

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

Helena Faust

**Arginiin-sõrm veise papilloomiviiruse tüüp 1
valgus E1**

Magistritöö

Juhendajad: Aare Abroi Ph. D

Meelis Kadaja M. Sc

TARTU 2005

Sisukord

Töös kasutatavad lühendid	3
Sissejuhatus	5
Kirjanduslik osa	6
1. Veise papilloomiviiruse tüüp1 üldiseloomustus	6
2. BPV1 geeni E1 produkt	7
3. BPV1 E1 sidumine DNA-le ja heksameeri moodustumine	10
4. E1 NTPaasse valguna	14
5. E1 ATPaasne-helikaasne funktsioon	15
6. Arginiin-sõrme sisaldavad valgud	18
7. E1 kui potentsiaalne arginiin-sõrm NTPaas	22
Ekspérimentaalne osa	25
Töö eesmärk	25
Materjal ja meetodika	26
Bakteritüved ja söötmed	26
Rakuliinid ja söötmed	26
Algplasmiidid	26
Plasmiidse DNA eraldamine aluselise lüüsiga (midipreparatsioon)	27
DNA puhastamine agarosgeelist	27
Transfektsioon koekultuuri rakkudesse	27
Denatureeritud BPV-1 E1 valkude detekteerimine <i>Western blot</i> meetodil	27
Transientse replikatsiooni analüüs	28
Valgu GST-E1 puhastamine	29
Bradfordi test	30
Valgu värvimine SDS-akrüülamiidgeelis	30
Lüsaadi valmistamine	30
Radioaktiivse proovi valmistamine	30
EMSA	31
ATPaasse aktiivsuse mõõtmine	31
Tulemused	32
E1 mutantide replikatsiooni defektsus BPV1 lühendatud ORI-del	32
Replikatsioon ei taastu, kui E1 heksameer moodustub mutantide segust	33
COS-7 lüsaatidega ei moodustu spetsiifilisi valk-DNA komplekse EMSA-s	34
Puhastati GST E1 valgud	37
GST E1 valgud moodustavad valk-DNA komplekse EMSA-s	40
GST E1-E2 kompleksi teke	41
ATP-st sõltuv E2 eemaldamine ORI-lt	42
E1 heksameeri moodustumine	43
GST E1 wt ja E1 wt omavad võrreldavat ATPaasset aktiivsust	45
GST E1 mutantsete valkude ATPaasne aktiivsus	45
Arutelu	48
Kokkuvõte	53
Summary	54
Kasutatud kirjandus	55

Töös kasutatavad lühendid

AAA - ATPaasid erinevate rakuliste aktiivsustega (*ATPases associated with diverse cellular activities*)

BS - seostumiskoht (*Binding Site*)

BPV - veise papilloomiviirus (*Bovine Papilloma Virus*)

BSA - veise seerum albumiin (*Bovine serum albumine*)

CPM - loendid minutis (*counts per minut*)

DBD - DNA-d siduv domeen (*DNA Binding Domain*)

dsDNA - kaksikahelaline DNA (*double stranded DNA*)

DTT - ditiotreitool

dI:dC – deoksüinosiin ja deoksütsütidiin

EDTA - etüleendiaminotetraädikhape (*ethylenediaminetetraaceatic acid*)

EMSA - geel shift (*Electrophoretic mobility shift assay*)

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

GEF - guaniini välja vahetav faktor (*Guanine exchange factor*)

GFP – roheline fluoresseruv valk (*green fluorescent protein*)

GNBP - guaniinnukleotiidi siduv valk (*Guanine nucleotide binding protein*)

GST - glutatioon-S-transferaas

HPV - inimese papilloomiviirus (*Human Papilloma Virus*)

IPTG - isopropüülthio- β -D-galaktosiid

LCR - pikk kontrollregioon (*Long Control Region*)

LT-ag - suur T antigeen (*Large T antigen*)

MCM - minikromosoomi säilitavad valgud (*Minichromosome maintenance proteins*)

ORF - avatud lugemisraam (*Open Reading Frame*)

ORI - replikatsiooni alguskoht (*Origin of Replication Initiation*)

PBS - fosfaadiga puhverdatud sool (*phosphate-buffered saline*)

PCR - polümeraasi ahel reaktsioon (*Polymerase Chain Reaction*)

PyV - polüoomiviirus (*Polyoma Virus*)

SF - superperekond (*Super Family*)

SDS - naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecylsulphate*)

ssDNA - üheaahelaline DNA (*single stranded DNA*)

sscDNA - üheaahelaline tsirkulaarne DNA (*single stranded circular DNA*)

SSC - naatriumkloriidi ja naatriumtsitraadi lahus

SV40 - reesusmakaagi viirus tüüp 40 (*Simian Virus Type 40*)

TAE - Tris-atsetaat puhver

TE - Tris-EDTA puhver

Tris - trishüdrosümetüülaminmetaan

TAD - transaktivatsiooni domeen (*Transactivating domain*)

URR - ülemine reguleeriv ala (*Upstream Regulatory Region*)

WT - metsik tüüp (*Wild type*)

Sissejuhatus

Pika evolutsiooni jooksul on välja kujunenud seosed valkude struktuuri ja funktsiooni vahel. On avaldatud lugematu hulk teaduslikke töid, mis näitavad, et pelgalt ühe aminohappe muutmine valgus mõjutab selle funktsiooni. Erandiks ei ole siinkohal ka helikaasid.

Antud töös on uurimisobjektiks veise papilloomiviiruse tüüp1 (BPV1) valk E1, mis on oma olemuselt heksameerne DNA helikaas ning mis on antud viiruse ainus ensümaatiliseltselt aktiivne valk. E1 on replikatsiooni initsiaator, millel on tõestatud DNA-d siduv, ORI lahti sulatav, NTPaasne ning helikaasne aktiivsus. BPV1 E1 on oma struktuurilt ja funktsioonilt sarnane teistele NTPaasetele valkudele. Mitmetel oligomeersetel NTPaasetel valkudel on näidatud struktuurne- funktsionaalne üksus, mida nimetatakse arginiin-sõrmeks. Tegemist on aminohappe arginiiniga, mis ulatub ühelt valgu subühikult teise subühiku fosfaati siduvasse lingo (P-lingu) ja on seega osa aktiivtsentrist. Arginiin-sõrme ülesandeks on hõlbustada NTP hüdrolyüsi ja anda edasi sellega kaasnevad konformatsioonilised muutused. BPV1 E1 puhul ei ole siiani näidatud arginiin-sõrme olemasolu. Käesolevas töö eksperimentaalses osas uuritakse kahe arginiini, mis on kirjanduse andmete põhjal potentsiaalsed arginiin-sõrmed, tähtsust, kasutades asendusmutantseid E1 valke. Mutantsete E1 valkudega viiakse läbi erinevaid katseid selgitamaks arginiinide olulisust neis positsioonides. Kuna autori varasema töö tulemusena on teada mutantsete E1 valkude replikatsiooni ning ATPaasi defektsus, keskendutakse selle põhjuste leidmisele. Põgusalt kontrollitakse ka komplementatsiooni mehhanismi võimalikkust P-lingu ja arginiin-sõrme mutantide vahel. Antud küsimuste lahendamiseks on BPV1 E1 sobilik, kuna seda viirust ja valku on põhjalikult uuritud ka meie laboris ning paljud protsessid nagu näiteks oligomeriseerumine, on täpselt kirjeldatud erinevate uurimisgruppide poolt.

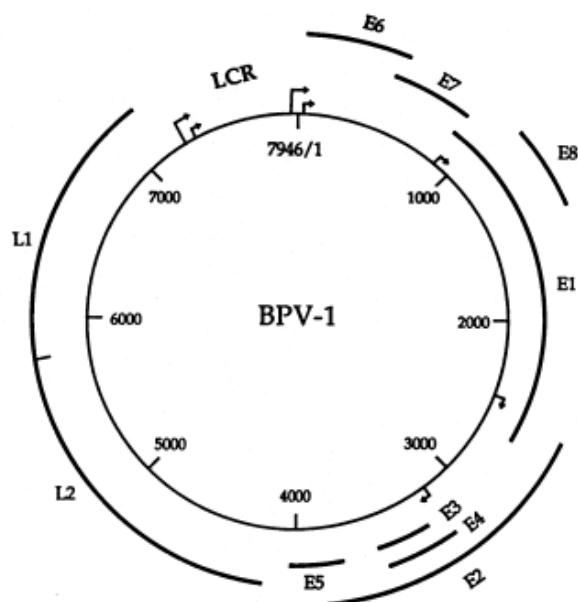
Käesolev magistr töö on sooritatud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi Viroloogia- Mikrobioloogia õppetoolis. Töö ideeline juhendaja oli Ph. D Aare Abroi, tehnilistes küsimustes E1 puhastamisel oli nõustajaks M. Sc Meelis Kadaja. Täna neid abi eest.

Kirjanduslik osa

1. Veise papilloomiviiruse tüüp1 üldiseloomustus

Papilloomiviirused kuuluvad samanimelisse sugukonda (de Villiers, Fauquet et al. 2004). Tegemist on kõrgelt liigispetsiifiliste viirustega, mis nakatavad imetajaid ja teisi selgroogseid. BPV1 nakkus väljendub healoomulistes fibropapilloomides. Seda viirust kasutatakse laialdaselt mudelsüsteemina papilloomiviiruste bioloogia uurimisel.

BPV1 genoom on 7946 aluspaari pikkune kaheaheelaline tsirkulaarne DNA, mida viiruspartiklis katab ümbriseta 55 nanomeetrise diameetriga kapsiid. Genoom jaotatakse varajaseks, hiliseks ja mittekodeerivaks piirkonnaks (URR - *upstream regulatory region* või LCR - *long control region*) (joonis 1.). Avatud lugemisraamid (ORF- *open reading frame*), mis kodeerivad valke, asuvad BPV1 ühel DNA ahelal. Varajases piirkonnas on 8 ORF-i (E1- E8), millelt ekspresseeruvad valgud on vajalikud viiruse DNA replikatsiooniks, transkriptsiooniks ja rakkude transformatsiooniks. Hilises piirkonnas on kaks ORF-i, L1 ja L2, millelt ekspresseeritakse kapsiidi valke. URR on ca 1000 aluspaari pikkune järjestus, mis sisaldab mitmesuguseid regulaatoralasid ja replikatsiooni alguspunkti (Bream 1994).



Joonis 1. BPV1 genoomne ülesehitus ja ORF-id (Bream 1994).

→ - promootor

— - ORF

LCR – pikk kontroll regioon

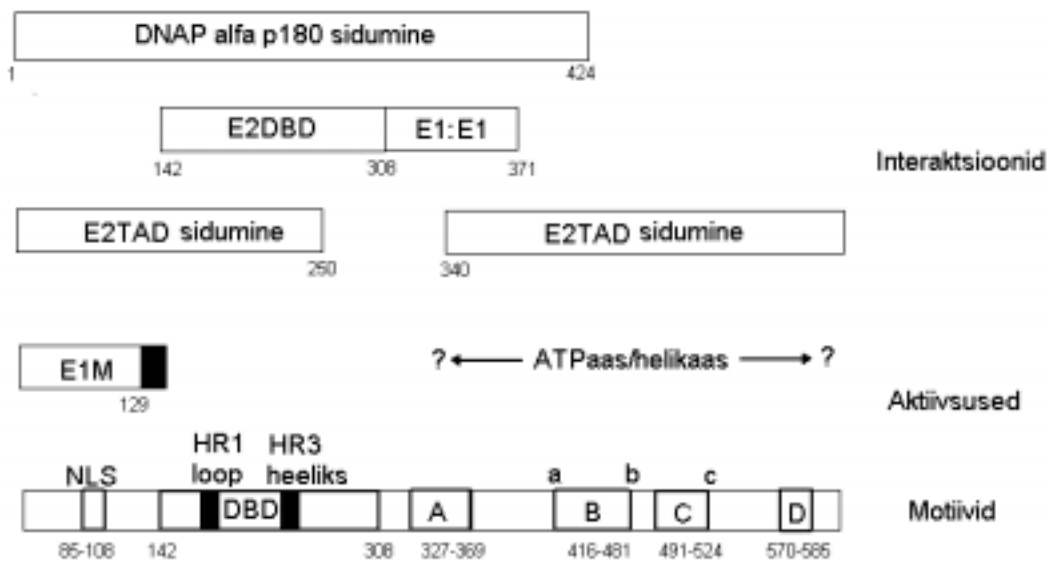
Papilloomiviiruste elutsükkel jagatakse raku sees vastavalt DNA replikatsioonile kolmeks. Vahtelt peale peremeesorganismi basaalse epiteelraku nakatumist toimub amplifikatsiooniline replikatsioon, kus paljundatakse viiruse DNA 50-100 koopiani raku kohta. Järgneb stabiilne replikatsioon, mil viiruse DNA koopiaarv rakus ei muutu. Vahtelt enne virioonide moodustumist toimub juba diferentseerunud rakus uus amplifikatsiooniline ehk vegetatiivne replikatsioon (Howley 1996).

BPV1 valk E1 on viiruse DNA replikatsiooni initsiaatorvalk ja seega omab kriitilist tähtsust viiruse säilimisel episoomina kogu elutsükli jooksul. BPV1 valk E1 on tuuma fosfoproteiin millel on ATPaasne, DNA helikaasne ja replikatsiooni alguspunkti (ORI- *Origin of Replication Initiation*) siduv aktiivsus. Samuti on viiruse DNA replikatsiooniks vajalik täispikk E2 transaktivaator. E1 ja E2 moodustavad kompleksi ja seonduvad kõrge spetsiifilisuse ja afiinsusega ORI-le, millel on mõlema geeni produkti sidumiskohad- E1 BS ja E2 BS (BS - *binding site*). E2 ülesandeks on stimuleerida E1 sidumist ORI-le ning olla spetsiifilisuse faktoriks. E2 eemaldatakse kompleksist ATP mõjul. Peale seda sündmust lisanduvad ORI-le uued E1 molekulid, mis oligomeriseeruvad. Aktiivne E1-DNA kompleks on ühenduses peremeesraku replikatsiooni aparaadiga ja põhjustab DNA lokaalse lahtisulamise ning initseerib uue DNA ahela sünteesi. E1-l osaleb ka viiruse transkriptsiooni ja transformatsiooni regulatsioonil, nimelt see aktiveerib promootoreid ning võimalik, et E2-ga interakteerudes mõjutab raku tsükli (Sverdrup 1997). Alljärgnevas töös käsitletakse neid protsesse lähemalt.

2. BPV1 geeni E1 produkt

E1 ORF on kõige konserveerunud papilloomiviiruste geen. E1 ekspresseeritakse nakatunud või transformeeritud rakkudes madalas hulgas ning natiivselt visualiseerida õnnestub seda harva. Tegelikult kodeerib E1 ORF kahte produkti: täispikk ORF produkt on 68 kuni 72 kDa fosfoproteiin, mida vajatakse viiruse replikatsiooniks (Sun, Thorner et al. 1990) (vt. joonis 2.) ja millest meil edaspidi juttu tulebki. Teine produkt on väiksem, 23 kDa E1-M, mida kodeeritakse töödeldud (*spliced*) transkriptilt E1 ORF 5' kolmandikust (Thorner, Bucay et al. 1988).

E1-M bioloogiline roll ei ole veel päris selge ehkki varem näidati teda kui BPV1 replikatsiooni negatiivset modulaatorit ent hilisemad katsed ei ole seda kinnitanud (Wilson, West et al. 2002).



Joonis 2. BPV1 E1 piirkonnad, sidumiskohad, aktiivsused (Wilson, West et al. 2002) järgi. E2TAD – E2 transaktiivatsiooni domeen. E2DBD – E2 DNA-ga seondumis domeeni sidumiskiirkond. A, B, C, D on konserveerunud motiivid E1 ja LT-ag perekonna valkudes; a, b, c on SF3 perekonna NTPPaasidele iseloomulikud motiivid. Selline motiivide organisatsioon on nii struktuurne kui funktsionaalne.

E1 valgul on teada kolmeosaline organisatsioon: N-terminaalne regioon, DNA-ga seostuv piirkond ning lai C-terminaalne ATPaasse ja helikaasse aktiivsusega regioon. N-terminaalne osa arvatakse olevat regulatoorne piirkond. Seal on fosforüleeritavad piirkonnad ning mutatsioonid neis muudavad E1 replikatsiooni aktiivsust (Zanardi, Stanley et al. 1997; Ma, Zou et al. 1999). Ka on näidatud, et N-terminuse esimesed 185 aminohapet seovad histoon H1 (Swindle and Engler 1998). Kogupikkuses BPV1 E1-le ei ole kritallstruktuuranalüüsi teostud, küll aga on teada DNA-d siduva domeeni struktuur. E1 DBD struktuur on väga sarnane SV40 (*Simian virus*) Large T antigeenidega (LT-ag) ja AAV (*Adeno associated virus*) Rep DBD-ga (Hickman, Ronning et al. 2002).

Papilloomiviiruste E1 ORF-id on märkimisväärselt sarnased, iseäranis C-terminaalses osas. Järjestussarnasused on SF3 superperekonda kuuluvate parvoviiruste ja inimese herpesviiruse 6 NS-1 valkudega (Gorbalenya 1993). Samuti on homologia SV40 ja PyV (*Polyoma virus*)

LT-ag. Need on viirusliku DNA replikatsiooni initsiaatorid ja seega funktsionaalselt sarnased E1-le. SV40 LT-ag struktuuri ja funktsiooni vahelistest seostest on palju teada. Need teadmised on suureks abiks E1 funktsioonide uurimisel (Sverdrup 1997).

Titolo *et al.* uurisid E1-E1 interaktsioone pärmi kaksikhübriid süsteemis, kasutades täispikki ja kunstlikult lühendatud E1 produkte. C-terminaalne E1 ORF järjestus 353-649 oli võimeline E1-E1 interaktsiooniks, lühim sellise aktiivsusega tükk oli E1₃₅₃₋₄₁₆. Üllatav oli aga see, et E1₃₅₃₋₆₄₉ suutis oligomeriseeruda ka DNA puudumise korral, pikem tükk E1₁₉₆₋₆₄₉ vajab ssDNA kohalolekut (Titolo, Pelletier *et al.* 2000). Võimalik, et täispikas E1 kontekstis DNA sidumine hõlbustab konformatsioonilist muutust, mis paljastab tõelise E1-E1 interaktsiooni järjestuse C-terminaalses regioonis (Wilson, West *et al.* 2002).

Heksameersete helikaaside monomeeride omavahelise interaktsiooni kohta saab infot ka SV40 LT-ag kristallstruktuurist. See näitab, et LT monomeer koosneb kolmest domeenis: D1 (N-terminaalne Zn domeen), D2 (Walker A, B ja motiiv C) ja D3 (koosneb nii N kui C terminuse heeliksiest). Kristallstruktuur dimeerist ATP-ta näitas, et monomeeride interaktsiooni osalevad D1 ja D2. Geelfiltratsioon kromatograafia deletsiooni mutantidega näitas, et LTag251-627 sisaldab kõiki elemente, mida on oligomeerumisel vaja. ATP stimuleeris heksameriseerumist ja stabiliseeris seda (Li, Zhao *et al.* 2003).

Olgugi et BPV1 täispika E1 kristallstruktuuri ei ole avaldatud, on seda tehtud HPV18 üksikutele domeenidele ja ka E1-E2 kompleksile (Abbate, Berger *et al.* 2004) ning SV40 LT-ag (Li, Zhao *et al.* 2003) puhul. Nende struktuuride võrdlemine näitas, et DBD domeenid on sama kujuga vaatamata sellele, et aminohappeline sarnasus nende vahel on alla 10% (Luo, Sanford *et al.* 1996; Enemark, Stenlund *et al.* 2002). Helikaasse domeeni identsus on 20%. LT-ag ATPaasse domeeni N-terminaalsed heeliksid on identsed E1 omadega. See regioon on vastutav oligomeriseerumise eest. Ka ATPaasse domeeni sekundaarstruktuur on nendel valkudel väga sarnane. Suurim erinevus nende valkude struktuuris on E1 ling-2 asukoht, milles on järjestused, mis vastutavad E2-ga interaktsioonide eest. LT-ags on see ling asendatud heeliksiestega. See erinevus näitab selgelt PV E1 spetsiifilisust interaktsioonides E2-ga, mis on osa mehhanismist, kus ATP on allosteeriliseks regulaatoriks E1-E2 kompleksi stabiilsuses (Abbate, Berger *et al.* 2004).

BPV1 E1 kvaternaarne struktuur on näidatud elektronmikrokoopiaga. E1 monomeerid moodustavad ORI-l heksameere ja topelt heksameere. Pildi analüüs on näidanud, et heksameer formeerub kuuese või kolmese sümmeetriaga, viimasel juhul olles dimeeridest koosnev trimeer. Heksameersed ringid on 40-50Å paksud ja 125Å diameetriga (Fouts, Yu et al. 1999). Katsed näitavad, et reaktsioonikeskkonnas olev ühe- või kaheaahelaline DNA stimuleerib E1 monomeere heksameriseeruma (Sedman and Stenlund 1998; Fouts, Yu et al. 1999). ATP-d ei ole oligomeriseerumiseks vaja, kui on olemas vähemalt 10 aluspaari pikkune DNA ahel, kusjuures selle järjestus ei ole oluline (Fouts, Yu et al. 1999). ATP indutseerib oligomeriseerumist, kui keskkonnas puudub DNA (Sedman and Stenlund 1998). E1 eelistab üldiselt olla monomeerne valk, mis vajab nukleiinhapet oligomeriseerumiseks (Wilson, West et al. 2002). Ka elektronmikroskoopia pildid näitavad, et SV40 LT-ag ja BPV E1 heksameersed helikaasid on oma struktuurilt väga sarnased (San Martin, Gruss et al. 1997; Fouts, Yu et al. 1999).

3. BPV1 E1 sidumine DNA-le ja heksameeri moodustumine

BPV1 replikatsiooni ORI koosneb kolmest elemendist: 18-aluspaarine palindroomne järjestus, mis seob E1, 12-aluspaarine järjestus, mis seob E2 ning nende vahele jääv AT-rikas element (Sverdrup 1997), (joonis 3.). Kuigi 18-ap järjestus on otseselt ja spetsiifiliselt siduv piirkond E1-le, on efektiivseks kompleksi formeerumiseks veel vajalikud mittespetsiifilised külgmised järjestused (Holt, Schuller et al. 1994). Seda et E1 assambleerub ORI regiooni samal ajal kaitstes järjestusi mõlemal pool 18-ap elementi, näitavad katsed keemilise, DNAas I (Sedman, Sedman et al. 1997) ja eksonukleaas III protektsiooni katsetega (Holt, Schuller et al. 1994).



