

TARTU ÜLIKOOL
Bioloogia-geograafiateaduskond
Mikrobioloogia ja viroloogia õppetool

Kadri Janikson

Episomaalsete DNA viiruste replikatsiooni- ja
segregatsioonifunktsiooni uurimine

Magistritöö

Juhendaja:
prof. Mart Ustav

Tartu 2004

Sisukord

SISSEJUHATUS	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
TEOREETILINE OSA	5
Viiruste DNA replikatsioon	5
Tüüp 1 veise papilloomiviirus (BPV1)	5
Hiire polüoomiviirus (PyV)	8
Epstein-Barri viirus (EBV)	11
Erinevate episoomina püsivate viiruste stabiilset säilimist tagavad faktorid...	14
Tüüp 1 veise papilloomiviirus (BPV1)	14
Epstein-Barri Viirus (EBV)	15
Plasmiidide ühtesobivus bakterites	17
EKSPERIMENTAALNE OSA	18
TÖÖ EESMÄRGID	18
MATERJAL JA METOODIKA	20
TULEMUSED	31
PyV LT ja EBV EBNA1 valku ekspresseeriva rakuliini tegemine	31
PyV replikatsiooni <i>origin'</i> i ja FR-elementi sisaldava plasmidi (WTOFRneo)	
säilimine konstitutiivselt EBV EBNA1 ja PyV LT valku ekspresseerivas	
Cop5EBNA1 rakuliinis	31
BPV1 E1 ja E2, PyV LT ja EBV EBNA1 valke ekspresseeriva rakuliini	
tegemine	33
BPV1 E1 ja E2 valke, EBV EBNA1 valku ja PyV mLT valku ekspresseeriva	
rakuliini konstrueerimine ja analüüs	35
Erinevate replikatsiooni- ja segregatsioonifunktsiooniks vajalike viiruseliste	
elementidega plasmiidide konstrueerimine	38
Transientse replikatsiooni analüüs 4P11 liinis	39
Episomaalse DNA analüüs selektsiooni all kasvanud rakkudest	42
Selektsiooni all kasvanud transfekteeeritud rakkude analüüs	
voolutsütomeetria meetodiga	43
ARUTELU	45
KOKKUVÕTE	50
SUMMARY	52
KASUTATUD KIRJANDUS	54
LISAD	60

SISSEJUHATUS

Kõikide rakkude jaoks on oluline, et geneetiline materjal jaotuks pärast rakkude jagunemist tütarakkudesse võrdset. Eukarüootsete rakkude kromosoomidel on geneetilise materjali korrektse jaotumise tagamiseks tsentromeerid, millele rakkude jagunemise ajal kinnituvad kääviniidid. Imetajatel võivad tsentromeerid olla isegi rohkem kui miljoni aluspaari pikkused piirkonnad. Kuna suur osa imatajate genoomist ei kodeeri valke, siis pole suure hulga DNA kasutamine kromosoomide jaotumismehhanismi tagamiseks organismile probleemiks.

Ka eukarüootsete viiruste jaoks on oluline, et pärast peremeesrakkude jagunemist säiliks nende geneetiline materjal võimalikult paljudes jagunenud rakkudes. Samas on viiruste puhul oluline kompaktsus ning seepärast on eukarüootsetele kromosoomidele sarnane säilimismehhanism välistatud. Viirustel on aga samuti mitu erinevat strateegiat geneetilise materjali säilitamiseks jagunevates rakkudes. Esiteks võivad viirused integreeruda kromosoomidesse (nt. retroviirused) ning kasutada seeläbi ära tsentromeeride poolt tagatud DNA segregatsioonimehhanismi; teiseks võimaluseks on säilitada viiruse genoom episoomina, mis rakkude jagunemisel assotsieerub mitoetiliste kromosoomidega (nt. tüüp 1 veise papilloomiviirus – BPV1 ja Epstein-Barr' i viirus - EBV) ning kasutab seega samuti ära tsentromeeride poolt tagatud DNA segregatsioonimehhanismi.

Käesoleva töö teoreetiline osa annab ülevaate BPV1, hiire polüoomiviiruse (PyV) ja EBV replikatsiooniks vajalikest viiruselistest faktoritest ning BPV1 ja EBV säilimismehhanismidest jagunevates rakkudes. Töö eksperimentaalne osa seisneb BPV1 E1 ja E2 valku, PyV LT valku ja EBV EBNA1 valku ekspresseeriva rakuliini konstrueerimises ning BPV1 ja PyV replikatsiooni *origin'* i ja EBV stabiilset säilimist tagava FR-elementi ning BPV1 säilituselement MME (*Minichromosome Maintenance Element*) poolt tagatud replikatsiooni- ja segregatsioonimehhanismide võrdlemises.

Töö on teostatud Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi viroloogia ja mikrobioloogia õppetooli juures. Olen väga tänulik juhendamise eest prof. Mart Ustavile. Samuti tahaksin tänada Aare Abroid ning kõiki teisi, kes mind selle töö valmimisel abistasid.

KASUTATUD LÜHENDID

AD – transaktivatsioonidomeen (**a**ctivation **d**omain)
aux – abijärjestus (**a**uxiliary **s**equ**e**nce)
BPV1 – tüüp 1 veise papilloomiviirus (**B**ovine **P**apilloma **V**irus type 1)
CMV – tsütomegaloviirus
d1EGFP – destabiliseeritud roheliselt fluorestseeruv valk (**d**estabilized **E**nhanced **G**reen **F**luorescent **P**rotein)
DBD – DNAGA seostumise domeen (**D**N**A** **b**inding **d**omain)
DS – pöördkordusjärjestuste piirkond (**d**yad **s**ymmetry **r**egion)
DTT – ditiotreitool
EBNA – Epstein-Barri viirusega assotsieerunud tuuma antigeen (**E**pstein-**B**arr **N**uclear **A**ntigen)
EBV – **E**pstein-**B**arri viirus
E1BS – E1 valgu seostumiskoht (**E**1 **b**inding **s**ite)
E2BS – E2 valgu seostumiskoht (**E**2 **b**inding **s**ite)
FISH – fluorestsents *in situ* hübridisatsioon
FR – tandemkorduste pere (**f**amily of **r**epeats)
G418 – antibiootikum genetitsiin
HcRed – punaselt fluorestseeruv valk
LCR – pikk kontrollpiirkond (**l**ong **c**ontrol **r**egion)
LMP – latentne membraanivalk (**l**atent **m**embrane **p**rotein)
LT – suur T-antigeen (**l**arge **T**-antigen)
LTR – pikk terminaalne kordus (**l**ong **t**erminal **r**epeat)
MME – minikromosoomi säilituselement (**M**inichromosome **M**aintenance **E**lement)
MO – minimaalne replikatsiooni alguspunkt (**o**rig**i**n)
NLS – tuuma lokaliseerimise signaal (**n**uclear **l**ocalisation **s**ignal)
PyV – hiire polüoomiviirus
RPA – replikatsioonivalk A
RSV – **R**ous **s**arkoomi viirus
SDS – naatrium dodetsüülsulfaat (**s**odium **d**odecyl **s**ulfate)
SV-40 – tüüp 40 reesusmakaagi viirus (**S**imian **V**irus-40)
URR – ülemine regulaatorpiirkond (**u**pstream **r**egulatory **r**egion)
wt – metsiktüüp (**w**ild **t**ype)
WTO – metsiktüüpi replikatsiooni alguspunkt (**w**ild **t**ype **o**rig**i**n)

TEOREETILINE OSA

Viiruste DNA replikatsioon

Tüüp 1 veise papilloomiviirus (BPV1)

Tüüp 1 veise papilloomiviiruse (BPV1) genoom on 7946 aluspaari pikkune kaheaahelaline tsirkulaarne DNA, mida katab lipiidümbriseta 55 nanomeetrise diameetriga kapsiid. Genoom jaotatakse varajaseks, hiliseks ja mittekodeerivaks piirkonnaks (nimetatud ka URR – *upstream regulatory region* või LCR – *long control region*). Sarnaselt kõikide papilloomiviirustega asuvad BPV1 genoomis valke kodeerivad avatud lugemisraamid ühel DNA ahelal. Varajases genoomi piirkonnas paiknevad kaheksa lugemisraami (E1-E8), millelt ekspresseeruvad valgud on vajalikud viiruse DNA replikatsiooniks, transkriptsiooniks ning rakkude transformatsiooniks (Bream and Phelps 1994). Genoomi hiline piirkond sisaldab kahte avatud lugemisraami kapsiidi valkude L1 ja L2 jaoks. Mittekodeeriv piirkond ehk URR on umbes 1000 aluspaari pikkune DNA järjestus, mis sisaldab mitmesuguseid transkriptsiooni ja replikatsiooni reguleerivaid alasid ning replikatsiooni *origin'* i (Bream and Phelps 1994).

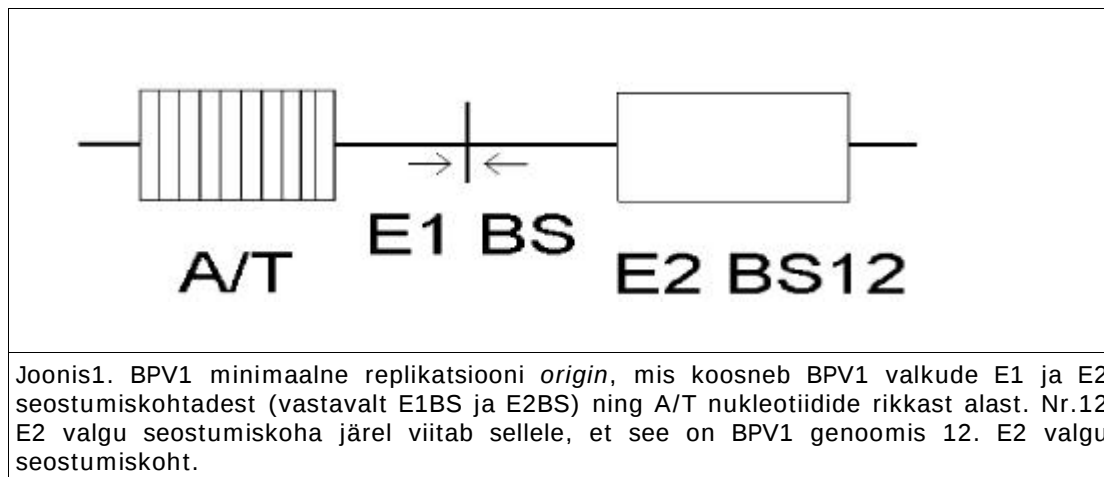
Papilloomiviiruste elutsükkel jagatakse kolmeks vastavalt kolme tüüpi viiruse DNA replikatsioonile (Howley 1996):

- Algne amplifikatsiooniline replikatsioon – vahetult pärast peremeesraku nakatamist paljundatakse viiruse DNA 50-100 koopiani raku kohta;
- Stabiilne replikatsioon – viiruse DNA koopiaarv rakus ei muutu;
- Vegetatiivne replikatsioon – lõplikult diferentseerunud epiteelirakkudes toimub uus amplifikatsiooniline replikatsioon vahetult enne virionide moodustumist .

Amplifikatsioonilises replikatsioonis vajalikud viiruselised faktorid

Algseks amplifikatsiooniliseks replikatsiooniks vajalikeks *trans*-faktoriteks on BPV1 puhul viirusevalgud E1 ja E2 (Ustav and Stenlund 1991) ning *cis*-faktoriks URR piirkonnas asuv minimaalne replikatsiooni *origin* (MO ehk *minimal origin*)(Ustav et al. 1991).

MO koosneb valkude E1 ja E2 seostumiskohtadest ning *origin'* i lahti keerdumist hõlbustavast A/T nukleotiidide rikkast alast (Ustav et al., 1991; Ustav et al., 1993) (joonis 1).



BPV1 E1 valk on 605 aminohappe pikkune polüpeptiid, mis kuulub samasse initsiaatorvalkude gruppi SV40 (*Simian Virus-40*) ja polüoomiviiruse suure T-antigeeniga (*large T-antigen*) (Clertant and Seif, 1984; Mansky et al., 1997). E1 valgul eristatakse kolme domeeni: N-terminaalne tuumalokalisatsiooni signaali ja fosforüleerimiskohtade domeen, DNAGA seostumise domeen ning C-terminaalne ATPaasne/helikaasne domeen (Wilson et al., 2002). E1 valk on vajalik nii viiruse DNA sünteesi initsiatsiooniks kui ka elongatsiooniks ning ta omab ATPaasset ja DNA helikaasset aktiivsust (Seo et al., 1993 a; Yang et al., 1993). Kuigi E1 valk võib spetsiifiliselt seostuda DNAGA (replikatsiooni *origin'* iga), pole selline seostumine piisav, et tagada replikatsioon *in vivo* tingimustes (Wilson et al, 1991; Ustav et al., 1991). Selleks, et tagada E1 valgu piisavalt tugev spetsiifiline seostumine replikatsiooni *origin'* iga on vajalik E1 valgu interaktsioon E2 valguga. Seejuures on E2 valguga kompleksis oleva E1 valgu järjestusspetsiifiline seostumine replikatsiooni *origin'* iga võimendunud sadu kordi (Sedman and Stenlund, 1995). Lisaks E2 valgule seostub E1 valk veel mitmete replikatsiooniks vajalike rakuliste valkudega, näiteks DNA polümeraas α -primaasi kompleksiga (Bonne-Andrea et al., 1995; Park et al., 1994) ja RPA valguga (Han et al., 1999).

BPV1 E2 valk on 410 aminohappe pikkune ning koosneb kahest funktsionaalsest domeenist: C-terminaalne DNAGA seostumise domeen on vaheregiooni (*hinge*) kaudu ühendatud N-terminaalse trans-aktivatsiooni domeeniga. DNAGA seostub valk dimeerina. Seostumiseks on spetsiifilised kohad, mida BPV1 genoomis on kokku 17, ning mis seovad E2 valku erineva afiinsusega (Li et al., 1989). BPV1 E2 valgul on teada kolm erinevat vormi – täispikk valk E2TA ning kaks lühemat vormi – E2TR ja E8/E2, kus DNAGA seostumise domeen on säilinud. Koos E1 valguga on E2TA vajalik trans-faktor nii viiruse DNA amplifikatsioonilises kui stabiilses replikatsioonis ning ilmselt ka vegetatiivses replikatsioonis. Replikatsiooniks on vajalik nii trans-aktivatsiooni kui ka DNAGA seostumise domeen. Vaheregioonis võib aminohappeid küll üksteisega asendada, kuid

replikatsiooni toimumiseks on oluline, et mingi pikkusega järjestus kahe domeeni vahel säiluks (McBride and Myers, 1997). Lühema E2TR valgu puhul on näidatud nii *in vivo* kui ka *in vitro* katsetes, et selle valgu homodimeerid suruvad BPV1 DNA replikatsiooni maha, kuid E2TR ja E2TA valkudest koosnevad heterodimeerid aktiveerivad *in vitro* replikatsiooni (Lim et al., 1998). Lisaks E1 valgule seostub E2 valk ka rakuliste replikatsioonivalkudega, näiteks RPA valguga (Li and Botchan, 1993).

Kuna täispika E1 valgu üksinda spetsiifiline seostumine DNAGA toimub madala efektiivsusega, on E2 valgu funktsiooniks tagada E1 valgu ja DNA tugev spetsiifiline seostumine. Kuni viimase ajani peeti E2 valgu rolliks peamiselt E1 valgu spetsiifilist „sidumist“ replikatsiooni *origin'* ile, kuid uurides E1 spetsiifilist ja mittespetsiifilist DNAGA seostumist selgus E2 valgu teistsugune funktsioon. Esmalt tehti kindlaks, et kuigi täispika E1 valgu spetsiifiline DNAGA seostumise tase on madal, seostub ainult E1 valgu DNAGA seostumise domeen (DBD) DNAGA kõrge selektiivsusega (DBD seostumine DNAGA on kuni 1000 korda selektiivsem kui täispikal E1 valgul). Seega sarnaneb E1 DBD DNAGA seostumine pigem E1 ja E2 valgu kompleksi seostumisele kui ainult täispika E1 valgu seostumisele. Kuna on teada, et täispikk E1 valk seostub DNAGA läbi DBD (Sedman et al., 1997; Chen and Stenlund, 2001), peab täispika E1 valgu madal DNAGA seostumise selektiivsus tulenema helikaasest domeenist. Seega maskeerib täispika E1 valgu mittespetsiifiline seostumine DNAGA ilmselt DBD selektiivsuse. On näidatud, et E1 ja E2 kompleksi seostumine DNAGA on samasugune kui E1 DBD puhul ning seega on E2 valgu funktsiooniks erinevalt varasemalt pakutud replikatsiooni *origin'* ile „sidumise“ mudelist pigem E1 valgu DBD tugevalt selektiivse aktiivsuse „paljastamine“ (*unmasking*) (Stenlund, 2003). Selle uue mudeli puhul tagab E1 ja E2 valgukompleksi spetsiifilise seostumise DNAGA täispika E2 valgu võime seostuda E1 valgu helikaasse domeeniga ning takistada E1 valgu mittespetsiifilist DNAGA seostumist (Stenlund, 2003).

Selleks, et BPV1 replikatsiooni *origin'* ilt toimuks *in vivo* DNA replikatsioon, on esmalt vajalik E1 dimeeri ja E2 dimeeri kompleksi ($E1_2E2_2$) moodustumine, mis seejärel seostub koöperatiivselt replikatsiooni *origin'* il kõrvuti paiknevate seostumiskohtadega (Sedman and Stenlund 1995; Sedman et al., 1997; Seo et al., 1993 b; Yang et al., 1991). Kuna E1 valgu helikaasne domeen on seostunud E2 valgu transaktivatsioonidomeeniga (AD), toimub E1 valgu kontakt DNA-ga ainult läbi DBD ning selline seostumine on väga spetsiifiline. $E1_2E2_2$ -kompleksil puudub aga edasiseks DNA replikatsiooni initsiatsiooniks vajalik aktiivsus ning funktsionaalse initsiatsioonikompleksi tekkimiseks on vajalik täiendavate E1 valgu

molekulide lisandumine kompleksi (helikaasne aktiivsus on E1 valgu heksameersel vormil). E1 molekulide lisandumine saab võimalikuks pärast seda, kui E1 valk on hüdrolüüsinud ATP ning E2 valk vabanenud kompleksist (Sanders and Stenlund, 1998; Sanders and Stenlund, 2000). Kuna replikatsiooni *origin* is paiknev E2 valgu seostumiskoht on madala afiinsusega, siis dissotsieerub E1 valguga mitteseotud E2 valk DNAlt. Seejärel lisandub E1-*origin* kompleksi veel E1 valgu molekule ning lõpp-tulemusena moodustub replikatsiooni alguspunktile kaks aktiivset helikaasse ja ATPaasse aktiivsusega E1 valgu heksameeri (E1₆)₂ ja saab alata DNA süntees (Sedman and Stenlund, 1998; Sanders and Stenlund, 2001).

Stabiilses replikatsioonis vajalikud viiruselised faktorid

BPV1 stabiilseks replikatsiooniks vajalikeks trans-faktoriteks on samuti viiruse valgud E1 ja E2 ning cis-faktoriks minimaalne replikatsiooni *origin* ja *minichromosome maintenance element* (MME), mis koosneb vähemalt kuuest E2 valgu seostumiskohtast (Piirsoo et al., 1996). BPV1 genoomi stabiilne replikatsioon ei toimu sünkroonselt peremeesraku DNA sünteesiga ning jagunemine ei pruugi toimuda rangelt üks kord rakutsükli jooksul, vaid pigem statistiliselt juhusliku valiku mehhanismil (Piirsoo et al., 1996).

BPV1 vegetatiivse replikatsiooni kohta on teadmisi äärmiselt vähe, kuna selleks on vajalikud lõplikult diferentseerunud keratinotsüüdid ning selliseid tingimusi on raske koekultuuri tingimustes reprodutseerida.

Hiire polüoomiviirus (PyV)

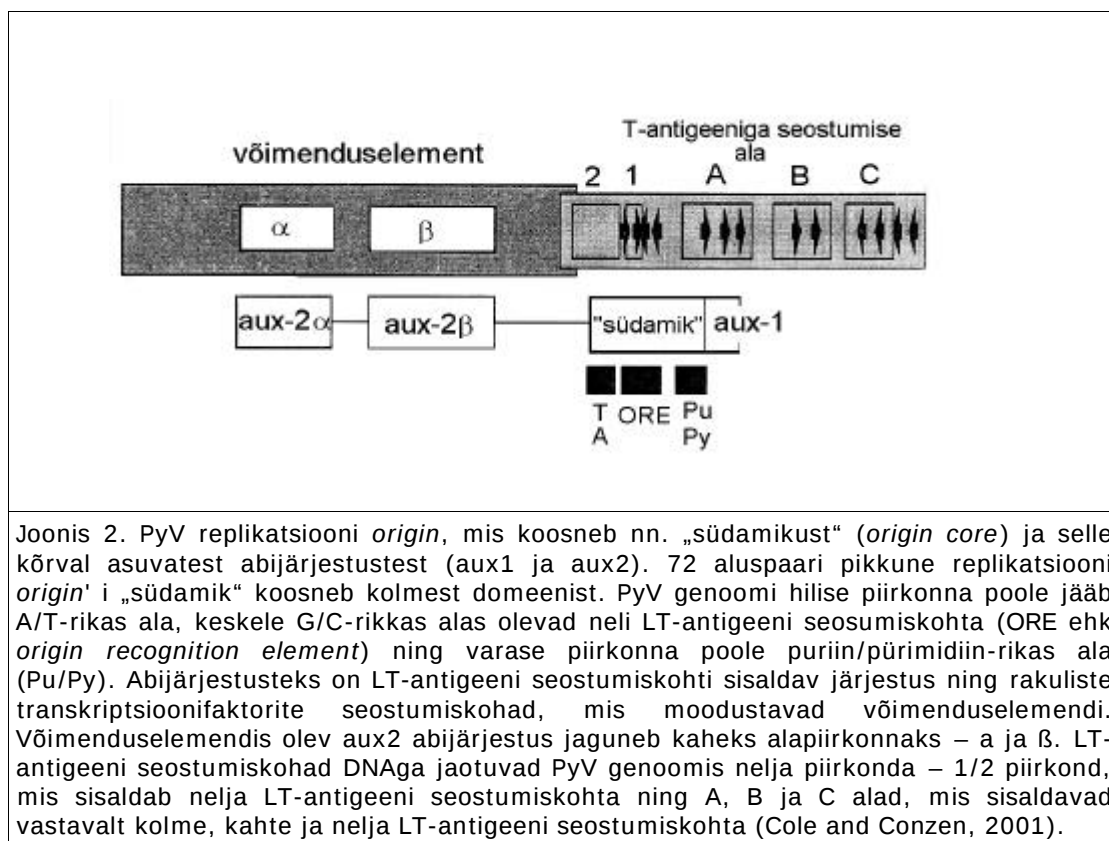
Hiire polüoomiviiruse (PyV) genoom on 5297 aluspaari pikkune kaheaheelaline tsirkulaarne DNA, mida katab ümbriseta 45 nanomeetrise diameetriga kapsiid. Genoom jaotatakse varajaseks, hiliseks ja mittekodeerivaks piirkonnaks. Erinevalt papilloomiviirustest asuvad PyV genoomis varaseid ja hiliseid valke kodeerivad avatud lugemisraamid erinevatel DNA ahelatel (Cole and Conzen, 2001). Varajases genoomi piirkonnas paiknevad kolm lugemisraami, millelt ekspresseeruvad valke nimetatakse tuumorantigeenideks (*T-antigens*) ning mis on vajalikud viiruse DNA replikatsiooni ning peremeesrakkude rakutsükli regulatsiooniks. Genoomi hiliselt piirkonnalt ekspresseeruvad kapsiidivalgud VP1, VP2 ja VP3. Mittekodeeriv piirkond ehk regulatoorne ala on umbes 400 aluspaari pikkune ning sisaldab promootoreid varajaste ja hiliste valkude transkriptsiooniks,

replikatsiooni *origin'* i ning liigispetsiifilist võimenduselementi (*enhancer*)(Pipas, 1994).

Permissiivsete rakkude nakatumisel siseneb viirus rakutuumas, kus viiruse genoom vabaneb kapsiidist ning algab varajaste geenide ekspressioon. Varajaselt piirkonnalt toodetud valgud aktiveerivad rakulise DNA sünteesi, seejärel initsieerib suur T-antigeen (LT) viiruse DNA sünteesi ning hilise piirkonna kapsiidivalkude ekspressiooni. Sellega kaasneb pidev virioonide pakkimine, mis kutsub esile peremeesrakkude surma ja viiruspartiklite vabanemise (Cole and Conzen, 2001).

