

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivana Jerković

**Produkcija onkoproteina E6 i E7
humanog papiloma virusa u
bakteriji *Escherichia coli***

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2010.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. inž. biologije, smjer molekularna biologija.

Voditelji rada:

dr. sc. Magdalena Grce

doc. dr. sc. Maja Matulić

Zahvaljujem se:

Dr. sc. Magdaleni Grce koja me primila u svoj laboratorij te mi ustupila sve potrebno da bih ovaj rad uspješno izradila i završila ali isto tako i na brojnim savjetima, preporukama te velikoj moralnoj i stručnoj pomoći prilikom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Dipl. ing. Ivanu Sabolu na najvećoj stručnoj pomoći prilikom mog rada u laboratoriju, brojnim savjetima za rad i pisanje, ustupcima, iznimnoj pristupačnosti i nadasve strpljivosti. Nadalje bih se htjela zahvaliti na cjelokupnoj izradi prvog dijela ovog istraživanja što mi je omogućilo da radim na baš tom projektu.

Dipl. ing. Nini Milutin Gašperov za strpljivo lektoriranje ovog rada i savjete prilikom boravka u laboratoriju.

Doc. Dr. sc. Maji Matulić za stručnu pomoć pri izradi ovog diplomskog rada.

Mojim roditeljima i prijateljima koji su mi bili pomoć i podrška kada mi je trebalo.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

PRODUKCIJA ONKOPROTEINA E6 I E7 HUMANOG PAPILOMA VIRUSA U BAKTERIJI *ESCHERICHIA COLI*

Ivana Jerković

Institut Ruđer Bošković
Bijenička 54
Zavod za molekularnu medicinu
HR-10002 Zagreb, Hrvatska

Humani papiloma virus (HPV) spada u obitelj Papilomavirusa. U 1970-ima dokazano je kako infekcija čovjeka ovim virusom kod žena može dovesti do razvoja raka vrata maternice. Za onkogenična svojstva HPV-a odgovorni su E6 i E7 geni, odnosno njihovi proteini. Cilj ovog istraživanja bio je eksprimirati E6 i E7 gene tako da dobijemo nativne i topive proteine koji se mogu koristiti za daljnje istraživanje. Uvidom u slijed nukleotida genoma HPV 16 odabrane su početnice za umnažanje E6 i E7 gena. Pomoću vektorskog sustava prenešeni su u bakteriji *E. coli* gdje se odvijala ekspresija. U ovom radu smo, mijenjali uvjete ekspresije kako bi našli optimalne za dobivanje nativnih proteina. Iako je ekspresija bila uspješna, nijedan od promijenjenih parametara nije utjecao na topivost proteina. Kao alternativni pristup, proteine smo izolirali u denaturirajućim uvjetima.

62 stranica, 8 slika, 2 tablica, 97 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u: Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: virus HPV, onkogeničnost, rak vrata maternice, protein E6, protein E7, produkcija stranih proteina, *E. coli*

Voditelj: dr. sc. Magdalena Grce
doc. dr. sc. Maja Matulić

Ocjenitelji: dr. sc. Magdalena Grce
doc. dr. sc. Maja Matulić
prof. dr. sc. Gordana Lacković Venturin
doc. dr. sc. Mirna Ćurković Perica

Rad prihvaćen: 15.09.2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

PRODUCTION OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS E6 AND E7 ONCOPROTEINS IN *ESCHERICHIA COLI*

Ivana Jerković

Ruđer Bošković Institute
Bijenička 54
Department of Molecular Medicine
HR-10002 Zagreb, Croatia

Human papilloma virus (HPV) belongs to Papillomavirus family. In the 1970s it has been demonstrated that human infection by this virus in women may lead to the development of cervical cancer. The oncogenic properties of HPV are E6 and E7 genes. The aim of this study was the expression of E6 and E7 genes in order to obtain native, productive proteins for further research. Based on the genome sequence of HPV type 16, specific primers for E6 and E7 amplification were designed. Using a vector system the amplicons were transferred into *E. coli* bacteria where they were expressed. In this study, we have changed the conditions of the expression in order to find the optimal condition. Although the expression was successful, the proteins remained insoluble under every tested change. Therefore, the alternative approach that we applied was to extract the proteins in denaturing conditions.

62 pages, 8 pictures, 2 tables, 97 references, original in: Croatian

Thesis deposited in: Central Biological Library

Key words: HPV virus, oncogenic, cervical cancer, protein E6, protein E7, foreign protein production, *E. coli*

Supervisors: dr. sc. Magdalena Grce
doc. dr. sc. Maja Matulić

Reviewers: dr. sc. Magdalena Grce
doc. dr. sc. Maja Matulić
prof. dr. sc. Gordana Lacković Venturin
doc. dr. sc. Mirna Ćurković Perica

Thesis accepted: 15.09.2010.

SADRŽAJ

1	UVOD	- 1 -
1.1	Povijest otkrića humanog papiloma virusa (HPV).....	- 2 -
1.2	Obitelj papiloma virus (PV).....	- 4 -
1.3	Humani papiloma virus (HPV) tip 16	- 6 -
1.3.1	Organizacija genoma HPV 16.....	- 6 -
1.3.2	Genski produkti HPV 16.....	- 8 -
1.4	E6 i E7 proteini HPV 16	- 10 -
1.4.1	Građa i uloga E6 proteina.....	- 10 -
1.4.1.1	Interakcija p53 i E6	- 12 -
1.4.1.2	E6 i regulacija ostalih staničnih procesa.....	- 15 -
1.4.2	Građa i uloga E7 proteina.....	- 18 -
1.4.2.1	Interakcija pRb i E7	- 19 -
1.4.2.2	E7 i regulacija ostalih staničnih procesa.....	- 20 -
2	OBRAZLOŽENJE TEME.....	- 22 -
3	MATERIJALI I METODE	- 24 -
3.1	Biološki materijal.....	- 25 -
3.2	Kloniranje	- 25 -
3.2.1	Izbor početnica i vektorski sistem	- 25 -
3.3	Transformacija <i>Escherichia coli</i>	- 27 -
3.4	Rast transformiranih bakterija.....	- 27 -
3.5	Indukcija IPTG-om i produkcija proteina	- 28 -
3.6	Pročišćavanje proteina.....	- 29 -
3.6.1	Pročišćavanje proteina u nativnim uvjetima	- 29 -
3.6.2	Pročišćavanje proteina u denaturirajućim uvjetima.....	- 30 -
3.7	Vizualizacija proteina elektroforezom u denaturirajućem gelu akrilamida.....	- 31 -
4	REZULTATI.....	- 34 -
5	RASPRAVA	- 38 -
6	ZAKLJUČAK.....	- 42 -
7	LITERATURA.....	- 44 -
8	PRILOZI	- 52 -
8.1	Kemikalije	- 53 -
8.2	Uređaji.....	- 54 -
8.3	Popis kratica	- 55 -

1 UVOD

1.1 Povijest otkrića humanog papiloma virusa (HPV)

U 19. stoljeću Rigorni-Strern proučavao je smrtne listove žena u Veroni te uočio učestalu pojavu raka vrata maternice u udanih žena, udovica i prostitutki, ali vrlo rijetku pojavu iste bolesti u djevice i časnih sestara, stoga je zaključio da je za razvoj te bolesti odgovoran uzročnik koji se prenosi spolnim kontaktom. Tek kasnih 1960-ih je pretpostavljeno virusno porijeklo te bolesti, a 1970-ih otkriven je i uzročnik, humani papiloma virus (HPV).

Godine 1965. je prvi put uočen i opisan genetički materijal HPV-a (Crawford, 1965). Ranih 1970-ih uočena je velika raznolikost Papilomavirusa (PV) na temelju razlika antigena genitalnih i kožnih bradavica (Almeida i sur. 1969), a hibridizacijskim istraživanjima zur Hansen i sur. potvrdili su uočenu heterogenost tih virusa (zur Hansen i sur. 1974a; zur Hansen i sur. 1974b).

Za daljnji tijek istraživanja HPV-a vrlo je bitno uočavanje povezanosti infekcije virusom i pojave raka vrata maternice. To je prvi put uspješno povezano 1972. godine nakon što nisu uspjeli povezati Herpes simplex virus tip 2 sa rakom vrata maternice (zur Hansen i sur., 1974b). Slijedio je nagli razvoj istraživanja HPV-a koji je 1982. doveo do izoliranja genoma HPV tipa 6 iz spolne bradavice (Gissman i zur Hausen, 1980) i HPV tipa 11 iz laringealnog papiloma čovjeka (Gissman i sur., 1982). Nakon brojnih dokaza o heterogenosti Papilomavirusa uslijedila su istraživanja za izoliranje novih tipova virusa iz uzoraka raka vrata maternice. Već sljedeće godine hibridizacijom sa HPV tipom 11, koji je služio kao proba, otkriven je novi tip HPV virusa, HPV tip 16 (Dürst i sur., 1983). Ubrzo nakon njega pronađen je i HPV tip 18 okarakteriziran u staničnoj kulturi uzgojenoj iz uzorka raka vrata maternice (Boshart i sur., 1984).

Istraživanja koja su uslijedila bila su ponajviše usmjerena na mehanizme njihove onkogeničnosti. Otkriveni su virusni proteini i njihova uloga, ponajprije E6 i E7 proteini, a uočena je i delecija u virusnom genomu prilikom integracije u genom domaćina (Schwarz i sur., 1985). Uloga E6 i njegova interakcija sa p53 (Werness i sur., 1990) te uloga E7 u interakciji sa pRB staničnim proteinom (Dyson i sur., 1992) dala je objašnjenje za karcinogenezu raka vrata maternice premda detalji još nisu bili poznati.

Usporedno sa otkrićem HPV-a išlo je i otkrivanje uloge HPV-a u nekih oblika raka. Ponajviše se to odnosi na rak vrata maternice za koji je uočena iznimna povezanost sa HPV infekcijom. Široke epidemiološke studije pokazuju da je u čak 99% žena koje su oboljele od tog oblika raka dokazana prisutnost HPV infekcije, a u 97% tih slučajeva dokazana je prisutnost HPV tipa 16, 18, 31, 33 ili 45 (Clifford i sur., 2003; Walboomers i sur. 1999), od čega je HPV tip 16 odgovoran za 50%, a HPV tip 18 za 20% slučajeva (Muñoz i sur., 2003; Smith i sur., 2007; Ghittoni i sur., 2010). HPV tipovi koji inficiraju sluznicu prilikom inficiranja vrata maternice najčešće ciljaju zonu transformacije između ektocervikalnih pločastih i endocervikalnih kolumnarnih stanica stoga što su stanice na tom mjestu vrlo podložne promjenama tijekom života žene. Većina zaraza HPV-om ne dovodi do citoloških promjena zaraženih stanica niti do pojave raka, već tu zarazu suzbija imunološki sustav najčešće tijekom 6 do 12 mjeseci. Ukoliko zaraza potraje razvijaju se citološke promjene na zaraženom tkivu (CIN, od engl. *Cervical Intraepithelial Neoplasia*) koje može ili nestati spontanom regresijom ili se razviti u teže promjene ili invazivni rak vrata maternice. Rizik se povećava ukoliko je tijelo izloženo dodatnim vanjskim ili unutarnjim kancerogenim čimbenicima. Ti čimbenici su: pušenje, spolne navike, oralna kontracepcija, roditeljstvo te genetska predodređenost (Jones i sur., 1990; Magnusson i sur., 1999; Moreno i sur., 1995; Muñoz i sur., 2002; Schiffman i sur., 1987).

Za dokazivanje prisutnosti HPV-a bitno je da zaražena stanica domaćina sadrži barem jedan virusni genom, a za održavanje promijenjenog fenotipa bitno je da su E6 i E7 virusni geni konstantno eksprimirani. To je ujedno preduvjet za nastanak raka vrata maternice.

Prevenција je iznimno bitna pošto će čak 80% svjetske populacije žena biti izloženo nekom tipu HPV-a prije nego dosegnu 50 godina života. Otkada se u ginekološku praksu uveo proces probira (ranog otkrivanja bolesti u zdravoj populaciji), pojava raka vrata maternice smanjila se za čitavih 70% u zemljama gdje se to sustavno provodi u sklopu organiziranih programa probira (Grce, 2009).

Sva istraživanja kulminirala su nedavnim razvojem cjepiva protiv najonkogenijih tipova HPV-a, što je od iznimne važnosti pošto je rak vrata maternice drugi najučestaliji oblik raka kod žena, a većina tog oblika raka uzrokovana je infekcijom sa virusom HPV-a (Grce, 2009).

1.2 Obitelj papiloma virus (PV)

Papilomavirus čovjeka (PV, od engl. *Papillomavirus*) pripada heterogenoj grupi virusa iz obitelji *Papillomaviridae* (Bernard i sur. 2010). Papilomavirusi (PV) su vrlo raširena skupina virusa koju čine 189 PV grupiranih u 29 rodova ljudskog porijekla (120 tipova) te ostalih sisavaca (64 tipa), ptica (3 tipa) i gmazova (2 tipa). PV zaražavaju epitelne stanice kože i sluznice što može uzrokovati različite neoplazme ili ostati u stanici potpuno asimptomatski dugi niz godina.