Joonis 3. BPV1 ORI-d. Näha on E1 ja E2 sidumiskohad, A/T rikas piirkond. A) täispikk looduslik B) lühendatult plasmiidis pUCA12 C) lühendatud plasmiidis pUCA11.

On näidatud, et BPV1 E1 sidumine heksameersele järjestusele AACAAAT on E2 sõltuv (Chen and Stenlund 2001). Ümber 18-ap palindroomi on kaks AACAAAT järjestust ja 4-5 koopiat

sellele sarnast järjestust 24-ap ulatuses. Ka on näidatud, et neile järjestustele formeerub E1-E2 kompleks, ehkki madala afiinsusega ning Chen ja Stenlund esitlevad seda motiivi kui minimaalset E1 monomeeri sidumiskohta. See interpretatsioon on seoses E1 oligomerisatsiooniga. DNA sidumistulemused näitavad, et need järjestused 24-ap regioonis seovad E1 monomeere individuaalselt ja see põhjustab oligomeerse (võib-olla tetrameerse) kompleksi moodustumist läbi valk-DNA ja valk-valk komplekside (Chen and Stenlund 2001). Järgneb lisa E1 monomeeride kohale toomine, mis eeldatavalt viib heksameerse või topeltheksameerse E1 helikaasi formeerumisele (Sanders and Stenlund 2000). Kuna valgu assambleerumised kaitsevad DNA-d väljaspool 24-ap regiooni, peab DNA kontakteerumine toimuma külgmiste regioonidega peamiselt läbi fosfodiester selgroo, kus aluspaari spetsiifilisus on minimaalne (Sedman, Sedman et al. 1997).

BPV1 E1 valku seotakse nii ssDNA-le kui dsDNA-le, nii lineaarsele kui ka tsirkulaarsele. Mittespetsiifiline ssDNA stimuleerib tugevalt E1 oligomeriseerumist ja stabiilset assotsiatsiooni (Sedman and Stenlund 1998). dsDNA-ga seostumiseks on vajalik E1-te siduv ORI (Seo, Muller et al. 1993; Yang, Mohr et al. 1993; Fouts, Yu et al. 1999).

Paljud viiruslikud initsiaatorid seovad DNA-d *in vitro* madala spetsiifilisusega. Initsiaatoritele omane kõrge selektiivsus avaldub *in vivo*. E1 on võimeline siduma DNA-d spetsiifiliselt ja mittespetsiifiliselt. E1 madal selektiivsus selgus *in vitro* konkureerimiskatsetes mittespetsiifilise (s.t ei sisalda ORI) DNA-ga, (Yang, Mohr et al. 1993; Sedman and Stenlund 1995). E1 tundis ORI-le sarnaseid piirkondi teistest suvalistest DNA järjestustest 10-100 korda paremini ära, kuid olulise spetsiifilisuse tagas E1-E2 kompleksi seostumine (Sedman and Stenlund 1995).

E1 lühendamiskatsed kaardistasid, et järjestusspetsiifiline DNA sidumiseks vajalik E1 piirkond jääb aminohapete 150-300 vahele. Kui ekspresseeriti E1₁₄₂₋₃₀₈, säilis ORI sidumisaktiivsus, mis on võrreldav täispika E1 puhul (Chen and Stenlund 1998). Seega E1 DBD on funktsionaalselt ja struktuurselt diskreetne ühik ning konformatsiooniliselt iseseisev allapoole jäävatest järjestustest (Wilson, West et al. 2002). Järgnevad uuringud näitasid, et E1 DBD-s on eristatavad subregioonid HR1 ja HR3, mis on vajalikud järjestusspetsiifiliseks DNA sidumiseks (Gonzalez, Bazaldua-Hernandez et al. 2000). Enemark et. al näitasid, et E1 dimeer seondub külgnevale DNA suurele vaole ühel pool biheeliksit, teine dimeer seostub siis teisele poole heeliksit. Igal E1 monomeeril on kaks DNA sidumismoodulit: DNA-d siduv ling (HR1)

(R180-N189), mis seostub ühele DNA ahelale ja DNA-d siduv heeliks (HR3) (T239-N248), mis seostub vastasahelale (Enemark, Stenlund et al. 2002). Sama on täheldatud ka SV40 LT-age puhul. HR1 asub lingus, mis on E1 DBD pinnal kõrvuti koos alfa-heeliks 4-ga, mis sisaldab HR3 järjestust. HR3 on aminohapete vahetamisele tolerantsem kui HR1. Sellest on järeldatud, et HR1 vajatakse kui aluspaari äratundmiskohta ja HR3 on vajalik stabiliseerimaks HR1 lingu, seega omab arhitektuurset rolli (West, Flanery et al. 2001).

In vitro replikatsiooni süsteemis on E1 ainus replikatsiooniks vajalik viirusvalk ent kui E1 on madalas hulgas, on E2 vajalik stimuleerimaks replikatsiooni (Sedman, Sedman et al. 1997). Lisaks tõstab E2 E1 DNA-le seostumise järjestusspetsiifilisust (Bonne-Andrea, Tillier et al. 1997) ja stimuleerib E1 helikaaset aktiivsust - võimet sulatada lahti ORI piirkonda (Sanders and Stenlund 2000). E2 laadimisfunktsioon on oluline just *in vivo*, kui E1, mille järjestusspetsiifilisus on madal, hulk on väike ja konkureeriva rakulise DNA hulk väga suur (Sedman and Stenlund 1995). E2-E1 kompleks aitab tuua E1 molekule esmasesse E2-E1-DNA kompleksi. See toimub just läbi E2 BS12-e (Sanders and Stenlund 1998). Mis täpselt toimub E2 BS11, ei ole seni selgelt näidatud. Kuna *in vitro* suudab E1 teostada replikatsiooni ka ilma E2-ta, on see tõestuseks E2 stimulaatorsest rollist.

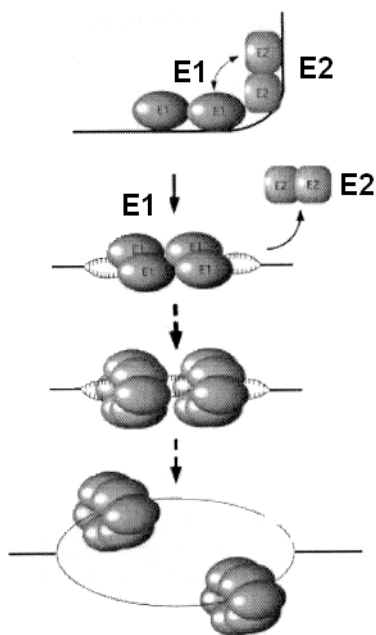
BPV1 E1 initsiaatori madal DNA-d siduv aktiivsus ei tulene E1 DBD-st vaid pigem on põhjustatud E1 helikaasse domeeni mittespetsiifilisest DNA sidumisest. See varjab spetsiifilise sidumise E1 DBD poolt. E2 tõstab selektiivsust, kuna E2 TAD seostub E1 helikaasse domeeniga ja väldib mittespetsiifilist seondumist. Esmalt seotakse E1 ORI-le kõrge selektiivsusega tänu E2-le. Hiljem, kui heksameer on formeerunud, E1 DNA selektiivsus langeb. Mittespetsiifiline E1 sidumine DNA-le on vajalik ahelate lahtisulatamiseks ja helikaasseks aktiivsuseks (Stenlund 2003).

Uuringud, milles on kasutatud kombinatsioone eri HPV tüüpide E1 ja E2 domeenide vahel, näitavad, et eksisteerivad vähemalt kolm otsest E1-E2 interaktsiooni. E1 nii N- (Benson and Howley 1995; Woytek, Rangasamy et al. 2001), kui C- (Moscufo, Sverdrup et al. 1999) terminaalsed regioonid suudavad iseseisvalt interakteeruda E2 transaktivatsiooni- domeeniga (E2 TAD), samas E1 DBD interakteerub E2 DBD-ga samuti. Funktsionaalselt on E1C-E2 TAD ja E1 DBD-E2 DBD interaktsioonid tähtsad, et BPV ORI-le assambleeruks aktiivne E1 initsiatsiooni kompleks (Berg and Stenlund 1997). Samas ei ole E1N-E2 TAD-il replikatsioonis märkimisväärset rolli (Woytek, Rangasamy et al. 2001). E1 DBD-E2 TAD on

oluline E1-vahendatud transkriptsioonilise aktiivsuse stimuleerimiseks ja näitab, et E1 DBD-E2 TAD interaktsiooni funktsiooniks on pigem transkriptsiooni regulatsioon kui DNA replikatsioon (Parker, Harris et al. 2000).

Interaktsioon E1 DBD ja E2 DBD vahel tekitab märkimisväärse DNA paindumise, mis hõlbustab järgnevat interaktsiooni E2 TAD ja E1 helikaase domeeni vahel (Gillitzer, Chen et al. 2000). E2 seostumine distaalsete piirkondadega vahendab lisa E1 molekulide kohale toomist ja uute E1 molekulide assambleerumine viib E2 eemaldamiseni ATPaases protsessis (Sanders and Stenlund 2000). HPV11 puhul on leitud, et ATP nõrgendab E1-E2 interaktsiooni (White, Pelletier et al. 2001).

Praeguse ettekujutuse kohaselt algab BPV1 E1 laadimine ORI-le järgnevalt (joonis 4.): E2 dimeer seostub E1 dimeeriga, E1 seostub spetsiifiliselt esimesele paarile E1 DBD-le (Chen and Stenlund 1998). Järgnevalt lisanduvad veel kaks E1 molekuli, mis seotakse teisele paarile E1 DBD-le, mis osaliselt katab esimest. DNA ahel paindub tugevalt ning E2 dimeer eemaldatakse ATP-d nõudvas protsessis (Sanders and Stenlund 1998). Seega tekib nelja E1 molekuliga E1-ORI komplek. Permanganaat tundlikkusega on detekteeritud ORI lahti sulamine (Sanders and Stenlund 1998). Hüpoteesi kohaselt lisanduvad järgnevalt uued E1 molekulid, nii et moodustuvad kaks heksameeri, üks ühele DNA ahelale, teine vastasahelale. Avaldub helikaasne aktiivsus (Enemark, Stenlund et al. 2002).



Joonis 4. BPV1 replikatsiooni initsiatsioon (Enemark, Stenlund et al. 2002).

4. E1 NTPaasse valguna

Helikaasid jaotatakse konserveerunud motiivide alusel superperekondadesse SF-1, SF-2, SF-3 ja DnaB-sarnased valgud. E1-l on kirjeldatud SF3 perekonnale iseloomulikud motiivid. Kõik eelnimetatud superperekonnad seovad ATP-d ja omavad kahte klassikalist motiivi WalkerA (fosfaati siduv P-ling e. *P-loop*) ja WalkerB (Mg^{2+} siduv aspartaat). Motiiv A on defineeritud aminohappe konsensusena GxxxxGKT ning funktsioneerimiseks on minimaalne aminohappeline järjestus GK(T/S) (Walker, Saraste et al. 1982). Lüsiini aminorühm interakteerub MgATP/MgADP fosfaatidega ning treoniini või seriini hüdroksüülrühm seob Mg^{2+} ioone. Motiiv B on näidatud kui iseseisev aspartaat (Walker, Saraste et al. 1982) ja kui järjestus DExx SF1 ja SF2 perekondades (Gorbalenya 1993). Aspartaadi karboksüülrühm koordineerib Mg^{2+} ioone MgATP/MgADP, samas kui glutamaat arvatakse toimivat katalüütilise alusena ATP hüdroolüüsis (Gorbalenya 1993).

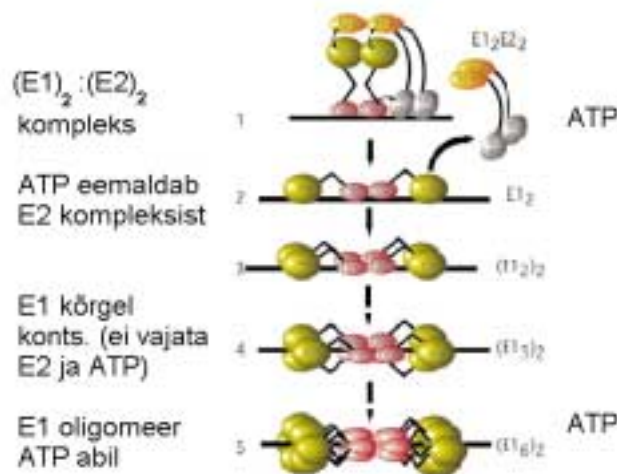
Kahe valguperekonna - papilloomiviiruste E1-e ja SV40 LT-age vahel on konserveerunud C-terminaalses fragmendis neli motiivi A, B, C, D (Clertant and Seif 1984) (vt. joonis 2. lk.8.). HPV11 puhul asub A E1 minimaalsel oligomerisatsiooni järjestusel aminohapetel 353-416. B ja C on osa ATPaasest domeenist ja sisaldavad kolme lühikest järjestusmotiivi nimedega a, b, c, mis on iseloomulikud SF3 NTP-d siduvatele valkudele (Gorbalenya, Koonin et al. 1990). Motiivid a ja b on vastavuses WalkerA ja B motiividega (Walker, Saraste et al. 1982). Motiiv c võib olla ATP γ -fosfaadi sensor ATP sidumisel ja hüdroolüüsil. Konserveerunud D regiooni täpseid funktsioone ei ole veel kirjeldatud.

HPV11 E1 on tehtud katseid lühendatud valguga. N-terminaalsed deletsioonid kuni 353 aminohappeni säilitasid ATPaasse aktiivsuse, kuid järgmised deletsioonid kuni aminohappeni 435 kaotasid selle aktiivsuse. Seega jääb kriitiline regioon 353-435 vahele. E1₃₅₃₋₆₄₉ säilitas nii ATPaasse kui ka helikaasse funktsiooni, seega C-terminaalne ots on vajalik (White, Pelletier et al. 2001). Eri uurimisgrupid on BPV1 E1 puhul näidanud, et mutatsioonid P-lingus P434 positsioonis kaotab ensümaatilise aktiivsuse (Wilson, West et al. 2002). Kahtlemata ka teised mutatsioonid C-terminaalses konserveerunud regioonis motiivides b ja c (Mansky, Batiza et al. 1997; White, Pelletier et al. 2001) ja regioonides A ja D (White, Pelletier et al. 2001) vähendavad või kaotavad ATPaasse ja helikaasse funktsiooni. Ühesõnaga selge on, et E1 puhul on tegemist ATP sõltuva heksameerse helikaasiga, millel on järjestussarnasused

konserveerunud regioonides teiste heksameersete helikaaside ja tavaliste NTP-d siduvate valkudega ning need aktiivsused asuvad E1 C-terminaalses osas.

ATP-d vajatakse praegusel andmetel E1 töös kolmes erinevas etapis (joonis 5.):

1. E2 eemaldamine E1-E2 kompleksist,
2. E1 oligomeriseerumine kaksikheksameeriks, millega kaasneb ORI lahti sulatamine,
3. helikaases töös.



Joonis 5. E1 oligomeriseerumise etapid. Vasakul on toodud *in vitro* tingimused kompleksi formeerumiseks ja paremal etapid, kus vajatakse selleks ATP-d.

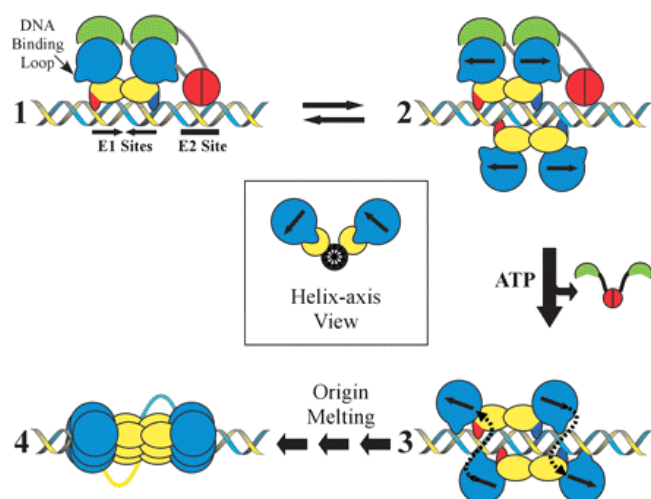
5. E1 ATPaasne-helikaasne funktsioon

E1 on 3'-5' helikaas ja kasutab substraadina nii lineaarset, tsirkulaarset kaheahelalist DNAd kui ka tsirkulaarset üheaahelalist DNAd, milles võib olla kaheahelalisi regioone (Wilson, West et al. 2002). Kui tegemist on täielikult üheaahelalise DNA-ga, avaldub E1 helikaasne aktiivsus ka siis, kui substraadil puuduvad ORI järjestused (Sedman and Stenlund 1998; Fouts, Yu et al. 1999). Kontrastiks, täielikult kaheahelaline DNA, milles on E1 siduv osa BPV1 E1 ORI regioonis, viib võimendatud helikaasele aktiivsusele (Fouts, Yu et al. 1999).

Valk E1 on DNA-st sõltuv ATPaas ja helikaas (Sun, Thorner et al. 1990; Seo, Muller et al. 1993; Yang, Mohr et al. 1993; MacPherson, Thorner et al. 1994) ning on papilloomiviiruste ainus ensümaatiliselt aktiivne valk. PV E1-l ei lähe nendeks aktiivsusteks *E. coli*s

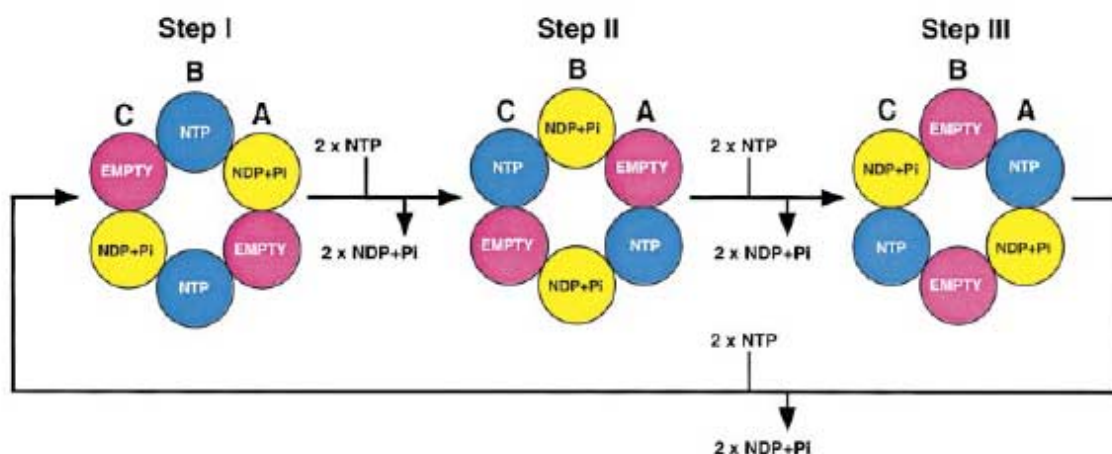
ekspresseerituna post- translatsioonilisi modifikatsioone vaja ning E1 hüdrolüütiline aktiivsus ei ole suunatud rangelt ATP-le, vaid ka teistele NTP-dele ja dNTP-dele, mis on samuti efektiivsed substraadid helikaasile (White, Pelletier et al. 2001). Erinevates uuringutes on tõestatud, et ensümaatilisel aktiivne E1 on alati heksameerses vormis (Sedman and Stenlund 1998; Fouts, Yu et al. 1999; White, Pelletier et al. 2001). Tavaliselt monomeerina leiduv E1 oligomeriseerub ja muutub ensümaatilisel aktiivseks, kui lisada nukleinhapet (Sedman and Stenlund 1998; Fouts, Yu et al. 1999)

Sellele, kuidas ikkagi kaksikheksameer seondub DNA-le ja kuidas avaldub helikaasne aktiivsus, on pakutud mitmeid mudeleid. Tsiteerides Fouts et. al 1999 aasta tööd, on potentsiaalsed mudelid sellised: A) Heksameerid moodustuvad dsDNA-le, nii et dsDNA jääb helikaasi keskel olevasse auku. Edasi ühe variandi puhul liiguvad heksameerid teineteisest lahku, nii et nende vahele jäävad kaks ssDNA ahelat. Teise variandi puhul jäävad helikaasid kokku ning ssDNA ahelad rulluvad heksameeride vahelt välja. Sellise mudeliga seletatakse RuvB ja SV40 LT-ag helikaasset toimet (Parsons and Tegtmeier 1992; Stasiak, Tsaneva et al. 1994). Ka HPV E1 puhul arvatakse helikaasne aktiivsus sel kujul toimuvat (Lin, Makhov et al. 2002). B) Heksameerid moodustuvad ssDNA-le, nii et üks 5`-3`ahelale, teine 3`-5`ahelale. Edasi toimub helikaaside liikumine nagu kirjeldatud variandi A puhul (Fouts, Yu et al. 1999). Uuemad andmed, mis on saadud E1-E2 kompleksi kristallstruktuurist, toetavad hüpoteesi kaksikheksameeri kokkujäämisest (joonis. 6).



Joonis 6. Mudel E1 assambleerumisest DNA-le ning ORI lahti sulamine. E1 DBS on näidatud kollase värviga, helikaasne domeen sinise. E2 DBS on punane ja E2 AD roheline (Abbate, Berger et al. 2004).

Selle kohta, kuidas toimub heksameeri liikuma panemine NTP jõul, on välja pakutud nelja muutuva sidumiskoha mudel (joonis 7.). Sellisele tulemusele jõuti T7 gp4 (faagi T7 heksameerne helikaas-praimaas) uurimisel ssDNA juuresolekul. Heksameeri kuuest oligomeerist neli on võimelised siduma NTP-d, kaks neist teevad seda kõrgema afiinsusega. Erineva NTP afiinsusega oligomeeride järjekord on selline, et oligomeerile on seotud: NTP, NDP+P_i, tühi; NTP, NDP+P_i, tühi. Hüdroolüüs toob kaasa konformatsioonilise muutuse, nii et NDP+P_i dissotsieerub valgult ja tekkinud vaba oligomeer on jälle võimeline siduma endale NTP-d. Seega heksameerne ring ise ei pruugi ringiratast käia, vaid NTP ja NDP+P_i virvendavad ümber heksameeri. See protsess ei pruugi tingimata olla sümmeetriline (Singleton, Sawaya et al. 2000).



Joonis 7. Muutuva NTP sidumise mehhanism heksameersetele helikaasidele (Singleton, Sawaya et al. 2000). A, B, C on oligomeerid, mis ise ei vahetu, vaid neile seotav fosfaat vahetub.

Sellele mudelile ei vasta SV40 LT-ag kristallstruktuur DNA-ta, mis tehti ATP, ADP juuresolekul või puudumisel. Andmetest tuli välja kõik või mitte midagi mudel, sest kõik heksameeri monomeerid sidusid korraga kas ATP, ADP või olid nukleotiidi vabad (Gai, Zhao et al. 2004). Erinevused mudelite vahel võivad tuleneda DNA juuresolekust.

