

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Liisi Henno

**Inimese papilloomiviiruse tüüp 18 DNA  
replikatsiooni ja oligomerisatsiooni jälgimine U2OS  
rakkudes lühiajalise replikatsiooni tingimustes**

Magistritöö

Juhendajad

PhD Ene Ustav

MSc Marit Orav

Tartu 2013

# SISUKOKKUVÕTE

Sisukokkuvõte .....	2
Kasutatud lühendid .....	4
Sissejuhatus .....	6
1. Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1. Papilloomiviiruste üldiseloomustus .....	7
1.2. Inimese papilloomiviirused .....	7
1.2.1. Nahka nakatavad papilloomiviirused .....	8
1.2.2. Limaskesti nakatavad papilloomiviirused .....	8
1.3. Inimese papilloomiviiruse genoom .....	9
1.3.1. Lugemisraamid .....	9
1.4. Inimese papilloomiviiruse elutsükkel .....	12
1.4.1. Kihistunud lameepiteeli ehitus ja arengutsükkel .....	12
1.4.2. Inimese papilloomiviiruse infektsiooni algusetapid .....	12
1.4.3. Stabiilne replikatsioon .....	14
1.4.4. Teistkordne amplifikatsioon .....	14
1.5. HPV replikatsiooniks vajalikud <i>cis</i> elemendid ja <i>trans</i> faktorid .....	15
1.6. Mudelsüsteemid HPV DNA replikatsiooni uurimiseks .....	18
1.7. DNA kahjustustejärgne rakuline vastus ja selle seotus rekombinatsiooni mehhanismidega .....	19
1.7.1. DNA kahjustustejärgne rakuline vastus .....	19
1.7.2. Oligomerisatsioon .....	21
2. Eksperimentaalosa .....	22
2.1. Töö eesmärgid .....	22
2.2. Materjal ja meetodika .....	23
2.2.1. Plasmiidid .....	23

2.2.2.	Superspiraliseerunud tsirkulaarne viiruse genoom.....	24
2.2.3.	<i>Minicircle</i> HPV18 URR, HPV18E ja HPV18 tootmine.....	25
2.2.4.	PCR URR fragmentide tegemine .....	26
2.2.5.	Rakuliinid .....	26
2.2.6.	Transfektsioon elektroporatsiooni meetodil .....	27
2.2.7.	Eukarüootsetest rakkudest episomaalse DNA eraldamine Hirt lüüsi meetodil..	27
2.2.8.	Southern blot .....	28
2.2.9.	2D geelelektroforees.....	28
2.3.	Tulemused ja arutelu.....	29
2.3.1.	Transientse replikatsiooni analüüsi katsetingimuste optimeerimine ja mc HPV18 ning mc HPV18 E8 <sup>E2</sup> mutandi võrdlus .....	29
2.3.2.	Mc HPV18 ja mc HPV18E replikatsioon ja oligomerisatsioon U2OS-s rakkudes 32	
2.3.3.	Mc HPV18 URR oligomerisatsioon .....	34
2.3.4.	HPV18 URR-is paiknevate E1 ja E2 seondumiskiirkondade mõju replikatsioonile ja oligomerisatsioonile; .....	38
2.3.4.1.	<i>Minicircle</i> HPV18 URR ja PCR fragmentide oligomeriseerumise võrdlus .....	38
2.3.4.2.	Replitseeruva ja oligomeriseeruva HPV18 URR minimaalse ori leidmine .....	40
	Kokkuvõte .....	46
	Résumé .....	47
	Kasutatud materjalid.....	48
	Lisad .....	55

# KASUTATUD LÜHENDID

1D – ühedimensionaalne

2D – kahedimensionaalne

ATM – *ataxia telangiectasia mutated* kinaas (*ataxia telangiectasia mutated kinase*)

ATR – ATM ja Rad50 sõltuv kinaas (*ATM and Rad50 dependent kinase*)

BPV – veise papilloomiviirus (*bovine papilloma virus*)

ccc DNA – kovalentselt suletud superspiraliseerunud DNA (*covalently closed circular DNA*)

E valgud – varajased valgud (*early*)

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

E2B1, E2B2, E2B3, E2B4 – vastavalt esimene, teine, kolmas ja neljas E2 seondumisjärjestus

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

HPV – inimese papilloomiviirus (*human papilloma virus*)

L valgud – hilised valgud (*late*)

LCR – papilloomiviiruse peamine reguleeriv järjestus (*long control region*) = URR

lin DNA – lineaarne DNA

M faas – rakutsükli faas, kus rakk jaguneb tütarakkudeks

mc – kovalentselt suletud superspiraliseerunud konformatsioonis DNA ehk pisirõngas (*minicircle*)

oc DNA – avatud ringi vormis DNA (*open circular DNA*)

ORF – avatud lugemisraam (*open reading frame*)

p53 – oluline rakuline tuumorsupressorvalk

PIKK – fosfatidüülinoositol-3 kinaaside perekond (*phosphatidylinositol 3-kinase related kinase family*)

pRB – retinoblastoomi valk

PV – papilloomiviirus

RPA – replikatsioonivalk A

S faas – rakutsükli faas, kus toimub raku DNA replikatsioon

U2OS rakuliin – inimese osteosarkoomist algatatud rakuliin

URR – papilloomiviiruse peamine reguleeriv järjestus (*upstream regulatory region*) = LCR

UV kiirgus – ultravioletne kiirgus

wt – metsik-tüüpi (*wild-type*)

## SISSEJUHATUS

Papilloomiviirused (PV-d) on väikesed kaheahelalise DNA genoomiga viirused, mis on võimelised nakatama mitmeid imetajaid, linde ja roomajaid. Inimese papilloomiviirused (HPV-d) on populatsioonis laialt levinud olulised patogeenid, mille infektsioonile on iseloomulik epiteeli enamjaolt healoomuliste vohandite tekitamine. Kuna mõnede inimese papilloomiviiruse tüüpide tekitatud kasvaja võivad areneda halvaloomulisteks, on tegemist oluliste uurimisobjektidega.

Käesolevas töös kasutan meie töögrupi poolt välja töötatud U2OS rakkudel põhinevat mudelsüsteemi uurimaks HPV tüüp 18 (HPV18) DNA lühiajalise replikatsiooni käigus tekkivaid viiruse genoomi oligomeere ning otsin minimaalset HPV järjestust, mis replitseerub ja oligomeriseerub. HPV genoomi oligomeriseerumine on seni põhjalikult uurimata protsess, mille mõistmine võib anda uusi olulisi teadmisi viiruse infektsioonitsüklist. Katseteks valiti HPV 18 genoom, kuna tegu on ühe laialdasemalt levinud HPV tüübiga, mille nakkus võib viia vähi tekkeni. Töö teoreetilises osas annan lühiülevaate inimese papilloomiviirustest, nende elutsüklist, genoomi ülesehitusest ja toon välja viiruse kodeeritavate valkude peamised funktsioonid. Samuti tutvustan oligomerisatsiooni protsessi ning kirjeldan lühidalt rakulist DNA kahjustuse vastust, mis võib olla seotud oligomeeride tekkimisega.

Töö on kirjutatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis (TÜTI) ja tänan kõiki oma uurimisgrupi liikmeid, kes töö kirjutamisele on kaasa aidanud, eriti oma juhendajaid Marit Oravat ja Ene Ustavit.

# **1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE**

## **1.1. PAPILLOOMIVIIRUSTE ÜLDISELOOMUSTUS**

Papilloomiviirused (PV-d) on väikese kaheaheelalise DNA genoomiga viirused, mille peremeesorganismide hulka kuuluvad inimesed ning mitmed teised imetajaid, kahepaiksed ja linnud. PV genoomi katab ilma membraanita valguline kapsiid, mis koosneb kokku 72 kapsomeerist. Papilloomiviiruste virionide diameeter on ~55nm (Baker et al., 1991).

Papilloomiviirused on äärmiselt koespetsiifilised ning on võimelised edukalt nakatama ainult epiteelkoe peamist rakutüüpi – keratinotsüüte. Papilloomiviiruste infektsioonile on iseloomulik tekitada peremeesorganismis healoomulisi kasvajaid nagu tüükaid ja papilloome.

Erinevate peremeesorganismidega kohanenud papilloomiviirused on evolutsioneerunud ligi kahesajaks eri tüübiks. Papilloomiviirusi jagatakse erinevateks tüüpideks nende kõige konserveerunuma valgu L1 lugemisraami põhjal. Kui nukleotiidne järjestus erineb vähemalt 10% seni teadaolevate PV tüüpide järjestusest, saab defineerida uue tüübi (Bernard et al., 2010).

## **1.2. INIMESE PAPILLOOMIVIIRUSED**

Tänaseks on kirjeldatud ligikaudu 120 inimest nakatavat papilloomiviiruse tüüpi (Bernard et al., 2010). Vastavalt nakatatavale epiteelkoele jagatakse inimese papilloomiviirused (HPV-d) naha ja limaskestade papilloomiviirusteks, mis jagunevad omakorda kõrge- ja madalariski HPV-deks. Madalariski papilloomiviirused põhjustavad epiteelkoe healoomulisi vohandeid, mis nahal ilmnevad peamiselt soolatüügaste ja papilloomidena, limaskestadel aga kondüloomidena. Kõrgeriski HPV infektsioon võib viia epiteelkoe vähieelse seisundi tekkeni, mis omakorda võib areneda halvaloomuliseks kasvajaks. Kokku seostatakse ligi 5.2% kõikidest vähkidest inimese papilloomiviirustega (Stanley, 2012). Sellest tingituna on HPV-d oluliseks uurimisobjektiks.

### **1.2.1. NAHKA NAKATAVAD PAPILLOOMIVIIRUSED**

Nahka nakatavad papilloomiviirused on inimeste seas laialt levinud ning neid võib pidada naha normaalse mikrofloora hulka kuuluvateks (Antonsson et al., 2003). Madalariski naha papilloomiviirused (näiteks HPV1, HPV2 ja HPV4) tekitavad juba mainitud soolatüükaid ja papilloome (Cardoso and Calonje, 2011).

Kõrgeriski naha papilloomiviirusteks peetavad HPV5 ja HPV8 on populatsioonis kõige levinumad (näiteks HPV5 esineb ~6% inimestest) (Antonsson et al., 2003). Neid klassifitseeritakse kõrgeriski tüüpideks, kuna neid seostatakse nahahaigusega *Epidermodysplasia verruciformis* (EV). EV on harvaesinev päriliku eelsoodumusega haigus, mille tulemusena tekivad nahale tüükalaadsed kasvajakasvud, mis võivad ajapikku areneda pahaloomulisteks. Enamikel juhtudel progresseeruvad halvaloomulisteks UV kiirgusele eksponeeritud kehapiirkondades olevad kasvajakasvud. Üldjuhul kujuneb vähk välja inimestel, kellel on puudulik immuunsüsteem (Cardoso and Calonje, 2011). Siiski pole kindlaid tõendeid selle kohta, et HPV-d põhjustaksid nahavähki. Katseliste tõendite põhjal võib oletada, et HPV aitab koos UV kiirgusega kaasa vähi tekkele, aga edaspidine vähi areng ei sõltu papilloomiviiruse DNA olemasolust rakus (Aldabagh et al., 2013).

### **1.2.2. LIMASKESTI NAKATAVAD PAPILLOOMIVIIRUSED**

Limaskesti nakatavad papilloomiviirused levivad peamiselt sugulisel teel ja põhjustavad suguelundite, aga ka kurgu ning kaela piirkonna erinevaid hea- või halvaloomulisi kasvajakasvuid. Levinuimad madalariski papilloomiviirused on HPV6 ja HPV11, mille geneetilist materjali on leitud rohkem kui 90% maailmas diagnoositud kondüloomidest (Hawkins et al., 2013). Arvatakse, et 1-5% inimestest esinevad suguelunditel kondüloomid (Patel et al., 2013). Kõrgeriski papilloomiviiruse tüüpe on ligi 15, millest levinuimad on HPV16 ja HPV18 (Stanley, 2012). Kõige sagedamini seostatakse HPV infektsiooni emakakaelavähi tekkega – 99% neist vähkidest sisaldavad kõrgeriski papilloomiviiruse DNA-d vähirakkudes, kõige sagedamini neist HPV16-t (~60%) (Walboomers et al., 1999). Kõrgeriski papilloomiviirused põhjustavad ka eesnäärme-, põie-, anal-, peenise-, pea- ja kaelavähki. Praegu ei ole olemas efektiivseid ravivõimalusi papilloomiviiruse infektsiooni tõrjumiseks, seega on HPV-alaste uuringute jätkamine väga oluline (Moscicki, 2010).



## 1.3. INIMESE PAPILLOOMIVIIRUSE GENOOM

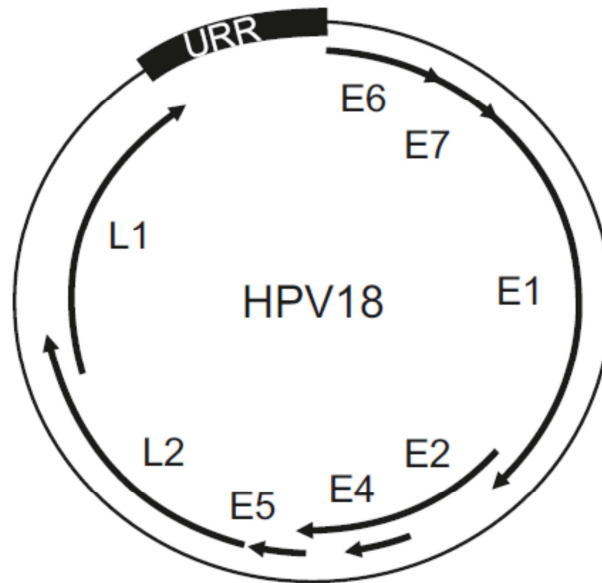
Papilloomiviirused on väikesed tsirkulaarse kaheaheelalise DNA genoomiga viirused. Genoomi pikkus on ligi 8000 aluspaari ning seda võib jagada kolmeks regiooniks: varajane (E ehk *early*), hiline (L ehk *late*) ja peamine regulatoorne ala (LCR ehk *long control region* või ka URR ehk *upstream regulatory region*) (joonis 1).

URR piirkond on ligi 850 aluspaari pikkune ning ei kodeeri ühtegi valku, ent selles on HPV DNA replikatsiooni alguspunkt (*ori*), järjestused genoomi säilitamiseks peremeesrakus rakujagunemise käigus ning transkriptsiooni kontrollelemendid (Demeret et al., 1995; McBride, 2008). URR piirkonnas paiknevad mitmed seondumiskohad nii rakuliste kui ka viiruse enda valkude jaoks, mis toimivad koos kontrollimaks HPV genoomilt toimuvat transkriptsiooni ja replikatsiooni (Lee et al., 1997).

### 1.3.1. LUGEMISRAAMID

HPV genoomilt ekspresseeritakse papilloomiviiruse infektsiooni eri etappidel varajasi – E1, E2, E1<sup>E4</sup>, E5, E6 ja E7 – ning hilised valke – L1 ja L2.

E1 ja E2 on ainsad viiruslikud valgud, mida papilloomiviirused vajavad oma genoomi paljundamiseks (Chiang et al., 1992b; Remm et al., 1992; Sverdrup and Khan, 1994; Ustav and Stenlund, 1991). Kuna PV-te puhul on tegemist väikeste viirustega, mis kodeerivad piiratud hulka valke, kasutavad nad oma genoomi paljundamiseks lisaks ka peremeesraku DNA replikatsiooni masinavärki. E1 ja E2 valkude koostöö tulemusel värvatakse replikatsioonikompleks viiruse *origin* piirkonnale ning algatatakse kahesuunaline DNA paljundamine. Lisaks rollile PV genoomi replikatsiooni initsiatsioonil on E2 ka oluline regulaatorvalk. Täpsemalt on nende valkude funktsioone kirjeldatud peatükis 4.5.



**Joonis 1. HPV18 genoomi skemaatiline ehitus.**

HPV18 genoom on 7,9 kb suurune ning jaguneb kolmeks piirkonnaks: varajased (E1, E2, E4, E5, E6, E7) ja hilised lugemisraamid (L1, L2) ning mittekodeeriv ala (URR) (Kadaja et al., 2007).

E8 lugemisraamilt kodeeritakse E8<sup>E2C</sup> (ei hõlma kogu E2 valgu lugemisraami, puudub N-terminaalne osa) repressorvalku, mis on tugev replikatsiooni ja varajase geeniekspressiooni inhibiitor. E8 lugemisraami ekspressiooni väljalülitamine viib genoomi koopiarvu tõusuni (Kurg et al., 2010). On näidatud, et E8<sup>E2C</sup> on HPV31 puhul vajalik genoomi stabiilseks säilimiseks inimese keratinotsüütides (Stubenrauch et al., 2000). E8<sup>E2C</sup> mutantse HPV genoomi tugevat replikatsioonimustrit võrreldes metsiktüüpi genoomiga täheldame ka oma U2OS rakuliinil põhinevas mudelsüsteemis.

E1<sup>E4</sup> on multifunktsionaalne valk, mida ekspresseeritakse kogu viiruse elutsükli jooksul, ent mille tase on kõrgeim infektsiooni viimastes staadiumites. E1<sup>E4</sup> on seotud keratiini intermediaansete filamentide ümberkorraldustega, mis võivad viiruse elutsükli lõppfaasis aidata kaasa virionide vabanemisele. Samuti aitab ta kaasa viiruse DNA sünteesile, indutseerib vajadusel apoptoosi ning mõjutab E2-ga seondudes viiruse genoomi replikatsiooni ja transkriptsiooni aktiivsust (Nakahara et al., 2005).

E5, E6 ja E7 on HPV onkogeense toimega valgud. Nende ekspressioon võib viia peremeesraku transformatsioonini kasvajakarakuks.

E5 valgu roll rakutsükli pole veel päris selge, aga on teada, et ta võimendab E6 ja E7 valkude transformeerivaid omadusi. Selle väikese valgu tuvastamine on raske, kuna ta ekspressioonitase on väga madal, kuid on teada, et tema süntees ei ole vähi arengu seisukohalt hädavajalik. E5 väldib peremeesraku apoptoosi ja viiruslike antigeenide esitlemist nakatunud raku pinnal (Cai et al., 2013).