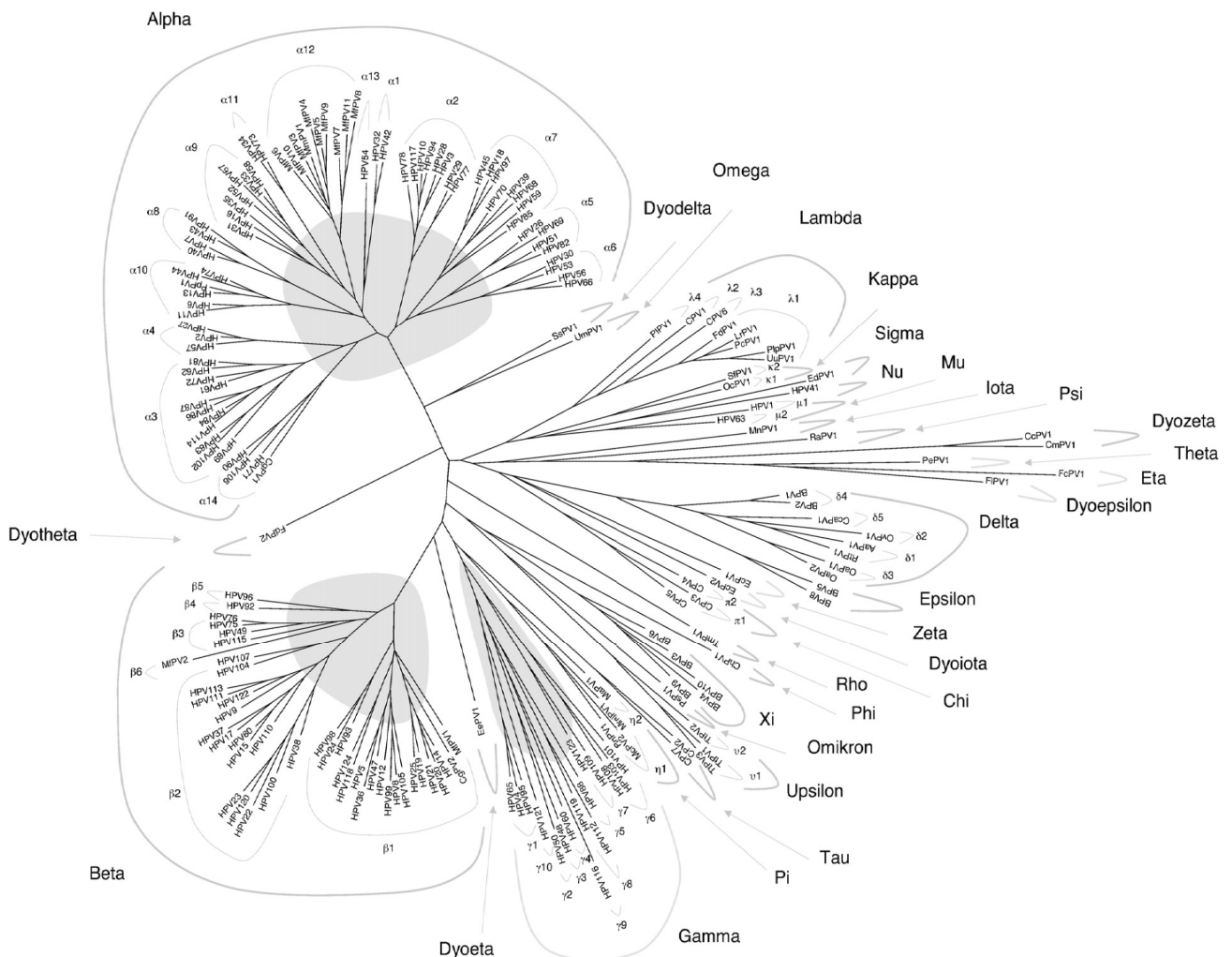
PV su klasificirani prema vrsti koju zaražavaju npr. BPV (od engl. *Bovine papillomavirus*) te unutar tih skupina prema srodnosti s DNA papilomavirsa iste vrste. Sličnost na razini DNA se određuje prema slijedu nukleotida koji kodiraju za gen L1 te je potrebna sličnost u 90% ili više da bi se virus smatrao istim tipom (de Villiers i sur., 2004).

HPV možemo podijeliti prema njihovom karcinogenom potencijalu, odnosno stupnju rizika razvoja karcinoma (**Tablica 1**). HPV visokog rizika većinom se pojavljuje u zloćudnim oštećenjima epitela, karcinomima i displazijama visokog stupnja, a HPV niskog rizika ponajviše se nalaze u dobroćudnim oštećenjima epitela poput genitalnih bradavica (Muñoz i sur., 2003). Virusi visokog rizika svoju DNA često ugrađuju u genom domaćina što dovodi do pojačane ekspresije E6 i E7 virusnih onkogeni.

Tablica 1. Podjela virusnih HPV tipova prema njihovom karcinogenom potencijalu
(prema Muñoz i sur., 2003)

HPV visokog rizika	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 i 82
HPV potencijalno kacinogeni	26, 53 i 66
HPV niskog rizika	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 i CP6108

HPV je virus čiji se genetski materijal sastoji od kružne dvolančane DNA (c dsDNA, od engl. *circular double stranded DNA*) veličine otprilike 8.000 parova baza (bp, od engl. *base pair*) koja kodira za najčešće 8 gena te ima ikozaedersku kapsidu. Otkriveno je 120 tipova HPV-a za koje je poznat čitav slijed nikleotida ali postoje smjernice za postojanje još mnogo drugih tipova koji tek trebaju biti dokazani. Filogenetsko stablo papilomavirusa je dizajnirano na temelju sličnosti u sekvenci za L1 gen te ih dijelimo u rodove Alfa, Beta, Gama, Rho, Mu, Nu i dr. (**Slika 1**).



Slika 1. Filogenetsko stablo papiloma virusa (prema Bernard i sur., 2010)

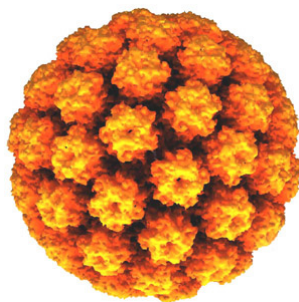
1.3 Humani papiloma virus (HPV) tip 16

HPV tip 16 spada u rod Alfa-PV kao i HPV 2, HPV 6, HPV 31, HPV 33 i dr. HPV 16 koji je najučestaliji, također je i najonkogeniji tip među svim poznatim tipovima Alfa-PV-a. HPV tipovi 16, 18, 31, 33 i 45 su svi zajedno povezani sa više od 97% slučajeva raka vrata maternice (Clifford i sur., 2003; Walboomers i sur., 1999) među kojima prednjači HPV 16 koji je detektiran u čak 50% svih slučajeva raka vrata maternice (Ghittoni i sur., 2010).

HPV tip 16 najčešće je prisutan u sluznicama spolnog sustava te se smatra spolno prenosivom infekcijom, najčešće je dokazan kod raka vrata maternice, ali i kod analnog raka, raka stidnice i penisa. Nadalje, može inficirati i sluznice dišnog sustava te se pojavljuje i u 25% raka glave ili vrata (zur Hausen, 2009).

1.3.1 Organizacija genoma HPV 16

HPV je mali virus promjera 52-55 nm bez lipoproteinske ovojnice (Howley, 1990) te veličine genoma od 8.000 pb (**Slika 2**). Obavijen je kapsidom (proteinskim omotačem) koji je ikozaedralne simetrije i sastoji se od 72 kapsomere a sastoji se od dvije proteinske podjedinice, velike koja čini čak 80% proteina virusa (Mr 55 kd) te male (Mr 70 kd). Na kapsidi nalazimo tipsko i vrsnospecifične antigenske determinante.



Slika 2. Shematski prikaz virusne čestice humanog papiloma virusa

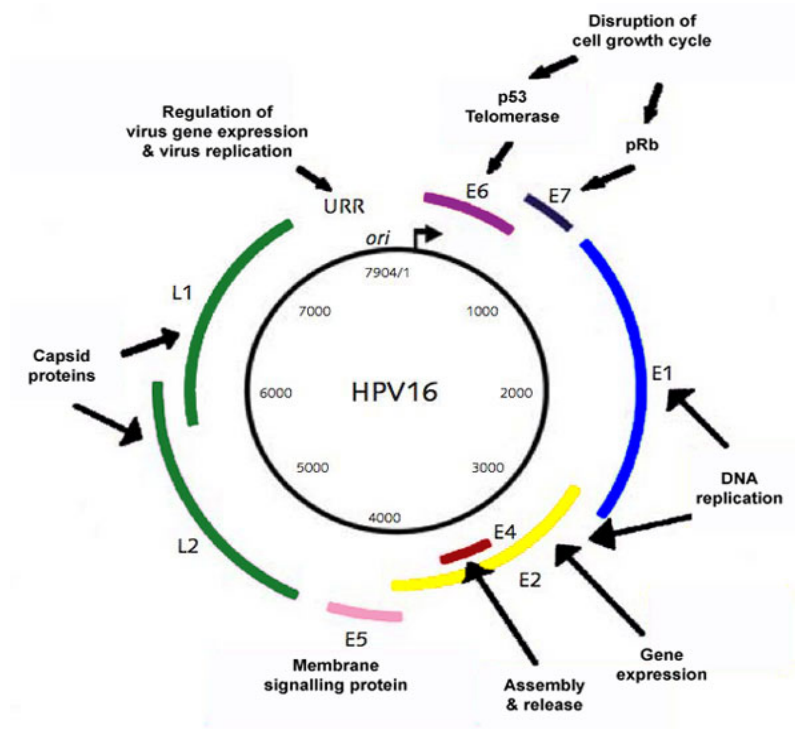
(preuzeto sa <http://codingnews.inhealthcare.com/files/2010/06/hpv.jpg>)

DNA HPV-a veličine $5,2 \times 10^6$ daltona u interakciji sa staničnim histonima stvara komplekse slične kromatinu te se umnožava u jezgri stanica domaćina. HPV 16 je sekvenciran te je poznata organizacija njegovog genoma (**Slika 3**). Svi tipovi HPV-a sadrže barem 8 ili 9 otvorenih okvira čitanja (ORF, od engl. *Open Reading Frame*) na jednom lancu DNA. To je ujedno jedini lanac koji se prepisuje i od kojeg se stvara mRNA.

Genom se može podijeliti u 3 regije koje su podijeljene s obzirom na ranu ili kasnu ekspresiju u stanici domaćina (**Slika 3**).

Postoje:

- Kodirajuća regija sa ranim genima (E1, E2, E4, E5, E6 i E7; duljine oko 4,5 kb)
- Kodirajuća regija sa kasnim genima (L1, kodira veliku podjedinicu i L2 kodira malu podjedinicu kapside; zajedno duljine oko 2,5 kb)
- Nekodirajuća regija (LCR, od engl., *Long Control Region*; duljine oko 1 kb)



Slika 3. Organizacija genoma HPV 16

(preuzeto sa www.microbiologybytes.com/virology/Papillomaviruses.html)

LCR regija se nalazi u genomu između dva otvorena okvira čitanja, L1 i E6, ne daje proteinski produkt te sadrži većinom regulatorne elemente koji su uključeni u umnožavanje i prepisivanje virusne DNA. Osim toga LCR sadrži i jedan od dva virusna promotora, tu se nalazi ishodište za replikaciju virusnih ranih gena P97, dok je drugo ishodište za replikaciju kasnih gena smješten pri kraju E7 gena. Ostale dvije regije kodiraju za proteine, E (engl. *Early*) regija kodira za proteine koji su potrebni za umnožavanje i prepisivanje, a L (engl. *Late*) regija kodira za proteine za virusni proteinski omotač.

Umnožavanje DNA i prijepis kasnih gena događa se samo u diferenciranim stanicama, a rani geni se prepisuju i u proliferirajućim stanicama.

1.3.2 Genski produkti HPV 16

Od 3 regije prisutne na genomu HPV tipa 16 dvije od njih kodiraju za proteine te daju proteinske produkte, to su regije E i L. Rana regija kodira za 6 proteina i oni su važni u regulaciji transkripcije, replikacije i postizanju onkogeničnosti virusa, dok L1 i L2 proteini zajedno izgrađuju kapsidu koja obavlja virus (Ghittoni i sur., 2010).

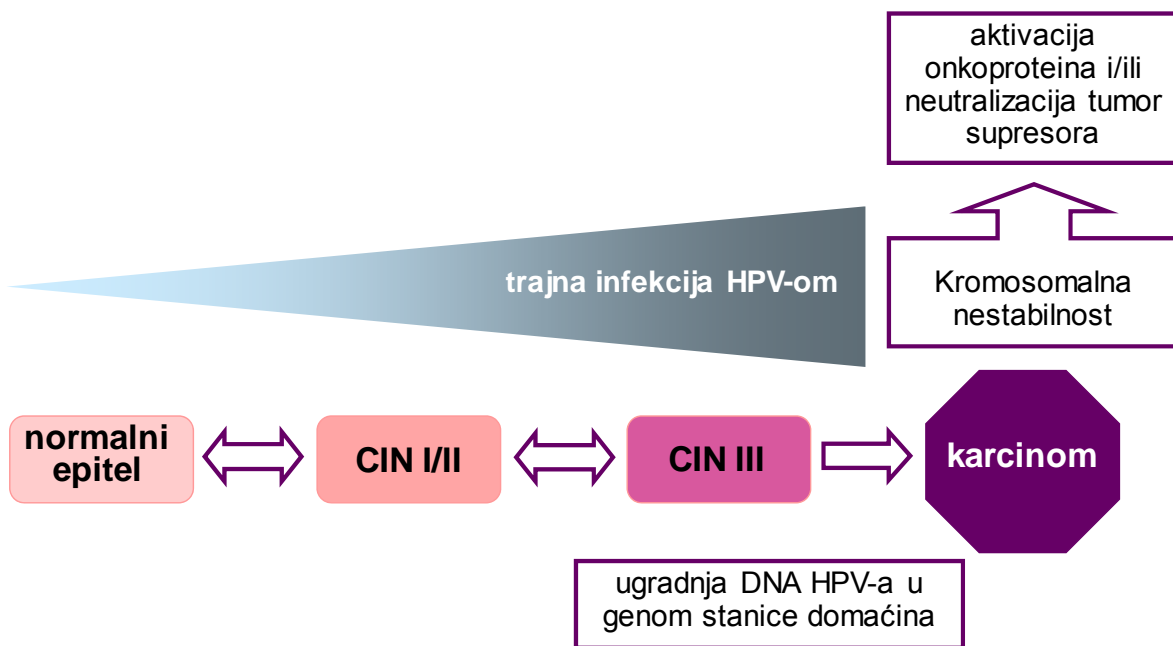
Rana, E regija, kodira za proteine koji su potrebni pri osnovnim procesima povezanim uz virusno preživljenje u stanici domaćinu. E1 protein iznimno je važan jer se nakon fosforilacije veže na *ori* mjesto koje označava ishodište replikacije i nužan je za replikaciju. Funkcionalno E1 je ATP-aza te se na njega nakon vezanja na *ori* mjesto veže i E2 protein (Ghittoni i sur., 2010).