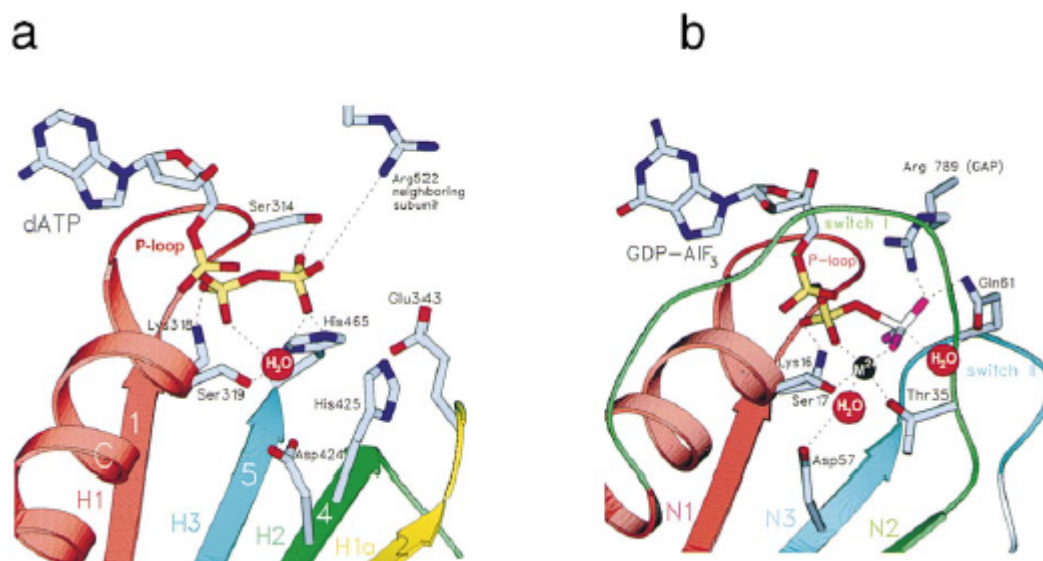
6. Arginiin-sõrme sisaldavad valgud

Arginiin-sõrme (*Arginine-finger*) on kirjeldatud esmalt guaniinnukleotiide siduvatel valkudel (GNBP- *guanine nucleotide binding protein*). Need on molekulaarsed lülitid, mis juhivad aktiivsuse tsükli, mis sõltub sellest, kas neile on seotud GTP (aktiivne vorm) või GDP (inaktiivne). Selleks protsessiks on vajalikud regulaatorid GEF (*guanine exchange factor*) ja GAP (*GTPase activating protein*). GAP-e on avastatud Ras valkudel ja heterotrimeersetel G valkudel. Ras ja G α valkude aktiivsetetes piirkondades on näidatud konserveerunud glutamiini järjestused γ -fosfaadi lähedal. G α valgud omavad lisaks invariantset arginiini. AIF $_4$ juuresolekul on GDP struktuurid planaarses konformatsioonis, nii et Arg ja Glu stabiliseerivad konformatsiooni fosfaadi transpordi ajal. Biokeemilised katsed näitavad, et tõepoolest G α “*cis*” arginiin asendatakse “*trans*” arginiiniks kasutades GAP-e. Ka RasGAP-i ja RhoGAP-i kompleksid neile omaste GNBP-dega AIF $_x$ juuresolekul näitavad, et GAP-id varustavad aktiivtsentreid arginiin-sõrmega. Mõned eukarüootidele toksilised bakteriaalsed Rho valgud kasutavad arginiin-sõrme lülitamiseks välja valgu aktiivsust. Arginiin-sõrmed arvatakse olevat põhjuseks, miks onkogeensed Ras mutandid ei saa hüdrolyüsida GTP-d. Enamasti ongi GTP hüdrolyüsiks vaja katalüütiliselt aktiivset Gln ja Arg ent ATP-d hüdrolyüsivatel müosiinidel ja kinesiinidel ei ole täheldatud Arg osavõttu sellest protsessist. Siiski ei saa välistada, et peamine panus katalüüsis on (arvestamata Mg $^{2+}$) hoopis P-ling lüsiinil, mis on invariantne nii G kui ka ATP mootorvalkudes (Vetter and Wittinghofer 2001).

Hilisemad tööd näitavad, et struktuurseid ja ka funktsionaalseid arginiin-sõrmi leidub NTPaasides, sealhulgas ka oligomeersetes helikaasides. Kristallstruktuurianalüüsid näitavad, et gram-negatiivsete bakterite plasmidi RSF1010 heksameerse helikaasi RepA motiivis H4 on Arg207, mis “*in trans*” võib toetada külgnevat ATPaasset ala ja selle läbi mõjutada ATP hüdrolyüsi. Arg207 asub sobivalt, et täita analoogset arginiin-sõrme ülesannet nagu GTPaase aktiveerivates valkudes. ATP hüdrolyüsi uurides on huvipakkuvaks RepA osaks selle aktiivne piirkond 179-207. Histidiin179 asub γ -fosfaadi grupi lähedal, moodustades RepA- ATP kompleksi, kus see võib käituda sensorina, muutes konformatsiooni järgnevas lingus, sõltuvalt γ -fosfaadi olemasolust sidumiskohas. See ling, mis järgneb H4-le koosneb aminohapete tripletist $^{197}\text{RGS}^{199}$, mis on identne T7 gp4 tripletiga 497-499, mille puhul on teada tänu mutatsiooni uuringutele, et Arg497 ja Gly498 vajatakse DNA sidumisel. See vihjab, et individuaalsete RepA monomeeride seondumine DNA-le võib sõltuda ATP sidumiskohast.

Arg207 toimib arginiin-sõrmena naaber RepA monomeeri katalüütilises saidis. Kuna ainult lühike ling kinnitub Arg207-ga DNA-d siduvale järjestusele ¹⁹⁷RGS¹⁹⁹, DNA sidumine motiiv H4-ga võib muuta Arg207 positsiooni ja konformatsiooni tekitades seeläbi ATPasse aktiivsuse naaber subühikutele heksameeris (Niedenzu, Roleke et al. 2001).

Bakteriofaag T7 gp4 hüdrolüüsib erinevaid nukleotiidsubstraate. Arvatakse, et Arg522 ühendab hüdrolüüsi subühikute rotatsiooniga. Arg522 asub subühiku sees lingus (vt. joonis 8.). Geen 4E fragmendiga kompleksis dATP ja dTTP-ga on Arg522 γ -fosfaadist 4Å kaugusel. Arg522 külghela vähene kohendamine võib kergelt kaasa tuua vesinik sidemete moodustamise nukleotiididega. Selline trans- interaktsioon sarnaneb GAP-ide arginiin-sõrmele. Arg522 on struktuuris ja ensümaatilises aktiivsuses analoogne F1-ATPaasi Arg376. Mutatsioonid Arg376-s kahandasid märkimisväärselt nukleotiidide hüdrolüüsi F1-ATPaasi poolt (Sawaya, Guo et al. 1999). Sealhulgas R376K sidus ATP-d võttes ka õige konformatsiooni, kuid ei hüdrolüüsinud ATP-d. Seega on oluline selles positsioonis just arginiini guaniidium grupp (Nadanaciva, Weber et al. 1999).



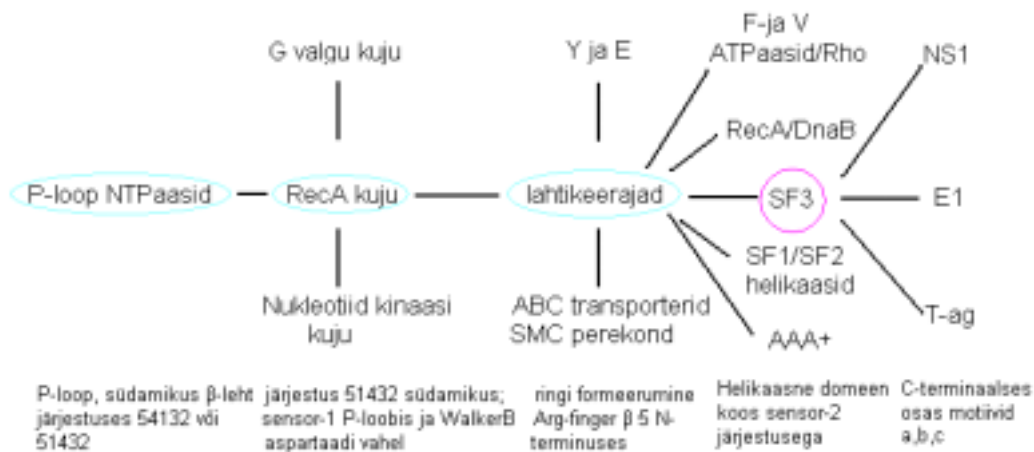
Joonis 8. Sarnasused kahe NTPaasi aktiivtsentrites (Sawaya, Guo et al. 1999).

- ATP seondumine T7 helikaasiga. Konserveerunud helikaasi motiivid kontakteeruvad dATP fosfaadiga. Glu343 (H1A) aktiveerib vee molekuli, mis seob γ - fosfaati . His465 (H3) võib tegutseda γ - fosfaadi sensorina ja läbi viia konformatsioonilisi muutusi nukleotiidi siduvas saidis. Naaber monomeeri Arg 522 on piisavalt lähedal dATP γ - fosfaadile nagu arginiin-sõrm Ras GTPaasi aktiveerivas valgus Vt. (b)
- p21Ras kompleks p120GAP ja GDP- AIF₃-ga. Gln61 lüliti II lingus aktiveerib vee molekuli nukleotiidi hüdrolüüsiks ja γ - fosfaadi ära tundmiseks. Arg789 p120GAP valgust ulatab arginiin-sõrme aktiivsele p21Ras saidile, tõstes GTP hüdrolüüsi intensiivsust. Arg522 T7-l võib sama ülesanne olla.

Ka homoloogilise rekombinatsiooni valg RuvB-s on arginiin-sõrm (Arg174 *Thermotoga maritima* valgus). Kui see arginiin vahetadaalaniini vastu, kaotab valg ATPaasse aktiivsuse, kuigi kristallstruktuuranalüüs näitas, et sellega ei kaasnenud märkimisväärset konformatsioonilist muutust. Seega on oluline just arginiini guaniidium grupp (Putnam, Clancy et al. 2001). Funktsionaalset on RuvB arginiin-sõrm positsioonis 174 samuti tõestatud. Näidati, et see positsioon stimuleerib allosteeriliselt ATPaasi naabersubühikul. RuvB R174A on dominant negatiivne DNA paranduste suhtes *in vivo* ja takistab metsik tüübi poolt katalüüsitud DNA tükide ümberpaiknemist. Samasugust efekti täheldati ka P-ling mutandi K68A puhul. Topeltnutant mõjus suurema efektiga kui üksikmutandid. Ootamatu oli aga tulemus, mis saadi ATPaasi katses. Olgugi et nii K68A kui R174A olid täiesti inaktiivsed ATPaasis, neid võrdes hulgas reaktsiooni kokku pannes, ATPaas taastus teataval määral. See näitab, et mõlemal mutandil on täpne funktsionaalne defekt ja ATPaasse aktiivsuse taastumine on põhjustatud heteroheksameeris tekkivatest komplementaarsetest interaktsioonidest mutantsete subühikute vahel (Hishida, Han et al. 2004).

AAA (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) valgud on perekond P-ling ATPaase. Need on paljuski sarnased RecA-like, DnaB ja SF3 valguperekondadele, näiteks moodustavad ka AAA valgud heksameerseid ringe. Nukleotiidi siduvad subdomeenid on paigutatud kiilukujuliselt, sidumistsenter on subühikute vahel, nii et $\beta 5$ N-terminaalne regioon ühelt subühikult sihib seotud nukleotiidi poole eelnevalt subühikult. Iga subühik ulatab oma arginiini järjestuse eelnevale aktiivtsentrile. Seda peetakse arginiin-sõrmeks ja see on tähtis ka AAA valkudes ATP hüdrolüüsi toimumiseks (Ahmadian, Stege et al. 1997).

Analoogne arginiin-sõrme motiiv on dokumenteeritud ka teistel AAA⁺ valkudel, kus neil arvatakse olevat roll konformatsiooniliste muutuste vahendajana (Neuwald, Aravind et al. 1999). Võib ilmneda, et spetsiifilise arginiini järjestuse osavõtt ATP hüdrolüüsi vahendamisel ja pürofosfaadi vabanemine spetsiifilisse domeeni sisesesse konformatsioonilisse muutusesse on protsess, mis on levinud kõikide oligomeersetes helikaaside seas ja sarnastab neid AAA⁺ valkudele (Caruthers and McKay 2002). Vt. joonis 9. lk 21.



Joonis 9. Fülogeneetiline klassifikatsioon P-ling NTPaasidele (Lupas and Martin 2002) järgi. Tunnused, mille alusel jaotus toimub on toodud iga jaotuse all.

MCM (*Minichromosome maintenance proteins*) kuuluvad ka AAA+ perekonda. Need valgud töötavad tõenäoliselt keerlevate pumpadena prereplikatiivsel kompleksis, mis assambleerib replikatsiooni alguspunkti. Kuus valku (Mcm2-7p) moodustavad heteroheksameeri, mis töötab eukarüootides replikatiivse helikaasina. Mutatsioon P- lingus ükskõik millises kuuest subühiku valgust inaktiveeris Mcm2-7p. Leiti, et üksik MCM ei oma märkimisväärset ATPaas aktiivsust, kuigi neil olid ATP-d siduvad tsentrid. ATPaasne aktiivsus nõuab kombinatsiooni vähemalt kahe MCM vahel näidates, et ATPaasse aktiivsuse jaoks on vajalikud järjestused mõlemalt subühikult, ehk siis katalüütiline arginiin ühelt ja ATPaasne piirkond teiselt. Seda piirkonda nimetatakse nendes valkudes SRF-iks ja on oma olemuselt arginiin-sõrm (joonis 10). Veel leiti, et ainult kolm erinevat varianti, kuidas kaks protomeeri paarduda võivad, omas ATPaasset toimet. Sügavam uuring ühe sellise kombinatsiooniga Mcm3/7p näitas, et Mcm3p ulatas arginiini järjestuse ATP hüdrolyüsiks Mcm7p-le (Davey, Indiani et al. 2003).



Joonis 10. MCM- i heteroheksameer (Davey, Indiani et al. 2003). Näidatud on arginiin-sõrme (SRF) ulatamine järgneva subühiku P-lingule.

Arginiin-sõrm on struktuuraalselt näidatud paljudes eri valguperekondades, funktsionaalselt on neid jõutud vähem tõestada. Selge on see, et arginiin-sõrm on laialt levinud ning omane NTPaassetele valkudele. Selle struktuuri ülesandeks on ATP hüdroolüüs ning arvatavasti ka sellega kaasneva konformatsiooni muutuse edasiandmine.

7. E1 kui potentsiaalne arginiin-sõrm helikaas

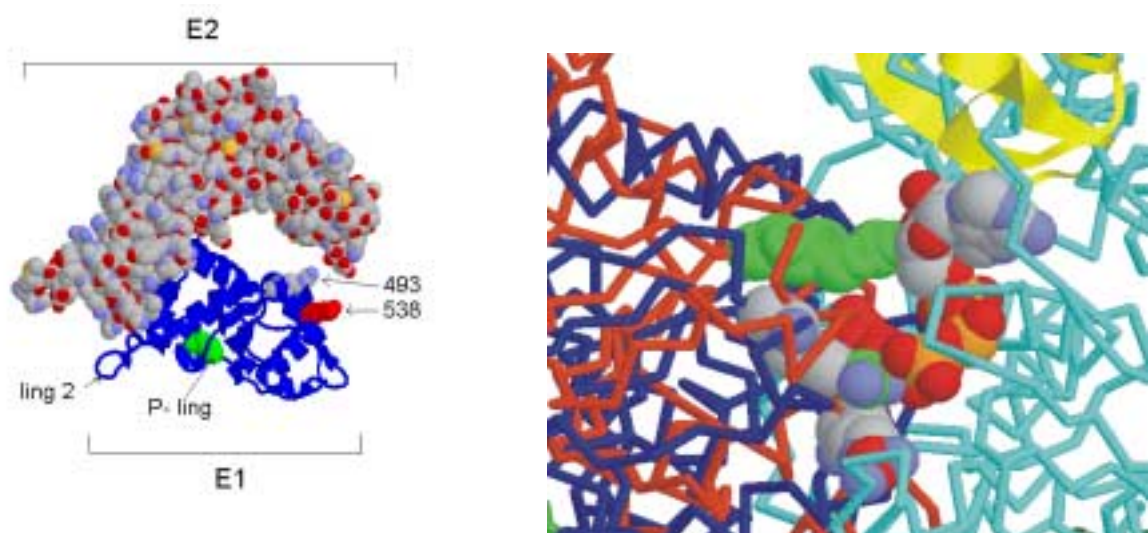
E1-e aminohappelisel järjestusel on leitud viis konserveerunud arginiini. Üks neist NLS-is (Arg85), kaks tükki DNA-ga seonduvas domeenis (Arg180 ja 243) ning kaks helikaases domeenis (493 ja 538). Masterson et.al on näidanud, et positsioonis 493 on Arg konserveerunud LT-antigeenidel, positsioonis 538 lisaks NS1 valkudel (Masterson 1998). Kui alustasime oma tööd selgitamaks arginiin-sõrme olemasolu E1-s, olid helikaasse domeeni arginiinid meile potentsiaalsed arginiin-sõrmed. See oletus pidas paika, kuna järgnevat kristallstruktuuri töödes HPV18 E1-E2 kompleksi ja SV40 LT-ag kohta on neid mõlemaid arginiine esitletud arginiin-sõrmedena.

Esimene SF3 superperekonna heksameerse helikaas, mille kristallstruktuur avaldati, on SV40 LT-ag. Kristalliseerumine toimus ilma ATP-ta. Saadi kahest LT-ag monomeerist formeerunud asümmeetriline ühik *P321*. Selle struktuuri järgi pakuti arginiin-sõrmeks positsiooni 498 (BPV1 E1 puhul 493), sest see ulatus naabermolekuli P-lingu poole (Li, Zhao et al. 2003). Funktsionaalsete katsetega seda ei kinnitatud. Loo teeb keerulisemaks see, et potentsiaalsed arginiinid (BPV1 493 ja 538) asuvad praktiliselt kohakuti (joonis 11. lk 23.) Segadust arginiin-sõrme osas ei vähendanud ka SV40 LT-ag kaksikheksameer ORI-le seonduvana krüoelektronmikroskoobiga vaadelduna (Gomez-Lorenzo, Valle et al. 2003).

Hiljem avaldati SV40 LT-age struktuur kompleksis kas ATP või ADP-ga ja nukleotiidi vabana. Selgus, et sellest, mis on seotud aktiivtsentrisse, oleneb nende arginiinide paigutus, kusjuures ADP-ga tekkis kaks erinevat struktuuri. Kui kompleksis on ATP, paistab positsioon 540 (BPV1 538) arginiin-sõrmena, kui ADP, siis ühel juhul 498 (BPV1 493), teisel juhul 540. Lisaks näidati struktuuril lüsiin-sõrme K418, mis kontakteerub ATP γ - β hapnikuga (Gai, Zhao et al. 2004).

Aastal 2004 avaldati HPV18 E2-E1 kompleksi kristallstruktuur (joonis 11.). See kinnitas paljusid hüpoteese E1-E2 interaktsioonide kohta. Näiteks et E2 reguleerib steeriliselt E1

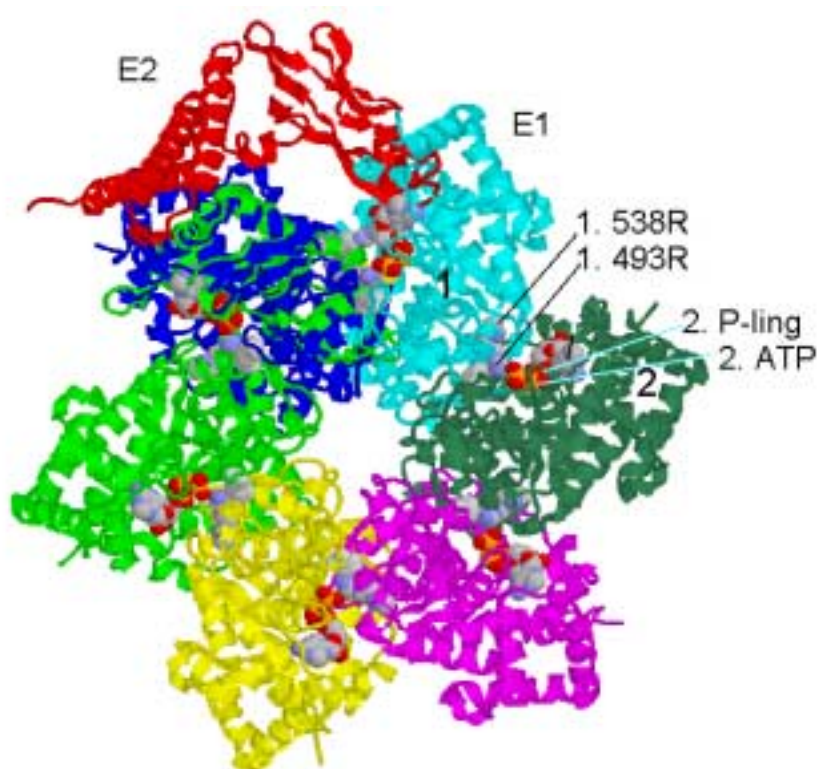
assambleerumist, blokeerides peamised E1 oligomeriseerumise pinnad. Seega pole E2 lihtsalt E1 kohaletooja vaid pigem sobivuse tekitaja E1 ja DNA vahel. Samuti näidati, et selles protsessis on ATP allosteeriline efektor. E1 topoloogia vastab SF3 superperekonnale. E1 struktuuri kõrvutati SV40 LT-ag omaga ning leiti palju kattumisi ent arginiin-sõrmeks pakuti hoopis 589 (BPV 1 538, T-ag 540) positsiooni arginiini, sest see külgnas naabermonomeeri ATP sidumiskohaga. Kuigi kui modelleerida E1-te ATP-LT kompleksi, jääb fosfaadile ruumiliselt lähemale E1 aminohape, mis vastab BPV1 493-le (joonis 11. B). HPV18 E1 589 positsiooni tähtsust tõestati ka funktsionaalselt, kasutades ATPaasi katses selle positsioonialaniini mutanti. ATPaasne aktiivsus selle mutatsiooni tagajärjel kadus ent ei omanud mõju valgu oligomeriseerumisele ega interaktsioonile E2-ga. See oli ka tõestuseks, et mutantne valk oli korralikult pakkunud (Abbate, Berger et al. 2004).