Normaalsete keratsinotsüütide jagunemine on rakuliste retinoblastoomi (Rb) perekonna valkude kontrolli all. Rb reguleerib E2F transkriptsioonifaktorite aktiivsust, mis omakorda kontrollivad rakutsükli üleminekut G1 faasist S faasi (Moody and Laimins, 2010). HPV E7 valgu seondumine tuumorsupressor Rb valkudega (Dyson et al., 1989) aga suunab nad lagundamisele. Selle tulemusena liigub rakutsükkel S faasi, millega kaasneb viiruse genoomi paljundamiseks vajalike rakuliste replikatsioonifaktorite aktiveerumine. Kõikide HPV tüüpide E7 valgud seonduvad Rb perekonna valkudega, aga on näidatud, et kõrgeriski papilloomiviiruse E7 valgud on Rb suhtes suurema afiinsusega (Gage et al., 1990).

E7 valgu poolne peremeesraku loomuliku rakutsükli modifitseerimine võib viia rakutsükli peatumise ja apoptoosini läbi p53-sõltuva mehhanismi. Selle vältimiseks seonduvad kõrgeriski E6 valgud p53-ga, mistõttu rakutsükkel ei peatu ja saab jätkuda papilloomiviiruse genoomi replikatsioon (Moody and Laimins, 2010). E7 on HPV peamine onkovalk ja selle ekspressioonist piisab, et muuta primaarsed inimese epiteelirakud surematuks, E6 valgul sellist võimet pole. Nende kahe valgu kombinatsioon on aga efektiivseim variant primaarsete rakkude surematuks muutmiseks (Hawley-Nelson et al., 1989). Kõrge- ja madalariski HPV-de vahe seisnebki nende E6 ja E7 valkude transformeerivas võimekuses. On näidatud, et ainult kõrgeriski viiruse tüüpide onkogeensed valgud on võimelised vältima peremeesraku surma, mis võib viia vähi tekkeni, madalariski HPV-de E6 ja E7 onkogeenne võime on aga madal (Munger et al., 1989; zur Hausen, 2002).

Struktuursete valkude L1 ja L2 ekspressioon toimub viiruse hilises elutsükli faasis. L2 seondub L1-ga ja koos moodustavad nad virioni kapsiidi, kusjuures on näidatud, et L2 valk tagab HPV partikli nakkusvõime. (Zhou et al., 1993).

## **1.4. INIMESE PAPILLOOMIVIIRUSE ELUTSÜKKEL**

Papilloomiviiruste elutsükkel on tihedalt seotud peremeesorganismi epiteeli diferentseerumisega. Nagu eespool juba mainitud, on PV-d äärmiselt koespetsiifilised viirused, mis nakatavad ainult limaskestast või naha epiteeli rakke. Edukaks infektsiooniks peavad papilloomiviirused sisenema epiteeli basaalkihi rakkudesse ning ühildama oma elu- ja replikatsioonitsüklid peremeesraku arengutsükliga (vt joonis 2). Nii HPV genoomi replikatsioon kui ka viiruse elutsükkel jagatakse enamasti kolmeks faasiks (Bodily and Laimins, 2011; Kadaja et al., 2009).

### **1.4.1. KIHISTUNUD LAMEEPITEELI EHITUS JA ARENGUTSÜKKEL**

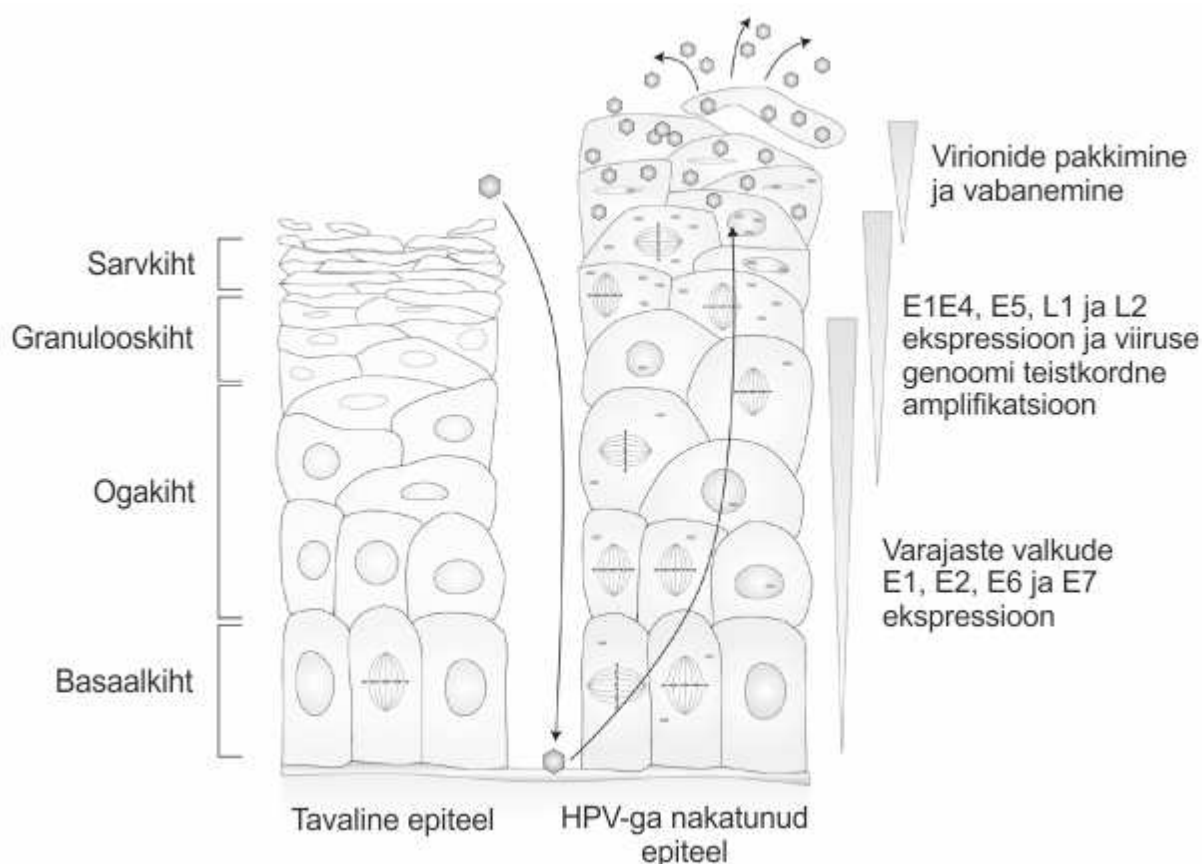
Epiteelkude koosneb erinevas diferentseerumisfaasis olevatest keratinotsüütidest. Normaalses epiteelis on ainult basaalkihi rakud mitootiliselt aktiivsed. Rakujagunemise käigus jääb üks tütarakk basaalkihti ning säilitab paljunemisvõime. Teine tütarakk aga lükatakse ülespoole, kus ta muudab geeniekspressioonimustrit, hakkab diferentseeruma ehk väljub rakutsüklist ning selle tulemusena kaotab võime jaguneda (vt joonis 2). Keratinotsüütide diferentseerumisprogrammi iseloomustab raku tsütoskeleti tugevdamiseks keratiini sünteesimine. Lõpliku diferentseerumise käigus jõuab keratinotsüüt sisseprogrammeeritud rakusurma faasi. Selline loomulik tsükkel kestab umbes 3 nädalat ja viimases etapis koorub surnud keratinotsüüt epiteeli pinnalt (Fuchs, 2008, 2009).

On välja pakutud, et kui virionid sisenevad basaalarakkudesse, tekib pärast esmast kiiret amplifikatsiooni latentne säilumine, aga kui nad nakatavad arengutsüklis juba edasi liikunud rakku, mis enam ei jagune, tekib ainult lühiajaline infektsioon (HPV eemaldub koos kooruvate rakkudega) (Bodily and Laimins, 2011).

### **1.4.2. INIMESE PAPILLOOMIVIIRUSE INFEKTSIOONI ALGUSETAPID**

Inimese papilloomiviiruse virionid jõuavad basaalarakkudeni peamiselt epiteeli vigastuste kaudu. Basaalarakkude nakatamine võimaldab neil tekitada organismis püsiva nakkuse (vt

joonis 2). Viiruse seondumise ja sisenemise mehhanismid on endiselt täpselt teadmata, aga on välja pakutud erinevaid rakulisi ja viiruslikke valke, mis sellele kaasa võiksid aidata. Ühe võimaliku HPV rakulise retseptori kandidaadina on välja toodud hepariinsulfaat, kuid ka teiste rakupinna valkude tähtsust on näidatud HPV sisenemisel peremeesrakku. HPV virioni infektsioonivõimekuse tagamiseks on vaja nii L1 kui ka L2 valku (Horvath et al., 2010; Joyce et al., 1999).



## Joonis 2. Inimese papilloomiviiruse elutsükli skemaatiline esitus.

Pildil on kujutatud tavaline epiteel ja HPV-ga nakatunud epiteel. HPV siseneb vigastuste kaudu epiteeli ja nakatab basaalkihis paiknevaid rakke. Pärast papilloomiviirusega nakatumist toimub peremeesrakus viiruse varajaste geenide ekspressioon ja genoomi esmane amplifikatsioon, millele järgneb latentse säilumise faas, kus viiruse genoom püsib peremeesraku tuumas stabiilse koopiaarvuga episoomina. Ekspresseeritakse ainult varajasi valke. Kogu selle aja püsib peremeesrakk basaalkihis. Pärast peremeesraku lahkumist basaalembraanilt käivitub tema diferentseerumisprogramm. Viirusele tähendab see väljumist latentse infektsiooni faasist ja elutsükli hiliste sündmuste käivitumist. Erinevalt normaalsest epiteelist, on ogakihis ja granulooskihis paiknevad rakud mitootiliselt aktiivsed. Toimub HPV genoomi teistkordne amplifikatsioon ning virionidesse pakkumine. Viirusosakeste vabanemine toimub epiteeli pinnal olevatest surnud rakkudest (Kajitani et al., 2012).

Pärast keratinotsüüdile kinnitumist siseneb virion rakku, kus toimub selle lahtipakkumine ning HPV genoomi transport rakutuuma. Viiruse varajaselt promooterilt hakkab toimuma varajaste valkude ekspressioon. HPV peab oma nakkuse kehtestamiseks genoomi koopia arvu kordistama ehk üles amplifitseerima. Selle võimaldamiseks toimub korduv HPV replikatsioon ühe peremeesraku rakutsükli jooksul. Kui viirusevalkude ekspressioontasemed jäävad stabiilseks, lakkab genoomi koopiaarvu tõus ja jääb püsivalt 10-200 juurde raku kohta (Demeret et al., 1997; Kadaja et al., 2009; Moody and Laimins, 2010; Steger and Corbach, 1997).

### **1.4.3. STABIILNE REPLIKATSIOON**

Esmasele amplifikatsioonile järgneb viiruse DNA (koopjaarvu) stabiilse ehk latentse säilumise faas, mis tagatakse HPV genoomi replikatsiooni toimumisega sünkroonselt peremeesraku replikatsiooniga.

HPV genoomi latentse perioodi jooksul ekspresseeritakse episomaalseks säilitamiseks vajalikke valke (E6, E7, E1 ja E2) madalal tasemel, et vältida nakatunud peremeesraku detektsiooni immuunsüsteemi poolt. PV-e replikatsioon toimub suure tõenäosusega üks kord rakutsükli jooksul, paralleelselt raku replikatsiooniga, ning viiruse episoomid jagunevad enam-vähem võrdselt tütarakkude tuumade vahel (Bodily and Laimins, 2011; Kadaja et al., 2009; McBride et al., 2006).

### **1.4.4. TEISTKORDNE AMPLIFIKATSIOON**

Kui viiruse peremeesrakk lahkub basaalmembraanilt, viib see HPV elutsükli hiliste sündmuste algatamiseni. Papilloomiviiruse onkovaalgu häirivad raku normaalse diferentseerumisprogrammi alustamist ning nakatunud rakk jääb mitootiliselt aktiivseks, mis võimaldab viirusel jätkuvalt kasutada replikatsiooniks vajaminevaid peremeesorganismi valke. Kui rakud on jõudnud ogakihti, hakatakse viiruse replikatsioonivalke ekspresseerima senisest märgatavalt kõrgemal tasemel (vt joonis 2). Selle tulemusena tõuseb viiruse

koopiaarv raku kohta mitme tuhandeni ehk toimub teistkordne amplifikatsioon. (Bodily and Laimins, 2011).

Viimasena toimub viiruse kapsiidivalkude L1 ja L2 ekspressioon ning virionide kokkupakkimine. Kuna nimetatud valgud kutsuvad tugevalt immuunvastust esile, oodatakse nende ekspresseerimisega, kuni rakk on jõudnud viimastesse epiteelikihtidesse. Viiruspartiklite vabanemisel on oluline roll viiruse E1<sup>E4</sup> liitvalgul, mis indutseerib terminaalset diferentseerunud peremeesraku kokkuvarisemist ja apoptoosi (Nakahara et al., 2005). Kuna papilloomiviirused ei ole lüütilised, vabanevad virionid ainult pindmisest epiteelikihist, kuhu jõudnud rakud on juba surma staadiumis. Ka see on üheks immuunvastuse vältimise mehhanismiks (Bodily and Laimins, 2011).

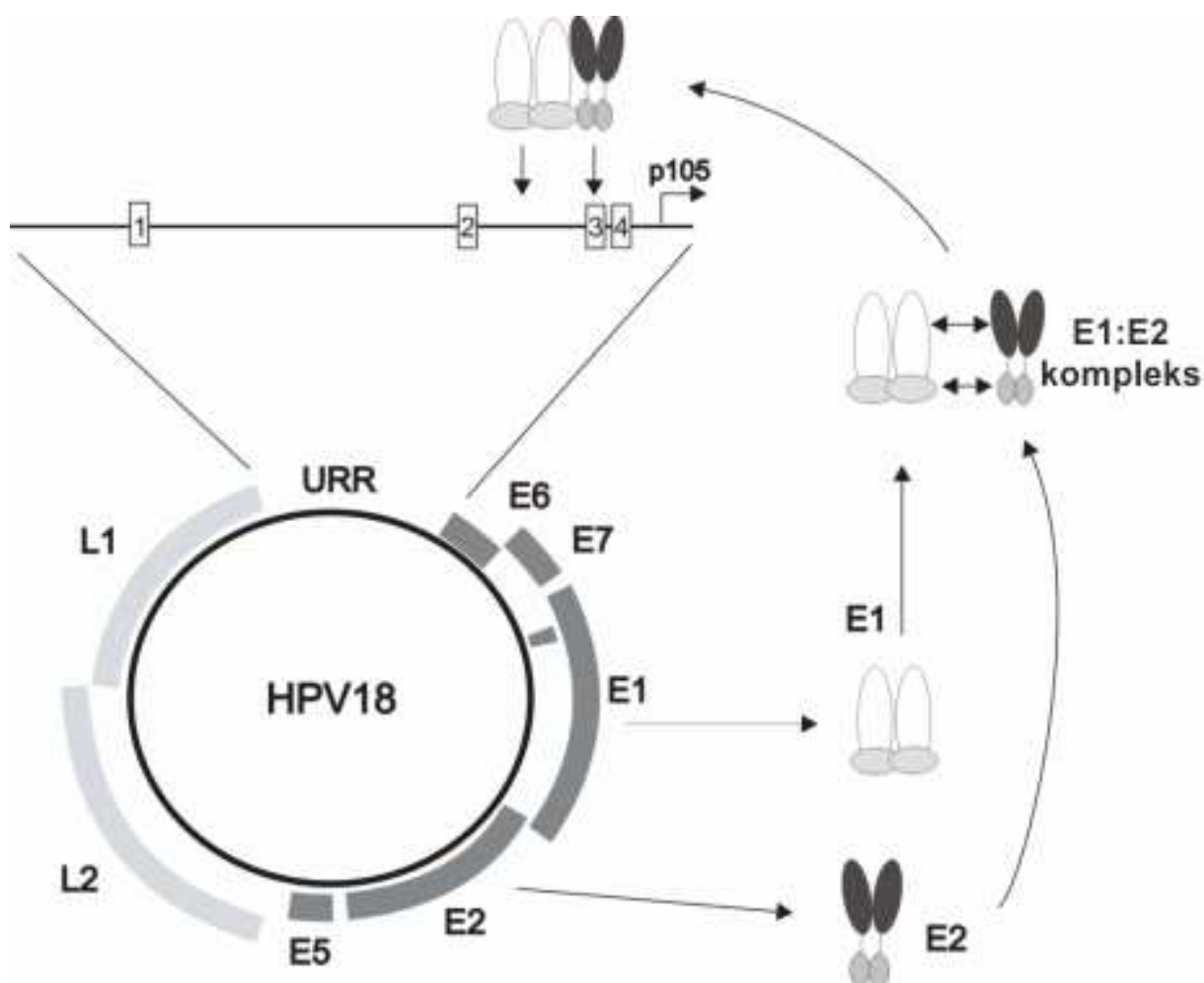
## **1.5. HPV REPLIKATSIOONIKS VAJALIKUD *CIS* ELEMENDID JA *TRANS* FAKTORID**

Viiruselised *cis*-järjestused on konkreetsed genoomi piirkonnad, mis vastutavad teatud funktsiooni, näiteks DNA replikatsiooni läbiviimise eest (*origin*, transkriptsiooni ugevadajad ehk enhanserid jne). Viiruselisi *trans*-faktoreid ekspresseeritakse teatud viiruse genoomi alalt (ORF-lt), misjärel nad rakendavad oma mõju neid kodeerivast lugemisraamist eemal, funktsioneerivad kaudselt, seostudes vastavatele äratundmiskohtadele genoomis .

HPV 18 replikatsiooni alguspunkt *origin* asub peamises reguloorses järjestuses (long control region LCR), ning hõlmab ühte E1 seondumispaika (*E1 binding site* – E1BS) ning nelja E2 sidumispiirkonda (*E2 binding site* – E2BS) (vt joonis 3 ja 4) (Hegde, 2002; Wilson et al., 2002). Lisaks HPV replikatsiooni kontrollivatele viiruselistele valkudele on mitmeid rakulisi faktoreid, mis mõjutavad protsessi kas viiruse replikatsioonivalkudega interakteerudes või muutes *origin* piirkonna DNA struktuuri preinitsiatsiooni kompleksi jaoks lihtsamini kättesaadavaks (Lee et al., 1997). Antud töös keskendun siiski ainult viiruselistele HPV replikatsiooni mõjutavatele faktoritele.