E2 protein ima regulatornu ulogu i sadrži vrlo konzerviranu regiju koja je zajednička većini papilomavirusa te gradi dimere. Kao dimer E2 protein odlazi do LCR domene gdje se veže na palindromski slijed i sudjeluje u kontroli procesa replikacije i translacije DNA. Nakon vezanja dimer može djelovati kao aktivator ili inhibitor procesa (Ghittoni i sur., 2010).

E4 protein ima ulogu u destabilizaciji citokeratinske mreže te u kasnijem dijelu ciklusa pomaže u oslobađanju virusne čestice iz stanice (Ghittoni i sur., 2010). E5 protein se nalazi u staničnoj membrani i pomaže u prijenosu signala za čimbenike rasta (Ghittoni i sur., 2010).

Kod visokorizičnih HPV tipova 16 i 18, E2 protein djeluje kao inhibitor promotora za E6 i E7 gene i na taj način zaustavlja njihovu translaciju. Kod ulaska tih tipova HPV-a u stanicu oni se mogu ugraditi u području okvira čitanja E1 i E2 gena što može poremetiti njihovu funkciju. To utječe na regulaciju aktivnosti kod E6 i E7 gena te je prisutna konstitutivna transkripcija tih gena. HPV virusi ne ugrađuju se na jednom i točno određenom mjestu u genom domaćina već na bilo koje mjesto u genomu domaćina koje je relativno nestabilno i podložno lomovima (Ghittoni i sur., 2010).

E6 i E7 su glavni onkoproteini te su odgovorni za niz procesa koji tjeraju stanicu na izbjegavanje apoptoze i ignoriranje oštećenja (**Slika 4**) (Ghittoni i sur., 2010). E6 protein se veže na stanični tumor supresor protein p53 te ga time inaktivira i onemogućuje detekciju oštećenja DNA. E6 visokorizičnih HPV-a ga ujedno razgrađuje. Istovremeno E7 protein se veže za stanični protein pRb te tjera stanicu u konstantne diobe.



Slika 4. Shematski prikaz utjecaja HPV-a na razvoj raka vrata maternice

1.4 E6 i E7 proteini HPV 16

E6 i E7 su najvažniji virusni proteini odgovorni za onkogeno svojstvo HPV virusa te održavanje promijenjenih svojstava stanice (Ghittoni i sur., 2010). Združenim djelovanjem kontroliraju dva osnovna događaja u tom procesu, transformaciju zaražene stanice i izbjegavanje odgovora imunog sustava domaćina. Sredinom 1980-ih godina otkriveni su proteini E6 i E7 i od tada su osnova većine istraživanja koja se bave proučavanjem onkogeneze uzrokovane HPV virusom. Biokemijske studije pokazale su kako postoje strukturalne razlike između E6 i E7 proteina iz HPV tipova visokog rizika, HR (engl. *High Risk*) i HPV tipova niskog rizika, LR (engl. *Low Risk*) što je pomoglo u razumijevanju mehanizama kojima virus dovodi do maligne transformacije. Zahvaljujući dugom periodu latencije HPV je izniman model za proučavanje uloga onkoproteina u staničnoj karcinogenezi, ali i u razumijevanju općenitih mehanizama kojima se dovodi stanica u promijenjeno stanje i zadržava isto (Ghittoni i sur., 2010).

1.4.1 Građa i uloga E6 proteina

E6 je mali protein eksprimiran rano u virusnom ciklusu. Sastoji se od 150 aminokiselina i blizu oba kraja mogu se primijetiti motivi nazvani „Cink prsti“ (Zinc-fingers) koji su povezani sa centralnom domenom veličine 36 aminokiselina. Na samim krajevima, N- i C- kraju nalaze se varijabilne domene. Na krajevima Cink prstiju nalazi se cistein bogata regija koja je konzervirana kod E6 svih tipova (Ghittoni i sur., 2010).

Stanični proteini sadrže dvije poznate domene, LXXLL i PDZ, preko kojih se vežu na E6 virusni protein. LXXLL domena je leucin bogata regija (L = leucin, X = bilo koja negativno nabijena aminokiselina) što je zajednička osobina pri vezanju na HR HPV i LR HPV. HR HPV E6 proteini dodatno se mogu vezati na stanične proteine svojom PDZ domenom (PDZ od početnih slova imena prva 3 proteina na kojima je ova domena uočena). Vezanje na PDZ domenu ide preko regije na E6 proteinu koja je nazvana XT/SXV regija i nalazi se na C- kraju proteina (Ghittoni i sur., 2010).

E6 onkoprotein veže se na brojne druge stanične proteine i nisu poznate biokemijske strukture domena niti mehanizmi reakcija sa tim drugim proteinima, samo se pouzdano zna da se na njih ne veže na gore predložene motive (**Slika 5**) (Howie i sur.,

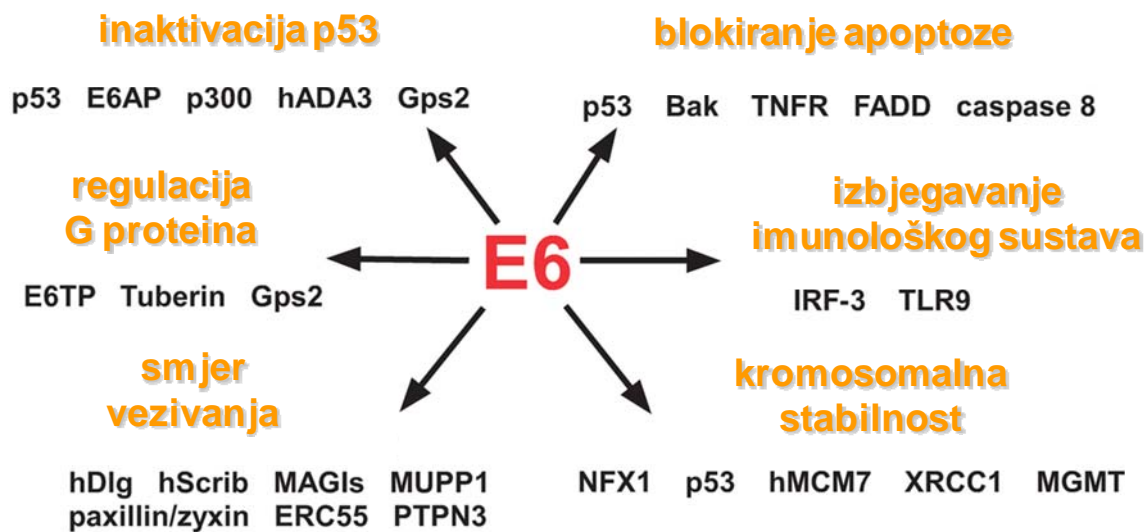
2009). Virusni E6 onkoprotein ključni je čimbenik u transformaciji stanica i zadržavanju promijenjenog fenotipa. Zahvaljujući istraživanjima na ovom proteinu otkriveni su brojni mehanizmi virusne ali i općenito onkogeneze. Kod čak 50% svih ljudskih tumora uočena je mutacija u genu za p53 protein, a kako i E6 protein reagira s njim, ta činjenica iskoristila u razumijevanju mehanizma nastanka tumora. Ovaj protein utječe na brojne stanične signalne puteve te se uključuje u regulaciju staničnog ciklusa. Zbog heterogenosti funkcija koje obavlja E6 protein postoje brojni mehanizmi kojima to postiže i proteini sa kojima reagira (Howie i sur., 2009).

Da bi se nakupina stanica mogla definirati kao tumor potrebno je ispuniti određene uvjete i posjedovati određene karakteristike. Godine 2000. opisano je 6 osnovnih tumorskih karakteristika (Hanahan i Weinberg, 2000). To su:

- Neograničena mogućnost proliferacije
- Neovisnost o čimbenicima rasta
- Izbjegavanje apoptoze
- Neosjetljivost na stanične citostatike
- Angiogeneza
- Metastaziranje

Osnovne uloge E6 proteina u stanici domaćina:

- Blokiranje apoptoze
- Induciranje telomerazne aktivnosti
- Poremećaj stanične adhezije, polarnosti i diferencijacije epitela
- Izbjegavanje imunog sustava domaćina



Slika 5. Shematski prikaz glavnih liganada E6 proteina (prema Howie i sur., 2009)

Na heterogenost E6 proteina ukazuju njegove uloge u stanici koje gotovo u potpunosti pokrivaju tumorske karakteristike koje se odnose na staničnu razinu. Uzevši to u obzir E6 se može okarakterizirati kao glavni virusni onkoprotein. Da bi postigao tu razinu stanične kontrole E6 mora reagirati sa mnogo, često ključnih staničnih proteina. Najpoznatiji i najvažniji stanični protein koji reagira sa E6 proteinom je p53, često nazivan i čuvarom genoma. Mehanizmi kojima E6 kontrolira p53 su brojni i nisu svi potpuno razjašnjeni.

1.4.1.1 Interakcija p53 i E6

Protein p53 je normalni stanični protein koji je prisutan u zdravoj, nezaraženoj stanici u niskoj koncentraciji, transkripcijski je gotovo neaktivan a u tim uvjetima podložan je i razgradnji Mdm-2 ubikvitin ligazom (Honda i sur., 1997). Ukoliko dođe do virusne infekcije, oštećenja DNA ili bilo kakvog oblika staničnog stresa Mdm-2 razgradnja je inhibirana što dovodi do povećanja koncentracije p53 proteina u stanici i posttranslacijske aktivacije. Aktiviran p53 utječe na puteve popravka DNA, zaustavlja stanični ciklus, a ako je oštećenje nepremostivo aktivira i apoptozu.

Ugradnjom u genom domaćina HPV nepravilno aktivira sintezu DNA što aktivira p53. Nakon aktiviranja tumor-supresor p53 proteina HPV virus treba inaktivirati taj

protein da bi preživio u stanici domaćinu. S tim ciljem razvilo se niz mehanizama kojima se dovodi do inaktivacije p53 proteina. Prilikom infekcije HPV-om E6 u interakciji sa staničnim proteinima može uzrokovati:

- Preskakanje kontrolnih točaka u G1 i G2
- Raspad p53 pomoću ubikvitinacije proteina
- Pogrešnu lokalizaciju p53
- Modifikaciju p53

Najpoznatiji i najbolje istražen mehanizam interakcije p53 i E6 je E6 inducirani raspad p53 pomoću ubikvitinacije. U normalnoj stanici nalazimo neke ubikvitin ligaze koje ne reagiraju sa p53 no u kompleksu sa E6 dovode do ubikvitinacije te proteosomalne degradacije. Ta E3 ubikvitin ligaza nazvana je E6AP (Huibregtse i sur., 1991 i 1993; Scheffner i sur., 1993).

Ovaj put jedna je od ključnih razlika između HR i LR HPV tipova virusa. Naime HR HPV virusi vežu se za C- kraj i centralnu regiju p53 proteina, a LR HPV virusi samo za C- kraj p53 proteina te je proteosomalna razgradnja p53 svojstvena samo HR HPV tipovima virusa (Crook i sur., 1991; Li i Coffino, 1996; Ghittoni i sur., 2010) (**Slika 6**). Ipak, LR HPV tipovi ne mogu uopće, a HR HPV tipovi ne mogu u potpunosti razgraditi sav p53 u stanici te su stoga morali razviti dodatne mehanizme supresije njegove aktivnosti.