PyV replikatsioonis vajalikud viiruselised faktorid

PyV DNA replikatsiooni jaoks on ainuke vajalik viiruseline valk LT-antigeen, mis seostub replikatsiooni *origin'* ile. PyV replikatsiooni *origin* koosneb nn. „südamikust“ (*origin core*) ja selle kõrval asuvatest abijärjestustest (*aux1* ja *aux2*)(joonis 2). 72 aluspaari pikkune replikatsiooni *origin'* i „südamik“ koosneb kolmest domeenist. PyV genoomi hilise piirkonna poole jääb A/T-rikas ala, keskele G/C-rikas alas olevad neli LT-antigeeni seosumiskohta (ORE ehk *origin recognition element*) ning varase piirkonna poole puriin/pürimidiin-rikas ala (Katinka and Yaniv, 1983; Triezenberg and Folk, 1984). Abijärjestusteks on LT-antigeeni seostumiskohti sisaldav järjestus ning rakuliste transkriptsioonifaktorite seostumiskohad, mis moodustavad võimenduselemendi (Guo and DePamphilis, 1992). Võimenduselemendis olev *aux2* abijärjestus jaguneb kaheks alapiirkonnaks – α ja β (Herbomel et al., 1984). LT-antigeeni seostumine *aux1* järjestusele võimendab replikatsiooni initsiatsiooni 5-10 korda ning transkriptsioonifaktorite seostumine võimenduselemendis olevatele *aux2* järjestustele võimendab replikatsiooni veelgi kümneid kordi (Veldman et al., 1985; Muller et al., 1988). *Aux2* võimenduselemendis olevad transkriptsioonifaktorite seostumiskohad võib vahetada ainult ühte tüüpi transkriptsioonifaktori seostumiskohtade vastu ilma, et kaoks võimenduselemendi funktsionaalsus. Vahetades *aux2* võimenduselemendi BPV1 E2 valgu seostumiskohtade vastu, indutseerib BPV1 E2 valk PyV replikatsiooni, seejuures piisab replikatsiooni indutseerimiseks juba kahe E2 valgu seostumiskoha lisamisest (Nilsson et al., 1991). Lisades PyV *aux2* elemendi asemele vähemalt viis BPV1 E2 valgu seostumiskohta, tagab E2 valk plasmiididele segregatsioonifunktsiooni ning sellised plasmiidid säilivad jagunevates PyV LT ja BPV1 E2 valku ekspresseerivates peremeesrakkudes stabiilselt episoomidena (Silla, 2001).



LT-antigeen on 785 aminohappe pikkune polüpeptiid, mis kuulub samasse initsiaatorvalkude gruppi SV40 (*Simian Virus*-40) LT-antigeeni ja BPV1 E1 valguga (Clertant and Seif, 1984; Mansky et al., 1997). Geneetilised ja biokeemilised uuringud on näidanud, et PyV LT-antigeen on multifunktsionaalne valk, mis koosneb mitmetest erinevatest domeenidest. N-terminaalses osas paikneb fosforüleerimise ja rakulise Rb valguga seostumise domeen, millele järgneb tuumalokalisatsiooni signaal ja DNAGA seostumise domeen. N-terminaalses osas on ka DnaJ perekonna *chaperon* valkude konserveerunud alaga homoloogne piirkond (Brodsky and Pipas, 1998). Valgu C-terminaalsesse ossasse jääb ATPaasne domeen (Pipas, 1992). LT-antigeen on vajalik nii viiruse DNA sünteesi initsiatsiooniks kui ka elongatsiooniks ning ta seostub spetsiifiliselt DNAGA, omab ATPaasset ja DNA helikaasset aktiivsust (Guizani et al., 1988; Seki et al., 1990). LT-antigeeni seostumiskohad DNAGA jaotuvad PyV genoomis nelja piirkonda – replikatsiooni *origin* i „südamik“ paiknev 1/2 piirkond, mis sisaldab nelja LT-antigeeni seostumiskohta ning „südamikust“ varajase genoomi piirkonna poole jäävad A, B ja C alad, mis sisaldavad vastavalt kolme, kahte ja nelja LT-antigeeni seostumiskohta (joonis 2) (Cowie and Camen, 1984; Dilworth et al., 1984; Pomerantz et al., 1983). *In vitro* katsetes on näidatud, et ATP puudumisel keskkonnas seostub LT-antigeen tugevamini piirkondadele A, B ja C, kuid ATP lisamisel suureneb LT-antigeeni afiinsus „südamik“ paikneva 1/2 piirkonna

suhtes kuni kümme korda. Selline erinevus tuleneb ilmselt sellest, et ATP soodustab replikatsiooni *origin'* il LT-antigeeni heksameeri moodustumist (Lorimer et al., 1991). Lisaks interakteerub PyV LT-antigeen mitmete rakuliste replikatsiooniks vajalike valkudega, näiteks sarnaselt BPV1 E1 valgule DNA polümeraas α -primaasiga (Schneider et al., 1994).

LT-antigeen initsieerib DNA replikatsiooni PyV replikatsiooni *origin'* ilt seostudes kooperatiivselt mitmekordsetele seostumiskohtadele *origin'* is ja selle kõrval olevas alas. LT-antigeeni seostumine A, B, ja C piirkondades olevatele seostumiskohtadele hõlbustab valgu seostumist *origin'* i „südamikus“ paiknevale 1/2 piirkonnale (Peng and Acheson, 1998). „Südamikus“ paikneval 1/2 piirkonnal moodustuvad seejärel LT-antigeeni heksameerid, mis initsieerivad DNA lahtikeerdumist ning replikatsiooni. Kuna LT heksameeride moodustumine on soodustatud kui LT-antigeeni molekulid on üksteise läheduses ning saavad üksteisega seostuda, on väljapakutud nn. „handover“ mudel, mille kohaselt „antakse“ A, B ja C piirkondadega seostunud LT valgu molekulid üle 1/2 piirkonda, kus moodustub heksameer. Teise heksameeri moodustumine toimub ilmselt pärast esimese heksameeri poolt initsieeritud DNA lahtikeerdumist ja replikatsiooni alustamist varajase genoomi piirkonna suunas (Peng and Acheson, 1998). *In vitro* katsetes on leitud, et LT-antigeeni seostumine DNAGA sõltub keskkonna pH-st, olles tugevaim seitsmest madalamatel pH väärtustel ning nõrgem pH väärtustel üle 7.4. Seega on võimalik, et PyV DNA replikatsioon on tundlik rakulise pH muutustele. Madalam rakuline pH võib soodustada LT-antigeeni seostumist DNAGA ja seega piisava koguse suure T-antigeeni molekulide kuhjumist replikatsiooni replikatsiooni *origin'* i lähedusse ning kõrgem pH omakorda soodustab nendest DNAGA seostunud molekulidest heksameeride moodustumist (Peng and Acheson, 1998).

Epstein-Barri viirus (EBV)

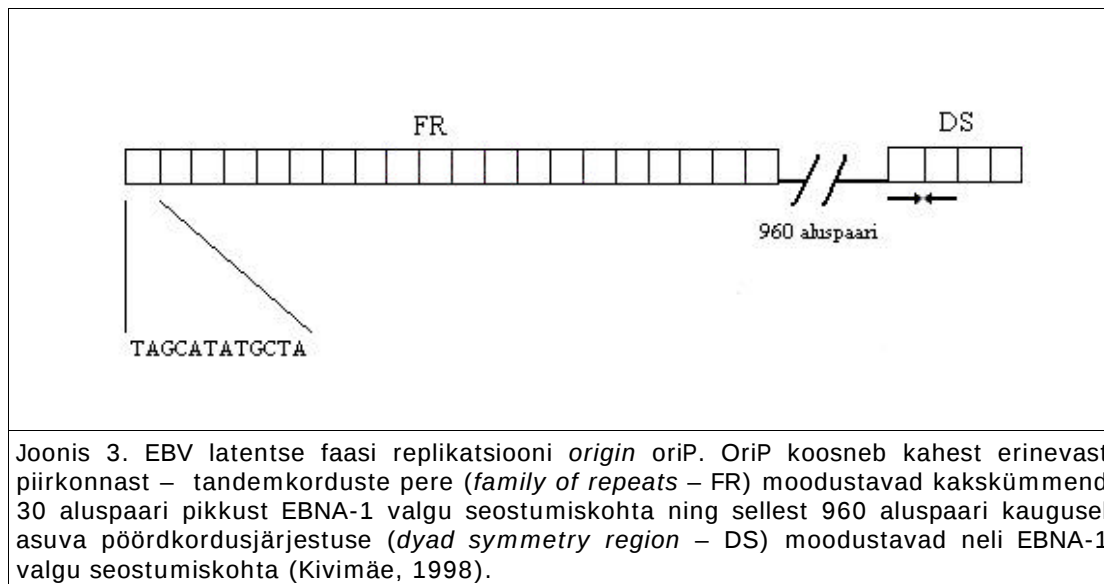
Epstein-Barri viiruse (EBV) genoom on 172 000 aluspaari pikkune kaheaheelaline lineaarne DNA, mis on 110 nanomeetrise diameetriga kapsiidi sees, pakitud ümber toruja valgulise südamiku. Kapsiidi ümbritseb valguline tegument, mille peal on lipiidne ümbris. Rakke nakatades liituvad genoomi terminaalsed otsekordusjärjestused, moodustub episoom ning DNA püsib tsirkulaarsel kujul raku tuumas. Genoom jaotub lühikeseks ja pikaks unikaalseks regiooniks (U_S ja U_L), mida eraldab kaheksa koopiat otsekordusjärjestust IR1. Pikk unikaalne

piirkond jaotub väiksemateks domeenideks (U2, U3, U4, U5) lühikeste korduselementide poolt (IR2, IR3, IR4) (Sample, 1994). EBV genoom sisaldab umbes 90 geeni. Latentse infektsiooni ajal B-lümfotsüütides ekspresseeritakse üheksat valku. Ülejäänud geenid on vajalikud viiruse amplifikatsioonilise replikatsiooni ajal või lüütilises faasis.

EBV genoom sisaldab kahte funktsionaalselt erinevat DNA replikatsiooni algusala. Latentses faasis toimub viiruse DNA paljundamine kord rakutsüklis sünkroonselt peremehe raku jagunemisega ning replikatsioon algab *origin'* lt oriP (joonis 3). Lüütilises faasis algab replikatsioon *origin'* lt oriLyt ning seejuures suureneb viiruse koopia arv 100-1000 korda. Replikatsiooni *origin'* i oriLyt on genoomis tavaliselt kaks koopiat, kuigi lüütiliseks replikatsiooniks piisab ka ühest (Sample, 1994).

EBV elutsüklis saab sarnaselt BPV1-ga eristada viiruse DNA replikatsioonitüübi alusel kolme faasi (Kieff, 1996):

- Eeldatavasti nakatuvad kõigepealt neelu, süljenäärmete ja keele-epiteeli rakud, kus toimub viiruse efektiivne paljunemine ehk produktiivne faas.
- Sealt levib viirus edasi verre, kus nakatab puhkavaid B-lümfotsüüte. Latentset säilimist tagavad üheksa viiruse valku jaotatakse kahte rühma – Epstein-Barri viirusega assotsieerunud tuuma antigeenid (EBNA-1, 2, 3A, 3B, 3C, LP) ning kolm latentset membraani valku (LMP-1, 2A ja 2B). Lisaks nendele transkribeeritakse veel kahte RNA geeni (EBER-1 ja 2). Latentses faasis on viiruse replikatsioon range kontrolli all, toimudes ainult korra rakutsüklis. Viiruse koopiaarv rakus on 10-400.
- Viiruse reaktivatsiooniks on oluline BZLF-1 geeniprodukt, mis reguleerib mitmete nii viiruse kui rakuliste geenide transkriptsiooni ning aktiveerib EBV replikatsiooni, seondudes lüütilise replikatsiooni *origin'* ile (oriLyt). Tekkinud konkatemeerne DNA lõigatakse õige suurusega fragmentideks ning pakitakse kapsiidi (Kieff, 1996).



Latentse faasi replikatsioonis vajalikud viiruselised faktorid

Latentses faasis toimuva DNA replikatsiooni jaoks on ainuke vajalik viiruseline valk EBNA-1, mis seostub replikatsiooni *origin'* ile oriP. Ülejäänud viiruseliste valkude roll on tagada viirusele sobiv keskkond rakus, B-lümfotsüütide immortalisatsioon ning suruda alla viiruse enneaegne aktivatsioon. Erinevalt BPV1 stabiilsest replikatsioonist toimub EBV genoomi replikatsioon latentse faasis rangelt kontrollitult ainult korra rakutsüklis (Yates and Guan, 1991).

EBNA-1 valk on 641 aminohappe pikkune valk, mille üheks funktsiooniks on osalemine EBV replikatsioonis. EBNA-1 ei oma helikaasset, ATPaasset ega muid ensümaatilisi aktiivsusi. Tõenäoliselt seostuvad EBNA-1 valguga rakulised replikatsiooniks vajalikud valgud (Frappier and O'Donnell, 1991 a). DNAGA seostub EBNA-1 dimeerina. EBNA-1 seostub latentse replikatsiooni *origin'* i oriPga, mis koosneb kahest erinevast piirkonnast (Yates et al., 1984)(joonis 3). Tandemkorduste pere (*family of repeats* – FR) moodustavad kakskümmend 30 aluspaari pikkust EBNA-1 seostumiskohta. Sellest 960 aluspaari kaugusel asuvad neli EBNA-1 seostumiskohta, mis moodustuvad pöördkordusjärjestuse (*dyad symmetry region* – DS). FRi ja DSi vahele jääva ala deleteerimine ei riku oriP funktsioone (Reisman et al., 1985). Replikatsiooni initsiatsiooni puhul seondub EBNA-1 valk kõigepelt FRile ning seejärel DSile, painutades sellega nende elementide vahelise ala silmuseks (Frappier and O'Donnell, 1991 b). EBNA-1 valgu seondudes DSile initsieeritakse sellelt replikatsioon (Reisman et al., 1985). Hilisemates uuringutes on kindlaks tehtud, et EBV replikatsiooniks piisaks ka ainult DS elemendist. Kui DSist deleteerida kaks EBNA-1 seostumiskohta, siis replikatsioon küll toimub, kuid väga madala efektiivsusega (Yates et al., 2000).

Erinevate episoomina püsivate viiruste stabiilset säilimist tagavad faktorid

Tüüp 1 veise papilloomiviirus (BPV1)

BPV1 stabiilset säilimist jagunevates rakkudes vahendab E2 valk assotsieerudes samaagselt viiruse genoomi ning peremeesraku mitoetiliste kromosoomidega. See tagab viiruse stabiilseks säilimiseks vajaliku püsimise tuumas ja segregatsioonimehhanismi. Mitoetilistes rakkudes seostub E2 valk oma N-terminaalse transaktivatsioonidomeeni kaudu mitoetiliste kromosoomidega. E2-TR ja E8/E2 vormid, millel puudub trans-aktivatsiooni domeen, kromatiiniga ei seostu, tõestades et just N-terminaalne domeen on selleks vajalik (Skiadopoulos and McBride, 1998). E2 valgu mutatsiooniline analüüs näitas, et N-terminaalsest domeenist on kromatiiniga seostumiseks olulised mõningad spetsiifilised alampiirkonnad nt. dimeriseerumises osalev ala (Abroi et al., 2004). E2 valgu assotsieerumine mitoetiliste kromosoomidega määrati kindlaks kasutades immunofluorestsentsi meetodit, mille puhul on sekundaarse antikeha külge seotud immunofluorestsentsmärgis (Skiadopoulos and McBride, 1998). E2 valgu assotsiatsioon kromosoomidega ei vaja BPV1 genoomi juuresolekut, samuti pole mitoetilistele kromosoomidele kinnitumiseks määrav E2-TA valgu DNAGA seostumise domeen, sest vastavad E2 mutandid seostusid kromosoomidega samasuguse efektiivsusega nagu metsiktüüpi valk (Skiadopoulos and McBride, 1998). Samas on E2 valgu DNAGA seostumise domeen aga vajalik E2 seostumiskohti sisaldavate plasmiidide kinnitumiseks mitoetilistele kromosoomidele. E2 valgu seostumist mitoetiliste kromosoomidega vahendavaks rakuliseks partneriks võib olla Brd4 valk, mis seostub spetsiifiliselt ning kolokaliseerub E2 valguga mitoetilistel kromosoomidel (You et al., 2004). BPV1 genoomi seostumine mitoetiliste kromosoomidega on vahendatud E2 valgu ja selle seostumiskohtade poolt. Kasutades fluorestsents *in situ* hübriidisatsiooni (FISH) analüüsi, andis viiruse DNA signaal mitoetilistele kromosoomidele juhusliku täpilise mustriga ega olnud spetsiifiline ühelegi kromosoomile ega kromosoomi domeenile (Skiadopoulos and McBride, 1998; Lehman and Botchan, 1998).

Edasistes uuringutes kasutati BPV1 genoomi asemel plasmidi, mis sisaldas BPV1 URR järjestust ning püsis stabiilsena rakuliinis, milles ekspresseeruvad BPV1 E1 ja E2 valgud (CHOBgl40 rakuliin). Kasutades FISH analüüsi, tehti kindlaks, et ka see plasmiid lokaliseerub juhusliku mustriga metafaasi kromosoomidel (Ilves et al., 1999). Sarnane tulemus saadi ka transientses replikatsiooni katses, kus BPV1 E1

ja E2 valku ekspresseerivat rakuliini (CHO 4.15.5) transfekteeriti plasmiidiga, mis sisaldas BPV1 URR piirkonda. Sellest järeldub, et BPV1 URR plasmiidide seostumine kromatiiniga ei sõltu sellest, kas plasmiid on rakkudes transientselt või stabiilselt (Ilves et al., 1999). Edasistes katsetes kasutatud plasmiid, milles E1 seostumiskoht oli defektne, ei olnud võimeline replitseeruma CHO 4.15.5 rakkudes, kuid lokaliseerus samuti mitootilistel kromosoomidel. Seega on replikatsioon ja kromosoomidele seostumine BPV1 replikoni erinevad funktsioonid (Ilves et al., 1999). Plasmiidid, mis ei sisaldanud URR järjestust või sisaldasid ainult minimaalset replikatsiooni *origini* (MO) koos kahe E2 seostumiskohaga, ei seostunud mitootiliste kromosoomidega CHO 4.15.5 rakuliinis. Kui minimaalset replikatsiooni *origini* sisaldavale plasmiidile lisati 10 E2 seostumiskohta, siis plasmiidi võime kromosoomidega seostuda taastus. Ka plasmiidid, mis sisaldasid BPV1 URRist ainult E2 seostumiskohti (ilma MO-ta) ja plasmiidid, mis sisaldasid kümmet sünteetilist E2 valgu seostumiskohta, assotsieerusid mitootiliste kromosoomidega. Kõigest sellest tehti järeldus, et BPV1 täispikk E2 valk *in trans* ning selle mitmekordsed seostumiskohad *in cis* on mõlemad vajalikud ja piisavad plasmiidide seostumiseks mitootiliste kromosoomidega (Ilves et al., 1999).

Epstein-Barri Viirus (EBV)

EBV stabiilses säilimises osaleb EBNA-1 valk, mis vahendab viiruse genoomi assotsiatsiooni kromosoomidele. See võimaldab viirusel säilida latentses faasis, kus viiruse koopiarv rakkudes on madal. EBNA-1 valgu lokaliseerimine mitootilistel kromosoomidel tehti kindlaks kasutades immunofluorestsentsmeetodit (Petti et al., 1990). EBV genoomi assotsiatsioon mitootiliste kromosoomidega tehti kindlaks kasutades FISH meetodit. Seejuures oli EBV genoomide mitootiliste kromosoomidega seondumise muster juhuslik (Delecluse et al., 1992). EBNA-1 seostumiskohti sisaldavate mittereplitseeruvate plasmiidide säilimine EBNA-1 valku ekspresseerivas rakuliinis (143 rakuliin) on oluliselt efektiivsem kui EBNA-1 seostumiskohti mittesisaldavate konstruktide säilimine (Middleton and Sugden, 1994). Säilimiseks vajalike EBNA-1 seostumiskohtade arv selles rakuliinis tehti kindlaks kasutades konstrukte, mis sisaldasid erinevat arvu FRist pärit 30 aluspaari pikkusi kordusi. Plasmiidid, mis sisaldasid seitset sellist kordust, säilisid juba sama efektiivselt kui täispikka FRi sisaldavad. Ühte või kahte DSist pärit tandemkordust sisaldavad konstruktid aga ei suutnud EBNA-1 juuresolekul säilida (Wysokenski and Yates, 1989). Selleks, et teha kindlaks, kas EBNA-1 seostumiskohti sisaldava plasmiidi säilimine toimub ainult tänu EBNA-1 tuumalokalisatsiooni signaalile (NLS) ning EBNA-1 võimele seostuda plasmiidse

DNAGA, kasutati kontrolli, mis sisaldas EBNA-1 seostumiskohti ning ekspresseeris mutantset EBNA-1 valku. Mutantsel valgul oli alles NLS ning C-terminaalne DNAGA seostumise domeen, kuid puudus suur osa N-terminaalsest otsast. Selline mutantne valk ei suutnud plasmiidide säilimist tagada, mis tõestab veelkord, et plasmiidide säilimiseks on oluline peale DNAGA seostumise veel mingi EBNA-1 funktsioon (Middelton and Sugden, 1994). Need andmed näitavad, et ka viiruse DNA säilimisel jagunevates rakkudes on ainukesteks viiruselisteks faktoriteks EBNA-1 valk ning selle seostumiskohad, ning viitavad, et EBNA-1 vahendab episomaalset segregatsiooni, seostudes oriP FR elemendiga ja tõenäoliselt läbi mingi rakulise komponendi ka mitootiliste kromosoomidega. Jagunevates rakkudes on EBNA-1 seostumist mitootiliste kromosoomidega võimalised vahendama kolm domeeni (CBS-1, -2 ja -3). CBS-1 on piirkond EBNA-1 aminohapete 72 ja 84 vahel, CBS-2 piirkond 328 ja 365 aminohappe vahel ja CBS-3 piirkond aminohapete 8 ja 54 vahel. CBS-1 ja CBS-3 deletsioon täispikast EBNA-1 valgust ei häirinud EBNA-1 seostumist (Marechal et al., 1999). Edasistes uuringutes leiti, et EBNA-1 seostub rakulise valguga, mida nimetatakse EBP2 (EBNA-1 *binding protein*) ning see toimub just EBNA-1 325 ja 376 aminohappe vahelise piirkonna kaudu (CBS-2) (Shire et al., 1999). EBP2 valk kolokaliseerub EBNA-1 valguga mitootilistel kromosoomidel. Samas pole EBP2 seondumine kromosoomidele sõltuv EBNA-1 valgust (Wu et al., 2000). Immunofluorestsentsanalüüsiga tehti kindlaks, et täispikk EBNA-1 lokaliseerub mitootilistel kromosoomidel, kuid EBNA-1 valk, millel puudus CBS-2 domään paiknes hajusalt kromosoomide läheduses (Wu et al., 2000). Need tulemused näitavad, et see EBNA-1 piirkond, mis vahendab interaktsiooni EBP2ga on vastutav ka kromosoomidega seostumise eest. See omakorda toetab arvamust, et EBV genoomide assotsiatsioon mitootiliste kromosoomidega on EBV segregatsioonimehhanismiks (Wu et al., 2000). *Saccharomyces cerevisiae* ga tehtud katsetes polnud EBNA-1 valk piisav, et võimaldada FR järjestust sisaldavate plasmiidide stabiilset säilimist jagunevates rakkudes. Efektiivseks säilimiseks oli lisaks EBNA-1 valgule vaja ka EBP2 valku, mis kinnitab eelnevaid tulemusi (Kapoor et al., 2001). Erinevalt EBV EBNA-1 valgust puuduvad BPV1 E2 valgul lineaarsed alamjärjestused, mis vastutavad kromatiiniga seostumise eest. Pigem vastutab BPV1 E2 valgu kromatiiniga seostumise eest kogu valgu N-terminaalse osa struktuurne terviklikkus (Abroi et al., 2004). Seega on BPV1 E2 valguga seostuvad rakulise kromatiini komponendid ilmselt erinevad kui EBV EBNA1 valgu puhul.