E1 on kõige suurem (68kDa) HPV valk. E1 valgul on helikaasne, ATPaasne, *origin*-i piirkonna DNA sidumise ja lahtiharutamise aktiivsus (Seo et al., 1993b). E1 valk seondub URR piirkonnas kindlale A:T rikkale seondumisjärjestusele nii BPV (Holt et al., 1994) kui ka

erinevate HPV-de puhul (Sverdrup and Khan, 1994). Näiteks HPV18 URR piirkonnas paiknev E1BS on 18 aluspaari pikkune, kuid selle järjestus ei ole erinevate viirustüüpide vahel eriti konserveerunud (vt joonis 4) (Auster and Joshua-Tor, 2004). E1 *origin*-ile seondumise afiinsus on küllaltki nõrk ning E2 valg aitab kaasa E1 A:T rikkale järjestusele seondumise efektiivsemaks ning järjestusspetsiifilisemaks muutmiseks (Seo et al., 1993a). Näiteks HPV11 puhul on näidatud, et E1 seondub DNA-le väga nõrgalt ja sidumisjärjestuse olemasolu polegi vajalik (Dixon et al., 2000). Ka HPV18 korral on näidatud, et E1BS eri mutatsioonid küll vähendavad replikatsiooni efektiivsust, aga ei elimineeri seda (Lee et al., 1997).



**Joonis 3. Inimese papilloomiviiruse tüübi 18 (HPV18) skemaatiline esitus koos E1 ja E2 valkude URR-le seondumiste esitlusega.**

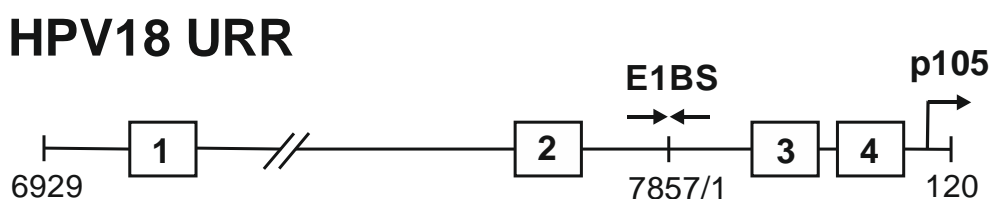
Joonisel on märgitud E1 ja E2 valgu sidumise piirkonnad. E1 ja E2 valgud, mida ekspresseeritakse varajaselt promooterilt (p105), on näidatud dimeeri kujul. Dimeersed molekulid moodustavad omavahel kompleksi, mis omakorda seondub *origin*-i piirkonnale (Kurg, 2011).



*Origin*-iga seondumiseks peab E1 valk moodustama dimeeri ning dimeerse E2 valgu abil kinnituvad nad DNA-le (vt joonis 3). Pärast esmast seondumist värvatakse kompleksi veel E1 valke, E2 dimeer vabaneb ja E1 valkudest moodustub kaks heksameerset helikaasse aktiivsusega struktuuri, mille abil toimub DNA ahelate lahtiharutamine replikatsiooni alustamiseks (Auster and Joshua-Tor, 2004; Sedman and Stenlund, 1998). E1 valk on 3' – 5' suunaline helikaas, mis kasutab DNA komplementaarsete ahelate eraldamiseks ATP energiat (Patel and Donmez, 2006; Wilson et al., 2002). E1 interakteerub ka replikatsiooniks vajalike rakuliste valkudega nagu DNA polümeraas  $\alpha$ -primaas ja replikatsioonivalk A (RPA) ning värbab need kompleksi replikatsiooni alguspunktis (Han et al., 1999; Park et al., 1994).

E2 valk koosneb kolmest funktsionaalsest domeenist: N-terminaalne transaktivatsiooni domeen, vahepealne paindlik siduv osa ning DNA-d siduv ja dimerisatsiooni eest vastutav domeen C-terminuses (McBride et al., 2006).

E2 on järjestusspetsiifiliselt DNA-d siduv valk, mis tunneb ära palindroomset DNA järjestust 5'-ACCgNNNNcGGT-3' (väikeste tähtedega nukleotiidid on eelistatud, aga mitte hädavajalikud E2 seondumiseks). Nimetatud E2 sidumisjärjestust esineb mitme koopiana viiruse genoomi URR piirkonnas. Kõrgeriski HPV-del on taolisi järjestusi 4 (vt joonis 4), aga teiste papilloomiviiruste puhul võib palindroomide arv olla erinev, näiteks BPV-1 on 17 E2BS-i, millest 12 on URRs (ACCGN<sub>4</sub>CGGT järjestusega) (Li et al., 1989). Kuigi ka inimese genoomis leidub kokkuvõttes väga palju taolisi palindroomseid järjestusi, seondub E2 dimeer siiski eelistatult viiruse E2BS järjestustele. Eelistatud seondumine on tagatud seondumisjärjestuste vaheosa ehk vahejärjestusega (N<sub>N</sub>), mis HPV puhul koosneb eelistatult A:T nukleotiididest. Inimeses leiduvad palindroomsed järjestused on aga kõrge G:C sisaldusega vaheosas (Bedrosian and Bastia, 1990; Vosa et al., 2012).



**Joonis 4. HPV18 URR skemaatiline esitus koos E1 ja E2 valkude seondumiskohtade paigutusega.**

Joonisel on kastikestega tähistatud 4 E2 valgu seondumisala HPV18 URR piirkonnas ja vastandlike nooltega E1 valgu seostumiskoht. Samuti on suunatud noolega näidatud HPV18 varajane promooter p105.

Viiruse erinevad E2-seondumispaigad omavad E2 valgu suhtes erinevat afiinsust, mis tuleneb E2BS järjestuste variatsioonidest, ning järjestustele seondumise mõju replikatsioonile on erinev (Li et al., 1989; Remm et al., 1992). On näidatud, et seondumistugevus ei sõltu ainult E2BS-de koosseisu jäävatest nukleotiididest, vaid ka seda ümbritsevatest järjestustest (Li et al., 1989; Steger and Corbach, 1997). Piisab vaid ühest E2 sidumisjärjestustest koos teatud DNA regiooniga, et transientne replikatsioon toimuks (Chiang et al., 1992a). E2BS-ga seondudes suudab E2 valk värvata E1 helikaasi origin-ile viiruse DNA replikatsiooni alustamiseks (Mohr et al., 1990).

Viiruse genoomi võrdse segregatsiooni toimumise eest HPV stabiilse säilumise elutsükli faasis vastutab E2 valk, mis kinnitab rakujagunemisel PV episoomid peremeesraku kromosoomide külge, tagades sellega nende liikumise koos mitoosi kääviga (McBride et al., 2006).

## **1.6. MUDELSÜSTEEMID HPV DNA REPLIKATSIOONI UURIMISEKS.**

HPV genoomi replikatsioonimehhanismide uurimiseks on püütud luua rakulisi süsteeme, mis imiteeriksid epiteeli ülesehitust ning kus saaks jälgida ja analüüsida viiruse genoomi replikatsiooni basaal- ja kaugemale diferentseerunud rakkudes. Selliseks sobivaks mudelsüsteemiks on osutunud primaarsed eesnahast pärit või emakakaelalalt eraldatud keratinotsüüdid, millele transfekteerimine kõrgeriski HPV retsirkuleeritud genoomiga rekonstrueerib viiruse elutsükli nn parvkuultuuris kasvatades. See on võimaldanud uurida HPV genoomi replikatsiooni ja raku diferentseerumise vahelisi seoseid. Sellised süsteemid on kasutusel vaid vähestes suuremates uurimisgruppides, kuna on töömahukad, kulukad, küllalt komplitseeritud. Inimese transformeerunud rakkude monokihti kasutades pole aga edu saavutatud.

M. Ustavi töögrupi liikmetel on õnnestunud luua süsteem HPV genoomi replikatsiooni uurimiseks, mis põhineb superspiraliseeritud viiruse genoomi transfektsioonil U2OS rakkudesse. Selles rakuliinis replitseeruvad efektiivselt nii kõrgeriski kui madalariski HPV18, -16, -11, -6b ning nahapapilloome tekitavad HPV5, -8 ja -38, seda nii transientselt kui ka stabiilselt ning tihedaks kasvanud rakukultuuris saab imiteerida hilist amplifikatsiooni.

Erinevalt eelnevatest on uue mudelsüsteemi kasutamine vähem töömahukas, lihtsam, odavam ja võimaldab samas uurida HPV DNA replikatsiooni kõiki staadiumeid (Geimanen et al., 2011).

Kuna HPV genoom esineb looduses kovalentselt suletud superspiraliseerunud rõngasmolekulina, kasutame oma katsetes sarnaseid, kuigi bakterirakus sünteesitud pisirõnga kujulisi (*minicircle*) genoome. Meile teadaolevate andmete kohaselt (Männik, avaldamisel olevad andmed) on HPV18 genoomi transkriptsioonimuster U2OS rakkudes sarnane keratinotsüütides esineva HPV transkriptsiooniga. Seega usume, et antud mudelsüsteem kirjeldab reaalselt looduses toimuvaid HPV infektsiooni eri etappe.

## **1.7. DNA KAHJUSTUSTEJÄRGNE RAKULINE VASTUS JA SELLE SEOTUS REKOMBINATSIOONI MEHHAANISMIDEGA**

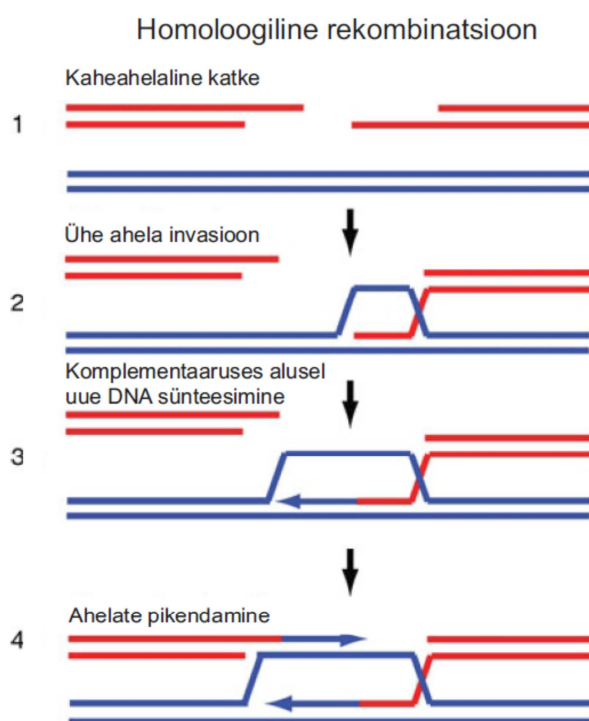
### **1.7.1. DNA KAHJUSTUSTEJÄRGNE RAKULINE VASTUS**

Raku normaalseks elutegevuseks peab rakuline DNA vastu pidama kõikidele mutatsioonetekitavatele endogeensetele (näiteks reaktiivsed hapnikuühendid) ja eksogeensetele rünnakutele (UV, ioniseeriv radiatsioon, viirusinfektsioon). Mistahes teel tekkinud DNA katked aktiveerivad kinaasidel põhineva signaalikomplekside jada – nn. DNA kahjustuse vastuse (DDR – *DNA damage response*). DDR aktiveerumine mõjutab rakutsükli kontrollpunkte ning kahjustuste parandamise ajaks rakutsükkel peatatakse. Kui kahjustused on liiga suured, suunatakse rakk apoptoosi. DNA kahjustuste vastuse eest vastutavad põhiliselt 2 kinaasi – ATM ja ATR, mis kuuluvad fosfatidüülinoositol-3-sarnaste kinaaside perekonda (PIKK – *phosphatidylinositol 3-kinase related kinase*) (Finlay and Griffin, 2012; Harper and Elledge, 2007).

Kaheahelalised katked on rakule kõige tsütotoksilisemad ning neid on kõige raskem parandada, nende parandamiseks on 2 põhilist mehhanismi: vigadeta töötav homologne rekombinatsioon (*homologous recombination* – HR) ja vigadele aldis mittehologne otste ühendamine (*non-homologous end joining* – NHEJ). On näidatud, HPV värbab homologse rekombinatsiooni valgud HPV replikatsiooni fookustesse, samas kui mittehologse otste

ühendamise protsessis (NHEJ) osalevaid valke HPV replikatsioonitsentritesse ei värvata (Gillespie et al., 2012).

On leitud, et erinevad viirused kasutavad peremeesraku DNA kahjustuste vastust ära, et efektiivselt DNA-d paljundada (HIV, Epstein-Barr viirus, Simian viirus 40, polüoomiviirus). Hiljuti on aga näidatud, et ka HPV-d kasutavad DDR radasid, et viiruse genoomi efektiivselt amplifitseerida, aga protsessi täpsed mehhanismid pole veel selged. Arvatakse, et papilloomiviiruse E1 valgu tekitatud kaheaahelised katked aktiveerivad DDR raja(d), mis aitab kaasa viiruse DNA replikatsioonile (Moody and Laimins, 2009; Reinson et al., 2013; Sakakibara et al., 2011).



### Joonis 5. Homoloogse rekombinatsiooni mehhanismi selgitav skeem.

Kaheaahelalised DNA katked tuntakse homoloogsel rekombinatsioonil osalevate valkude poolt ära ning värvatakse nukleasid, mis tekitavad 3' üleulatuvad üheaahelalised DNA otsad. HR valkude juhtimisel liigub üks DNA ahel komplementaarse kaheaahelalise DNA ahelate vahele ning homoloogia alusel sünteesitakse puuduvad nukleotiidid. Tekivad ristilaadsed ehk Holliday struktuurid.

On võimalik, et DDR-i aktiveeritud homoloogne rekombinatsioon viib oligomeersete HPV genoomide tekkeni. Homoloogse rekombinatsiooni korral tekivad X-kujuliste Holliday struktuuride kaudu ühendatud liitmolekulid (vt joonis 5) (Li and Heyer, 2008). HPV viiruse

genoomi oligomeerid võivad olla nii homoloogse rekombinatsiooni läbinud lahutamata kui ka lahutatud molekulid.

### 1.7.2. OLIGOMERISATSIOON

U2OS rakuliinil põhinevat mudelsüsteemi kasutades oleme märganud HPV genoomide replikatsiooniga kaasaskäivat genoomi oligomeriseerumist. Eelneva töö põhjal on arusaam, et vähemalt HPV elutsükli stabiilse säilumise faasis toimub replikatsioon theeta ( $\theta$ ) struktuuri alusel, ehk toimub kahesuunaline DNA replikatsioon (Flores and Lambert, 1997). On ka näidatud, et teistkordsel amplifikatsioonil diferentseerumise käivituses replikatsioonimehhanism lülitub nn. "veereva ratta" (RCR – *rolling circle replication*) mehhanismile, aga kindlaid tõendusi teiste keerukamate replikatsioonimooduste (mehhanismide) kasutuse kohta pole. Hetkel pole ka teada mehhanismid, kuidas üks HPV replikatsioonifaas lülitub ümber järgnevale.

Näitan oma töös, et HPV genoomid hakkavad oligomeriseeruma juba mõni päev pärast viiruselise genoomi rakkudesse sisse viimist ning multimeeride osakaal replikatsiooni jätkudes suureneb. U2OS-põhistes stabiilsetes HPV-positiivsetes rakuliinides on tuvastatavad vaid multimeersed HPV genoomid (Geimanen et al., 2011). Eeldades, et multimeerid sisaldavad vaid ühte aktiivset replikatsiooni alguspunkti (Cai et al., 2013), võimaldavad oligomeersed molekulid ühe replikatsioonikompleksi moodustumisel replitseerida mitmeid kordusi HPV genoomi. Seega on võimalik väheste peremeesraku ja viiruseliste valkude abil hoida üleval kõrget papilloomiviiruse genoomi koopiaarvu.

Meie seni tehtud katsete põhjal saab väita, et multimeriseerumine esmase amplifikatsiooni jooksul võib toimuda homoloogse rekombinatsiooni kaasabil (Henno, 2011; Orav et al., avaldamata andmed). On võimalik, et E1 valgu tekitatud kaheaahelalised katked (Reinson et al., 2013) aktiveerivad DDR-i, mis võimaldab viiruse genoomil oligomeriseeruda võttes kasutusele rakulised homoloogse rekombinatsiooni mehhanismi eest vastutavad reparatsioonikompleksid.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. TÖÖ EESMÄRGID

TÜTI papilloomiviirustega tegelevas uurimisgrupis on eelnevalt tõestatud, et U2OS rakuliin toetab erinevate HPV-de, sealhulgas ka HPV18 genoomi replikatsiooni (Geimanen et al., 2011). Oleme näidanud, et HPV18 genoom oligomeriseerub meie U2OS rakuliinil põhinevas süsteemis. Antud magistritöö raames tehtud eksperimendid uurivad seda fenomeni põhjalikumalt.

Kasutan oma töös HPV18 *wild type* (wt) ehk metsiktüüpi genoomi ja sealt pärinevaid HPV18 subgenoomseid osi sisaldavaid molekule nagu varast kodeerivat piirkonda ja reguloorset ala hõlmavat HPV18E genoomi konstrukti ning vaid HPV18 reguloorset piirkonda sisaldavat HPV18 URR konstrukti. Lisaks kasutan ka erinevaid PCR-i abil sünteesitud HPV18 URR piirkonda hõlmavaid lineaarseid fragmente. Kõik kasutatud molekulid on viidud U2OS rakkudesse elektroporatsiooni teel. HPV DNA madalmolekulaarse episomaalse materjali eraldasin eukarüootsetest rakkudest Hirt lüüsi meetodil. HPV lühiajalise replikatsiooni produkte analüüsin ühe- või kahedimensionaalsel geelelektroforeesil kasutades tulemuste visualiseerimiseks Southern blot meetodit.