Dodatni mehanizmi uključuju:

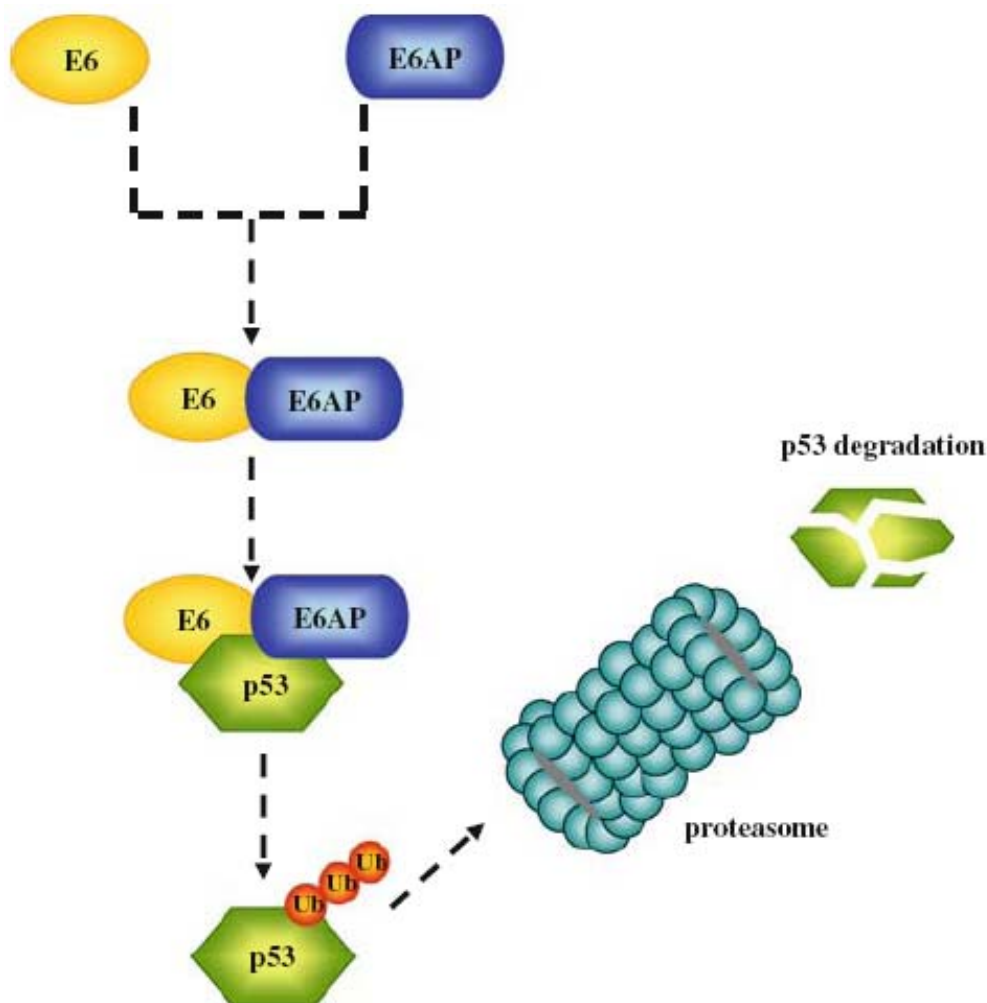
- Inhibiciju vezanja p53 proteina na točnu DNA sekvencu (Lechner i Laimins, 1994; Thomas i sur., 1995) – snaga inhibicije ovisi o tome da li se radi o HR ili LR HPV-u. Najvjerojatnije se to odvija na dva načina, samom inhibicijom vezanja usljed konformacijskih promjenama ili disocijacijom već vezanog p53 uslijed tih promjena.

- Kriva lokalizacija p53 proteina za što postoje dva najvjerojatnija mehanizma: maskiranje jezgrinog lokalizacijskog signala na C- kraju p53 proteina (NLS, od engl. *Nuclear Localization Signal*) ili pojačan eksport p53 proteina iz jezgre (Mantovani i Banks, 2001).

- Onemogućavanje acetiliranja p53 proteina. Nakon acetilacije p53 proteina pomoću p300/CBP (Patel i sur., 1999; Zimmermann i sur., 2000) ili hADA3 (histonske transacetilaze) (Kumar i sur., 2002) taj stanični protein pokazuje veći afinitet pri vezanju za DNA regije gdje je smješten promotor gena p53 i na taj način potiče njegovu transkripciju. Ukoliko se E6 protein veže za p300 i/ili CBP oni više nisu sposobni

acetilirati p53 i time smanjuju njegovu ekspresiju. HR HPV E6 protein pokazuje veći afinitet pri vezanju tih proteina nego LR HPV E6 protein.

- Ukoliko se E6 veže sa hADA3 ekspresija se ne smanjuje istim mehanizmom kao kod p300 i CNP, već će to vezanje dovesti do direktnog razaranja hADA3 proteina.
- Direktna inhibicija Mdm-2 ubikvitin ligaze, neovisno o E6-p53 proteinskom kompleksu koji dovodi do razaranja p53. U stanju „onkogenog stresa“ direktno se inhibira Mdm-2 ubikvitin ligaza što dovodi do povećavanja koncentracije p53 proteina u stanici te do njegove aktivacije. Proteini odgovorni za taj način aktivacije p53 su p14/ARF (Matheu i sur., 2008). Ukoliko ARF reagira sa E6 ARF više nije u mogućnosti aktivirati p53.



Slika 6. Shematski prikaz proteosomalne razgradnje p53 proteina ubikvitinacijom posredovanom E6 (prema Ghittoni i sur., 2010)

Protein p53 i njegove interakcije sa E6 proteinom još nisu do kraja istražene niti su još poznati svi mehanizmi djelovanja i to je područje još uvijek vrlo zanimljivo i potrebno ga je istražiti da bi se što bolje razumjeli svi čimbenici u onkogenezi stanice.

1.4.1.2 E6 i regulacija ostalih staničnih procesa

Osim što uvelike ometa rad p53 proteina i stanične puteve uključene u provođenje aktivnosti tog proteina, E6 reagira i sa proteinima koji su neovisni o p53.

E6 regulira stanični rast preko signalnog puta G-proteina. Tako reagira sa tuberinom, Gps2 i E6TP te dovodi do njihovog raspadanja. Te promjene dovode do daljnjeg poremećaja u stanici i staničnoj signalizaciji za što je najbolji primjer tuberin koji je bitan za stanični rast no u njegovoj odsutnosti vrlo je teško regulirati stanični rast kao u normalnoj stanici (Lu i sur., 2004; Zheng i sur., 2008).

Regulirana stanična smrt (apoptoza) može nastupiti zbog vanjskih ili unutrašnjih staničnih čimbenika. U vanjske spadaju događaji poput virusne infekcije a u unutrašnje oštećenje DNA, oksidativni stres, gladovanje itd. Za E6 je pokazano da reagira za oba puta i u oba mehanizma sprečava stanicu da ode programiranu smrt. Pri djelovanju vanjskih događaja za induciranje apoptoze E6 se spaja sa „receptorima smrti“ na membrani umjesto njihovih normalnih liganada, i to sa TNFR obitelji receptora (engl. *Tumor Necrosis Factor Receptors*) (Howie i sur., 2009). TNFR obitelj receptora uključuje:

- TNFR-1 (engl. *Tumor Necrosis Factor Receptors 1*; Fas/CD95) i
- TRAIL (engl. *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*; DR-4 i DR-5) receptore (Duerksen-Hughes i sur., 1999).

E6 se veže na sve ove receptore i ne dopušta da regularni ligandi (TNF-Tumor Necrosis Factor, Fas-L ili TRAIL-om) nastave apoptotski signalni slijed koji djeluje preko kaspaza.

Ukoliko se radi o unutrašnjim događajima prilikom stresa se aktiviraju pro-apoptotski proteini:

- BH3 koči aktivnost anti-apoptotskih proteina koji slijedom događaja aktivira Bak.

- Bak pro-apoptotski protein stvara otvore u mitohondrijskoj membrani zbog čega izlazi citokrom c, AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), endonukleaza G, Diablo ili Omi membranski proteini te uključuju kaspaze koje dovode do stanične smrti.

- E6/Bak proteinski kompleks dovodi do proteosomalne razgradnje Bak proteina (Jackson i sur., 2000; Thomas i Banks, 1998; Thomas i Banks, 1999; Underbrink i sur., 2008).

Osim Bak proteina E6 protein djeluje i kao ekspresijski aktivator anti-apoptotskog Bcl-2 proteina (Du i sur., 2004).

Regulacija telomerazne aktivnosti također je pod utjecajem onkogen E6. Telomeraza je ribozim koji replicira krajeve kromosoma i prisutna je samo kod embrionalnih i matičnih stanica u normalnim uvjetima. Ukoliko se telomeraza aktivira u nekim drugim stanicama dolazi do imortalizacije stanica (Kiyono i sur., 1998; Klingelhutz i sur., 1996). Telomerazna aktivnost može biti potaknuta različitim čimbenicima te je pokazano kako je HR HPV E6 u suradnji sa HR HPV E7 jedan od njenih aktivatora što je bitno za tijek HPV infekcije te onkogenezu. Kao ribozim, telomeraza posjeduje RNA regiju i proteinsku regiju. Njena proteinska regija se sastoji od 2 proteina: Diskerin i hTERT.

- hTERT je proteinska podjedinica koja posjeduje katalitičku aktivnost telomeraze. U imortaliziranim stanicama raka pronađena je hTERT podjedinica, što znači da je potaknuta telomerazna aktivnost koja nije prisutna kod ne-tumorskih stanica (Bryan i Cech, 1999; Shay i Bacchetti. 1997).

- HR HPV E6 protein u interakciji sa E6AP veže se na dvije „E-kutije“ (E-box) koje se nalaze neposredno prije promotora hTERT-a i tako aktivira hTERT podjedinicu (Gewin i sur., 2004; Liu i sur., 2005; Cong i sur., 1999; Lebel i sur., 2007; Oh i sur., 2001., Takakura i sur., 1999). U stanici je dokazano da c-Myc onkogen ima važnu ulogu u aktivaciji telomeraze, a u stanicama sa HPV infekcijom prisutan je kompleks E6, E6AP i c-Myc na promotoru hTERT gena (Liu i sur., 2005; Veldman i sur., 2003).

Osim indukcije transkripcije E6/E6AP kompleks se spaja i sa :

- NFX1-91, stanični represor na hTERT promotoru. Specifičnim vezanjem na taj represor E6 ga šalje u proteosomalnu razgradnju poput p53 proteina (Gewin i sur., 2004).

- NFX1-123, druga varijanta proteina nastala nešto drugačijim isijecanjem iz iste mRNA kao i NFX-91. Djeluje kao dodati pojačivač ekspresije hTERT gena (Katzenellenbogen i sur., 2007).

Regulacija kromosomske stabilnosti pod utjecajem je onkoproteina E6. Protein hMCM7 (human minichromosome maintenance 7 protein) je protein koji kontrolira proces DNA replikacije čuvajući integritet stanice i strogo regulirajući da dođe do samo jedne DNA replikacije u jednom staničnom ciklusu. Ukoliko E6 protein (LR i HR) reagira sa hMCM7 dovodi do njegove proteosomalne razgradnje i zbog toga se mogu naći kromosomalne abnormalnosti u stanicama zaraženima HPV virusom. Osim hMCM7 proteina HPV E6 protein reagira i sa još dva proteina uključena u regulaciju kromosomske stabilnosti, a to su: XRCC1 i MGMT (Iftner i sur., 2002; Srivenugopal i Ali-Osman, 2002). Prisutnost XRCC1/E6 kompleksa uzrokuje slabiju sposobnost popravka jednolančanog loma u DNA, a MGMT/E6 kompleks uzrokuje veću osjetljivost DNA na alkilirajuće agense. Isto tako i gore spomenuti p53/E6 kompleks dovodi do inaktivacije G1 te gubitka G2 kontrolne točke.

E6 također utječe na **poremećaj u staničnoj adheziji, polarnosti i diferencijaciji epitela**. Glavni mehanizam HPV E6 proteina sa proteinima važnima za regulaciju ovih procesa je preko PDZ vezujuće domene na tim proteinima. Najvažniji proteini u ovim ciklusima su:

- Paksilin i ziksin prevode signal iz ekstracelularnog matriksa preko aktinskih vlakana do jezgre. Interakcija sa E6 rezultira nemogućnosti održavanja pravilnog staničnog oblika (Degenhardt i Silverstein, 2001; Tong i Howley, 1997).

- hScrib sudjeluje u čvrstim vezama, adheziji bazalnih stanica za vanstanični matriks. Djeluje kao tumor supresor negativno regulirajući proliferaciju. Interakcija sa E6 dovodi do razgradnje hScrib i dovodi do nekontrolirane proliferacije (Nakagawa i Huibregtse, 2000).

- hD1g sudjeluje u čvrstim vezama, regulira staničnu polarnost u epitelnim stanicama, djeluje kao tumor supresor. Prvi protein za koji je dokazana interakcija između njegove PDZ domene i E6 onkoproteina (Kiyono i sur., 1997; Lee i sur., 1997).

- MAGI i MUPP1 sudjeluju u čvrstim vezama i negativno reguliraju staničnu proliferaciju (Glaunsinger i sur., 2000; Thomas i sur., 2002)

- PTPN3 djeluju kao membranske tirozin fosfataze i time reguliraju receptore čimbenika rasta (Jing i sur., 2007; Spanos i sur., 2008).

Imuni sustav je iznimno važan u obrani organizma od vanjskih čimbenika poput virusne ili bakterijske infekcije te od unutrašnjih, poput pojave tumora. Prilikom virusne infekcije aktivira se najprije nespecifična, urođena imunost koja je prva crta obrane. HPV E6 razvio je različite puteve kojima reagira sa nekoliko posrednika te imunosti i na taj način pokušava izbjeći imuni odgovor domaćina. Ti čimbenici su:

- IRF-3 (engl. *Interferon Regulatory Factor 3*) aktivira transkripciju IFN- β (Infertefon β) (Ronco i sur., 1998) koji se bori sa virusnom infekcijom. IRF-3/E6 kompleks ne može aktivirati transkripciju IFN- β te izostaje pravovaljani odgovor imunog sustava (Ronco i sur., 1998)

- TLR-9 (engl. *Toll-Like Receptor 9*) potiče lučenje citokina koji su drugi način odgovora imunog sustava domaćina na virusnu infekciju (Muller i sur., 2008). Zbog interakcije između TLR-9, E6 i E7 proteina stanica domaćina ne može do kraja provesti signal za poticanje lučenja citokina pa je njihova koncentracija smanjena.

Protein E6 veže se i na druge još nepoznate proteine čije su inerakcije predmet daljnjih istraživanja.

1.4.2 Građa i uloga E7 proteina

E7 protein je mali, rani protein HPV virusa. Ekspimirira se i u HR i u LR HPV tipovima te je jedan od glavnih odgovornih medijatora transformacije i imortalizacije stanica. HPV E7 protein se sastoji od 98 aminokiselina, sadrži 3 konzervirane regije CD1-3 (od engl. *Conserved Domain*) te na -N kraju i „cink prst“ motiv poput E6 proteina. Najzanimljivija je CD2 regija u kojoj se nalazi LXCXE domena koja predstavlja vezno mjesto za tumor supresor pRb (protein Retinoblastoma 1), p107 i p130 proteina. Prilikom vezanja HPV E7 na LXCXE domenu HR HPV virusni tipovi vezuju stanične proteine sa puno većim afinitetom nego LR HPV tipovi (Münger i sur., 1989).