Plasmiidide ühtesobivus bakterites

Mitmed loodusest isoleeritud bakterid sisaldavad samaaegselt stabiilselt säilivaid erinevat tüüpi plasmiide. Samas on bakterite puhul kirjeldatud ka plasmiide, mis ei jää stabiilselt koos püsima. Sellist nähtust, mille puhul plasmiidid segavad üksteise replikatsiooni või jaotumist tütarakkudesse ning mille käigus üks plasmiididest kaob rakkudest tavalisest kiiremini, nimetatakse plasmiidide ühtesobimatuseks (*incompatibility*). Selle järgi jaotatakse bakterites esinevad plasmiidid ühtesobimatuse gruppidesse (*Inc group*) ning samasse gruppi kuuluvad plasmiidid ei saa bakterikultuuris stabiilselt koos säilida, kuna neil on sama replikatsiooni kontrollmehhanism ja/või kuna nad jagavad samu jaotumisfunktsioone (ülevaade Snyder and Champers, 1997). Sama replikatsiooni kontrollmehhanismi puhul ei ole üksteisest erisatavad kaks sama replikatsiooni *origin'* iga plasmiidi ning seega võib replitseeruma hakata juhuslikult ükskõik kumb plasmiid. Kuigi rakkudes võib algselt olla mõlemat plasmiidi ühe palju, ei pruugi rakkude jagunemisel enam võrdne arv plasmiide tütarakkudesse sattuda. Seega jääb osadesse rakkudesse ühte plasmiidi vähem kui teist. Pärast rakkude jagunemist replitseeruvad tütarakkudesse sattunud plasmiidid seni, kuni lubatud koopianumber on saavutatud. Arvuliselt vähemuses olev plasmiid ei pruugi rohkem replitseeruda kui teine plasmiid ning seega võib plasmiidide suhe veelgi rohkem tasakaalust välja minna. Järgmise rakkude jagunemise ajal on vähemaarvulisel plasmiidil väiksem võimalus sattuda mõlemasse tütarakku ning seega võib see plasmiid rakkudest kaduda. Samuti võib üks plasmiididest minna rakkudest kaduma juhul, kui mõlemad rakus olevad plasmiidid kasutavad sama jaotumisfunktsiooni (Snyder and Champers, 1997).

EKSPERIMENTAALNE OSA

TÖÖ EESMÄRGID

Varasemalt on meie laboris kirjeldatud viiruseliste elementidega plasmide, mis püsivad eukarüootsetes rakkudes episoomidena (Piirsoo et al., 1996; Silla, 2001). Tüüp 1 veise papilloomiviiruse (BPV1) puhul on sellist episoomina säilimist tagavateks elementideks viiruselised replikatsioonivalgud E1 ja E2 ning replikatsiooni *origin* ja multimeersed E2 valgu seondumiskohad (MME ehk *Minichromosome Maintenance Element*) (Piirsoo et al., 1996). Algseks lühiajaliseks replikatsiooniks piisab E1 ja E2 valgust ning replikatsiooni *origin'* ist; stabiilse säilimise tagamiseks vajaliku segregatsioonimehhanismi tagavad just E2 valk ning MME. Samuti on kirjeldatud hübriidne stabiilselt episoomina säiliv plasmid, mille puhul replikatsiooni tagab hiire polüoomiviiruse (PyV) minimaalne replikatsiooni *origin* ning PyV suur T-antigeen (LT). Kuna PyV on lüütiline viirus, siis selline stabiilset säilimist tagav segregatsioonimehhanism nagu E2 valk ja MME BPV1 puhul, polüoomiviirusel puudub. Hübriidse plasmidi puhul on segregatsioonimehhanismi tagavateks elementideks BPV1 E2 valk ning MME (Silla, 2001). Nendest andmetest tulenevalt sooviti uurida erinevate episomaalselt säilivate DNA viiruste replikatsiooni *origin'* ide ja segregatsioonimehhanismide struktuursete komponentide rolli ja võimalikku koostööd plasmidide stabiilsel episomaalsel säilimisel jagunevates rakkudes.

Selleks püstitati töö eesmärgid:

1. Konstrueerida rakuliin, mis ekspresseeriks PyV LT valku ning Epstein-Barri viiruse (EBV) EBNA1 valku.
2. Uurida, kas PyV replikatsiooni *origin'* i ja EBV stabiilset säilimist tagavat FR-elementi sisaldavad plasmidid on võimelised LT ja EBNA1 valku ekspresseerivas rakuliinis stabiilselt säilima (EBV segregatsioonimehhanism on analoogne BPV1 segregatsioonimehhanismiga).

Järgnevalt sooviti võrrelda omavahel erinevate viiruseliste replikatsiooni ja segregatsiooni tagavate *cis*-elementidega plasmidide säilimist koekultuuri tingimustes. Selleks püstitati töö eesmärgiks:

3. Konstrueerida rakuliin, mis ekspresseeriks konstitutiivselt erinevate viiruseliste *cis*-elementide funktsionaalsuseks vajalikke viiruselisi valke (BPV1 E1 ja E2 valku, PyV LT valku ning EBV EBNA1 valku)
4. Uurida järgnevate replikonide transientset ja stabiilset replikatsiooni konstrueeritud rakuliinis:
 - BPV1 replikatsiooni *origin* + BPV1 säilituselement MME
 - PyV minimaalne replikatsiooni *origin* + BPV1 säilituselement MME
 - PyV minimaalne replikatsiooni *origin* + EBV stabiilseks säilimiseks vajalik FR-element
 - PyV wt *origin* + EBV FR-element
5. Uurida erinevate replikonide koreplikatsiooni ja -segregatsiooni konstrueeritud rakuliinis.

MATERJAL JA METOODIKA

Bakteritüved ja söötmed

Kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α (*supE44 DlacU169 (f80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*). Plasmiidide paljundamiseks kasvatati rakke LB söötmes (10 g/l trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 10 g/l NaCl), kuhu oli lisatud kas ampitsilliini või kanamütsiini lõppkontsentratsioonini vastavalt 100 μ g/ml või 25 μ g/ml.

Rakuliinid ja söötmed

Konstrueeritud plasmiidide replikatsiooni ja stabiilse säilimise analüüsiks kasutati CHO (*Chinese Hamster Ovary cell line*) liinil põhinevat CHO 4.15.5 (ekspresseerib BPV1 E1 ja E2 valke) rakuliini; CHO 4.15.5 rakuliini baasil tehtud 4P11 rakuliini; C127 (*mouse mammary tumor cell line*) rakuliini; Cop5 rakuliini (PyV-ga transformeerunud C127 rakuliini, mis ekspresseerib konstitutiivselt PyV T-antigeene) ja Cop5 baasil tehtud Cop5EBNA1 rakuliini ning valkude ekspressiooni kontrolliks Cos7 (SV40-ga transformeerunud *African Green monkey kidney cell line*) rakuliini. Rakke kasvatati kas Ham's F12 (CHO-põhised rakuliinid) või IMDM (*Iscove* modifitseeritud *Dulbecco* sööde, GibcoBRL, Cat. No 42200-030) (kõigi ülejäänud liinide puhul) söötmes, millele oli lisatud 10 % veise loote seerumit (FCS)(Sebac) ning penitsilliini 100 IU/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml. Katsetes kasutatud rakke inkubeeriti 37 °C ja 5 % CO₂ sisalduse juures.

Plasmiidse DNA eraldamine aluselise lüüsiga (mini- ja midipreparatsioon)

Plasmiidide eraldamiseks kasutati aluse lüüsi meetodit (Janikson, 2002). Plasmiidse DNA paljundamiseks suuremas koguses kasutati *Perfectprep Plasmid Midi Kit*'i (*Eppendorf*) vastavalt tootja protokollile.

DNA agarosgeelist puhastamise meetod

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

Eukarüootsete rakukolooniate subkloneerimine

Selektsiooni all kasvavatest rakkudest tehti 100 mm diameetriga tassile selline lahjendus, et ühe raku ümber moodustuv koloonia ei puutuks kokku naaberkolooniatega. Kui kasvavad rakud olid moodustanud umbes mõnekümnerakulise koloonia, eemaldati plaadilt sööde ning rakukolooniatele asetati trüpsiinis immutatud filterpaberi tükid. Seejärel täideti 10 mm diameetriga kannud 1 ml söötmega, filterpaber suruti pintsettidega õrnalt vastu kolooniat, loputati kannus olevas söötmes ning asetati kannu põhja. Sama korratati kõikide valitud kolooniatega. Sellise meetodiga on võimalik rakuliini tehes kasvatada ülesse ühe raku järglased st. saada samasuguse geneetilise infoga kloonid. Järgmisel päeval pärast pikkimist eemaldati kannudest filterpaberid ja rakkudel lasti kasvada kuni kannud olid umbes 75 % konfluentsed ning rakud külvati edasi 40 mm diameetriga kannudesse. Seejärel kasvatati rakke jälle samasuguse tiheduseni ning külvati edasi 60 mm tassidele. Osa kasvatatud rakkudest analüüsiti kas *Western* või *Southern blot* meetodiga ning osa külmutati säilitamiseks vedelas lämmastikus.

Eukarüootsete rakkude külmutamine

75 % konfluentsetelt tassidelt eemaldati sööde, lisati 2 ml trüpsiini, oodati kuni rakud hakkasid plastiku küljest lahti tulema. Seejärel eemaldati trüpsiin, tass asetati jääle ning rakkudele lisati tilkhaaval külmutussegu (FCS, millele on lisatud 5 % DMSO-d), millega pesti rakud plastiku küljest lahti. Rakud pipeteeriti tassilt külmutusviaali ning viaal asetati tagasi jääle. Edasi asetati rakud temperatuurile – 20 °C, sealt kolme tunni pärast temperatuurile –70 °C ning järgmisel päeval vedelasse lämmastikku.

Transfektsioon

Ühe transfektsiooni jaoks võeti 75 % konfluentsed 100 millimeetrise diameetriga koekultuuri tassid. Rakkudelt eemaldati sööde, lisati 2 ml trüpsiini ning oodati kuni rakud tulid plastiku küljest lahti. Seejärel pipeteeriti trüpsiini ja rakkude segu 50 ml tuubi, kuhu oli eelnevalt lisatud võrreldes trüpsiiniga kolmekordne kogus värsket söödet. Rakud tsentrifuugiti põhja (1000 rpm 5 min. 20 °C *Eppendorf centrifuge* 5810 R), aspireeriti sööde ja resuspendeeriti söötmes, mis sisaldas 5mM Na-BES puhvrit (pH 7.5). Küvetis segati 250 µl rakususpensiooni 50 µg kandja DNA (lõhe või heeringa spermi DNA – *carrier*) ja erineva koguse

plasmiidse DNA-ga (sõltuvalt katsest 200 ng – 2 µg) ning elektroporeeriti kasutades BioRad Gene Pulser II. Kasutatud pinge oli 220 V ja mahtuvus 975 µF C127, Cop5, Cop5EBNA1 ja CHO-põhiste rakkude puhul; 180V ning 975 µF Cos7 puhul. Peale elektroporatsiooni pipeteeriti rakud küvetist 15 ml koekultuuri tuubi, kuhu oli eelnevalt lisatud 2 ml seerumiga söödet. Rakud koguti tsentrifuugides (1000 rpm 5 min. 20 °C-l *Eppendorf centrifuge* 5810 R) ja resuspendeeriti 1 ml söötmes. Valguekspressiooni kontrolliks pipeteeriti rakud 60 millimeetrise diameetriga koekultuuri tassile, kuhu oli eelnevalt lisatud 4 ml söödet. Transientse replikatsiooni analüüsi jaoks jagati rakud võrdselt kahele 60 millimeetrise diameetriga tassile (kaks ajapunkti). Kui lisaks transientsele replikatsioonile sooviti analüüsida ka stabiilset replikatsiooni, jagati rakud pärast transfektsiooni kolmele 60 millimeetrise diameetriga tassile, millest kahte tassi kasutati transientse replikatsiooni analüüsiks ning kolmandale tassile pandi 24 tundi pärast transfektsiooni peale selektiivne sööde (sisaldas sellist antibiootikumi, mille resistentsusmarkeriga plasmiidiga oli rakke transfecteeritud). Cop5-põhiste liinide puhul oli antibiootikumi lõpp-kontsentratsioonid järgnevad – puromütsiin 2,5 µg/ml ning G418 500 µg/ml, CHO-põhistel liinidel puromütsiin 8 µg/ml, G418 510 µg/ml ning hügromütsiin B 300 µg/ml.

Plasmiidide klonimine

Kõikide algplasmiidide ning kloneeritud plasmiidide joonised on toodud lisas.

Plasmiidi pBPEBNA1 klonimine

pBabepuro ja FREBNA1 plasmiide lõigati ensüümidega *EcoRI* ja *Sa/I*. FREBNA1 plasmiidist oli edasiseks klonimiseks vajalik 2550 aluspaari pikkune fragment, pBabepurost 5150 aluspaari pikkune fragment. Kõik kloneerimistes tehtud restriksioonid viidi läbi temperatuuril 37 °C kahe tunni jooksul. pBabepuro restriksioonisegule lisati pool tundi enne reaktsiooni lõppu 1 ühik (U) aluselist fosfataasi (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase* e *CIAP Fermentas*), mis eemaldab DNA 5' otsast fosfaadijäägi. Lõigatud DNA fragmendid lahutati geel-elektroforeesil 0.8 %-lises agarosgeelis ning puhastati, ligeeriti ja transformeeriti kasutades varasemalt kirjeldatud protokolle (Janikson, 2002) *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmiide kontrolliti suuruse järgi kõigepealt agaros-geelelektroforeesil ja seejärel restriksioonanalüüsiga (ensüümiga *PvuI* lõigates pidid tekkima 5664 ja 2036 aluspaari pikkused fragmendid).

Plasmiidi RSVLTRpuro kloneerimine

Plasmiidi pUCRSVLTR lõigati ensüümiga *Bam*HI (lineariseeriv ensüüm) ja plasmiidi pUCPSIN ensüümiga *Hind*III (tekkis edasiseks kloneerimiseks vajalik 1033 bp pikkune fragment). Seejärel tehti mõlemale restriksioonisegule Klenowi töötlus ühe ühiku (U) Klenowi fragmendiga, täitmaks DNA 5' üleulatuvaid kleepuvaid otsi. pUCRSVLTR restriksioonisegule lisati pool tundi enne reaktsiooni lõppu 1 U aluselist fosfataasi. Lõigatud DNA fragmendid lahutati geel-elektroforeesil 0.8 %-lises agarosgeelis ning puhastati, ligeeriti ja transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmiide kontrolliti suuruse järgi kõigepealt agaros-geelektroforeesil ja seejärel restriksioonanalüüsiga (ensüümiga *Xba*I lõigates pidid õige orientatsiooni puhul tekkima 3565 ja 753 aluspaari pikkused fragmendid).

Plasmiidi WTOFRneo kloneerimine

Plasmiidi BskWTOFR lõigati ensüümidega *Not*I ja *Ssp*I ning plasmiidi pBabeneo lõigati ensüümiga *Sal*I. Seejärel tehti pBabeneo restriksioonisegule Klenowi töötlus ning lõigati ensüümiga *Not*I. BskWTOFR plasmiidist oli edasiseks kloneerimiseks vajalik 1696 aluspaari pikkune fragment, pBabeneost 2725 aluspaari pikkune fragment. Lõigatud DNA fragmendid lahutati geel-elektroforeesil 0.8 %-lises agarosgeelis ning puhastati, ligeeriti ja transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmiide kontrolliti suuruse järgi kõigepealt agaros-geelektroforeesil ja seejärel restriksioonanalüüsiga (ensüümiga *Hind*III lõigates pidi tekkima 1362 ja 3059 aluspaari pikkune fragment).

Plasmiidi MOFRneo kloneerimine

Plasmiide pUCMOFR ja WTOFRneo lõigati ensüümidega *Not*I ja *Pvu*I. pUCMOFR plasmiidist oli edasiseks kloneerimiseks vajalik 1074 aluspaari pikkune fragment, WTOFRneo-st 3320 aluspaari pikkune fragment. Lõigatud DNA fragmendid lahutati geel-elektroforeesil 0.8 %-lises agarosgeelis ning puhastati, ligeeriti ja transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmiid kontrolliti suuruse järgi kõigepealt agaros-geelektroforeesil ja seejärel restriksioonanalüüsiga (ensüümiga *Hind*III lõigates pidid tekkima 275, 956 ja 3169 aluspaari pikkused fragmendid).

Plasmiidi WTOFRpuro kloneerimine

Plasmiidi WTOFRneo lõigati ensüümidega *Asp718* ja *Asel* (tekkis edasiseks kloneerimiseks vajalik 1112 bp pikkune fragment) ning plasmiidi RSVLTRpuro ensüümiga *Asp718* (lineariseeriv ensüüm). Seejärel tehti mõlemale restriktsoonisegule Klenowi töötlus ning RSVLTRpuro restriktsoonisegule lisati pool tundi enne reaktsiooni lõppu 1 U aluselist fosfataasi. Lõigatud DNA fragmendid lahutati geel-elektrofooresil 0.8 %-lises agarosgeelis ning puhastati, ligeeriti ja transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmiid kontrolliti suuruse järgi kõigepealt agaros-geelelektrofooresil ja seejärel restriktsoonianalüüsiga (ensüümiga *HindIII* lõigates pidi tekkima sõltuvalt WTOFR fragmendi orientatsioonist kas 3033 ja 2528 aluspaari või 3504 ja 2057 bp pikkune fragment). Edasi kasutusel saadud plasmiididest esimene variant.

Plasmiidi MOMMEpuro kloneerimine

Plasmiidi MOMMEneo lõigati ensüümidega *HindIII* ja *BamHI* (tekkis edasiseks kloneerimiseks vajalik 457 bp pikkune fragment) ning plasmiidi RSVLTRpuro ensüümiga *Asp718* (lineariseeriv ensüüm). Seejärel tehti mõlemale restriktsoonisegule Klenowi töötlus ning RSVLTRpuro reaktsioonisegusse lisati pool tundi enne reaktsiooni lõppu 1 U aluselist fosfataasi. Lõigatud DNA fragmendid lahutati geel-elektrofooresil 0.8 %-lises agarosgeelis ning puhastati, ligeeriti ja transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmiid kontrolliti restriktsoonianalüüsiga (ensüümiga *EcoRI* lõigates pidid tekkima 1647 ja 3136 aluspaari pikkused fragmendid).

Plasmiidi pCGmLT konstrueerimine

Selleks, et deleteerida PyV suure T-antigeeni (LT) valgu retinoblastoomi valguga (Rb) seondumise domeen, kasutati PCR meetodit. pCGLT plasmiidilt amplifitseeriti mõlemalt poolt RB valguga seondumise domeeni LT järjestus. RB valguga seondumise domeeni poolses osas kasutati praimereid, mille otstesse oli disainitud *SpeI* ensüümi lõikamiskoht (RBUP 5' GTT ACT AGT GGG TTG CTC AGA AGA CTC 3'; RBDOWN 5' CCA CTA GTA ACC CGA GTT CTC CAA CAG 3', milles *SpeI* lõikamiskoht on tähistatud allajoonitult). LT valku kodeeriva järjestuse 5' osa amplifitseerimiseks kasutati praimerit pCGseq2 (5' GGG ACC GAT CCA GCC TCC 3') ning 3' osa jaoks kasutati praimerit LTsaba (5' TGA GTG ATG CAA ACT GGT CAC GAA CCT CCT TCA C 3'). Praimerite sidumiseks kasutati 30 sekundit

temperatuuri 53 °C, elongatsiooniaeg oli 3 minutit temperatuuril 72 °C ning tsükleid korrati 25 korda. PCR reaktsiooni tegemisel kasutati *Pfu* polümeraasi (*Fermentas*). Puhastatud PCR-i produkte lõigati *SpeI* ensüümiga 16 tundi temperatuuril 37 °C, lahutati geel-elektroforeesil 1 %-lises agarosgeelis, puhastati ja ligeeriti 20 µl-is 16 tundi temperatuuril 18 °C. Seejärel lisati ligatsiooni segusse 4 µl 10x O⁺ puhvrit, 10 U *Bst*1107I ensüümi ning reaktsioonisegu ruumala viidi ddH₂O-ga 40 µl-ni. Restriktsioon toimus 2 tundi temperatuuril 37 °C ning seejärel lahutati DNA geel-elektroforeesil 1 %-lises agarosgeelis. Lisaks lõigati plasmidi pCGLT ensüümiga *Bst*1107I, reaktsiooni segusse lisati pool tundi enne reaktsiooni lõppu 1 U aluselist fosfataasi. Geelist puhastati mLT puhul 717 bp ja pCGLT puhul 6045 bp pikkune fragment, mis ligeeriti ja transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmidid kontrolliti restriktsioonanalüüsiga (ensüüm *SpeI* lõigab ainult pCGmLT plasmidi, ensüümiga *Ec*/136II lõigates pidi tekkima õige orientatsiooni puhul 6190 ja 953 aluspaari pikkune fragment). Kloneerimise käigus eemaldati LT valgust 12 aminohappe koodonid, lisaks tekkis kahe aminohappe koodon (*SpeI* ensüümi lõikamiskoha nukleotiididest)

Plasmidi MOFRneoHcred1 kloneerimine

Plasmidi MOFRneo lõigati ensüümiga *VspI* ning plasmidi RSVLTRhcred1 lõigati ensüümidega *VspI* ja *NdeI*. RSVLTRhcred1 restriktsioonisegule lisati pool tundi enne reaktsiooni lõppu 1 U aluselist fosfataasi. MOFRneo plasmidist oli edasiseks kloneerimiseks vajalik 4400 aluspaari pikkune fragment, RSVLTRhcred1-st 1939 aluspaari pikkune fragment. Lõigatud DNA fragmendid lahutati geel-elektroforeesil 0.8 %-lises agarosgeelis ning puhastati, ligeeriti ja transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmidid kontrolliti suuruse järgi kõigepealt agaros-geelelektroforeesil ja seejärel restriktsioonanalüüsiga (ensüümiga *HindIII* lõigates pidid tekkima kas 605, 1357, 1831 ja 4260 aluspaari või 945, 1357, 1831 ja 3920 aluspaari pikkused fragmendid).

Plasmidi MOFRpurod1EGFP kloneerimine

Plasmidi pUCMOFR lõigati ensüümidega *Ec*/136II ja *EheI* ning plasmidi RSVLTRpurod1EGFP lõigati ensüümiga *NdeI*. Seejärel tehti RSVLTRpurod1EGFP restriktsioonisegule Klenowi töötlus ning pool tundi enne reaktsiooni lõppu lisati 1 U aluselist fosfataasi. pUCMOFR plasmidist oli edasiseks kloneerimiseks vajalik 1135 aluspaari pikkune fragment, RSVLTRpurod1EGFP-st 6937 aluspaari pikkune

fragment. Lõigatud DNA fragmendid lahutati geel-elektroforeesil 0.8 %-lises agarosgeelis ning puhastati, ligeeriti ja transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmiid kontrolliti suuruse järgi kõigepealt agaros-geelektroforeesil ja seejärel restriksioonanalüüsiga (ensüümiga *HindIII* lõigates pidid tekkima kas 275, 913, 1357, 1831 ja 3696 aluspaari või 275, 381, 1357, 1831 ja 4228 aluspaari pikkused fragmendid).

Plasmiidi WTOFRneoHcred1 kloneerimine

Plasmiidi RSVLTRhcred1 lõigati ensüümiga *PvuII* ning plasmiidi WTOFRneo lõigati ensüümiga *VspI*. Seejärel tehti WTOFRneo restriksioonisegule Klenowi töötlus ning pool tundi enne reaktsiooni lõppu lisati 1 U aluselist fosfataasi. RSVLTRhcred1 plasmiidist oli edasiseks kloneerimiseks vajalik 1868 aluspaari pikkune fragment, WTOFRneost 3914 aluspaari pikkune fragment. Lõigatud DNA fragmendid lahutati geel-elektroforeesil 0.8 %-lises agarosgeelis ning puhastati, ligeeriti ja transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmiid kontrolliti suuruse järgi kõigepealt agaros-geelektroforeesil ja seejärel restriksioonanalüüsiga (ensüümiga *HindIII* lõigates pidid tekkima sõltuvalt Hcred1 valgu ekspressioonikasseti orientatsioonist kas 741, 2536 ja 2503 või 741, 821 ja 4218 aluspaari pikkused fragmendid). Edasistes katsetes kasutati esimest varianti.

Plasmiidi WTOFRpurod1EGFP kloneerimine

Plasmiidi WTOFRpuro lõigati ensüümiga *EcoRI* ning plasmiidi RSVLTRpurod1EGFP lõigati ensüümiga *NdeI*. Seejärel tehti RSVLTRpurod1EGFP restriksioonisegule Klenowi töötlus ning pool tundi enne reaktsiooni lõppu lisati 1 U aluselist fosfataasi. WTOFRpuro plasmiidist oli edasiseks kloneerimiseks vajalik 1485 aluspaari pikkune fragment, RSVLTRpurod1EGFP-st 6937 aluspaari pikkune fragment. Lõigatud DNA fragmendid lahutati geel-elektroforeesil 0.8 %-lises agarosgeelis ning puhastati, ligeeriti ja transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmiid kontrolliti suuruse järgi kõigepealt agaros-geelektroforeesil ja seejärel restriksioonanalüüsiga (ensüümiga *HindIII* lõigates pidid tekkima kas 609, 1357, 1831 ja 4625 aluspaari või 1310, 1357, 1831 ja 3924 aluspaari pikkused fragmendid).