Antud töö eesmärkideks on uurida:

1. erinevate HPV18 genoomse päritoluga molekulide esmast amplifikatsiooni, kirjeldada kaasnevat oligomerisatsioonimustrit ja mustri muutust ajalõikes;
2. oligomeeride tuvastamise erinevaid võimalusi 1D ja 2D analüüsi abil;
3. HPV18 URR-sõltuvat oligomerisatsiooni E1 ja E2 kaasabil (ekspressioonivektoritega; kotransfektsioonis wt genoomiga);
4. URR-is paiknevate HPV18 replikatsioonivalkude E2 ja E1 seondumispriirkondade mõju replikatsioonile ja oligomerisatsioonile.

## 2.2. MATERJAL JA METOODIKA

### 2.2.1. PLASMIIDID

- HPV18 URR, HPV18E ja HPV18 *minicircle* molekulid

Töös kasutan nn. "pisirõnga" kujul ("minicircle", lühendina kasutusel "mc") HPV konstrukte, mis on ligikaudu 1,1 kb (HPV18 URR), 5,4 kb (HPV18E) ja 8 kb (HPV18) suurused rõngasmolekulid. Mc HPV18 URR koosneb ainult HPV18 mittekodeerivast järjestusest, mc HPV18E-s puuduvad papilloomiviiruse hiliste valkude L1 ja L2 avatud lugemisraamid ning lisaks URR alale on säilinud vaid varase piirkonna ORF-id koos varase polyA-ga. Mc HPV18 esindab metsiktüüpi HPV18 genoomi, kuid tal on pisirõngaste tootmisprotsessi käigus tekkinud mõnekümne nukleotiidi pikkune lisajärjestus URR piirkonnas (mis on olemas ka HPV18E ja HPV18 URR molekulides).

Genoomi kaardid on lisas (lisa 1).

- pMC.BESPX algplasmiid

Algplasmiid sisaldab ColeE1 replikatsiooni *origin* järjestust, kanamütsiini resistentsusgeeni, 32 ScaI restriksiooniensüümi äratundmisjärjestust, polülinkeri järjestust ja  $\Phi$ C31 integraasi äratundmisjärjestusi attB ning attP.

Plasmiidi kaart on lisas (lisa 2).

- HPV18 E2 ekspressioonivektor – pQMN18E2

HPV18 E2 järjestus (nukleotiidid 2817-3914) kloonitati vektori pQM-NTag/Ai+ (Quattromed) multikloneerimisalasse. Vektor sisaldab Simian viirus 40-e replikatsiooni alguspiirkonda, polü-A signaali, ampitsilliini resistentsusgeeni, tsütomegaloviiruse (CMV) promooterit,  $\beta$ -globiini intronit ja E2 märget (E2 tag).

- HPV18 E1 ekspressioonivektor – pM18-14

pM18-14 E1 ekspressioonivektor sisaldab HPV-18 E6, E7 ja E1 ORF-i (nukleotiidid 105-2887), millele eelneb CMV promooter ning mis on viidud pQM-NTag/Ai+ vektorisse.

Onkovalkude E6 ja E7 initsiatsioonikoodonid on kustutatud ning E1 ORF-i algusesse on lisatud hemaglutiniin (HA) märgis.

- Mutantne HPV18 E1 ekspressioonivektor (puudub spetsiifiline DNA sidumise võime) – pM18-14 K237A

pM18-14 plasmidi viidi sisse punktmutatsioon kasutades järjestusspetsiifilist praimerit: 5' GTACACGTGGTTGCATCACTTTTAAAATTTTC 3' (Auster and Joshua-Tor, 2004; Reinson et al., 2013).

- AraD

PauxoMCF (FitBiotech) plasmid, mida kasutati elektroporatsiooni käigus kandja DNA-na. Ei kodeeri ühtegi geeniproducti inimese rakkudes ja ei oma märkimisväärset homoloogiat kasutatud ekspressioonivektoritega.

### **2.2.2. SUPERSPIRALISEERUNUD TSIRKULAARNE VIIRUSE GENOOM**

Põhimõtteliselt on võimalik eukarüootses parvkultuuris replitseerida HPV genoomi nii, et vabanevad virionid, mida saab omakorda kasutada uute rakkude nakatamiseks, ent see on väga vaearikas. Meie laboris on aga kasutusel HPV genoomid, mis on kloneeritud bakterirakus paljundamist võimaldavatesse vektoritesse (pUC või pBR). Säärased bakterijärjestustega konstruktid aga ei ole U2OS rakkudes replitseerumisvõimelised, samuti ei esindaks nende replikatsioon looduses esineva viiruse genoomi paljunemist. Kuni viimase ajani eemaldati bakteriaalsed vektorid viiruse genoomist restriksiooniensüümidega, HPV genoom puhastati välja ning ligeeriti T4 DNA ligaasi kasutades kokku. Re-ligeeritud genoomid viidi U2OS rakkudesse, kus nad olid võimelised replitseeruma. See protsess oli küllalt töömahukas, aeganõudev ja ligatsiooni käigus tekkis lisaks genoomi monomeeridele ka soovimatuid oligomeere. Hiljuti rakendasime uue meetodi HPV genoomide tootmiseks, kasutades Mark A. Kay laboris välja töötatud bakterifaag ΦC31 integraasil põhinevat rekombinatsioonisüsteemi.

HPV genoomikonstruktid kloneeriti pMC.BESPX algplasmidi (lisa 2), mis sisaldab ColE1 replikatsiooni *origin* järjestust, kanamütsiini resistentsusgeeni, 32 ScaI restriksiooniensüümi



äratundmisjärjestust, polülinkerit ning  $\Phi$ C31 integraasi äratundmisjärjestusi attB ning attP. HPV-pMC.BESPX konstruktid viidi *E.coli* ZYCY10P3S2T tüve kompetentidesse, mis sisaldavad  $\Phi$ C31 integraasi ja SceI restriksiooniensüümi geeni. Pärast transformatsiooni kasvatatakse ZYCY10P3S2T rakke kõigepealt temperatuuril 37°C HPV genoomi sisaldavate konstruktide paljundamise eesmärgil. Siis alandatakse kasvutemperatuuri 32°C kraadini ning lisatakse kultuurile induktsioonisegu (LB sööde, 0,04% L-arabinoos ja 4% 1 M NaOH lahust), mis koos viivad bakterirakus  $\Phi$ C31 integraasi ja SceI restriksiooniensüümi ekspressioonile.  $\Phi$ C31 integraas viib läbi rekombinatsiooni attB ja attP järjestuste vahel, mille tulemusena eemaldatakse pMC.BESPX vektori järjestused HPV genoomist. SceI lõikab pMC.BESPX vektori oma äratundmisjärjestuste koha pealt, pärast mida vektor lagundatakse bakteriraku nukleaaside poolt. Temperatuur 32°C on optimaalne rekombinatsiooni toimumiseks, kuid mitte SceI restriksiooni tööks, mistõttu SceI substraatideks on valdavalt juba rekombinatsiooni läbinud pMC.BESPX vektorid, mitte HPV-pMC.BESPX algplasmidid. Tulemusena saab bakterirakust puhastada kovalentselt suletud HPV genoomi rõngasmolekulide monomeere. Sellised molekulid on meetodi loojate poolt ristitud pisirõngasteks e *minicircle*'iteks. Looduses esinevad HPV genoomid samuti kovalentselt suletud rõngasmolekulide kujul.

### **2.2.3. MINICIRCLE HPV18 URR, HPV18E JA HPV18 TOOTMINE**

*E. coli* ZYCY10P3S2T tüve kompetendid transformeeriti HPV genoomi sisaldava pMC.BESPX algplasmiidiga. Esimese päeva õhtul pandi 1 koloonia kasvama katseklaasis 10 ml LB söötmesse (50 µg/ml Km) temperatuuri 37°C ja 220 rpm juurde. Teise päeva hommikul inokuleeriti 100 ml TB söödet (50 µg/ml Km) 5 ml starterkultuuriga ning kasvatati temperatuuril 37°C ja 190 rpm juures kuni OD saavutas 4. Kolvi ruumala ning söötme mahu suhe on 5:1. Kontrolliti bakterikultuuri pH-d ning viidi see 6.5 peale ning lisati pisirõngaste induktsioonilahus. Edasi kasvatati kultuuri temperatuuril 32°C ja 190 rpm juures 5-6 tundi. Järgnevalt tsentrifugeeriti bakterimass põhja ja sööde eemaldati. Lõpuks eraldati plasmiidne DNA kasutades NucleoBond PC 500 EF kit-i (Machery-Nagel).

## 2.2.4. PCR URR FRAGMENTIDE TEGEMINE

Disainisin ja sünteesisin URR piirkonna erinevate fragmentide uurimiseks 11 PCR fragmenti. Kasutasin matriitsina HPV18 E2 piirkonnast lineariseeritud genoomi. Tabelina on esitatud kasutatud PCR praimerid: vastavalt vasakus paneelis fragmenti nimed, ning paremal ülal pärisuunalise ahela praimerid ning all komplementaarse ahela praimerid nukleotiidsel järjestusel 5'-3' orientatsioonis:

1234	<b>Pre0</b> 5' CGACAAGCTTGTTGTGTTTGTATGTCCTGTGTTTG 3' <b>BclI</b> 5' TGATCACCGTGTGGATCCTCAAAGC 3'
123	<b>Pre0</b> 5' CGACAAGCTTGTTGTGTTTGTATGTCCTGTGTTTG 3' <b>E2BS3 rev</b> 5' CCCGACCGTTTTTCGGTTAC 3'
12	<b>Pre0</b> 5' CGACAAGCTTGTTGTGTTTGTATGTCCTGTGTTTG 3' <b>E1BS</b> 5' CTCCTTTTTTATATACTAC 3'
2	<b>Pre1</b> 5' CGACAAGCTTTCCTTTGGCTTATGTCTG 3' <b>E1BS</b> 5' CTCCTTTTTTATATACTAC 3'
23 A	<b>Pre1</b> 5' CGACAAGCTTTCCTTTGGCTTATGTCTG 3' <b>E2BS3 rev</b> 5' CCCGACCGTTTTTCGGTTAC 3'
234 A	<b>Pre1</b> 5' CGACAAGCTTTCCTTTGGCTTATGTCTG 3' <b>BclI</b> 5' TGATCACCGTGTGGATCCTCAAAGC 3'
34 A	<b>Pre8</b> 5' GAGATCTCGCAAGCTTGGGCAGCACATACTATACTAC 3' <b>BclI</b> 5' TGATCACCGTGTGGATCCTCAAAGC 3'
34 B	<b>Pre8</b> 5' GAGATCTCGCAAGCTTGGGCAGCACATACTATACTAC 3' <b>18ep1_Hind</b> 5' GCTAAGCTTGGGCTTCACACTTACAACAC 3'
K 12	<b>MO1</b> 5' ATACACTACGTCTTCTAAACCTGCC 3' <b>E2B2</b> 5' GAAAAGTATAGTATGTGCTGCCC 3'
K 1	<b>MO1</b> 5' ATACACTACGTCTTCTAAACCTGCC 3' <b>Rev1ap1</b> 5' GCAGATCTGCATAAACTATGTATGCACAGC 3'
K A	<b>L1FR</b> 5' GTGAGGTACCATTGGATATTTGTCAG 3' <b>RepL1R</b> 5' GCTTGGCAGGTTTAGAAGAC 3'

## 2.2.5. RAKULIINID

Töös kasutati U2OS rakuliini, mis algatati 1964. aastal 15 aastase tütarlapse sääreluu osteosarkoomist (Ponten and Saksela, 1967). Rakuliin on HPV-negatiivne, kuid ekspresseerib

pRB ning p53 valke. Rakkudel on keratinotsüütidele iseloomulik morfoloogia. Rakke kasvatati 100 mm plaatidel IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) (GibcoBRL) söötmes, kuhu oli lisatud 10% vasika loote seerumit (Sebak) ning penitsilliini 100 IU/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml. Rakke inkubeeriti temperatuuril 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> sisalduse juures.

### **2.2.6. TRANSFEKTSIOON ELEKTROPORATSIOONI MEETODIL**

Elektroporatsiooniks kasutati 90% konfluentsuseni kasvanud rakke. Üheks transfektsiooniks kasutati ühe 100 mm koekultuuri tassi jagu rakke ( $\sim 1 \times 10^6$ ). Tassidelt aspireeriti sööde, pesti 1×PBS-iga ning rakud eemaldati tassidelt trüpsiiniga. Lahtitulnud rakud koguti kokku tsentrifuugituubidesse. Tuube tsentrifuugiti *Eppendorf Centrifuge 5810 R* tsentrifuugiga 300 g juures 5 minutit. Seejärel sööde eemaldati ja rakud suspendeeriti ühe elektroporatsiooni kohta 250 µl-s värskes söötmes. Rakususpensioon pipeteeriti küvettidesse koos 5 µg lõhe sperma (*salmon sperm*) või 2,5 µg AraD kandja ja uuritava DNA-ga. Transfekkeerimiseks kasutati *Gene Pulser XCell* (Bio-Rad Instruments) elektroporaatorit, pinget 220 V ning mahtuvust 975 µF. Transfekteeritud rakud viidi söödet sisaldavatesse tsentrifuugituubidesse ning koguti tsentrifuugides 300 g 5 minuti jooksul. Sööde aspireeriti, rakud suspendeeriti värskes söötmes ning kanti 100 mm suurustele koekultuuri tassidele.

### **2.2.7. EUKARÜOOTSETEST RAKKUEST EPISOMAALSE DNA ERALDAMINE HIRT LÜÜSI MEETODIL**

Rakkudelt eemaldati sööde ja tase pesti 2 korda 1×PBS-ga. PBS-i jäägid aspireeriti ning rakkudele lisati 0,8 ml Hirt lüüsi lahust (0,5% SDS, 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA). Rakke inkubeeriti toatemperatuuril 15 minutit. Seejärel lisati 0,2 ml 5M NaCl lahust lõppkontsentratsioonini 1 M. Lüsaat koguti kummispaatliga mikrotsentrifuugi tuubidesse ja hoiti üleöö temperatuuril 4°C. Tuube tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga (*MicroCL 21R Thermo Scientific*) 30 minutit 21100 g temperatuuril 4°C. Supernatant, mis sisaldas madalmolekulaarset DNA-d pipeteeriti uude mikrotsentrifuugi tuubi ja DNA sadestati 0,6 ml isopropanooliga vähemalt 30 minuti jooksul temperatuuril -20°C. Seejärel tsentrifuugiti proove temperatuuril 4°C 21100 g juures ja sade võeti üles 0,2 ml Sol IV puhvris (20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,2% SDS), kuhu oli lisatud proteinaas K-d

lõppkontsentratsioonini 0.1 µg/µl ning inkubeeriti 60 minutit temperatuuril 37°C. Seejärel lisati fenool:kloroformi segu (1:1), segati *vortex*´il ja tsentrifuugiti 2 minutit 21100 g. Ülemine vesifaas tõsteti uude tuubi ja nukleiin happed sadestati 2,5 ruumala 96% etanooliga vähemalt 30 minutit temperatuuril -20°C ning tsentrifuugiti 10 minutit 21100 g. DNA sadet pesti 70% etanooliga, tsentrifuugiti 3 minutit 21100 g, kuivatati ning suspendeeriti TE-s, mis sisaldas 20 µg/ml RNAas A-d. Lahust inkubeeriti temperatuuril 37°C 1 tund.

### 2.2.8. SOUTHERN BLOT

Transfekteeritud rakkudest eraldatud DNA-d töödeldi võimalusel DpnI, mis lõikab katki rakkudesse elektroporeeritud bakteriaalset päritolu iseloomustava metüleerimismustriga plasmiidse DNA, ja vajadusel lineariseeriva ensüümiga. Restriktsioon kestis temperatuuril 37°C 16-18 tundi. Seejärel lahutati episomaalne DNA geelelektroforeesil 0,5% agarosgeelis 1xTAE puhvril (4 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA). Geel denatureeriti lahuses A (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) 30 minutit, loputati destilleeritud veega ja neutraliseeriti lahuses B (1 M Tris pH 7.4, 1,5 M NaCl) 30 minutit. DNA kanti geelilt nailonmembraanile (*Nylon Transfer membrane*, Naxo) kapillaarse ülekande meetodil, kasutades 10xSSC lahust ning seoti filtriga UV Stratalinker 1800 (Stratagene) abil. Mittespetsiifiline seondumine blokeeriti prehübridisatsiooniseguga (6x SSC, 5x Denhardti reaktiiv, 0.5x SDS, 200 µg/ml kandja DNA, mis denatureeriti enne temperatuuril 100°C 10 minutit). Prehübridisatsioon toimus vähemalt 3 tundi temperatuuril 65°C. Seejärel hübridiseeriti filter spetsiifilise prooviga, mille valmistamisel kasutati *DecaLabel TM DNA Labeling Kit*-i (Fermentas) ja radioaktiivset  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Perkin Elmer või Hartmann Analytcs). Hübridisatsioon (proovina kasutati HPV18 PCR URR fragmenti) toimus üleöö temperatuuril 65°C ning seejärel pesti filtrit 2 korda 5 minutit pesulahusega I (10xSSC, 0,1% SDS), üks kord 15 minutit pesulahusega II (5xSSC, 0,1% SDS) ja 2 korda 10 minutit pesulahusega III (0,5xSSC, 0,1% SDS). Hübridisatsioonisignaali detekteeriti, eksponeerides filtrit röntgenfilmile (Fuji).

### 2.2.9. 2D GEELELEKTROFOREES

Uuritavad DNA proovid lahutati 0,4% etiidiumbromiidiga agarosgeelis 1xTAE puhvril 44 tunni jooksul rakendades pinget 0,4 V/cm. Seejärel lõigati proovi sisaldav geeliriba 1D geelist

välja, keerati 90° ning selle ümber valati etiidiimbromiidi (lõppkontsentratsiooniga 0.3 µg/ml) sisaldav 1,2% agarosgeel. Teine dimensioon jooksutati 1xTAE puhvris ligikaudu 3 tundi temperatuuril 4°C rakendades pinget 6 V/cm. Uuritavate HPV DNA fragmentide analüüs toimus peatükis 5.2.8 kirjeldatud Southern blot meetodil.

## **2.3. TULEMUSED JA ARUTELU**

Inimese papilloomiviiruse elutsükli esimestel etappidel toimub viiruse genoomi koopiarvu lühiajaline kiire tõus. Koekultuuri tingimustes esindab neid varajasi staadiume lühiajaline ehk transientne HPV genoomi replikatsioon pärast viiruse DNA sisenemist raku.

