususpensioonid koguti mikrotsentrifuugituubidesse ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis pööretel 4000 rpm 5 minutit 4°C juures. Seejärel pesti rakke 1 ml PBS-iga ning tsentrifuugiti nagu eelnevalt. Rakud suspendeeriti 200 µl IP puhvris [0.1 M KCl, 20 mM Tris (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 10% glütserool, 0.1% Tween 20, 0.5 mM DTT, proteaasi inhibiitorid], lõhuti sonikeerides 2x5 sekundit, inkubeeriti jääl 15 minutit ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis pööretel 13000 rpm 10 minutit 4°C juures. Supernatandist kanti 10 µl (1/20) uude tuubi ning sellele lisati 10 µl 2xLaemmli puhvrit [10% SDS, 20% glütserool, 120 mM Tris (pH 6.8), 0.01% broomfenoolsinine] (*input*), ülejäänud supernatandile lisati 1 ml IP puhvrit. Alternatiivselt lisati pärast tsentrifuugimist supernatandile 1 ml IP puhvrit ning etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 200 µg/ml, inkubeeriti 20 minutit jääl ning tsentrifuugiti

lauatsentrifuugis pöõretel 13000 rpm 10 minutit 4°C juures. Supernatandist 60 µl (1/20) kanti uude tuubi ja sellele lisati 12 µl 5xLaemmli puhvrit (*input*), ülejäänud supernatanti kasutati immunosadestamiseks. hBrd4 CTD ja endogeenne Brd4 valk immunosadestati 5 µl α-Brd4 antikehaga, endogeenne Daxx valk 3 µl α-Daxx antikehaga, hDaxx valk 2 µg HA-7 antikehaga ning BPV-1 E2 valk 1 µg 5H4 antikehaga ühe tunni jooksul 4°C juures. Immunokompleksid seoti 20 µl *protein G-Sepharose beads*'idele („Amersham Biosciences”) inkubeerides 1 h 4°C juures. *Beads*'id koguti tsentrifuugides lauatsentrifuugis pöõretel 13000 rpm 1 minut 4°C juures, pesti neli korda 200 µl IP puhvriga, resuspendeeriti 20 µl 2xLaemmli puhvris ning analüüsiti *Western blot* meetodil.

2.8. Ultratsentrifuugimine glütserooli gradiendis

CHO rakkudesse transfekeeriti 500 ng pCGE2, pCGBrd4CTD ja pQMHADaxx plasmidi. 24 tunni pärast pesti rakke PBS-iga ning suspendeeriti PBS/3 mM EDTA puhvris. Rakususpensioonid koguti mikrotsentrifuugituubidesse ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis pöõretel 4000 rpm 5 minutit 4°C juures. Seejärel pesti rakke 1 ml PBS-iga ning tsentrifuugiti nagu eelnevalt. Rakud suspendeeriti 500 µl CSK puhvris, millele oli lisatud 0.5% Triton X-100, inkubeeriti jääl 5 minutit ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis pöõretel 7500 rpm 5 minutit 4°C juures. Sade pesti 1 ml CSK puhvriga ning tsentrifuugiti nagu eelnevalt. Seejärel resuspendeeriti sade 200 µl CSK puhvris, millele oli lisatud 0.4 M NaCl. Pärast 15 minutit jääl inkubeerimist tsentrifuugiti lauatsentrifuugis pöõretel 13000 rpm 10 minutit 4°C juures. Supernatandist 10 µl (1/20) kanti uude tuubi ning sellele lisati 5 µl 5xLaemmli puhvrit (*input*). 0.4 M NaCl juuresolekul lahustumatust kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist ekstraheerivate valkude lüsaadid kanti 5 ml lineaarsetele glütserooli gradientidele [10-40%; 10 mM Tris (pH 7.6), 0.1 mM EDTA, 100 mM NaCl] ning tsentrifuugiti pöõretel 45000 rpm 4 tundi 4°C juures (SW55 rootor, *Beckman*'i tsentrifuug). Markervalgud, apoferritiin (440 kDa) ja alkoholi dehüdrogenaas (150 kDa) („Sigma“), tsentrifuugiti paralleelsetes glütserooli gradientides. Gradiendid jagati 10 fraktsiooni ning tuubi põhi pesti 100 µl 2xLaemmli puhvriga (põhi). Saadud fraktsioonidest sadestati valgud TCA-ga ning analüüsiti *Western blot* meetodil. Markervalkude puhul

lahutati sadestamata fraktsioonid 12% SDS-PAAG elektroforeesil ja värviti *PageBlue Protein Staining Solution*'iga (MBI Fermentas).

2.9. Valkude sadestamine TCA-ga

Valkude sadestamiseks lisati glütserooli gradiendi fraktsioonidele 0.01% NaDoc ja 10% TCA ning inkubeeriti 30 minutit ruumitemperatuuril. Seejärel tsentrifuugiti lauatsentrifuugis maksimumpööretel 10 minutit 4°C juures, sademed pesti 300 µl atsetooniga ning lüüsi 2x Laemmli puhvis.

2.10. Western blot

Valgulüsaadid lahutati 9% SDS-PAAG elektroforeesil 1xSDS puhvis (125 mM Tris, 960 mM glütsiin, 0.5% SDS). Valkude ülekanne toimus *semi dry* meetodil 0.45 µm PVDF filtrile (*Immobilon-P*, „Millipore Corporation“). Enne ülekannet märjati filter metanoolis ning seejärel inkubeeriti filtrit ja geeli mõned minutid *semi dry* ülekandepuhvis (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0.037% SDS, 20% etanool). Ülekanne kestis 40-50 minutit 15 V juures (*TransBlot SD*, „BioRad“). Peale ülekannet aktiveeriti filter metanoolis ning asetati 5% blokeerimislahusesse (0.5 g lõssipulbrit 10 ml-s 1xTBS/0.05% Tween 20) ja inkubeeriti ruumitemperatuuril 30 minutit. Monoklonaalsed antikehad lisati 1% blokeerimislahusesse (0.1 g lõssipulbrit 10 ml-s 1xTBS/0.05% Tween 20). BPV-1 E2, E2C ja E2N valkude ning E2Tag-iga liidetud HPV-18 E2, HPV-11 E2, hBrd4 CTD ja mBrd4 FL valkude detekteerimiseks kasutati peroksüdaasiga konjugeeritud antikeha 5E11-HRP lõppkontsentratsiooniga 0.1 µg/ml. HPV-18 ning HPV-11 E2 vastaste antikehadena kasutati vastavalt antikehasid 2E7 ning 6H3 ja 1F7 lõppkontsentratsiooniga 5 µg/ml. Hemaglutiniini tag'iga liidetud hDaxx valgu detekteerimiseks kasutati peroksüdaasiga konjugeeritud antikeha 3F10-HRP lõppkontsentratsiooniga 0.1 µg/ml. hOrc2 valgu vastase antikehana kasutati antikeha α-Orc2 („BD Biosciences Pharmingen“) lahjendusega 1:4000. Filtrit inkubeeriti toatemperatuuril 1 tund ning pesti kolm korda 10 minutit pesulahusega

[50 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.5), 0.1% Tween 20]. Antikehade 2E7, 6H3, 1F7 ja α -Orc2 vastase sekundaarse antikehana kasutati peroksüdaasiga konjugeeritud hiire IgG vastast antikeha („LabAS“), mis lisati 1% blokeerimislahusesse lahjendusega 1:10000. Filtrit inkubeeriti ruumitemperatuuril 1 tund ning pesti üks kord 30 minutit ja seejärel kolm kuni neli korda 10 minutit pesulahusega [50 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.5), 0.1% Tween 20]. Detekteerimiseks kasutati kommertsiaalset kit'i *ECL RPN 2106* („Amersham Biosciences“).

2.11. Transkriptsiooni katse

CHO rakkudesse transfecteeriti 100 ng pGL3E2BS ja pGLP2 plasmidi, 25 ng pRL-Tk plasmidi, 200 ng pCGE2 ja pCGE2C plasmidi, 250 ng pCGBrd4CTD plasmidi ning 100 ng, 500 ng ja 2000 ng pQMNTag/B-MCAP ja pQMHADaxx plasmidi. Transkriptsioonilise aktiivsuse uurimiseks kasutati firma „Promega“ *Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit*'i. 30 tundi pärast transfectsiooni pesti koekultuuritassidel kasvavaid CHO rakke PBS-iga. Rakkudele lisati 400 μ l 1xPLB-d (*Passive lysis buffer*). Rakud kraabiti tassilt lahti kummispaatli abil ning suspendeeriti homogeenseks suspensiooniks, mis kanti puhtasse mikrotsentrifuugituubi. Rakuseinte lõhkumiseks külmutati proovid -80°C juures ning sulatati uuesti. Külmutamise-sulatamise etappi viidi läbi kaks korda. 40 μ l LAR II lahust (*Luciferase Assay Reagent II*) sisaldavatesse mikrotsentrifuugituubidesse lisati 8 μ l rakulüsaati. LAR II on vajalik *Photinus pyralis*'e lutsiferaasi aktiveerimiseks. Tuubid asetati TD-20/20 luminomeetrisse („Turner Biosystems“) ning mõõdeti tulemus. *Photinus pyralis*'e lutsiferaasi aktiivsuse kustutamiseks ja *Renilla reniformis*'e lutsiferaasi aktiveerimiseks lisati samasse tuubi 40 μ l *Stop&Glo Reagent*'i, segati vortex'il ning mõõdeti tulemus. Saadud tulemusi analüüsiti *Microsoft Excel* programmiga.

2.12. Episomaalse DNA eraldamine

CHO rakkudesse transfekeeriti 100 ng pUC/Alu plasmiidi, 500 ng pCGEag plasmiidi, 250 ng pCGE2 ja pCGE2C plasmiidi ning 250 ng, 500 ng ja 1000 ng pQMHADaxx plasmiidi. 36 ja 72 tundi peale transfektsiooni eraldati rakkudest episomaalne DNA. Rakud pesti PBS-iga, lüüsi 400 µl Sol I/Sol II (1:2) lahuses [Sol I: 50 mM glükoos, 25 mM Tris (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0); Sol II: 0.2 M NaOH, 1% SDS] ning inkubeeriti 5 minutit jääl. Järgnevalt lisati 200 µl Sol III lahust (100 ml-s 60 ml 5 M kaaliumatsetaati ja 11.5 ml jää-äädikhapet) ning kallutati tase kuni kromosoom-membraankompleksi moodustumiseni. Plaadil olev materjal koguti kummispaatliga mikrotsentrifuugituubidesse ja tsentrifuugiti lauatsentrifuugis maksimumpööretel 15 minutit 4°C juures. Supernatant kanti uude mikrotsentrifuugituubi ja sadestati 0.6 mahu isopropanooliga 30 minutit -20°C juures. Seejärel tsentrifuugiti lauatsentrifuugis maksimumpööretel 10 minutit 4° juures ning sade lahustati 200 µl Sol IV lahuses [Sol IV e. T₂₀E₁₀N₁₀₀S_{0.2}: 20 mM Tris (pH 7.5), 10 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM NaCl, 0.2 % SDS], mis sisaldas 100 µg/ml proteinaas K-d. Inkubeeriti 1 tund 56°C juures. Seejärel lisati võrdne ruumala fenooli ja kloroformi lahust (1:1), segati ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugis maksimumpööretel 10 minutit 4°C juures. Tekkinud vesifaas kanti üle uude mikrotsentrifuugituubi. DNA sadestati 2.5 mahu 96% etanooliga ja 0.2 M NaCl-ga 30 minutit -20°C juures. Seejärel tsentrifuugiti lauatsentrifuugis maksimumpööretel 10 minutit 4°C juures. DNA sade lahustati 30 µl T₁₀E₁-s, mis sisaldas 30 µg/ml RNAas A-d, ning inkubeeriti 20 minutit 65°C juures.

Edasisele analüüsile võeti 15 µl DNA-d, mida lõigati uuritavat plasmiidi lineariseeriva ensüümiga ning *DpnI* ensüümiga, mis lõikab ainult bakteriaalse päritoluga DNA-d. Restriktsioon kestis 6-12 tundi 37°C juures.

2.13. Southern blot

Restrikteeritud episomaalne DNA lahutati elektroforeetiliselt 1% agarosgeelis 1xTAE puhvril (4 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA). Pärast elektroforeesi denatureeriti geeli 40 minutit SolA lahuses (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) ja neutraliseeriti 30 minutit SolB lahuses (1.5 M Tris, 1.5 M NaCl). DNA ülekanne nailonfiltrile (*Amersham Hybond-N⁺*) toimus 10xSSC lahuses [1.5 M NaCl, 0.15 M Na-tsitraat (pH 7.0)] 12-18 tundi. Ülekandunud DNA fikseeriti filtrile kovalentselt ultravioletkiirguse abil 120 mJ juures (*UV Stratalinker 1800*, „Stratagene“). Filtrit inkubeeriti seejärel 0.5-2 tundi 65°C juures prehübridisatsiooni lahuses (6xSSC, 5xDenhardt, 0.5% SDS, 200 µg/ml denatureeritud lõhe spermi DNA). Radioaktiivse fosforiga (³²P) märgistatud hübridisatsiooni proov valmistati kasutades *MBI Fermentas DecaLabel DNA Labeling Kit*'i, vastavalt tootjapoolsele protokollile. Proovi valmistamisel kasutati ensüümiga *HindIII* restrikteeritud pUC/Alu plasmidi. Denatureeritud proov lisati prehübridisatsiooni lahusesse ja inkubeeriti 12-18 tundi 65°C juures. Pärast hübridiseerimist pesti filtrit 3x30 minutit I pesulahuses (2xSSC ja 0.2% SDS) ja 3x30 minutit II pesulahuses (0.2xSSC ja 0.2% SDS). Tulemused visualiseeriti autoradiograafiliselt röntgenfilmile.

3. TULEMUSED

3.1. Brd4 CTD relokaliseerib E2 valguga tuuma fookustesse

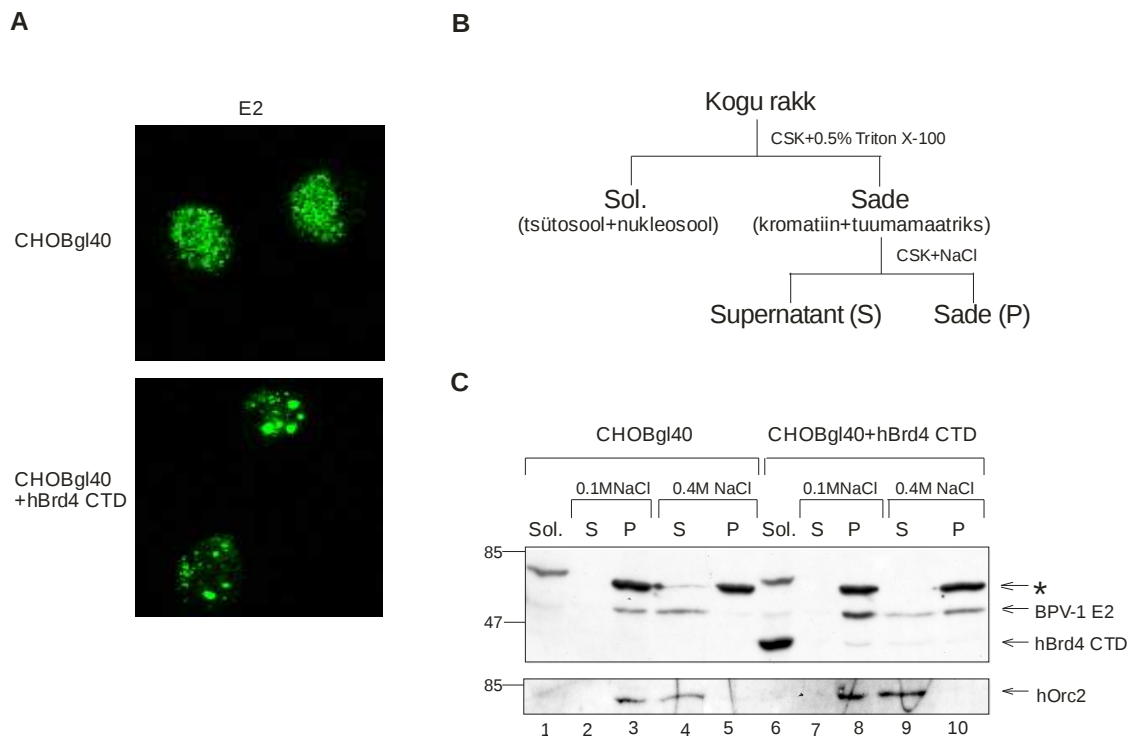
Papilloomiviiruse E2 valg on viiruse elutsükli peamine regulaator, kontrollides selle geenide transkriptsiooni ning genoomi replikatsiooni ja segregatsiooni. BPV-1 E2 valg esineb rakkude tuumas juhusliku täpilise mustrina ning on seotud kromatiiniga kogu rakutsükli vältel (Skiadopoulos ja McBride, 1996; Allikas *et al.*, 2001; Kurg *et al.*, 2005). E2 valg on näidatud interakteeruvat erinevate tuumasiseste kompartmentidega. Lisaks kromatiinifraksioonile on osa BPV-1 E2 valgust seotud mittekromatiinsete tuumastruktuuridega (Kurg *et al.*, 2005). Kui enamik BPV-1 E2 valgust on seotud rakulise kromatiiniga, siis HPV-11 E2 valg on näidatud assotsieeruvat eelistatult tuumamaatriksiga (Zou *et al.*, 2000).