Plasmiidi MOMMEpurod1EGFP klonimine

Plasmiidi pUCMOMME lõigati ensüümidega *NdeI* ja *VspI* ning plasmiidi RSVLTRpurod1EGFP lõigati ensüümiga *NdeI*. RSVLTRpurod1EGFP restriksioonisegule lisati pool tundi enne reaktsiooni lõppu 1 U aluselist fosfataasi. pUCMOMME plasmiidist oli edasiseks klonimiseks vajalik 803 aluspaari pikkune fragment, RSVLTRpurod1EGFP plasmiidist 6935 aluspaari pikkune fragment. Lõigatud DNA fragmendid lahutati geel-elektroforeesil 0.8 %-lises agarosgeelis ning puhastati, ligeeriti ja transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmiid kontrolliti suuruse järgi kõigepealt agaros-geelektroforeesil ja seejärel restriksioonanalüüsiga (ensüümiga *HindIII* lõigates pidid tekkima kas 803, 1357, 1831 ja 3747 aluspaari või 432, 1357, 1831 ja 4118 aluspaari pikkused fragmendid).

Plasmiidi URRHcred1 klonimine

Plasmiidi RSVLTRhcred1 lõigati ensüümiga *PvuII* ning plasmiidi pNeoBgl40 lõigati ensüümiga *SspI*. pNeoBgl40 restriksioonisegule lisati pool tundi enne reaktsiooni lõppu 1 U aluselist fosfataasi. RSVLTRhcred1 plasmiidist oli edasiseks klonimiseks vajalik 1868 aluspaari pikkune fragment, pNeoBgl40-st 6430 aluspaari pikkune fragment. Lõigatud DNA fragmendid lahutati geel-elektroforeesil 0.8 %-lises agarosgeelis ning puhastati, ligeeriti ja transformeeriti *E. coli* tüvesse DH5a. Saadud plasmiid kontrolliti suuruse järgi kõigepealt agaros-geelektroforeesil ja seejärel restriksioonanalüüsiga (ensüümiga *HindIII* lõigates pidid tekkima sõltuvalt Hcred1 valgu ekspressioonikasseti orientatsioonist kas 2502 ja 5796 või 4184 ja 4114 aluspaari pikkused fragmendid). Edasistes katsetes kasutati teist varianti.

Rakuliinide tegemine

Cop5EBNA1 liini tegemine

Plasmiid pBPEBNA1 (1,2 µg) lineariseeriti ensüümiga *NotI* ning restrikteeritud DNA puhastati fenool-töötlustega. Selleks viidi restriksioonisegu ruumala ddH₂O-ga 100 µl-ni, millele lisati 100 µl fenool:kloroformi (1:1). Lahust segati vortexiga ning tsentrifuugiti lauatsentrifuugiga 13 000 rpm 2 minutit. Vesifaas tõsteti uude tuubi, kus DNA sadestati 3 µl 5M NaCl ja 250 µl 96%-lise etanooliga (30 minutit – 20 °C). Seejärel tsentrifuugiti lahust 15 minutit 13 000 rpm (4 °C), vedelik

aspireeriti ning DNA sadet pesti 200 µl 70%-lise etanooliga. Tsentrifuugimist korrati 7 minutit 13 000 rpm-i (4 °C), etanool aspireeriti ning DNA sadet kuivatati temperatuuril 37 °C 5 minutit. Seejärel lahustati DNA 10 µl ddH₂O-s ning lahust inkubeeriti 5 minutit temperatuuril 37 °C. Saadud DNA lahusega transfecteeriti Cop5 rakke nagu kirjeldatud transfectiooni protokollis. Negatiivseks kontrolliks kasutati ainult kandja-DNAGA (*carrier*) transfecteeritud rakke. 24 tundi pärast transfectiooni pandi rakkudele peale selektiivne sööde (puromütsiini lõpp-kontsentratsioon oli söötmes 2,5 µg/ml). Puromütsiini juuresolekul said kasvada ainult sellised rakud, mille kromosoomi oli integreerunud puromütsiini resistentsusmarkeri ekspressioonikassett ning mis sisaldas EBNA1 valgu ekspressioonikasseti. Kümme päeva pärast selektsiooniga söötme lisamist pikiti pBPEBNA1 plasmiidiga transfecteeritud rakkude plaadilt 10 kolooniat. Saadud kloonid kontrolliti *Western blot* meetodi abil.

4P11 rakuliini tegemine

Plasmiid pCGmLT lineariseeriti ensüümiga *Xho*I, plasmiid pBabehügro ensüümiga *Sal*I ning FREBNA1 lõigati ensüümidega *Xho*I ja *Bst*1107I (geelist puhastati 4177 aluspaari pikkune fragment, mis sisaldas EBNA1 valgu ekspressioonikasseti). Restriksioonisegudele (v.a. FREBNA1 plasmidi puhul, mis puhastati geelist) tehti fenooltöötlus ja lineariseeritud DNA-d sadestati nagu eelnevalt kirjeldatud. DNA-d lahustati 10 µl ddH₂O-s ning segati kokku ligatsioonisegu, millesse võeti lineariseeritud plasmide ning puhastatud ekspressioonikasseti (pCGmLT:pBabehügro:EBNA1) molaarses suhtes 10:1:10 (DNA lõpp-kontsentratsioon ligatsiooni segus oli 0,5 µg/µl). Ligatsioon toimus kahe ühiku T4 DNA ligaasiga (*Fermentas*) 20 µl 16 tundi temperatuuril 18 °C. Ligatsioonisegule tehti fenooltöötlus ja DNA sadestamine nagu eelnevalt kirjeldatud ning DNA lahustati 10 µl-is ddH₂O-s. Saadud DNA lahusega transfecteeriti CHO 4.15.5 rakke nagu kirjeldatud transfectiooni protokollis ning 24 tundi pärast transfectiooni pandi rakkudele peale selektiivne sööde, mis sisaldas hügromütsiin B lõpp-kontsentratsiooniga 300 µg/ml. Hügromütsiin B juuresolekul said kasvada ainult sellised rakud, mille kromosoomi oli integreerunud hügromütsiini resistentsusmarkeri ekspressioonikassett ning mis eeldatavalt sisaldas ka mLT ja EBNA1 valgu ekspressioonikasseti. 17 päeva pärast pikiti 33 kolooniat, milles hiljem analüüsiti *Southern blot* meetodil mLT, EBNA1 ning E1 ja E2 valkude funktsionaalsust.

Denatureeritud PyV LT, PyV mLT ja EBV EBNA-1 valkude detekteerimine Western blot meetodil

Cos7 rakud tranfekteeriti nagu eelpool kirjeldatud ning lüüsi 48 tundi pärast transfektsiooni 100 µl Laemmli puhvris (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2 % SDS, 0.1 % broomfenool sinine, 10 % glütserool), konstitutiivselt uuritavaid valke ekspresseerivate rakuliinide puhul lüüsi 75 % konfluentsed tassid. Lüsaati kuumutati temperatuuril 96 °C 10 minutit, valgud lahutati 8 % SDS-polüakrüülamiid geelis (Sambrook, J. and Russell, D. W., 2001) ning kanti üle PVDF filtrile (Millipore Immobilon™ -P 0.45µm). Ülekanne toimus pingel 15 V 45 min jooksul poolkuiva ülekandeaparaadiga (*Bio-Rad Instruments*) SD puhvris (39 mM glütsiin, 48 mM Tris alus, 0.037 % SDS, 20 % etanool). Järgnevalt teostati *Western blot* eelnevalt kirjeldatud meetodil (Janikson, 2002). Primaarsete antikehadena, kasutati PyV LT valgu detekteerimiseks F4 ja F5 antikehasid (Pallas et al., 1986) ning EBV EBNA-1 valgu jaoks BM3167 ja BM1083 antikehasid (DPC Biermann). Primaarse antikeha lõpp-kontsentratsioon inkubatsioonilahuses oli 1 µg/ml. Sekundaarse antikehana kasutati peroksüdaasiga konjugeeritud hiire IgG vastast antikeha (LabAS Ltd., Tartu, Estonia, lahjendusega 1:8000) ning signaal detekteeriti kasutades ECL™ *Western Blotting Detection Kit*'i reagente (Amersham Pharmacia Biotech).

Transientse replikatsiooni analüüs

Transfekteeritud rakkudest eraldati 48 ja 72 tundi pärast transfektsiooni episomaalne DNA kasutades aluselise lüüsi meetodit, DNA lahustati 20 µl ddH₂O-s (Janikson, 2002). Igast proovist võeti edasisele analüüsile 10 µl, mida lõigati uuritavat plasmidi lineariseeriva ensüümiga (või analüüsi jaoks sobilikeks fragmentideks lõikava ensüümiga) ja *DpnI* ensüümiga, mis lõikab ainult bakteriaalse päritoluga DNAd. Restriktsioon kestis 16 tundi temperatuuril 37 °C. DNA lahutati geel-elektroforeesil 0.8 %-lises agarosgeelis ning seejärel denatureeriti loksutades geeli denatureerivas lahuses (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 45 minutit ja neutraliseerivas lahuses (1 M Tris pH 7.4, 1.5 M NaCl) 10 minutit. DNA ülekanne filtrile toimus 10xSSC puhvriga (1.5 M NaCl, 0.15 M Na-atsetaat) üleöö toatemperatuuril, kasutades kapillaarset ülekannet. DNA ristsidumine filtrile toimus kasutades UV-d. Filter asetati hübridisatsioonitorusse ning pandi koos pre-hübridisatsiooni lahusega (10 ml-is lahuses: 20x SSC 3 ml, 50x Denhardt (1% Ficoll 400, 1% polüvinüülpürrolidoon, 1% veise seerumi albumiin (FractionV, Sigma) 1 ml, 10% SDS 0.5 ml, H₂O 5.3 ml ja 2000 µg denatureeritud kandja-DNA) pooleks tunniks 65 °C juurde. Hübridiseerimisel kasutatud spetsiifiline

kaheaheelaline DNA proov sünteesiti kasutades templina 150 ng lineariseeritud plasmidi, mille replikatsiooni sooviti jälgida; märkimiseks kasutati *Fermentas DecaLabel DNA Labeling Kit*'i ja $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Du Pont NEN). Vahetult enne hübridiseerimist denatureeriti proov 6 min jooksul temperatuuril 100 °C. Hübridisatsioon kestis 16 tundi temperatuuril 65 °C, seejärel pesti filtrit samuti 65 °C 3x20 minutit esimese pesulahusega (2x SSC, 0.1 % SDS) ning 3x20 min teise pesulahusega (0.2xSSC, 0.1 % SDS). Filter kuivatati toatemperatuuril ning hübridiseerunud DNA detekteeriti eksponeerides filtrit röntgenfilmile. Markeriks kasutati 50-300 pg sellist restrikteeritud DNAd, mille replikatsiooni sooviti uurida (restrikteeriti sama ensüümiga, millega lõigati ka episomaalset analüüsitavat DNAd).

Stabiilse replikatsiooni analüüs

Selekteeritud rakkudest eraldati episomaalne DNA, mille analüüs teostati nagu eelnevalt kirjeldatud (vt. Transientse replikatsiooni analüüs).

Fluorestseeruvate markerite ekspressiooni analüüs erinevate replikonidega transfekteeeritud 4P11 rakkudes

Kõikidele konstrueeritud plasmiididele on lisatud kas, d1EGFP või Hcred1 ekspressioonikassett ning vastavate valkude ekspresseerumist rakkudes jälgiti kasutades läbivoolu tsütomeetria meetodit (Becton-Dickinson FACSCalibur süsteemiga). Rakkudelt eemaldati sööde, lisati 700 µl trüpsiini ning oodati kuni rakud tulid plastiku küljest lahti. Seejärel pipeteeriti trüpsiini ja rakkude segu *eppendorf* tuubi, kuhu oli eelnevalt lisatud 100 µl seerumit (FCS) ning proovid asetati kuni mõõtmiseni jääle. Erinevate replikonidega transfekteeeritud ning kaks nädalat selektsiooni all kasvatatud 4P11 rakke võrreldi transfekteeerimata 4P11 rakuliiniga, et teha kindlaks, kui suur osa transfekteeeritud rakkudest ekspresseerib fluorestseeruvat markerit. Analüüsil loeti igast proovist 50 000 rakku. Seejärel eemaldati osadelt rakkudelt selektsioon (kahe replikoniga transfekteeeritud rakkude puhul ka selliselt, et kahest antibiootikumist eemaldati üks, teine jäi söötmesse alles) ning vaadeldi, kuidas muutub ajas fluorestseeruvate markerite ekspressioon.

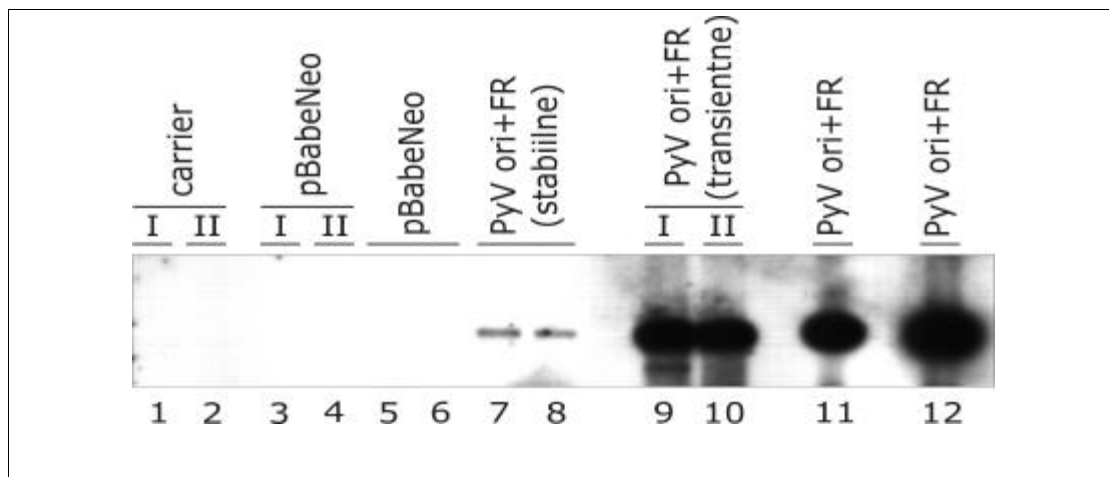
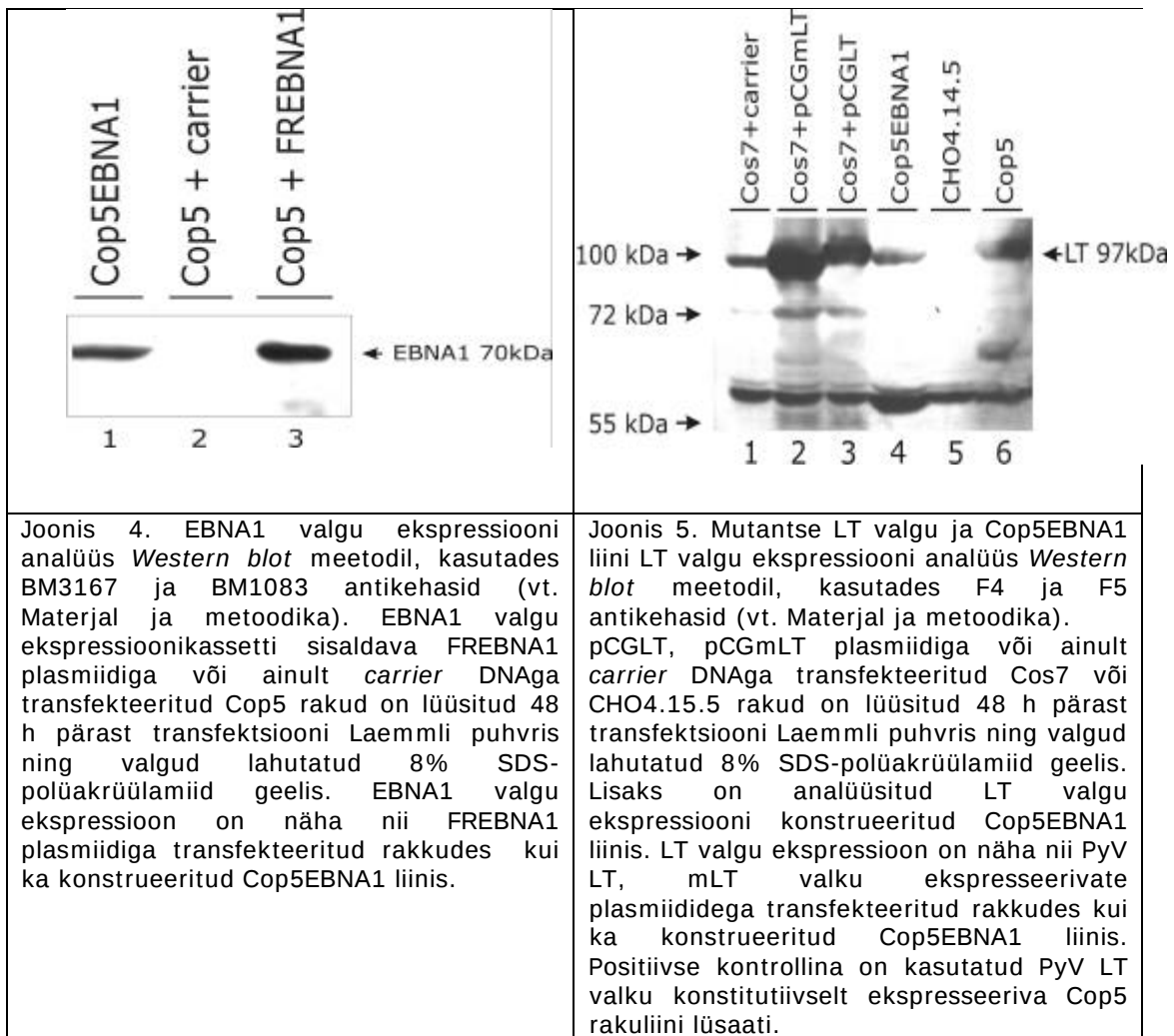
TULEMUSED

PyV LT ja EBV EBNA1 valgu ekspresseeriva rakuliini tegemine

Uurimaks hiire polüoomiviiruse (PyV) replikatsiooni *origin'* i ja Epstein-Barr viiruse (EBV) stabiilset säilimist tagava FR-elementiga plasmiidide replikatsiooni ja episomaalset säilimist koekultuuri tingimustes, konstrueeriti rakuliin, mis ekspresseeriks PyV *origin'* i ja FR-elementi funktsionaalsuseks vajalikke viiruselisi valke – PyV LT ja EBV EBNA1 valgu (vt. Materjal ja metoodika). Näitamaks, et konstrueeritud rakuliin ekspresseerib nii PyV LT valgu kui ka EBV EBNA1 valgu kasutati *Western blot* meetodit (vt. Materjal ja metoodika). EBNA1 valgu ekspressiooni kontrolliks Cop5EBNA1 liinis kasutati positiivse kontrollina 1 µg EBNA1 valgu ekspresseeriva plasmiidiga (FREBNA1) transfekteeeritud Cop5 rakke ning negatiivse kontrollina 50 µg *carrier* DNAGA transfekteeeritud Cop5 liini rakke. EBV EBNA1 valgu (70 kDa) ekspressioon detekteeriti nii FREBNA1 plasmiidiga transfekteeeritud rakkudes kui ka Cop5EBNA1 liini rakkudes (joonis 4). LT valgu ekspressiooni positiivse kontrollina kasutati algset Cop5 (ekspresseerib konstitutiivselt vaid PyV LT valgu) rakke. Negatiivse kontrollina kasutati CHO4.15.5 rakke. PyV LT valgu (97kDa) ekspressiooni detekteeriti nii konstrueeritud Cop5EBNA1 liinis kui ka algse Cop5 liini rakkudes (joonis 5).

PyV replikatsiooni *origin'* i ja FR-elementi sisaldava plasmidi (WTOFRneo) säilimine konstitutiivselt EBV EBNA1 ja PyV LT valgu ekspresseerivas Cop5EBNA1 rakuliinis

Uurimaks PyV replikatsiooni *origin'* i ja FR-elementi sisaldavate plasmiidide replikatsiooni ja episomaalset säilimist transfekteeeriti Cop5EBNA1 rakuliini 500 ng PyV wt replikatsiooni *origin'* i ja EBV FR-elementi sisaldava WTOFRneo plasmiidiga. Negatiivse kontrollina kasutati ainult *carrier* DNAGA transfekteeeritud ning pBabeNeo (sisaldab antibiootikum G418 resistentsusmarkerit) plasmiidiga transfekteeeritud rakke. Transfekteeeritud rakud jagati kolmele 60 mm koekultuuri tassile, milledest kaks kasutati transientse replikatsiooni analüüsiks ning kolmas jäi stabiilse replikatsiooni analüüsiks (vt. Materjal ja metoodika). Transfekteeeritud rakkudest eraldati 48 ja 72 tundi pärast transfektsiooni episomaalne DNA (I ja II ajapunkt joonisel 6) kasutades aluselise lüüsi meetodit (vt. Materjal ja metoodika). Igast proovist võeti edasisele analüüsile pool eraldatud episomaalsest DNAST.



Joonis 6. Plasmidi WTFRneo transientse ja stabiilse replikatsiooni analüüs *Southern blot* meetodil Cop5EBNA1 rakuliinis. Episomaalne DNA on eraldatud transientse katse puhul 48 ja 72 tundi pärast transfectsiooni (joonisel vastavalt tähistatud I ja II), stabiilse katse puhul kolm nädalat pärast transfectsiooni. Eraldatud DNA on lõigatud ensüümidega *DpnI* ja *HindIII*, lahutatud geel-elektroforeesil, kantud filtrile ning hüdrideeritud radioaktiivselt märgitud WTFRneo prooviga. WTFRneo plasmidi replitseerub Cop5EBNA1 liinis transientset (rajad 9 ja 10) ning episomaalne replikatsioonisignaali on detekteeritav ka kolm nädalat pärast transfectsiooni (rajad 7 ja 8). Negatiivse kontrollina on kasutatud *carrier* DNA ja pBabeneo plasmiidiga (sisaldab G418 resistentsusmarkerit) transfecteeritud rakke, milles mingisugust replikatsioonisignaali ei esine (rajad 1-6). Markeriteks on 300 pg ja 600 pg WTFRneo plasmidi, mis on lineariseeritud ensüümiga *HindIII* (rajad 11 ja 12).

Kolmandale tassile pandi 48 tundi pärast transfektsiooni peale selektiivne sööde, mis sisaldas G418 antibiootikumi. Järgnevalt kasvatati selektsiooni all olevaid rakke kuni saavutati 80 % konfluentsed tassid (umbes kolm nädalat), seejärel eemaldati rakkudelt selektiivne sööde, rakud külvati 100 mm koekultuuritassile ning kasvatati 24 tundi tavalises IMDM söötmes. Selektiooni all kasvanud rakkudest eraldati episomaalne DNA, mida analüüsiti *Southern blot* meetodil (vt. Materjal ja metoodika). Episomaalne DNA lõigati ensüümidega *DpnI* ja *HindIII* (lineariseeriv ensüüm) ning teostati *Southern blot* analüüs (vt. Materjal ja metoodika). Markeritena kasutati foreesil 300 pg ja 600 pg ensüümiga *HindIII* lineariseeritud WTOFRneo plasmidi. Replikatsioonikatse tulemus on toodud joonisel 6 ning sellel on näha, et PyV origini ja FR-elementi sisaldav plasmid WTOFRneo replitseerub konstrueeritud Cop5EBNA1 liinis nii transientselt kui ka stabiilselt.

BPV1 E1 ja E2, PyV LT ja EBV EBNA1 valke ekspresseeriva rakuliini tegemine

Uurimaks erinevatel viiruselistel elementidel põhinevate plasmiidide replikatsiooni- ja segregatsioonifunktsiooni, konstrueeriti rakuliin, mis ekspresseeriks:

1. BPV1 replikatsiooni *origin'* i ja MME säilituselemendi funktsionaalsuseks vajalikke E1 ja E2 valke,
2. PyV replikatsiooni *origin'* i funktsionaalsuseks vajalikku LT valku ning
3. EBV stabiilset säilimist tagava FR-elementi funktsionaalsuse tagamiseks vajalikku EBNA1 valku.