Joonis 11. (A) HPV 18 E1-E2 kompleksi kristallstruktuur. Näidatud on potentsiaalsed arginiin-sõrmed (BPV1 numeratsiooni järgi) P- ling ja ling 2. (B) LT-ATP heksameersesse kompleksi modelleeritud HPV18 E1 struktuur. LT peptiidahel on sinine ja E1-l punane. BPV1 E1 Arg538 vastav aa on roheline ning Arg493 vastav punane. LT aktiivtsentri arginiinid on värvitud CPK koodi järgi, välja arvatud arginiini z süsinik, mis on Arg498 puhul punane ning Arg540 roheline.

Seda, et arginiinide paiknemine P-lingu suunas sõltub nukleotiidi fosfaadi seotusest sinna, näitavad ka F1-ATPaasi ja Rep40 kristallstruktuurid (James, Escalante et al. 2003; Ahmad and Senior 2004). On ilmne, et kui oleks avaldatud mõni heksameerse helikaasi kristallstruktuur koos dsDNA või ssDNA-ga võib oletatavate arginiin-sõrmede paigutus jällegi erineda praegustest andmetest.

Avaldatud kristallstruktuurandmete põhjal võiks BPV1 E1 heksameeri struktuur olla, nagu kujutatud joonisel 12. Selle valmimisel on kasutatud nii HPV18 E1-E2 kompleksi kui ka SV40 LT-age kristallstruktuuri.



Joonis 12. BPV1 E1 võimalik kristallstruktuur E2 ja ATP juuresolekul. Näidatud on, kuidas E1 monomeerilt nr. 1 ulatuvad arginiinid positsioonides 493 ja 538 nr. 2 monomeeri P-lingu, kuhu on seotud ATP (oranž).

Kuna kristallstruktuurid ja seni avaldatud funktsionaalsed katsed ei ole tõestanud, milline helikaaside arginiinidest on just arginiin-sõrm või on need seda mõlemad, innustas see jätkama funktsionaalseid katseid selle küsimuse lahendamiseks. Kui alustasin E1 arginiin-sõrme otsinguid aastaid tagasi, ei olnud selle kristallstruktuurist veel midagi teada. Nüüdsed andmed näitavad, et muteerides just neid positsioone ning uurides mutantide käitumist, oleme oma otsingutes õigel teel. BPV1 E1 on hea objekt selleks, kuna selle ATP-d vajavad oligomeriseerumise etapid on hästi kirjeldatud vastandina LT-agle.

Eksperimentaalne osa

Töö eesmärk

Käesolev töö on järg autori keskastme ja bakalaureuse töödele. Põhiküsimus läbi nende tööde on jäänud samaks: kas E1 helikaas on arginiin-sõrm NTPaas ning milline aktiivtsentris asuvatest arginiinidest väärub seda nime? Nimelt kirjanduse andmed lubavad oletada, et BPV1 helikaas E1 sisaldab arginiin-sõrme. Definiitsiooni kohaselt see struktuurne-funktsionaalne üksus on vajalik ATP hüdrolyüsiks ning konformatsiooni muutuse edasi andmiseks helikaasi töös. Samuti on kirjanduse andmetel teada, et arginiin-sõrme ja P-lingu vahel, kuhu ATP seotakse, toimub koostöö. Seni ei ole BPV1 E1 puhul arginiin-sõrme ega koostööd selle ja P-lingu vahel tõestatud. Vastust küsimusele arginiin-sõrme võimalikkusest E1 helikaasis alustati asendusmutatsioonide tegemisega potentsiaalsetesse arginiin-sõrm positsioonidesse 493 ja 538 E1 ekspresseerivas vektoris pCGEag. Arginiin asendati neisalaniini, glutamiini ja lüsiini vastu (H. Fausti keskastmetöö). Seega uuritavad mutandid on R493A, R493Q, R493K, R538A, R538Q ja R538K. Tõestatud sai mutantide replikatsiooni defektsus vaatamata nende valkude lokaliseerimisele tuuma ja lülitumisele heksameeri. Samuti puhastati väikeses mahus GST E1 valgud ja tehti nendega ATPaasi katse, mis näitas mutantide ATPaasi funktsiooni kadumist (H. Fausti bakalaureusetöö). Paraku need katsed ei näidanud erinevusi 439 ja 538 positsiooni mutantide käitumises. Neist tulemustest tekkisid uued küsimused, kuna teadaolevalt kasutatakse ATP-d E1 DNA-le oligomeriseerumise puhul kahes erinevas etapis, lisaks veel helikaasina.

Käesoleva magistr töö põhiküsimus on järgmine: millises helikaasi formeerumise või töö etapis on mutantsetel E1 valkudel rikitud ATP kasutamine ning kas on erinevusi 493 ja 538 positsiooni arginiini mutantide käitumises? Vaatluse alla võetakse eri pikkusega BPV1 ORI-de replikatsioon, kuna on teada E2 BS11 ja E2 BS12 erinev roll E1-DNA kompleksi formeerumisel. Samuti kontrollitakse replikatsiooni taastumise võimalust erinevate mutantsete E1 valkude olemasolu korral katses, et jõuda jälile võimalikele komplementatsiooni mehhanismidele. Edasi minnakse *in vitro* katsetega selgitamiseks ATP kasutamist E1 oligomeriseerumisel nende mutantide poolt. Esmalt proovitakse EMSA katseid rakulüsaatidega, seejärel GST E1 valkudega. Samuti uuritakse E1 valkude võimet hüdrolyüsida ATP-d ning võimalikku komplementatsiooni mehhanismi P-ling ja arginiin-sõrm mutandi vahel selles protsessis.

Materjal ja metoodika

Bakteritüved ja söötmed

Kasutati *Escherichia coli* tüvesid DH5 α (*supE44 ΔlacU169 (ϕ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*). Plasmide kasvatati 37°C juures LB söötmes (10 g/l trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 10 g/l NaCl), kuhu oli lisatud ampitsilliini lõppkontsentratsioonini 100 µg/ml. Valgu ekspressiooniks kasutati BL21(DE3) RP [F^- ompT r_B^- m_B^- dcm $^+$ Tetr gal endA Hte (argU proL Camr)] ja kasvatati LB söötmes, kuhu oli lisatud MgCl $_2$ 20 mM ja ampitsilliini lõppkontsentratsioonini 100 µg/ml.

Rakuliinid ja söötmed

Mutatsioone sisaldavate pCGEag plasmiidide kontrollimiseks replikatsiooni analüüsis kasutati CHO (*Chinese Hamster Ovary*) rakuliini, mida kasvatati F12 söötmes, millele oli lisatud 10% veise loote seerumit (Sebac) ning penitsilliini 100 U/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml. Rakulüsaadi valmistamiseks kasutati COS-7 rakuliini. See rakuliin pärineb Aafrika rohepärdiku neeru koest ning selles toodetakse SV40 *large* T- antigeeni, mis võimaldab SV40 ori sisaldava pCGEag replikatsiooni. Rakke kasvatati IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's medium*, GibcoBRL, Cat. No 42200-030) söötmes, millele oli lisatud 10% veise loote seerumit (Sebac) ning penitsilliini 100 U/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml. Katsetes kasutatud rakke inkubeeriti 37°C ja 5% CO $_2$ sisalduse juures.

Algplasmiidid

Algplasmiidideks olid pCGEag (Ustav and Stenlund 1991). Plasmiid pCGEag on 6969 aluspaari (ap) pikk, sisaldab E1 kodeerivat järjestust CMV promootori kontrolli all. Autori keskastme lõputöös tehti pCGEag vektorisse asendusmutatsioonid positsioonides R493A, R493Q, R493K, R538A, R538Q, R538K. Mutantsed pCGEag vektorid on kirjeldatud H. Fausti keskastme lõputöös (Faust 2002).

Plasmiid pCGE2 on kirjeldatud (Ustav and Stenlund 1991) artiklis. Ekspressioonivektoris pCG on lisatud E2 avatud lugemisraami fragment nt. 2600 kuni nt. 4450. Positsioonis 3092 (BPV1 genoomi järgi) on tehtud punktmutatsioon, mis muudab E2C initsatsiooni koodonit ning selle tulemusena ekspresseeritakse vektorilt pCGE2 ainult täispikka E2-te. Plasmidi pUCAlu on pUC19 konstrukt, kuhu polülinkerisse on lisatud BPV1 fragment nt. 7891-55, mis on minimaalne BPV1 ORI, millel valkude E2 ja E1 sidumiskohad (Ustav, Ustav et al. 1991).

pUC Δ 11 ja pUC Δ 12 on eemaldatud E2 sidumiskohad 11 (nt. 7891-7895) või 12 (nt. 51-55) vastavalt plasmiidile A. Abroi ja I. Ilvese poolt (vt. joonis 3. lk 10.).

Valgu puhastamiseks vajati pET11c-GST-E1, mis on BPV-1 E1 valgu ekspresioonivektor (Melendy *et al.*, 1995). Sellesse kloneeriti mutatsiooni sisaldavad E1 kodeerivad järjestused, mis on kirjeldatud H. Fausti bakalaureusetöös (Faust 2003).

Plasmiidse DNA eraldamine aluselise lüüsiiga (midipreparatsioon)

Plasmiidide eraldamiseks kasutati *Eppendorf Perfectprep Plasmid Midi Kit*'i ning saadud DNA-le tehti fenooltöötlus.

DNA puhastamine agarosgeelist

DNA puhastamiseks agarosgeelist kasutati *Ultra Clean DNA Purification Kit*'i (MO BIO) vastavalt tootja poolt soovitatud protokollile.

Transfektsioon koekultuuri rakkudesse

100 millimeetrise diameetriga tassilt koguti vajalik koguse rakkudega söödet 50 ml koekultuuri tuubi. Rakud tsentrifugiti (1000 rpm 5 min. 20°C-l *Jouan CR 422*), aspireeriti sööde ja resuspendeeriti söötmes, mis sisaldas 5mM Na-BES puhvrit (pH 7.5). Küvetis segati 250 μ l rakususpensiooni 50 μ g kandja DNA (lõhe või heeringa spermi DNA – *carrier*) ja vastavalt katse iseloomule valke E1, E2 kodeerivaid ja BPV1 ORI sisaldavaid plasmide. Elektroporeeriti kasutades BioRad Gene Pulser II. Kasutatud pinge oli 230 V CHO rakkude puhul ja 180 V COS-7 puhul, mahtuvus 975 μ F. Peale elektroporatsiooni pipeteeriti rakud küvetist 15 ml koekultuuri tuubi, kuhu oli eelnevalt lisatud 2 ml seerumiga söödet. Rakud koguti tsentrifugides (1000 rpm 5 min. 20°C-l *Jouan CR 422*) ja resuspendeeriti 1 ml söötmes. Rakud pipeteeriti 60 millimeetrise diameetriga koekultuuri tassile, kuhu oli eelnevalt lisatud 4 ml söödet. Transientse replikatsiooni analüüsi jaoks jagati rakud võrdselt neljale 60 millimeetrise diameetriga tassile (kolme ajapunkti ja *Western blot* analüüsi jaoks).

Denatureeritud BPV-1 E1 valkude detekteerimine *Western blot* meetodil

Proovidele lisati võrdne kogus Laemmli puhvrit (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% broomfenool sinine, 10% glütserool). Lüsaati kuumutati 96°C 5 minutit, millest foreesile kanti 20 μ l lüsaati. Valgud lahutati 10% SDS-polüakrüülamiid geelis ning kanti üle PVDF filtrile (*Millipore ImmobilonTM -P 0.45 μ m*). Ülekanne toimus pingel 15 V 60 min

jooksul poolkuiva ülekande aparaadiga (*Bio-Rad Instruments*) SDS puhvris (39 mM glütsiin, 48 mM Tris, 0.037% SDS, 20% etanool). Vähendamaks mittespetsiifilisi signaale blokeeriti filter 1 tunni jooksul toatemperatuuril 4% lõssipulbri lahuses 1xPBS/Tweenis (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween20). Järgnevalt inkubeeriti filtrit monoklonaalse E1 antikehadega (A. Stenlundi laborist pärit) BPV1 E1 valgu detekteerimiseks. Inkubatsioon toimus 1 tunni jooksul 2% lõssipulbri lahuses 1xPBS/Tweenis; antikeha lahjendusega 1:3500. Seejärel pesti filtrit 4x15 minutit pesulahuses (50mM TrisHCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween20). Sekundaarse antikehana kasutati peroksüdaasiga konjugeeritud hiire IgG vastast antikeha (*LabAS Ltd.*, Tartu, Estonia, lahjendusega 1:7 500), millega inkubeeriti filtrit 2% lõssipulbri lahuses 1xPBS/Tweenis ühe tunni jooksul. Seejärel pesti filtrit 4x15 min pesulahusega ning signaal detekteeriti kasutades *ECLTM Western Blotting Detection Kit*'i reagente (*Amersham Pharmacia Biotech*).

Transientse replikatsiooni analüüs

Transfekteeritud rakkudest eraldati 24, 48 ja 72 tundi pärast transfektsiooni episomaalne DNA. Selleks kasutati aluselise lüüsi meetodit. Rakkudelt eemaldati sööde ja pesti kolm korda PBSiga. PBSi jäägid eemaldati ning lisati 0.4 ml lahuse I (50 mM glükoos, 25 mM Tris-Cl- pH 8.0, 10 mM EDTA- pH 8.0) ja lahuse II (0.2 N NaOH, 1% SDS) segu (suhe 1:2) tassi kohta. Rakud lüüsi tase kallutades ja hoiti 10 minutit jääl. Seejärel lisati igale tassile 0.2 ml jahutatud lahust III (5 M kaaliumatsetaat, 3M jää-äädikas), kallutati ja hoiti 10 minutit jääl. Lüsaaat koguti mikrotsentrifuugi tuubidesse ning fuugiti 10 minutit maksimaal kiirusel (*Eppendorf 5415C*) 4°C juures. Supernatant pipeteeriti uude mikrotsentrifuugi tuubi ja DNA sadestati 0.6 ruumala isopropanooliga. Selles staadiumis proove säilitati -20°C juures. Tsentrifugeeritud ja kuivatatud sade suspendeeriti 0.2 ml proteinaas K puhvris (20 mM Tris- HCl pH 8.0, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 0.2% SDS), kuhu oli lisatud 0.1mg/ml proteinaas K ja inkubeeriti 1 tund 65°C. Seejärel proovid ekstraheeriti fenool/kloroform seguga (suhe 1:1) ning sadestati 2.5 ruumala etanooliga. DNA sade pesti 70% etanooliga, kuivatati ja suspendeeriti 20 µl TEs, mis sisaldas 20 µg/ml RNAasi ja inkubeeriti 65°C 20 minutit.

Igast proovist 10 µl restrikteeriti 5U *DpnI* ja *BamH I* pUCAlu puhul või *CaiI* pUCΔ11 ja pUCΔ12 puhul. Restriksioon kestis 12-16 tundi temperatuuril 37°C. DNA lahutati elektroforeetilisel (~3V/cm) 1% agarosgeelis TAE puhvris ning seejärel denatureeriti loksutades SOL A (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) lahuses 45 minutit ja SOL B (1M TrisCl 1.5M

NaCl) lahuses 30 minutit. DNA kanti filtrile kasutades kapillaarset ülekannet. Proov valmistati kasutades kommertsiaalselt kiti (*Fermentas Decalable*) ja $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (*Du Pont NEN*) ning matriitsina lineariseeritud pUCAlu 100 ng. Hübridisatsioon kestis 12- 20 tundi 65°C juures ning seejärel filtrit pesti 45 minutit 2 x SSC / 0.5% SDS, 15 minutit 0.2x SSC / 0.05% SDS ja 10 minutit 0.1 x SSC/ 0.025% SDS. Filter kuivatati ja seejärel hübridiseerunud DNA detekteeriti eksponeerides filtrit röntgenfilmile või kasutades *Phosphoimager SI-d*.

Valgu GST-E1 puhastamine

4 x 500 ml BL21(DE3) RP rakke indutseeriti IPTG lisamisega lõppkontsentratsioonini 0.4 mM tihedusel $\text{OD}_{600} = 0.6-1$ 10-12 tundi 20°C. Peale indutseerimist koguti rakud tsentrifuugimisega 4°C juures GS-3 rootoriga 6,000 rpm. Rakke pesti üks kord jääkülma 1x PBS. Seejärel suspendeeriti rakud 15 ml 4°C puhvril A: 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1M NaCl, 20% sahharoos, 5mM DTT, 0.5mM PMSF. Rakkude suspensioon külmutati vedelas lämmastikus (vähemalt 30 minutit) ning sulatati jää ja vee segul. Lisati 15 ml puhvrit B: 50mM Tris-HCl pH 7.9, 0.2M NaCl, 10% glütserool, 5mM DTT, 0.5mM PMSF. Sonikeeriti 5 x 10 sek väljund 70 juures (*Ultrasonic Homogenizer 4710*). Peale sonikeerimist lisati NP-40 (Igepal) lõppkontsentratsioonini 0.1%. Seejärel tsentrifuugiti rootoriga SS-34 16,000 rpm-i 10 min 4°C juures. Supernatant tõsteti teise tuubi ning lisati täiendav kogus proteaasi inhibiitoreid, NaCl viidi kontsentratsioonini 1M ning polüetüleenimiini 0.6 %-ni ja segati *end-over-end* segajal 20minutit 4°C juures. Järgnevalt tsentrifuugiti SS-34 rootoriga 16,000 rpm-i 10 minutit 4°C juures. Seejärel valgud sadestati $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ga, mida võeti 0.4 g iga valgu lahuse ml kohta, sool lahustati vedelikus ning saadu lahust tsentrifuugiti 4°C juures, 30 minutit 20,000 g. Saadud valgu sade lahustati puhvril B, mis sisaldas 0.4M NaCl ja 0.5 % NP-40 (Igepal) . Järgnevalt inkubeeriti valgulahust 1 ml glutatioon-sefaroos-kandjatega 1 tund 4°C juures *end-over-end* segajal.

Glutatioon-sefaroos-kandjaid pesti *in batch* neli korda 15x ruumala puhver B-ga ja kaks korda 15x ruumala 1 M NaCl sisaldusega puhvriga B. Glutatioon-sefaroos-kandjad tsentrifuugiti 4°C juures iga pesu järel 500 rpm 2 min Jouan CR 422 tsentrifuugiga, pesuvedelik eemaldati vaakumpumbaga. Peale pesu kanti glutatioon-sefaroos-kandjad kolonnile (*Qiagen Disposable Column* 1 ml). Mittespetsiifiliselt seondunud valgud pesti maha 1 kord 5-kordse ruumalaga 1 M NaCl sisaldusega puhvriga B, seejärel 2 korda 5-kordse ruumalaga 0.2 M NaCl sisaldusega

puhvriga B. GST-E1 valk elueeriti puhvriga B, mis sisaldas 20mM redutseeritud glutatiooni, 500 µl fraktsioonide kaupa ning säilitati -70 °C.

Bradfordi test

Valgu kontsentratsiooni mõõtmiseks lahuses võeti 100 µl 1x Bradfordi lahust (0,01% w/v Coomassie brilliant blue G-250, 5% v/v etanool, 4,25% v/v fosorhape) lisati 10 µl uuritavat valgulahust ja võrreldi BSA standardiga. Optiline tihedus mõõdeti ELISA loenduriga (Titertek MCC/ 340).

Valgu värvimine SDS-akrüülamiid geelis

Peale elektroforeesi lõppemist keedeti geeli korraks Coomassie blue lahuses (50% v/v etanooli, 10% äädikhapet, 0,025% w/v Coomassie brilliant blue R-250) või lasti loksuda üleöö ja pesti 3 korda destainiga (7% v/v äädikhapet, 25% v/v metanooli), kuni taust oli mutunud värvituks. Säilitati vees.

Lüsaadi valmistamine

COS-7 rakkudesse transfekteeriti valgu ekspressioonivektorid pCGEag 500 ng ja kontroll prooviks lihtsalt *carrier* DNA-d. Rakud koguti 100-mm diameetriteliselt tassidelt kummimiilitsaga, pesti ja lüüsi 100 µl puhvis [50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 0.9% NP-40 (Igepal), 10% glütserool, 1mM EDTA, 10mM DTT, proteaasi inhibiitorid PMSF, leupeptiin ja aprotiniin 0.5 mM] jää 15 min. Seejärel tsentrifugeeriti raku membraanid tuubi põhja maksimum kiirusel (*Eppendorf* 5415C), ekstrakt villiti 10 µl kaupa ja säilitati -70 °C .

Radioaktiivse proovi valmistamine

Esmalt amplifitseeriti BPV1 ORI sisaldavad vektorid pUCAlu, pUCΔ11 ja pUCΔ12 praimeritega pUCRev ja pUCFw. Saadud produktid eraldati elektroforeetiliselt ja puhastati agarosgeelist. Neid kasutati märklaudadena PCRis radioaktiivselt märgitud oligoga, milleks oli pUCFw. Oligo kineeriti järgnevalt: võeti 10 pmol praimerit, 1U T4 polünukleotiidi kinaasi, 15 µl [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (6000 ci/mmol). Reaktsioon toimus 1x kinaasi puhvis A (*Fermentas*) 37°C 1.5h. Reaktsioon peatati 2 µl 0.5 M EDTA lisamisega ning kinaas inaktiveeriti 75°C 20 min. Seejärel sadestati oligo 10 µg glükogeeni, 6 µl küllastatud ammooniumatsetaadi ja 100 µl etanooliga. Peale proovide amplifitseerimist radioaktiivse praimeriga need eraldati elektroforeetiliselt ning puhastati agarosgeelist kasutades *Ultra Clean DNA Purification Kit*'i (MO BIO).

EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*)

Standardne reaktsioonisegu, kuhu segati kokku vastavalt katse iseloomule valke E1, E2 või COS-7 lüsaate, sisaldas radioaktiivset proovi 0.5 ng ehk 4 femtomooli proovi kohta ja puhvrit (20 mM KPO₄ pH 7.6, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.7 mg BSA ml segu kohta, 2.5 mM DTT, 10% glütserooli, ebaspetsiiflilsuse vähendajana 20 ng pUC18 plasmidi reaktsiooni kohta). Kui katse iseloom nõudis ATP ja MgCl₂, lisati neid lõppkontsentratsioonini 5 mM reaktsiooni kohta. Reaktsioon segati kokku jääs, seejärel inkubeeriti 20 minutit ruumitemperatuuril. Tekkinud valk-DNA kompleksid fikseeriti 15 minutit ruumitemperatuuril lisades glutaaraldehüüdi lõppkontsentratsioonini 0.02%. Selle reaktsiooni lõpetas geelile kandmise värvi lisamine. Kui katse nõudis, lisati selles etapis ka 500ng etiidiumbromiidi. Proovid kanti 1% TAE agarosgeelile. Peale elektroforeesi geel fikseeriti 20 minutit 25% etanooli ja 7% äädika vesilahuses, kuivatati ning visualiseeriti autoradiograafiliselt.