Kuna E2 on multifunktsionaalne valg, seondub see oma erinevate rollide täitmiseks mitmete rakuliste valgudega. E2 transkriptsiooni funktsiooni täitmiseks on vajalik selle interakteerumine Brd4 valguga (Ilves *et al.*, 2006; Schweiger *et al.*, 2006). Nendevahelise interaktsiooni lõhkumisel kaotab E2 võime aktiveerida transkriptsiooni. Brd4 C-terminaalse domeeni (Brd4 CTD) ekspressioon on näidatud olevat dominant-negatiivse mõjuga, kuna see inhibeerib efektiivselt kõigi papilloomiviiruste E2-vahendatud transaktivatsiooni (McPhillips *et al.*, 2006; Schweiger *et al.*, 2006; Ilves *et al.*, 2006; Kurg *et al.*, 2006). Tõenäoliselt konkureerib Brd4 CTD endogeense Brd4 valguga E2 sidumise pärast. Me otsustasime uurida, kas ja kuidas mõjutab Brd4 CTD üleekspressioon E2 valguga tuumasisest lokalisatsiooni.

E2 valguga lokalisatsiooni analüüsimiseks kasutati esmalt CHO Bgl40 rakuliini, mis mimikeerib papilloomiviiruse elutsükli latentset faasi, ekspresseerides stabiilselt BPV-1 E1 ja E2 valke ning sisaldades BPV-1 URR piirkonda kandvat plasmidi pNeoBgl40 (Piirsoo *et al.*, 1996). IF analüüsil oli *carrier*-iga transfekteeeritud CHO Bgl40 rakkudes E2 spetsiifiline signaal detekteeritav täppidena rakkude tuumas (joonis 4A, ülemine pilt). hBrd4 CTD ekspressioon põhjustas aga E2 relokaliseerumise selgelt eristuvatesse fookustesse (joonis 4A, alumine pilt).

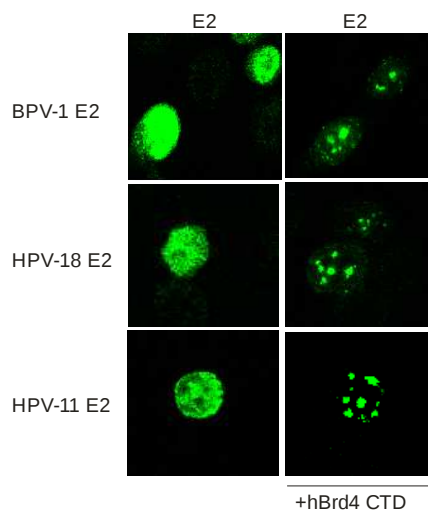
BPV-1 E2 valgu tuumasisese lokalisatsiooni muutumise detailsemaks uurimiseks kasutati biokeemilist subtsellulaarse fraktsioneerimise meetodit. Biokeemilise fraktsioneerimise katse skeem on ära toodud joonisel 4B. Esimese sammuna lüüsi rakud 0.5% Triton X-100 sisaldavas CSK puhvris, peale 10 minutist jääl inkubeerimist eraldati tsentrifuugides lahustuvad valgud. Antud fraktsiooni nimetasime Sol. (*soluble*) fraktsiooniks. Mitteilõõnse detergendiga lahustumatu tuumafraktsioon, mis sisaldab nii kromatiini kui tuumamaatriksit, jaotati kaheks ning resuspendeeriti paralleelselt kas 0.1 M või 0.4 M NaCl sisaldavas CSK puhvris. Pärast 10 minutist jääl inkubeerimist eraldati tsentrifuugides lahustuvad fraktsioonid (0.1 M NaCl S ja 0.4 M NaCl S) soolaresistentsetest fraktsioonidest (0.1 M NaCl P ja 0.4 M NaCl P). Saadud fraktsioonid analüüsiiti *Western blot* meetodil E2 spetsiifilise antikeha abil.

Joonisel 4C on näha, et valdav osa E2 spetsiifilist signaali *carrier*'iga transfekteritud CHOBgl40 rakkudes oli detekteeritav lahustumatus kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonis, millest E2 kui kromatiinivalk oli ekstraheeritav 0.4 M soolaga (joonis 4C, ülemine paneel, rajad 3 ja 4). hBrd4 CTD ekspressiooni tulemusena aga polnud osa E2 valku enam soolatundlik (joonis 4C, ülemine paneel, rajad 8, 9 ja 10). Mittelahustuv tuumafraktsioon sisaldab kahte lahustumatut fraktsiooni – kromatiini, mis koosneb DNA-st ja sellega seotud valkudest, mis on 0.45 M soolaga lahustumatust tuumafraktsioonist ekstraheeritavad, ning tuumamaatriksit, mis on DNA-s töötlusele resistentne ja kõrgel soolakontsentratsioonil mitteekstraheeritav fibrogranulaarne struktuur (Berezney, 2002). hBrd4 CTD ise on kromatiiniga seondumist tagavate domeenide puudumise tõttu detekteeritav peamiselt mitteilõõnse detergendiga lahustavas tuumafraktsioonis, mis koosneb tsütosoolist ja nukleosoolist (joonis 4C, ülemine paneel, rada 6). Kontrollina on toodud ühe teise kromatiinivalgu, inimese Orc2 (hOrc2), fraktsioneerumine, tõestamaks, et hBrd4 CTD ekspressiooni mõju E2 valgu relokalisatsioonile on spetsiifiline (joonis 4C, alumine paneel, rajad 3 ja 4 ning 8 ja 9).



Joonis 4. BPV-1 E2 valgu tuumasisese lokalisatsiooni uurimine CHOBgl40 rakkudes. **A.** BPV-1 E2 valgu lokalisatsiooni uurimine *carrier*-iga ja hBrd4 CTD transfecteeritud rakkudes IF meetodil E2 spetsiifilise 5H4 antikehaga. **B.** Subtsellulaarse fraktsioneerimise skeem. **C.** Subtsellulaarsel fraktsioneerimisel saadud BPV-1 E2, hBrd4 CTD ja hOrc2 valkude jaotumine mitteeionse detergendiga lahustuvate valkude fraktsiooni (Sol.), lahustumatust kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist 0.1 M või 0.4M NaCl juuresolekul ekstraheerunud valkude fraktsiooni ja soolaresistentse tuumamaatriksi fraktsiooni vahel. Western blot analüüsil detekteeriti BPV-1 E2 valku E2-spetsiifilise antikehaga 5E11-HRP, mis tunneb ära ka E2Tag-i hBrd4 CTD N-terminuses, ning hOrc2 valku antikehaga α -Orc2. BPV-1 E2, hBrd4 CTD ja hOrc2 valkude asukohad on näidatud paremal noolega. * tähistab mittespetsiifilist signaali.

Edasiseks sammuks oli kontrollida, kas hBrd4 CTD muudab BPV-1 E2 valgu tuumasisest kompartmentalisatsiooni ka transientses süsteemis ning omab samasugust efekti ka inimese papilloomiviiruse E2 valkude suhtes. Sarnaselt stabiilselt ekspresseeritud BPV-1 E2 valgule oli CHO rakkudes transientselt ekspresseeritud BPV-1 E2, HPV-18 E2 ja HPV-11 E2 valkude spetsiifiline signaal detekteeritav üle kogu tuuma (joonis 5, vasakpoolne paneel). hBrd4 CTD koekspressioon tõi aga E2 valkude relokaliseerumise distinktsetesse fookustesse (joonis 5, parempoolne paneel).



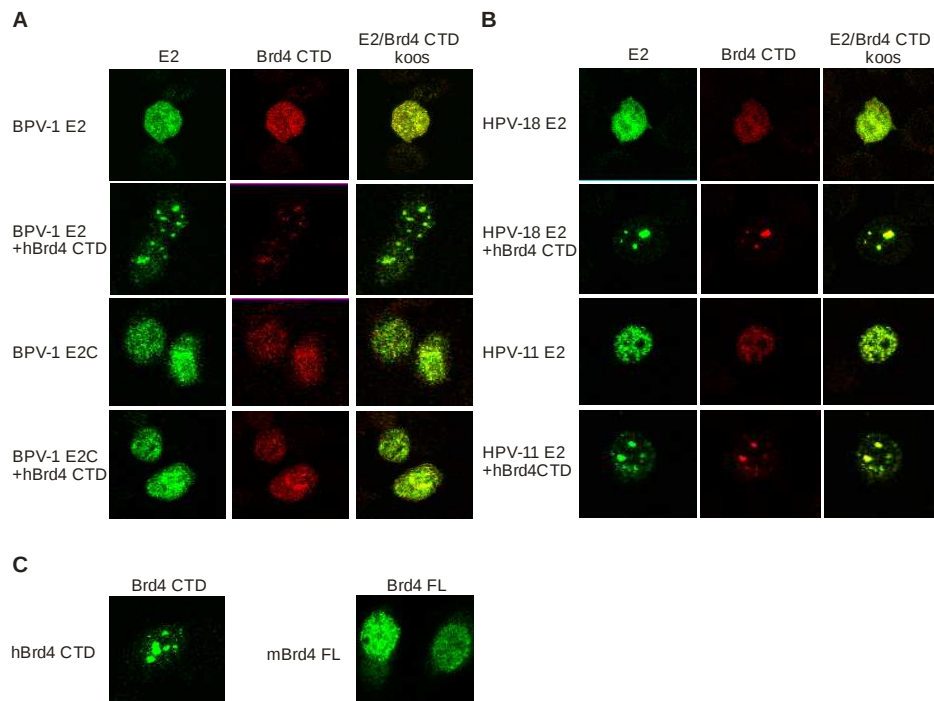
Joonis 5. BPV-1, HPV-18 ja HPV-11 E2 valkude tuumasisese lokalisatsiooni uurimine CHO rakkudes nii üksi kui hBrd4 CTD koekspressioonil IF meetodil BPV-1 E2 ja HPV-18 E2 spetsiifiliste antikehadega 5H4 ja 2E7, vastavalt, ning HPV-11 E2 valgu N-terminuses paiknevat E2Tag-i äratundva antikehaga 3F12.

Seega indutseerib hBrd4 CTD algselt üle kogu raku tuuma jaotunud E2 valgu relokaliseerumise distinktsetesse fookustesse, mis kuuluvad lahustumatu tuumamaatriksi koosseisu. BPV-1 E2 valgu tuumasisese lokalisatsiooni muutus toimub nii stabiilse kui transientse ekspressiooni tingimustes ning lisaks põhjustab hBrd4 CTD ka HPV-18 ja HPV-11 E2 valkude kontsentreerumise distinktsetesse tuumastruktuuridesse.

3.2. E2 valgu relokaliseerimiseks on vajalik selle N-terminaalne transaktivatsiooni domeen, mis vahendab interaktsiooni Brd4 CTD-ga

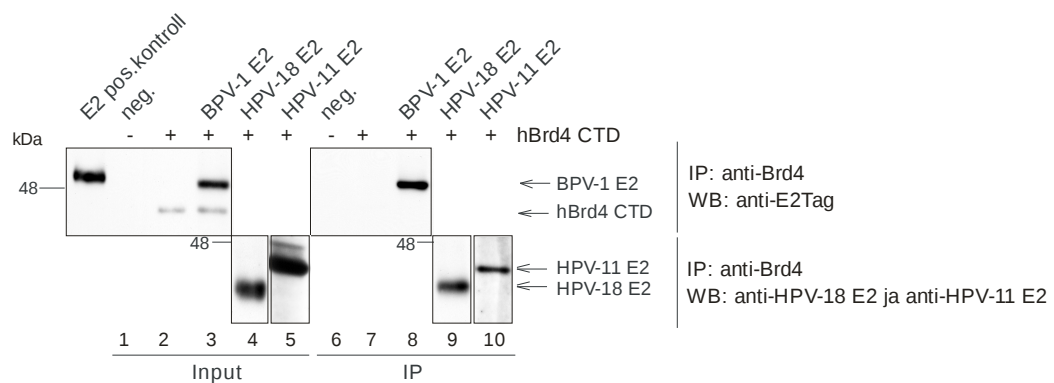
Veendumaks, et hBrd4 CTD poolt indutseeritud E2 valgu relokaliseerumine on aktiivne protsess ning vajab selleks E2 ja hBrd4 CTD otsest interaktsiooni, hinnati fookustes BPV-1, HPV-18 ja HPV-11 E2 ning BPV-1 E2C valkude kolokalisatsiooni hBrd4 CTD valguga. Samuti uuriti, kas ka hBrd4 CTD üksi lokaliseerub nendes fookustes ning milline on täispika Brd4 valgu tuumasisene jaotus. CHO rakkude analüüsimisel IF meetodil selgus, et täispikad BPV-1 (joonis 6A), HPV-18 ja HPV-11 (joonis 6B) E2 valgud kolokaliseerusid hBrd4 CTD-ga viimase poolt indutseeritud fookustes. Samas BPV-1 E2C

tuumasisest lokalisatsiooni hBrd4 CTD ekspressioon ei mõjutanud (joonis 6A). Kuna BPV-1 E2C valgul puudub hBrd4 CTD-ga interakteerumist vahendav N-terminaalne transaktivatsiooni domeen, võib järeldada, et E2 valgu tuumasisese kompartmentalisatsiooni muutumiseks on vajalik selle otsene interaktsioon hBrd4 CTD-ga. Seda, et E2 valgu lokaliseerumine hBrd4 CTD mõjul on aktiivne protsess, näitab hBrd4 CTD kontsentreerumine fookustesse ka E2 ekspressiooni puudumisel (joonis 6C). Hiire täispikk Brd4 (mBrd4 FL), mis erinevalt Brd4 CTD valgust sisaldab kahte bromodomeeni, on aga endiselt jaotunud peene täpilise muustrina üle kogu tuuma (joonis 6C).



Joonis 6. A. ja B. E2 valkude tuumasisese kolokalisatsiooni uurimine CHO rakkudes nii üksi kui hBrd4 CTD koekspressioonil IF meetodil BPV-1 E2 ja E2C spetsiifilise antikehaga 5H4, HPV-18 E2 spetsiifilise antikehaga 2E7, HPV-11 E2 N-terminuses paikneva E2Tag-i spetsiifilise antikehaga 3F12 ja hBrd4 CTD spetsiifiliste antikehaga α -Brd4. **C.** hBrd4 CTD ja mBrd4 FL tuumasisese lokalisatsiooni uurimine CHO rakkudes IF meetodil hBrd4 CTD N-terminuses paikneva E2Tag-i spetsiifilise antikehaga 3F12 ja mBrd4 FL spetsiifilise polüseerumiga Brd4 B.

Järgmisena kontrolliti hBrd4 CTD interaktsiooni BPV-1, HPV-18 ja HPV-11 E2 valkudega COS-7 rakkudes. hBrd4 CTD ning sellega interakteeruvad valgud koimmunosadestati α -Brd4 antikehaga ning immunokompleksid analüüsiti *Western blot* meetodil. Nagu näha interakteerub hBrd4 CTD efektiivselt nii BPV-1 E2 valguga (joonis 7, ülemine paneel, rada 8) kui HPV-18 ja HPV-11 E2 valkudega (joonis 7, alumine paneel, rajad 9 ja 10 vastavalt).