Vastava rakuliini tegemisel võeti aluseks CHO4.15.5 rakuliin, mis ekspresseerib konstitutiivselt BPV1 E1 ja E2 valku. Esmalt prooviti LT valku ekspresseerivat rakuliini teha pCGLT konstruktiga, millelt transkribeeritakse LT valgu sünteesiks vajalik RNA tugeva CMV (tsütomegaloviirus) promootori alt (vt. Materjal ja metoodika). Kõiki saadud kloone transfekteeriti 500 ng pUCPyVWTO plasmiidiga (sisaldab PyV *origin'* i) ning juhul kui LT valk ekspresseerub rakkudes, oleks pidanud selline plasmid replitseeruma. Analüüsi tulemusel ei õnnestunud detekteerida LT valgu ekspressiooni üheski kloonis (analüüsiti 20 kloon). Seejärel vahetati pCGLT konstrukti tugev CMV promootor nõrgema RSV (Rous sarkoomi viirus) LTR promootori vastu, kuid ka selliselt ei õnnestunud saada ühtegi LT valku ekspresseerivat kloon (analüüsiti sarnaselt eelnevalt kirjeldatud katsega 20 kloon). Varasemast on kirjanduse põhjal teada, et PyV LT valgu interakteerumine rakulise Rb valguga võib põhjustada rakkude apoptoosi (Sheng et al., 2000) ning

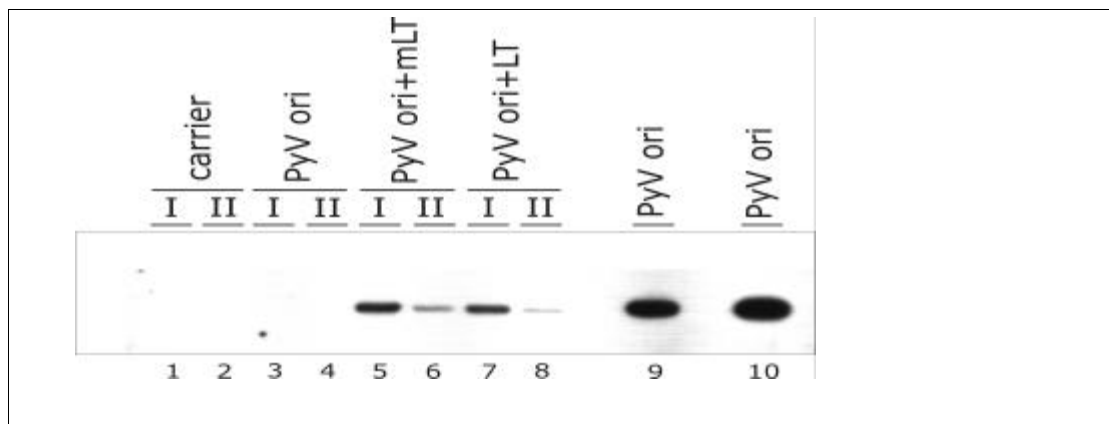
et Rb valguga seostumise domeeni deleteerimine LT valgust ei riku LT valgu võimet toetada PyV *origin'* i replikatsiooni (Soderbarg and Magnusson, 1993). Sellest lähtuvalt konstrueeriti selline mutantne LT valk, milles Rb valguga seostumise domeen on deleteeritud (vt. Materjal ja meetodika).

Mutantse LT valgu ekspressiooni kontroll *Western blot* meetodiga

Mutantse LT valgu (mLT) ekspressiooni analüüsiks kasutati *Western blot* meetodit (vt. Materjal ja meetodika). Cos7 rakke transfekteeeriti nii 500 ng pCGmLT kui ka 500 ng pCGLT plasmiidiga, negatiivse kontrollina kasutati 50 µg *carrier* DNAGA transfekteeeritud Cos7 ja CHO4.15.5 rakke ning positiivse kontrollina Cop5 liini (ekspresseerib konstitutiivselt PyV LT valku) rakke. PyV LT valgu (97kDa) ekspressiooni detekteeriti nii pCGLT plasmiidiga transfekteeeritud rakkudes kui ka Cop5 liini rakkudes, samuti detekteeriti 10 aminohappe võrra lühema mLT valgu ekspressioon pCGmLT plasmiidiga transfekteeeritud rakkudes (joonis 5). Samal kõrgusel LT ja mLT valguga on Cos7 rakkudes ka tundmatu mittespetsiifilise valgu signaal, kuid sellele vaatamata on näha LT ja mLT valkude ekspressioon (madalamal olevad mittespetsiifilised signaalid on kõikidel radadel enam-vähem võrdsed, LT ja mLT valgu kõrgusel olevav signaal on aga *carrier'* iga transfekteeeritud Cos7 rakkudes hoopis nõrgem) (joonis 5).

Mutantse LT valgu funktsionaalsus replikatsioonikatses

Selleks, et teha kindlaks, kas sellise Rb-domeeni deletsiooniga mLT valk toetab PyV *origin'* iga plasmidi replikatsiooni, tehti transientse replikatsiooni katse C127 rakuliinis (vt. Materjal ja meetodika). Selleks kotransfekteeeriti C127 rakuliini 100 ng pUCPyVWTO plasmidi (sisaldab PyV replikatsiooni *origin'* i) ja 500 ng pCGmLT plasmidi (sisaldab mLT valgu ekspressioonikasseti). Positiivse kontrollina kasutati 100 ng pUCPyVWTO plasmidi ja 500 ng pCGLT plasmidi (sisaldab wt LT valgu ekspressioonikasseti) kotransfektsiooni ja negatiivse kontrollina ainult 100 ng pUCPyVWTO plasmidi ning ainult *carrier* DNAd. Transfekteeeritud rakkudest eraldati 48 ja 72 tundi pärast transfektsiooni episomaalne DNA, mis lõigati ensüümidega *DpnI* ja *HindIII* (lineariseeriv ensüüm) ning teostati *Southern blot* analüüs (vt. Materjal ja meetodika). Markeritena kasutati foreesil 200 pg ja 400 pg plasmidi pUCPyVWTO, mis oli lineariseeritud ensüümiga *HindIII*. Replikatsioonikatse tulemus on toodud joonisel 7 ning kinnitab, et mLT valk töötab replikatsioonis samaväärselt wt LT valguga.



Joonis 7. Transientse replikatsiooni analüüs *Southern blot* meetodil C127 rakuliinis. Episomaalne DNA on eraldatud 48 ja 72 tundi pärast transfektsiooni (joonisel vastavalt tähistatud ajapunktid I ja II), lõigatud ensüümidega *DpnI* ja *HindIII* ning hübridiseeritud radioaktiivselt märgitud pUCPyVWTO prooviga. PyVWTO replikatsiooni *origin'* i sisaldav plasmid (pUCPyVWTO) replitseerub samaväärselt nii pCGLT kui ka pCGmLT plasmidi lisamisel, mis tõestab, et mutantse LT valgu funktsionaalsus replikatsiooni toetamisel pole häiritud. Negatiivse kontrollina on ainult pUCPyVWTO plasmidiga transfektsioon rakud, milles mingisugust replikatsioonisignaali ei esine. Markeriteks on 200 pg ja 400 pg pUCPyVWTO plasmidi, mis on lineariseeritud ensüümiga *HindIII*.

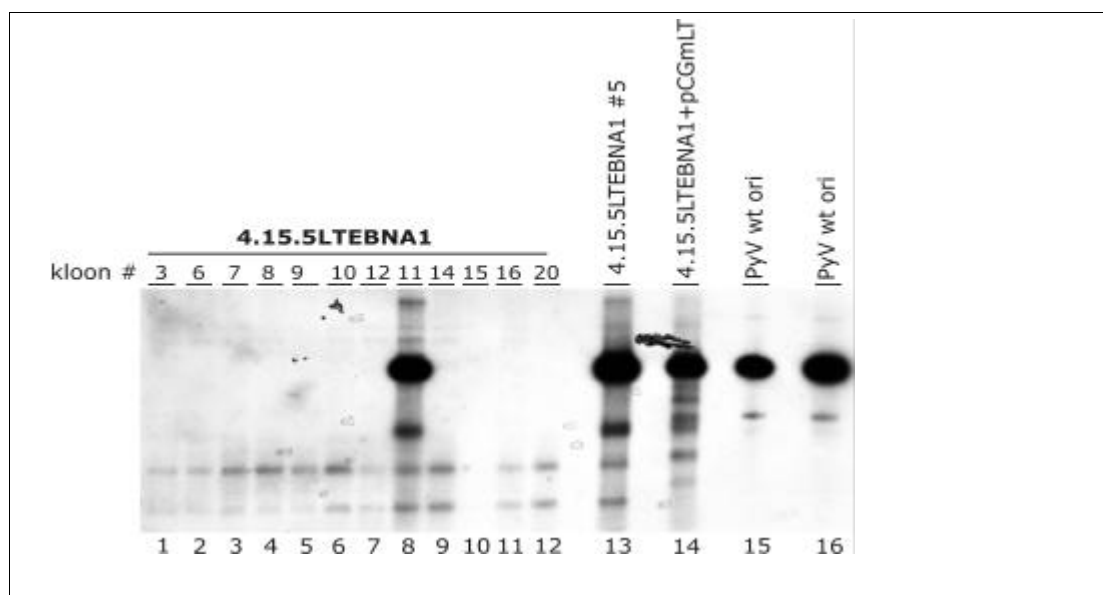
BPV1 E1 ja E2 valke, EBV EBNA1 valku ja PyV mLT valku ekspresseeriva rakuliini konstrueerimine ja analüüs

Rakuliini tegemiseks kasutati mLT ja EBNA1 ekspressioonikassette sisaldavaid plasmide ning hügromütsiini resistentsusmarkerit sisaldavat plasmidi (vt. Materjal ja meetodika). Rakuliini tegemisel võeti aluseks BPV1 E1 ja E2 valke konstitutiivselt ekspresseeriv CHO4.15.5 rakuliin. Hügromütsiini juuresolekul kasvavad ainult need rakud, mille kromosoomi on integreerunud resistentsusmarkeri ekspressioonikassett ning eeldatavalt sisaldavad sellised rakud ka mLT ja EBNA1 valgu ekspressioonikassetti. Tekkinud rakukolooniatest kasvatati ülesse 33 kloon, milles analüüsiti *Southern blot* meetodil mLT, EBNA1 ning E1 ja E2 valkude funktsionaalsust.

mLT valgu funktsionaalsuse kontroll konstrueeritud rakuliinis

Selleks, et kontrollida, kas konstrueeritud rakuliin ekspresseerib replikatsioonis funktsionaalset mLT valku, transfektsiooni kõiki selekteeritud kloonide 500 ng pUCPyVWTO plasmidiga (sisaldab PyV wt *origin'* i). Positiivse kontrollina kasutati 500 ng pUCPyVWTO ja 500 ng pCGmLT plasmidi kotransfektsiooni ning negatiivse kontrollina 500 ng pUC18 plasmidi. Transfektsioon rakudest eraldati 48 tundi pärast transfektsiooni episomaalne DNA kasutades aluselise lüüsi meetodit. Igast proovist võeti edasisele analüüsile pool eraldatud DNAst.

Katse tulemusena ilmnes, et pUCPyWTO plasmiid replitseerus neljas kloonis, milledest kaks on toodud joonisel 8. Neljast kloonist ühes (joonisel 8. kloon nr.11) jäi mLT valk stabiilselt funktsionaalseks. Seda kloonit hakati nimetama 4P11 liiniks ning edasised katsed on tehtud kõik selle rakuliiniga (joonisel rada 8).



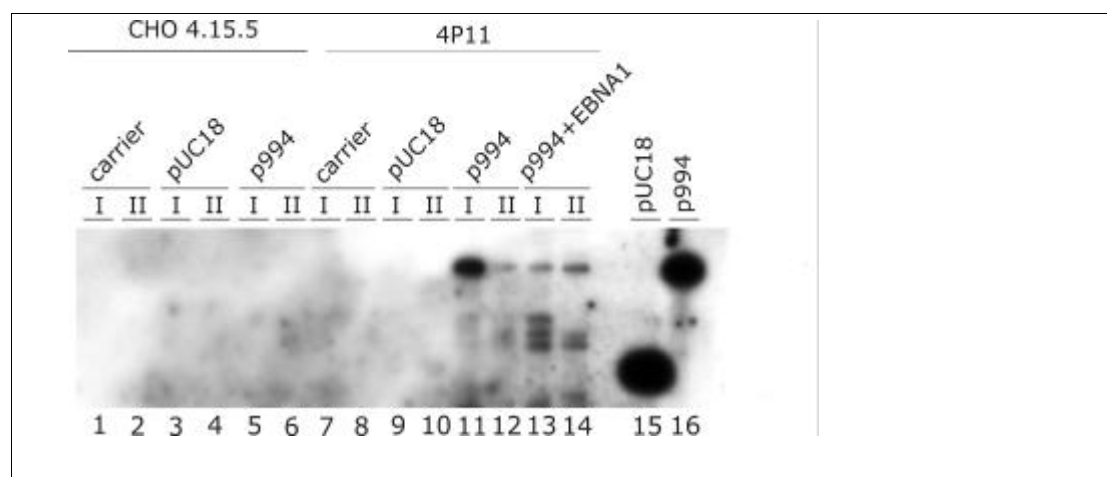
Joonis 8. Transientse replikatsiooni analüüs konstrueeritud 4.15.5LTEBNA1 rakuliinis *Southern blot* meetodil.

Episomaalne DNA on eraldatud 48 tundi pärast transfektsiooni (joonisel raja kohal tähistatud kloni number) ning lõigatud ensüümidega *DpnI* ja *HindIII*. Hübridisatsiooniks on kasutatud radioaktiivselt märgitud pUCPyVWTO proovi. Kõiki rakuliini kloone transfekteeeriti 500 ng pUCPyVWTO plasmiidiga (sisaldab PyV *origin'* i), mis replitseerub ainult PyV replikatsioonivalgu LT juuresolekul. Positiivne replikatsioonisignaali detekteeriti kahes kloonis (kloonid 5 ja 11), positiivse kontrollina kasutati 4.15.5LTEBNA1 liini rakke, millesse kotransfekteeeriti pUCPyVWTO ja pCGmLT (sisaldab mLT valgu ekspressioonikasseti) (rada 14). Markeriteks on 300 ja 500 pg pUCPyVWTO plasmidi, mis on lineariseeritud *HindIII* ensüümiga (radad 15 ja 16).

EBNA1 valgu funktsionaalsuse kontroll 4P11 liinis

EBNA1 valgu funktsionaalsust 4P11 liinis kontrolliti samuti replikatsioonikatsetega. Selleks transfekteeeriti 4P11 liini 2 µg p994 plasmiidiga (sisaldab EBV latentse faasi replikatsiooni *origin'* i oriP), positiivse kontrollina kasutati 2 µg p994 plasmidi ja 2 µg s6EBNA1 plasmidi (sellelt ekspresseerub lisaks oriP replikatsiooniks vajalik EBNA1 valk) kotransfektsiooni ning negatiivse kontrollina 700 ng pUC18 plasmidi. Veendumaks, et oriP replikatsioonisignaali 4P11 liinis on EBNA1 valgust sõltuv, transfekteeeriti lisaks 4P11 liinile samade konstruktidega ka CHO 4.15.5 liini (mõnedes inimese rakuliinides on kirjeldatud oriP replikatsiooni ilma EBNA1 valgu osaluseta). Tulemused on toodud joonisel 9. Plasmid (p994 sisaldab EBV replikatsiooni *origin'* i oriP-d) replitseerub 4P11 liinis samaväärselt nii EBV replikatsioonivalgu EBNA1 lisamisel ekspressiooniplasmiidilt s6EBNA1 kui ka ilma EBNA1 ekspressiooniplasmidi lisamiseta. See tõestab, et replikatsiooniks

vajalikku EBNA1 valku ekspresseeritakse ka 4P11 rakuliini poolt. Negatiivse kontrollina on kasutatud ainult pUC18 plasmiidiga transfecteeritud rakke, milles mingisugust replikatsioonisignaali ei esine. Paralleelselt testitud p994 plasmidi replikatsioon CHO4.15.5 rakuliinis mingisugust replikatsioonisignaali ei anna (joonis 9). Seega tagab oriP replikatsiooni 4P11 liinis just EBNA1 valgu funktsionaalsus. Markeriteks on kasutatud 200 pg pUC18 ja p994 plasmide, mis on lineariseeritud *Bam*HI ensüümiga.

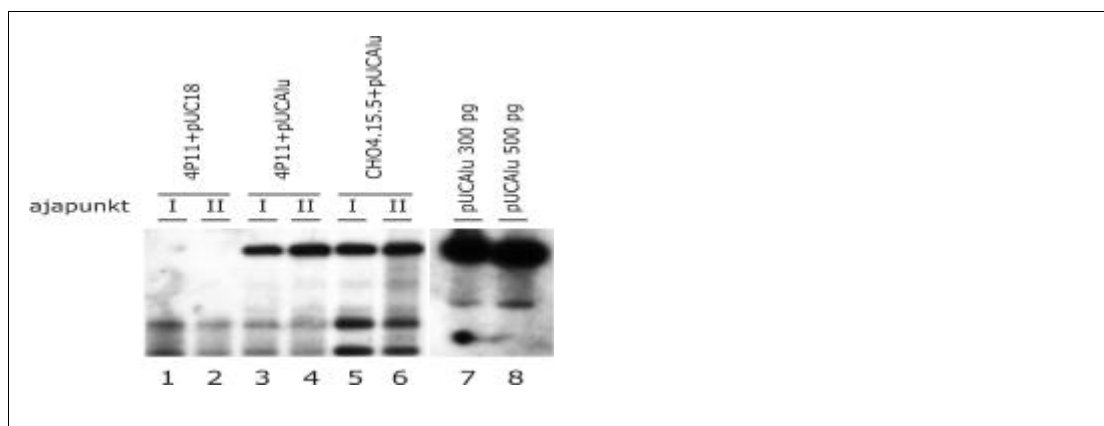


Joonis 9. Transientse replikatsiooni analüüs *Southern blot* meetodil CHO4.15.5 ja 4P11 rakuliinis.

EBV replikatsiooni *origin'* i oriP-d sisaldav plasmid p994 replitseerub 4P11 liinis samaväärselt nii EBV replikatsioonivalgu EBNA1 juuresolekul kui ka ilma EBNA1 ekspressiooniplasmidi lisamiseta (rajad 11-14). See tõestab, et replikatsiooniks vajalikk EBNA1 valku ekspresseeritakse ka 4P11 rakuliini poolt. Negatiivse kontrollina on ainult pUC18 plasmiidiga transfecteeritud rakud, milles mingisugust replikatsioonisignaali ei esine (rajad 9, 10). Paralleelselt on testitud p994 plasmidi replikatsiooni ka CHO4.15.5 rakuliinis (rajad 1-8), kuna oriP võib mõnedes rakuliinides replitseeruda ka sõltumatult EBNA1 valgust. See, et CHO4.15.5 rakuliinis mingisugust replikatsioonisignaali ei teki, tõestab, et oriP replikatsioon 4P11 liinis on tagatud tänu EBNA1 valgu funktsionaalsusele selles rakuliinis. Markeriteks on 200 pg pUC18 ja p994 plasmidi, mis on lineariseeritud ensüümiga *Bam*HI (rajad 15, 16). Hübridisatsiooniks kasutati radioaktiivselt märgitud p994 ja pUC18 plasmide.

E1 ja E2 valgu funktsionaalsuse kontroll 4P11 liinis

Selleks, et kontrollida, kas 4P11 liinis on säilinud E1 ja E2 valgu funktsionaalsus, transfecteeriti 4P11 liini 500 ng pUCAlu plasmiidiga (sisaldab BPV1 replikatsiooni *origin'* i). Positiivse kontrollina kasutati 500 ng pUCAlu plasmidi ning 1 µg pCGEag ja 1 µg pCGE2 plasmidi (nendelt ekspresseeruvad lisaks BPV1 replikatsiooniks vajalikud valgud E1 ja E2) kotransfectiooni ning negatiivse kontrollina 500 ng pUC18 plasmidi. Tulemuseks on see, et pUCAlu plasmid replitseerub 4P11 rakuliinis võrreldavalt positiivse kontrolliga ning seega on konstrueeritud rakuliinis funktsionaalsed nii BPV1 E1 kui ka E2 valk (joonis 10). Markeritena on kasutatud 300 ja 500 pg pUCAlu plasmidi, mis on lineariseeritud ensüümiga *Hind*III .



Joonis 10. Transientse replikatsiooni analüüs *Southern blot* meetodil CHO4.15.5 ja 4P11 rakuliinis.

BPV1 replikatsiooni *origin'* i sisaldav plasmiid pUCAlu replitseerub 4P11 liinis (rajad 3, 4) samaväärselt BPV1 replikatsioonivalke E1 ja E2 ekspresseeriva CHO4.15.5 rakuliiniga (rajad 5, 6). See tõestab, et replikatsiooniks vajalikke E1 ja E2 valku ekspresseeritakse ka 4P11 rakuliini poolt. Negatiivse kontrollina on ainult pUC18 plasmiidiga transfekteeritud rakud, milles mingisugust replikatsioonisignaali ei esine (rajad 1, 2). Markeriteks on 300 ja 500 pg pUCAlu plasmidi, mis on lineariseeritud *Hind*III ensüümiga (rajad 7, 8). Hübridisatsiooniks kasutati radioaktiivselt märgitud pUCAlu plasmidi.

Kõikide 4P11 rakuliinis olevate viiruseliste valkude funktsionaalsust kontrolliti sarnaselt eelnevalt kirjeldatud katsetele ka pärast seda, kui rakuliini oli kasvatatud kolm kuud mitteselektiivsetes tingimustes (ilma hügroümütsiin B antibiootikumita). Kõik viiruselised valgud olid endiselt funktsionaalsed, kuna liinis replitseerusid nii PyV, BPV1 kui ka EBV *origin'* i sisaldavad plasmiidid (andmed esitamata).

Erinevate replikatsiooni- ja segregatsioonifunktsiooniks vajalike viiruseliste elementidega plasmiidide konstrueerimine

Uurimaks erinevate episomaalselt säilivate DNA viiruste replikatsiooni- ja segregatsioonifunktsiooni võimalikku kokkusobivust jagunevates rakkudes konstrueeriti erinevate viiruseliste replikatsiooni- ja segregatsioonifunktsiooni tagavate *cis*-elementidega plasmiidid (vt. Materjal ja meetoodika). Plasmiidide konstrueerimisel lähtuti eelnevalt teadaolevatest episomaalselt säilivatest plasmiididest. Varasemalt on täheldatud, et näiteks liiga tugeva promootori paigutamine vahetult replikatsiooni *origin'* i lähedusse häirib tugevalt replikatsioonifunktsiooni (E. Ustav avaldamata andmed). See võib omakorda häirida plasmiidide stabiilset säilimist ning sellest tulenevalt vahetati nii resistentsusmarkerite kui ka fluorestseeruvate valkude ekspressioonikassettides tugevad CMV ja SV40 promootorid nõrgema RSV LTR promootori vastu. BPV1 URR piirkonda ja antibiootikumi G418 resistentsusmarkerit sisaldava plasmidi konstrueerimisel võeti aluseks pNeoBgl40 plasmiid, mille stabiilset episomaalset

säilimist BPV1 E1 ja E2 valgu ekspresseerivas rakuliinis on varasemalt näidatud (Piirsoo et al., 1996). Sellele plasmiidile lisati veel HcRed1 valgu ekspressioonikassett, mis võimaldaks jälgida vastava plasmidi segregatsiooni ja stabiilset säilimist ka voolutsütomeetria meetodit kasutades (plasmiid nimetati URRHcRed1).

PyV minimaalset replikatsiooni *origin'* i ning BPV1 segregatsioonifunktsiooni tagava MME-ga plasmidi konstrueerimisel võeti samuti aluseks neid elemente sisaldav plasmiid (p10Pym), mille stabiilset episomaalset säilimist oli juba varasemalt PyV LT ja BPV1 E2 valgu ekspresseerivas rakuliinis näidatud (Silla, 2001). Täiendavalt lisati sellele plasmiidile veel puromütsiini resistentsusmarker ning d1EGFP valgu ekspressioonikassett (plasmiid MOMMEpurod1EGFP). PyV replikatsiooni *origin'* il on kirjeldatud nii minimaalne *origin* (MO) kui ka sellele eelnev võimenduselement (*enhancer*), mille olemasolul on replikatsioon kuni 100 korda efektiivsem (MO+*enhancer* = WTO ehk wt *origin*). Hübridses plasmidis, milles on kasutatud PyV MO+MME, täidab *enhancerelemendi* osa MME ning replikatsioon on võrreldav PyV WTO replikatsiooniga (Silla, 2001). Samas ei säilinud PyV wt *origin'* i ja MMEd sisaldavad plasmiidid stabiilselt ning ilmselt põhjustas esmane tugeva ülereplikatsioon rakkude apoptoosi (Silla, 2001). Kuna FR elemendi ja EBNA1 valgu rolli PyV MO võimendamisel polnud teada, konstrueeriti edasisteks katseteks hübridsed plasmiidid nii minimaalse PyV replikatsiooni *origin'* iga (MO) kui ka wt PyV replikatsiooni *origin'* iga (WTO). Neid elemente sisaldavatele plasmiididele lisati veel kas puromütsiini resistentsusmarker ja d1EGFP valgu ekspressioonikassett või antibiootikumi G418 resistentsusmarker ja HcRed1 valgu ekspressioonikassett. Olenevalt kotransfektsiooniks valitud plasmiididest on võimalik kasutada sellist kombinatsiooni, et nii selektsiooni- kui fluorestseeruv marker oleksid erinevad (plasmiidid MOFRpurod1EGFP, WTOFRpurod1EGFP, MOFRneoHcRed1 ja WTOFRneoHcRed1).