Razlog za to krije se u strukturnoj razlici HR i LR HPV E7 proteina. HR HPV E7 protein na 22. mjestu ima asparagin, LR HPV E7 protein ima glicin (Münger i sur., 1989).

Osim sličnosti sa HPV E6 proteinom E7 protein pokazuje homologiju i sa E1 proteinom Adenovirusa te velikim T antigenom Poliomavirusa, SV40. Osim strukturalne homologije, HPV E7, E1 i SV40-T veliki antigen imaju i vrlo sličnu ulogu u stanici domaćina, vezuju i inaktiviraju pRb protein.

1.4.2.1 Interakcija pRb i E7

Najvažnija i najistraženija uloga HPV E7 proteina je njegova interakcija sa staničnim pRb proteinom.

pRb protein je važan regulator staničnog ciklusa a time i proliferacije stanice. U normalnoj stanici uključen je u kontrolu procesa inhibicije stanica u pojedinim fazama staničnih ciklusa.

Nakon mitoze, na stanične promotore za gene S (DNA synthesis) faze vezani su E2F/DP kompleks i hipofosforilirani pRb protein. E2F je transkripcijski čimbenik zajedno sa svojim kočimbenikom DP, kada su vezani na DNA promotore potiče sintezu gena potrebnih u S-fazi staničnog ciklusa. Ukoliko se na E2F veže hipofosforilirani pRb protein ekspresija tih gena je inhibirana i stanica je u G1 fazi (Cobrinik, 2005; Dimova i sur., 2005).

Ciklin D i CDK4 (*Cyclin Dependant Kinase 4*) dolaze u G1 fazi te fosforiliraju pRb protein što uzrokuje njegovu disocijaciju i dopušta ekspresiju gena te stanica ulazi u S fazu. U slučaju kada bi pRb protein bio konstantno fosforiliran stanica bi stalno ispoljavala proteine bitne za proces diobe.

E7 protein reagira sa pRb proteinom i onemogućava njegovo vezanje na E2F/DP kompleks transkripcijskih čimbenika. Zbog izostanka kontrole staničnog ciklusa stanica stalno duplicira svoj genom i odlazi u diobu. Na taj način virus dovodi i do povećanja kopija svog genoma što je krajnji cilj regulacije ovog procesa.

Osim pRb-a, E7 protein reagira i sa još 2 pRb-u srodna proteina, p107 i p130. Oba dva proteina zajedno sa pRb sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa. p107 se veže za E2F4, a p130 se veže na E2F4 i E2F5 te preko njih sudjeluju u kontroli staničnog ciklusa.

Prilikom interakcije E7/pRb proteina dolazi do pRb proteosomalne razgradnje putem ubikvitinacije, poput E6 i p53 (Boyer i sur., 1996; Jones i sur., 1997a).

Ubikvitinacija je posredovana sa dva mehanizma:

- Kulin 2 ubikvitin kinaza te
- Kalpain (Ca²⁺ aktivirana cisteinska proteaza).

1.4.2.2 E7 i regulacija ostalih staničnih procesa

E7 preko pRb, p107 i p130 proteina kontrolira stanične procese ali i reagira sa ostalim staničnim proteinima te pospješuje tu kontrolu.

Tako reagira direktno sa:

- p21^{WAF1/CIP1} i p27^{KIP1}. Oba proteina su CDKI (engl. *Cyclin Dependant Kinase Inhibitors*) te u njihovoj prisutnosti stanice mogu stati u G1 fazi. Prilikom njihove inaktivacije sa E7 stanica ne može stati u G1 fazi već završetkom svakog ciklusa opet iznova ulazi u S fazu i započinje diobu stanice (Funk i sur., 1997; Jones i sur., 1997b).
- Ciklin A/CDK2. E7 ponajviše reagira sa ciklinom A ali detalji mehanizma te intrakcije još uvijek nisu poznati (Arroyo i sur., 1993; Davies i sur., 1993; Tommasino i sur., 1993).

Interakcije sa ostalim staničnim proteinima nisu u potpunosti poznate.

Osim interakcija sa staničnim proteinima koji kontroliraju stanični ciklus, E7 kontrolira i imuni odgovor domaćina. Tu utječe na:

- TLR-9 (engl. *Toll-Like Receptor 9*). E7 utječe na smanjenje ekspresije TLR-9 receptora koji je bitan u prepoznavanju virusne dsDNA te prijenosu signala. Nakon što je signal uspješno prenesen dolazi do imunog odgovora, koji je u ovom slučaju spriječen (Hasan i sur., 2007).
- IRF1 (engl. *Interferon Regulatory Factor 1*). Vezući se na IRF1 E7 onemogućava ekspresiju IFN- α i IFN- β (Park i sur., 2000; Perea i sur., 2000)
- TAP1 (engl. *Transporter Associated with antigen Protein 1*). TAP1 je protein koji sudjeluje u prenošenju antigena u predočnih stanica. Uvelike je u interakciji sa MHC-I (Membrane Histocompatibility Complex 1) kompleksom. TAP1 prenosi antigene u

stanici koje, nakon što se prerade, MHC-I predočava na svojoj membrani. Prilikom E7/TAP1 interakcije post-translacijski se smanjuje ekspresija TAP1 proteina. Tako je broj prenesenih antigena drastično smanjen a time i količina citokina koji bi inače došli kao odgovor (Cromme i sur., 1993; Vambutas i sur., 2000; Vambutas i sur., 2001).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Kako svi tipovi HPV-a nisu karcinogeni ne predstavljaju svi jednako velik rizik za razvoj težih bolesti. Znanstveno najzanimljiviji HPV tipovi su HPV 16 i HPV 18. HPV 16 je najučestaliji karcinogeni tip virusa stoga se ulažu izuzetni napori da bi se razumjelo što bolje kako on funkcionira u stanici domaćina i kako dovodi do displazija, a posljedično i do raka. Najvažniji virusni proteini za izazivanje onkogeneze su E6 i E7 te je potrebno dobro definirati svojstva i funkcije oba proteina.

Ipak postoje problemi prilikom izolacije ta dva proteina, naime, oni često formiraju agregate i ne dopuštaju izolaciju pojedinačnog proteina u topivom sloju, kada je još funkcionalan.

Cilj našeg rada bio je inducirati ekspresiju HPV 16 E6 i E7 te optimizirati uvjete za njegovu ekspresiju u *E. coli*. Kroz istraživanje smo mijenjali sve čimbenike koje smo mogli mijenjati tijekom ekspresije, a mijenjali smo i metode izolacije proteina u nativnim i denaturirajućim uvjetima.

3 MATERIJALI I METODE

Obzirom da je eksperimentalni rad na ovom radu započeo nakon transformacije bakterijskih stanica stoga ću metode do tog stadija opisati ukratko i općenito.

3.1 Biološki materijal

Koristili smo kompetentne stanice *E. coli* soj M15 spremne za transformaciju. Za vektor smo koristili pQE-30UA™ plazmid koji se dobije zajedno sa QIAexpressionist UA Cloning Kit-om (Qiagen) (Anonymous, 2003).

3.2 Kloniranje

Kloniranje je proces koji omogućuje umnožavanje dijela DNA ili čitavog organizma i u laboratoriju se često koristi kao sredstvo umnožavanja gena za produkciju željenog proteina. Za konstruiranje i kloniranje gena bitno je poznavati gensku sekvencu te pravilno odabrati početnice.

3.2.1 Izbor početnica i vektorski sistem

Kloniranje započinje izabirom početnica za konstruiranje E6 i E7 gena. Pošto je genom HPV 16 sekvenciran i sekvenca objavljena, pronađu su njihovi slijedovi nukleotida u bazi podataka (www.ncbi.nlm.nih.gov) te se odabere 18-28 nukleotida sa početka sekvence svakog gena kao početnica. Potrebno je na temelju tog slijeda sintetizirati dvije početnice, jedna koja je komplementarna kodirajućem a druga nekodirajućem lancu DNA. Za početnice je bitno da imaju sadržaj 45-55% GC parova baza. Konstruirane su, sintetizirane i korištene početnice koje su specifične za HPV 16 E6 i E7 gene.

PCR (engl., *Polymerase Chain Reaction*) služi za umnožavanje ciljane molekule DNA u velik broj kopija. Umnožavanje se odvija *in vitro* a provodi ga enzim DNA-ovisna-

DNA polimeraza izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimeraza) te posjeduje 5'→3' polimeraznu i 5'→3' egzonukleaznu aktivnost. Taq polimeraza je iznimno bitna prilikom PCR reakcije zbog toga što funkcionira i na temperaturi od 75-80°C. Za reakciju je potreban enzim Taq polimeraza, željena DNA koju se umnaža, početnice, svi deoksiribonukleozidtrifosfati (dNTP) te ioni magnezija (Mg²⁺) i neki stabilizatori medija potrebni za stvaranje optimalnih uvjeta za funkcioniranje enzima. Dio molekule koji će se umnožiti je onaj dio molekule DNA omeđen 5' i 3' oligonukleotidnim početnicama. Osim sastava medija važna je i koncentracija svih sastojaka pošto prevelike količine sastojaka mogu inhibirati ili smanjiti specifičnost reakcije.

E6 i E7, HPV 16 geni se tom specifičnom reakcijom umnože. Svaki umnoženi produkt ujedno dobije na 3' kraju dodane adenine (poli A rep) što je specifičnost Taq i ostalih polimeraza koje ne mogu same provjeravati svoju točnost (engl., *proofreading activity*).

Dio PCR produkta odvozi se na 1% agaroznom gelu (Sigma) da se provjeri veličina produkta i uspješnost same reakcije.

Kao vektor koristili smo pQE-30UA™ koji se dobije zajedno sa QIAexpress UA Cloning Kit-om. Specifičnost tog vektora je svojstvo 3' poli U kraja, a sam vektor je primarno lineariziran. To omogućava neposredno ugrađivanje PRC produkta u vektor koji posjeduje A na 3' krajevima. Ligacija se obavlja pomoću 2x Ligation Master Mix-om sa pQE-30UA vektorom koji dolaze sa QIAexpress UA Cloning Kit-om. Sam vektor sadrži i otpornost na antibiotik ampicilin što olakšava selekciju.

Soj *E. coli* M15 sadrži i plasmid PREP4 koji pomaže u finoj regulaciji transformacije sa naknadno unesenim plasmidom pQE-30. Za održavanje plazmida PREP4 u medij je potrebno dodati kanamicin pošto on sadrži gen za rezistenciju na taj antibiotik.

3.3 Transformacija *Escherichia coli*

Transformacija kompetentnih *E. coli* sa pQE-30UA™ vektorom provodi se sa bilo kojim standardiziranim protokolom za transformaciju bakterija. Važno je napraviti kontrolu transformacije DNA, *E.coli* bez vektora, da se provjeri da li je bakterija uistinu osjetljiva na ampicilin, kao druga kontrola posluži čisti vektor. Nakon transformacije provjeravaju se transformanti i ukoliko doista sadrže insert željenog gena nastavlja se njihova ekspresija u većoj količini.

Napravi se ploča na LB mediju (*Luria-Bertani Broth*, SIGMA) sa agarom (Fluka) koja sadrži 100 µg/mL ampicilina i 25 µg/mL kanamicina te se na nju nasade transformirane *E.coli*. Ukoliko bakterije sa plazmidom narastu, a bez plazmida ne narastu znači da je bakterija transformirana željenim vektorom. Da bi se provjerilo da li vektor posjeduje željeni insert odabere se nasumično nekoliko kolonija na agarskoj ploči te se iz njih izolira plazmidna DNA i pošalje na sekvenciranje. Ukoliko se unutar plazmidne DNA nalazi slijed DNA koji odgovara E6 odnosno E7 genima odgovarajućem okviru čitanja nastavlja se pokus.

3.4 Rast transformiranih bakterija

Iz glicerolskog štoka bakterija, koji se nakon potvrđene E6 odnosno E7 genske sekvence čuvao na -80°C, uzme se nastavkom malo bakterija te se razrijedi u 150 µL LB medija. Razrijeđene bakterije razmažu se na, prije pripremljenoj, agarskoj ploči sa LB medijem te ampicilinom i kanamicinom koncentracija 100 i 25 µg/mL.

Nakon prekonocnog rasta na 37°C, odabere se jedna kolonija te se razrijedi u 6 mL medija, i to LB (Sigma), TB (*Terrific Broth*, Sigma) i 2X YT medije (Sigma). U medije potrebno je dodati antibiotike ampicilin do koncentracije 100 µg/mL i kanamicin do koncentracije 25 µg/mL. Bakterije rastu na 37°C sa lagano odvrnutim čepom, tijekom 3-4 sata.

Nakon rasta potrebno je izmjeriti gustoću naraslih bakterija. ApSORBANCija se mjeri na 600 nm (A_{600}) na UV spektrofotometru (CECIL CE 2040). Izmjerena

apsorbancija mora biti u granicama između 0,5 – 0,9. Za bakterije rasle na LB mediju se koristi čisti LB medij za normalizaciju spektrofotometra, za bakterije rasle na TB mediju koristi se čisti TB, a za bakterije rasle na 2X YT mediju, čisti 2X YT medij. Mjerenja za LB medij uvijek su se kretala u danim granicama no za TB i 2X YT često su bila viša no potrebno te su najviše dosegnula 1,262, vjerojatno zbog veće gustoće medija.

Nakon provjere gustoće slijedi indukcija.