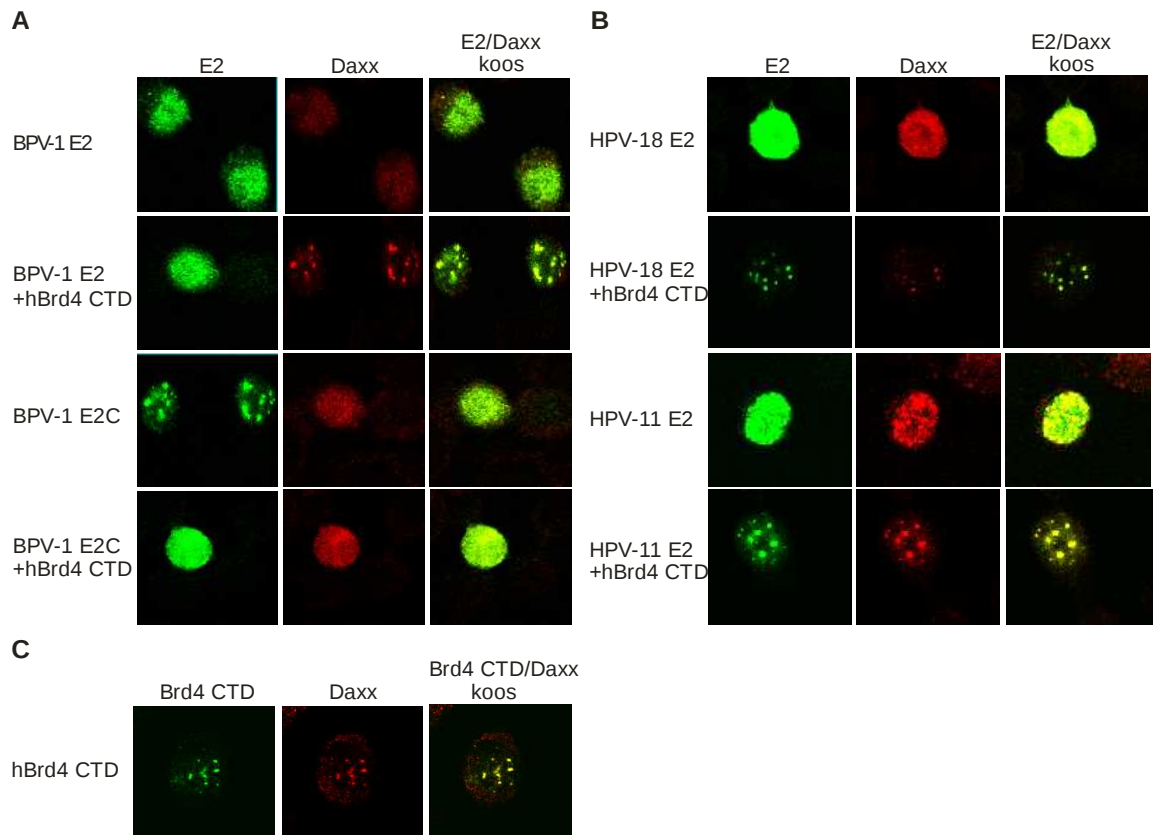


Joonis 7. hBrd4 CTD interaktsioon BPV-1, HPV-18 ja HPV-11 E2 valkudega. hBrd4 CTD ja E2 valke ekspresseeriti COS-7 rakkudes ja hBrd4 CTD koimmunosadestati (IP) α -Brd4 antikehaga. *Western blot* (WB) analüüsil detekteeriti BPV-1 E2 valku E2-spetsiifilise antikehaga 5E11-HRP, mis tunneb ära ka E2Tag-i hBrd4 CTD N-terminuses, HPV-18 E2 valku antikehaga 2E7 ja HPV-11 E2 valku antikehaga 1F7. *Input* on radadel 1-5, immunopretsipiteeritud valgud radadel 6-10. E2 positiivne kontroll on bakterist puhastatud BPV-1 E2 valk. neg. tähistab *carrier*'iga transfecteeritud rakke. BPV-1, HPV-18 ja HPV-11 E2 valkude ning hBrd4 CTD asukohad on näidatud paremal noolega.

Seega E2 relokaliseerumiseks hBrd4 CTD üleekspressiooni tingimustes on vajalik selle N-terminaalne transaktivatsiooni domeen, kuna BPV-1 E2C lokaliseerumisele hBrd4 CTD ekspressioon mõju ei avaldanud. E2 valgu N-terminaalne domeen vahendab selle otsest interaktsiooni hBrd4 CTD-ga, mis ka üksinda on lokaliseerunud rakus distinktsetesse fookustesse ning seondudes E2 N-terminaalse domeeniga relokaliseerib sinna ka E2 valgu.

3.3. E2 kolokaliseerub fookustes Daxx valguga

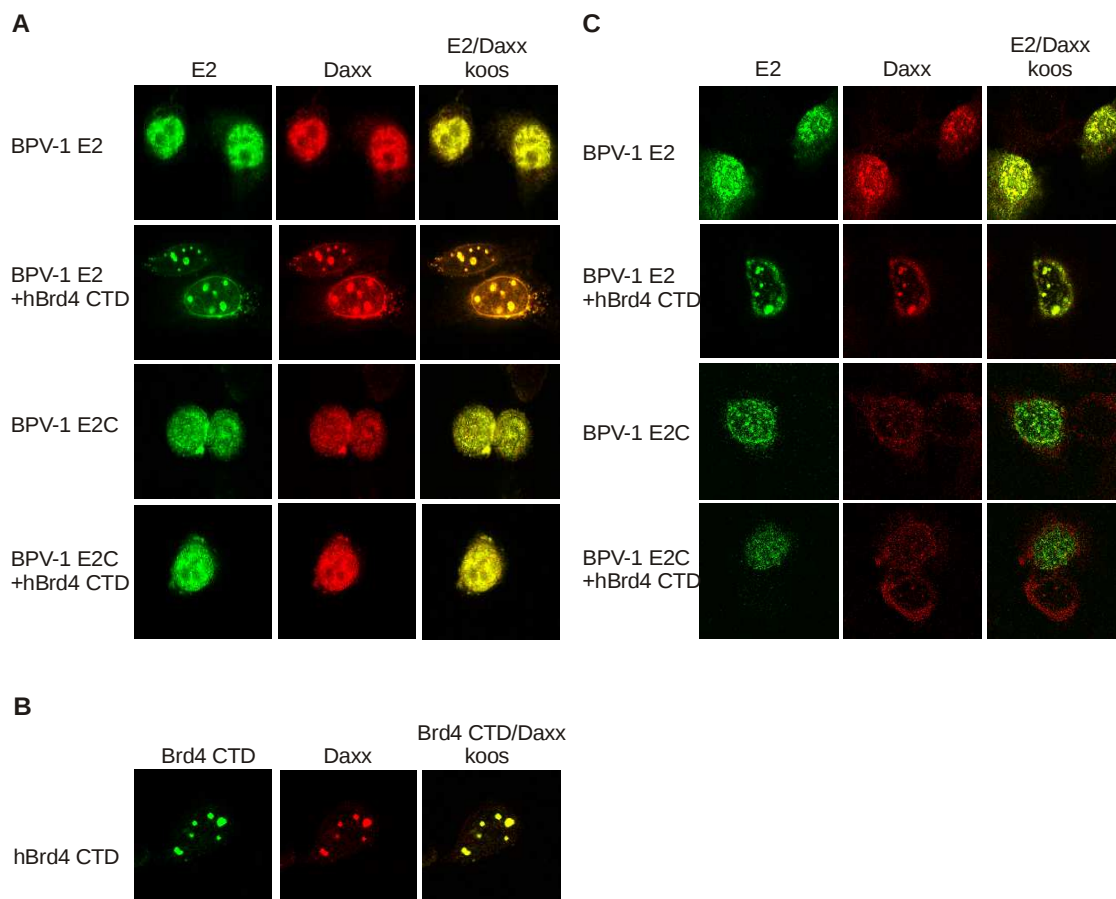
Raku tuum sisaldab mitmeid interkromatiinseid struktuure, nende hulka kuuluvad ka PML kehad. PML kehad on dünaamilised struktuurid, mille hulk ja suurus varieerub sõltuvalt rakutüübist. Nad arvatakse olevat seotud tuumamaatriksiga ning reguleeritud rakutsükli poolt (Maul *et al.*, 2000; Sternsdorf *et al.*, 1997). Kuigi PML kehadele on omistatud mitmeid funktsioone, on viimastel aastatel pakkunud huvi nende seos erinevate DNA viiruste varajase replikatsiooniga. Ka papilloomiviiruse mitmed elutsükli etapid arvatakse leidvat aset PML kehade vahetus läheduses (Swindle *et al.*, 1999; Day *et al.*, 1998; Florin *et al.*, 2002; Day *et al.*, 2004). Selleks, et uurida, kas hBrd4 CTD üleekspressioonil detekteeritud fookused võivad tähistada PML kehasid, hinnati nendes tuumastruktuurides E2 ja PML kehade markervalgu Daxx kolokalisatsiooni IF meetodil. Kui BPV-1 E2 ja E2C (joonis 8A) ning HPV-18 E2 ja HPV-11 E2 (joonis 8B) valke ekspresseerivates rakkudes oli endogeense Daxx valgu spetsiifiline signaal detekteeritav üle kogu raku, siis hBrd4 CTD juurdeviimisel kolokaliseerus Daxx koos BPV-1 (joonis 8A), HPV-18 ja HPV-11 (joonis 8B) E2 valkudega formeerunud fookustes. BPV-1 E2C ekspressiooni puhul Daxx valgu relokaliseerumist ei toimunud (joonis 8A). Ka hBrd4 CTD üksinda kolokaliseerus Daxx valguga neis subnukleaarsetes fookustes (joonis 8C).



Joonis 8. E2 valkude (**A** ja **B**) ja endogeense Daxx valgu tuumasisese kolokalisatsiooni uurimine nii üksi kui hBrd4 CTD koekspressioonil ning hBrd4 CTD (**C**) ja endogeense Daxx valgu tuumasisese kolokalisatsiooni uurimine CHO rakkudes IF meetodil BPV-1 E2 ja E2C spetsiifilise antikehaga 5H4, HPV-18 E2 spetsiifilise antikehaga 2E7, HPV-11 E2 ja hBrd4 CTD N-terminuses paikneva E2Tag-i äratundva antikehaga 3F12 ning endogeense Daxx valgu spetsiifilise antikehaga α -Daxx.

Veendumaks, et saadud tulemused pole rakutüübi spetsiifilised, analüüsiti E2 ja Daxx valkude kolokalisatsiooni ka inimese rakkudes HeLa ja HaCat. Kuna esimene neist on HPV-18 positiivne emakakaela kasvaja rakuliin ning teine immortaliseeritud keratinotsüütide rakuliin, on mõlemad papilloomiviiruse infektsioonile sobivaks keskkonnaks. Nagu näha jooniselt 9, oli mõlemas rakuliinis saadud tulemused sarnased CHO rakkudes detekteerituga. HeLa ja HaCat rakkudes oli BPV-1 E2 ja E2C ning endogeense Daxx valgu spetsiifiline signaal jaotunud peene täpilise muustrina üle tuuma (joonis 9A ja 9C, vastavalt). Kui hBrd4 CTD ekspressiooni tagajärjel relokaliseerus BPV-1 E2 koos Daxx valguga distinktsetesse fookustesse (joonis 9A ja 9C), siis BPV-1 E2C

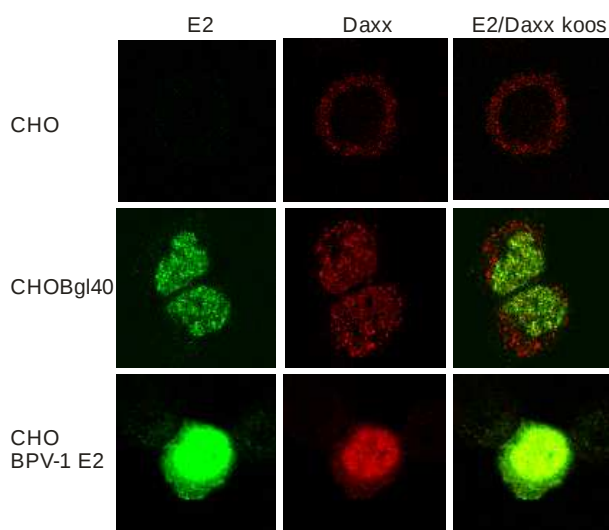
lokalisatsioonis ei olnud erinevusi võimalik detekteerida – nii E2C kui Daxx spetsiifiline signaal jäi difuusseks (joonis 9A ja 9C). Sarnaselt CHO rakuliinile oli ka HeLa rakkudes hBrd4 CTD ka üksinda lokaliseerunud fookustesse ning kolokaliseerus neis Daxx valguga (joonis 9B).



Joonis 9. E2 valkude ja endogeense Daxx valgu tuumasisese kolokalisatsiooni uurimine HeLa (**A**) ja HaCat (**C**) rakkudes nii üksi kui hBrd4 CTD koekspressioonil ning hBrd4 CTD ja endogeense Daxx valgu tuumasisese kolokalisatsiooni uurimine HeLa rakkudes (**B**) IF meetodil BPV-1 E2 ja E2C spetsiifilise antikehaga 5H4, HPV-18 E2 spetsiifilise antikehaga 2E7, HPV-11 E2 ja hBrd4 CTD N-terminuses paikneva E2Tag-i äratundva antikehaga 3F12 ning endogeense Daxx valgu spetsiifilise antikehaga α -Daxx.

Antud katsete käigus täheldasime, et E2 positiivsetes rakkudes on endogeense Daxx valgu spetsiifiline signaal raku tuumas tunduvalt intensiivsem kui E2 mitteekspressseerivates rakkudes. Daxx signaali intensiivsus näis olevat sõltuvuses E2 valgu

spetsiifilise signaali tugevusest. See andis alust arvata, et Daxx võib E2 valguga otseselt interakteeruda ning osaleda E2 relokaliseerimisel fookustesse. Kui CHO rakkudes oli endogeense Daxx valgu signaal detekteeritav valdavalt tsütoplasmas (joonis 10, üleval), siis BPV-1 E2 stabiilselt madalal tasemel ekspresseerivas CHO Bgl40 rakuliinis, oli Daxx spetsiifilise signaali intensiivsus võrreldav nii tuumas kui tsütoplasmas (joonis 10, keskel). Kui aga hinnati Daxx signaali tugevust BPV-1 E2 üleekspressiooni tingimustes, võis märgata Daxx valgu tuumasisese signaali suurenemist võrreldes tsütoplasmaaga (joonis 10, all).

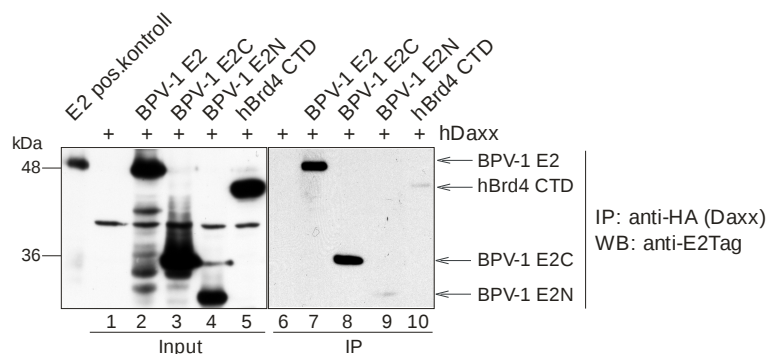


Joonis 10. Endogeense Daxx valgu spetsiifilise signaali hindamine CHO, CHO Bgl40 ja BPV-1 E2 valgu ekspresseerivates CHO rakkudes IF meetodil BPV-1 E2 ja Daxx valkude spetsiifiliste antikehadega 5H4 ja α -Daxx, vastavalt.

Seega hBrd4 CTD ekspressiooni tagajärjel relokaliseerub papilloomiviiruse E2 valk tuumafookustesse ning kolokaliseerub neis koos endogeense Daxx valguga kõikides testitud rakuliinides. Samuti kolokaliseerub fookustes Daxx valguga hBrd4 CTD üksinda. Kuna Daxx valku kasutatakse sageli PML kehade markerina, siis võib fookuste puhul olla tegu PML kehadega. Samas võis märgata, et Daxx valgu spetsiifilise signaali intensiivsus raku tuumas sõltub E2 spetsiifilise signaali tugevusest, mis omakorda võib viidata nende kahe valgu otsesele interakteerumisele.