Oleme oma mudelsüsteemis näidanud, et esmase replikatsiooni käigus toimub omapärane viiruse genoomi molekulide struktuuri muutus – HPV genoomi oligomeriseerumine, mille käigus tekkivates molekulides asetsevad HPV genoomi molekulid pea-saba orientatsioonis (Cai et al., 2013).

Eksperimentaalset osa alustasin transientse replikatsiooni ja oligomerisatsiooni katsete tingimuste optimeerimisega. Kuna mõnede eksperimentide läbiviimisel oli otstarbekas rakendada mc HPV18 genoomi kõrgema replikatsiooniaktiivsusega E8<sup>E2</sup> mutanti (E8<sup>E2</sup><sup>-</sup>), võrdlesin ühtlasi ka mc HPV18 ja mc HPV18 E8<sup>E2</sup><sup>-</sup> genoomide replikatsiooni intermediaate.

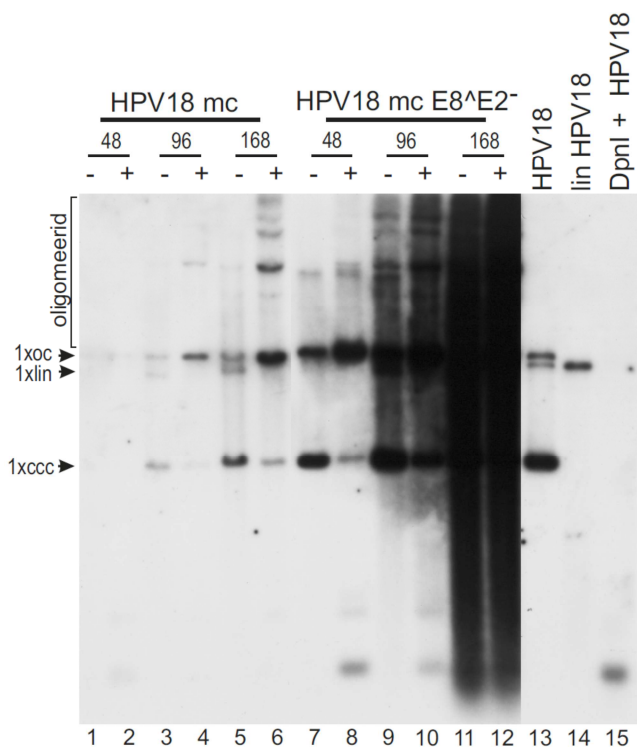
Töö järgmistes etappides on katsed läbi viidud HPV18 subgenoomsete DNA konstruktidega. Püüan eristada ja tuvastada viiruse DNA replikatsiooniks ja oligomerisatsiooniks vajalikke viiruselisi *cis* elemente ja *trans* faktoreid.

### **2.3.1. TRANSIENTSE REPLIKATSIOONI ANALÜÜSI KATSETINGIMUSTE OPTIMEERIMINE JA MC HPV18 NING MC HPV18 E8<sup>E2</sup> MUTANDI VÕRDLU**

Esmalt kontrollisin võrdlevalt mc HPV18 (lisa 1) ja mc HPV18 E8<sup>E2</sup> mutandi replikatsiooni- ja oligomerisatsiooniprotsesse transientse replikatsiooni tingimustes eesmärgiga kasutada mutantset genoomi edaspidi mc HPV18 metsiktüüpi genoomi asemel.

HPV18 E8<sup>E2</sup> mutandi E8 ORF-i ATG initsiatsioonikoodon on muteeritud ACG koodoniks, mistõttu ei toimu E8<sup>E2</sup> repressorvalgu, ekspressiooni. Täispika E2 valgu aminohappeline järjestus jääb seejuures muutmata. E8<sup>E2</sup> valgu puudumise tulemuseks on palju efektiivsem viiruse genoomi replikatsioon (Kurg et al., 2010). Kuna suurenenud replikatsiooniaktiivsus oleks paljude katsete puhul kasulik, osutuks HPV18 E8<sup>E2</sup> genoomi kasutamine otstarbekaks. Enne tuleb aga kindlaks teha, et muteeritud genoom käitub transientsse replikatsiooni käigus sarnaselt metsiktüüpi genoomiga.

U2OS rakkudesse transfekteeriti mc HPV18 ja mc HPV18 E8<sup>E2</sup> plasmide. Erinevatel ajapunktidel pärast transfektsiooni eraldasime rakkudest madalmolekulaarse DNA fraktsiooni (Hirt lüsaat). Replikatsioonisignaale tuvastamiseks kasutasin PCR teel loodud HPV18 URR fragmenti hübridisatsiooniproovina. Kahe plasmidi replikatsioonisignaale võrdlus on esitatud joonisel 6.



**Joonis 6. Mc HPV18 ja mc HPV18 E8<sup>E2</sup> mutandi episomaalse DNA analüüs lühiajalise replikatsiooni katses U2OS rakkudes.**

Transfekteerisin U2OS rakkudesse 1 µg mc HPV18 ja 1 µg mc HPV18 E8<sup>E2</sup> DNA-d koos 2,5 µg kandja DNA-ga (AraD). Eraldasime madalmolekulaarse DNA ajapunktidel 48, 96 ja 168 tundi pärast elektroporatsooni. Analüüsisin lõikamata ja DpnI-ga töödeldud DNA-d Southern blot meetodi abil, kasutades hübridisatsiooniproovina PCR teel loodud URR fragmenti (DpnI lõikab katki rakkudesse elektroporeeritud bakteriaalset päritolu iseloomustava metüleerimismustriga plasmidse DNA).

Monomeerse DNA markerina on kasutatud *minicircle* HPV18 genoomi, mis esineb kolmes eri konformatsioonis (lineaarne – 1xlin, avatud rõngas – 1xoc, superspiraliseerunud vorm – 1xccc) rajal 13, lineariseeritud ja *DpnI* ensüümiga töödeldud mc HPV18 markerid on radadel 14 ja 15.

HPV monomeersed molekulid võivad esineda kolmes erinevas konformatsioonis – lineaarsena (lin), superspiraliseerunud (ccc) ja avatud rõnga (oc) kujul. Erineva konformatsiooniga molekulid jooksevad geelelektroforeesil eri kiirustega. Kuna mc HPV18 replitseerumisel tekkivad oligomeersed genoomid on kõik esindatud kolmes eri vormis, siis paljud signaalid kattuvad ning replikatsiooni intermediaatide eristamine 1D geelelektroforeesil on suhteliselt keeruline. Joonisel 6 nähtava katse tulemuste põhjal võib väita, et mc HPV18 E8<sup>E2</sup> replikatsiooni intermediaatide ja oligomerisatsiooni mustrid sarnanevad mc HPV18 omadele, mistõttu mc HPV18 E8<sup>E2</sup> mutanti on võimalik kasutada edaspidistes katsetes metsiktüüpi mc HPV18 asemel.

Lisaks kinnitasin antud katses veelkord kirjanduses eelnevalt teada olnud HPV18 E8<sup>E2</sup> valguga HPV replikatsioonis (Kurg et al., 2010; Stubenrauch et al., 2000).

Joonisel 6 on näha, et lisaks monomeersete HPV genoomide erinevatele vormidele esineb rakus ka kõrgemaid oligomeere. Oligomeerid on eriti tugevalt detekteeritavad juhul, kui proove on töödeldud *DpnI* ensüümiga vastava restriksioonipuhvri juuresolekul [Tango puhver: 33 mM Tris-atsetaat (pH 7.9), 10 mM magneesiumatsetaat, 66 mM kaaliumatsetaat, 0.1 mg/mL veise seerumi albumiini (Thermo Scientific)] (rajad 2, 4, 6, 8, 10, 12).

Tähelepaneku kinnitamiseks viisin läbi katsed kasutades *minicircle* HPV18 URR-i ning analüüsisin tulemusi 2D geelelektroforeesi abil ja selgus, et efekti tekitab kasutatud puhver, mitte ensüüm (avaldamata andmed). Võib oletada, et puhvris olevad Mg<sup>2+</sup> ioonid aitavad säilitada keerukaid DNA struktuure, mis oligomerisatsioonil tekivad. Joonise 6 tulemustele toetudes inkubeerisime edaspidiste analüüside puhul proove alati Mg<sup>2+</sup> ionidega varustatud puhvris. Ka DNA rakkudest eraldamisel arvestasime oligomeersete struktuuride lagunemise võimalusega ja kasutasime vastavaid abinõusid (nt temperatuuri ei tohiks tõsta üle 37°C).

Kasutasin antud katses plasmiidset AraD kandja DNA-d, kuid järgnevates katsetes kasutan ka lõhe spermiga purustatud lineaarset DNA-d (*salmon sperm*). Kuna katketega DNA fragmendid võivad aktiveerida DDR raja, mis omakorda käivitaks homologe rekombinatsiooni mehhanismi (Harper and Elledge, 2007), oleks hea kasutada pigem plasmiidset DNA-d. Ent

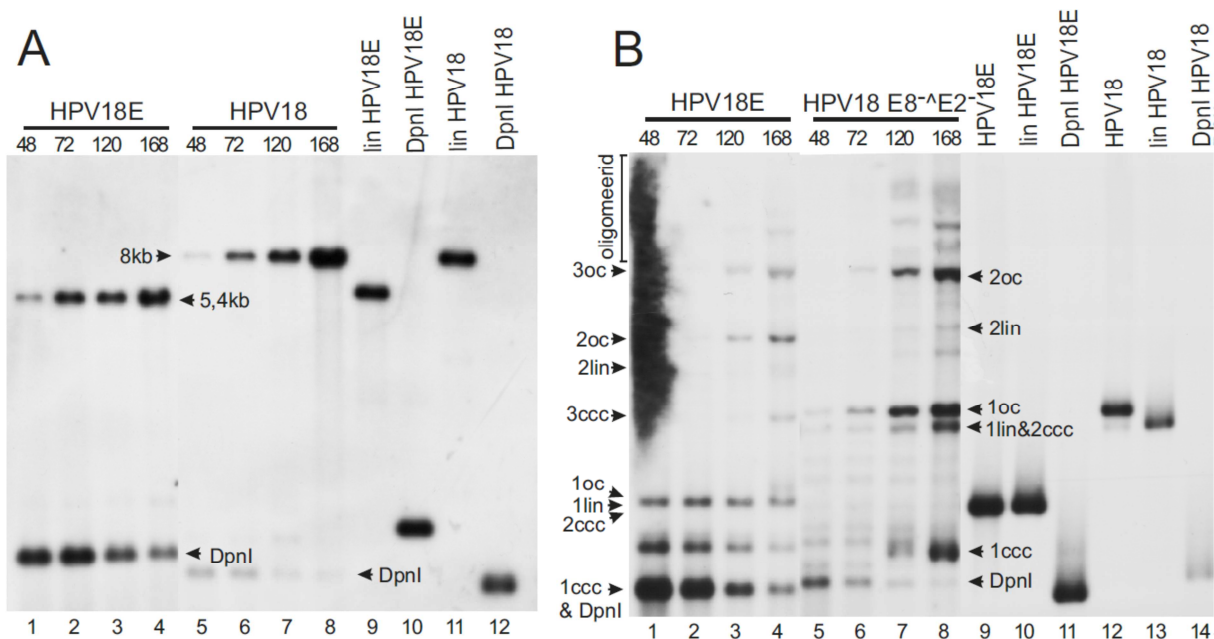
kontrollimaks erinevate kandja DNA-de mõju oligomerisatsioonile sai läbi viidud katse erinevate kandja DNA-dega ning katse tulemustest on näha, et oligomerisatsioonimuster ei muutu sõltumata kasutatud kandja DNA tüübist ning samuti ka üldse kandja DNA-d kasutamata (avaldamata andmed).

### **2.3.2. MC HPV18 JA MC HPV18E REPLIKATSIOON JA OLIGOMERISATSIOON U2OS-S RAKKUKES**

Uurimaks oligomerisatsiooniks vajalikke *cis* elemente, võrdlesin mc HPV18 ja mc HPV18E konstruktide replikatsiooni- ja oligomerisatsioonimustrit (joonis 7). Mc HPV18E konstrukti (lisa 1) sisaldab HPV18 URR-i ning varajaste lugemisraamide järjestusi, hilised L1 ja L2 lugemisraamid on eemaldatud.

U2OS rakkudesse elektroporeeriti mc HPV18 ja mc HPV18E plasmiide. Kasutasin lineariseeritud analüüsi puhul mc HPV18 genoomi, aga lõikamata DNA analüüsil olen võrdlemiseks esitanud intensiivsema replikatsioonimustriga mc HPV18 E8<sup>E2</sup> mutandi. Transfektsioonijärgselt eraldas erinevatel ajapunktidel rakkudest Hirt lüüsi kasutades madalmolekulaarse DNA fraktsiooni. Replikatsioonisignaale analüüsisin Southern blot meetodi abil kasutades hübriidatsiooniproovina PCR teel loodud URR fragmenti (7A) või täispikka HPV18 genoomi (7B). Katse tulemused on vormistatud ja esitatud joonisel 7.





**Joonis 7. Restriksiooniensüümiga töödeldud (A) ja töötlemata (B) mc HPV18E ja mc HPV18 episomaalse DNA analüüs lühiajalise replikatsiooni katses U2OS rakkudes.**

Transfekteerisin U2OS rakkudesse 2 µg mc HPV18E ja 1 µg mc HPV18 DNA-d koos kandja DNA-ga (AraD) (7A) või 2 µg mc HPV18E ja 1 µg mc HPV18 E8<sup>+</sup>E2<sup>-</sup> DNA-d koos kandja DNA-ga (*salmon sperm*) (7B). Eraldasin madalmolekulaarse DNA ajapunktidel 48 tundi kuni 168 tundi pärast elektroporatsiooni. Töötlesin proove DpnI-ga. Analüüsisin lineariseeritud (BspTI) või lõikamata HPV18E või HPV18 DNA-d Southern blot meetodi abil. Joonisel 7A on võimalik kindlaks määrata lineariseeritud mc HPV18E (rajad 1-4) ja mc HPV18 (rajad 5-8) molekulide asukoht. Joonisel 7B on näha lõikamata genoomide oligomeriseerumist. 1xccc tähistab siis vastavalt 5,4kb või 8kb monomeeri, 2xccc dimeeri ja 3xccc trimeeri superspiraliseerunud vormide liikumist geelis. 1xlin on lineaarne ja 1xOC avatud rõngasmolekuli kujul monomeer. Kõrgemaid erinevas konformatsioonis olevad DNA vorme ei saa kindlalt tähistada, kuna puudub vajalik marker ja geeli ülaosas paljud signaalid kattuvad. Markeritena on kasutatud lõikamata (7B rada 9), lineariseeritud (7A rada 9 ja 7B rada 10) ja *DpnI* ensüümiga lõigatud (7A rada 10 ja 7B rada 11) mc HPV18E genoomi ning lõikamata (7B rada 12), lineariseeritud (7A rada 11 ja 7B rada 13) ja *DpnI* ensüümiga lõigatud (5A rada 12 ja 5B rada 14) mc HPV18 genoomi.

Joonise 7A replikatsioonisignaale jälgides on näha, et hiliste lugemisraamide ja sellest lähtuvalt ka hiliste valkude puudumine ei mõjuta replikatsiooni üldsignaali. Nii lineariseeritud mc HPV18E (5.4 kb) kui ka mc HPV18 (8kb) genoomide arv tõuseb ajas (võrdle signaalide tõusu joonisel 7A, radadel 1-4 ja 5-8). Joonisel 7B võib tuvastada mõlema molekuli oligomeriseerumist.

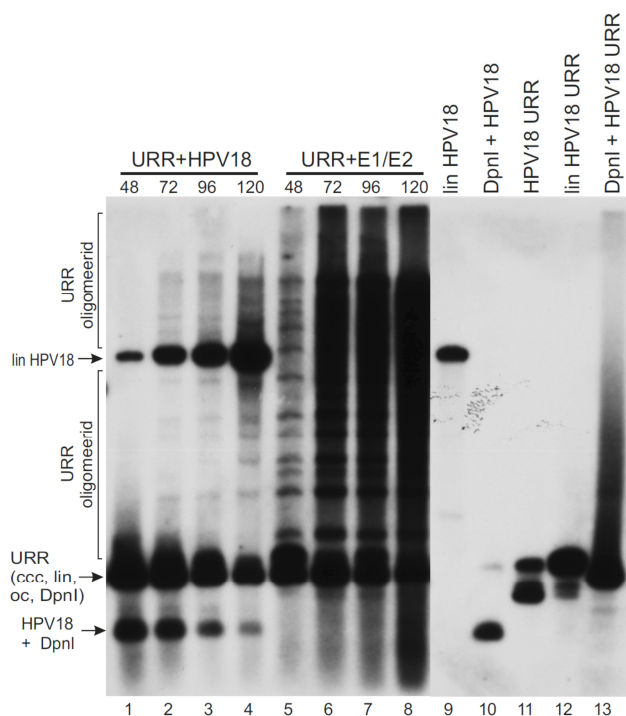
Joonisel 7B on näha, et varajastel ajapunktidel on monomeerne ccc vorm valdav (rajad 1-2, 5-6), aga hilisemates ajapunktides tekivad oligomeersed molekulid, mille osakaal on monomeeridega võrreldav (rajad 3-4, 7-8). Kuna mc HPV18 E8<sup>E2</sup> replitseerub efektiivsemalt, on ka oligomeere tugevamalt näha. Joonise 7 järgi tundub, et oligomerisatsiooniks vajalikud *cis* järjestused ei asu L1 ja L2 lugemisraamides ning vastavad valgud pole olulised.

Meie töögrupis on näidatud, et HPV18 varajaste valkude lugemisraamide (E1<sup>E4</sup>, E4, E5, E6, E7) muteerimisel toimub ikkagi viiruse genoomi oligomerisatsioon, seega vastavad valgud pole multimerisatsiooniks vajalikud. Ainult HPV18 E1 ja E2 mutandid ei replitseeru ega oligomeriseeru (Orav et al., avaldamata andmed). Järelikult E1 ja E2 on ainsad vajalikud replikatsioonivalgud, ilma milleta ei saa viiruse genoomi replikatsioon ja seega ka oligomerisatsioon toimuda.