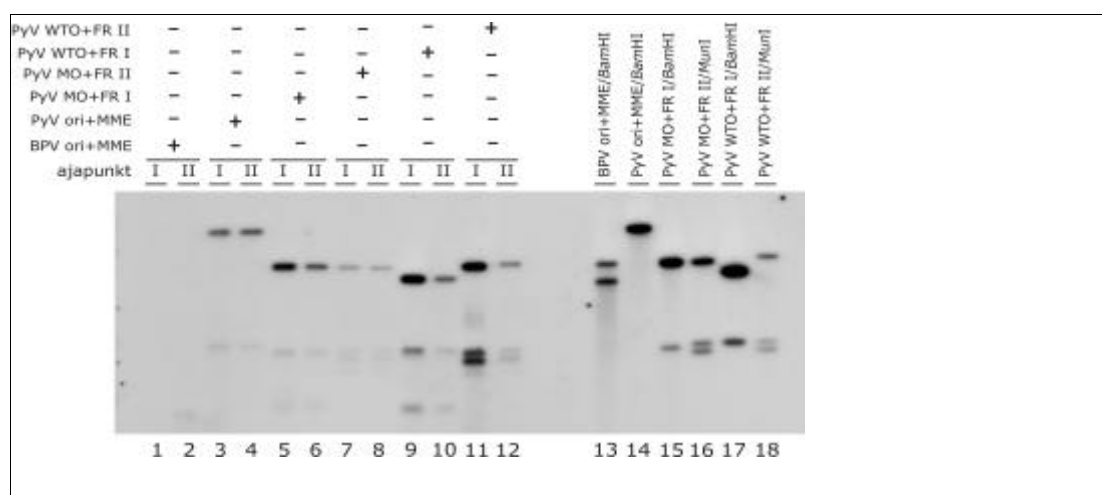
Transientse replikatsiooni analüüs 4P11 liinis

Selleks, et võrrelda omavahel erinevate viiruseliste elementidega plasmiidide replikatsiooni transfekteriti 4P11 liini järgmiste konstruktidega (plasmiidide kaardid toodud lisas):

1. URRHcRed1 0,66 µg (BPV1 replikatsiooni *origin* + MME)
2. MOMMEpurod1EGFP 0,61 µg (PyV minimaalne replikatsiooni *origin* + MME)
3. MOFRneoHcRed1 0,5 µg (PyV minimaalne replikatsiooni *origin* + FR I)

4. MOFRpurod1EGFP 0,64 µg (PyV minimaalne replikatsiooni *origin* + FR II)
5. WTOFRneoHcRed1 0,46 µg (PyV wt replikatsiooni *origin* + FR I)
6. WTOFRpurod1EGFP 0,64 µg (PyV wt replikatsiooni *origin* + FR II)
7. URRHcRed1 0,66 µg + MOMMEpurod1EGFP 0,61 µg
8. MOFRneoHcRed1 0,5 µg + MOMMEpurod1EGFP 0,61 µg
9. MOFRpurod1EGFP 0,64 µg + URRHcRed1 0,66 µg
10. MOFRneoHcRed1 0,5 µg + MOFRpurod1EGFP 0,64 µg
11. WTOFRpurod1EGFP 0,64 µg + URRHcRed1 0,66 µg
12. WTOFRneoHcRed1 0,46 µg + MOMMEpurod1EGFP 0,61 µg
13. *carrier* DNA 50 µg

Kõiki plasmide võeti transfektsiooni võrdses molaarses koguses, lisaks kasutati igas transfektsioonis ka 50 µg *carrier* DNAd. Negatiivse kontrollina kasutati ainult *carrier* DNAGA transfekteeritud rakke.



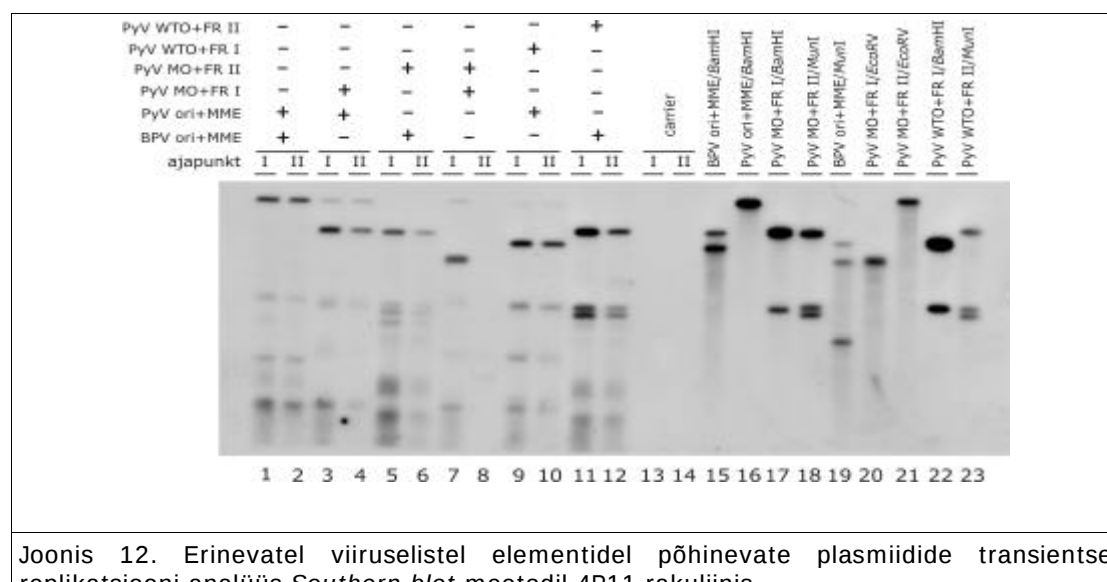
Joonis 11. Erinevatel viiruselistel elementidel põhinevate plasmidide transientse replikatsiooni analüüs *Southern blot* meetodil 4P11 rakuliinis.

Joonise ülemises osas on ära toodud erinevate plasmidide replikatsiooni *origin* id ning säilituselemendid ning radade kohal on tähistatud plussmärgiga vastavate elementidega plasmidide olemasolu transfektsioonis. Antud katses kasutati URRHcRed1 (BPVori+MME), MOMMEpurod1EGFP (PyVMO+MME), MOFRneoHcRed1 (PyVMO+FR I), MOFRpurod1EGFP (PyVMO+FR II), WTOFRneoHcRed1 (PyVMO+FR I) ja WTOFRpurod1EGFP (PyVWTO+FR II) plasmide. Kõikide plasmidide puhul v.a URRHcRed1 (rajad 1, 2) on detekteeritav replikatsioonisignaal. Ilmselt on BPV1 URR replikatsioon siiski rakuliinis olemas, kuid võrreldes PyV replikatsioonisignaaliga detekteerimiseks liiga nõrk. Markeriteks on 50 pg katses kasutatud plasmide (rajad 13-18), mis on lõigatud sobiva ensüümiga nii, et ka kahe plasmidiga transfekteeritud rakkudes oleks mõlema plasmidi replikatsioonisignaalid eristatavad (kasutatud ensüüm on toodud välja joonisel markerite taga). Hübridisatsiooniks kasutati radioaktiivselt märgitud URRHcRed1, MOMMEpurod1EGFP ja MOFRneoHcRed1 plasmide.

Transfekteeritud rakud jagati kolmele 60 mm koekultuuri tassile, millest kaks kasutati transientse replikatsiooni analüüsiks ning kolmas jäi stabiilse replikatsiooni analüüsiks. Transfekteeritud rakkudest eraldati 48 ja 72 tundi pärast transfektsiooni episomaalne DNA (joonisel 11 ja 12 vastavalt I ja II ajapunkt) kasutades aluselise lüüsi meetodit (vt. Materjal ja metoodika). Igast

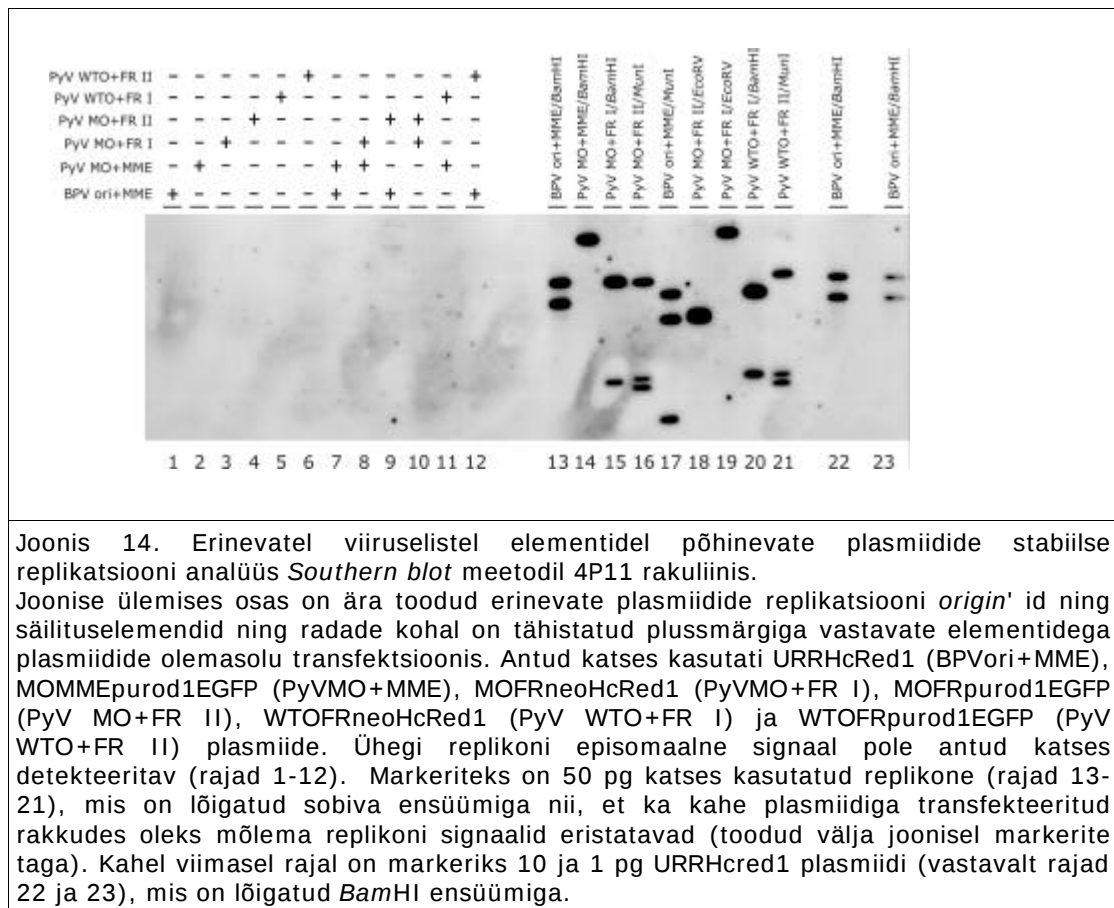
proovist võeti edasisele analüüsile pool eraldatud episomaalsest DNAST. Joonisel 11 on toodud ühe plasmiidiga transfekteeeritud rakkude replikatsioonianalüüs ning joonisel 12 on sama katse erinevad kotransfektsioonid. Markeriteks on 50 pg katses kasutatud replikone, mis on lõigatud sama ensüümiga nagu katses uuritavaid plasmide (toodud välja joonisel markerite taga).

Kõikide plasmiidide puhul v.a URRHcRed1 detekteeriti replikatsioonisignaali. Kuna BPV1 E1 ja E2 valk on antud rakuliinis funktsionaalsed, eeldati, et ilmselt on replikatsioonisignaali detekteerimiseks liiga nõrk, ning BPV1 URR-i sisaldavaid transfektsioone korrati 1 µg URRHcRed1 plasmiidiga (kotransfektsioonis võeti teisi plasmide vastavalt võrdses molaarses suhtes). Tulemused on toodud joonisel 13 ning suurema koguse URRHcRed1 plasmiidiga transfekteeeritud rakkudes detekteeriti replikatsioonisignaali ka BPV1 URR piirkonda sisaldavate plasmiidide puhul.



Joonis 12. Erinevatel viiruselistel elementidel põhinevate plasmiidide transientse replikatsiooni analüüs *Southern blot* meetodil 4P11 rakuliinis.

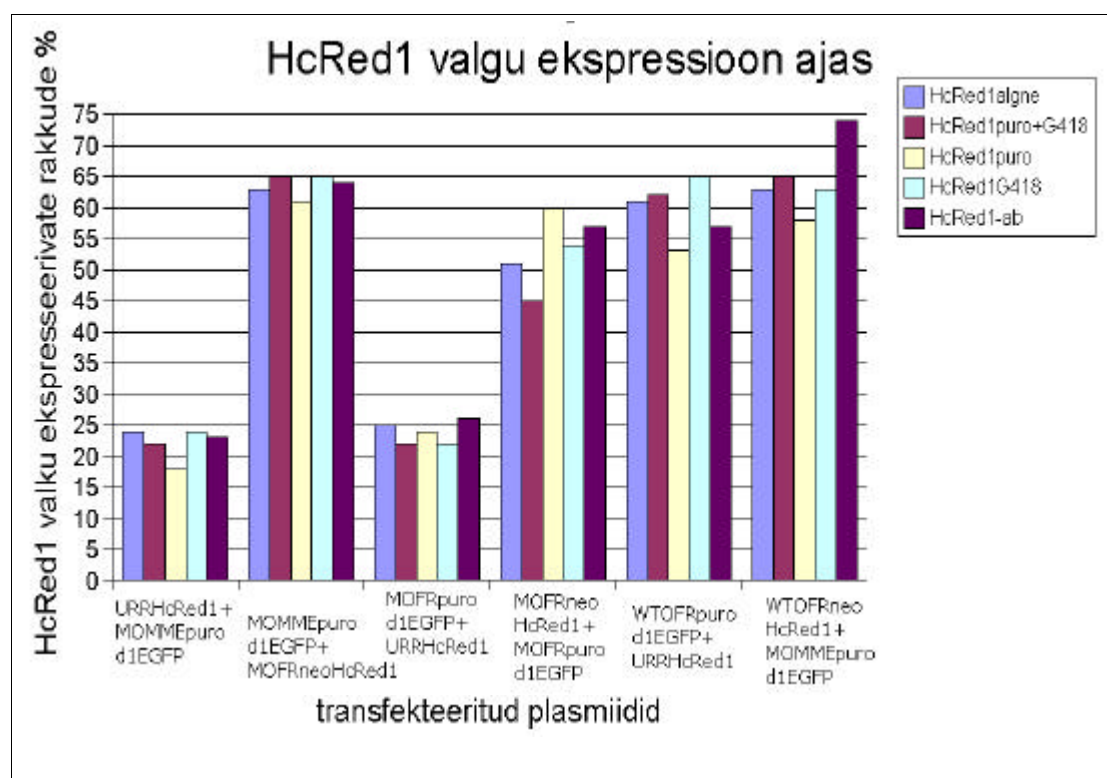
Joonise ülemises osas on ära toodud erinevate plasmiidide replikatsiooni *origin'* id ning säilituselemendid ning radade kohal on tähistatud plussmärgiga vastavate elementidega plasmiidide olemasolu transfektsioonis. Antud katses kasutati URRHcRed1 (BPVori+MME), MOMMEpurod1EGFP (PyVMO+MME), MOFRneoHcRed1 (PyVMO+FR I), MOFRpurod1EGFP (PyV MO+FR II), WTOFRneoHcRed1 (PyV WTO+FR I) ja WTOFRpurod1EGFP (PyV WTO+FR II) plasmide. Sarnaselt joonisega 11, pole ka siin detekteeritav URRHcRed1 plasmidi replikatsioon. Jooniselt on näha, et MOFRneoHcRed1 plasmidi ja MOMMEpurod1EGFP plasmidi kotransfektsioon surub viimase replikatsiooni maha (rajad 3, 4). Negatiivse kontrollina on kasutatud ainult *carrier* DNAGA transfekteeeritud rakke (rajad 13, 14). Markeriteks on 50 pg katses kasutatud plasmide (rajad 15-23), mis on lõigatud sobiva ensüümiga nii, et ka kahe plasmiidiga transfekteeeritud rakkudes oleks mõlema plasmidi replikatsioonisignaali eristatavad (kasutatud ensüüm on toodud välja joonisel markerite taga). Hübridisatsiooniks kasutati radioaktiivselt märgitud URRHcRed1, MOMMEpurod1EGFP ja MOFRneoHcRed1 plasmide.



Selektsiooni all kasvanud transfekteeeritud rakkude analüüs voolutsütomeetria meetodiga.

Selekteeritud rakke analüüsiti lisaks plasmiidse DNA eraldamisele ka voolutsütomeetria meetodiga. Selleks, et jälgida d1EGFP või Hcred1 valgu ekspresseerumist rakkudes, kasvatati selektsiooni all olevaid rakke kuni saavutati 80 % konfluentsed tassid. Seejärel loeti kasutades FACSCalibur süsteemi igast transfektsioonist 50 000 rakku ning analüüsiti kui suur osa rakkudest ekspresseerib fluorestseeruvat markerit (vt. Materjal ja metoodika). Osadelt rakkudelt eemaldati selektiivne sööde, kahe replikoniga transfekteeeritud rakkude puhul ka selliselt, et eemaldati kahest antibiootikumist üks, teine jäi söötmesse alles ning vaadeldi ajas toimuvaid fluorestseeruvate markerite ekspressiooni muutusi. Tulemused on esitatud HcRed1 valgu ekspressiooni kohta kahe plasmiidiga transfekteeeritud rakkudes joonisel 15. Kuu aja jooksul ei detekteeritud olulisi muutusi HcRed1 valgu ekspressioonis (joonis 15). Sarnane tulemus saadi ka ühe plasmiidiga transfekteeeritud puhul ning d1EGFP valgu ekspressiooni analüüsil. Juhul kui replikonid on säilinud episomaalsena, peaks antibiootikumi eemaldamisel hakkama fluorestseeruvat markerit sisaldavate plasmiidide osa rakkudes vähenema, samas kui antibiootikumi selektsiooni all

olevates rakkudes ei tohiks erilisi muutusi tekkida. Kuna pärast nelja nädalat ei olnud tekkinud mingisuguseid olulisi erinevusi rakkude fluorestsentsis, mis olid kasvanud antibiootikumi juuresolekul või ilma, viitab see tulemus sellele, et tegu on markerite integratsiooniga.



Joonis 15. Joonisel on kujutatud erinevate replikonidega kotransfekteeritud ning algselt selektsiooni all kasvatatud 4P11 rakuliini HcRed1 markeri ekspressioonis toimuvaid muutusi.

Iga tulpade grupi all on kirjeldatud milliste plasmiidide kotransfektsiooniga on tegu. Y-teljel on näha HcRed1 valgu ekspresseerivate rakkude osakaal kogupopulatsioonis. Esimesel tulbal on kujutatud HcRed1 valgu ekspresseerivate rakkude osakaal algselt selektsiooni all kasvatatud rakkude puhul (HcRed1 algne). Seejärel eemaldati söötimest kas üks või mõlemad antibiootikumid ning järgmised neli tulpa kujutavad HcRed1 valgu ekspressiooni muutusi nelja nädala möödudes kas mõlema antibiootikumi juuresolekul (HcRed1puro+G418), ilma puromütsiiniga (HcRed1G418), ilma G418 (HcRed1puro) või ilma selektsioonita (HcRed1-ab) kasvanud rakkude puhul.

ARUTELU

Käesolevas töös näidati, et hiire polüoomiviiruse (PyV) wt replikatsiooni *origin'* i (PyV WTO) ja Epstein-Barri viiruse (EBV) FR-elementi sisaldavad plasmiidid replitseerusid ning säilisid episomaalsena kolme nädala jooksul PyV LT ja EBV EBNA1 valku konstitutiivselt ekspresseerivas rakuliinis (Cop5EBNA1). Sellisel juhul tagab plasmiidide replikatsioonifunktsiooni PyV WTO ja LT valk ning segregatsioonifunktsiooni EBV multimeerseid EBNA1 valgu seostumiskohti sisaldav FR-element ja EBNA1 valk. Varasemast on teada, et BPV1 replikatsiooni *origin'* i (BPV1 MO) ja multimeerseid E2 valgu seostumiskohti (MME) sisaldavad plasmiidid säilivad BPV1 E1 ja E2 valgu juuresolekul jagunevates rakkudes episoomidena (Piirsoo et al., 1996). Seejuures tagavad E1 ja E2 ning BPV1 MO plasmiidide replikatsioonifunktsiooni ning MME ja E2 valk segregatsioonifunktsiooni. Samuti on teada, et hübriidsed plasmiidid, mis sisaldavad PyV minimaalset replikatsiooni *origin'* i (PyV MO) ja BPV1 multimeerseid E2 valgu seostumiskohti (MME), säilivad PyV LT ja BPV1 E2 valgu juuresolekul jagunevates rakkudes episoomidena (Silla, 2001). Sellisel juhul tagavad PyV MO ja LT valk plasmiididele replikatsioonifunktsiooni ning BPV1 MME ja E2 valk segregatsioonifunktsiooni. Samas on ka teada, et PyV WTO ja BPV1 MME elementidega plasmiidid replitseeruvad küll PyV LT ja BPV1 E2 valgu juuresolekul, kuid stabiilselt episoomina püsima ei jää (Silla, 2001). Ilmselt on selliste plasmiidide replikatsioon esmaselt ülevõimendatud ning see põhjustab transfekterunud rakkude apoptoosi. Ka antud töös tehtud katses on stabiilselt episoomina püsiva PyV WTO ja EBV segregatsioonielementi FR sisaldava plasmidi replikatsioonisignaal võrreldes algse transientse replikatsioonisignaaliga väga nõrk. Seega võib ka PyV WTO ja EBV FR-elementi sisaldava plasmidi puhul pikemaajaline episomaalne säilimine olla häiritud ning efektiivsem oleks kasutada PyV MO ja EBV FR-elementiga plasmide.