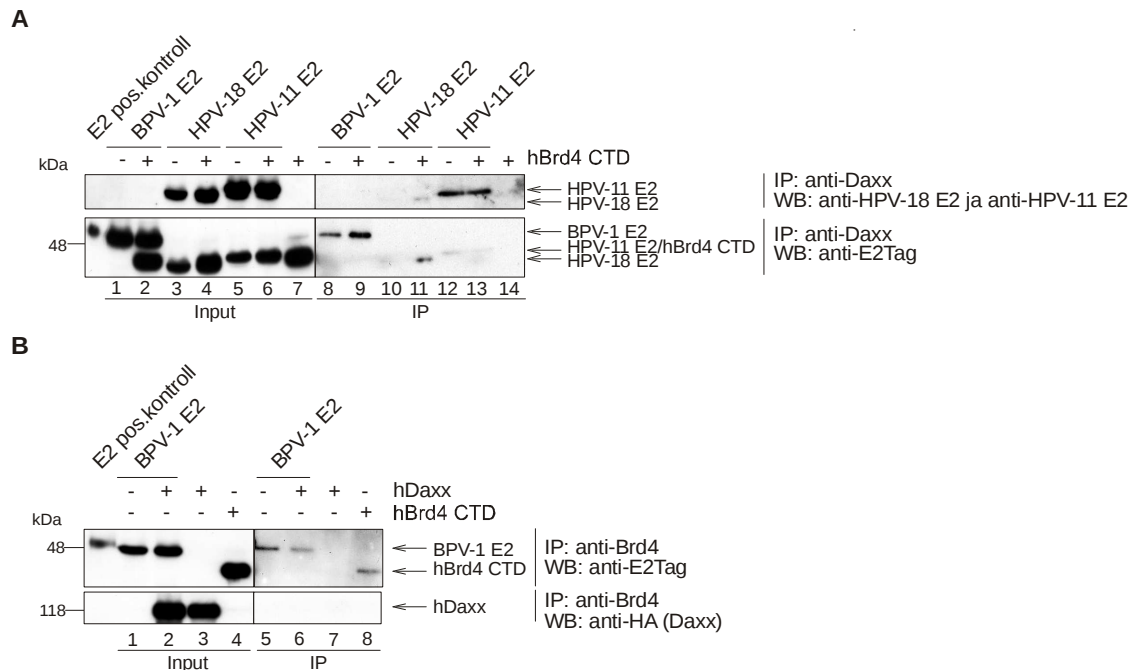
3.4. E2, Brd4 CTD ja Daxx valgud võivad moodustada rakus kompleksi

Teadaolevalt interakteerub täispikk Brd4 bromodomeenide kaudu atsetüleeritud kromatiiniga ja C-terminaalse domeeni kaudu (aminohapped 1224-1362) papilloomiviiruse E2 valguga N-terminaalse transaktivatsiooni domeeniga (You *et al.*, 2004; McPhillips *et al.*, 2006). hBrd4 CTD on oma kromatiiniga assotsieerumise võime kaotanud, kuid suudab endiselt interakteeruda E2 valguga. Kui täispikk Brd4 omas peent täpilist lokaliseerumist tuumas (joonis 6C), siis hBrd4 CTD oli kontsentreerunud fookustesse (joonis 6C) ning relokaliseeris sinna ka E2 valguga (joonised 6A ja 6B). Nii hBrd4 CTD (joonised 8C ja 9B) kui papilloomiviiruse E2 valk (joonised 8A ja 8B ning 9A ja 9C) kolokaliseerusid neis distinktses tuumastruktuurides endogeense Daxx valguga. Seetõttu oli järgmiseks sammuks uurida, kas ja kui, siis millise domeeni kaudu, seondub papilloomiviiruse E2 valk Daxx valguga ning kas ka hBrd4 CTD on võimeline Daxx valguga interakteeruma. Selleks konstrueeriti esmalt liitvalk, kus inimese Daxx valku (hDaxx) kodeeriva ala N-terminuses on hemaglutiniini (HA) tag. COS-7 rakkudes ekspresseeriti BPV-1 E2 valke ning hBrd4 CTD ja hDaxx valke. HA tag'i vastase HA-7 antikeha abil koimmunoprecipiteeriti hDaxx valk ning sellega interakteeruvad valgud. Immunoprecipitaadid analüüsiti *Western blot* meetodil BPV-1 E2 valguga spetsiifilise antikeha abil, mis võimaldab detekteerida ka hBrd4 CTD selle N-terminuses oleva E2Tag-i abil. Selgus, et BPV-1 E2 valk interakteerub hDaxx valguga mõlema valguga ülekspressiooni korral (joonis 11, rada 7). hDaxx sidus ka BPV-1 E2C valku (joonis 11, rada 8), hDaxx interaktsioon BPV-1 E2N valguga oli aga tunduvalt kehvem (joonis 11, rada 9). BPV-1 E2C valk (järjestused 162-410) omab täispika valguga "hinge" ja C-terminaalset DNA-ga seondumise ja dimerisatsiooni domeeni ning kannab väikest osa E2 N-terminaalsest transaktivatsiooni domeenist (joonis 2). BPV-1 E2N valk (järjestused 1-218) hõlmab tervet N-terminaalset transaktivatsiooni domeeni. Seega seondub hDaxx otseselt E2 valguga läbi selle "hinge" ja/või C-terminaalse domeeni. hBrd4 CTD valku sidus hDaxx aga väga nõrgalt (joonis 11, rada 10).



Joonis 11. hDaxx valgu interaktsioon BPV-1 E2, E2C ja E2N ning hBrd4 CTD valkudega. BPV-1 E2, E2C, E2N ning hBrd4 CTD ja hDaxx valke ekspresseeriti COS-7 rakkudes ning hDaxx koimmunosadestati (IP) HA-7 antikehaga. Western blot (WB) analüüsil detekteeriti BPV-1 E2, E2C ja E2N valku E2-spetsiifilise antikehaga 5E11-HRP, mis tunneb ära ka E2Tag-i hBrd4 CTD N-terminuses. Input on radadel 1-5, immunopretsipiteeritud valgud radadel 6-10. E2 positiivne kontroll on bakterist puhastatud BPV-1 E2 valk. BPV-1 E2, E2C ja E2N ning hBrd4 CTD valkude asukohad on näidatud paremal noolega.

Veendumaks, et saadud tulemused pole tingitud üleekspressioonist, tuli näidata, et papilloomiviiruse E2 valk seondub ka endogeense Daxx valguga. Lisaks uuriti ka hBrd4 CTD võimet interakteeruda endogeense Daxx valguga. α -Daxx antikeha abil koimmunosadestati E2 ekspresseerivatest rakkudest endogeenne Daxx ning sellega interakteeruvad valgud. Antud katses kasutati koodon-optimeeritud HPV-18 ja HPV-11 E2 valke, sest natiivsete HPV E2 valkude ekspressioonitase on rakus väga madal. Kuna koodon-optimeeritud HPV E2 valkude N-terminuses paikneb E2Tag (vt “Materjal ja meetodika”), tunneb neid ära ka BPV-1 E2 spetsiifiline antikeha. Nagu näha, interakteerusid endogeense Daxx valguga nii BPV-1 E2 (joonis 12A, alumine paneel, rajad 8 ja 9) kui HPV-18 E2 (joonis 12A, ülemine ja alumine paneel, rajad 10 ja 11) ja HPV-11 E2 valgud (joonis 12A, ülemine paneel, rajad 12 ja 13). Kui BPV-1 E2 (joonis 12A, alumine paneel, rajad 8 ja 9, vastavalt) ja HPV-11 E2 (joonis 12A, ülemine paneel, rajad 12 ja 13, vastavalt) interakteerusid Daxx valguga nii üksi kui hBrd4 CTD koekspressioonil, siis HPV-18 E2 valgu interaktsioon oli detekteeritav vaid koos hBrd4 CTD-ga (joonis 12A, ülemine ja alumine paneel, rada 11). hBrd4 CTD interaktsiooni endogeense Daxx valguga detekteerida ei suudetud (joonis 12A, alumine paneel, rada 14).



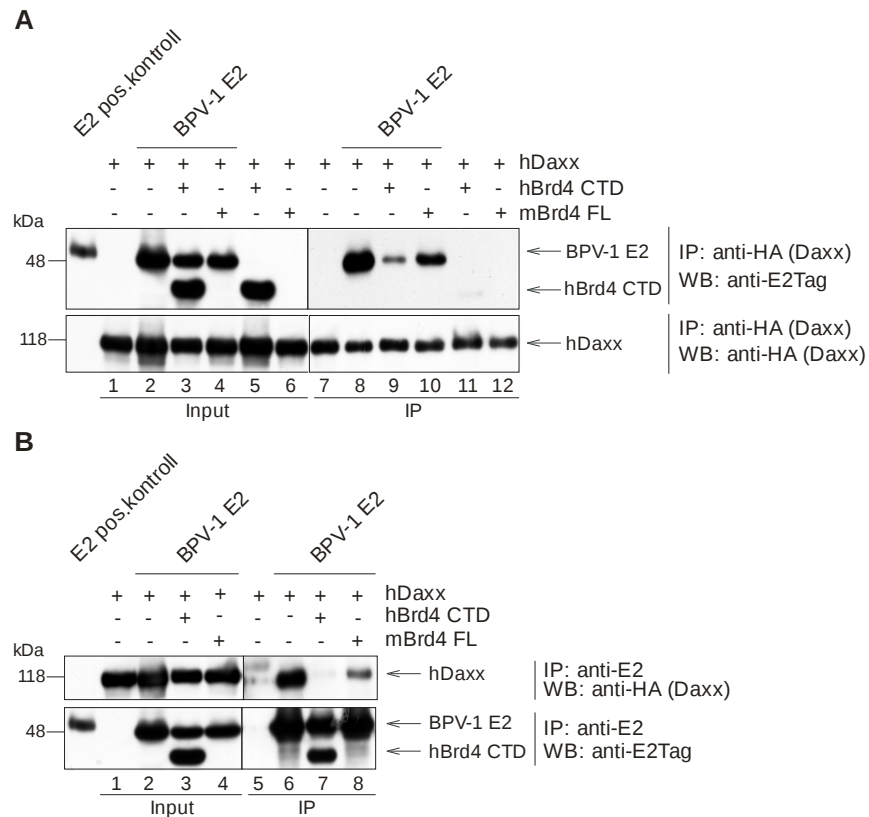
Joonis 12. A. Endogeense Daxx valgu interaktsioon BPV-1, HPV-18 ja HPV-11 E2 valkudega ning hBrd4 CTD valguga. BPV-1 E2 ning koodon-optimeeritud HPV-18 ja HPV-11 E2 valke ning hBrd4 CTD valku ekspresseeriti COS-7 rakkudes ja endogeenne Daxx koimmunoadestati (IP) α -Daxx antikehaga. **B.** Endogeense Brd4 valgu interaktsioon BPV-1 E2 ja hDaxx valkudega. BPV-1 E2, hBrd4 CTD ja hDaxx valke ekspresseeriti COS-7 rakkudes ning endogeenne Brd4 koimmunoadestati (IP) α -Brd4 antikehaga. *Western blot* (WB) analüüsil detekteeriti BPV-1 E2 valku E2-spetsiifilise antikehaga 5E11-HRP (A, alumine paneel; B, ülemine paneel), mis tunneb ära ka E2Tag-i hBrd4 CTD N-terminuses, HPV-18 ja HPV-11 E2 valke vastavalt antikehadega 2E7 ja 6H3 (A, ülemine paneel) ning hDaxx valku antikehaga 3F10-HRP (B, alumine paneel). *Input* on radadel 1-7 (A) ja 1-4 (B), immunopretsipiteeritud valgud radadel 8-14 (A) ja 5-8 (B). E2 positiivne kontroll on bakterist puhastatud BPV-1 E2 valk. BPV-1 E2, HPV-18 E2, HPV-11 E2, hBrd4 CTD ja hDaxx valkude asukohad on näidatud paremal noolega.

Järgmisena kontrolliti Brd4 ja Daxx valkude omavahelist interaktsiooni koimmunoadestades endogeense Brd4 ning sellega interakteeruvad valgud Brd4 spetsiifilise α -Brd4 antikeha abil. Nagu näha ja nagu ka eelnevalt teada, interakteeruvad omavahel BPV-1 E2 valk ja endogeenne Brd4 (joonis 12B, ülemine paneel, rajad 5 ja 6). Endogeense Brd4 ja üleekspresseeritud hDaxx interaktsioon polnud ei BPV-1 E2 valgu ekspressiooni puhul ega selle puudumisel detekteeritav (joonis 12B, alumine paneel, rajad 6 ja 7, vastavalt). hBrd4 CTD spetsiifilise bändi esinemine on tingitud E2 spetsiifilise

antikeha võimest ära tunda nii BPV-1 E2 valku kui E2Tag-i (paikneb hBrd4 CTD N-terminuses) ning on antud katse positiivseks kontrolliks (joonis 12B, ülemine paneel, rada 8).

Kui eespool vaadati, kas papilloomiviiruse E2 valk ja hBrd4 CTD kumbki eraldi seonduvad Daxx valguga, siis edasi otsustati uurida, kas BPV-1 E2, hBrd4 CTD ja hDaxx moodustavad omavahel rakus kolmikkompleksi. Esmalt koimmunopretsipiteeriti üleekspresseeritud hDaxx ja sellega interakteeruvad valgud, kasutades üleekspresseeritud hDaxx detekteerimiseks HA-7 antikeha. Selgus, et BPV-1 E2 valk interakteerub hDaxx valguga (joonis 13A, ülemine paneel, rajad 8, 9 ja 10). Kõige tugevam oli E2/hDaxx interaktsioon, kui ekspresseerida BPV-1 E2 üksinda (joonis 13A, ülemine paneel, rada 8). Kui E2 valku ekspresseeriti koos mBrd4 FL ja hBrd4 CTD, oli vastav interaktsioon samuti detekteeritav, kuid nõrgem, kui ekspresseerida BPV-1 E2 valku üksinda (joonis 13A, ülemine paneel, rada 9 ja 10 võrreldes rada 8). hBrd4 CTD üksinda seondus hDaxx valguga väga nõrgalt (joonis 13A, ülemine paneel, rada 11), BPV-1 E2 valguga koos ekspresseerides oli hBrd4 CTD/hDaxx interaktsioon aga alla detekteeritavuse piiri (joonis 13A, ülemine paneel, rada 9). mBrd4 FL ja hDaxx valkude vahelise interaktsiooni hindamist takistas esimese madal ekspressioonitase ja sobivate antikehade puudumine (joonis 13A, ülemine paneel, rajad 10 ja 12). Joonise 13A alumine paneel on katse sisemiseks kontrolliks, näitamaks, et hDaxx oli kõikides immunopretsipitaatides võrreldaval tasemel olemas.

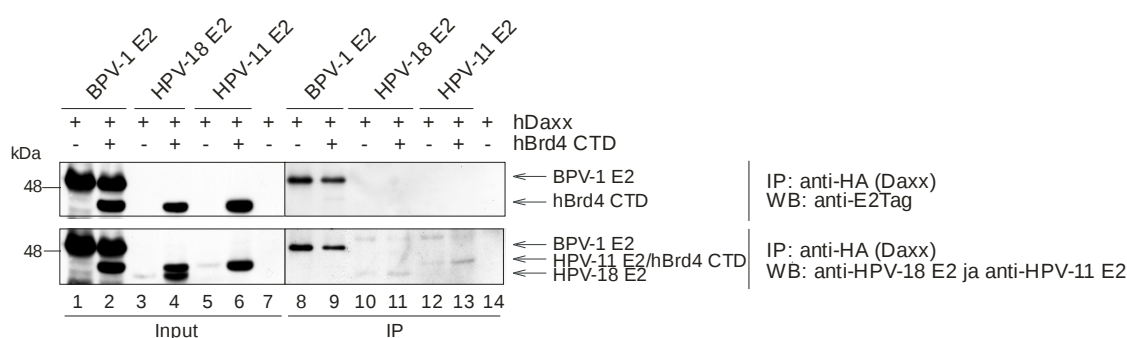
Järgmisena koimmunosadestati meid huvitav valkude kompleks E2 spetsiifilise antikeha abil. Ka selles katses kordusid eelmised tulemused – ekspresseerides E2 valku üksinda, oli BPV-1 E2/hDaxx interaktsioon kõige paremini detekteeritav (joonis 13B, ülemine paneel, rada 6), koekspresseerides mBrd4 FL oli vastav interaktsioon nõrgem (joonis 13B, ülemine paneel, rada 8) ning hBrd4 CTD puhul vaevu detekteeritav (joonis 13B, ülemine paneel, rada 7). Nii BPV-1 E2 kui hBrd4 CTD olid immunopretsipitaatides olemas (joonis 13B, alumine paneel).



Joonis 13. A. hDaxx valgu interaktsioon BPV-1 E2 ja hBrd4 CTD valkudega. **B.** BPV-1 E2 valgu interaktsioon hDaxx valguga. BPV-1 E2, hBrd4 CTD, mBrd4 FL ja hDaxx valke ekspressseeriti COS-7 rakkudes ning hDaxx ja BPV-1 E2 koimmunoadestati (IP) vastavalt HA-7 ja 5H4 antikehaga. *Western blot* (WB) analüüsil detekteeriti BPV-1 E2 valku E2-spetsiifilise antikehaga 5E11-HRP (A, ülemine paneel; B, alumine paneel), mis tunneb ära ka E2Tag-i hBrd4 CTD N-terminuses, ja hDaxx valku antikehaga 3F10-HRP (A, alumine paneel; B, ülemine paneel). *Input* on radadel 1-6 (A) ja 1-4 (B), immunopretsipiteeritud valgud radadel 7-12 (A) ja 5-8 (B). E2 positiivseks kontrolliks on bakterist puhastatud BPV-1 E2 valk. BPV-1 E2, hBrd4 CTD ja hDaxx valkude asukohad on näidatud paremal noolega.