ATPaasse aktiivsuse mõõtmine

ATPaasset aktiivsust mõõdeti söelahuse meetodil. 10 µl standardset reaktsioonisegu sisaldas 1 µl 10x puhvrit (250 mM Tris-HCl pH 7,5, 70 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 500ng BSA-d, 1 µl 1mM ATP-d, 10000-100000 cpm [³²P]ATP-d ja 150 ng üheaahelalist tsirkulaarset DNA-d (bakteriofaag M13mp18). Reaktsiooni segu eelsoojendati paar minutit 37°C termostaadil ja lisati ensüümi 1.2 µl ajapunkti kohta. Inkubeeriti 37°C termostaadil soovitud aja (10, 30, 60, 90 minutit). Reaktsioon peatati 150 µl söelahuse (2 mM KH₂PO₄, 0,035% v/v HCl, 0,8% w/v aktiveeritud süsi) lisamisega. Segati 10 sekundit vorteksil, tsentrifuugiti 1 minut 13000 rpm, võeti 100 µl supernatanti, lisati uuesti 150 µl supernatanti, segati 10 sekundit vorteksil, tsentrifuugiti 1 minut 13000 rpm, võeti 150 µl supernatanti ja mõõdeti radioaktiivsus loenduris (101414 Winspectra). Võrdluseks loendati radioaktiivsus 3.75 µl algse reaktsioonisegus, sest see on mahuliselt võrdne kogusega, mis peale reaktsiooni peatamist söelahusega algsest segust radioaktiivsuse mõõtmiseks võeti.

Tulemused

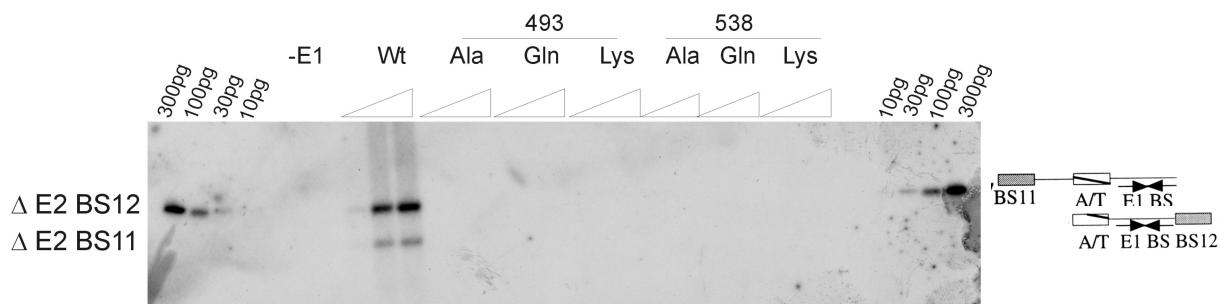
E1 mutantide replikatsiooni defektsus lühendatud ORI-del

Autori varasemad tulemused näitasid, et arginiini asendusmutandid ei toeta replikatsiooni *in vivo*. Need katsed olid tehtud BPV1 täispikka ORI sisaldava pUCAlu plasmiidiga, mille replikatsioon toimus, kui rakkudesse oli transfekteeritud E2 ekspresseerivat plasmidi pCGE2 ja wt E1 ekspresseerivat plasmidi pCGEag.

Käesolevas transientse replikatsiooni katses kasutati pUCAlu lühendatud variante pUC Δ 11 ja pUC Δ 12, millel siis vastavalt puudub kas E2 sidumiskoht 11 või 12. Seda katset tehti, kuna A. Stenlundi grupi tööde põhjal on teada, et neid sidumiskohti kasutatakse E1 oligomeriseerumise erinevates etappides. Nimelt on teada, et BS12 on vajalik esmaseks E1-E2 kompleksi sidumiseks ORI-le. Kui mutantide replikatsiooni defektsus tuleneks ühest E2 BS-st, s.t E2 ära ajamisest BS12-lt, replikatsioon toimuks pUC Δ 12-l.

Igasse proovi transfekteeriti 50 ng pUC Δ 11, 50 ng pUC Δ 12, 150 ng pCGE2, 50 μ g *carrier* DNA-d ning igasse proovi erinevat E1 ekspresseerivat pCGEag plasmidi 100 ng. Negatiivse kontrollina jäeti pCGEag transfekteerimata ja positiivse kontrollina wt E1 ekspresseerivat pCGEag. Agaroosgeelile kanti veel mõlemasse geeli serva markerina lineariseeritud pUCAlu 300 pg, 100 pg, 30 pg, 10 pg.

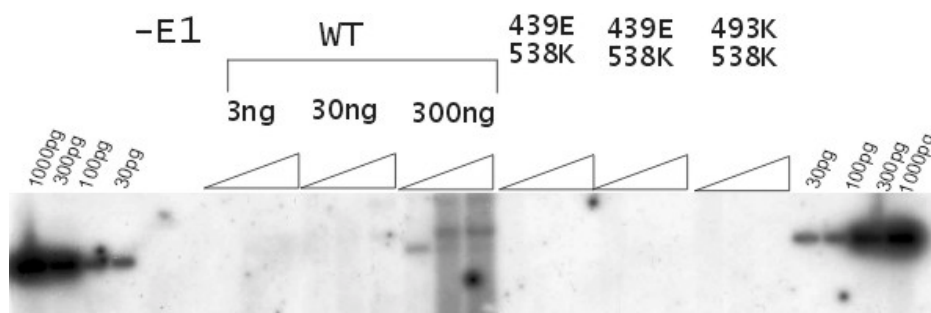
Selgus, et arginiini mutantsed E1 valgud ei viinud läbi replikatsiooni ka lühendatud ORI sisaldavatel plasmiididel. Positiivse kontrollina poreeritud wt pCGEag-lt ekspresseeritud E1 toetas replikatsiooni nii pUC Δ 11 kui ka pUC Δ 12-l (vt. joonis 13. lk 33.). Seega ei ole E1 arginiini mutantide defektsus seotud vaid ühe E2 sidumiskohaga.



Joonis 13. *Southern bloti* pilt transientsest replikatsioonist, kus transfekteeriti CHO rakkudesse 100 ng WT ja mutantseid pCGEag, 150 ng pCGE2 ja võrdsel hulgal - 50 ng pUCΔ11 ja pUCΔ12 plasmide. Paremalt on näidatud, millist BPV1 ORI need pUC plasmidid sisaldavad. Kolmnurgad tähistavad muutust ajas (kolm ajapunkti: 24, 48, 72h). -E1 replikatsioon E1-ta (E2 juuresolekul), WT- *Wilde Type* pCGEag-ga, ülejäänud on replikatsioon erinevate mutantsete pCGEag plasmiididega. Servades on markerina lineariseeritud pUCAlu plasmid eri kogustes.

Replikatsioon ei taastu, kui E1 heksameer moodustub mutantide segust

Autori bakalaureusetöös näidati dominant-negatiivsuse katsega, et mutantset E1-d lülituvad heksameeri koos wt-ga. Et saada vastust küsimusele, kas eri positsioonide arginiinidel ja P-lingul on *in vivo* üksteise suhtes mingit mõju, teostati järgnev replikatsiooni katse, milleks kasutati mutantseid E1 valke ekspresseerivaid plasmide P-lingu mutant K439E ja arginiini mutandid R493K, R538K. CHO rakkudesse transfekteeriti pUCAlu plasmidi 700 ng, E2 ekspressioonivektorit pCGE2 150 ng, *carrier* DNA-d 50 µg. E1 ekspresseerivaid plasmide transfekteeriti järgnevalt: negatiivse kontrolli proovi ei poreeritud sellist plasmidi, wt E1 transfekteeriti 3 ng, 30 ng ja 300 ng, et teada saada, kui väikese kogusega veel replikatsiooni signaal näha on. Proovi nr 5. transfekteeriti võrdses koguses (300 ng) K439E ja R538K ekspresseerivaid plasmide, nr. 6. K439E ja R493K ja nr. 7. arginiini mutandid R538K ja R493K koos. Replikatsioon ei taastunud erinevate mutantsete E1 valkude koosmõjul (joonis 14. lk 34.).

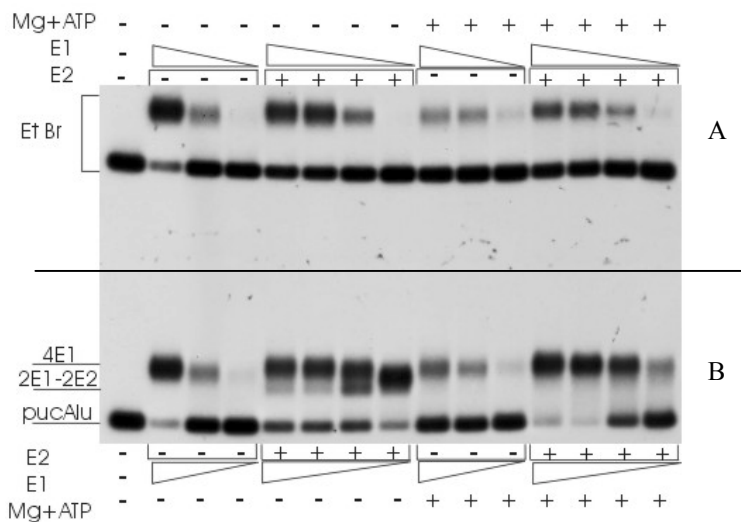


Joonis 14. *Southern bloti* pilt transientsest replikatsioonist, kus transfekteeriti CHO rakkudesse eri kogustes WT ja võrdses koguses – 300 ng mutantseid pCGEag plasmide, nii et kaks mutanti koos. Lisaks transfekteeriti kõikjale 150 ng pCGE2 ja 700 ng pUCAlu plasmide. Paremal on näidatud, millist BPV1 ORI need pUC plasmiidid sisaldavad. Kolmnurgad tähistavad muutust ajas (kolm ajapunkti: 24, 48, 72h). –E1 replikatsioon E1-ta (E2 juuresolekul), WT- *Wilde Type* pCGEag-ga, ülejäänud on replikatsioon erinevate mutantsete pCGEag plasmiididega. Servades on markerina lineariseeritud pUCAlu plasmiid eri kogustes.

COS-7 lüsaatidega ei moodustu spetsiifilisi valk-DNA komplekse EMSA-s

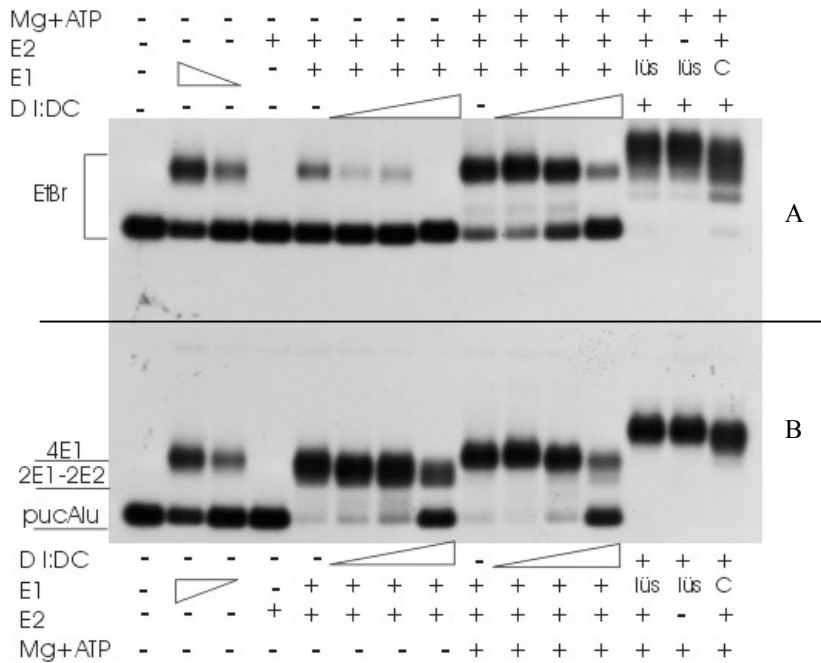
EMSA on hea meetod jälgimaks E1 oligomeriseerumist DNA-le, kuna A. Stenlundi grupp on näidanud, millistele *in vitro* tingimustele vastavad oligomeriseerumise erinevad etapid (vt. joonis 5. lk 15.). Et selline *in vitro* katse peegeldaks natiivsetes tingimustes toimuvat, prooviti kasutada rakulüsaati. Lüsaadid valmistati nagu kirjeldatud eespool.

Esmalt, et kontrollida katse tingimuste paikapidavust, tehti katse Meelis Kadaja poolt puhastatud wt E1 ja E2 valkudega (joonis 15. Lk 35.). Radioaktiivselt märgitud BPV1 minimaalset ORI sisaldav pUCAlu oli DNA-ks, millele valk-kompleksid formeerusid. Selles katses tiitriti puhast E1 valku kontsentratsioonidega 200 ng, 70 ng, 20 ng, ja 7 ng. E2 lisati, kuhu ette nähtud, 10 ng. Reaktsioonisegu oli nagu eespool kirjeldatud, kuid sisaldas lisaks tõrjujat dI:dC 100 ng reaktsiooni kohta. Selgus, et meie katse tingimused õigustavad end, kuna neil tingimustel formeerunud kompleksid vastasid kirjanduse andmetele. Need on järgmised: kõrge E1 kontsentratsiooni puhul formeerub 4E1 ehk $(E1)_2$ kompleks; E1 ja E2 koos: 2E1-2E2 ehk $E1_2-E2_2$ kompleks ja 4E1 molekuli; ATP lisamine ajab ära E2 kompleksist 2E1-2E2; etiidiumbromiid ajab DNA-lt ära kõik muud valkkompleksid v.a ümber DNA oligomeriseerunud E1 (ilmselt kaksik tri- või tetrameer, välistatud pole ka heksameer).



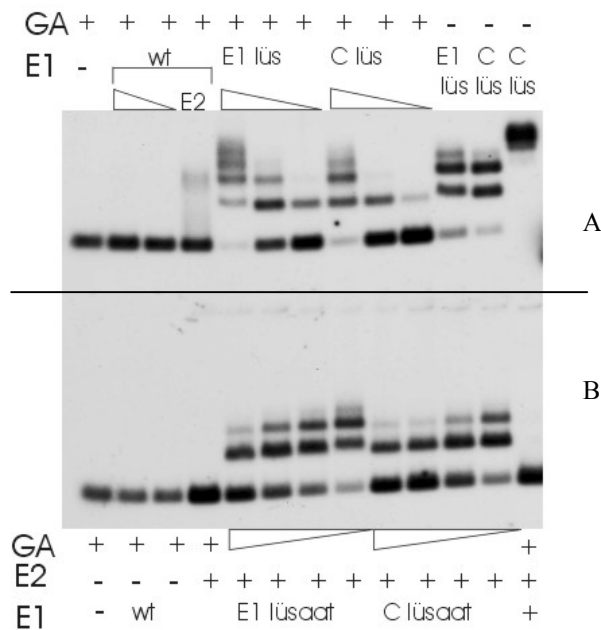
Joonis 15. EMSA pilt kontrollimaks valk komplekside formeerumist pUCAlu DNA-le. Joonis koosneb kahest geelist, mis on paremaks jälgimiseks kohakuti. Joonise A ja B pool erinevad selle poolest, et ülemise poole proovidele lisati 250 ng EtBr. Kasutatud on puhtaid E1 ja E2 valke. Reaktsiooni lisatud ainesed on märgitud – ja + ning kontsentratsiooni muutus kolmnurgaga. E1 kontsentratsiooni varieeriti 200ng -7 ng. Alumise rea vasakul küljel on näidatud, millisel kõrgusel liiguvad erinevad valk-DNA kompleksid ja valkudest vaba DNA proov pUCAlu.

Kuna oli teada, et rakulüsaadi kasutamine võib kaasa tuua kõrgeenenud ebaspetsiifika, otsustati järgmises katses tiitrida tõrjujat dI:dC, et selgitada välja, millisel tõrjuja kontsentratsioonil meid huvitavad valk-DNA kompleksid veel formeeruvad (joonis 16.). Kui dI:dC kontsentratsiooni varieeriti 10 ng, 100 ng ja 1000 ng, olid E1 ja E2 kontsentratsioonid muutumatuna 10 ng. Katses lüsaadiga (rajad 13-15) oli dI:dC kontsentratsioon 100 ng. Selgus, et kompleksid puhaste valkudega formeerusid veel dI:dC kontsentratsioonil 1000 ng. Kahjuks aga ei tekkinud spetsiifilisi komplekse kui kasutati rakulüsaate. Ei olnud vahet, kas kasutati ainult *carrier* DNA-ga (kontroll lüsaat) või E1 ekspresseeriva plasmiidiga transfekteeritud rakkude lüsaate.



Joonis 16. EMSA pilt tõrjuja dI:dC tiitrimisest, mille konts. varieeriti 10ng, 100ng ja 1000 ng. Joonis koosneb kahest geelist, mis on paremaks jälgimiseks kohakuti. Joonise A ja B pool erinevad selle poolest, et ülemise poole proovidele lisati 250 ng EtBr. Kasutatud on puhtaid E1 ja E2 valke ning rakulüsaate (C- negatiivne kontroll). Reaktsiooni lisatud ainesed on märgitud – ja + ning konts. muutus kolmnurgaga. E2 konts. on 10 ng ja E1 kontsentratsiooni rajal 2. 70 ng, mujal 10 ng. Alumise rea vasakul küljel on näidatud, millisel kõrgusel liiguvad erinevad valk-DNA kompleksid ja valkudest vaba pUCAlu DNA

Lootes siiski katse tingimused kohandada tööks lüsaatidega, tiitriti järgnevas katses lüsaate ja glutaaraldehüüdi (joonis 17. lk 37.). Viimase vähendamine muudab valkude *crosslingi* DNA-le spetsiifilisemaks. Tõrjuja dI:dC kontsentratsioon oli kõikjal 1000 ng ning proovid sisaldasid ATP-d ja MgCl₂. Lüsaate lisati reaktsiooni 1 µl, 0.1 µl, 0.01 µl tiitrimise katses (joonise A pool). Glutaaraldehüüdi tiitrimisel (joonise B pool) võeti lüsaati 0.3 µl ja puhast E2 20 ng, glutaaraldehüüdi kontsentratsioon varieerus 20 pg, 10 pg, 5 pg ja 2.5 pg. Kõigele sellele vaatamata tugev mittespetsiifika säilis ning selles osas ei olnud erinevusi kontroll ja E1 sisaldava lüsaadi vahel.

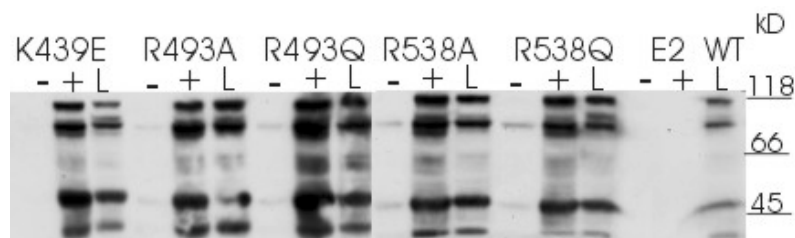


Joonis 17. EMSA pilt. A) E1 sisaldava ja kontroll (C) rakulüsaatide tiitrimine. Lüsaate võeti 1 µl, 0.1 µl ja 0.01 µl. B) GA (glutaaraldehüüdi) tiitrimine. GA konts. varieeriti 20 pg, 10 pg, 5 pg ja 2.5 pg. Proovides, kus on märgitud E2 olemasolu, oli seda 20 ng. Puhast E1 lisati 70 ng ja 10 ng radadel 2 ja 3. Reaktsiooni lisatud ained on märgitud – ja + ning konts. muutus kolmnurgaga. Igas proovis on 1000ng dI:dC ja ATP ning MgCl₂ 5mM.

Puhastati GST E1 valgud

Kuna COS-7 lüsaatidega EMSA ei toimi, kuid EMSA katset oli soov teha, tuli selleks puhastada E1 valgud. Enne suures mahus valgu puhastamist tehti soovitud valke ekspresseerivatele pET plasmiididele ja *E. coli* DH5α tüvele BL21(DE3) RP ekspressiooni ja sünteesitava valgu lahustuvuse kontroll. Selleks transformeeriti pET11c-GST-E1 plasmiidid wt, R493A, R493K, R538A, R538K ja K439E mainitud tüvesse. Baktoreid kasvatati 2 ml LB söötmes ampitsilliini juuresolekul 37°C tiheduseni 0.3 OD₆₀₀, siis kasvatati bakterikultuur 20°C tiheduseni 1 OD₆₀₀. Võeti 0.5 ml bakterikultuuri analüüsima E1 ekspressiooni enne IPTG lisamist. Seejärel indutseeriti allesjäänud kultuuri IPTG lisamisega lõppkontsentratsioonini 0.4 mM. Nelja tunni pärast võeti analüüsima 2x0.5 ml kultuuri. Induktsiooni kontrolliks koguti bakterid maksimum kiirusel tsentrifuugides (*Eppendorf* 5415C), suspendeeriti 1x Laemmli puhvris ja kuumutati. Selleks, et kontrollida valgu lahustuvust, tehti teise kokku tsentrifuugitud bakterikogumiga valgupuhastamise esimene etapp. Selleks suspendeeriti bakterikogum 100 µl puhvris A, külmutati lämmastikus, sulatati, sonikeeriti, bakterite kestad eemaldati tsentrifuugides, saadud vedelik pipeteeriti uude tuubi ja valmistati sellest proov 20 µl 6x Laemmli puhvri lisamise ja kuumutamise. Proovid analüüsiti *Western Blotil* nagu eespool kirjeldatud.

Selgus, et IPTG lisamine tõepoolest indutseeris E1 ekspressiooni (joonis 18.). Täispika valgu kõrval (*ca* 110 kD) ekspresseeriti aga ka selle lühemaid vorme. Samuti oli ekspresseeritud E1 lahustuvas vormis antud tingimustel. Negatiivse kontrollina kasutati bakterilüsaati, kus oli E2.



Joonis 18. *Western Bloti* pilt E1 antikehaga. (-)- proov enne IPTG lisamist, (+)- proov 4h peale induksiooni IPTG-ga, (L)- proov peale valgu puhastamise esimest etappi ehk lahustuvas fraktsioonis. Joonise paremal küljel on molekulmassi marker.