3.5 Indukcija IPTG-om i produkcija proteina

E. coli je jednostanični organizam koji sadrži jednu dvolančanu molekulu DNA. Kodira otprilike 4.300 proteina no samo dio ih je eksprimiran istovremeno. To kontroliraju uvjeti u kojima se nalazi stanica, odnosno dostupnost hrane. Geni koji kodiraju proteine udruženi su u operone i pod kontrolom su istog promotora. Tako se uređena struktura prepoznala i počela koristiti za kontroliranu gensku ekspresiju. Za tu manipulaciju najviše se koristi *lac* operon koji je korišten za gensku ekspresiju i u ovom eksperimentu.

lac operon uključuje 3 gena koji su pod kontrolom istog promotora, gen za β -galaktozidazu, permeazu galaktozidaze i transacetilazu tiogalaktozidaze. Osim promotora na operonu se nalazi i mjesto za vezanje *lac* represora koji se nalazi vezan u prisutnosti glukoze. Ukoliko se u okolišu nalazi samo laktoza bakterija se počne hraniti laktozom što dovodi do raspada *lac* represora i eksprimiranja gena nizvodno od *lac* promotora.

Prilikom genetske manipulacije željeni gen se unese iza *lac* promotora tako da se u uvjetima prisutnosti laktoze te odsutnosti *lac* represora eksprimira taj gen.

Općenito geni mogu biti eksprimirani konstitutivno i inducibilno. Konstitutivno znači da je gen eksprimiran u svim uvjetima i uvijek, dok indukcija znači poticanje na ekspresiju odnosno eksprimiranje gena u određenim uvjetima.

IPTG (engl., *isopropylthiogalactoside*) je sintetski spoj koji je strukturni analog laktoze. U uvjetima bez glukoze, indukcijom sa IPTG-om doći će do ekspresije svih gena nizvodno od *lac* promotora gdje se nalaze i E6 i E7 geni koji su ubačeni u *E.coli*.

Indukciju smo provodili na:

- na temperaturi od 18°C, 24°C, 30°C te 36°C,
- tijekom: 30 min, 2h, 4h i preko noći,
- sa koncentracijama IPTG-a od 0,01 mM, 0,05 mM i 1 mM,
- u tri različita medija: TB (*Terrific Broth*), LB (*Luthein Broth*) i 2X YT
- u volumenu medija od 1 mL ili 50 mL.

Nakon provedene indukcije uzorci se talože centrifugiranjem 1 min na 14 000 x g, odvoji se talog te se spremi na -20°C, ukoliko se ne nastavlja rad sa uzorcima taj dan.

3.6 Pročišćavanje proteina

Indukcijom sa IPTG-om stvaraju se E6 i E7 onkoproteini pošto su smješteni unutar *lac* operona. Nakon produkcije onkoproteina potrebno ih je izolirati i pročistiti. Ukoliko nije detaljno poznato kako izolirati protein potrebno je optimizirati uvjete za njegovo pročišćavanje. Da bi proteini zadržali svoju funkciju potrebno ih je izolirati u nativnim uvjetima ili nakon izolacije u denaturirajućim uvjetima povratiti njihovu funkciju, npr. difuzijom.

3.6.1 Pročišćavanje proteina u nativnim uvjetima

Tijekom pročišćavanja proteina u nativnim uvjetima pročišćavali smo pomoću CellLyctic™ B pufera (Sigma; 40 mM Tris-HCl, pH 8.0, nedenaturirajući „zwitter“ ionski deterdženti), pufera za lizu stanica u nativnim uvjetima te bez pufera za lizu stanica. Osim kemijskih sredstava za lizu stanica koristili smo i fizikalne metode. U njih spadaju sonifikacija, naglo smrzavanje na -80°C i odmrzavanje u kupelji na 37°C,

Dalje slijede dvije kemijske metode za pročišćavanje:

- Prilikom pročišćavanja sa CellLytic™ B-om na talog bakterija raslih u 1 ml stavlja se približno 266 µL CellLytic™ B-a, vorteksira se kratko potom se 10 minuta miješa na sobnoj temperaturi. Za kraj se centrifugira na 14 000 x g tijekom 5 minuta da bi se razdvojili topivi od netopivih proteina. Odvoje se supernatanti od taloga i oboje se smrznju na -20°C.

- Prilikom pročišćavanja sa puferom za lizu stanica u nativnim uvjetima na talog se stavi 100 µL pufera (50mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol; pH 8).

Izuzev pročišćavanja sa CellLytic™ B-om, kombiniraju se kemijske i fizikalne metode da bi se pospješila liza stanica. Od fizikalnih metoda nakon dodavanja „pufera za lizu stanica u nativnim uvjetima“ slijede:

- Smrzavanje uzoraka na -80°C te naglo odmrzavanje na 37°C u kupelji ili na termobloku.

- Sonificiranje šest puta po 10 sec na 250 W, pa onda po 10 sec pauze. Važno je stalno držati uzorke na ledu prilikom sonificiranja da se spriječi pregrijavanje i raspadanje uzorka.

- Nakon sonificiranja slijedi centrifugiranje na 10 000 x g tijekom 25 minuta. Supernatant se zatim odvoji od taloga i sve se smrznje na -20°C

3.6.2 Pročišćavanje proteina u denaturirajućim uvjetima

Prilikom pročišćavanja u denaturirajućim uvjetima nije moguće sačuvati sekundarnu ni terciarnu strukturu proteina pa time ni njihovu funkciju. Nije poželjno pročišćavati protein u ovim uvjetima ukoliko je protein potreban za daljnja istraživanja, međutim, ukoliko ne postoji način da se protein izolira i pročisti u nativnim uvjetima tada se pristupa ovom protokolu. Nakon izoliranja proteina u tim uvjetima potrebno ga je renaturirati prije funkcionalnih testova.

Uzorci taloga (staničnog lizata) dobiveni indukcijom uzeti su i na njih se nanese 5 mL pufera za lizu koji sadrži ureu, NaH₂PO₄ i Tris-HCl, pH 8.0. Nakon lize se nastavlja sonifikacija tijekom 5 minuta, 10 sekundi sonificiranja, pa 10 sekundi pauze tijekom 5 minuta. Podvrgne se naglom smrzavanju na -80°C, pa se naglo otopi na 37°C. Po liziranju

stanica potrebno ih je centrifugirati 25 min na 12 000 x g, a dalje se slijedi protokol za purifikaciju u denaturirajućim uvjetima iz Ni-NTA Spin Kit Handbook-a (Qiagen). Prilikom tog protokola koriste se još 2 pufera. Jedan nazvan pufer za ispiranje (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 8 M urea; pH 6,3), a drugi pufer za eluiranje (100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 8 M urea; pH 4,5). Prvo se dodaje 600µL bistrog bakterijskog lizata koji se potom centrifugira 5 minuta na 270 x g, a na tretiranu kolonicu se potom u dva navrata nanosi 600 µL pufera za ispiranje, pH 6.3, te se centrifugira svaki put 2 minute na 270 x g. Posljednji je pufer za eluiranje, pH 4.5, kojeg se nanosi također u dva navrata po 200µL te se centrifugira svaki put 2 minute na 270 x g.

Liza, ispiranje i eluiranje provode se u puferima istog sastava ali drugačijeg pH koji je osnovica za postupak. Da bi se povećala uspješnost izolacije proteina na ovaj način potrebno je netom prije dodatka provjeravati pH svaki put. Sve frakcije koje se dobiju prilikom ovog protokola moraju se sačuvati pošto su bezbojne i ne mogu se razlikovati vizualno. Stoga ih je potrebno dalje analizirati SDS poliakrilamidnom elektroforezom da bi se dokazalo eventualno prisustvo proteina E6 ili E7 u pojedinoj frakciji. Sačuvane frakcije također služe i kao kontrole vezanja ili prolaska kroz kolonicu.

3.7 Vizualizacija proteina elektroforezom u denaturirajućem gelu akrilamida

SDS (engl. *Sodium Dodecyl Sulfat*) poliakrilamidna elektroforeza (PAGE, engl. *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) je način vizualizacije ali i kvantifikacije proteina. To je metoda pri kojoj se proteini razdvajaju na poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima.

Za potrebe razdvajanja proteina pripreme se dva gela, gel za sabijanje i gel za razdvajanje. Gel za sabijanje je gornji i služi za sabijanje uzoraka i dolazak čitave količine, svih uzoraka u istu ravninu prije nego dođu do gela za razdvajanje. Gel za razdvajanje se napravi gust koliko treba da se uzorci razdvoje. Gelovi se naprave prema standardiziranom protokolu. Prilikom izbora gela za razdvajanje treba se odlučiti na količinu poliakrilamida odnosno gustoću gela. O tome ovisi kako dobro će se razdvojiti

proteini u uzorku. Prilikom ovog istraživanja pravljjen je 12%-tni gel za poliakrilamidnu elektroforezu.

Da bi proteini bili spremni za nanošenje na gel potrebno ih je prethodno pripremiti. Pred-priprema za taloge je dodavanje 50 μL dH_2O . Talog je važan i kod neinducirane kontrole kao negativna kontrola indukcije.

Kao priprema za nanošenje na gel smatra se miješanje uzorka i SDS pufera za nanošenje (63 mM Tris-HCl; 10% glicerol; 2% SDS; 0,0025% Bromfenol plavo; pH 6,8) u omjeru 1:5, njegovo kuhanje na 95°C tijekom 5 minuta te centrifugiranje na 14 000 x g tijekom 5 minuta.

Gel za SDS poliakrilamidnu elektroforezu (SDS PAGE) sastoji se od 12% gela za razdvajanje (donji gel) i 5% gela za sabijanje (gornji, manji gel) naprave se po recepturi prikazanoj u **Tablici 2** (Harlow i Lane, 1988).

Tablica 2. Akrilamidni gelovi za SDS PAGE

Vrsta gela	Količina štok otopina	Koncentracija štok otopina
5% gel za sabijanje	170 $\mu\text{L}/\text{mL}$	30% akrilamida
	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	10% SDS
	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	10% APS
	1 $\mu\text{L}/\text{mL}$	TEMED
	130 $\mu\text{L}/\text{mL}$	1 M Tris pH 6,8
12% gel za razdvajanje	400 $\mu\text{L}/\text{mL}$	30% akrilamid
	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	10% SDS
	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$	10% APS
	0,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$	TEMED
	260 $\mu\text{L}/\text{mL}$	1,5 M Tris pH 8,8

Gel se vozi u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl; 200 mM glicin; 0,1% SDS) 2 sata na 110V te se potom boja *Coomassie Brilliant Blue* (0,025% u otopini) bojom za bojanje proteina kojom se oboji čitav gel. Za pospješjenje obojenja gela, gel se zajedno sa bojom kuha u mikrovalnoj pećnici do vrenja a potom se hladi. Postupak se ponavlja

dvaput, a prilikom hlađenja treba biti na miješalici i lagano se miješati. Nakon obojenja potrebno je odbojati gel, što se radi u otopini za odbojavanje koja sadrži metanol. Odbojavanje je potrebno provoditi tijekom noći a gel za to vrijeme mora biti na miješalici. Odbojavanje je pospješeno ukoliko se u otopinu na krajeve gela stavi malo papira da uklone boju i/ili češćim izmjenama otopine za odbojavanje.

4 REZULTATI

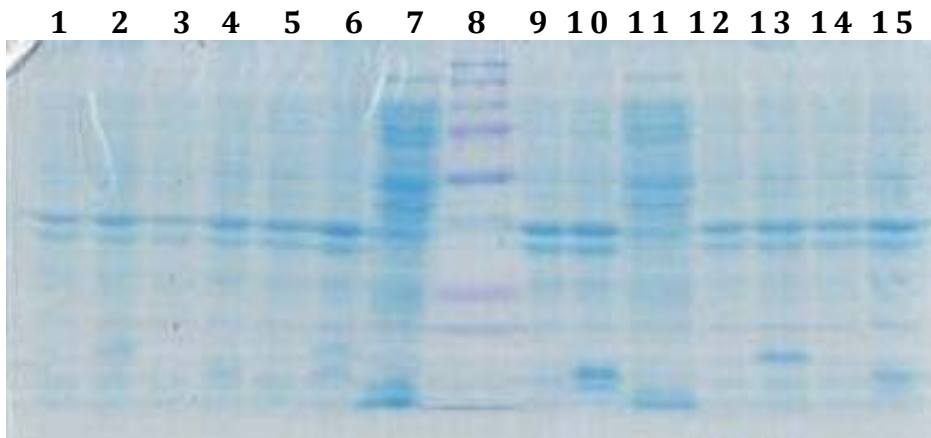
E6 i E7 proteine HPV tipa 16 proizveli smo i pročistili u ekspresijskom sustavu *E. coli* indukcijom sa IPTG-om preko *lac* operona. Trebalo je optimizirati uvjete i dokazati svojstva oba proteina, te potencijalno dobiti pročišćene proteine za daljnja istraživanja. Prisutnost i veličinu proteina provjerili smo vizualizacijom na gelu u prisutnosti markera i negativne kontrole na SDS poliakrilamidnoj elektroforezi.

HPV 16 E6 i E7 proteine inducirali smo i eksprimirali u različitim uvjetima mijenjajući čimbenike koji mogu utjecati na jačinu njihove ekspresije. Mijenjali smo temperaturu, količinu IPTG-a kojom je uzorak induciran, vrijeme duljine trajanja indukcije, medije i količine medija u kojima je indukcija poticana. Ni E6 ni E7 proteini nisu pokazali da ijedan od ovih čimbenika utječe na njihovu topivost.