HPV-18 ja HPV-11 E2 valkude olemasolu uurimiseks meid huvitavas kolmikkompleksis koimmunoadestati HA-7 antikeha abil üleekspressseeritud hDaxx ning sellega interakteeruvad valgud. Positiivseks kontrolliks oli BPV-1 E2 valgu interaktsioon hDaxx valguga, mis oli detekteeritav ka hBrd4 CTD koekspressioonil (joonis 14, ülemine paneel, rajad 8 ja 9, vastavalt). HPV-18 E2 ja HPV-11 E2 interaktsioon hDaxx valguga oli detekteerimise piiri peal (joonis 14, alumine paneel, rajad 10 ja 12, vastavalt), samas oli

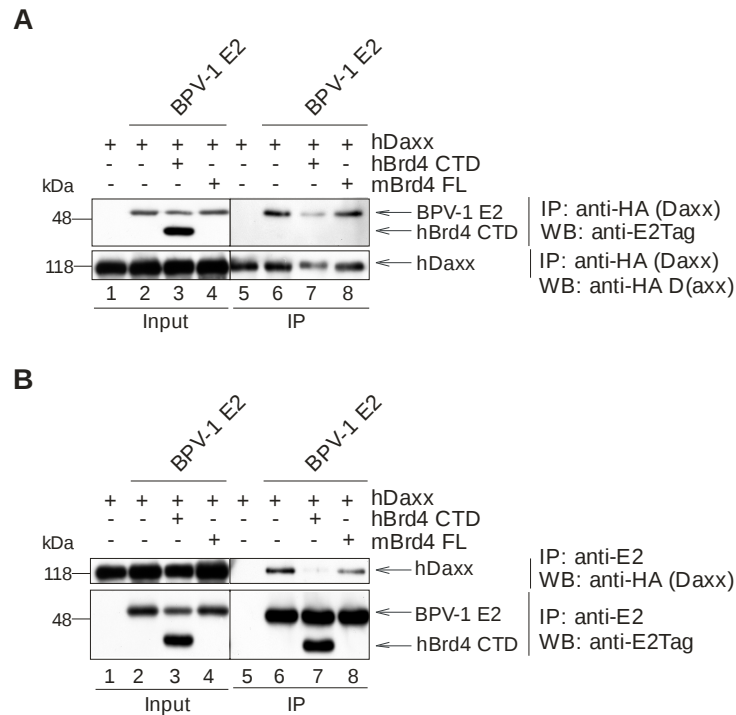
nende valkude tase juba *input*'is väga madal (joonis 14, alumine paneel, rajad 3 ja 5, vastavalt). hBrd4 CTD koekspressioonil esines HPV-18 ja HPV-11 E2 valku *input*'is oluliselt rohkem (joonis 14, alumine paneel, rajad 4 ja 6, vastavalt) ning nende interaktsiooni detekteerimine hDaxx valguga oli võimalik (joonis 14, alumine paneel, rajad 11 ja 13, vastavalt). hBrd4 CTD interaktsiooni hDaxx valguga polnud võimalik detekteerida ei BPV-1 E2, HPV-18 E2 ega HPV-11 E2 valguga koekspressioneerides (joonis 14, ülemine paneel, rada 9; alumine paneel, rada 11; alumine paneel, rada 13, vastavalt). Erinevus BPV-1 E2 ja HPV E2 valkude detekteerimises *input*'is võib olla tingitud HPV valkude tunduvalt madalamast ekspressioonitasemest rakus või nende tugevamast assotsiatsioonist tuumamaatriksiga (Zou *et al.*, 2000), mistõttu rakkude sonikeerimisel vabaneb neid lahustuvasse fraktsiooni tunduvalt vähem. hBrd4 CTD võib tõsta HPV E2 valkude ekspressioonitaset või nõrgendada nende interaktsiooni tuumamaatriksiga.



Joonis 14. hDaxx valgu interaktsioon BPV-1, HPV-18 ja HPV-11 E2 valkudega. BPV-1, HPV-18 ja HPV-11 E2 valke ning hBrd4 CTD ja hDaxx valke ekspresseeriti COS-7 rakkudes ning hDaxx koimmunoprecipiteeriti (IP) HA-7 antikehaga. Western blot (WB) analüüsil detekteeriti BPV-1 E2 valku E2-spetsiifilise antikehaga 5E11-HRP (ülemine paneel), mis tunneb ära ka E2Tag-i hBrd4 CTD N-terminuses, ning HPV-18 ja HPV-11 E2 valku vastavalt antikehadega 2E7 ja 6H3 (alumine paneel). *Input* on radadel 1-7 immunoprecipiteeritud valgud radadel 8-14. BPV-1 E2, HPV-18 E2 ja HPV-11 E2 valkude ning hBrd4 CTD valgu asukohad on näidatud paremal noolega.

Nii papilloomiviiruse E2 kui Daxx on võimalised teiste valkude vahendusel seonduma kromatiiniga. E2 valk on eelistatult atsetüleeritud kromatiiniga seonduva Brd4 valgu abil assotsieerunud kromatiiniga terve rakutsükli vältel (McPhillips *et al.*, 2005). Lisaks seob E2 mitmeid rakulisi transkriptsiooni ja replikatsiooni masinavärki kuuluvaid

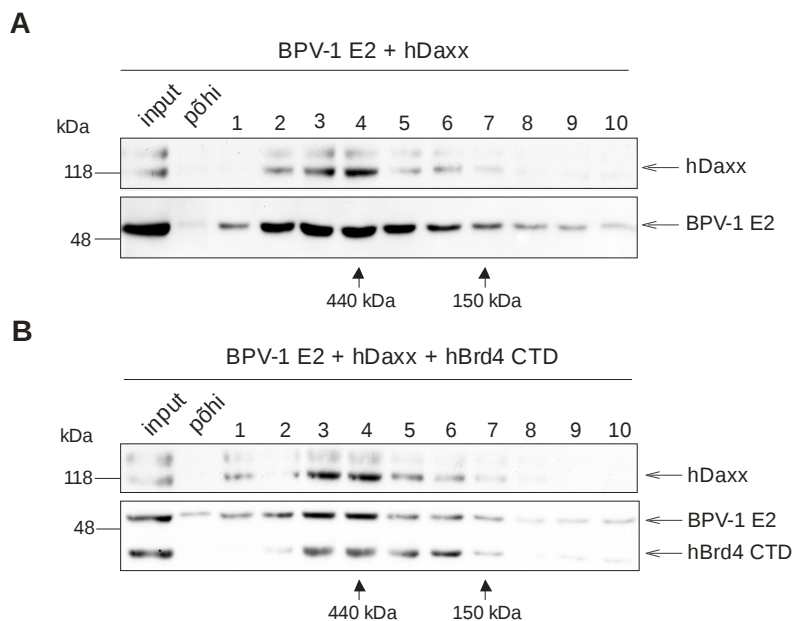
komponente (Rank *et al.*, 1995; Steger *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1991; Benson *et al.*, 1997; Breiding *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2000; Li ja Botchan, 1993; Parish *et al.*, 2006). Nendeks interaktsioonideks on vajalik E2 valgu N-terminaalne transaktivatsiooni domeen. Daxx on leitud interakteeruvat heterokromatiinse DNA-ga, sealjuures tsentromeeriga (Ishov *et al.*, 2004; Pluta *et al.*, 1998), ning mitmete transkriptsiooni reguleerivate faktoritega (Salomoni ja Khelifi, 2006; Hollenbach *et al.*, 2002). Seetõttu uuriti, kas E2 ja Daxx moodustavad kompleksi DNA vahendusel või on võimelised omavahel interakteeruma ka lahuses. Selleks kasutati etiidiumbromiidi, mis interkaleerub nukleiinhapete aluste vahele ning takistab seeläbi valkude seondumist DNA-le. Pärast etiidiumbromiidiga inkubeerimist koimmunosadestati rakulüsaadist hDaxx (joonis 15A) või BPV-1 E2 (joonis 15B) ning nendega interakteeruvad valgud, kasutades vastavalt üleekspresseeritud hDaxx (joonis 15A) või BPV-1 E2 valgu (joonis 15B) spetsiifilist antikeha. Selgus, et hDaxx seondub BPV-1 E2 valguga ka lahuses ja seda nii hBrd4 CTD kui mBrd4 FL koekspressioonil (joonis 15A, ülemine paneel, rajad 6, 7, 8; joonis 15B, ülemine paneel rajad 6, 7, 8). Seega võib järeldada, et hDaxx/BPV-1 E2 interaktsiooni eeltingimuseks ei ole nende valkude seondumine DNA-ga. Joonise 15A ja 15B alumine paneel on katse sisemiseks kontrolliks, näitamaks, et hDaxx ning BPV-1 E2 ja hBrd4 CTD olid kõikides immunopretsipitaatides võrreldaval tasemel olemas.



Joonis 15. A. ja B. hDaxx valgu interaktsioon BPV-1 E2 valguga etiidiimbromiidi juuresolekul. BPV-1E2, hBrd4 CTD, mBrd4 FL ning hDaxx valke ekspresseeriti COS-7 rakkudes ning enne hDaxx (A) või BPV-1 E2 (B) valkude koimmunoadestamist (IP) vastavalt HA-7 (A) või 5H4 (B) antikehaga inkubeeriti lahustuvat fraktsiooni etiidiimbromiidiga. *Western blot* (WB) analüüsil detekteeriti BPV-1 E2 valku E2-spetsiifilise antikehaga 5E11-HRP (A, ülemine paneel; B, alumine paneel), mis tunneb ära ka E2Tag-i hBrd4 CTD N-terminuses, ning hDaxx valku antikehaga 3F10-HRP (A, alumine paneel; B, ülemine paneel). *Input* on radadel 1-4, immunopretsipiteeritud valgud radadel 5-8. BPV-1 E2, hBrd4 CTD ja hDaxx valkude asukohad on näidatud paremal noolega.

Kuna koimmunoadestamise katsetest saadud andmed olid kohati vastukäivad, siis alternatiivselt analüüsiti potentsiaalse kolmikkompleksi formeerumist ka glütserooli gradiendis ultratsentrifuugimise teel. BPV-1 E2, hDaxx ja hBrd4 CTD valke ekspresseerivad CHO rakud fraktsioneeriti vastavalt joonisel 4B toodud skeemile ning 0.4 M soola juuresolekul lahustumatust kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist ekstraheerunud valgud ultratsentrifuugiti läbi 10-40% glütserooli gradiendi. Seejärel jagati gradient 10 fraktsiooniks, milles BPV-1 E2, hBrd4 CTD ja hDaxx valkude jaotuvus määrati *Western blot* meetodil.

Analüüsides BPV-1 E2 ja hDaxx koekspressioonil nende kahe valgu sedimentatsiooni profiili, võib öelda, et mõlemad liiguvad glütserooli gradiendis sarnase kiirusega. Nii BPV-1 E2 (joonis 16A, alumine paneel, rajad 2 kuni 5) kui hDaxx valku (joonis 16A, ülemine paneel, rajad 2 kuni 4) detekteeriti kõige enam fraktsioonidest, mis vastavad ~440 kDa kompleksile. Kui lisaks BPV-1 E2 ja hDaxx valkudele ekspresseeriti ka hBrd4 CTD, liikusid E2 (joonis 16B, alumine paneel, rajad 3 kuni 4) ja hDaxx (joonis 16B, ülemine paneel, rajad 3 kuni 4) sarnaselt eelnevaga – mõlemat esines kõige rohkem fraktsioonides, mis vastavad ~440 kDa suurusele kompleksile. Samuti võis samades fraktsioonides detekteerida ka hBrd4 CTD (joonis 16B, alumine paneel, rajad 3 kuni 6). Võrreldes 0.4 M soola tundliku fraktsiooniga, olid hDaxx ja hBrd4 CTD suuremal hulgal esindatud mitteioonse detergendiga lahustavas fraktsioonis. Mõlemad olid esindatud laia piigina üle 10 fraktsiooni. Mitteioonse detergendiga ekstraheeruvate valkude hulgast ei olnud aga võimalik detekteerida E2 (andmeid pole näidatud).



Joonis 16. CHO rakkudes koekspressioonil BPV-1 E2 ja hDaxx (**A**) ning BPV-1 E2, hDaxx ja hBrd4 CTD (**B**) valgud ekstraheeriti lahustumatust kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist 0.4 M NaCl juuresolekul ning nende liikumist hinnati glütserooli gradiendis (10-40%) ultratsentrifuugimise teel ja *Western blot* meetodil BPV-1 E2 valgu spetsiifilise antikehaga 5E11-HRP, mis tunneb ära ka E2Tag-i hBrd4 CTD N-terminuses, ning hDaxx valgu spetsiifilise antikehaga 3F10-HRP. Glütserooli gradiendis ultratsentrifuugimise kestus oli 4h. BPV-1 E2, hDaxx ja hBrd4 CTD valkude asukohad on näidatud paremal nooltega.

Eelnevalt on kirjeldatud Brd4 CTD interaktsioon kõigi papilloomiviiruste E2 valkudega. Meie kirjeldasime inimese Daxx valgu seondumist BPV-1, HPV-18 ja HPV-11 E2 valkudega. Lisaks detekteerisime nõrga interaktsiooni Brd4 CTD ja Daxx valgu vahel, mis võib viidata nendevahelisele väga transientssele seondumisele või toimub interaktsioon teiste valkude vahendusel. Näitasime ka 0.4 M soolaga elueeritavas kromatiinifraktsioonis BPV-1 E2, Daxx ja Brd4 CTD valkude sarnast liikumist glütserooli gradiendis ultratsentrifuugides. Samas IP tulemused viitavad sellele, et E2 seondub kas Brd4 CTD või Daxx valguga, aga mitte mõlemaga korraga. Seega võib üks takistada teise seondumist E2 valguga. Siiski arvame, et papilloomiviiruse E2 ning inimese Daxx ja Brd4 CTD valgud on võimelised moodustama teatud tingimustel rakus kompleksi ning selleks vajalikud interaktsioonid võivad toimuda ka 0.4 M soolaga ekstraheeritavas kromatiini fraktsioonis, kuid ilma DNA vahenduseta.

3.5. Daxx valgu mõju uurimine E2BS-sõltuvale E2 transkriptsiooni ning replikatsiooni funktsioonile

Daxx valgu üheks funktsiooniks on transkriptsiooni reguleerimine. Siiaamaani on kirjeldatud Daxx kui transkriptsiooni korepressorit, mis represseerib mitmeid rakulisi transkriptsiooni faktoreid (Salomoni ja Khelifi, 2006) ning interakteerub valkudega (histooni deatsetülaas II, *core* histoonid, DEK valk), mis osalevad transkriptsiooni vaigistamisel (Hollenbach *et al.*, 2002). Sel põhjusel otsustati uurida, kas E2/Daxx interaktsioon mõjutab E2 transaktivatsiooni funktsiooni.

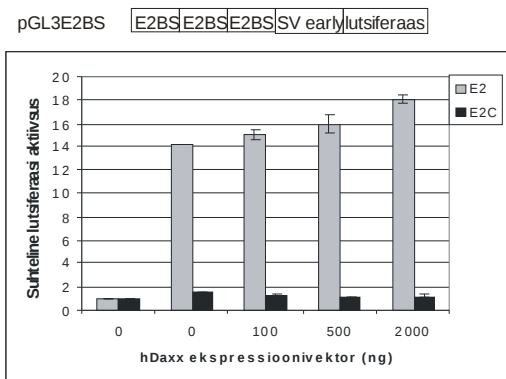
Daxx valgu mõju hindamiseks E2-sõltuvale transkriptsioonile kasutati kahte erinevat reporterplasmidi – pGL3E2BS (joonis 17A ja 17C) ja pGL3P2 (joonis 17B). Esimene sisaldab *Photinus pyralis*'e lutsiferaasi geeni ees SV40 promootorit ja kolme E2 seondumiskohta (BS9) ning teine BPV-1 URR piirkonda (7476-94 BPV-1 genoomis). E2 valgu seondumisel reporterplasmidis leiduvatele E2 seondumiskohtadele aktiveeritakse SV40 või BPV-1 URR piirkonnas asuv promootor ning ekspresseeritakse lutsiferaasi. E2 transaktivatsioonivõimet määratakse rakkudes tekkinud lutsiferaasi hulga järgi. Antud katses hindasime Daxx valgu võimet mõjutada BPV-1 E2 ja E2C sõltuvat transkriptsiooni.