Selleks, et teada saada, kas ka eukarüootsed plasmiidid võivad olla sarnaselt bakteriaalsete plasmiididega teatud juhtudel ühtesobimatud, sooviti uurida erinevate viiruseliste elementidega plasmiidide koreplikatsiooni ja -segregatsiooni. Katsesse otsustati võtta võrdlevalt BPV1 MO ja PyV MO ning PyV WTO kui replikatsioonifunktsiooni tagamiseks vajalikud *cis*-elemendid ning MME ja FR-element kui segregatsioonifunktsiooni tagavad *cis*-elemendid. Kasutades erinevaid kombinatsioone on võimalik uurida sama replikatsiooni *origin'* i kuid erineva segregatsioonimehhanismiga ning erineva replikatsiooni *origin'* i kuid sama segregatsioonimehhanismiga plasmiidide ko-replikatsiooni ja stabiilset

säilimist jagunevates rakkudes. Selleks, et tagada vastavate *cis*-elementide funktsionaalsus, tuli konstrueerida rakuliin, mis ekspresseeriks konstitutiivselt kõiki nende elementide funktsionaalsuseks vajalikke viiruselisi *trans*-faktoreid. Rakuliini baasiks valiti CHO4.15.5 rakuliin, mis ekspresseerib konstitutiivselt BPV1 E1 ja E2 valku ning milles on varasemalt näidatud BPV1 URR piirkonda sisaldavate plasmiidide stabiilne episomaalne säilimine (Piirsoo et al., 1996). Lisaks on vajalikeks *trans*-faktoriteks veel PyV LT ja EBV EBNA1 valk. Rakuliini tegemine wt LT valguga ebaõnnestus, üheski selekteeritud kloonis ei ekspresseerunud LT valk (analüüsiti 40 kloon), samas olid olemas funktsionaalsed E1, E2 ja EBNA1 valk (andmed esitamata). Ka ei aidanud LT valgu ekspressioonikassetis tugeva CMV promootori vahetus nõrgema RSV LTR promootori vastu. Ilmselt on wt LT valgu ekspressioon rakkudele toksiline ning selektsiooni all kasvasid ülesse ainult need rakud, milles LT valgu tootmine oli mahasurutud. Varasemast oli teada, et LT valgu toksilisus võib teatud tingimustel olla seotud LT valgu seostumisega rakulise Rb valguga (Sheng et al., 2000) ning et Rb valguga seostumise domeeni deleteerimine LT valgust ei riku LT valgu võimet toetada PyV *origin'* i replikatsiooni (Soderbarg and Magnusson, 1993). Seega otsustati deleteerida LT valgust Rb valguga seostumise domeen ning proovida sellise mutantse LT (mLT) valguga rakuliini teha. Mutantse LT valgu funktsionaalsust testiti replikatsioonikatses ning see oli võrreldav wt LT valgu funktsionaalsusega. See, et replikatsioonisignaal ajas nõrgenes (võrreldi 48 ja 72 tunni ajapunkte) tuleneb ilmselt sellest, et mLT valgu funktsionaalsuse testimiseks kasutati PyV wt *origin'* i sisaldavat plasmidi. Selline plasmid replitseerub aga LT valgu juuresolekul väga efektiivselt ning selline ülereplikatsioon põhjustab rakkude apoptoosi. Seega kahaneb plasmidi replitseerivate rakkude arv aja jooksul. Kuna mLT ja LT valgu funktsionaalsus PyV *origin'* i sisaldava plasmidi replikatsiooni toetamisel oli võrreldav, sai rakuliini tegemisel kasutada PyV mLT valku. Selektiooni all kasvanud rakukolooniatest kasvatati ülesse 33 kloon, milles analüüsiti mLT valgu funktsionaalsust. Analüüsitud kloonidest neli toetas PyV WTO replikatsiooni, seega pidi neis neljas kloonis ekspresseeruma PyV mLT valk. Hilisemates katsetes jäi mLT valk stabiilselt ekspresseeruma ühes kloonis, mida hakati nimetama 4P11 rakuliiniks. Teistest algselt mLT valku ekspresseerivatest kloonidest ühes oli hilisemates katsetes mLT valk küll funktsionaalne, kuid selles liinis kadus ära E1 valgu funktsionaalsus ning BPV1 MO replikatsiooni selles rakuliinis enam ei toimunud. Ülejäänud kaks algselt mLT valku ekspresseerivat kloon hiljem PyV WTO replikatsiooni enam ei toetanud. Ilmselt on ka sellise mutantse LT valgu ekspressioon rakkudele mingil moel kahjulik ning ainult Rb valguga seostumise

domeeni deleteerimisest ei piisa, et rakkudele kahjulikkus kaoks. Vastasel juhul oleks pidanud enamus kloone ekspresseerima mLT valku, stabiilselt jäi seda ekspresseerima aga ainult üks kloon kolmekümne kolmest. Samas ei saa ka välistada teiste viiruseliste valkude mõju LT valgu ekspressioonile. Kuna varasemalt on õnnestunud edukalt teha rakuliine PyV LT ja BPV1 E2 valguga (konstrueeritud I. Hääle poolt) ning PyV LT ja EBNA1 valguga (Cop5EBNA1), saab ainsaks LT valguga mitesobivaks valguks olla BPV1 E1 valk. Mitesobivuse põhjused võivad peituda selles, et tegemist on funktsionaalselt väga sarnaste valkudega ning mingil põhjusel võivad need viiruselised helikaasid omavahel konkureerida. Seda hüpoteesi toetab ka fakt, et ühes kloonis, kus mLT valk jäi stabiilselt ekspresseeruma, kadus ära varasemalt konstitutiivselt rakuliinis ekspresseeritud BPV1 E1 valgu ekspressioon.

Järgnevalt konstrueeriti erinevatel viiruselistel elementidel põhinevad plasmiidid, millele lisati lisaks replikatsiooni *origin'* ile ja segregatsioonifunktsiooni tagavale elemendile ka antibiootikumi resistentsusmarker ning fluorestseeruva valgu marker. Selliste plasmiidide replikatsioonifunktsioone võrreldi kõigepealt transientses replikatsioonikatses ning osale transfekteeeritud rakkudest pandi peale selektiivne sööde, mis sisaldas vastavalt transfekteeeritud plasmiididele valitud antibiootikume. Transientses katses replitseerusid kõik transfekteeeritud plasmiidid. BPV1 *origin'* i replikatsioon oli küll tunduvat nõrgem võrreldes nii PyV MO kui ka PyV WTO elemente sisaldavate plasmiididega, kuid siiski detekteeritav, kui algsesse transfektsiooni võeti suurem kogus DNAd. Samas võttes arvesse seda, et PyV on lüütiline viirus ning ülereplikatsioonist tulenev rakkude apoptoos pole sellisel juhul viirusele probleemiks, on mõistetav, miks PyV replikatsiooni *origin'* i sisaldavate plasmiidide replikatsioon on oluliselt efektiivsem kui BPV1 *origin'* iga plasmiidide replikatsioon. Transfekteeerides korraga PyV MO ja BPV1 MME ning PyV MO ja FR-elementiga plasmide on mingil põhjusel PyV MO+BPV1 MME plasmidi replikatsioon maha surutud. Veelgi rohkem surub PyV MO+BPV1 MME plasmidi replikatsiooni maha aga PyV WTO+EBV FR-elementiga plasmid. Ilmselt on sellise plasmidi replikatsiooni initsiatsioon efektiivsem.

Edasi kasvatati osa transfekteeeritud rakke selekteerivates tingimustes nii, et ellu said jääda ainult selektsioonimarkerit sisaldavad plasmiidid (eeldatavasti episomaalset plasmidi sisaldavad). Seejärel analüüsiti selekteeritud rakkudes episomaalsete plasmiidide olemasolu, et võrrelda erinevate replikatsiooni *origin'*ide ja segregatsioonimehhanismide sobivust koosfunktsioneerimiseks. Üllataval kombel ei olnud mitte ükski transfekteeeritud plasmiididest säilinud kolm

nädalat peale transfektsiooni episomaalsena. Seejuures arvutati välja ka ligikaudne replikatsioonisignaali tugevus juhul, kui igas analüüsitud rakus oleks vähemalt üks koopia transfekteeeritud plasmidi (vastasel juhul poleks antibiootikumi resistentsus võimalik). Võttes arvesse analüüsil kasutatud rakkude hulka ning plasmiidide suurust peaks replikatsioonisignaali tugevus sellisel juhul olema ligikaudu 2 pg. Kuna analüüsil oli detekteeritav markerina kasutatud 1 pg URRHcRed1 plasmidi signaal, ei ole saadud negatiivne tulemus põhjustatud kasutatud katsesüsteemi sobimatusest. Episomaalsena ei olnud säilinud isegi üksikult transfekteeeritud plasmiidid, mis näitab, et mittesäilimine pole tingitud erinevate segregatsioonifunktsioonide konkureerimisest. Kuna paralleelselt analüüsiti ka konstrueeritud rakuliinis ekspresseeritavate viiruseliste valkude funktsionaalsust ning kolme kuu jooksul ekspresseerusid kõik viiruselised valgud antud rakuliinis stabiilselt, ei ole põhjust arvata, et plasmiidide mittesäilimise põhjuseks on vajalike viiruseliste *trans*-faktorite kadumine süsteemist. Paralleelselt jälgiti ka transfekteeeritud rakkudes fluorestseeruvate markerite ekspressioonis kuu aja jooksul toimuvaid muutusi. Selektiivse söötme eemaldamisel oleks pidanud fluorestseeruva markeri signaal rakkudest kahanema, eeldusel, et markeri ekspressioonikassett on rakkudes episoomina. Kuna mingisuguseid olulisi muutusi fluorestseeruvate markerite ekspressioonis rakkudes ei täheldatud, võib väita, et ilmselt on marker integreerunud rakkude genoomi ning seega ei kao markegeeni ekspressioon selektiivse surve eemaldamisel rakkudelt. Osa rakupopulatsioonist ei ekspresseeri aga üldse fluorestseeruvat markerit ning sellisel juhul võib olla plasmiid integreerunud peremeesraku genoomi selliselt, et fluorestseeruva markeri ekspressioonikassett on rikutud. Kuigi varasemalt on kasutatud fluorestseeruvat markerit plasmide episomaalse säilimise analüüsis, võivad nii d1EGFP kui ka HcRed1 valk olla rakkudele suures koguses toksilised. Seega võib põhjus, et plasmiidid ei säilinud episomaalselt, peituda nende markerite mittesobivuses. Ilmselt toimub fluorestseeruvate markerite puhul negatiivne vastuselektatsioon ning eelistatud on plasmiidide integreerumine peremeesraku kromosoomidesse. Sellise vastuselektatsiooni põhjuseks võib olla see, et multikoopialistelt plasmiididelt ekspresseeritakse liiga suures koguses rakkudele kahjulikku fluorestseeruvat valku, samas kui antibiootikumi resistentsuse tagamiseks rakkudele võib olla piisav juba ühe plasmidi integreerumine rakkude genoomi. Seega pole rakkudel vajadust säilitada ülejäänud plasmidikoopiaid. Integratsioon on rakkudele ka selletõttu kasulik, et sellisel juhul võib fluorestseeruva valgu ekspressioonikassett üldse rikutud saada, sest piisab vaid resistentsusmarkeri integratsioonist. Seega tuleks 4P11 rakuliinis testida ka selliste viiruseliste replikatsiooni- ja

segregatsioonifunktsiooni elementidega plasmiidide replikatsiooni ja stabiilset säilimist, mis ei sisaldaks fluorestseeruva markeri ekspressioonikassetti.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida erinevatel viiruselistel elementidel põhinevate plasmiidide ko-replikatsiooni ja -segregatsiooni.

Käesoleva töö kirjanduslik osa annab ülevaate tüüp 1 veise papilloomiviiruse (BPV1), hiire polüoomiviiruse (PyV) ja Epstein-Barri viiruse (EBV) replikatsiooniks vajalikest viiruselistest faktoritest ning BPV1 ja EBV säilimismehhanismidest jagunevates rakkudes.

Varasemalt on kirjeldatud viiruseliste elementidega plasmiide, mis püsivad eukarüootsetes rakkudes episoomidena. Tüüp 1 veise papilloomiviiruse (BPV1) puhul on sellist episoomina säilimist tagavateks elementideks viiruselised replikatsioonivalgud E1 ja E2 ning replikatsiooni *origin* ja multimeersed E2 valgu seostumiskohad (MME ehk *Minichromosome Maintenance Element*). Samuti on kirjeldatud hübriidset stabiilselt episoomina säilivat plasmiidi, mille puhul replikatsiooni tagab polüoomiviiruse (PyV) minimaalne replikatsiooni *origin* ning PyV LT valk. Kuna PyV on lüütiline viirus, siis selline stabiilset säilimist tagav mehhanism nagu E2 valk ja MME BPV1 puhul, polüoomiviirusel puudub. Hübriidse plasmiidi puhul on stabiilset säilimist tagavateks elementideks BPV1 E2 valk ning MME. Käesoleva töö praktilise osa eesmärgiks oli konstrueerida rakuliin, mis ekspresseeriks PyV LT ja EBV EBNA1 valku ning uurida, kas PyV replikatsiooni *origin* i ja EBV stabiilset säilimist tagavat FR-elementi sisaldavad plasmiidid on võimelised selles rakuliinis stabiilselt säilima.

Eesmärgiks oli ka konstrueerida rakuliin, mis ekspresseeriks BPV1 E1 ja E2 valku, PyV LT valku ja EBV EBNA1 valku ning võrrelda selles rakuliinis BPV1 ja PyV replikatsiooni *origin* i ning EBV stabiilset säilimist tagava FR-elementi ja BPV1 säilituselement MME poolt tagatud replikatsiooni ja segregatsioonimehhanismide ühtesobivust jagunevates rakkudes.

Eksperimentaalse töö tulemused :

1. PyV LT ja EBV EBNA1 valku ekspresseeriv rakuliin (Cop5EBNA1) toetab PyV replikatsiooni *origin* i ja FR-elementiga plasmiidi replikatsiooni ja stabiilset episoomina säilimist jagunevates rakkudes.

2. Konstrueeriti rakuliin, mis ekspresseerib konstitutiivselt nelja erinevat viiruselist valku – BPV1 E1 ja E2 valku, PyV mLT valku ning EBV EBNA1 valku (4P11 liin). Viiruseliste valkude funktsionaalsus konstrueeritud rakuliinis püsis stabiilsena vähemalt kolme kuu jooksul

3. Konstrueeritud rakuliinis võrreldi omavahel järgnevate viiruseliste elementidega plasmiidide replikatsiooni ja segregatsiooni:

- BPV1 replikatsiooni *origin* + BPV1 säilituselement MME
- PyV minimaalne replikatsiooni *origin* + BPV1 säilituselement MME
- PyV minimaalne replikatsiooni *origin* + EBV stabiilseks säilimiseks vajalik FR-element
- PyV wt *origin* + EBV FR-element

Transientses katses replitseerusid kõik transfekteeeritud plasmiidid. Transfekteeerides korraga sama replikatsiooni *origin'* iga kuid erineva säilituselemendiga plasmide (PyV MO + BPV1 MME ning PyV MO + FR-element) on PyV MO+BPV1 MME plasmidi replikatsioon maha surutud. Veelgi rohkem surub PyV MO+BPV1 MME plasmidi replikatsioon maha aga PyV WTO+EBV FR-elementiga plasmid. Ilmselt on PyV WTO replikatsiooni initsiatsioon efektiivsem ning plasmid saab seetõttu replikatsioonil eelise.

Kuigi kõik plasmiidid replitseerusid konstrueeritud 4P11 rakuliinis transientselt, ei jäänud mitte ükski plasmiididest püsima stabiilse episoomina ning ilmselt integreerusid vastavad selektsioonimarkerid rakkude genoomi. Seega ei saa antud süsteemis võrrelda plasmiidide ühtesobivust.

SUMMARY

The main goal of this work was to analyze the replication and segregation function of different DNA viruses.

It has been shown previously that different virus-based plasmids are maintained as episomes in the proliferating cell culture. The elements for assuring this function for bovine papillomavirus type 1 are viral replication proteins E1 and E2 , replication origin and multimeric E2 binding sites (MME or Minichromosome Maintenance Element). It has been also shown that hybrid plasmid containing murine polyomavirus replication origin and MME is maintained as a stable episome in the cell line expressing PyV LT protein and BPV1 E2 protein – the viral trans-factors necessary for the functioning of the latter cis-elements. The goal of this work was to construct a cell line expressing PyV LT and EBV EBNA1 protein and analyze if plasmids containing PyV replication origin and EBV FR-element are capable for stable episomal maintenance in this cell line.

Another goal was to construct a cell line expressing BPV1 E1 and E2 protein, PyV LT protein and EBV EBNA1 protein. This cell line allows to analyze the replication and maintenance of plasmids containing BPV1 or PyV replication origin and EBV or BPV1 segregation-element (FR-elementi and MME respectively).

Main results:

1. Cell line expressing PyV LT and EBV EBNA1 protein (Cop5EBNA1) supports replication and stable maintenance of plasmids containing PyV replication origin and EBV FR-element.
2. Cell line expressing four different viral proteins – BPV1 E1 and E2 protein, PyV mLT protein and EBV EBNA1 protein (4P11 cell line) was constructed. The functionality of viral proteins was stable for at least three month.
3. Replication and segregation of different virus-based plasmids were analyzed in the constructed cell line. The analyzed plasmids contained following viral elements:
 - BPV1 replication origin + BPV1 segregation mechanism MME
 - PyV minimal replication origin + BPV1 segregation mechanism MME
 - PyV minimal replication origin + EBV segregation mechanism FR-element

- PyV wt replication origin + EBV segregation mechanism FR-element

All the analyzed plasmids replicated transiently in the constructed 4P11 cell line while none of the plasmids were maintained as a stable episome. In case of co-transfection of plasmids with the same replication origin but different segregation element (PyV MO and BPV1 MME; PyV MO and FR-element), the replication of PyV MO+BPV1 MME plasmid is suppressed. Similar but even stronger effect is detectable in the case of co-transfection of plasmid containing PyV MO+BPV1 MME and plasmid containing PyV WTO+EBV FR-element. Although all the analyzed plasmids replicated transiently in the constructed 4P11 cell line, none of the plasmids were maintained as a stable episome. Based on these results the constructed system can not be used for analysis of incompatibility of different virus-based plasmids in cell culture.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Abroi A, Ilves I, Kivi S, Ustav M. 2004. Analysis of chromatin attachment and partitioning functions of bovine papillomavirus type 1 E2 protein. *J Virol.* Feb;78(4):2100-13.
2. Bonne-Andrea C, Santucci S, Clertant P, Tillier F. 1995. Bovine papillomavirus E1 protein binds specifically DNA polymerase alpha but not replication protein A. *J Virol.* Apr;69(4):2341-50.
3. Bream, G., Phelps, W. 1994. Shope Papilloma and Bovine Papillomaviruses. *Encyclopedia of Virology.* London, San Diego Academic Press: 1305-1311
4. Brodsky JL, Pipas JM. 1998. Polyomavirus T antigens: molecular chaperones for multiprotein complexes. *J Virol.* Jul;72(7):5329-34.
5. Chen G, Stenlund A. 2001. The E1 initiator recognizes multiple overlapping sites in the papillomavirus origin of DNA replication. *J Virol.* Jan;75(1):292-302.
6. Clertant P, Seif I. 1984. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature.* Sep 20-26;311(5983):276-9.
7. Cole CN, Conzen SD. 2001. Polyomaviridae: the viruses and their replication. *Virology.* P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers: 2045-2076.
8. Cowie A, Kamen R. 1984. Multiple binding sites for polyomavirus large T antigen within regulatory sequences of polyomavirus DNA. *J Virol.* Dec;52(3):750-60.
9. Delecluse HJ, Bartnizke S, Hammerschmidt W, Bullerdiek J, Bornkamm GW. 1993. Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J Virol.* Mar;67(3):1292-9.
10. Dilworth SM, Cowie A, Kamen RI, Griffin BE. DNA binding activity of polyoma virus large tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Apr;81(7):1941-5.
11. Frappier L, O'Donnell M. 1991 a. Overproduction, purification, and characterization of EBNA1, the origin binding protein of Epstein-Barr virus. *J Biol Chem.* Apr 25;266(12):7819-26.
12. Frappier L, O'Donnell M. 1991 b. Epstein-Barr nuclear antigen 1 mediates a DNA loop within the latent replication origin of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1;88(23):10875-9.
13. Guizani I, Kieny MP, Lathe R, Clertant P. 1988. Characterization of polyoma virus early proteins expressed from vaccinia virus recombinants. *Gene.* Dec 15;73(1):163-73.
14. Guo ZS, DePamphilis ML. 1992. Specific transcription factors stimulate simian virus 40 and polyomavirus origins of DNA replication. *Mol Cell Biol.* Jun;12(6):2514-24.
15. Han Y, Loo YM, Militello KT, 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. *J Virol.* Jun;73(6):4899-907.
16. Herbolme P, Bourachot B, Yaniv M. 1984. Two distinct enhancers with different cell specificities coexist in the regulatory region of polyoma. *Cell.* Dec;39(3 Pt 2):653-62.
 17. Howley, P. M. 2001. Papillomavirinae: the viruses and their replication. *Virology*. P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers: 2045-2076.
 18. Ilves I, Kivi S, Ustav M. 1999. Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. *J Virol.* May;73(5):4404-12.
 19. Janikson K. 2002. Veise papilloomiviiruse tüüp 1 ning inimese papilloomiviiruse tüüp 11 E2 valkude ja nende seostumiskohtade roll plasmiidide säilimisel jagunevates rakkudes. Tartu Ülikool.
 20. Kapoor, P., Shire, K., Frappier, L. 2001. Reconstitution of Epstein-Barr virus-based plasmid partitioning in budding yeast. *EMBO J.* Jan 15; 20(1): 222-230.
 21. Katinka M, Yaniv M. 1983. DNA replication origin of polyoma virus: early proximal boundary. *J Virol.* Jul;47(1):244-8.
 22. Kieff E. 1996. Epstein-Barr virus and its replication. *Virology*. P. M. Howley. New York, Lippincott-Raven Press: 2343-2396.
 23. Kivimäe S. 1998. Replication of chimeric replicator containing elements from Epstein-Barr Virus oriP and Bovine Papillomavirus minimal origin. University of Tartu.
 24. Lehman CW, Botchan MR. 1998. Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 14;95(8):4338-43.
 25. Li R, Botchan MR. 1993. The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell.* Jun 18;73(6):1207-21.
 26. Li R, Knight J, Bream G, Stenlund A, Botchan MR. Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome. *Genes Dev.* 1989 Apr;3(4):510-26.
 27. Lim DA, Gossen M, Lehman CW, Botchan MR. 1998. Competition for DNA binding sites between the short and long forms of E2 dimers underlies repression in bovine papillomavirus type 1 DNA replication control. *J Virol.* Mar;72(3):1931-40.
 28. Lorimer HE, Wang EH, Prives C. 1991. The DNA-binding properties of polyomavirus large T antigen are altered by ATP and other nucleotides. *J Virol.* Feb;65(2):687-99.
 29. McBride AA, Myers G. The E2 proteins. *Human Papillomaviruses 1997 Compendium*.

30. Mansky KC, Batiza A, Lambert PF. 1997. Bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen share regions of sequence similarity required for multiple functions. *J Virol.* Oct;71(10):7600-8.
31. Marechal V, Dehee A, Chikhi-Brachet R, Piolot T, Coppey-Moisan M, Nicolas JC. 1999. Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol.* May;73(5):4385-92.
32. Middleton T, Sugden B. 1994. Retention of plasmid DNA in mammalian cells is enhanced by binding of the Epstein-Barr virus replication protein EBNA1. *J Virol.* Jun;68(6):4067-71.
33. Muller WJ, Dufort D, Hassell JA. 1988. Multiple subelements within the polyomavirus enhancer function synergistically to activate DNA replication. *Mol Cell Biol.* Nov;8(11):5000-15.
34. Nilsson M, Forsberg M, You ZY, Westin G, Magnusson G. 1991. Enhancer effect of bovine papillomavirus E2 protein in replication of polyomavirus DNA. *Nucleic Acids Res.* Dec;19(25):7061-5.
35. Pallas DC, Schley C, Mahoney M, Harlow E, Schaffhausen BS, Roberts TM. 1986. Polyomavirus small t antigen: overproduction in bacteria, purification, and utilization for monoclonal and polyclonal antibody production. *J Virol.* Dec;60(3):1075-84.
36. Park P, Copeland W, Yang L, Wang T, Botchan MR, Mohr IJ. 1994. The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 30;91(18):8700-4.
37. Peng YC, Acheson NH. 1998. Polyomavirus large T antigen binds cooperatively to its multiple binding sites in the viral origin of DNA replication. *J Virol.* Sep;72(9):7330-40.
38. Petti L, Sample C, Kieff E. 1990. Subnuclear localization and phosphorylation of Epstein-Barr virus latent infection nuclear proteins. *Virology.* Jun;176(2):563-74.
39. Piirsoo M, Ustav E, Mandel T, Stenlund A, Ustav M. 1996. Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J.* Jan 2;15(1):1-11.
40. Pipas JM. 1992. Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *J Virol.* Jul;66(7):3979-85.
41. Pipas JM. 1994. Polyomaviruses – murine. General features. *Encyclopedia of Virology.* London, San Diego Academic Press
35. Pomerantz BJ, Mueller CR, Hassell JA. 1983. Polyomavirus large T antigen binds independently to multiple, unique regions on the viral genome. *J Virol.* Sep;47(3):600-10.
42. Reisman D, Yates J, Sugden B. 1985. A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. *Mol Cell Biol.* Aug;5(8):1822-32.