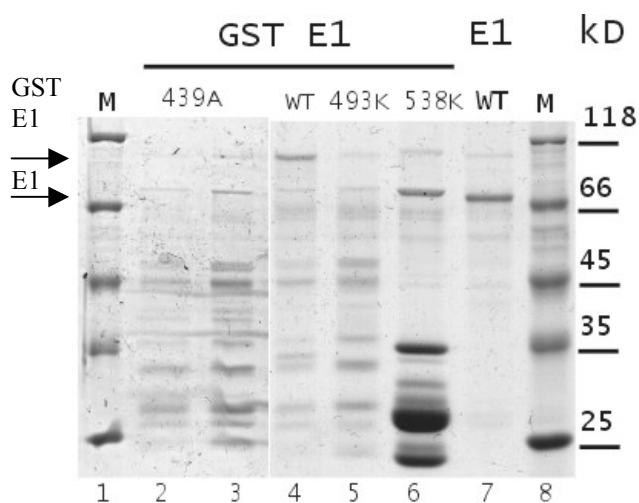
Mutantsete E1 valkude tootmine suures mahus oli oodatust keerulisem ettevõtmine. Probleemid algasid juba bakterite kasvatamisest toatemperatuuril. See oli vajalik, et E1 bakteris sünteesituna õigesti pakuks. Mitmeid kordi juhtus, et bakterid lüüsusid suures mahus kasvatades. Millest see tulenes, ei ole siiani teada. Olukord lahenes, kui kasutusele võeti 2 L klaaskolvid, mida hoiti enne kasutamist tunde ahjus (200°C). Valguekspressiooni vektoriga pET-11c-GST-E1 värskelt transformeeritud *E. coli* BL21(DE3) RP bakterid kasvatati 37°C 200 ml LB-s tiheduseni 1 OD₆₀₀, seejärel lisati ettekasvatatud kultuur 2L LB söötmele, millele lisati steriilset MgCl₂ lõppkontsentratsioonini 20 mM ja ampitsilliini. Igasse kolvi pandi pool liitrit söödet. Kasvatati 37°C tiheduseni 0.4 OD₆₀₀, seejärel kasvatati 1 tund 20°C et bakteri füsioloogia kohanduks madalama temperatuuriga. Valgu ekspressioon indutseeriti IPTG lisamisega 0.4 mM lõppkontsentratsioonini. Induktsioon kestis 12 tundi. Analüüs näitas, et jätkuvalt ekspresseeriti täispika GST E1 kõrval ka lühemaid valgu vorme.

Probleeme, mis ilmnesisid valgu puhastamise juures, oli mitu. Esiteks juhtus paar korda, et mutantsed E1 valgud hakkasid lahusest välja sadenema juba DNA väljasadestamise etapis (NaCl ja PEI lisamine). Teiseks seostus ekspresseeritud täispikk E1 glutatioon-sefaroos kandjatele halvasti, suurem osa valgust jäi seondumata. Seda leevendas esialgsest tagasihoidlikum sonikeerimine, mis võis valgu konformatsioonile halvasti mõjuda. Esialgseks eesmärgiks oli saada täipikk puhas E1 valk. See eeldas E1 küljest GST ära lõikamist trombiiniga ning seejärel lühematest valgutükkidest vabanemist kasutades MonoS-Sepharose ja MonoQ-Sepharose kolonne. Paraku osutus see võimatuks, kuna mutantsed valgud lagunevad

kiiresti ning need ei talu pikka käsitlemist. Seepärast rahulduti peale mitmeid katsetusi GST E1 liitvalkudega, mis saadi glutatioon- sefaroos kandjatelt peale glutatiooniga elueerimist.

Valk koguti 500 µl fraktsioonide kaupa, villiti 10 µl alikvootidena ja analüüsiti Bradfordini testi ning SDS-akrüülamiid geelil. Bradfordini test näitab paraku vaid kogu valgu sisaldust fraktsioonis, mitte aga täispika valgu hulka. Seepärast ei ole ka ELISA loenduriga mõõdetud valgu kontsentratsioonid (0.5- 1 µg) kuigi informatiivsed. Järgnevates katsetes kasutati fraktsioone, mis sisaldasid visuaalselt kõige rohkem täispikka GST E1 valku. Positiivne oli see, et täispika GST E1 puhastamisega kaasa tulnud lühemad E1-d (nimetame edaspidi laguks) liikusid erinevate E1 valkude puhul samadel kõrgustel. Erandiks on siin positsiooni 538 mutandid, mis sisaldasid spetsiifilist tugevat lagu. Prooviti puhastada kõiki genereeritud E1 mutantseid valke. Joonisel 19. on valgud, mis õnnestus puhastada ja mida kasutati järgnevates katsetes.

Kuna P-lingu mutant K439E lagunes täiesti (näidatud ka H. Fausti bakalaureuse töös), tehti pCGEag vektorisse selles positsioonis asendusalaniini vastu [tuginedes andmetele (MacPherson, Thorner et al. 1994) artiklis] ning kloonitati pET11c-GST-E1 vektorisse kasutades samu meetodikaid, mida on kirjeldatud H. Fausti keskastme ja bakalaureuse töödes. Tulemust kontrolliti PCR, restriksioonanalüüsi ja sekveneerimisega. Asendusalaniini vastu selles positsioonis õigustas end – seda valku oli võimalik puhastada.



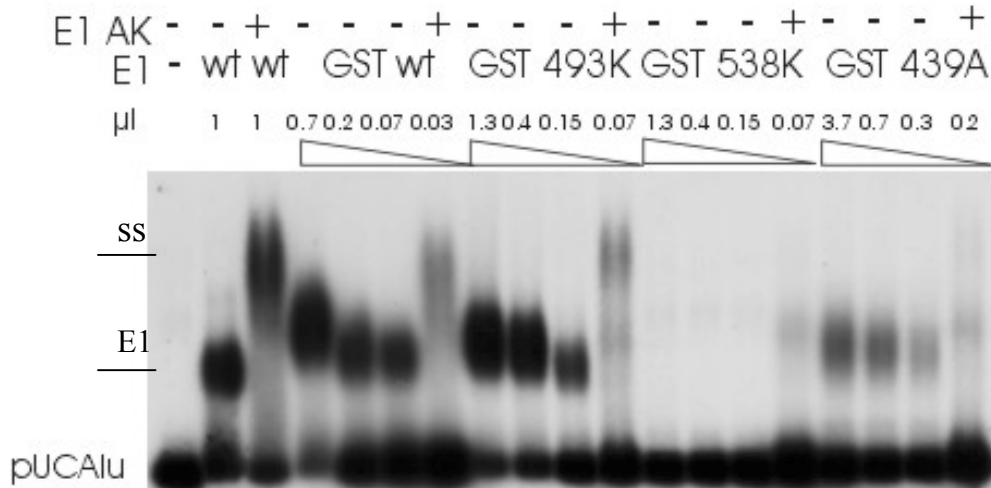
Joonis 19. GST E1 valgud SDS-akrüülamiid geelil, värvitud *Coomassie Blue* lahusega. Joonis on kokku pandud kahest erinevast geelist. Radadel **1** ja **8** on molekulmassi markerid, **2**- GST E1 K439A valgu fraktsioon nr. 2, **3**- sama valgu fraktsioon nr. 1, **4**- GST E1 wt, **5**- GST E1 R439K, **6**- GST E1 538K, **7**- E1 wt. Täispikad GST E1 valgud asuvad ca 100 kD, E1 valk ca 70 kD kõrgusel (näidatud nooltega). Järgnevates katsetes kasutati radadel **3-7** näidatud valke.

GST E1 valgud moodustavad valk-DNA komplekse EMSA-s

Puhastatud GST E1 liitvalke kasutati järgnevas biokeemilistes katsetes. Varem on näidatud, et GST E1 liitvalk on aktiivne EMSA katsetes (Sedman and Stenlund 1996). Ka on näidatud, et HPV11 **GFP** (*green fluorescent protein*) E1 liitvalk on replikatsioonis aktiivne (Deng, Jin et al. 2003). GST E1-ga kaasnev lagu ei saa selles katses olla takistuseks, sest kui valgul puuduks N-terminus, siis see ei oleks seostunud glutatioon-sefaroos kandjatele ning kui puuduks C-terminus, siis see valk ei oleks võimeline oligomeriseeruma (Titolo, Pelletier et al. 2000). Seega katses saab signaali anda ainult täispika GST E1 valgu seostumine proovile.

EMSA puhul kasutati standardset reaktsioonisegu, mis on kirjeldatud eespool. Lisaks sisaldas see tõrjujat dI:dC 10 ng iga proovi kohta. Esmalt vaadeldi puhastatud valkude võimet oligomeriseeruda DNA juuresolekul (joonis 20. Lk 41.). Proovina kasutati täispikka ORI sisaldavat pUCAlu DNA-d. Kuna aktiivse valgu hulk ei olnud meil täpselt determineeritud, ei saanud võtta valke reaktsiooni massiühikutes. Kasutati lahjenduste rida jälgimaks GST valkude koguste vahemikku, millisel juhul valk-DNA kompleks kõige selgemalt formeerub. Et tulemusi omavahel võrrelda ja selgitada, milliseid valgu koguseid tarvitada, jälgisime vaba proovi ja valkudega seondunud proovi suhet *Phosphoimager* SI abil. Et olla kindel, et formeerunud kompleksid sisaldavad E1, kasutati BPV1 E1 antikeha (pärib A. Stenlundi laborist). Seda lisati kõige madalamas koguses E1 valku sisaldavatele proovidele 0.5 µl ning lasti E1 valgule seonduda 10 min enne glutaaraldehüüdi lisamist. Positiivse kontrollina kasutati puhast E1 wt, negatiivse kontrollina DNA proovi, millele ei lisatud valke.

Selgus, et vaatamata GST-le ja lagu rohkusele on sel viisil puhastatud E1 võimeline oligomeriseeruma, mis tõestab valgu aktiivsust ja kasutamiskõlblikkust biokeemilistes katsetes. Vaid GST 538K oli inaktiivne. GST E1 wt oli mutantsetest valkudest aktiivsem. P-lingu mutant oligomeriseerus kõige nõrgemalt. Supershift E1 antikehaga tõestas, et DNA-le seondunud valk on E1.

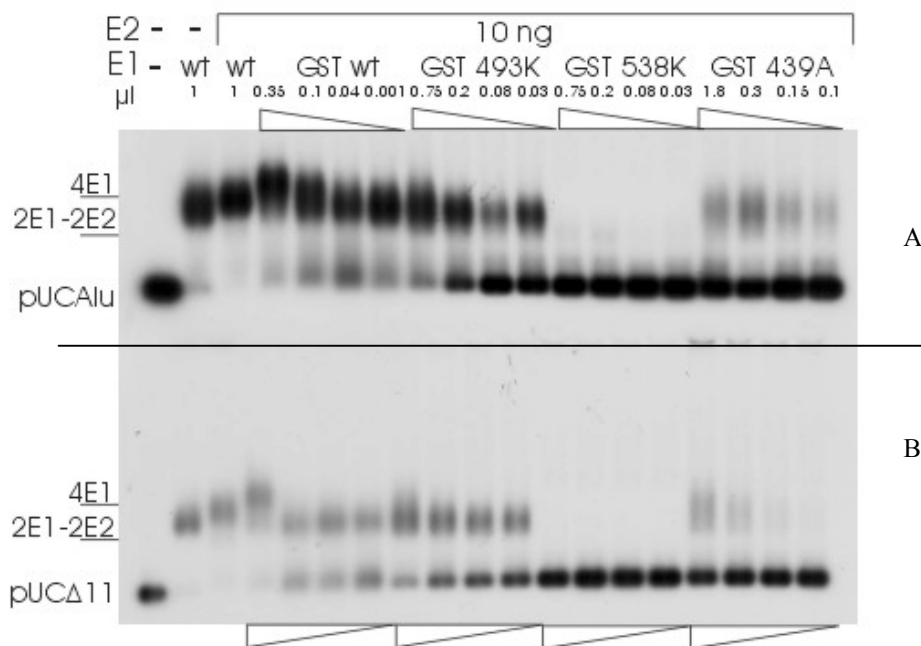


Joonis 20. BPV1 E1 oligomeriseerumine täispikka ORI sisaldavale pUCAlu DNA-le. Kõik GST E1 valgud on aktiivsed v.a. GST E1 R538K. Pildi alumises ääres on vaba DNA proov, kõrgemal on E1-DNA kompleks (E1) ja kõige kõrgemal E1 antikeha- E1-DNA kompleks (SS). Näidatud on katses kasutatud valgu hulk μ l, kolmnurgad tähistavad antud E1 valgu lahjendus rida. E1 AK- kasutatud on BPV1 E1 antikeha (+).

GST E1-E2 kompleksi teke

Järgnevas katses vaatasime, kas GST E1 valgud seonduvad puhta E2 valguga (joonis 21.). E2 võeti iga reaktsiooni kohta 10 ng. E1 kogust vähendati võrreldes E1 oligomeriseerumiskatsega poole võrra, kuna on teada E2 stimuleeriv efekt E1 oligomeriseerumisele. Proovina kasutati nii pUCAlu kui ka lühendatud pUC Δ 11 DNA-d, kuna on teada, et just E2 BS12 on vastutav esmase E1-E2 kompleksi tekkes. Positiivse kontrollina kasutati puhast E1 wt, negatiivse kontrollina DNA proovi, millele ei lisatud valke.

E1 madalamal kontsentratsioonil tekkis eelistatult 2E1-2E2 kompleks, mis oli paremini jälgitav pUC Δ 11-l. E1 kõrgemal kontsentratsioonil formeerus ka 4E1 kompleks. GST E1 R538K oli endiselt inaktiivne. P- ling mutant oligomeriseerus halvemini võrreldes potentsiaalse arginiin-sõrm mutandi ja wt- ga.



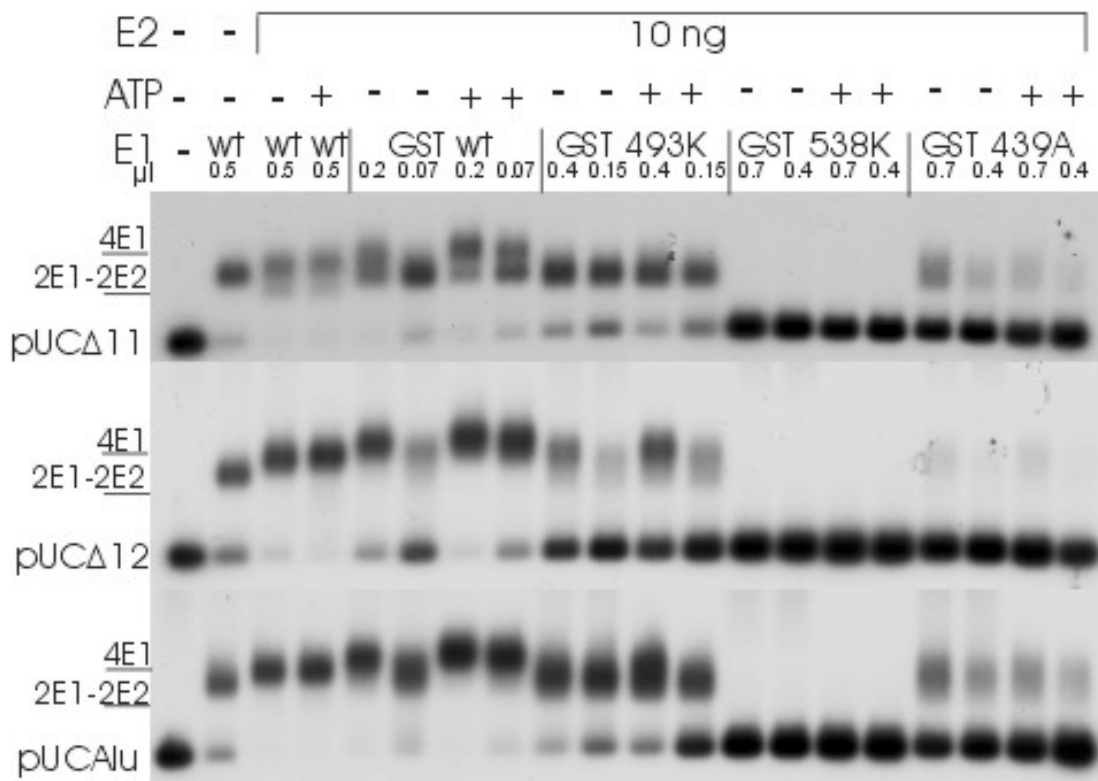
Joonis 21. E1 oligomeriseerumine E2 juuresolekul. E2 lisati 10 ng reaktsiooni kohta. Joonis koosneb kahest geelist, mis on jälgimise hõlbustamiseks kohakuti. Ülemise geeli (A) valk kompleksid formeeriti pUCAlu-le, alumisel (B) geelil pUCΔ11- le. Geelide alumistes servades on vaba DNA. Joonise vasakus servas on näidatud millistel kõrgustel liiguvad 4E1 ja 2E1-2E2 valk- DNA kompleksid. Näidatud on katses kasutatud valgu hulk μ l, kolmnurgad tähistavad antud E1 valgu lahjendus rida.

ATP-st sõltuv E2 eemaldamine ORI-lt

Puhastatud GST E1 valkude oligomeriseerumisvõime tõestatud, saime asuda põhiküsimuse juurde. Nimelt kas mutatsioon positsioonis 493 mõjutab oligomeriseerumisprotsesse, kus vajatakse ATP- d. Esimeseks selliseks etapiks on E2 ära ajamine 2E1-2E2 kompleksist. Seda protsessi jälgiti ATP ja $MgCl_2$ lisamisega reaktsiooni. Kasutati nii täispikka ORI sisaldavat pUCAlu kui ka lühendatud pUCΔ11 ja pUCΔ12. E2 võeti konstantselt 10 ng reaktsiooni kohta. E1 hulka alandati veelgi kasutades eelmise katse andmeid, et eelistatult tekiks 2E1-2E2 kompleks ning oleks paremini jälgitav E2 lahkumine sellest ATP mõjul. Positiivse kontrollina kasutati puhast E1 wt, negatiivse kontrollina DNA proove, millele ei lisatud valke (joonis 22. lk 43.).

GST E1 wt ja GST E1 R493K käitusid selles katses erinevalt. E2 lahkumine 2E1-2E2 kompleksist toimus GST E1 wt puhul probleemitult pUCAlu ja pUCΔ12-lt, kehvemini toimus see pUCΔ11-lt. GST E1 R493K puhul jäi eelistatud kompleksiks 2E1-2E2 ka ATP lisamisel, iseäranis pUCΔ11 puhul. GST E1 R538K oli endiselt inaktiivne. GST E1 K439A puhul 4E1

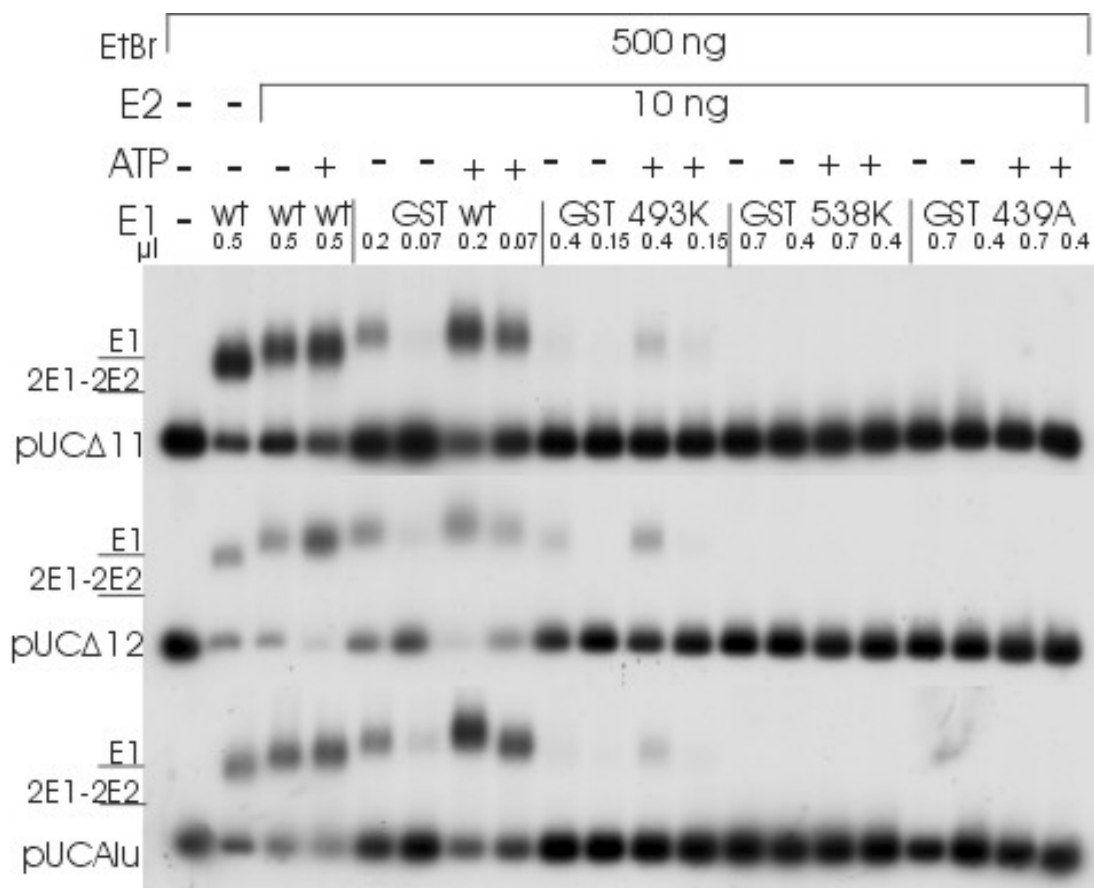
kompleksi ei formeerunudki, ATP lisamine nõrgendas oligomeriseerumist ning pUCΔ12 puhul oli oligomeriseerumine iseäranis nõrk.



Joonis 22. ATP mõju 2E1-2E2 kompleksile. Joonis koosneb kolmest geelist, mis on jälgimise hõlbustamiseks kohakuti. Ülemise geeli valk kompleksid formeeriti pUCΔ11-le, keskmisel pUCΔ12-le, alumisel geelil pUCAlu-le. Geelide alumistes servades on vaba DNA. Joonise vasakus servas on näidatud millistel kõrgustel liiguvad 4E1 ja 2E1-2E2 valk- DNA kompleksid. Näidatud on katses kasutatud E1 valgu hulk μl, ATP olemasolu reaktsioonis (+) ja E2 olemasolu.

E1 heksameeri moodustumine

Teiseks E1 oligomeriseerumisetapiks, kus vajatakse ATP-d, on heksameeri moodustumine peale E2 lahkumist kompleksist. Sellist etappi imiteeriti *in vitro* etiidiumbromiidi lisamisega reaktsiooni. See kemikaal vabastab DNA valkkompleksidest, v. a ümber DNA oligomeriseerunud E1. Reaktsiooni segu sisaldas samu komponente nagu ATP mõju uurimise katses E1 oligomeriseerumisele. Ainus erinevus oli see, et peale glutaaraldehüüdi reaktsiooni lisati veel 500 ng etiidiumbromiidi iga proovi kohta (joonis 23. lk 44.).