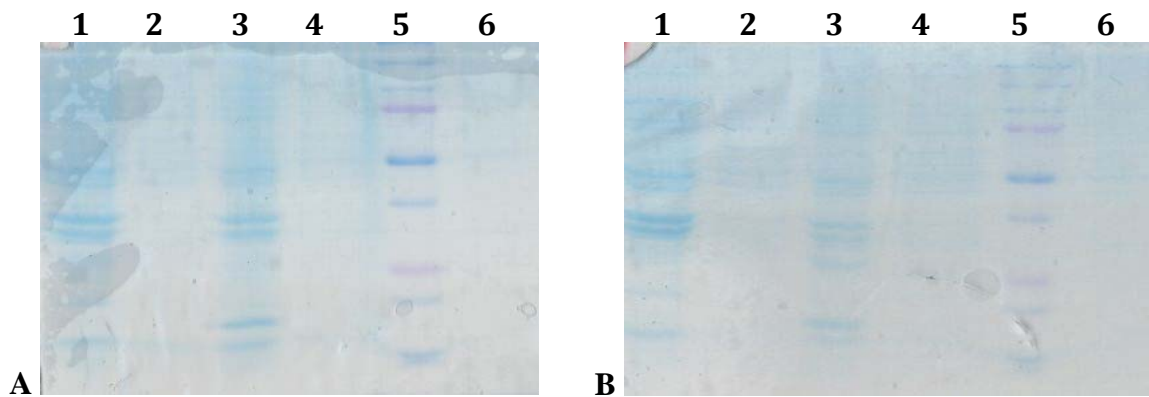
Slika 7 pokazuje vizualizaciju supernatanta pri pročišćavanju uzorka u nativnim uvjetima. U prvoj jažici je negativna kontrola indukcije za što je poslužila neinducirani uzorak koji se uzeo nakon mjerenja koncentracije naraslih bakterija, a u sredini gela, u 8. jažici jasno se vidi marker. Sedma jažica predstavlja supernatant onkoproteina E6 koji je rastao u TB mediju. Kada bi taj rezultat bio pozitivan vidjela bi se vrpca kao u donjem dijelu 13. uzorka. Taj uzorak je talog koji sadrži E6 onkoprotein i koristi se kao referenca za eventualni dokaz E6 proteina u supernatantu ali i kao direktni dokaz prisutnosti E6 proteina u talogu. Jasno se vidi u 10. jažici linija u donjem dijelu koja predstavlja E7 protein smješten nešto niže nego E6 protein. Ta je linija prikaz taloga iz uzorka E7 proteina pročišćenog u nativnim uvjetima. Sljedeća jažica na desno prikaz je supernatanta istog uzorka. Jasno se vidi da u toj jažici 11. nema linije te veličine.

Prilikom pročišćavanja u denaturirajućim uvjetima dobili smo slabo vizualiziran, pročišćen E6 protein dok se E7 protein nije vidio (**Slika 7**).

Pri izolaciji i pročišćavanju proteina u denaturirajućim uvjetima dobiveni su nešto drugačiji rezultati. Prilikom izolacije proteina u strogo bazičnim, denaturirajućim uvjetima E6 se uspio eluirati sa kolonice dok se E7 nije eluirao istim uspjehom. (Slika 8). Ipak oba proteina su se eluirala u maloj količini.



Slika 7. Elektroforeza u SDS PAGE gelu proteina dobivenih iz prekonocne kulture *E. Coli* koji su potom pročišćeni u nativnim uvjetima. Jažice 1, 2, 5, 6 i 12: uzorci taloga u kojima je odsutan E6; jažica 3, 4, 9 i 14: uzorci taloga u kojima je odsutan E7; jažica 7: negativni uzorak supernatanta; jažica 8: biljeg DNA veličine (*Precision Plus Protein Dual Color standard*, veličina od 10-250 kDa, Bio Rad); jažica 10 i 15: pozitivan uzorak taloga sa E7 proteinom; jažica 11: supernatanta istog uzorka koji ne pokazuje prisutnost E7 proteina; jažica 13: pozitivan uzorak taloga sa E6 proteinom



Slika 8. Elektroforeza u SDS PAGE gelu E6 (slika A) i E7 (slika B) proteina koji su izolirani i pročišćeni u denaturirajućim uvjetima. Jažice od 1 do 6 predstavljaju kontrole, čistog lizata, vezanja, ispiranja, prvog i drugog eluata, te biljeg veličine DNA (*Precision Plus Protein Dual Color standard*, veličina od 10-250 kDa, Bio Rad). U 4.-im jažicama (prvi eluat) naziru se linije veličine 25 i 20 kDa koje predstavljaju protein E6 (slika A) i protein E7 (slika B)

5 RASPRAVA

Prilikom induciranja ekspresije HPV 16 proteina E6 i E7 u različitim uvjetima nije došlo do nikakve promjene u topivosti tih proteina i nijedan se protein nije mogao izolirati u topivoj fazi. Različiti pokusi pokazuju kako proteini različito reagiraju na promjenu uvjeta u kojima se događa indukcija. Relativno najsnažniji utjecaj ima koncentracija IPTG-a u induksijskoj smjesi. IPTG uvijek dovodi do stanja stresa u organizmu (Kosinski i sur., 1992) i ovisno o proteinu te plazmidima koje *E. coli* sadrži, proteini će se stvarati u različitim količinama. Pokazano je kako je najbolje provoditi indukciju pri koncentraciji IPTG-a od 0,001 mM do 1 mM (Laffend i Shuler, 1994) ovisno o dodatnim plazmidima koje sadrži *E. coli*. Na temelju toga odlučeno je da se testiraju upravo te koncentracije za indukciju.

Osim same koncentracije IPTG-a praćeno je i još nekoliko parametara koji su se ukazali važnima za količinu dobivenog proteina. Različite temperature su pokazale različiti utjecaj na produkciju stranog proteina, pa smo se vodeći računa o mogućoj metaboličkoj inhibiciji na višim temperaturama (32°C naviše) i o mogućoj slaboj produkciji proteina na nižim temperaturama (20-ak °C) odlučili isprobati većinu temperatura između dvije krajnosti (Surek i sur., 1991).

Nadalje se kao važan čimbenik pokazala i duljina provođenja indukcije. Tijekom prekonoćne indukcije dolazi do većeg prinosa stranog proteina no to može imati negativan utjecaj na njegovo smatanje stoga se mora voditi računa o koncentraciji IPTG-a. Posljednji varijabilni čimbenik bio je medij u kojem je kultura rasla. Neki mediji su bogatiji nego drugi te stoga pružaju bolje uvjete za rast bakterijskih stanica, a time i kasniji nastanak proteina.

Smatra se kako pažljivom izmjenom parametara i praćenja prinosa proteina možemo pronaći optimalne uvjete za ekspresiju proteina E6 i E7 te njihovu pojavu u topivoj fazi. Naime, E6 i E7 stvaraju netopive agregate (Donovan i sur., 1996) što bi se

vjerojatno moglo izbjeći ukoliko se optimiziraju uvjeti za njihovu ekspresiju. Da bi se pronašli optimalni uvjeti bitno je znati koji su razlozi taloženja tih proteina. Taloženje može biti posljedica dva uzroka (Nominé i sur., 2001):

- krivo složenih proteina te
- ispravno složenih proteina ali podložnih oksidacijskim uvjetima.

Prvi uzrok je često prisutan zbog prebrze produkcije proteina koji se zbog toga ne stignu pravilno složiti, pa stvaraju inkluzijska tijela. Drugi je uzrok prisutan zbog oksidacijskih uvjeta koji nastaju nakon lize bakterijskih stanica. Proteini E6 i E7 iznimno su osjetljivi na redoks uvjete, a proces lize stanica dovodi do promjene tih uvjeta. Rezultat toga je agregacija čak i pravilno složenih proteina (Nominé i sur., 2001).

Početakom 2000-ih predloženi su optimizirani uvjeti izolacije E6 proteina (Nominé i sur., 2001). Za takvu izolaciju potrebno je fuzionirati ciljani protein sa nekim vrlo topivim proteinom, npr. MBP (od *engl. Maltose Binding Protein*). Na taj način dobiven je E6 kao topivi ali fuzionirani protein. Da bi se protein dobio samostalno potrebno je još pročistiti te odvojiti proteine. Kako bi se izbjegao čitav proces proizvodnje fuzijskog proteina i njegove obrade u ovom radu smo pokušali optimizirati uvjete za ekspresiju i izolaciju te proizvesti i eksperimentalno pronaći optimalne uvjete za produkciju samostalnih i topivih proteina E6 i E7.

Prilikom mijenjanja uvjeta nije primijećen nikakav napredak. Iako se znalo da ta dva onkoproteina često formiraju netopive agregate (Donovan i sur., 1996) zbog nepoznatih biokemijskih i strukturalnih svojstava nije se sa sigurnošću znalo da li je to uslijed neoptimiziranih uvjeta ekspresije ili netopivosti proteina.

Slijedeći rezultate ovog istraživanja smatramo da ovaj ekspresijski sistem isključivo producira E6 i E7 HPV 16 kao netopive proteine te ih se može izolirati samo u denaturirajućim uvjetima. Taj zaključak nadalje komplicira situaciju pošto iz toga slijedi

da sva istraživanja koja se budu provodila na tim proteinima moraju koristiti renaturirane proteine. Eksperimentalni uvjeti nisu poznati za renaturaciju ova dva proteina te će biti potrebna daljnja istraživanja za optimizaciju renaturacije prije bilo kakvih istraživanja funkcije ovih proteina. Također neizvjesna je i uspješnost renaturacije. Postoje različite metode renaturacije proteina koje se također moraju optimizirati za svaki protein pojedinačno te je potrebno paziti na uvjete u kojima se renaturacija odvija kako bi se povećala uspješnost postupka. Koncentracija proteina, reagensi sa tiolom, način uklanjanja denaturirajućih tvari, pH, prisustvo soli te inhibitori proteaza bitne su za stvaranje idealnih uvjeta za renaturaciju proteina. Isto tako treba dobro upoznati svojstva proteina te prilagoditi sastav pufera određenom proteinu (Anonymous, 2003).

Nadalje, važno je spomenuti kako postoji mogućnost da bi ovaj pokus bio uspješniji ako se kao ekspresijski vektor koristi neki eukariotski organizam poput kvasca pošto je HPV virus koji napada eukariotske stanice. Tome bi se trebalo posvetiti ukoliko se nastavi istraživanje za optimiziranje uvjeta izolacije ovih proteina.

6 ZAKLJUČAK

Korištenjem prokariotskog ekspresijskog sustava i mijenjanja svih pomičnih čimbenika prilikom indukcije ekspresije E6 i E7 proteina nismo uspjeli optimizirati uvjete za dobivanje tih proteina u topivoj fazi. Tijekom mijenjanja koncentracije inducensa, čitavog seta temperatura, medija te duljine indukcije nije uočeno očekivano poboljšanje u topivosti proteina. Time smo dokazali kako su ta dva proteina i inače netopivi proteini i samo kao takvi mogu biti izolirani. Nadalje, to je razlog što ta dva proteina formiraju agregate odnosno tzv. inkluzijska tijela što predstavlja problem u proučavanju istih. Osim što smo pokazali da ekspresija spomenutih proteina ide bez problema i da su netopivi, pokazali smo da ih je moguće pročistiti i izolirati u denaturirajućim uvjetima sa ureom. Ipak i u tim uvjetima velike bazičnosti proteini se ne mogu u potpunosti uspješno izolirati ni pročistiti. Samo dio proteina koje izložimo tim uvjetima se uspješno izolira.

7 LITERATURA

1. Almeida JD, Oriel JD, Stannard LM. Characterization of the virus found in human genital warts. *Microbios*. 1969; 3: 225–32.
2. Anonymous. The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 2003. QIAGEN. Available at: <http://www.mnstate.edu/provost/QiaExpressionist.pdf>
3. Arroyo M, Bagchi S, Raychaudhuri P. Association of the human papillomavirus type-16 E7 protein with the S-phasespecific E2F-cyclin-A complex. *Mol Cell Biol*. 1993; 13: 6537–46.
4. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010; 401: 70–9.
5. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer and in cell lines derived from genital cancer. *EMBO J*. 1984; 3: 1151–57.
6. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*. 1996; 56: 4620–4.
7. Bryan TM, Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol*. 1999; 11: 318–24.
8. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003; 89: 101–5.
9. Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*. 2005; 24: 2796–809.
10. Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet*. 1999; 8: 137–42.
11. Crawford LV. A study of human papilloma virus DNA. *J Mol Biol*. 1965; 13: 362–72.
12. Cromme FV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Kenemans P, Meijer CJ, Walboomers JM. MHC class I expression in HPV 16 positive cervical carcinomas is post-transcriptionally controlled and independent from c-myc overexpression. *Oncogene*. 1993; 8: 2969–75.
13. Crook T, Tidy JA, Vousden KH. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and transactivation. *Cell*. 1991; 67: 547–56.
14. Davies R, Hicks R, Crook T, Morris J, Vousden K. Human papillomavirus type-16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol*. 1993; 67: 2521–8.
15. Degenhardt YY, Silverstein S. Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation. *J Virol*. 2001; 75: 11791–802.

16. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004; 324: 17–27.
17. Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*. 2005; 24: 2810–26.
18. Donovan RS, Robinson CW, Glick BR. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1996; 16: 145–154.
19. Du J, Chen GG, Vlantis AC, Chan PK, Tsang RK, van Hasselt CA. Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. *Cancer Lett*. 2004; 205: 81–8.
20. Duerksen-Hughes PJ, Yang J, Schwartz SB. HPV 16 E6 blocks TNF-mediated apoptosis in mouse fibroblast LM cells. *Virology*. 1999; 264: 55–65.
21. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80: 3812–5.
22. Dyson N, Guida P, Münger K, Harlow E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol*. 1992; 66: 6893–902.
23. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 1997; 11: 2090–100.
24. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev*. 2004; 18: 2269–82.
25. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*. 2010; 40: 1–13.
26. Gissman L, Diehl V, Schulz-Coulon H-J, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA derived from laryngeal papilloma. *J Virol*. 1982; 44: 393–400.
27. Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata acuminata). *Int J Cancer* 1980; 25: 605–9.
28. Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, Banks L, Javier R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* 2000; 19: 5270–80.
29. Grce M. Primary and Secondary Prevention of Cervical Cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2009; 9: 851–7.
30. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57–70.
31. Harlow E, Lane D. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.
32. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M. TLR9

- expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol.* 2007; 178: 3186–97.
33. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 1997; 420: 25–7.
 34. Howley PM. Papillomavirus and their replication; U: Fields BN, Knipe DM (ur), *Virology*, Raven Press, New York, 1990; st. 1635–1650.
 35. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology.* 2009; 384: 324–334
 36. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16 or 18. *EMBO J.* 1991; 10: 4129–35.
 37. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 775–84.
 38. Iftner T, Elbel M, Schopp B, Hiller T, Loizou JI, Caldecott KW, Stubenrauch F. Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J.* 2002; 21: 4741–8.
 39. Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev.* 2000; 14: 3065–73.
 40. Jones DL, Alani RM, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 1997a; 11: 2101–11.
 41. Jones DL, Munger K. Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol.* 1997b; 71: 2905–12.
 42. Jones N. Transcriptional regulation by dimerization: two sides to an incestuous relationship. *Cell.* 1990; 61: 9–11.
 43. Jing M, Bohl J, Brimer N, Kinter M, Vande Pol SB. Degradation of tyrosine phosphatase PTPN3 (PTPH1) by association with oncogenic human papillomavirus E6 proteins. *J Virol.* 2007; 81: 2231–9.
 44. Katzenellenbogen RA, Egelkrout EM, Vliet-Gregg P, Gewin LC, Gafken PR, Galloway DA. NFX1-123 and poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *J Virol.* 2007; 81: 3786–96.
 45. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature.* 1998; 396: 84–8.
 46. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M. Binding of high risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94: 11612–16.

47. Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. 1996; 380: 79–82.
48. Kosinski MJ, Rinas U, Bailey JE. Proteolytic response to the expression of an abnormal beta-galactosidase in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1992; 37: 335–41.
49. Kumar A, Zhao Y, Meng G, Zeng M, Srinivasan S, Delmolino LM, Gao Q, Dimri G, Weber GF, Wazer DE, Band H, Band V. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 5801–12.
50. Laffend L, Shuler ML. Structured model of genetic control via the lac promoter in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 1994; 43: 399–410.
51. Lebel R, McDuff FO, Lavigne P, Grandbois M. Direct visualization of the binding of c-Myc/Max heterodimeric b-HLH-LZ to E-box sequences on the hTERT promoter. *Biochemistry*. 2007; 46: 10279–86.
52. Lechner MS, Laimins LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*. 1994; 68: 4262–73.
53. Lee SS, Weiss RS, Javier RT. Binding of human virus oncoproteins to hDLG/SAP97, a mammalian homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 6670–5.
54. Li X, Coffino P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol*. 1996; 70: 4509–16.
55. Liu X, Yuan H, Fu B, Disbrow GL, Apolinario T, Tomaic V, Kelley ML, Baker CC, Huibregtse J, Schlegel R. The E6AP ubiquitin ligase is required for transactivation of the hTERT promoter by the human papillomavirus E6 oncoprotein. *J Biol Chem*. 2005; 280: 10807–16.
56. Lu Z, Hu X, Li Y, Zheng L, Zhou Y, Jiang H, Ning T, Basang Z, Zhang C, Ke Y. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberlin. *J Biol Chem*. 2004; 279: 35664–70.
57. Magnusson PK, Sparén P, Gyllensten UB. Genetic link to cervical tumours. *Nature*. 1999; 400: 29–30.
58. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. 2001; 20: 7874–87.
59. Matheu A, Maraver A, Serrano M. The Arf/p53 pathway in cancer and aging. *Cancer Res*. 2008; 68: 6031–4.
60. Moreno V, Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Gonzalez LC, Tafur L, Gili M, Izarzugaza I, Navarro C, Vergara A, et al. Risk factors for progression of cervical intraepithelial neoplasm grade III to invasive cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995; 4: 459–67.
61. Muller T, Hamm S, Bauer S. TLR9-mediated recognition of DNA. *Handb Exp Pharmacol*. 2008; 183: 51–70.

62. Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 1989; 8: 4099–105.
63. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002; 359: 1093–101.
64. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348: 518–27.
65. Nakagawa S, Huibregtse JM. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 8244–53.
66. Nominé Y, Ristriani T, Laurent C, Lefèvre JF, Weiss E, Travé G. A strategy for optimizing the monodispersity of fusion proteins: application to purification of recombinant HPV E6 oncoprotein. *Protein Engineering.* 2001. 14: 297–305
67. Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol.* 2001; 75: 5559–66.
68. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2000; 275: 6764–9.
69. Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance DJ. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J.* 1999; 18: 5061–72.
70. Perea SE, Massimi P, Banks L. Human papillomavirus type 16 E7 impairs the activation of the interferon regulatory factor. *Int J Mol Med.* 2000; 5: 661–6.
71. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* 1998; 12: 2061–72.
72. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 1993; 75: 495–505.
73. Schiffman MH, Haley NJ, Felton JS, Andrews AW, Kaslow RA, Lancaster WD, Kurman RJ, Brinton LA, Lannom LB, Hoffmann D. Biochemical epidemiology of cervical neoplasia: measuring cigarette smoke constituents in the cervix. *Cancer Res.* 1987; 47: 3886–8.
74. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature.* 1985; 314: 111–4.

75. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997; 33: 787–91.
76. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007; 121: 621–32.
77. Spanos WC, Hoover A, Harris GF, Wu S, Strand GL, Anderson ME, Klingelutz AJ, Hendriks W, Bossler AD, Lee JH. The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth. *J Virol*. 2008; 82: 2493–500.
78. Srivenugopal KS, Ali-Osman F. The DNA repair protein, O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein. *Oncogene*. 2002; 21: 5940–5.
79. Surek B, Wilhelm M, Hillen W. Optimizing the promoter and ribosome binding sequence for expression of human single chain urokinase-like plasminogen activator in *Escherichia coli* and stabilization of the product by avoiding heat shock response. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1991; 34: 488–94.
80. Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M, Inoue M. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res*. 1999; 59: 551–7.
81. Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol*. 1999; 80: 1513–7.
82. Thomas M, Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*. 1998; 17: 2943–54.
83. Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Lasky L, Banks L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene*. 2002; 21: 5088–96.
84. Thomas M, Massimi P, Jenkins J, Banks L. HPV-18 E6 mediated inhibition of p53 DNA binding activity is independent of E6 induced degradation. *Oncogene*. 1995; 10: 261–8.
85. Tommasino M, Adamczewski JP, Carlotti F, Barth CF, Manetti R, Contorni M, Cavalieri F, Hunt T, Crawford L. HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene*. 1993; 8: 195–202.
86. Tong X, Howley PM. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94 : 4412–7.
87. Underbrink MP, Howie HL, Bedard KM, Koop JI, Galloway DA. The E6 proteins from multiple beta HPV types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. *J Virol*. 2008; 82: 10408–17.
88. Vambutas A, Bonagura VR, Steinberg BM. Altered expression of TAP-1 and major histocompatibility complex class I in laryngeal papillomatosis: correlation of TAP-1 with disease. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000; 7: 79–85.

89. Vambutas A, DeVoti J, Pinn W, Steinberg BM, Bonagura VR. Interaction of human papillomavirus type 11 E7 protein with TAP-1 results in the reduction of ATP-dependent peptide transport. *Clin Immunol.* 2001; 101: 94–9.
90. Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 8211–6.
91. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999; 189: 12–9.
92. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990; 248: 76–9.
93. Zimmermann H, Koh CH, Degenkolbe R, O'Connor MJ, Muller A, Steger G, Chen JJ, Lui Y, Androphy E, Bernard HU. Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J Gen Virol.* 2000; 81: 2617–23.
94. Zheng L, Ding H, Lu Z, Li Y, Pan Y, Ning T, Ke Y. E3 ubiquitin ligase E6AP-mediated TSC2 turnover in the presence and absence of HPV16 E6. *Genes Cells.* 2008; 13: 285–94.
95. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer.* 1974a; 13: 650–6.
96. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology.* 2009; 384: 260–265.
97. zur Hausen J, Schulte-Holthausen H, Wolf H, Dörries K, Egger H. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses. *Int J Cancer.* 1974b; 13: 657–64.

8 PRILOZI

8.1 Kemikalije

ZA INDUKCIJU BAKTERIJA

IPTG: 1mM matična otopina koja je po potrebi razrijeđena na 0,01 i 0,05 mM

LB prah (*Luria-Bertani Broth*; L3022, SIGMA): 10 g triptona (kazein razgrađen gušteračom), 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl na 1 L distilirane vode; autoklavirati 15 minuta na 121°C

TB prah (*Terrific Broth, modified*; T0918, SIGMA): 12 g triptona (kazein razgrađen gušteračom), 24 g ekstrakta kvasca, 9,4 g K₂HPO₄ i 2,2 g H₂PO₄; 47,6 g TB praha i 8 mL glicerola otopiti u 1 L distilirane vode i autoklavirati 15 minuta na 121°C

2X YT prah (*2X YT Microbial Medium*; Y2377, SIGMA): 16 g triptona (kazein razgrađen gušteračom), 10 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl na 1 L distilirane vode; autoklavirati 15 minuta na 121°C

Ampicilin (Gibco): 100 mg/mL

Kanamycin (Gibco): 25 mg/mL

Agar (05040, Fluka)

ZA PROČIŠĆAVANJE PROTEINA

CellLytic™ B (SIGMA): 40mM Tris-HCl, pH 8.0, „zwitter-ionski“ nedenaturirajući deterdženti

Pufer za lizu stanica u nativnim uvjetima: 50mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 10 mM imidazole; pH 8.0

Pufer za lizu stanica u denaturirajućim uvjetima: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 7 M urea, pH 8.0

Pufer za ispiranje kolone u denaturirajućim uvjetima: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 6.3

Pufer za eluiranje kolone u denaturirajućim uvjetima: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 4.5

ZA ELEKTROFOREZU

Akrilamid: 30%-tna otopina N,N'-metilenbisakrilamida u dH₂O

Agaroz (A-3038, Sigma): 1%-tna otopina u TAE pufer (Sigma; 0,8 mM Tris-acetat; 0,02 mM EDTA, pH 8)

SDS (L-4390, Sigma): 10%-tna otopina u dH₂O

dH₂O: filtrirana, destilirana i sterilizirana voda

Tris-HCl: 1 M pH 6,8 i 1,5 M pH 8,8

APS: 10%-tna otopina amonij persulfata u dH₂O

TEMED (T9281, Sigma): N, N, N', N'-tetrametilenbiamin

SDS running pufer: Tris-HCl, glicin, SDS, dH₂O

SDS loading pufer: Tris-HCl, glicin, bromfenolplavo, dH₂O

Comassie Brilliant Blue boja: 0,04% *Comassie Blue*; 25% izopropanol; 10% octena kiselina, dH₂O

Otopina za odbojavanje: 25% izopropanol; 10% octena kiselina, 40% metanol, dH₂O

8.2 Uređaji

Autoklav (Bari, Velika Gorica, Hrvatska)

Bakteriološka miješalica i inkubator (Sheldon Manufacturing, Cornelius, SAD)

Bakteriološki inkubator i miješalica (Heidolph instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Njemačka)

Centrifuga (Eppendorf 5415C, Hamburg, Njemačka)

Centrifuga sa hlađenjem (Eppendorf 5415R, Hamburg, Njemačka)

Kabinet za sterilni rad (Klima oprema, Samobor, Hrvatska)

Miješalica (GFL, Burgwedel, Njemačka)

Mikrovalna (GFL 3016; Gorenje)

Oprema za vertikalnu elektroforezu (Bio-Rad, Hercules, SAD)

pH metar (Mettler Toledo)

Sonifikator (B. Braun Biotech International, Melsungen, Njemačka)

Spektrofotometar (Cecil Instruments, Cambridge, UK)

Termoblokovi (Thermomixer 5437 i Thermomixer Comfort; Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

Vaga (Mettler, München, Njemačka)

Vorteks (Heidolph instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Njemačka)

8.3 Popis kratica

BPV	engl. <i>Bovine papillomavirus</i>
CD	konzervirana regija; engl. <i>Conserved Domain</i>
CDK	ciklin ovisna kinaza; engl. <i>Cyclin Dependant Kinase</i>
CDKI	inhibitor ciklin ovisne kinaze; engl. <i>Cyclin Dependant Kinase Inhibitor</i>
CIN	engl. <i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i>
DNA	deoksiribonukleinska kiselina, engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>
E	rani geni, engl. <i>Early</i>
hMCM7	protein održavanja ljudskog minikromosoma; engl. <i>human minichromosome maintenance 7 protein</i>
HPV	humani papiloma virus
HR HPV	tip HPV virusa visokog rizika, engl. <i>High Risk</i>
IPTG	izopropiltiogalaktozid

IRF	interferon regulatorni factor; engl. <i>Interferon Regulatory Factor</i>
L	kasni geni, engl. <i>Late</i>
LB	engl. <i>Luria-Bertani</i>
LCR	kontrolna regija; engl. <i>Long Control Region</i>
LR HPV	tip HPV virusa niskog rizika, engl. <i>Low Risk</i>
NLS	jezgreni lokalizacijski signal, engl. <i>Nuclear Localization Signal</i>
ORF	otvoreni okvir čitanja; engl. <i>Open Reading Frame</i>
PAGE	elektroforeza u denaturirajućem gelu akrilamida; engl. <i>SDS-Polyacrilamide Gel Elelectoforesis</i>
PCR	lančana reakcija polimerazom; engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pRb	protein Retinoblastoma
PV	Papillomavirus
RNA	ribonukleinska kiselina, engl. <i>Ribonucleic acid</i>
SDS	engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfat</i>
TB	engl. <i>Terrific Broth</i>
TLR-9	engl. <i>Toll-Like Receptor</i>
TNFR	engl. <i>Tumor Necrosis Factor Receptors</i>
TRAIL	engl. <i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
MBP	engl. <i>Maltose Binding Protein</i>