Teadaolevalt käitub täispikk E2 valk transkriptsiooni aktivaatorina ning selle repressorvorm E2C N-terminaalse transaktivatsiooni domeeni puudumisel transkriptsiooni ei mõjuta (Spalholz *et al.*, 1985; Lambert *et al.*, 1989; Choe *et al.*, 1989; Barsoum *et al.*, 1992).

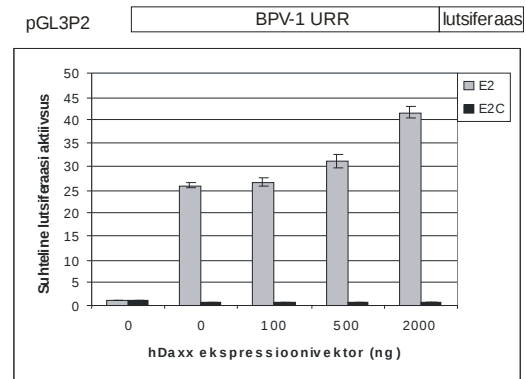
Transkriptsiooni katse läbiviimiseks CHO rakkudes kasutati nii E2-sõltuvat (pGL3E2BS või pGL3P2) kui E2-mittesõltuvat (pRL-TK) reporterplasmidi. Daxx valgu mõju E2-sõltuvale transkriptsioonile hinnati, lisades BPV-1 E2 ja BPV-1 E2C valgule erinevates kontsentratsioonides hDaxx valku. E2-sõltuva *Photinus pyralis*'e lutsiferaasi ekspressiooni mõõdetud tulemused normaliseeriti E2-mittesõltuva *Renilla reniformis*'e lutsiferaasi ekspressiooni tulemuste suhtes ning andmed esitati basaalse transkriptsiooni aktiivsuse suhtes (ilma E2 valguta), mis võrdsustati 1.0-ga. Nagu näha, ei represserinud Daxx valgu lisamine E2BS-sõltuvat E2 transaktivatsiooni võimet, pigem aktiveeris kontsentratsioonist sõltuvalt vähesel määral – kolme E2BS reportersüsteemi puhul tõusis lutsiferaasi ekspressioonitase 1.3 korda (joonis 17A, E2 tulbad) ja BPV-1 URR reportersüsteemi korral 1.6 korda (joonis 17B, heledad tulbad). hDaxx valgu lisamine BPV-1 E2C aktiivsust ei mõjutanud (joonis 17A ja 17B, tumedad tulbad).

Brd4 valguga interakteerumine on vajalik kõigi papilloomiviiruste E2-vahendatud transaktivatsiooniks (McPhillips *et al.*, 2006). Brd4 CTD ekspressioon konkureerib aga täispika Brd4 valguga E2 seondumise pärast ning inhibeerib seeläbi efektiivselt E2-vahendatud transaktivatsiooni (McPhillips *et al.*, 2006; Schweiger *et al.*, 2006; Ilves *et al.*, 2006; Kurg *et al.*, 2006; You *et al.*, 2004). Täispika Brd4 valgu ekspressioon aga vähendab Brd4 CTD tingitud transkriptsiooni inhibitsiooni kontsentratsioonist sõltuval moel (Schweiger *et al.*, 2006). Kuna hDaxx aktiveeris E2BS-sõltuvat transkriptsiooni vähesel määral, uuriti, kas ka hDaxx oleks võimeline taastama E2 valgu transaktivatsiooni võime.

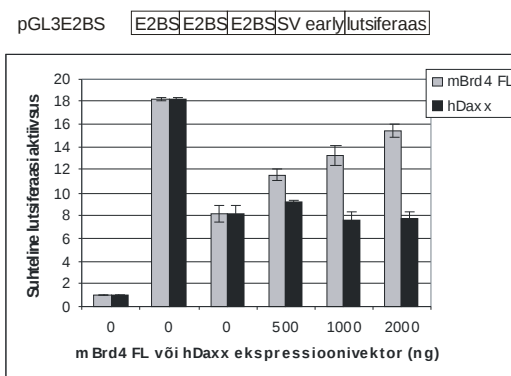
hDaxx valgu mõju hBrd4 CTD-tingitud BPV-1 E2-sõltuva transaktivatsiooni inhibitsioonile hinnati kolme E2BS-ga reportersüsteemis. Positiivseks kontrolliks oli mBrd4 FL üleekspressioon. Tulemuste hindamisel oli näha, et hBrd4 CTD ekspressioon inhibeerib E2-sõltuvat transkriptsiooni umbes 2 korda ning mBrd4 FL juurde viimine taastab E2 transaktivatsiooni funktsiooni kontsentratsioonist sõltuvalt esialgselt võrreldavale tasemele (joonis 17C, heledad tulbad). Samas hDaxx ekspressioon sellist mõju ei omanud, sest E2 valgu transaktivatsiooni funktsioon ei taastunud (joonis 17C, tumedad tulbad).

A

E2	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
E2C	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
hDaxx	-	-	-	-						

B

E2	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
E2C	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
hDaxx	-	-	-	-						

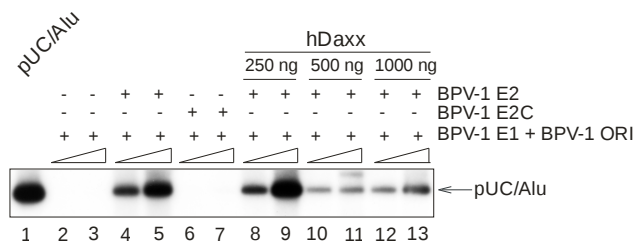
C

E2	-	-	++	++	++	++	++	++
hBrd4 CTD	-	-	-	++	++	++	++	++
mBrd4 FL	-	-	-	-				
hDaxx	-	-	-	-				

Joonis 17. A. ja B. hDaxx valgu mõju hindamine E2BS-sõltuval E2 transaktivatsiooni funktsioonile. CHO rakke transfecteeriti BPV-1 E2 ja E2C ekspressioonivektoritega, E2-mittesõltuva pRL-Tk ja E2-sõltuva pGL3E2BS (A) või pGL3P2 (B) reporterplasmiididega ning suurenevates kontsentratsioonides (100 ng, 500 ng ja 2000 ng) hDaxx ekspressioonivektoriga. **C.** hDaxx valgu mõju hindamine E2 valgu transaktivatsiooni funktsioonile hBrd4 CTD ekspressioonil. CHO rakke transfecteeriti BPV-1 E2 ja hBrd4 CTD ekspressioonivektoritega, E2-mittesõltuva pRL-Tk ja E2-sõltuva pGL3E2BS reporterplasmiidiga ning suurenevates kontsentratsioonides (100 ng, 500 ng ja 2000 ng) mBrd4 FL ja hDaxx ekspressioonivektoritega. Lutsiferaasi taset rakus mõõdeti 30 tundi peale transfectiooni. Lutsiferaasi ekspressioonitase E2-sõltuvalt reporterplasmiidilt normaliseeriti E2-mittesõltuva pRL-Tk reporterplasmidi lutsiferaasi ekspressiooni tulemuste suhtes ning andmed esitati basaalse lutsiferaasi aktiivsuse suhtes (ilma E2 valguta), mis võrdsustati 1.0-ga. Esitatud tulemused on kolme iseseisva katse keskmised.

Papilloomiviiruse replikatsiooniks on vajalikud replikatsiooni *origin in cis* ning E1 ja E2 valgud *in trans* (Chiang *et al.*, 1992; Ustav ja Stenlund, 1991). Stabiilset replikatsiooni tagav minimaalne *origin* koosneb AT-rikkast alast ning valkude E1 ja E2 seondumiskohast (Ustav *et al.*, 1991). E2 valgu rolliks papilloomiviiruse replikatsioonil on aidata seonduda E1 valgul kõrge afiinsusega ja järjestusspetsiifiliselt replikatsiooni alguspunktiga (Sedman ja Stenlund, 1995; Sedman *et al.*, 1997). E2C valk replikatsiooni ei toeta, kuna ei oma E1 valguga interakteerumiseks vajalikku N-terminaalset domeeni (Lim *et al.*, 1998). hDaxx valgu mõju papilloomiviiruse replikatsioonile uuriti BPV-1 minimaalse *origin*'i süsteemis CHO rakkudes. Kahes erinevas ajapunktis (36h ja 72h) rakkudest eraldatud ja lineariseeriva ensüümiga restrikteeritud episomaalset DNA-d analüüsiti *Southern blot* meetodil radioaktiivse fosforiga (³²P) märgistatud minimaalset *origin*'i sisaldava pUC/Alu plasmidi spetsiifilise prooviga.

Nagu näha, ei toimunud BPV-1 minimaalse *origin*'i replikatsiooni E2 valgu puudumisel (joonis 18, rajad 2 ja 3) ning E2C valgu ekspressioonil (joonis 18, rajad 6 ja 7). Kui kõige madalama hDaxx valgu kontsentratsiooni juures (250 ng) replikatsiooni signaali intensiivsuses märgatavaid erinevusi polnud võimalik detekteerida (joonis 18, rajad 4 ja 5 võrreldes radadega 8 ja 9), siis kõrgematel hDaxx kontsentratsioonidel (500 ng ja 1000 ng) võis näha replikatsiooni signaali vähenemist (joonis 18, rajad 4 ja 5 võrreldes radadega 10 kuni 13). Kuna erinevalt transkriptsiooni katsest puudus antud katstes sisemine kontroll, siis tuleb veel kontrollida, kas tegemist oli spetsiifiliselt papilloomiviiruse *origin*'ilt replikatsiooni inhibeerimisega.. hDaxx võis mõjuda ka üldisele replikatsiooni tasemele või oli hDaxx üleekspressioon rakkudele toksiline.



Joonis 18. hDaxx valgu mõju hindamine BPV-1 minimaalse *origin*'i replikatsioonile. CHO rakkudesse transfecteeriti BPV-1 minimaalset *origin*'i sisaldav pUC/Alu plasmiid, BPV-1 E1, E2 ja E2C ekspressiooniplasmiidid ning suurenevates kogustes (250 ng, 500 ng ja 1000 ng) hDaxx ekspressioonikonstrukti. 36 ja 72 tunni pärast (tähistatud ) eraldati rakkudest episomaalne DNA, mida restrikteeriti lineariseeriva ensüümiga *Hind*III ja ensüümiga *Dpn*I-ga, mis lõikab vaid bakteriaalse päritoluga DNA-d, ning analüüsiti *Southern blot* meetodi radioaktiivselt märgitud pUC/Alu spetsiifilise prooviga. Markeriks on 200 pg *Hind*III ensüümiga restrikteeritud pUC/Alu plasmidi (rada 1). Paremal on noolega näidatud pUC/Alu plasmidi asukoht.

Seega uurides inimese Daxx valgu üleekspressiooni mõju E2-sõltuval transkriptsioonile ja replikatsioonile, leidsime, et Daxx võimendab vähesel määral E2BS-sõltuvat E2 transaktivatsiooni. Samas ei olnud Daxx erinevalt täispikast Brd4 valgust võimeline taastama Brd4 CTD üleekspressioonil E2 valgu transaktivatsiooni funktsiooni. Papilloomiviiruse minimaalse *origin*'i replikatsiooni võib Daxx valgu üleekspressioon inhibeerida, aga kuna me ei ole jõudnud kontrollida Daxx mõju rakutsüklile ega rakkude elulemusele, ei saa veel kindlalt väita, et Daxx üleekspressioon inhibeerib papilloomiviiruse DNA replikatsiooni spetsiifiliselt.

4. ARUTELU

Papilloomiviiruse E2 on multifunktsionaalne valk, mis reguleerib viiruse transkriptsiooni ja replikatsiooni ning osaleb viirusgenoomi pikaajalisel episomaalsel säilimisel jagunevates rakkudes. Kõigi papilloomiviiruste E2 valgud seovad Brd4, kuigi erineva efektiivsusega (McPhillips *et al.*, 2006). See interaktsioon on vajalik E2-vahendatud transkriptsiooni funktsiooni täitmiseks (Ilves *et al.*, 2006; Schweiger *et al.*, 2006). Samas pole E2/Brd4 interaktsioon vajalik kõigi papilloomiviiruste efektiivseks segregeerumiseks, kuna mitmete papilloomiviiruste E2 valgud assotsieeruvad mitootiliste kromosoomidega Brd4-sõltumatul moel (McPhillips *et al.*, 2006). Brd4 seondub rakulise kromatiiniga kahe N-terminaalselt paikneva bromodomeeni kaudu, E2 valgu N-terminaalse transaktivatsiooni domeeniga interakteerub Brd4 aga oma C-terminaalselt paikneva ala kaudu (Dey *et al.*, 2003; You *et al.*, 2004). Kui E2 ja Brd4 vaheline interaktsioon lõhkuda, kaotab E2 oma transaktivatsiooni funktsiooni. Brd4 C-terminaalse domeeni ekspressioon inhibeerib efektiivselt kõigi papilloomiviiruste E2-vahendatud transaktivatsiooni funktsiooni (Ilves *et al.*, 2006; Schweiger *et al.*, 2006; Kurg *et al.*, 2006; McPhillips *et al.*, 2006). Antud töö üheks eesmärgiks oligi uurida, kas ja kuidas mõjutab Brd4 CTD üleekspressioon E2 valgu tuumasisest lokalisatsiooni.

Papilloomiviiruse E2 valk lokaliseerub raku tuuma ning IF analüüsil on E2 spetsiifiline signaal detekteeritav peene täpilise muustrina. BPV-1 E2 valk on seotud rakulise kromatiiniga kogu rakutsükli vältel (Allikas *et al.*, 2001; Skiadopoulos ja McBride, 1996; Kurg *et al.*, 2005). BPV-1 E2 valgu lokalisatsiooni uurimisel stabiilses ja transientses ekspressioonisüsteemis IF meetodil täheldasime, et algselt üle kogu tuuma jaotunud E2 spetsiifiline signaal koondus Brd4 CTD ekspressioonil selgelt eristuvatesse fookustesse. Lisaks põhjustas Brd4 CTD ka HPV-18 ja HPV-11 E2 valkude kontsentreerumise fookustena eristuvatesse tuumastruktuuridesse.

BPV-1 E2 valgu relokalisatsiooni detailsemal analüüsil biokeemilise fraktsioneerimise meetodil nägime, et BPV-1 valk oli valdavalt seotud mitteioonse detergendiga lahustumatu kromatiini-tuumamaatriksi fraktsiooniga, kust E2 oli valdavalt ekstraheeritav 0.4 M soolaga. Saadud tulemused on kooskõlas eelnevalt avaldatuga (Kurg

et al., 2005). Brd4 CTD ekspressioonil jäi aga mingi osa BPV-1 E2 valgust tuumastruktuuridega seotuks ka peale 0.4 M NaCl juuresolekul ekstraheerimist. Enamik kromatiini koosseisu kuuluvaid valke on 0.45 M NaCl juuresolekul tuumast ekstraheeritavad, tuumamaatriks aga jääb intaktseks ka pärast kõrge soolaga töötlemist (Pederson, 1998). Seega esineb BPV-1 E2 valk raku tuumas kahes fraktsioonis – üks fraktsioon on assotsieerunud rakulise kromatiiniga ning teine soolaresistentsete mittekromatiinsete tuumastruktuuridega. Seega võib järeldada, et valdav osa BPV-1 E2 valgust on seotud rakulise kromatiiniga ning Brd4 CTD ekspressioonil suureneb see E2 valgu fraktsioon, mis on seotud tuumamaatriksiga.

Kuigi kõigi papilloomiviiruste E2 valgud seonduvad läbi Brd4 kromatiiniga, on HPV-11 E2 valgu puhul kirjeldatud ka selle assotsiatsioon tuumamaatriksiga (Zou *et al.*, 2000). Seega võib oletada, et BPV-1 ja HPV-11 E2 valkude tuumasisene kompartmentalisatsioon on erinev – BPV-1 E2 seondub eelistatult kromatiiniga ning HPV-11 E2 tuumamaatriksiga. Seda, et BPV-1 ja HPV-11 E2 valgud erinevad kromatiiniga seondumise võime poolest, toetab ka asjaolu, et need kaks viirust kasutavad viirusgenoomide efektiivseks jaotumiseks tütarakkude vahel erinevaid strateegiaid ning omavad segregatsiooni funktsiooni täitmiseks erinevaid rakulisi partnereid (Van Tine *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2006; McPhillips *et al.*, 2006).