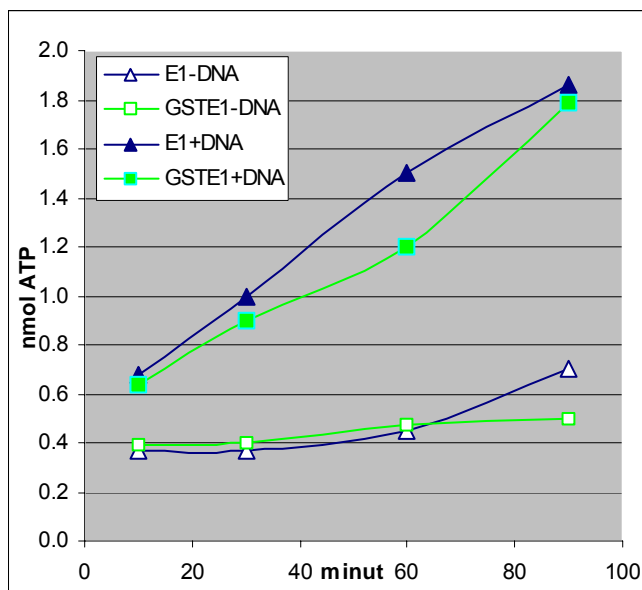


Joonis 23. Etiidiumbromiidi mõju valk-DNA kompleksile. Etiidiumbromiidi lisati iga reaktsiooni kohta 500 ng. Joonis koosneb kolmest geelist, mis on jälgimise hõlbustamiseks kohakuti. Ülemise geeli valk kompleksid formeeriti pUC Δ 11-le, keskmisel pUC Δ 12-le, alumisel geelil pUCAlu-le. Geelide alumistes servades on vaba DNA. Joonise vasakus servas on näidatud millistel kõrgustel liiguvad E1 ja 2E1-2E2 valk-DNA kompleksid.. Näidatud on katses kasutatud E1 valgu hulk μ l, ATP olemasolu reaktsioonis (+) ja E2 olemasolu.

GST E1 wt ja mutandid käitusid ka selles katses erinevalt. Potentsiaalne arginiin-sõrme mutant GST E1 R493K oligomeriseerus palju nõrgemini ja P-lingu mutant GST E1 K439A ei oligomeriseerunud üldse DNA-le. GST E1 R538K oli jätkuvalt inaktiivne. Samuti näitas katse, et üldiselt on ATP-l positiivne mõju E1 oligomeriseerumisele. Nagu eeldatud, sellistel reaktsiooni tingimustel enam 2E1-2E2 kompleksi ei formeerunud, kõik valk-DNA kompleksid on DNA-le oligomeriseerunud E1. Erinevalt E2 lahkumise katsest 2E1-2E2 kompleksist ATP mõjul, käesolevas katses drastilised erinevused erinevate DNA proovide kasutamisel puudusid.

GST E1 wt ja E1 wt omavad võrreldavat ATPaasset aktiivsust

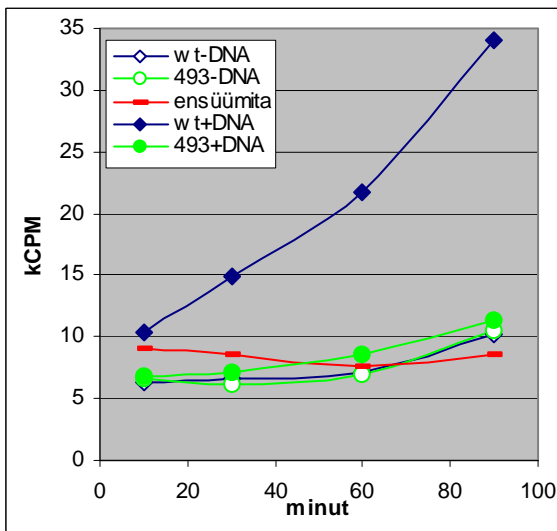
ATPaasi katse söelahuse meetodil näitab ATP hüdrolüüsi E1 helikaasses töös. Katse viidi läbi vastavalt eespool kirjeldatud protokollile. Esmalt vaadeldi, kas puhas E1 wt ning GST E1 wt käituvad sarnaselt sscDNA juuresolekul. On teada, et ssDNA juuresolek stimuleerib ATPaasset aktiivsust. Igasse reaktsiooni võeti 1.2 µl valku, ATPaasset aktiivsust mõõdeti 10, 30, 60 ja 90 min järel. Selgus, et E1 wt ja GST E1 wt omavad sarnast ATPaasset aktiivsust, mis on stimuleeritav sscDNA poolt (joonis 24.).



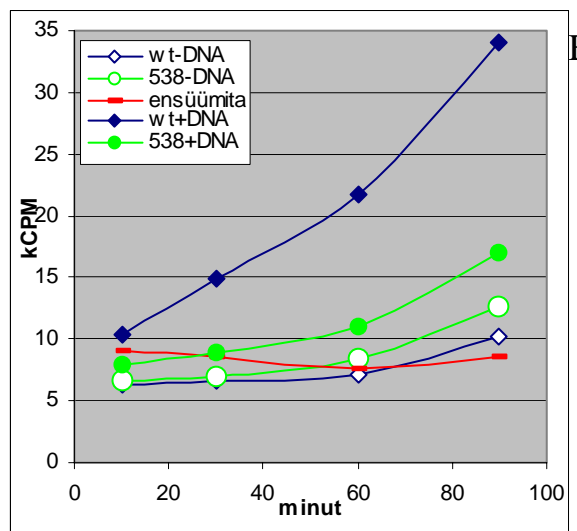
Joonis 24. E1 wt ja GST E1 wt ATPaasne aktiivsus sscDNA kohalolekul ja puudumisel. x- teljel on 4 ajapunkti (10, 30, 60, 90 min.), y- teljel reaalselt hüdrolüüsitud ATP hulk nmol.

GST E1 mutantsete valkude ATPaasne aktiivsus

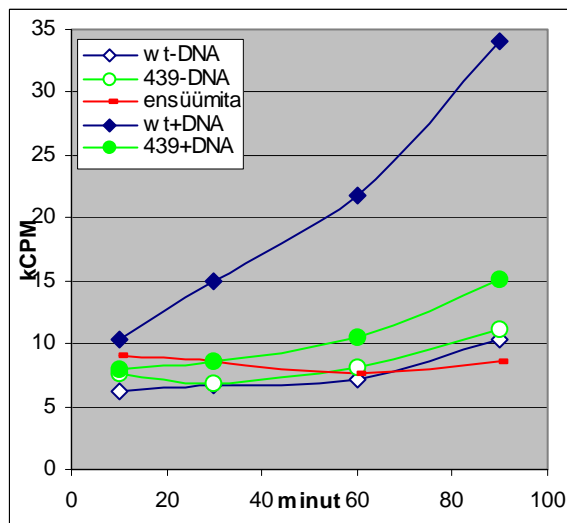
Järgnevalt tehti ATPaasi katse GST E1 valkudele. Vaadeldi GST mutantsete E1 valkude ATPaasset võimet võrreldes GST E1 wt-ga nii DNA-ta kui sscDNA juuresolekul. Valke võeti reaktsiooni kohta 1.2 µl. Negatiivse kontrollina oli proov, milles oli küll sscDNA, kuid kus puudus E1 valk. Selgus, et mutantsed GST E1 valgud ei oma samaväärset ATPaasset aktiivsust võrreldes wt. Samas ei saa eitada, et sscDNA juuresolek teataval määral stimuleeris nende valkude ATP hüdrolüüsi võimet (joonis 25.A-D lk 46.). R538K omas suhteliselt kõrgemat ATPaasset aktiivsust võrreldes teiste mutantidega, R439A aga kõige madalamat.



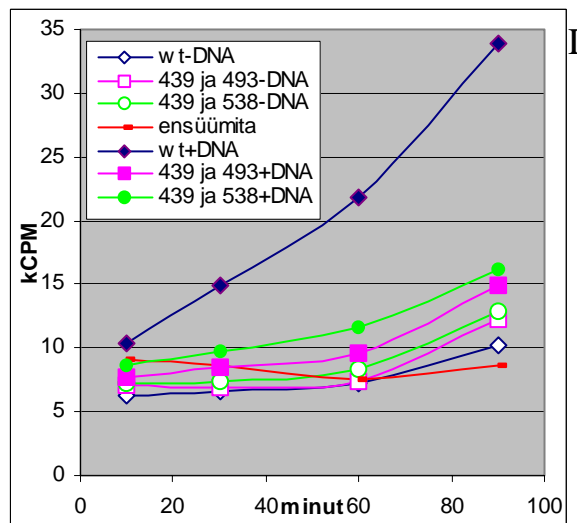
A



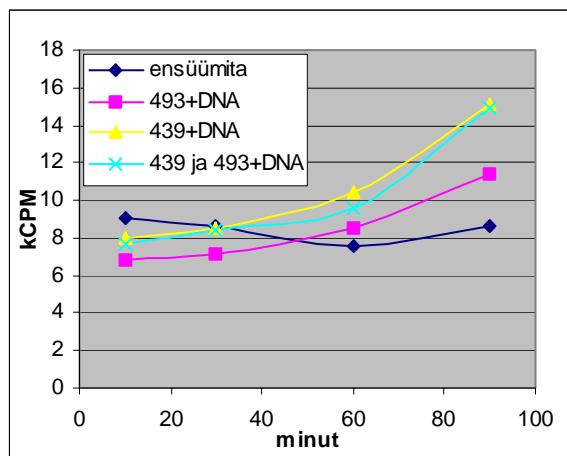
B



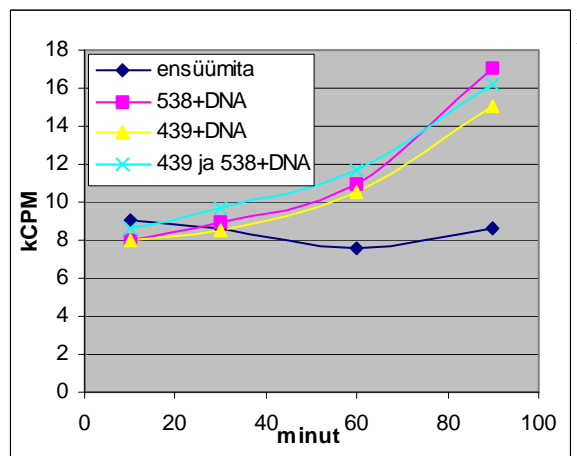
C



D



E

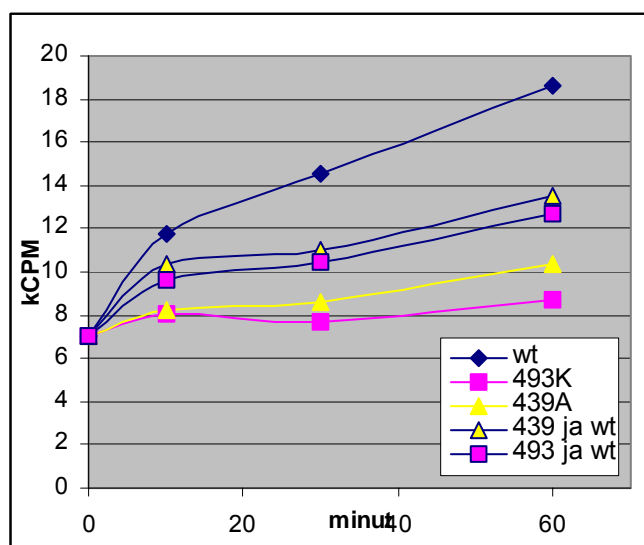


F

Joonis 25. ATPaasi katse GST E1 valkudele. Negatiivseks kontrolliks on ensüümita kuid sscDNA-ga proov. x-teljel on 4 ajapunkti (10, 30, 60, 90 min.), y-teljel signaali tugevus kCPM-es. A-D: ATPaase aktiivsuse sõltuvus sscDNA-st võrreldes wt A) R439K B) R538K C) K439A D) P-ling (439) ja arginiin-sõrm (493 ja 538) mutandid koos. E-F: P-ling ja arginiin-sõrm mutandid ATPaasi katses koos võrreldes ATPaase aktiivsusega reaktsioonis eraldi. E) R493K ja K439A F) R538K ja K439A.

Samas katses kontrolliti ka hüpoteesi, mille kohaselt taastub ATPaasne aktiivsus teataval määral, kui P-ling ja arginiin-sõrm mutantsed E1 monomeerid moodustavad koos heksameeri. Valke võeti reaktsiooni 0.6 µl kumbagi mutanti. sscDNA-l oli jätkuvalt stimuleeriv efekt ATP hüdrolüüsile (joonis 25.D). Selgus, et mutantide võime hüdrolüüsida ATP-d ei paranenud märkimisväärselt, kui heksameer moodustus segamini P-ling ja arginiin-sõrm mutantsetest monomeeridest (joonis 25.E-F). Siiski on näha väga väike ATP hüdrolüüsi võime paranemine kui reaktsioonis oli koos P-ling mutant K439A ja arginiini mutant R538K. Paraku ei saa siinkohal kindlalt väita, et seal komplementatsiooni mehhanism toimib, kuna mainitud R538K ei olnud sama puhtusastmega kui teised valgud ning mainitud ATP hüdrolüüsi tõus on vea piires.

Seda, et heksameer tõepoolest moodustus mutantide segust, näitab katse (joonis 26.), kus sscDNA juuresolekul mutandid koos wt-ga omasid vahepealset ATPaasest aktiivsust kui wt ja mutandid eraldi. Nimelt paranes mutantide ATPaasne aktiivsus, kui neid võeti reaktsiooni võrdselt wt-ga (mõlemaid 0.6 µl).



Joonis 26. ATPaasne aktiivsus sscDNA kohalolekul, kui heksameer moodustub wt ja mutantsete E1-de segust. x-teljel on 4 ajapunkt (0, 10, 30, 60 min.), y-teljel signaali tugevus kCPM-des.

Arutelu

Käesolevas töös uuritakse, milline potentsiaalsetest BPV1 E1 arginiinidest (positsioonid 493 ja 538) on arginiin-sõrm. Kasutades erinevaid meetodeid, uuritakse, kuidas käituvad arginiini asendusmutandid võrreldes wt-ga.

Autori varasemad tulemused näitasid, et arginiini asendusmutandid R493A, R493Q, R493K, R538A, R538Q ja R538K ei toeta täispikka BPV1 ORI (E2 BS11, AT rikas piirkond, E1 BS, E2 BS12) sisaldava pUCAlu plasmidi replikatsiooni *in vivo*. Samuti olid replikatsioonis defektsed SV40 LT-ag arginiini mutandid vaatamata tuuma lokeerumisele (autori avaldamata tulemused). Käesolevas töös kasutati pUCAlu lühendatud variante pUC Δ 11 ja pUC Δ 12, millel siis vastavalt puudub kas E2 sidumiskoht 11 või 12 (vt. joonis 3. lk 10.). Seda katset tehti, kuna A. Stenlundi grupi tööde põhjal on teada, et neid sidumiskohti kasutatakse E1 oligomeriseerumise erinevates etappides. E2 BS12 on vajalik oligomeriseerumise esimeses etapis, mil E2 seondub sellele, aidates omakorda esimestel E1 molekulidel DNA-le seonduda. (vt. jooniseid 4.-6. kirjanduslikust osast). Järgnevalt ATP mõjul lahkuvad E2 molekulid, et teha ruumi saabuvatele E1 molekulidele. *In vivo* katsetes on replikatsiooni toimumiseks hädavajalik BS12. Viiruse kontekstis on BS11 ja BS12-l eraldi seisev ent sünergiline roll (Gillette and Borowiec 1998).

Hüpoteesi kohaselt oleks võinud antud katses replikatsioon toimuda, kui mutantsete E1 valkude defektsus on seotud vaid E2 vabastamisega kompleksist. Kuna replikatsioon ei toimunud kummalgi juhul (joonis 13. lk 34.), võib sellest järeldada, et mutantsete valkude defektsus ei ole seotud ainult E2 eemaldamisega. Samas see katse ei välista, et mutantsed E1 valgud on defektsed mõnes hilisemas oligomeriseerumise etapis.

Replikatsiooni katse, kus transfekteeriti rakkudesse samaaegselt erinevaid mutantseid E1 valke ekspresseerivaid plasmide (joonis 14. lk 33.). Selle katse eelduseks oli mutantsete E1 valkude lülitumine heksameeri, mis tõestati *in vivo* autori bakalaureusetöös. Sama moodi käitusid ka LT-ag arginiini mutandid (autori avaldamata tulemused). Käesolev katse oli inspireeritud (Hishida, Han et al. 2004) tööst, kus näidati, et P-ling ja arginiin-sõrm võivad üksteise tööd komplementeerida. Nimelt taastus RuvB helikaasi ATPaasne aktiivsus teataval määral, kui P-lingu ja arginiin-sõrme mutantsed valgud esinesid katses koos. Samas ei taastunud neil tingimustel RuvB füsioloogiline funktsioon (DNA rekombinatsioon). Meie katses, kus esinesid

erinevad arginiin-sõrm ja P-ling mutantsed E1 valgud koos, ei taastunud samuti E1 füsioloogiline funktsioon (replikatsioon). Eelnevatest andmetest lähtudes oli replikatsiooni mitte taastumine oodatud tulemus. Seda oli vaja vaadata, kuna tulevikus oli planeeritud teha RuvB puhul kirjeldatud ATPaasi katse ka E1 valkudega.

Et välja selgitada, kas ja millises oligomeriseerumise etapis mutantsed E1 valgud on defektsed, suunduti *in vitro* süsteemi, kuna A. Stenlundi grupi poolt on hästi kirjeldatud millistele *in vitro* reaktsiooni tingimustele vastavad E1 heksameriseerumise kindlad etapid. Esialgu prooviti teha EMSA katseid COS-7 rakulüsaadiga, et tulemused peegeldaksid suuremal määral rakkudes toimuvat, kuna rakkudes on väga palju erinevaid valke ning E1 tase ei ole neis kunagi väga kõrge (kui transfekterida liiga suures hulgas E1 ekspresseerivat plasmidi, mõjub see rakkudele fataalselt). Paraku just nimelt teiste valkude esinemine rakkudes tegi võimatuks EMSA katsed rakulüsaatidega. Nimelt seonduvad vaadeldavale DNA-le (ilmselt A/T rikkale piirkonnale) ka teised rakus leiduvad valgud peale E1, mis omakorda andsid tugevaid ebaspetsiifilisi signaale. Olukorda üritati parandada katse tingimuste muutmisega, varieerides tõrjuja dI:dC, glutaaraldehüüdi ning lüsaadi enda kontsentratsioone. Siiski ebaspetsiifika säilis ning selles osas ei olnud erinevusi kontroll lüsaadi ning E1 ekspressiooni vektoriga transfekteritud rakulüsaadi vahel (joonised 16.lk 36. ja 17. lk 37.). Samasugune ebaspetsiifika kaasnes ka rakulüsaadiga, kuhu oli transfekteritud E2 transfekterivat plasmidi (autori avaldamata tulemused).

Kuna rakulüsaatidega ei õnnestunud EMSA katseid teha, tuli nendeks katseteks saada puhastatud E1 valgud. Selleks kasutati pET11c-GST süsteemi, kus IPTG lisamisega indutseeritakse GST E1 liitvalgu ekspressioon pET plasmiidilt, mis on transfekteritud *E. coli* BL21(DE3) RP tüvesse. Esialgse plaani kohaselt taheti vabaneda GST-st trombiiniga lõigates. Paraku olid mutantsed E1 valgud ebastabiilsed ega kannatanud pikka käitlemist. Seepärast rahulduti mutantsete GST E1 liitvalkudega. GST E1 valgud, mis õnnestus puhastada olid: wt, potentsiaalsed arginiin-sõrm mutandid R493K, R538K ja P-ling mutant K439A. Kaasa puhastuv lagu oli neil sarnane, v.a R538K, millel oli väga tugev spetsiifiline lagu. Kaasnev lagu oli E1 (kontrollitud *Western Blotil*) ja GST (valk elueeriti glutatioon sefaroos kandjatelt) spetsiifiline.

Vaatamata GST-le ja lagule olid puhastatud valgud töökõlbulikud, mida näitas EMSA katse kõrgel E1 kontsentratsioonil ehk E2 sõltumatu E1 kompleksi formeerumine (joonis 20. lk 41.).

Seda, et DNA-le seostunud valk tõepoolest E1 on, näitas supershift BPV1 E1 antikeyhaga. Ka EMSA E1 madalamal kontsentratsioonil, kui keskkonnas oli ka puhas E2 valk (joonis 21. lk), näitas valkude töökõlbulikkust. Samuti näitab viimati mainitud katse, et GST E1 mutandid seostuvad E2-ga. On tõestatud, et E1 kompleksid, mis formeeruvad DNA-le nii ilma kui ka koos E2-ga, on identsed. E2-l on selles protsessis kvantitatiivne efekt (Sanders and Stenlund 1998). Mainitud kahe EMSA katse abil määrati ka milliste valgu kogustega peab töötama, et näha erinevaid E1 ja E1-E2 komplekside formeerumist DNA-le.

Paraku kummaski katses ei töötnud R538K, millest me järeldasime, et see valk on inaktiivne. Põhjuseks võib olla kaasa tulnud lagu rohkus, mis kaasnes kõigi 538 positsiooni mutantidega. Sellest üritati vabaneda kasutades MonoQ Sepharose kolonni ent valgu aktiivsus ei taastunud. Q kolonni kasutati, kuna see on positiivselt laetud ning seega seob hästi E1 C-terminaalset osa, mis on negatiivselt laetud. R538K inaktiivsuse põhjuseks võib olla ka valgu pakkumisel toimunud konformatsioonilised muutused. Seega ei saa teha edaspidiseid järeldusi antud valgu mutatsiooni mõjust selle valgu defektsusele.

Töökõlbulikud valgud käes, saime asuda käesoleva töö põhiküsimuse juurde: millises ATP-d nõudvas protsessis käitub E1 arginiini mutant R493K teisiti kui E1 wt? On teada, et E1 vajab ATP-d kolmes eraldi protsessis, millest kaks on seotud selle DNA-le oligomeriseerumisega. Sündmuste järjekorras esimeseks selliseks on E2 ära ajamine 2E1-2E2 kompleksist, teiseks E1 heksameeri moodustumine peale E2 lahkumist, kolmandaks helikaasne töö. ATP-d nõudvaid E1 oligomeriseerumise etappe vaadati nii täispikka BPV1 ORI sisaldaval plasmidil pUCAlul kui ka selle lühematel vormidel pUCΔ11 ja pUCΔ12-l, kuna E2 BS11 ja E2 BS12 funktsioon ei ole täpselt sama.