### **2.3.3. MC HPV18 URR OLIGOMERISATSIOON**

Et kaardistada oligomerisatsiooniks vajalikku minimaalset järjestust ning paremini mõista replikatsiooni ja oligomerisatsiooni suhet, uurisime replikatsiooniks vajalike HPV E1 ja E2 mõju multimerisatsioonile. Katsetes kasutasin HPV18 URR pisirõngast (lisa 1), mis on 1132 aluspaari pikkune ja sisaldab endas vaid HPV18 mittekodeerivat regulatoorset järjestust. Mc HPV18 URR konstrukti kasutamine võimaldab lahutada HPV18 replikatsiooni transkriptsioonist, kuna antud konstruktilt ei toimu mitte ühegi lugemisraami ekspressiooni. Lisaks võimaldab see välistada oligomerisatsiooniks oluliste *cis*-järjestuste paiknemise HPV18 varajases piirkonnas.

U2OS rakkudesse transfekteeriti mc HPV18 ja mc HPV18 URR plasmide. Kasutan mittekodeeriva ala replikatsiooniks replikatsioonivalkude E1 ja E2 ekspressioonivektoreid (kirjeldatud materjal ja meetodikas 5.2.1) või mc HPV18 genoomi, millelt eksresseeritakse E1 ja E2 valgud. Transfektsioonijärgselt eraldasid erinevatel ajapunktidel rakkudest madalmolekulaarse DNA fraktsiooni. Replikatsioonisignaale analüüsisin Southern blot meetodi abil kasutades hübriidisatsiooniproovina PCR teel loodud URR fragmenti. Katse tulemused on vormistatud ja esitatud joonisel 8.



**Joonis 8. Mc HPV18 URR oligomerisatsiooni analüüs lühiajalise replikatsiooni katsetes U2OS rakkudes.**

Transfekteerisin U2OS rakkudesse koos 2,5 µg kandja DNA-ga (AraD) 1 µg mc HPV18 + 0,5 µg mc HPV18 URR ning 0,5 µg mc HPV18 URR + 100 ng E1 ja 100 ng E2 ekspressioonivektorite DNA-d. Eraldasin madalmolekulaarse DNA ajapunktidel 48 tundi kuni 120 tundi pärast elektroporatsiooni. Enne analüüsi töötlesin proove DpnI ja PaeI-ga, mis lineariseerib täispikka genoomi. Tulemused visualiseeriti Southern blot meetodi abil. Joonisel 8 on võimalik kindlaks määrata lineariseeritud mc HPV18 (rajad 1-4) molekulide asukoht. Samuti on näha URR oligomeriseerumise mustreid nii mc HPV18 genoomi kotransfektsioonil (rajad 2-4) kui ka ekspressioonivektorite juuresolekul (rajad 5-8). Markeritena on kasutatud lineariseeritud (rada 9) ja DpnI ensüümiga lõigatud (rada 10) HPV18 DNA-d ning lõikamata (rada 11), lineariseeritud (rada 12) ja DpnI ensüümiga lõigatud (rada 13) *minicircle* HPV18 URR genoomi.

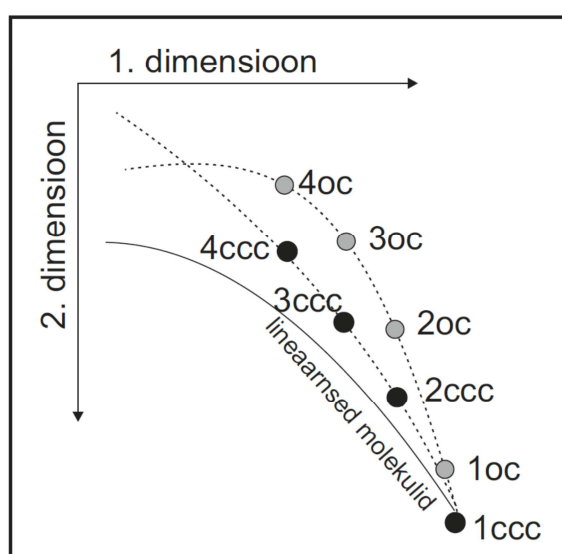
Mc HPV18 genoomilt ekspresseeritavate E1 ja E2 valgu tasemeid on raske mõõta, kuid antud sisseviidud HPV18 DNA kontsentratsioonil on need arvatavasti madalamad kui ekspressioonivektorite pealt sünteesitud valgu kogused. Ilmselt selle tõttu on mc HPV18 URR-i oligomeriseerumise mustrid ekspressioonivektorite juuresolekul mitu korda tugevamad kui mc HPV18 juuresolekul (joonis 8 võrrelda radu 5-8 ja 1-4). On näha, et mc HPV18 URR replitseerub ja oligomeriseerub ekspressioonivektorite juuresolekul väga efektiivselt, ent kuna konstrukt on nii pisike, pole võimalik efektiivselt eristada DNA erinevaid konformatsioone (lineaarne, avatud või superspiraliseerunud rõngasmolekul) ja oligomeeride asukohti.

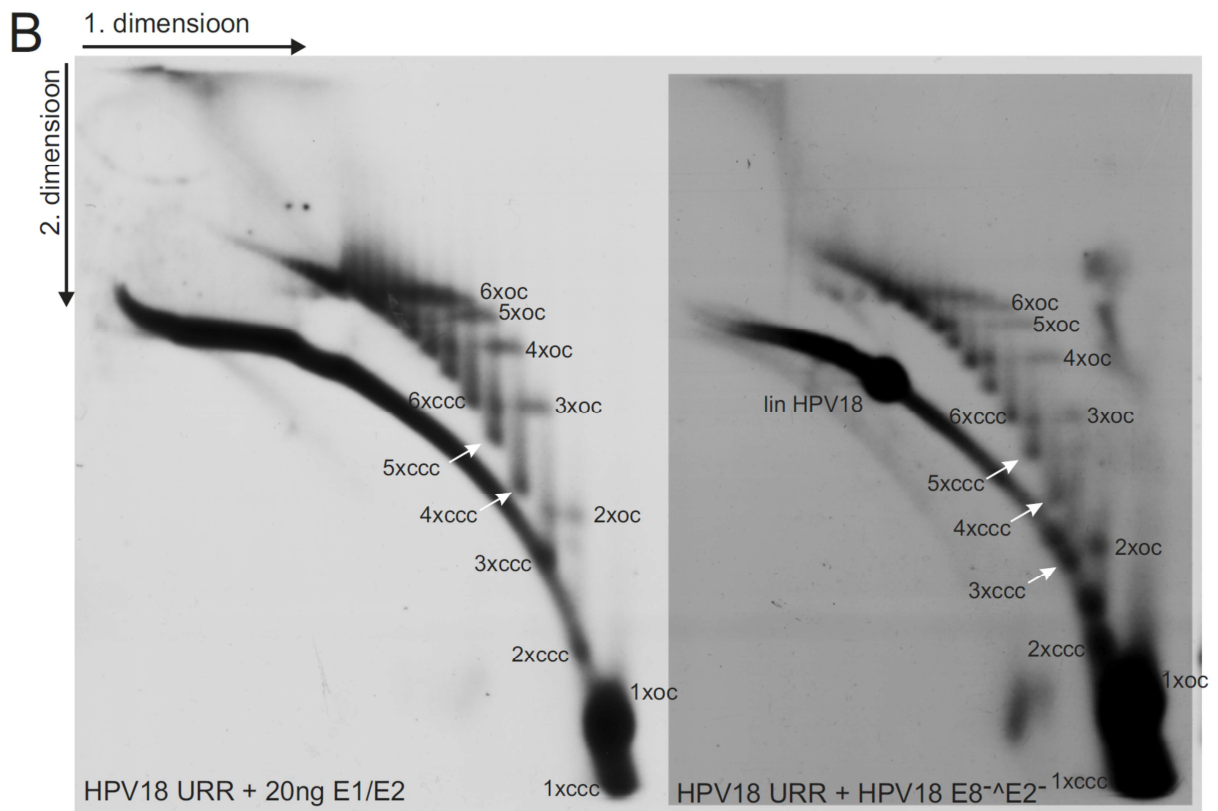
Kirjandusest on teada, et erinevate papilloomiviiruste URR piirkonnad replitseeruvad replikatsioonivalkude juuresolekul mitmetes rakuliinides (C33A, 293, HeLa) (Remm et al., 1992; Steger and Corbach, 1997; Ustav and Stenlund, 1991), aga pole andmeid nii lühikeste fragmentide oligomeriseerumise kohta. Kuna 1132 aluspaari pikkune *minicircle* HPV18 URR oligomeriseerub, võib öelda, et ainsad vajalikud *cis*-järjestused asuvad URR-is ning ainsad vajalikud viiruselised *trans*-faktorid on E1 ja E2.

Southern blot analüüsi põhjal võib arvata, et mc HPV18 URR oligomeriseerumise mustrid on samad nii ekspresioonivektoreid kui ka mc HPV18 genoomi E1 ja E2 valkude allikana kasutades, aga et täpsemalt hüpoteesi kinnitada ning samuti teha vahet erineva suurusega oligomeeridel ja DNA konformatsioonidel, kontrollisin multimerisatsioonisignaale 2D geelelektrofooresil.

U2OS rakkudesse elektroporeeriti mc HPV18 URR koos mc HPV18 genoomi või ekspresioonivektoritega. 48 tundi pärast transfektsiooni eraldas rakkudest madalmolekulaarse DNA fraktsiooni. Replikatsioonisignaale hübridiseerisin URR prooviga. Katse tulemused on vormistatud ja esitatud joonisel 9B. 2D geelelektrofooresil lahutatud lõikamata DNA molekulide skeem on esitatud joonisel 9A. Esimeses dimensioonis lahutatakse molekulid massi järgi, teises topoloogia järgi. Nii on võimalik eristada lineaarseid, superspiraliseerunud ja avatud rõnga vormis molekule.

A





**Joonis 9. A. 2D geelektroforeesipildi skemaatiline esitus. B. Mc HPV18 URR oligomerisatsiooni DNA analüüs 2D geelektroforeesi kasutades.**

**A.** 2D geelektroforeesi skemaatiline esitus, kus on näha selgelt kolme eristuvat kaart, milles asuvad vastavalt lineaarsed, superspiraliseerunud ja avatud rõnga kujul olevad molekulid. **B.** Transfekteeerisin U2OS rakkudesse 250 ng mc HPV18 URR + 250 ng mc HPV18 E8<sup>E2</sup> DNA-d ning 250 ng mc HPV18 URR + 20 ng E1 ja 20 ng E2 ekspressioonivektorite DNA-d koos kandja DNA-ga (*salmon sperm*). Pärast 48 tunni möödumist eraldas Hirt lüüsi meetodil rakkudest madalmolekulaarse DNA ja töötlesin proove 2 tundi temperatuuril 37°C Tango puhvris. Lahutasin lõikamata DNA-d 2D geelektroforeesil. Parempoolsel paneelil on näha XmaJI ensüümiga lineariseeritud mc HPV18 E8<sup>E2</sup> mutanti. Analüüsis kasutasin vastavalt kahte (vasak paneel) või kolme (parem paneel) 100 mm läbimõõduga koekultuuritassi jagu rakke.

Mc HPV18 URR oligomeriseerumise mustrite uurimiseks analüüsisin lõikamata DNA-d 2D geelektroforeesil abil. 9A skeemil on näidatud erinevate DNA vormide kaared: lineaarsed (lin), superspiraliseerunud (ccc), avatud rõnga (oc) kujul DNA fragmendid. Sama muster on näha joonisel 9B. Kuna mc HPV18 URR replitseerub mc HPV18 juuresolekul palju madalamal tasemel kui ekspressioonivektorite korral, olen pilti tumendanud. Aga on näha, oligomeriseerumise mustrid on põhimõtteliselt samad.

Hetkel pole veel teada replikatsiooni moodus ega mehhanism oligomeeride tekkeks esmase amplifikatsiooni ajal. Võrreldes mc HPV18 ja mc HPV18 URR replikatsiooni oleme töögrupis välja selgitanud, et mõlemad oligomeriseeruvad ja et need oligomeerid on pea-saba orientatsioonis (restriksioonianalüüsil mistahes lineariseeriva ensüümiga on võimalik kõik, ka HPV18 kõrgemad vormid lineariseerida üheks 8 kb või vastavalt 1 kb pikkuseks lineaarseks fragmendiks).

### **2.3.4. HPV18 URR-IS PAIKNEVATE E1 JA E2**

#### **SEONDUMISPIIRKONDADE MÕJU REPLIKATSIOONILE JA OLIGOMERISATSIOONILE;**

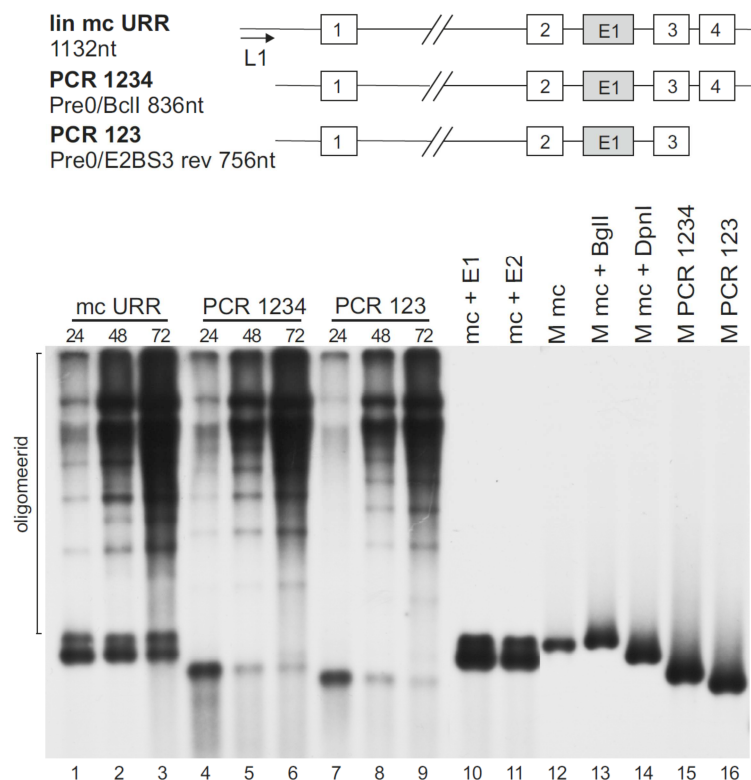
Tahtsin uurida E2BS-de ja E1 seondumispirkonna mõju replikatsioonile ja oligomeriseerumisele. Tegin selleks 9 erinevat fragmenti, mille skemaatilised esitlused on joonistel 10, 11 ja 12. PCR fragmentide nimed kajastavad E1 ja E2 seondumispirkondade olemasolu vastavas konstruktis (nt PCR 1234 sisaldab nii E1BS-i kui ka kõiki E2BS-e). Nimes sisalduv „K“ tähistab E1 valgu seondumispirkonna puudumist (nt PCR K 1 sisaldab ainult esimest E2BS-i). Skemaatilistel esitlustel on iga konstrukti juures märgitud kasutatud praimerite nimed ja vastava fragmendi nukleotiidne pikkus.

#### **2.3.4.1. MINICIRCLE HPV18 URR JA PCR FRAGMENTIDE OLIGOMERISEERUMISE VÕRDLUS**

Joonisel 9 oli näha, et HPV18 URR-sõltuva replitseerumise ja oligomeriseerumise signaalid kattuvad nii metsiktüüpi genoomi (kasutusel kui E1 ja E2 päritoluallikas) kui replikatsioonivalkude ekspressioonivektorite juureolekul. Järgnevalt tahtsin kontrollida PCR teel tehtud HPV18 URR piirkondade replikatsiooni ja oligomerisatsiooni.

U2OS rakkudesse elektroporeeriti mc HPV18 URR plasmiidid ja HPV18 URR lineaarsed fragmendid. Kasutan mittekodeeriva ala replikatsiooniks replikatsioonivalkude E1 ja E2 ekspressioonivektoreid. Transfektsioonijärgselt eraldasini erinevatel ajapunktidel rakkudest madalmolekulaarse DNA fraktsiooni. Replikatsioonisignaale analüüsisin Southern blot

meetodi abil kasutades hübriidsatsiooniproovina URR fragmenti. Katse tulemused on vormistatud ja esitatud joonisel 10.



**Joonis 10. Minicircle HPV18 URR ja PCR HPV18 URR replikatsiooni ja oligomerisatsiooni analüüs.**

Transfekteerisin U2OS rakkudesse 250 ng mc HPV URR, 250 ng PCR HPV URR ja 250 ng PCR 123 HPV URR DNA-d koos 5 µg kandja DNA (*salmon sperm*) ning 20 ng E1 ja E2 ekspressioonivektoritega. Eraldas madalmolekulaarse DNA ajapunktidel 24, 48 ja 72 tundi pärast elektroporatsooni. Analüüsisin 2 tundi temperatuuril 37°C Tango puhvis töödeldud HPV18 URR DNA-d Southern blot meetodi abil. Markeritena on kasutatud lõikamata (rada 12), lineariseeritud (rada 13) ja DpnI ensüümiga lõigatud (rada 14) mc HPV18 URR plasmidi ning PCR teel loodud 1234 ning 123 fragmente (rajad 15 ja 16). Skemaatilisel on esitatud nii *minicircle* kui PCR URR piirkonnad, märgitud on ka fragmentide loomiseks kasutatud praimerid ja molekulide pikkused nukleotiidides.

Lisaks *minicircle* HPV18 URR-le, uurin ka PCR teel loodud URR fragmentide oligomerisatsiooni. Joonisel 10 on näha sarnased HPV18 URR oligomeriseerumise mustrid nii *minicircle* kui ka lineaarsete molekulidena transfekteerituna. Lineaarsed fragmendid liiguvad raku kokku ja hakkavad oligomeriseeruma. Näitasin, et mc URR transfekteerituna ainult kas E1 või E2 ekspressioonvektoriga ei replitseeru (rajad 10-11).