Brd4 CTD poolt indutseeritud E2 valgu relokalisatsiooniks on vajalik viimase N-terminaalne transaktivatsiooni domeen, mis vahendab interaktsiooni Brd4 CTD-ga. Seda toetab ka asjaolu, et E2C tuumasisesele lokalisatsioonile Brd4 CTD mõju ei avaldanud. Kuna Brd4 CTD spetsiifiline signaal oli nii E2 ekspressioonil kui selle puudumisel koondunud distinktsetesse fookustesse, võib järeldada, et E2 relokaliseerimine on Brd4 CTD poolt vahendatud aktiivne protsess. Brd4 CTD ei oma kromatiiniga interakteerumiseks vajalikke bromodomeene, mistõttu konkureerib Brd4 CTD endogeense täispika Brd4 valguga E2 seondumise pärast, eemaldades viimase kromatiinilt. E2 relokaliseerumine kromatiini fraktsioonist mittekromatiinsetesse tuumastruktuuridesse on seega põhjuseks, miks Brd4 CTD ekspressioon inhibeerib efektiivselt E2-vahendatud transaktivatsiooni funktsiooni. See omakorda rõhutab täispika Brd4 valgu tähtsust E2 seondumisel kromatiiniga ning selle interaktsiooni olulisust E2 funktsioonide täitmisel.

Pealegi on antud interaktsioon vastastikku kasulik, kuna E2 aitab omalt poolt stabiliseerida Brd4 assotsiatsiooni kromatiiniga (McPhillips *et al.*, 2005).

Nii E2 valk kui Brd4 CTD üksinda kolokaliseerusid fookustes ühe PML kehade peamise struktuurse komponendi, Daxx valguga, mistõttu on alust arvata, et Brd4 CTD ekspressioonil eristunud fookused tähistavad PML kehasid. Kuna PML kehad on tuumasisesed mittekromatiinsed struktuurid ning assotsieerunud tuumamaatriksiga, oleks see kooskõlas ka biokeemilisel fraktsioneerimisel saadud tulemustega. Lisaks on PML kehasid varasemalt seostatud nii papilloomiviiruse replikatsiooni (Swindle *et al.*, 1999), varajase transkriptsiooni (Day *et al.*, 2004) kui virionide morfogeneesiga (Day *et al.*, 1998; Florin *et al.*, 2002).

Kuna täheldasime, et E2 positiivsetes rakkudes on endogeense Daxx valgu tuumasisene signaal tunduvalt intensiivsem kui E2 mitteekspresseerivates rakkudes, oletasime, et E2 interakteerub Daxx valguga ning relokaliseerib selle mujalt rakust tuuma. Selgus, et BPV-1 E2 seondub nii üleekspresseeritud kui endogeense Daxx valguga ja seda interaktsiooni vahendab kas E2 “hinge” ja/või C-terminaalne domeen. Samas, kui võrrelda *input*’i ja IP signaali, võis näha, et Daxx interakteerub täispika BPV-1 E2 valguga paremini kui BPV-1 E2C vormiga. Seega võib BPV-1 E2 seonduda Daxx valguga otseselt, kuid lisaks võivad E2/Daxx interaktsioonis osaleda ka teised valgud, mis seonduvad E2 N-terminusega. Üleekspresseeritud Daxx valgu ja BPV-1 E2 interaktsioon oli kõige tugevam, kui ekspresseeriti E2 üksinda. Brd4 CTD ja Brd4 FL lisamisel oli vastav interaktsioon nõrgem, mis võib olla tingitud konkurentsest seondumisest E2 valguga. Samas endogeense Daxx valguga saadud tulemused olid vastupidised – Brd4 CTD juuresolekul seondus BPV-1 E2 Daxx valguga tugevamini kui üksinda. Antud tulemused olid samad ka korduskatsetes.

Võrreldes BPV-1 E2 valguga oli HPV-18 ja HPV-11 E2 valkude seundumine üleekspresseeritud Daxx valguga vaevu detekteeritav. Selle põhjuseks võib ühelt poolt olla nende tugevam assotsiatsioon tuumamaatriksiga (Zou *et al.*, 2000), mille tulemusena oleks lahustuvasse fraktsiooni vabanenud ning koimmunopretsipiteeritavate valkude hulk tunduvalt väiksem. Teisalt aga võib viiruse kontrollmehhanismiks olla HPV E2 valkude ekspressioonitaseme rakus võimalikult madalana hoidmine, kuna nad omavad kasvu supresseerivaid omadusi ning on võimelised indutseerima apoptoosi (Downhanick *et al.*,

1995; Goodwin *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2000; Parish *et al.*, 2006). Kuna Brd4 CTD juuresolekul oli E2/Daxx interaktsiooni detekteerimine võimalik, võib Brd4 CTD tõsta HPV E2 valkude rakulist ekspressioonitaset või neid stabiliseerida. HPV E2 valkude interaktsiooni uurimisel endogeense Daxx valguga kasutasime N-terminaalselt koodon-optimeeritud E2 valke. E2 valkude koodon-optimeerimine on näidatud tõstvat nende ekspressioonitaset, kuna nende mRNA-des esinevate koodonite muutmine kõige sagedamini imetaja rakkudes esinevate vastu tõstab translatsiooni taset ja/või eemaldab mRNA-st negatiivsed regulaatorsed elemendid (Oliveira *et al.*, 2006). Koodon-optimeeritud HPV-18 ja HPV-11 E2 valgud olid *input*'is esindatud BPV-1 E2 valguga võrreldaval tasemel ning ka nende interaktsioon endogeense Daxx valguga oli hästi detekteeritav. Seega oli natiivsete HPV E2 valkude nõrga interaktsiooni põhjuseks üleekspressioon Daxx valguga pigem nende madal rakuline ekspressioonitase.

Ka Brd4 CTD üksinda kolokaliseerus endogeense Daxx valguga fookustena eristuvates tuumastruktuurides. Kuigi nendevahelist interaktsiooni meil hästi detekteerida ei õnnestunud, ei ole selle toimumine siiski välistatud. Brd4 CTD seondumine Daxx valguga võib olla väga transientne või on selle detekteerimine tehnilistel põhjustel raskendatud. Samas võib see toimuda ka teiste valkude vahendusel. Ka BPV-1 E2, Daxx ja Brd4 CTD valkude sarnane liikumine glütserooli gradiendis annab alust arvata, et need kolm valku on võimalised moodustama rakus kompleksi. Samas, kuigi E2 seondub nii Daxx kui Brd4 CTD valguga, ei ole kompleksi moodustamiseks tingimata vajalik Daxx/Brd4 CTD interaktsioon.

Daxx valk on multifunktsionaalne valk, mille üheks rolliks on transkriptsiooni reguleerimine. Daxx represseerib mitmeid rakulisi transkriptsioonifaktoreid ning interakteerub mitmete valkudega, mis osalevad transkriptsiooni vaigistamisel (Hollenbach *et al.*, 2002; Salomoni ja Khelifi, 2006). Samas BPV-1 E2-sõltuva transkriptsiooni suhtes Daxx valk represseerivat mõju ei omanud, pigem võis täheldada vähest aktiveerimist kontsentratsioonist sõltuval määral. Tõenäoliselt on Daxx valgu väike aktiveeriv mõju aga kaudne, sest erinevalt täispikast Brd4 valgust (Schweiger *et al.*, 2006) ei suutnud Daxx valgu üleekspressioon Brd4 CTD poolt inhibeeritud E2 transaktivatsiooni funktsiooni taastada. Seda toetab ka Brd4 ja Daxx valkude assotsieerumine erinevate kromatiini regioonidega – Brd4 on seotud eelistatult atsetüleeritud kromatiiniga (Dey *et al.*, 2003; You

et al., 2004), Daxx aga heterokromatiiniga, sealhulgas ka tsentromeeriga (Ishov *et al.*, 2004; Pluta *et al.*, 1998). Samas on võimalik, et Daxx käitub korepressorina HPV-de E2-vahendatud E6 ja E7 onkogeenide transkriptsiooni inhibeerimisel (Dowhanick *et al.*, 1995; Goodwin *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 2000).

E2/Daxx interaktsioonil võib olla funktsionaalne roll papilloomiviiruse replikatsioonil, kuna Daxx inhibeeris BPV-1 minimaalse *origin*'i replikatsiooni kontsentratsioonist sõltuval moel. Samas tuleb veel uurida, kas Daxx valgu mõju papilloomiviiruse DNA replikatsioonile oli spetsiifiline. Me ei saa välistada Daxx valgu mõju rakutsüklile ning seega ka üldisele replikatsiooni tasemele. Samuti võib E2 ja Daxx üleekspressioon mõjutada rakkude elulemust, kuna mõlemad valgud kannavad pro-apoptoetilisi omadusi ning on võimelised indutseerima apoptoosi (Webster *et al.*, 2000; Parish *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 1997; Perlman *et al.*, 2001; Torii *et al.*, 1999; Khelifi *et al.*, 2005). Viimast toetab ka tähelepanek, et HaCat rakkudele oli BPV-1 E2 ja Daxx valgu üleekspressioon toksiline. Seega vajab täheldatud fenomen veel detailsemat uurimist.

Kuna E2 valgu näol on tegemist papilloomiviiruse elutsüklis multifunktsionaalse valguga, siis peab E2 seonduma erinevate funktsioonide täitmiseks mitmete erinevate interaktsioonipartneritega erinevates tuumakompartimentides. Mittediferentseerunud jagunevates rakkudes ehk papilloomiviiruse latentses elutsüklis on E2 seotud eelistatult kromatiiniga, reguleerides seeläbi papilloomiviiruse transkriptsiooni, replikatsiooni ja segregatsiooni. Antud etapis on olulisel kohal E2 interaktsioon Brd4 valguga. Tõenäoliselt on latentses faasis seotud väike osa E2 valgust ka Daxx valguga, ühe PML kehade peamise struktuurse komponendiga. Papilloomiviiruse varajases elutsüklis võivad PML kehad olla amplifikatsioonilise replikatsiooni toimumise kohaks, kuna PML kehasid on seostatud mitmete DNA viiruste varajase replikatsiooniga ning ka papilloomiviiruse genoom on leitud pärast nakatumist nendes tuumastruktuurides. Samuti korreleerub papilloomiviiruse varajase transkriptsiooni efektiivsus PML kehade olemasoluga (Day *et al.*, 2004). Terminaalselt diferentseerunud rakkudes ehk papilloomiviiruse vegetatiivses eluetapis leiab PML kehas tõenäoliselt aset viiruse morfogeneesi (Day *et al.*, 1998; Florin *et al.*, 2002; Heino *et al.*, 2000). Seega omavad PML kehad funktsionaalset tähtsust mitmes papilloomiviiruse eluetapis, samas E2 ja Daxx valgu vahelise interaktsiooni roll vajab veel täiendavat uurimist.

KOKKUVÕTE

Antud töö eesmärgiks oli uurida, kuidas muudab Brd4 C-terminaalse domeeni ekspressioon papilloomiviiruse E2 valguga tuumasisest lokalisatsiooni ja selle interaktsioone erinevate tuumastruktuuridega. Lisaks uuriti viirusvalgu E2 interaktsiooni rakulise Daxx valguga, mis on PML kehade üks peamisi struktuurseid komponente, ning selle võimalikku tähtsust papilloomiviiruse elutsükliks.

Käesoleva töö kirjanduslik osa annab ülevaate papilloomiviiruse E2 valguga rollist viiruse elutsükliks, PML kehade struktuurist ja funktsioonidest ning nende tuumastruktuuride ühest peamisest struktuursest komponendist – Daxx valgust.

Eksperimentaalse töö tulemused olid järgmised:

1. Brd4 CTD ekspressioon relokaliseerib papilloomiviiruse E2 valguga kromatiinilt tuumamaatriksi koosseisu kuuluvatesse distinktsetesse fookustesse, mis seletab Brd4 CTD inhibeerivat mõju BPV-1 E2 transaktivatsiooni funktsioonile. Antud relokalisatsiooniks on vajalik E2 valguga N-terminaalne domeen, mis vahendab interaktsiooni Brd4 CTD valguga. Ka Brd4 CTD üksinda esineb fookustes.
2. E2 ja Brd4 CTD kolokaliseeruvad fookustes rakulise Daxx valguga, seega võib tegemist olla PML kehadega.
3. E2 seondub Daxx valguga ning seda interaktsiooni vahendab E2 “hinge” ja/või C-terminaalne domeen. Brd4 CTD ja Daxx valkude vahelist interaktsiooni aga detekteerida ei õnnestunud. Samas 0.4 M soola juureolekul kromatiini-tuumamaatriksi fraktsioonist vabanenud BPV-1 E2, Daxx ja Brd4 CTD valgud on võimelised moodustama rakus ühise kompleksi.
4. Daxx valk omab E2BS-sõltuvalt BPV-1 E2 transaktivatsioonile väikest aktiveerivat mõju, pole aga võimeline taastama Brd4 CTD poolt inhibeeritud BPV-1 E2 valguga transaktivatsiooni funktsiooni. Samas BPV-1 minimaalse *origin*’i replikatsioonile mõjub Daxx valguga ekspressioon inhibeerivalt.

SUMMARY

Papillomaviruses are small DNA viruses which infect basal cells of the epithelium. The main regulator of the virus life cycle is the viral E2 protein. It is involved in the transcription of viral genes, in the replication of the viral genome and in the stable segregation of viral episomes in the nuclei of dividing cells. For these different functions E2 must interact with many viral and cellular proteins. The most significant role in papillomavirus life cycle has the cellular protein Brd4. It is associated with chromatin by its two bromodomains and thereby mediates E2-dependent transactivation function and for some viruses also E2-dependent segregation function. The expression of the C-terminal domain of Brd4 competes with the endogenous Brd4 for E2 binding and has been shown to efficiently inhibit E2-activated transcription.

Our first goal was to examine the changes in the nuclear compartmentalization of the papillomavirus E2 protein when expressing Brd4 CTD. BPV-1 E2 protein is associated with cellular chromatin during the entire cell-cycle and distributed in a fine pattern over the nucleus. However, the expression of Brd4 CTD relocated E2 into distinct foci. If the majority of E2 is extractable from the insoluble chromatin-nuclear matrix fraction with 0.4 M salt then in the case of Brd4 CTD expression a part of E2 protein remained associated with nuclear matrix even after salt treatment. Thereby, the relocalization of E2 from chromatin into nuclear matrix associated foci explains the inhibitory effect of Brd4 CTD on E2-mediated transactivation. The relocalization of E2 protein requires its N-terminal transactivation domain which interacts directly with Brd4 CTD. In addition, Brd4 CTD alone was also found in these foci. In these nuclear foci both E2 and Brd4 CTD colocalized with the cellular Daxx protein, a major structural component of PML bodies. Thus, these foci could represent PML bodies which are distinct subnuclear structures associated with the nuclear matrix.

We also determined that E2 binds Daxx protein and that the interaction is mediated through the hinge and/or C-terminal domain of E2. However, we could not detect an interaction between Brd4 CTD and Daxx. Nevertheless, when considering the sedimentation profile of BPV-1 E2, Daxx and Brd4 CTD proteins extracted with 0.4 M salt

from chromatin-nuclear matrix fraction in glycerol gradient they are capable of forming a complex.

When studying the potential role of E2/Daxx interaction in papillomavirus life cycle, we found that Daxx activated slightly BPV-1 E2-dependent transactivation. However, Daxx could not reduce the inhibitory effect of Brd4 CTD on E2 transactivation function. The expression of Daxx inhibited replication from BPV-1 minimal origin. However, we need to ascertain the specificity of this phenomenon and also examine the possible role of Daxx in cell-cycle regulation and apoptosis.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abroi, A., Ilves, I., Kivi, S. and Ustav, M. (2004).** Analysis of chromatin attachment and partitioning functions of bovine papillomavirus type 1 E2 protein. *J Virol* **78**, 2100-13.
- Adamson, A.L. and Kenney, S. (2001).** Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *J Virol* **75**, 2388-99.
- Allikas, A., Ord, D., Kurg, R., Kivi, S. and Ustav, M. (2001).** 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* **75**, 95-106.
- Androphy, E., Lowy, D. and Schiller, J. (1987).** Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* **325**, 70-3.
- Baker, C. and Howley, P. (1987).** Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *EMBO J* **6**, 1027-35.
- Barsoum, J., Prakash, S., Han, P. and Androphy, E. (1992).** Mechanism of action of the papillomavirus E2 repressor: repression in the absence of DNA binding. *J Virol* **66**, 3941-5.
- Bastien, N. and McBride, A.A. (2000).** Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology* **270**, 124- 134.
- Baxter, M.K., McPhillips, M.G., Ozato, K. and McBride, A.A. (2005).** The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein, Brd4. *J Virol* **79**, 4806-18.
- Becker, K.A., Florin, L., Sapp, C. and Sapp, M. (2003).** Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization. *Virol* **314**, 161-7.
- Benson, J.D., Lawande, R. and Howley, P. M. (1997).** Conserved interaction of the papillomavirus E2 transcriptional activator proteins with human and yeast TFIIB proteins. *J Virol* **71**, 8041-7.
- Berezney, R. (2002).** Regulating the mammalian genome: the role of nuclear architecture. *Adv Enzyme Reg* **42**, 39-52.
- Breiding, D.E., Sverdrup, F., Grossel, M.J., Moscufo, N., Boonchai, W. and Androphy, E.J. (1997).** Functional interaction of a novel cellular protein with the papillomavirus E2 transactivation domain. *Mol Cell Biol* **17**, 7208-19.