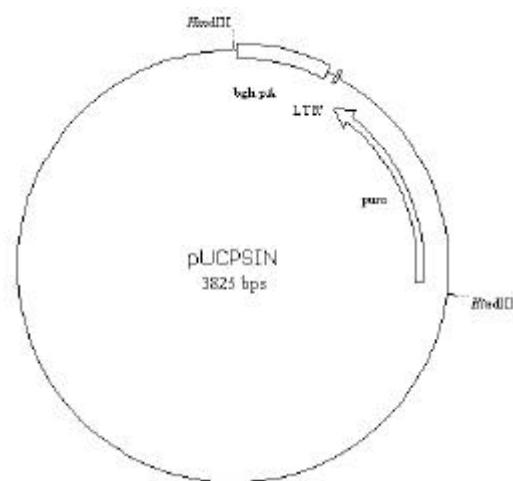
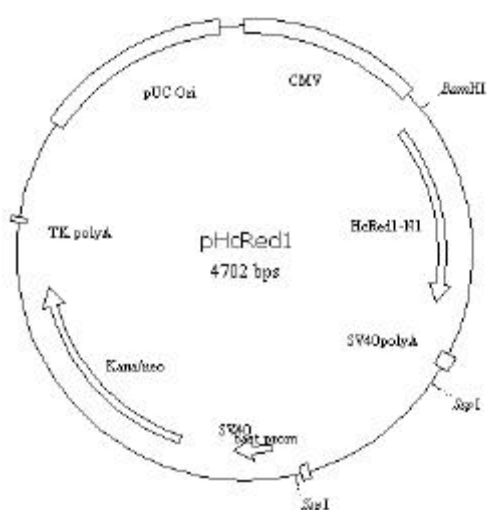
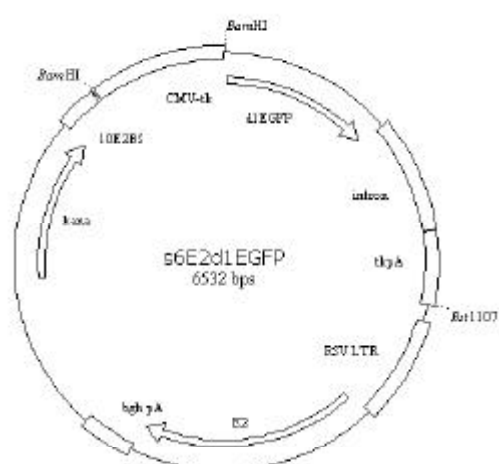
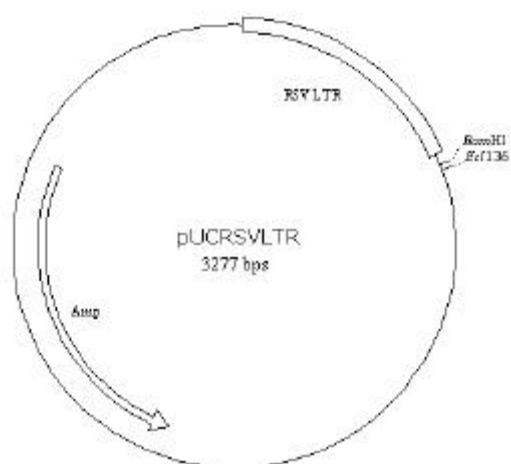
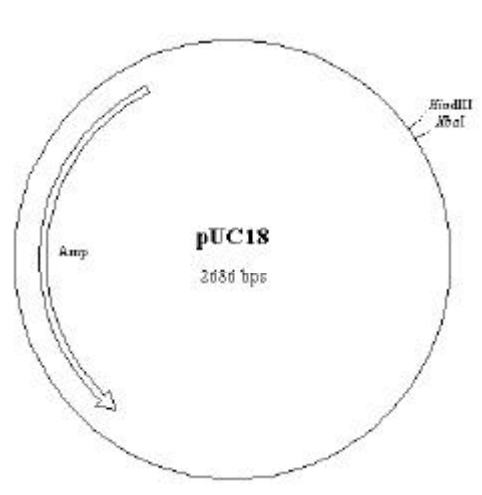
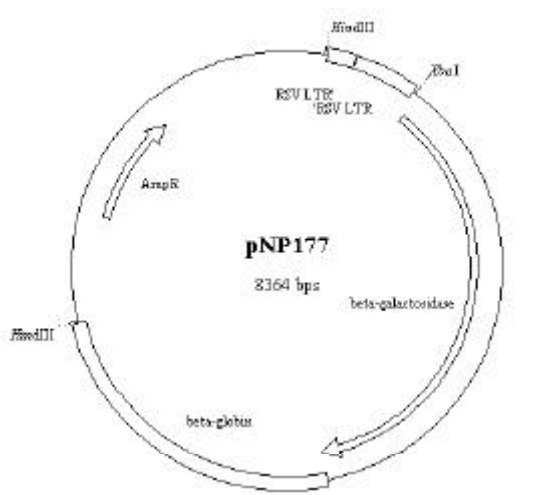
43. Sample, J. 1994. Epstein-Barr virus general features. Encyclopedia of Virology. London, San Diego Academic Press
44. Sanders CM, Stenlund A. 1998. Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. EMBO J. Dec 1;17(23):7044-55.
45. Sanders CM, Stenlund A. 2000. Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. J Biol Chem. Feb 4;275(5):3522-34.
46. Sanders CM, Stenlund A. 2001. Mechanism and requirements for bovine papillomavirus, type 1, E1 initiator complex assembly promoted by the E2 transcription factor bound to distal sites. J Biol Chem. Jun 29;276(26):23689-99. Epub 2001 Apr 25.
47. Schneider C, Weissbart K, Guarino LA, Dornreiter I, Fanning E. 1994. Species-specific functional interactions of DNA polymerase alpha-primase with simian virus 40 (SV40) T antigen require SV40 origin DNA. Mol Cell Biol. May;14(5):3176-85.
48. Sedman J, Stenlund A. 1995. Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. EMBO J. Dec 15;14(24):6218-28.
49. Sedman J, Stenlund A. 1998. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. J Virol. Aug;72(8):6893-7.
50. Sedman T, Sedman J, Stenlund A. 1997. Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. J Virol. Apr;71(4):2887-96.
51. Seki M, Enomoto T, Eki T, Miyajima A, Murakami Y, Hanaoka F, Ui M. 1990. DNA helicase and nucleoside-5'-triphosphatase activities of polyoma virus large tumor antigen. Biochemistry. Jan 30;29(4):1003-9.
52. Seo YS, Muller F, Lusky M, Hurwitz J. 1993 a. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 15;90(2):702-6.
53. Seo YS, Muller F, Lusky M, Gibbs E, Kim HY, Phillips B, Hurwitz J. 1993 b. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. Proc Natl Acad Sci U S A. Apr 1;90(7):2865-9.
54. Sheng Q, Love TM, Schaffhausen B. 2000. J domain-independent regulation of the Rb family by polyomavirus large T antigen. J Virol. Jun;74(11):5280-90.
55. Shire K, Ceccarelli DF, Avolio-Hunter TM, Frappier L. 1999. EBP2, a human protein that interacts with sequences of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 important for plasmid maintenance. J Virol. Apr;73(4):2587-95.
56. Silla T. 2001. Polüoomiviiruse replikoni ja Minichromosome maintenace Element' i sisaldavate plasmiidide transientse ja stabiilse replikatsioonivõime testimine koekultuuri tingimustes. Tartu Ülikool

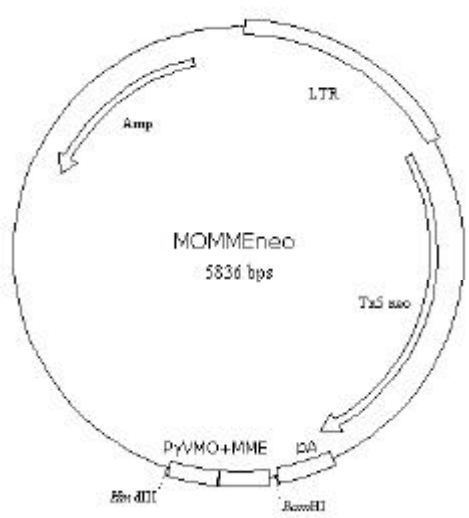
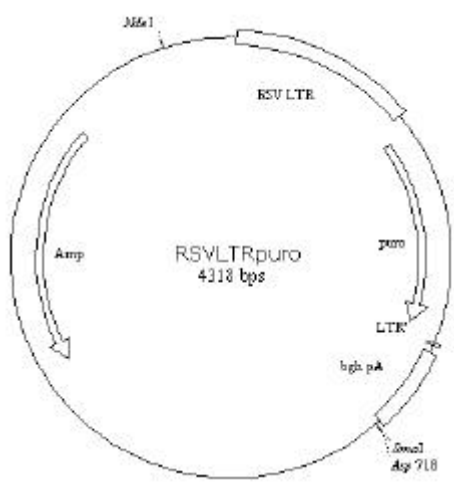
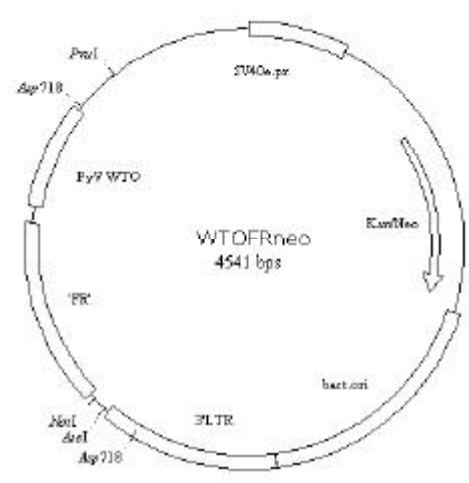
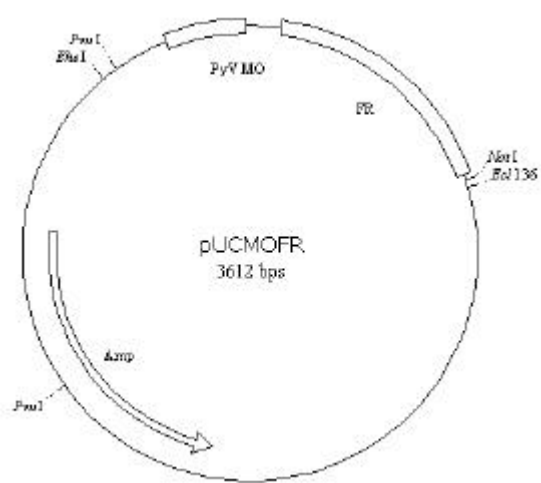
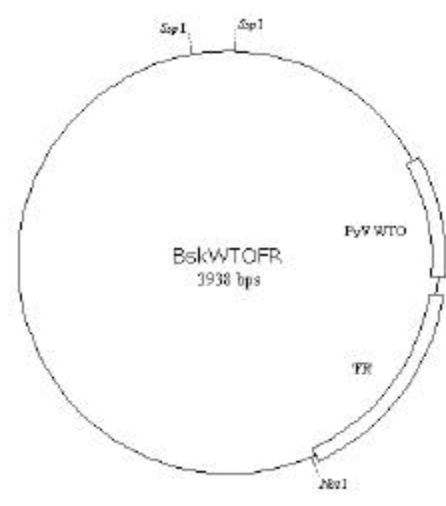
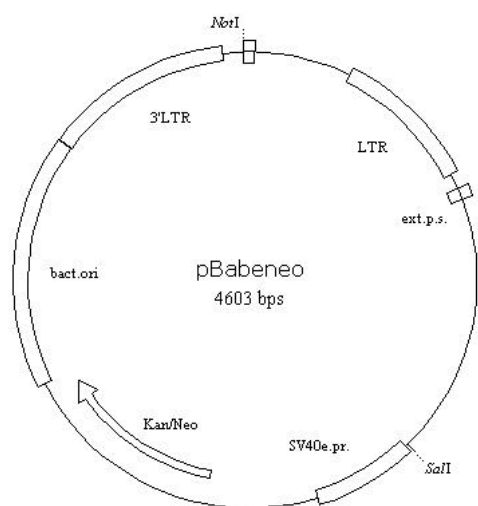
57. Skiadopoulos MH, McBride AA. 1998. Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J Virol.* Mar;72(3):2079-88.
58. Snyder L, Champs W. 1997. Incompatibility. *Molecular genetics of bacteria.*
59. Soderbarg K, Magnusson G. 1993. Lytic functions of mutant polyomavirus large T-antigen with deletion of retinoblastoma protein-binding motif. *Virology.* Mar;193(1):281-8.
60. Stenlund A. 2003. E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding. *EMBO J.* Feb 17;22(4):954-63.
61. Triezenberg SJ, Folk WR. 1984. Essential nucleotides in the polyomavirus origin region. *J Virol.* Aug;51(2):437-44.
62. Ustav E, Ustav M, Szymanski P, Stenlund A. 1993. The bovine papillomavirus origin of replication requires a binding site for the E2 transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 1;90(3):898-902.
63. Ustav M, Ustav E, Szymanski P, Stenlund A. 1991. Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J.* Dec;10(13):4321-9.
64. Ustav M, Stenlund A. 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J.* Feb;10(2):449-57.
65. Veldman GM, Lupton S, Kamen R. 1985. Polyomavirus enhancer contains multiple redundant sequence elements that activate both DNA replication and gene expression. *Mol Cell Biol.* Apr;5(4):649-58.
66. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes.* Jun;24(3):275-90.
67. Wu H, Ceccarelli DF, Frappier L. The DNA segregation mechanism of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *EMBO Rep.* 2000 Aug;1(2):140-4.
68. Wysokenski DA, Yates JL. 1989. Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus. *J Virol.* Jun;63(6):2657-66.
69. Yang L, Li R, Mohr I, Clark R, Botchan M. 1991. Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature.* 353: 628-32.
70. Yang L, Mohr I, Fouts E, Lim DA, Nohaile M, Botchan M. 1993. The E1 Protein of Bovine Papilloma Virus 1 is an ATP-Dependent DNA Helicase *PNAS.* 90: 5086-5090.
71. Yates JL, Camiolo SM, Bashaw JM. 2000. The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP. *J Virol.* May;74(10):4512-22.
72. Yates JL, Guan N. 1991. Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J Virol.* Jan;65(1):483-8.

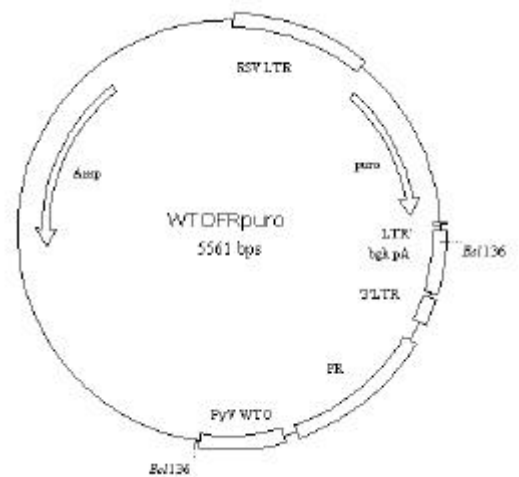
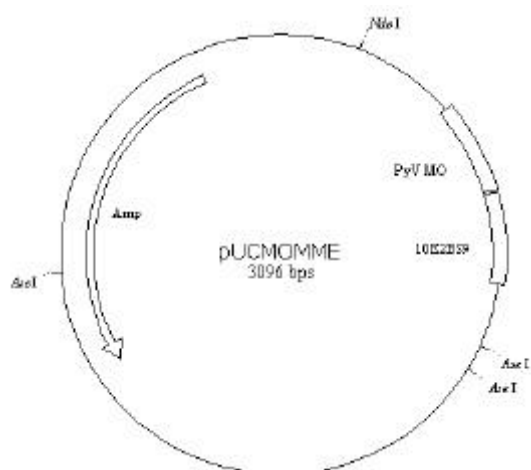
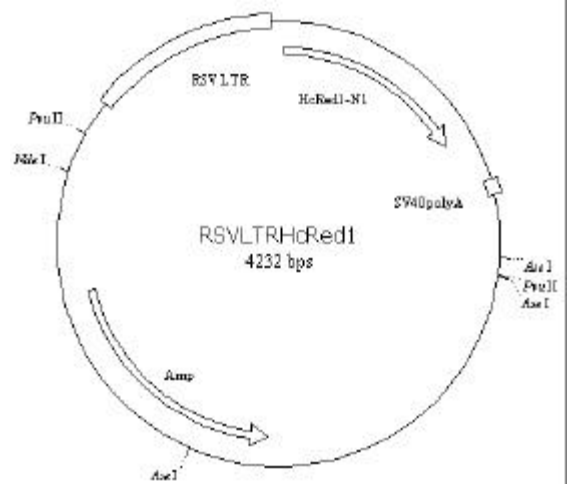
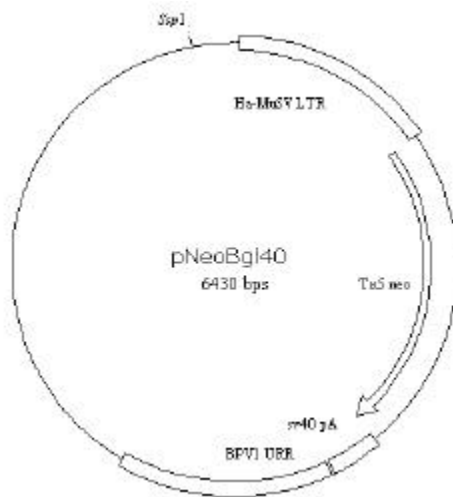
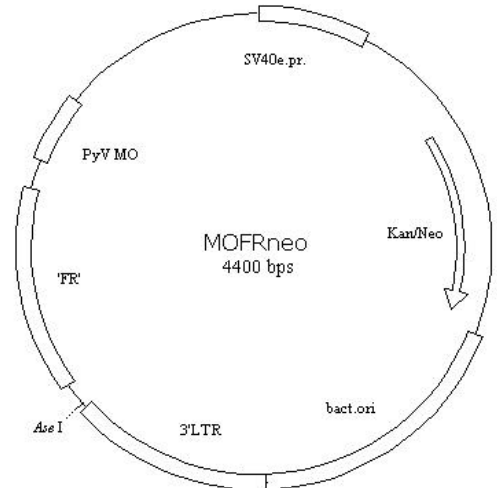
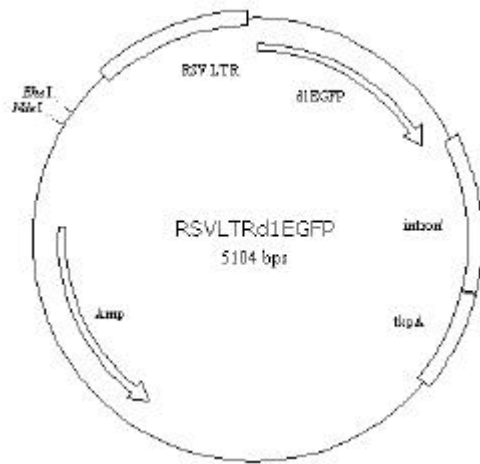
73. Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. 1984. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun;81(12):3806-10.
74. You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. 2004. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*. Apr 30;117(3):349-60.

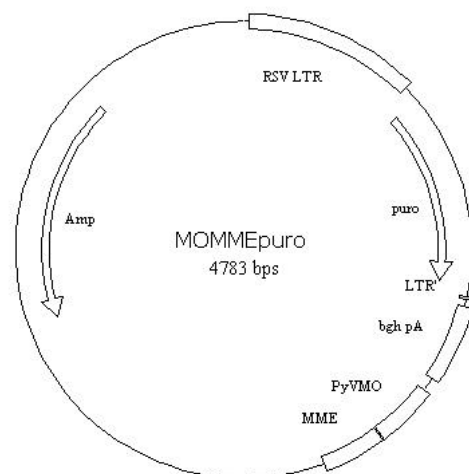
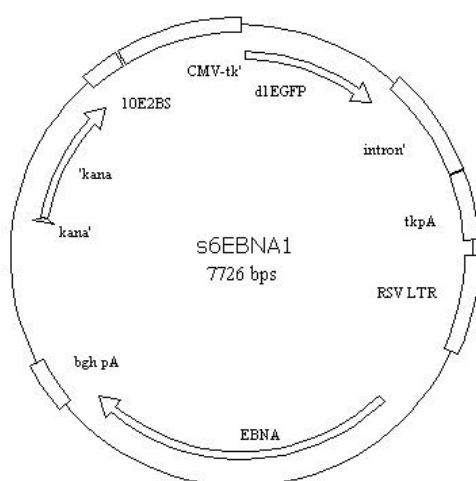
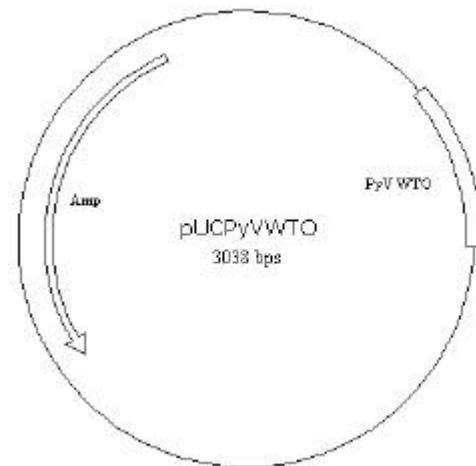
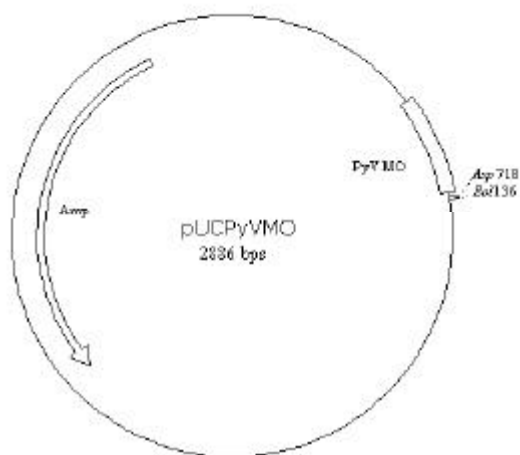
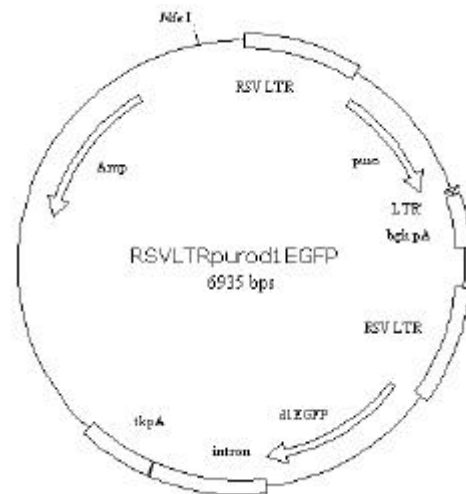
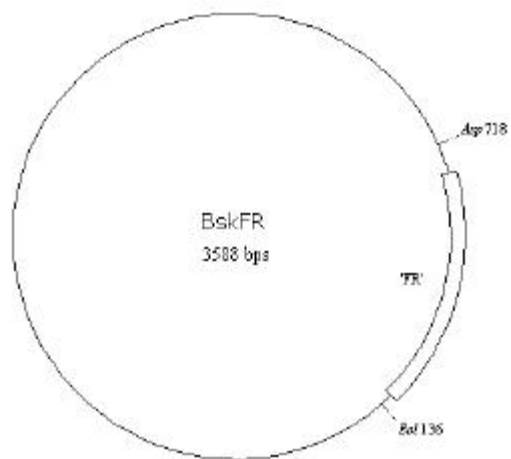
LISAD

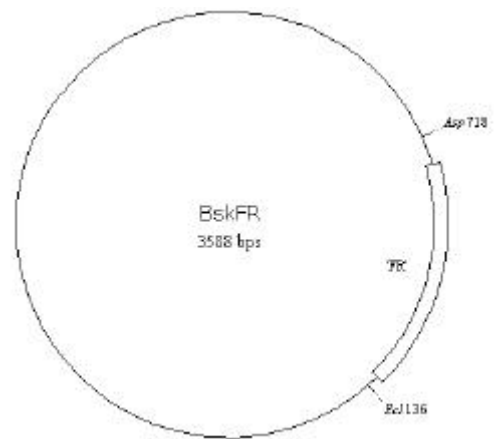
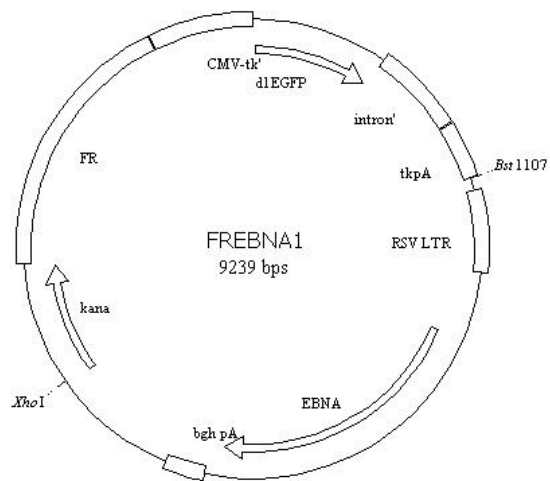
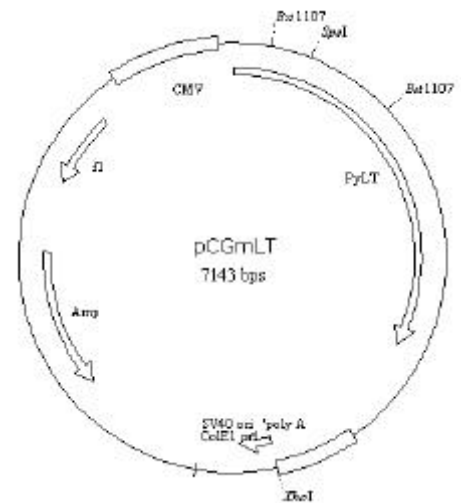
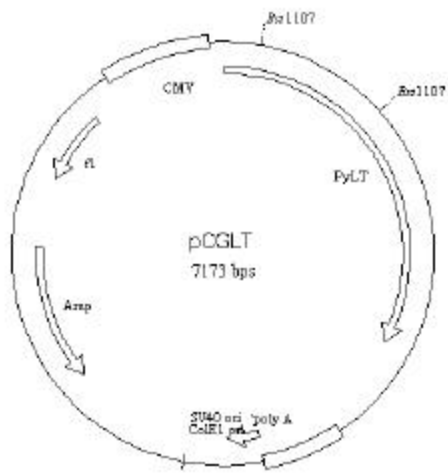
Katsetes kasutatud plasmiidid











Katsetes kasutatud fluorestseeruva valgu markeri ja antibiootikumi resistentsusmarkeriga plasmiidid