*Minicircle* URR ja lineaarne 1234 PCR fragment ei ole sama pikad, mc-l on sees ka osa L1 piirkonda ulatuvaid nukleotiide, aga mõlemas konstruktis sisalduvad kõik E1 ja E2 valkude sidumiskiirkonnad (E6 lugemisraamipoolne ots on sama). 123 konstruktis puudub viimane E2 seondumisjärjestus (E2B4) ja on näha, et selle seondumiskiirkonna puudumise mõju replikatsioonile ja oligomerisatsioonile on minu katsetingimustes peaaegu olematu.

Kuna PCR- i abil fragmentide süntees nõuab vähem vaeva kui erinevate järjestustega *minicircle* molekulide loomine, jätkasin tööd lineaarsete fragmentidega.

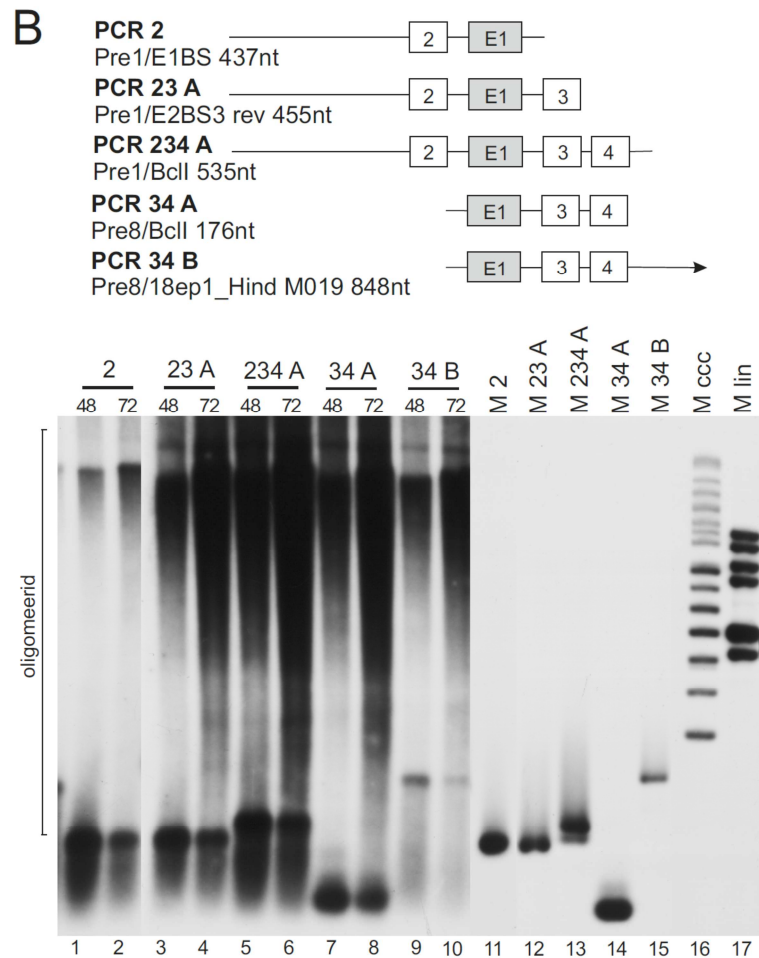
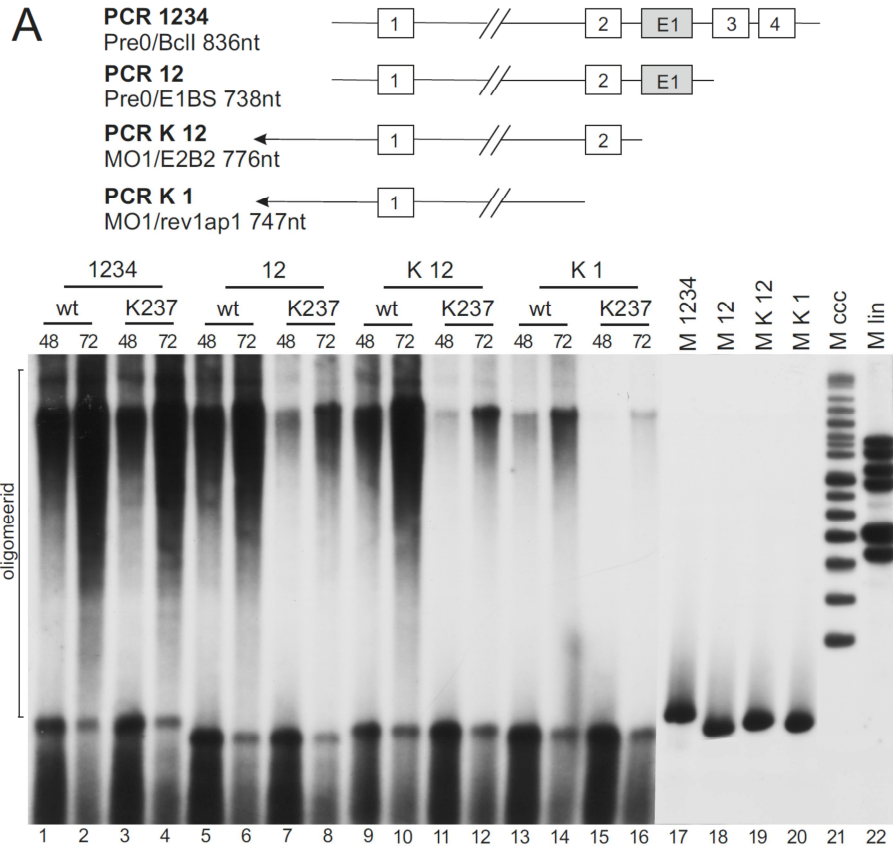
### **2.3.4.2. REPLITSEERUVA JA OLIGOMERISEERUVA HPV18 URR MINIMAALSE ORI LEIDMINE**

Edaspidi teen katsed ainult HPV18 URR PCR fragmentidega E1 ja E2 ekspressioonivektorite juuresolekul.

Järgnevalt üritan kontrollida E1 seondumiskiirkonna mõju oligomerisatsioonile. Selleks viin läbi katsed erinevate URR fragmentidega, kusjuures osadel puudub E1 seondumiskiirkond. Kasutan lisaks pM18-14 (E1) ekspressioonivektorile ka pM18-14 K237A vektorit, millel puudub spetsiifiline DNA sidumisvõime. Samuti uurin teiste E2BS-te mõju oligomerisatsioonile neid ükshaaval URR konstruktist eemaldades.

U2OS rakkudesse elektroporeeriti 250 ng HPV18 URR PCR fragmente koos 20 ng E1 ja 20ng E2 ekspressioonivektoritega. Transfektsioonijärgselt eraldas erinevatel ajapunktidel rakkudest madalmolekulaarse DNA fraktsiooni. Replikatsioonisignaale analüüsisin Southern blot meetodi abil kasutades hübridisatsiooniproovina URR fragmenti. Katse tulemused on vormistatud ja esitatud joonisel 11A ja 11B.





### **Joonis 11. HPV18 URR fragmentide oligomerisatsioon U2OS rakkudes.**

**A.** Transfekteerisin U2OS rakkudesse 250 ng erinevaid PCR fragmente: 1234, 12, K 12 ja K 1 koos 5 µg kandja DNA (*salmon sperm*) ning 20 ng E1 ja E2 ekspressioonivektoritega. Joonisel on märgitud wt ekspressioonivektorid (pM18-14 ja pQMN18E2) ning K237-ga märgitud radadel on kasutatud lisaks E2 vektorile E1 mutantset ekspressioonivektorit (E1 valgul puudub spetsiifiline DNA-ga seondumise võime). Eraldasin madalmolekulaarse DNA ajapunktidel 48 ja 72 tundi pärast elektroporatsooni. Analüüsisin 2 tundi temperatuuril 37°C Tango töödeldud HPV18 URR DNA-d Southern blot meetodi abil. HPV18 URR fragmentide oligomeriseerumise mustreid võrreldi kasutades nii tavalist kui ka muteeritud E1 ekspressioonivektorit. Markeritena on kasutatud PCR 1234, 12, K 12, K 1 fragmente (rajad 17-20) ja 2-16kb superspiraliseerunud (rada 21) ning 2-10kb lineaarset DNA-d (rada 22). Skemaatilisel on esitatud katses kasutatud PCR fragmendid.

**B.** Samadel tingimustel viisin läbi teise katse kasutades järgmisi PCR fragmente: 2, 23 A, 234 A, 34 A ja 34 B koos 5 µg kandja DNA (*salmon sperm*) ning 20 ng E1 ja E2 ekspressioonivektoritega. Markeritena on kasutatud PCR 2, 23 A, 234 A, 34 A ja 34 B fragmente (rajad 11-15) ja 2-16kb superspiraliseerunud (rada 16) ning 2-10kb lineaarset DNA-d (rada 17). Skemaatilisel on esitatud katses kasutatud PCR fragmendid.

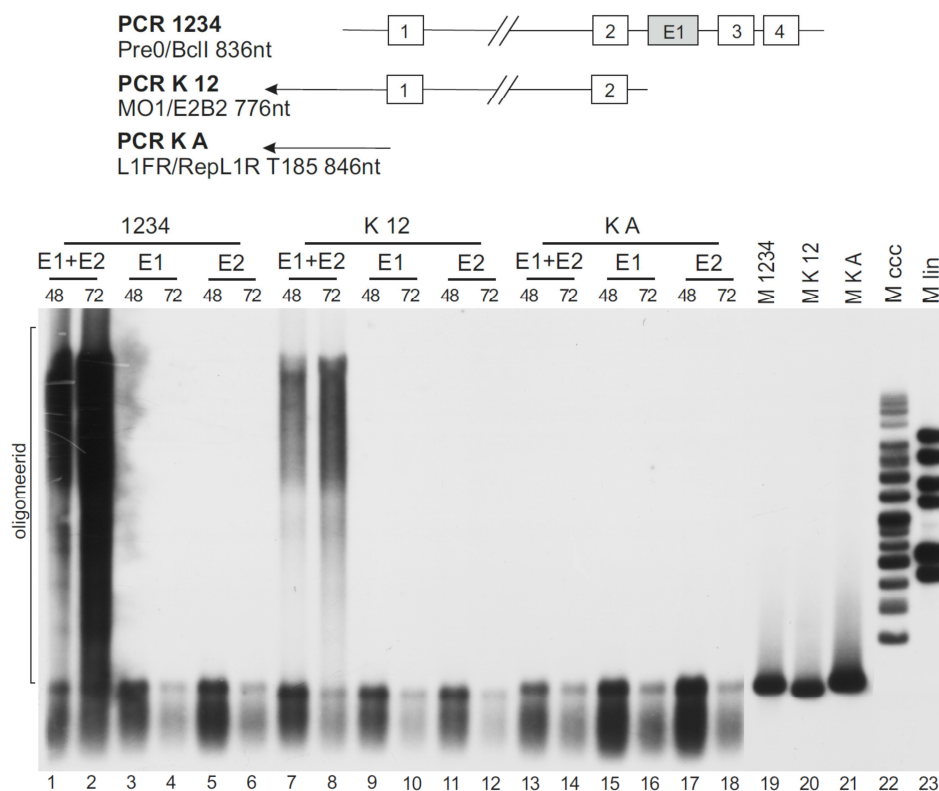
Kuna katses kasutatud fragmendid on eri pikkustega ja elektroporeerisin kõiki DNA-sid raku võrdse koguse, ei saa replikatsiooni signaalide intensiivsust omavahel võrrelda. Töö eesmärgiks oli oligomeriseerumise võime tuvastamine ning võib kinnitada, et minu katsetingimustes on kõik fragmendid võimelised replitseeruma ja oligomeriseeruma.

Jooniselt 11A võib järeldada, et E1 valgu seondumispirkonna puudumine avaldab vähest mõju replikatsioonile ja oligomerisatsioonile E1 ja E2 üleekspressiooni tingimustes (kuna fragmendid 12 ja K12 on sama pikad ja neid on transfekteeritud võrdne kogus, saab signaale võrrelda) (rajad 5-8 ja 9-12). Samuti kasutasin katses Tormi Reinsoni loodud E1 mutanti K237 (Reinson et al., 2013), millel puudub DNA-ga seondumise võime. Mutantse ja wt E1 ekspressioonivektorite replikatsioonisignaale võrreldes tuleb välja, et signaalid küll nõrgenevad mutandi puhul, aga replikatsioon siiski toimub (joonis 11, rajad 3-4, 7-8, 11-12, 15-16). Ka kirjanduses on eelnevalt näidatud, et E1BS muteerimine ei elimineeri replikatsiooni URR-il ja ekspressioonivektoritel põhinevas süsteemis (Lee et al., 1997; Sverdrup and Khan, 1995).

Esitatud eksperimendi põhjal võib järeldada, et meie U2OS rakuliinil põhinevas süsteemis piisab ainult ühest E2 (E2B1) seondumispirkonnast PCR fragmendis (elektroporeerituna koos ekspressioonivektoritega), et toimuks transientne replikatsioon ja oligomerisatsioon

(joonis 11A rajad 13-16). Teiste E2BS-te sarnast võimekust pole veel jõudnud kontrollida. Aga on näha, et ka E2B1-ta toimub teatud ulatuses replikatsioon, seega talle ei saa omistada mingit unikaalset rolli replikatsioonil ja oligomerisatsioonil meie katsetingimustes (joonis 11B rajad 1-10). Joonise 11 A ja B põhjal võib väita, et mida rohkem E2BS-e, seda tugevam on replikatsioon ja oligomerisatsioon (arvestades, et kõiki DNA-sid on raku viidud võrdne kogus, siis väiksemate molekulide puhul mahub 250 ng DNA hulka rohkem molekule ehk replikatsiooni *origin*-e).

Kontrollimaks, et replikatsiooni ja oligomerisatsioonimustrid minu PCR fragmentidel põhinevates katsetes pole lihtsalt kõrvalnähtused, elektroporeerisin U2OS rakkudesse 250 ng HPV18 URR PCR fragmente koos E1 ja E2 või eraldi vaid E1 või E2 ekspressioonivektoritega. Samuti elektroporeerisin rakkudesse URR piirkonnavälise fragmendi koos E1 ja E2 ekspressioonivektoritega. Transfektsioonijärgselt eraldasin erinevatel ajapunktidel rakkudest madalmolekulaarse DNA fraktsiooni. Replikatsioonisignaale analüüsisin Southern blot meetodi abil kasutades hübriidisatsiooniproovina URR fragmenti. Katse tulemused on vormistatud ja esitatud joonisel 12.



### Joonis 12. HPV18 URR fragmentide episomaalse DNA analüüs (kontrollfoores).

Transfekteerisin U2OS rakkudesse 250 ng erinevaid PCR fragmente: 1234, K 12 ja K A koos 5 µg kandja DNA (*salmon sperm*) ning 20 ng E1 ja E2 ekspressioonivektoritega (vastavalt siis kas E1 + E2, E1 või E2). Eraldasin madalmolekulaarse DNA ajapunktidel 48 ja 72 tundi pärast elektroporatsooni. Analüüsisin 2 tundi temperatuuril 37°C Tango puhvis töödeldud HPV18 URR DNA-d Southern blot meetodi abil. Markeritena on kasutatud 1234, K 12 ja K A fragmente (rajad 19-21) ja 2-16kb superspiraliseerunud (rada 22) ning 2-10kb lineaarset DNA-d (rada 23). Skemaatilisel on esitatud katses kasutatud PCR fragmendid.

Joonisel 12 on näha HPV18 URR fragmentide oligomeriseerumise mustreid ainult juhul, kui URR piirkond sisaldab vähemalt ühte E2BS-i ning on kasutatud mõlema replikatsioonivalgu ekspressioonivektoreid. Tulemuste põhjal võime kinnitada, et replikatsioon ei toimu ilma ühegi replikatsioonivalgu seondumispiirkonna olemasoluta. Samuti on kindlasti vaja nii E1 kui ka E2 valku. See kõik toetab varasemalt tehtud katsete tulemusi.

Tehtud katsete põhjal võib oletada, et transientsel replikatsioonil meie süsteemis saab E1 ja E2 replikatsioonikompleks paigutada igale poole URR piirkonda, peaasi, et E2 valgul oleks

võimalik DNA-ga seonduda. Seega ei saa kindlaks määrata kindlat replikatsiooni alguspunkti, vaid võib öelda, et replikatsioon võib alata erinevate E2 seondumiskiirkondade juurest. Tuleb siiski arvestada, et katsetingimused võivad oluliselt mõjutada replikatsiooni ja oligomerisatsiooni. Joonisel 8 esitatud andmetele tuginedes võib väita, et minu kasutatud eksperimentaalsetes tingimustes toimub tõenäoliselt E1 ja E2 tasemete üleekspressioon, mis erineb looduslikust tasemest. Seega ei saa erinevate seondumiskiirkondade mõju replikatsioonile ja oligomerisatsioonile üle kanda genoomi konteksti (Stubenrauch et al., 1998). Tulevikus on plaanis katseid korrata ka nii, et PCR fragmendid on elektroporeeritud wt HPV18 juuresolekul, mitte vaid ekspressioonivektoritega. Teine võimalus on muteerida erinevaid URR piirkondi HPV18 genoomi kontekstis.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö kirjanduse ülevaade tutvustab inimese papilloomiviiruseid (HPV-sid), kirjeldab nende elutsükli, genoomset ülesehitust ja teadaolevaid replikatsiooniks vajalikke *cis* järjestusi ja *trans* faktoreid. Lisaks annan ülevaate meie uurimisrühma poolt HPV-de uurimiseks kasutatavast mudelsüsteemist, kirjeldan selles mudelsüsteemis täheldatud viiruslike genoomide oligomeriseerumise fenomeni ja toon välja oligomerisatsiooni protsessi võimaliku seose rakuse DNA kahjustuste vastuse ja homoloogse rekombinatsiooniga.