- Burkham, J., Coen, D.M., Hwang, C.B. and Weller, S.K. (2001).** Interactions of herpes simplex virus type 1 with ND10 and recruitment of PML to replication compartments. *J Virol* **75**, 2353-67.
- Carvalho, T., Seeler, J.S., Ohman, K., Jordan, P., Pettersson, U., Akusjarvi, G., Carmo-Fonseca, M., and Dejean, A. (1995).** Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol* **131**, 45-56.
- Chen, L.Y. and Chen, J.D. (2003).** Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol Cell Biol* **23**, 7108-21.
- Chiang, C., Broker, T. and Chow, L. (1991).** An E1M-E2C fusion protein encoded by human papillomavirus type 11 is a sequence-specific transcription repressor. *J Virol* **65**, 3317-29.
- Chiang, C., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T., Broker, T. and Chow, L. (1992).** Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5799-803.
- Choe, J., Vaillancourt, P., Stenlund, A. and Botchan, M. (1989).** Bovine papillomavirus 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J Virol* **63**, 1743-55.
- Day, P.M., Baker, C.C., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (2004).** Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *PNAS* **101**, 14252-7.
- Day, P.M., Roden, R.B., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1998).** The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* **72**, 142-50.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T. and Ozato, K. (2003).** The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8758-63.
- Dey, A., Ellenberg, J., Farina, A., Coleman, A. E., Maruyama, T., Sciortino, S., Lippincott-Schwartz, J. and Ozato, K. (2000).** A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition. *Mol Cell Biol* **20**, 6537-49.
- Doorbar, J., Foo, C., Coleman, N., Medcalf, L., Hartley, O., Prospero, T., Napthine, S., Sterling, J., Winter, G. and Griffin, H. (1997).** Characterization of events during late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology* **238**, 40-52.

- Doorbar, J., Parton, A., Hartley, K., Banks, L., Crook, T., Stanley, M. and Crawford, L. (1990).** Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* **178**, 254-62.
- Doucas, V. (2000).** The promyelocytic (PML) nuclear compartment and transcription control. *Biochem Pharmacol* **60**, 1197-201.
- Dowhanick, J.J., McBride, A.A and Howley P.M. (1995).** Suppression of cellular proliferation by papillomavirus E2 protein. *J Virol* **69**, 7791-9.
- Everett, R.D. and Maul, G.G. (1994).** HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *EMBO J* **13**, 5062-9.
- Flores, E. R. and Lambert, P. F. (1997).** Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol* **71**, 7167-79.
- Florin, L., Schäfer, F., Sotlar, K., Streeck, R.E. and Sapp, M. (2002).** Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein L2. *Virol* **295**, 97-107.
- Giri, J. and Yaniv, M. (1988).** Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J* **7**, 2823-9.
- Goodwin, E.C., Naeger, L.K., Breiding, D.E., Androphy, E.J. and DiMaio, D. (1998).** Transactivation-competent bovine papillomavirus E2 protein is specifically required for efficient repression of human papillomavirus oncogene expression and for acute growth inhibition of cervical carcinoma cell lines. *J Virol* **72**, 3925-34.
- Gottifredi, V. and Prives, C. (2001).** P53 and PML: new partners in tumor suppression. *Trends Cell Biol* **11**, 184-7.
- Hagensee, M.E., Yaegashi, N. and Galloway, D.A. (1993).** 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*, **67**, 315-22.
- Heino, P., Zhou, J. and Lambert, P.F. (2000).** Interaction of the papillomavirus transcription/replication factor, E2, and the viral capsid protein, L2. *Virol* **276**, 304-14.
- Hollenbach, A.D., McPherson, C.J., Mientjes, E.J., Iyengar, R. and Grosveld, G. (2002).** Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci* **115**, 3319-30.
- Howley, P. M. and Lowy, D.R. (2001).** Papillomaviruses and their replication. In *Fields' Virology*, pp. 2197-2230. Edited by D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Hubbert, N. L., Schiller, J. T., Lowy, D. R. and Androphy, E. J. (1988). Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5864-8.

Ilves, I., Kivi, S. and Ustav, M. (1999). Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. *J. Virol* **73**, 4404- 4412.

Ilves, I., Mäemets, K., Silla, T., Janikson, K. and Ustav M. (2006). Brd4 is involved in multiple processes of the bovine papillomavirus type 1 life cycle. *J Virol* **80**, 3660-5.

Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., III and Maul, G.G. (1999). PML is critical for ND 10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* **147**, 221-34.

Ishov, A.M., Vladimirova, O.V. and Maul, G.G. (2004). Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX. *J Cell Sci* **117**, 3807-20.

Jang, M.K., Mochizuki, K., Zhou, M, Jeong, H.-S., Brady, J.N. and Ozato, K. (2005). The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* **19**, 523-34.

Khelifi, A.F., D'Alcontres, M.S. and Salomoni, P. (2005). Daxx is required for stress-induced cell death and JNK activation. *Cell Death Differ* **12**, 724-33.

Korioth, F., Maul, G.G., Plachter, B., Stamminger, T. and Frey, J. (1996). The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp Cell Res* **229**, 155-8.

Kurg, R., Parik, J., Juronen, E., Sedman, T., Abroi, A., Liiv, I., Langel, U. and Ustav, M. (1999). Effect of bovine papillomavirus E2 protein-specific monoclonal antibodies on papillomavirus DNA replication. *J Virol* **73**, 4670-7.

Kurg, R., Sild, K., Ilves, A., Sepp, M. and Ustav, M. (2005). Association of bovine papillomavirus E2 protein with nuclear structures in vivo. *J Virol* **79**, 10528-39.

Kurg, R., Tekkel, H., Abroi, A., and Ustav, M. (2006). Characterization of the functional activities of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein single-chain heterodimers. *J Virol* **80**, 11218-25.

Lambert, P., Hubbert, N., Howley, P. and Schiller, J. (1989). Genetic assignment of multiple E2 gene products in bovine papillomavirus-transformed cells. *J Virol* **63**, 3151-4.

- Law, M., Lowy, D., Dvoretzky, I. and Howley, P. (1981).** Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequences. *PNAS* **78**, 2727-31.
- Lee, D., Hwang, S., Kim, J. and Choe, J. (2002).** Functional interaction between p/CAF and human papillomavirus E2 protein. *J Biol Chem* **277**, 6483-9.
- Lee, D., Lee, B., Kim, J., Kim, D. and Choe, J. (2000).** cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription. *J Biol Chem* **275**, 7045-51.
- Lehman, C. and Botchan, M. (1998).** Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4338-43.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E.J. and Chen, J.D. (2000)** Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol* **20**, 1784-96.
- Li, R. and Botchan, M.R. (1993).** The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell* **73**, 1207-21.
- Li, R. and Botchan, M.R. (1994).** Acidic transcription factors alleviate nucleosome-mediated repression of DNA replication of bovine papillomavirus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7051-5.
- Li, R., Knight, J., Bream, G., Stenlund, A. and Botchan, M. (1989).** Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome. *Genes Dev* **3**, 510-26.
- Li, R., Knight, J.D., Jackson, S.P., Tjian, R. and Botchan, M.R. (1991).** Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell* **65**, 493-505.
- Lim, D.A., Gossen, M., Lehman, C.W. and Botchan, M.R. (1998).** Competition for DNA Binding Sites between the Short and Long Forms of E2 Dimers Underlies Repression in Bovine Papillomavirus Type 1 DNA Replication Control. *J Virol* **72**, 1931-40.
- MacPherson, P., Thorner, L., Parker, L. M. and Botchan, M. (1994).** The bovine papilloma virus E1 protein has ATPase activity essential to viral DNA replication and efficient transformation in cells. *Virology* **204**, 403-8.
- Maul, G.G., Negorev, D., Bell, P. and Ishov, A.M. (2000).** Review: Properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol* **129**, 278-87.

McBride, A.A., Byrne, J. and Howley, P. (1989). E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 510-4.

McBride, A.A., Romanzuk, H. and Howley, P. (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* **266**, 18411-4.

McPhillips, M.G., Oliveira, J.G., Spindler, J.E., Mitra, R. and McBride, A.A. (2006). Brd4 is required for E2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol* **80**, 9530-43.

McPhillips, M.G., Ozato, K. and McBride, A.A. (2005). Interaction of bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 stabilizes its association with chromatin. *J Virol* **79**, 8920-32.

Michaelson, J.S. and Leder, P. (2003). RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *J Cell Sci* **116**, 345-52.

Michaelson, J.S., Bader, D., Kuo, F., Kozak, C. and Leder, P. (1999). Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev* **13**, 1918-23.

Mohr, I.J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E.J., MacPherson, P. and Botchan, M.R. (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**, 1694-9.

Munger, K. and Howley, P.M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* **89**, 213-28.

Müller, A., Ritzkowsky, A. and Steger, G. (2002). Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300. *J Virol* **76**, 11042-53.

Nishimura, A., Ono, T., Ishimoto, A., Dowhanick, Frizzell, M.A., Howley, P.M. and Sakai, H. (2000). Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J Virol* **74**, 3752-60.

Nishiyama, A., Dey, A., Miyazaki, J. and Ozato, K. (2006). Brd4 is required for recovery from antimicrotubule drug-induced mitotic arrest: preservation of acetylated chromatin. *Mol Biol Cell* **17**, 814-23.

Oliveira, J.G., Colf, L.A. and McBride, A.A. (2006). Variations in the association of papillomavirus E2 proteins with mitotic chromosomes. *PNAS* **103**, 1047-52.

Parish J.L., Kowalczyk, A., Chen, H.-T., Roeder, G.E., Sessions, R., Buckle, M. and Gaston, K. (2006). E2 proteins from high- and low-risk human papillomavirus types differ in their ability to bind p53 and induce apoptotic cell death. *J Virol* **80**, 4580-90.

Parish, J.L., Bean, A.M., Park, R.B. and Androphy, E.J. (2006). ChlR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Mol Cell* **24**, 867-76.

Pederson, T. (1998). Thinking about a nuclear matrix. *J Mol Biol* **277**, 147-59.

Peng, Y.C., Breiding, D.E., Sverdrup, F., Richard, J. and Androphy, E.J. (2000). AMF-1/Gps2 binds p300 and enhances its interaction with papillomavirus E2 proteins. *J Virol* **74**, 5872-9.

Perlman, R., Schiemann, W.P., Brooks, M.W., Lodish, H.F. and Weinberg, R.A. (2001). TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* **3**, 708-14.

Piirsoo, M., Ustav, E., Mandel, T., Stenlund, A. and Ustav, M. (1996). Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J* **15**, 1-11.

Pluta, A.F., Earnshaw, W.C. and Goldberg, I.G. (1998). Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death. *J Cell Sci* **111**, 2029-41.

Rank, N.M. and Lambert, P.F. (1995). Bovine papillomavirus type 1 E2 transcriptional regulators directly bind two cellular transcription factors, TFIID and TFIIB. *J Virol* **69**, 6323-34.

Salomoni, P. and Khelifi, A.F. (2006). Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol* **16**, 97-104.

Sanders, C. M. and Stenlund, A. (1998). Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *EMBO J* **17**, 7044-55.

Schweiger, M.-R., You, J. and Howley, P.M. (2006). Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol* **80**, 4276-85.

Sedman, J. and Stenlund, A. (1995). Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. *EMBO J* **14**, 6218-28.

Sedman, J. and Stenlund, A. (1998). The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol* **72**, 6893-7.

- Sedman, T., Sedman, J. and Stenlund, A. (1997).** Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J Virol* **71**, 2887-96.
- Seeler, J.S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C. and Dejean, A. (1998).** Interaction of Sp100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7316-21.
- Seo, Y. S., Muller, F., Lusky, M. and Hurwitz, J. (1993).** Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 702-6.
- Skiadopoulos, M.H. and McBride, A.A. (1996).** The bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator and repressor proteins use different nuclear localization signals. *J Virol* **70**, 1117-24.
- Skiadopoulos, M.H. and McBride, A.A. (1998).** Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J Virol* **72**, 2079-88.
- Spalholz, B. A., Yang, Y. C., Howley, P. M. (1985).** Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* **42**, 183-91.
- Steger, G., Ham, J., Lefebvre, O. & Yaniv, M. (1995).** The bovine papillomavirus 1 E2 protein contains two activation domains: one that interacts with TBP and another that functions after TBP binding. *EMBO J*, **14**, 329-40.
- Sternsdorf, T., Grotzinger, T., Jensen, K. and Will, H. (1997).** Nuclear dots: Actors on many stages. *Immunobiology* **198**, 307-31.
- Stubenrauch, F., Hummel, M., Iftner, T. and Laimins, L.A. (2000).** The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J Virol* **74**, 1178-86.
- Swindle, C.S., Zou, N., Van Tine, B.A., Shaw, G.M., Engler, J.A. and Chow, L.T. (1999).** Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol* **73**, 1001-9.
- Szymanski, P. and Stenlund, A. (1991).** Regulation of early gene expression from the bovine papillomavirus genome in transiently transfected C127 cells. *J Virol* **65**, 5710-20.
- Tang, J., Wu, S., Liu, H., Stratt, R., Barak, O.G., Shiekhattar, R., Picketts, D.J. and Yang, X. (2004).** A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein. *J Biol Chem* **279**, 20369-77.

- Tang, Q., Bell, P., Tegtmeyer, P. and Maul, G.G. (2000).** Replication but not transcription of simian virus 40 DNA is dependent on nuclear domain 10. *J Virol* **74**, 9694-700.
- Torii, S., Egan, D.A., Evans, R.A. and Reed, J.C. (1999).** Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J* **18**, 6037-49.
- Turek, L. (1994).** The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv Virus Res* **44**, 305-56.
- Ustav, E., Ustav, M., Szymanski, P. and Stenlund, A. (1993).** The bovine papillomavirus origin of replication requires a binding site for the E2 transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 898-902.
- Ustav, M. and Stenlund, A. (1991).** Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* **10**, 449-57.
- Ustav, M., Ustav, E., Szymanski, P. and Stenlund, A. (1991).** Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J* **10**, 4321-9.
- Van Tine, B. A., Dao, L. D., Wu, S. Y., Sonbuchner, T. M., Lin, B. Y., Zou, N., Chiang, C. M., Broker, T. R. and Chow, L. T. (2004).** Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4030-5.
- Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R. and Pandolfi P.P. (1998).** PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* **20**, 266-72.
- Webster, K., Parish, J., Pandya, M., Stern, P.L., Clarke, A.R. and Gaston, K. (2000).** The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* **275**, 87-94.
- Wu, S.-Y., Lee, A.-Y., You, S.Y., Kemper, J.K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Chiang, C.-M. (2006).** Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev* **20**, 2383-96.
- Xue, Y., Gibbons, R., Yan, Z., Yang, D., McDowell, T.L., Sechi, S., Qin, J., Zhou, S., Higgs, D. and Wang, W. (2003).** The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10635-40.
- Yang, L., Mohr, I., Fouts, E., Lim, D., Nohaile, M. and Botchan, M. (1993).** The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5086-90.

- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y. and Baltimore, D. (1997).** Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* **89**, 1067-76.
- Yang, Z., Yik, J.H.N., Chen, R., He, N., Jang, M.K., Ozato, K. and Zhou, Q. (2005).** Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* **19**, 535-45.
- You, J., Croyle, J. L., Nishimura, A., Ozato, K. and Howley, P. M. (2004).** Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* **117**, 349-60.
- You, J., Schweiger, M.R. and Howley, P.M. (2005).** Inhibition of E2 binding to Brd4 enhances viral genome loss and phenotypic reversion of bovine papillomavirus-transformed cells. *J Virol* **79**, 14956-61.
- Yu, T., Peng, Y.-C. and Androphy, E.J. (2007).** Mitotic kinesin-like protein 2 binds and colocalizes with papillomavirus E2 during mitosis. *J Virol* **81**, 1736-45.
- Zhao, L.Y., Colosimo, A.L., Liu, Y., Wan, Y. and Liao, D. (2003).** Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein binds to Daxx and eliminates enhancement of p53-dependent transcription by Daxx. *J Virol* **77**, 11809-21.
- Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A. and Pandolfi, P.P. (2000).** Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* **95**, 2748-52.
- Zou, N., Lin, B.Y., Duan, F., Lee, K.-Y., Jin, G., Guan, R., Yao, G., Lefkowitz, E.J., Broker, T.R and Chow, L.T. (2000).** The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association. *J Virol* **74**, 3761-70.
- zur Hausen, H. (2002).** Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**, 342-50.