EMSA katses, kus vaadati E2 lahkumist 2E1-2E2 kompleksist ATP mõjul (joonis 22. lk 43.) käitusid E1 mutandid wt E1-st erinevalt. GST E1 wt moodustas E2 juuresolekul 2E1-2E2 kompleksi ORI-le, kust E2 lahkus ATP mõjul ja tekkis jällegi E1 oligomeer. Pisut kehvemini toimus see pUCΔ11-lt, kus jäi osa E2 ikka E1-ga kompleksi. pUCΔ12 ei tekkinud 2E1-2E2 kompleksi, mis on ka loogiline, sest E2 BS12 on vastutav selle kompleksi tekkes. Summaarse pildi toimuvast annab täispikka BPV1 ORI-ga pUCAlul toimuv. GST R493K E1 ehk arginiini mutant moodustas eelistatult 2E1-2E2 kompleksi, millest lahkus E2 ATP mõjul halvemini kui wt puhul. Eriti selgelt on näha seda pUCΔ11-l, kus ATP lisamine ei muuda tekkinud 2E1-2E2 kompleksi kuidagi. Seega saab siit järeldada, et juba selles oligomeriseerumise etapis on

positsioonis 493 vaja arginiini. GST E1 R538K oli katses jätkuvalt inaktiivne. Võrdlev katse P-ling mutandi GST E1 K439A näitas, et see mutant käitus nii wt-ist kui ka arginiini mutandist erinevalt. ORI-le tekkis ainult 2E1-2E2 kompleks ning pUC Δ 12 puhul toimus see väga nõrgalt. ATP lisamine vähendas oluliselt valk-DNA kompleksi teket, mis on seletatav selle mutandi teadaoleva ATP hüdroolüüsi defektsusega (MacPherson, Thorner et al. 1994).

EMSA katses, kus vaadati E1 oligomeriseerumist ATP mõjul (heksameeri teke), kasutati etiidiumbromiidi, et vabastada DNA muudest E2 ja ATP mõjul formeerunud valk kompleksidest (joonis 23. lk 44.) Selle kemikaali mõjul jääb alles ainult ümber DNA oligomeriseerunud E1 (kaksik tri- kuni heksameer). 4E1 ja 2E1-2E2 kompleks sellistel tingimustel DNA-lt eemaldatakse. Selles katses E1 oligomeriseerumine erinevatele BPV1 ORI-dele omavahel ei erinenud, mis on seletatav sellega, et vaadeldavas E1 multimeriseerumis protsessis ei ole E2 sidumiskohtadel enam sellist tähtsust kui E1 oligomeriseerumise esimestel etappidel neil on. Küll aga käitusid E1 mutandid erinevalt E1 wt-st. ATP mõjus stimuleerivalt selle kompleksi tekkele nii GST E1 wt kui ka arginiini mutandi GST E1 R493K puhul ent viimase puhul toimus see protsess oluliselt halvemini. GST E1 R538K oli jätkuvalt inaktiivne. Üllatav oli P-ling mutandi GST K439A käitumine. Nimelt oodatavat E1 multimeeri ei formeerunud DNA-le üldse, ka mitte ATP mõjul. Sellest järeldub, et varem nähtud kompleksid said olla ainult 4E1 ja 2E1-2E2 kompleksid antud mutandi puhul. Selline käitumine on seletatav jällegi ATP hüdroolüüsi defektsusega.

Üldiselt nendest EMSA katsetest järeldub, et kui valgu defektsus avaldub juba selle oligomeriseerumise esimeses etapis nagu me 493K puhul nägime, akumulereb see mõju läbi järgnevate etappide, mis lõpuks põhjustabki võimetuse oma füsioloogilist rolli täita.

ATPaasi katse sõelamise meetodil näitab ATP hüdroolüüsi E1 helikaasses töös. Selgus, et GST E1 wt-i aktiivsus ja sõltuvus sscDNA juuresolekust reaktsioonis on võrreldav puhta E1 wt-ga. Varasemad andmed (H. Fausti bakalaureusetöö) näitasid, et mutandid on ATPaasis täiesti inaktiivsed. Uued katsed näitasid, et see ei ole päris nii. Kõik mutantsed valgud hüdroolüüsisid küll ATP-d kordi kehvemini wt-ist kuid teatav sscDNA-st sõltuv ATPaasne aktiivsus avaldus. GST E1 mutantidest omas madalaimat ATPaasest aktiivsust R493K. Üllatav oli R538K suhteliselt kõrgem aktiivsus ent ei saa välistada kasutatud GST E1 valgusegu E1 sõltumatut ATPaasest aktiivsust. See võib tuleneda tugevast spetsiifilisest lagust, mis selle mutandi puhastamisega kaasnes. Lagu võis omada ATPaasest domeeni ent DNA-d siduv domeen võis

puududa. Aga välistada ei saa, et R538K tõepoolest teistest E1 mutantidest ATP-d paremini hüdrolüüsib.

Katses, kus loodeti näha komplementatsiooni mehhanismidest tulenevat ATPaasse aktiivsuse taastumist, seda detekteerida ei õnnestunud. P-ling ja arginiin-sõrm mutandid moodustasid küll ühiseid heksameere (joonis 26. lk 47.), kuid ATPaasne aktiivsus ei ületanud märkimisväärselt aktiivsust, mida omasid mutandid eraldi võetuna (joonis 25. E, F lk 46.).

Kirjanduse andmed HPV18 E1 ja SV40 LT-age arginiin-sõrme positsiooni kohta on vastukäivad. Kristallstruktuurid näitavad, et mõlemad potentsiaalsed arginiin-sõrmed asuvad aktiivtsentris, seega võivad need mõlemad seda olla. HPV18 puhul pakuti selleks 538 positsiooni, mille muteerimise tulemusena ATPaasne aktiivsus kadus. LT-age dimeeri puhul pakuti struktuuri põhjal selleks positsiooni 493 ent funktsionaalselt ei kinnitatud seda oletust. LT-age puhul näidati hiljem, et arginiinide paiknemine aktiivtsentris sõltub kas kompleksis on ATP või ADP. Seni ei ole avaldatud kristallstruktuuri sellisel kujul, kus oleks kompleksis ka DNA ning oleks seega looduslikule situatsioonile sarnasem.

Käesolev töö on esimene omasugune, kus arginiin-sõrme olemasolu uuritakse vaadeldes mutantse GST valgu käitumist kasutades EMSA-t. Uuritavat 493 positsiooni arginiini võib nimetada arginiin-sõrmeks, kuna see on vajalik ATP hüdrolüüsi nõudvates protsessides, milleks oli E2 eemaldamine ORI-le formeeruvast E1 kompleksist ja ATP hüdrolüüs helikaasses töös. Kuna mõlemad ATP-d nõudvad protsessid olid defektsed tänu ühe aminohappe muutusele, jääb mulje, et kõik E1 erinevad ATPaassed protsessid toimuvad sama mehhanismiga. Paraku jääb saladuseks, kuidas oleks käitunud neis katsetes 538 positsiooni mutant. Siinkohal jääb veel võimalus, et see mutant ei töötanud EMSA katsetes, kuna muudetud positsioon on vajalik hoopis E1 monomeeri sidumiseks teise E1 molekuliga või DNA-ga. Tõenäolisem on siiski variant, et selle valgu konformatsioon bakteris ekspresseerituna oli muutunud nii, et see ei võimaldanud DNA-le seostumist.

Kokkuvõte

Käesoleva töö kirjanduslik osa käsitleb veise papilloomiviiruse tüüp ühte, selle E1 valku, selle funktsioone ja struktuurset-funktsionaalset üksust arginiin-sõrm. E1-l on ATPaasne, helikaasne ning DNA-d siduv aktiivsus. Arginiin- sõrm on mitmete NTP-d siduvate valkude puhul näidatud kui NTP hüdroolüüsi hõlbustav üksus. Käesoleva töö praktilise osa eesmärgiks oli jätkata tööd, mis näitaks, kas BPV1 E1-l on funktsionaalne arginiin-sõrm. BPV1 E1 puhul ei ole funktsionaalset arginiin-sõrm veel näidatud, ent E1 aminohappejärjestuses on olemas arginiinid, mis võivad selleks osutada.

Tulemused:

1. Arginiini mutantsed valgud ei toetanud ka lühendatud ORI sisaldavate plasmiidide pUC Δ 11 ja pUC Δ 12 replikatsiooni, mis näitab et defektsus replikatsioonis ei ole seotud vaid E2 eemaldamisega E1-E2 kompleksist.
2. Replikatsioon ei toimunud ka siis, kui katses esinesid koos erineva positsiooni arginiini mutandid ja P-ling mutant. Seega ei toimu nende vahel komplementatsiooni.
3. COS-7 rakulüsaadiga ei teki spetsiifilisi valk-DNA komplekse EMSA-s vaadeldud tingimustel.
4. Puhastati GST E1 valgud wt, R493K, R538K ja K439A.
5. GST E1 valgud annavad spetsiifilisi valk-DNA komplekse EMSA-s, inaktiivseks osutus selles katses R538K.
6. Arginiini mutant 493K on defektne E2 ära ajamises E1-E2 kompleksist ATP mõjul. Samuti ATP-d nõudev heksameeri moodustumine on selle mutandi puhul vähem efektiivne võrreldes wt-ga.
7. ATPaasne aktiivsus oli E1 wt ja GST E1 wt puhul võrreldav.
8. Mutantsed valgud hüdroolüüsisid ATP-d kordi kehvemini kui wt. ATPaasne aktiivsus ei paranenud, kui heksameer oli moodustunud P-ling ja arginiin-sõrm mutantsete E1 monomeeride segust.

Tulemustest järeldub, et positsiooni 493 arginiin on vajalik ATP-d nõudvates protsessides, milleks on E2 ära ajamine E1-E2 kompleksist, E1 heksameeri moodustumine ning ATP hüdroolüüs üldiselt. Katsetes ei täheldatud komplementatsiooni mehhanisme P-ling ja arginiin-sõrm positsioonide vahel. Arginiini positsioonis 493 võib nimetada arginiin-sõrmeks vaatamata sellele, et EMSA-ga ei õnnestunud jälgida 538 positsiooni arginiini mutandi käitumist.

SUMMARY

Papillomaviruses are small DNA tumor viruses that cause benign epithelial proliferation. For viral DNA replication, an E1 translational open reading frame is required. The E1 protein is a hexameric helicase which belongs to the helicase superfamily SF3. E1 is a multifunctional protein whose properties include DNA binding, ATP binding and acting as an ATP-dependent DNA helicase. To hydrolyse ATP, E1 probably needs a structural unit named arginine-finger. In the process, each subunit contributes an arginine residue to the preceding active site. The arginine-finger is believed to be common among the hexameric helicases, but BPV1 E1 has never before been shown to have this unit. In the present work, we examine the possibilities that one of the conserved arginines in the C-terminal helicase domain could be the arginine-finger. The crystal structures of HPV18 E1 and SV40 LT-ag show that both of these locate in active centre of ATP hydrolysis. ATP is needed in three distinct processes of E1 working cycle: these are displacement of E2 from E1-E2 complex in first step of E1 oligomerization, hexamere formation with ORI melting and helicase work.

In order to clarify existence of the arginine-finger, we generated E1 mutants R493A, R493Q, R493K, R538A, R538Q, R538K and examined their properties in different assays. Our previous results show that these mutants are defective in replication and in ATP hydrolysis. Now we found that the mutants do not support replication of plasmids pUC Δ 11 and pUC Δ 12 where one E2 binding site has removed. It shows that mutants are not defective only because of the E2 displacement from initiation complex. Results show that there is no complementation between arginine-finger and P-loop mutant *in vivo* and *in vitro*. In order to study the effect of mutations further, we tried to use cell lysate in EMSA, but it was impossible to see specific protein-DNA complexes there. So we purified GST E1 proteins for biochemical assays. GST E1 mutants were active in EMSA, except R538A, which had much more specific degradation products. We found that R493K mutant is defective already in E2 displacement from ORI and in ATP hydrolysis.

We have showed in our study that arginine in position 493 is essential for functional E1 and it might be the arginine-finger though we do not know how acts arginine in position 538.

Kasutatud kirjandus

Abbate, E. A., J. M. Berger, et al. (2004). "The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2." Genes Dev **18**(16): 1981-96.

Ahmad, Z. and A. E. Senior (2004). "Mutagenesis of residue betaArg-246 in the phosphate-binding subdomain of catalytic sites of Escherichia coli F1-ATPase." J Biol Chem **279**(30): 31505-13.

Ahmadian, M. R., P. Stege, et al. (1997). "Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras." Nat Struct Biol **4**(9): 686-9.

Benson, J. D. and P. M. Howley (1995). "Amino-terminal domains of the bovine papillomavirus type 1 E1 and E2 proteins participate in complex formation." J Virol **69**(7): 4364-72.

Berg, M. and A. Stenlund (1997). "Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins." J Virol **71**(5): 3853-63.

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

Bream, G. P., W (1994). Shope Papilloma and Bvine Papillomaviruses. Encyclopedia of Virology. London, San Diego Academic Press: 1305-1311.

Caruthers, J. M. and D. B. McKay (2002). "Helicase structure and mechanism." Curr Opin Struct Biol **12**(1): 123-33.

Chen, G. and A. Stenlund (1998). "Characterization of the DNA-binding domain of the bovine papillomavirus replication initiator E1." J Virol **72**(4): 2567-76.

Chen, G. and A. Stenlund (2001). "The E1 initiator recognizes multiple overlapping sites in the papillomavirus origin of DNA replication." J Virol **75**(1): 292-302.

Clertant, P. and I. Seif (1984). "A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins?" Nature **311**(5983): 276-9.

Davey, M. J., C. Indiani, et al. (2003). "Reconstitution of the Mcm2-7p heterohexamer, subunit arrangement, and ATP site architecture." J Biol Chem **278**(7): 4491-9.

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

Deng, W., G. Jin, et al. (2003). "mRNA splicing regulates human papillomavirus type 11 E1 protein production and DNA replication." J Virol **77**(19): 10213-26.

Enemark, E. J., A. Stenlund, et al. (2002). "Crystal structures of two intermediates in the assembly of the papillomavirus replication initiation complex." Embo J **21**(6): 1487-96.

- Faust, H. (2002). "Veise papillomoviirus tüüp 1 arginiin-finger NTPaasina" TÜ MRI keskastme lõputöö.
- Faust, H. (2003). "Veise papillomoviirus tüüp 1 arginiin-finger NTPaasina" TÜ MRI bakalaureusetöö.
- Fouts, E. T., X. Yu, et al. (1999). "Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase." *J Biol Chem* **274**(7): 4447-58.
- Gai, D., R. Zhao, et al. (2004). "Mechanisms of conformational change for a replicative hexameric helicase of SV40 large tumor antigen." *Cell* **119**(1): 47-60.
- Gillette, T. G. and J. A. Borowiec (1998). "Distinct roles of two binding sites for the bovine papillomavirus (BPV) E2 transactivator on BPV DNA replication." *Journal of Virology* **72**(7): 5735-44.
- Gillitzer, E., G. Chen, et al. (2000). "Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding." *Embo J* **19**(12): 3069-79.
- Gomez-Lorenzo, M. G., M. Valle, et al. (2003). "Large T antigen on the simian virus 40 origin of replication: a 3D snapshot prior to DNA replication." *Embo J* **22**(23): 6205-13.
- Gonzalez, A., C. Bazaldua-Hernandez, et al. (2000). "Identification of a short, hydrophilic amino acid sequence critical for origin recognition by the bovine papillomavirus E1 protein." *J Virol* **74**(1): 245-53.
- Gorbalenya, A. (1993). "Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships." *Curr Opin Struct Biol* **3**: 419-429.
- Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, et al. (1990). "A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses." *FEBS Lett* **262**(1): 145-8.
- Hickman, A. B., D. R. Ronning, et al. (2002). "Structural unity among viral origin binding proteins: crystal structure of the nuclease domain of adeno-associated virus Rep." *Mol Cell* **10**(2): 327-37.
- Hishida, T., Y. W. Han, et al. (2004). "Direct evidence that a conserved arginine in RuvB AAA+ ATPase acts as an allosteric effector for the ATPase activity of the adjacent subunit in a hexamer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(26): 9573-7.
- Holt, S. E., G. Schuller, et al. (1994). "DNA binding specificity of the bovine papillomavirus E1 protein is determined by sequences contained within an 18-base-pair inverted repeat element at the origin of replication." *J Virol* **68**(2): 1094-102.
- Howley, P. M. (1996). Papillomavirinae: the viruses and their replication. *Virology*. Philadelphia, Lippincott- Raven Publishers: 2045-2076.
- James, J. A., C. R. Escalante, et al. (2003). "Crystal structure of the SF3 helicase from adeno-associated virus type 2." *Structure (Camb)* **11**(8): 1025-35.

- Li, D., R. Zhao, et al. (2003). "Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen." Nature **423**(6939): 512-8.
- Lin, B. Y., A. M. Makhov, et al. (2002). "Chaperone proteins abrogate inhibition of the human papillomavirus (HPV) E1 replicative helicase by the HPV E2 protein." Mol Cell Biol **22**(18): 6592-604.
- Luo, X., D. G. Sanford, et al. (1996). "Solution structure of the origin DNA-binding domain of SV40 T-antigen." Nat Struct Biol **3**(12): 1034-9.
- Lupas, A. N. and J. Martin (2002). "AAA proteins." Curr Opin Struct Biol **12**(6): 746-53.
- Ma, T., N. Zou, et al. (1999). "Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 382-7.
- MacPherson, P., L. Thorner, et al. (1994). "The bovine papilloma virus E1 protein has ATPase activity essential to viral DNA replication and efficient transformation in cells." Virology **204**(1): 403-8.
- Mansky, K. C., A. Batiza, et al. (1997). "Bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen share regions of sequence similarity required for multiple functions." J Virol **71**(10): 7600-8.
- Masterson, P. J., M. A. Stanley, et al. (1998). "A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit." J Virol **72**(9): 7407-19.
- Moscufo, N., F. Sverdrup, et al. (1999). "Two distinct regions of the BPV1 E1 replication protein interact with the activation domain of E2." Virus Res **65**(2): 141-54.
- Nadanaciva, S., J. Weber, et al. (1999). "Importance of F1-ATPase residue alpha-Arg-376 for catalytic transition state stabilization." Biochemistry **38**(47): 15493-9.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, et al. (1999). "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes." Genome Res **9**(1): 27-43.
- Niedenzu, T., D. Roleke, et al. (2001). "Crystal structure of the hexameric replicative helicase RepA of plasmid RSF1010." J Mol Biol **306**(3): 479-87.
- Parker, L. M., S. Harris, et al. (2000). "The bovine papillomavirus E2 transactivator is stimulated by the E1 initiator through the E2 activation domain." Virology **270**(2): 430-43.
- Parsons, R. and P. Tegtmeyer (1992). "Spacing is crucial for coordination of domain functions within the simian virus 40 core origin of replication." J Virol **66**(4): 1933-42.
- Putnam, C. D., S. B. Clancy, et al. (2001). "Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor." J Mol Biol **311**(2): 297-310.

- San Martin, M. C., C. Gruss, et al. (1997). "Six molecules of SV40 large T antigen assemble in a propeller-shaped particle around a channel." J Mol Biol **268**(1): 15-20.
- Sanders, C. M. and A. Stenlund (1998). "Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor." Embo J **17**(23): 7044-55.
- Sanders, C. M. and A. Stenlund (2000). "Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex." J Biol Chem **275**(5): 3522-34.
- Sawaya, M. R., S. Guo, et al. (1999). "Crystal structure of the helicase domain from the replicative helicase- primase of bacteriophage T7." Cell **99**(2): 167-77.
- Sedman, J. and A. Stenlund (1995). "Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro." Embo J **14**(24): 6218-28.
- Sedman, J. and A. Stenlund (1996). "The initiator protein E1 binds to the bovine papillomavirus origin of replication as a trimeric ring-like structure." The Embo Journal **15**(18): 5085-92.
- Sedman, J. and A. Stenlund (1998). "The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities." J Virol **72**(8): 6893-7.
- Sedman, T., J. Sedman, et al. (1997). "Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus." J Virol **71**(4): 2887-96.
- Seo, Y. S., F. Muller, et al. (1993). "Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2865-9.
- Singleton, M. R., M. R. Sawaya, et al. (2000). "Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides." Cell **101**(6): 589-600.
- Stasiak, A., I. R. Tsaneva, et al. (1994). "The Escherichia coli RuvB branch migration protein forms double hexameric rings around DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7618-22.
- Stenlund, A. (2003). "E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding." Embo J **22**(4): 954-63.
- Sun, S., L. Thorner, et al. (1990). "Identification of a 68-kilodalton nuclear ATP-binding phosphoprotein encoded by bovine papillomavirus type 1." J Virol **64**(10): 5093-105.
- Sverdrup, F. M., G (1997). The E1 Proteins. Human Papillomaviruses 1997. H.-U. Bernard. Los Almos, Los Almos National Laboratory.
- Swindle, C. S. and J. A. Engler (1998). "Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1." J Virol **72**(3): 1994-2001.

Thorner, L., N. Bucay, et al. (1988). "The product of the bovine papillomavirus type 1 modulator gene (M) is a phosphoprotein." J Virol **62**(7): 2474-82.

Titolo, S., A. Pelletier, et al. (2000). "Identification of domains of the human papillomavirus type 11 E1 helicase involved in oligomerization and binding to the viral origin." J Virol **74**(16): 7349-61.

Ustav, M. and A. Stenlund (1991). "Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames." Embo J **10**(2): 449-57.

Ustav, M., E. Ustav, et al. (1991). "Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1." Embo J **10**(13): 4321-9.

Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001). "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." Science **294**(5545): 1299-304.

Walker, J. E., M. Saraste, et al. (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." Embo J **1**(8): 945-51.

West, M., D. Flanery, et al. (2001). "Functional mapping of the DNA binding domain of bovine papillomavirus E1 protein." J Virol **75**(24): 11948-60.

White, P. W., A. Pelletier, et al. (2001). "Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain." J Biol Chem **276**(25): 22426-38.

Wilson, V. G., M. West, et al. (2002). "Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features." Virus Genes **24**(3): 275-90.

Woytek, K. J., D. Rangasamy, et al. (2001). "Effects of mutations within two hydrophilic regions of the bovine papillomavirus type 1 E1 DNA-binding domain on E1-E2 interaction." J Gen Virol **82**(Pt 10): 2341-51.

Yang, L., I. Mohr, et al. (1993). "The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5086-90.

Zanardi, T. A., C. M. Stanley, et al. (1997). "Modulation of bovine papillomavirus DNA replication by phosphorylation of the viral E1 protein." Virology **228**(1): 1-10.