Magistritöö eksperimentaalne osa keskendub HPV tüüp 18 (HPV18) replikatsiooni ja oligomerisatsiooni uurimisele transientsel replikatsiooni tingimustes. Kasutades võrdlevalt HPV18 täispikka genoomi ning HPV18 subgenoomseid fragmente, tegin kindlaks, et HPV18 replikatsiooniks ja oligomerisatsiooniks vajalikud *cis* järjestused paiknevad viiruse mittekodeerivas regulatoorses piirkonnas (URR-is) ning vajalikud viiruslikud *trans* faktorid on E1 ja E2 replikatsioonivalgud. Kasutades ainult HPV18 URR piirkonda sisaldavate fragmentide kotransfektsiooni E1 ja E2 valku kodeerivate ekspressioonivektoritega uurisin replikatsiooniks ja oligomerisatsiooniks vajalikke *cis*-järjestusi lähemalt ning tegin kindlaks, et:

- vähemalt ühte E2 seondumisjärjestust sisaldav HPV 18 genoomne fragment on replikatsiooni- ja oligomerisatsioonivõimeline
- E1 valgu seondusjärjestuse olemasolu ei ole meie katsetingimustel replikatsiooni ja oligomerisatsiooni toimumiseks vajalik
- E2 valgu seondumisjärjestusi mitte sisaldavad fragmendid ei ole replikatsiooniga oligomerisatsioonivõimelised
- kõik kasutatud URR piirkonna fragmendid on replikatsioonivõimelised ainult nii E1 kui ka E2 valgu juuresolekul, mis kinnitab antud katse tingimustes toimuva replikatsiooni HPV-spetsiifilisust
- meie kasutatud katsetingimustel on minimaalseks HPV18 replikatsiooni ja oligomerisatsiooni toimumise eelduseks seega vähemalt ühe E2 valgu seondumisjärjestuse ning E1 ja E2 valkude olemasolu. Lisaks viitavad saadud tulemused replikatsiooni- ja oligomerisatsiooniprotsesside seotusele.

# Analysis of replication and oligomerization of human papillomavirus type 18 DNA in transient replication assay using U2OS cells

Liisi Henno

## RÉSUMÉ

The human papillomavirus are a large family of small double-stranded DNA viruses that infect stratified epithelia. Infection may lead to hyperproliferative lesions such as warts and condyloma or in the case on high-risk human papillomaviruses (HPV16 and HPV18) to malignant tumors and are the major cause of cervical cancer .

The Human papillomavirus research group at Tartu University Institute of Technology has developed an effective model system to study HPV genome replication. The system is based on transfecting HPV genomes into human osteosarcoma cell line U2OS. I am using this novel model system to study the oligomerization of the viral genomes during the initial phase of replication. The oligomerization of viral genomes in host cells is a novel subject of research and not much is known about the phenomenon.

I confirmed the oligomerization patterns for HPV18 genome but also studied the replication and oligomerization of the HPV18 upstream regulatory non-coding region by using different truncated version of the URR region. I discovered that in our model system the essential *cis* factors for oligomerization are located in the URR region and the needed *trans* factors are the E1 and E2 replication proteins.

## KASUTATUD MATERJALID

Aldabagh, B., Angeles, J.G., Cardones, A.R., and Arron, S.T. (2013). Cutaneous squamous cell carcinoma and human papillomavirus: is there an association? *Dermatologic surgery* : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al] *39*, 1-23.

Antonsson, A., Erfurt, C., Hazard, K., Holmgren, V., Simon, M., Kataoka, A., Hossain, S., Hakangard, C., and Hansson, B.G. (2003). Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in healthy skin samples collected in three continents. *The Journal of general virology* *84*, 1881-1886.

Auster, A.S., and Joshua-Tor, L. (2004). The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1. Crystal structure, dimerization, and DNA binding. *The Journal of biological chemistry* *279*, 3733-3742.

Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H., Cowser, L.M., Olson, C., and Brown, J.C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophysical journal* *60*, 1445-1456.

Bedrosian, C.L., and Bastia, D. (1990). The DNA-binding domain of HPV-16 E2 protein interaction with the viral enhancer: protein-induced DNA bending and role of the nonconserved core sequence in binding site affinity. *Virology* *174*, 557-575.

Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., and de Villiers, E.M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* *401*, 70-79.

Bodily, J., and Laimins, L.A. (2011). Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in microbiology* *19*, 33-39.

Cai, Q., Lv, L., Shao, Q., Li, X., and Dian, A. (2013). Human papillomavirus early proteins and apoptosis. *Archives of gynecology and obstetrics* *287*, 541-548.

Cardoso, J.C., and Calonje, E. (2011). Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: a review. *Acta dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica* *20*, 145-154.

Chiang, C.M., Dong, G., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1992a). Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *Journal of virology* *66*, 5224-5231.

Chiang, C.M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T.F., Broker, T.R., and Chow, L.T. (1992b). Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral



origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 5799-5803.

Demeret, C., Desaintes, C., Yaniv, M., and Thierry, F. (1997). Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *Journal of virology* 71, 9343-9349.

Demeret, C., Le Moal, M., Yaniv, M., and Thierry, F. (1995). Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic acids research* 23, 4777-4784.

Dixon, E.P., Pahel, G.L., Rocque, W.J., Barnes, J.A., Lobe, D.C., Hanlon, M.H., Alexander, K.A., Chao, S.F., Lindley, K., and Phelps, W.C. (2000). The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* 270, 345-357.

Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., and Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-937.

Finlay, M.R., and Griffin, R.J. (2012). Modulation of DNA repair by pharmacological inhibitors of the PIKK protein kinase family. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 22, 5352-5359.

Flores, E.R., and Lambert, P.F. (1997). Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *Journal of virology* 71, 7167-7179.

Fuchs, E. (2008). Skin stem cells: rising to the surface. *The Journal of cell biology* 180, 273-284.

Fuchs, E. (2009). Finding one's niche in the skin. *Cell stem cell* 4, 499-502.

Gage, J.R., Meyers, C., and Wettstein, F.O. (1990). The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *Journal of virology* 64, 723-730.

Geimanen, J., Isok-Paas, H., Pipitch, R., Salk, K., Laos, T., Orav, M., Reinson, T., Ustav, M., Jr., Ustav, M., and Ustav, E. (2011). Development of a cellular assay system to study the genome replication of high- and low-risk mucosal and cutaneous human papillomaviruses. *Journal of virology* 85, 3315-3329.

Gillespie, K.A., Mehta, K.P., Laimins, L.A., and Moody, C.A. (2012). Human papillomaviruses recruit cellular DNA repair and homologous recombination factors to viral replication centers. *Journal of virology* 86, 9520-9526.

- Han, Y., Loo, Y.M., Militello, K.T., and Melendy, T. (1999). Interactions of the papovavirus DNA replication initiator proteins, bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen, with human replication protein A. *Journal of virology* 73, 4899-4907.
- Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell* 28, 739-745.
- Hawkins, M.G., Winder, D.M., Ball, S.L., Vaughan, K., Sonnex, C., Stanley, M.A., Sterling, J.C., and Goon, P.K. (2013). Detection of specific HPV subtypes responsible for the pathogenesis of condylomata acuminata. *Virology journal* 10, 137.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *The EMBO journal* 8, 3905-3910.
- Hegde, R.S. (2002). The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 31, 343-360.
- Henno, L. (2011). Inimese papilloomiviiruse DNA füüsilise oleku jälgimine U2OS rakkudes lühiajalise replikatsiooni tingimustes. Tartu Ülikool. Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut. Bakalaureusetöö.
- Holt, S.E., Schuller, G., and Wilson, V.G. (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. *Journal of virology* 68, 1094-1102.
- Horvath, C.A., Boulet, G.A., Renoux, V.M., Delvenne, P.O., and Bogers, J.P. (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology journal* 7, 11.
- Joyce, J.G., Tung, J.S., Przysiecki, C.T., Cook, J.C., Lehman, E.D., Sands, J.A., Jansen, K.U., and Keller, P.M. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* 274, 5810-5822.
- Kadaja, M., Silla, T., Ustav, E., and Ustav, M. (2009). Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology* 384, 360-368.
- Kadaja, M., Sumerina, A., Verst, T., Ojarand, M., Ustav, E., and Ustav, M. (2007). Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *EMBO J* 26, 2180-2191.

- Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., and Sakai, H. (2012). Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. *Frontiers in microbiology* 3, 152.
- Kurg, R. (2011) The role of E2 proteins in Papillomavirus DNA replication, In: *DNA Replication*, (edited by Seligmann, H.), pp. 613-638.
- Kurg, R., Uusen, P., Vosa, L., and Ustav, M. (2010). Human papillomavirus E2 protein with single activation domain initiates HPV18 genome replication, but is not sufficient for long-term maintenance of virus genome. *Virology* 408, 159-166.
- Lee, D., Kim, H., Lee, Y., and Choe, J. (1997). Identification of sequence requirement for the origin of DNA replication in human papillomavirus type 18. *Virus research* 52, 97-108.
- Li, R., Knight, J., Bream, G., Stenlund, A., and Botchan, M. (1989). Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome. *Genes & development* 3, 510-526.
- Li, X., and Heyer, W.D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell research* 18, 99-113.
- McBride, A.A. (2008). Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Advances in virus research* 72, 155-205.
- McBride, A.A., Oliveira, J.G., and McPhillips, M.G. (2006). Partitioning viral genomes in mitosis: same idea, different targets. *Cell Cycle* 5, 1499-1502.
- Mohr, I.J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E.J., MacPherson, P., and Botchan, M.R. (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250, 1694-1699.
- Moody, C.A., and Laimins, L.A. (2009). Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS pathogens* 5, e1000605.
- Moody, C.A., and Laimins, L.A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews Cancer* 10, 550-560.
- Moscicki, A.B. (2010). Human papillomavirus disease and vaccines in adolescents. *Adolescent medicine: state of the art reviews* 21, 347-363, x-xi.

Munger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M., and Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of virology* 63, 4417-4421.

Nakahara, T., Peh, W.L., Doorbar, J., Lee, D., and Lambert, P.F. (2005). Human papillomavirus type 16 E1circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *Journal of virology* 79, 13150-13165.

Orav, M., Henno, L., Isok-Paas, H., Geimanen, J., Ustav, M., and Ustav, E. (avaldata andmed).

Park, P., Copeland, W., Yang, L., Wang, T., Botchan, M.R., and Mohr, I.J. (1994). The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8700-8704.

Patel, H., Wagner, M., Singhal, P., and Kothari, S. (2013). Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. *BMC infectious diseases* 13, 39.

Patel, S.S., and Donmez, I. (2006). Mechanisms of helicases. *The Journal of biological chemistry* 281, 18265-18268.

Ponten, J., and Saksela, E. (1967). Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2, 434-447.

Reinson, T., Toots, M., Kadaja, M., Pipitch, R., Allik, M., Ustav, E., and Ustav, M. (2013). Engagement of the ATR-dependent DNA damage response at the human papillomavirus 18 replication centers during the initial amplification. *Journal of virology* 87, 951-964.

Remm, M., Brain, R., and Jenkins, J.R. (1992). The E2 binding sites determine the efficiency of replication for the origin of human papillomavirus type 18. *Nucleic acids research* 20, 6015-6021.

Sakakibara, N., Mitra, R., and McBride, A.A. (2011). The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci. *Journal of virology* 85, 8981-8995.

Sedman, J., and Stenlund, A. (1998). The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *Journal of virology* 72, 6893-6897.

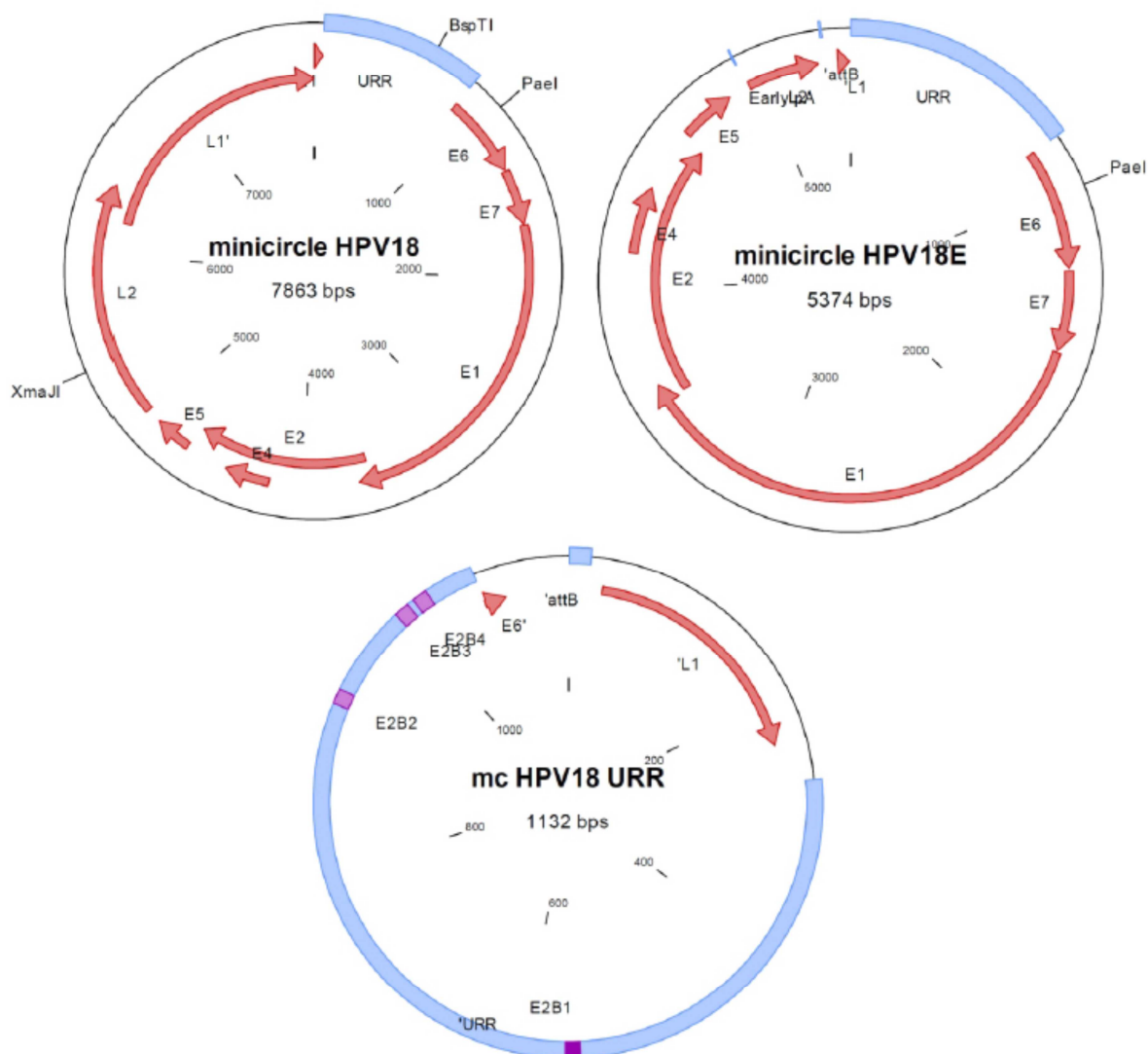
- Seo, Y.S., Muller, F., Lusky, M., Gibbs, E., Kim, H.Y., Phillips, B., and Hurwitz, J. (1993a). Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 2865-2869.
- Seo, Y.S., Muller, F., Lusky, M., and Hurwitz, J. (1993b). Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 702-706.
- Stanley, M.A. (2012). Genital human papillomavirus infections: current and prospective therapies. *The Journal of general virology* *93*, 681-691.
- Steger, G., and Corbach, S. (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *Journal of virology* *71*, 50-58.
- Stubenrauch, F., Hummel, M., Iftner, T., and Laimins, L.A. (2000). The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *Journal of virology* *74*, 1178-1186.
- Stubenrauch, F., Lim, H.B., and Laimins, L.A. (1998). Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. *Journal of virology* *72*, 1071-1077.
- Sverdrup, F., and Khan, S.A. (1994). Replication of human papillomavirus (HPV) DNAs supported by the HPV type 18 E1 and E2 proteins. *Journal of virology* *68*, 505-509.
- Sverdrup, F., and Khan, S.A. (1995). Two E2 binding sites alone are sufficient to function as the minimal origin of replication of human papillomavirus type 18 DNA. *Journal of virology* *69*, 1319-1323.
- Zhou, J., Stenzel, D.J., Sun, X.Y., and Frazer, I.H. (1993). Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *The Journal of general virology* *74 ( Pt 4)*, 763-768.
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews Cancer* *2*, 342-350.
- Ustav, M., and Stenlund, A. (1991). Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *The EMBO journal* *10*, 449-457.

Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., and Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 189, 12-19.

Wilson, V.G., West, M., Woytek, K., and Rangasamy, D. (2002). Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus genes* 24, 275-290.

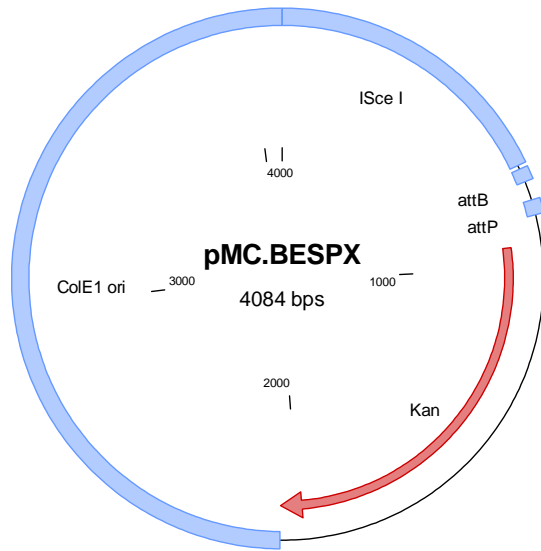
Vosa, L., Sudakov, A., Remm, M., Ustav, M., and Kurg, R. (2012). Identification and analysis of papillomavirus E2 protein binding sites in the human genome. *J Virol* 86, 348-357.

# LISAD



**Lisa 1. HPV18, HPV18E ja HPV18 URR pisirõngaste kaardid.**

*Minicircle* HPV18 on ~7,9kb, HPV18E ~5,4kb ja HPV18 URR ~1,1kb suurune. Kõigil asub enne URR piirkonda väike lisajärjestus – polülinker. HPV18 ja HPV18E genomidel on toodud eksperimentaalse osa katsetes kasutatud ensüümide lõikekohad. HPV18 URR kaardil on toodud E2 valgu seondumispirkonnad.



**Lisa 2. pMC.BESPX algplasmidi kaart.**



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Liisi Henno (12. aprill 1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**Inimese papilloomiviiruse tüüp 18 DNA replikatsiooni ja oligomerisatsiooni jälgimine U2OS rakkudes lühiajalise replikatsiooni tingimustes**

mille juhendajad on Ene Ustav, PhD ja Marit Orav, MSc,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **27.05.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27. Mai 2013