

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

Helen Isok

**Inimese papilloomiviiruse replikatsioonivalgu E1
ekspressiooni regulatsioon ja seotus DNA replikatsiooni
efektiivsusega**

Magistritöö

Juhendaja: Ene Ustav, *Ph. D*

TARTU 2007

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
TEOREETILINE OSA	7
1. Papilloomiviiruste üldisloomustus	7
1.1. Papilloomiviiruste klassifikatsioon	7
1.2. Papilloomiviiruste genoom ja kodeeritavad valgud	7
2. Papilloomiviiruste elutsükkel	9
2.1. Papilloomiviiruse elutsükli ümberlülitus ühest faasist teise	10
2.2. Papilloomiviiruse amplifikatsioonilise DNA replikatsiooni erijuhud	10
3. Papilloomiviiruste DNA replikatsiooniks vajalikud faktorid	12
3.1. <i>Cis</i> -elemendid papilloomiviiruse DNA replikatsiooniks	12
3.2. <i>Trans</i> -faktorid papilloomiviiruse DNA replikatsiooniks	13
3.2.1. E2 valk	13
3.2.2. E1 valk	15
3.2.2.1. E1 seostumine DNA-le	16
3.2.2.2. E1 interaktsioonid rakuliste valkudega	18
3.2.2.3. E1 regulatsioon mRNA splaissimise kaudu	18
3.2.2.4. E1 post-translatsiooniline modifikatsioon ja lokaliseerimine tuuma	19
3.2.2.5. E1 valgu transleerimine polütsistronselt mRNA-lt ning E6, E7 lugemisraamide tähtsus E1 valgu ekspressioonil	21
EKSPERIMENTAALNE OSA	23
1. TÖÖ EESMÄRGID	23
2. MATERJAL JA METOODIKA	25
2.1. Rakuliinid ja söötmed	25
2.2. Kasutatud plasmiidid ja valkude ekspressioonivektorid	25
2.3. Konstrueeritud E1 ekspressioonivektorid	27
2.4. Transfektsioon elektroporatsiooni meetodil	28
2.5. Eukarüootsetest rakkudest episomaalse DNA eraldamine Hirt lüüsi meetodil	28
2.6. Replikatsioonianalüüs (<i>Southern blot</i> meetodil)	29
2.7. Valkude ekspressiooni analüüs (<i>Western blot</i> meetodil)	29
2.8. Immunofluorestsents analüüs	30

2.9.	RNA analüüs	31
3.	TULEMUSED	33
3.1.	HPV-11, -16 ja -18 E1 valgu ekspressioon erinevatelt E1 ekspressioonivektoritelt	33
3.2.	Eri tüüpi ekspressioonivektoritelt sünteesitavad HPV-11 E1 valgud initsieerivad üksteisest erineva DNA replikatsiooni.....	36
3.3.	„Kõrge riskiga” HPV subtüüpide 16 ja 18 Liider- ja Liider+ E1 konstruktidelt sünteesitavad E1 valgud initsieerivad URR-i sisaldavalt plasmiidilt replikatsiooni CHO rakkudes üksteisest erinevalt	39
3.4.	HPV-de replikatsioon ja E1 valgu süntees toimub inimese rakuliinis HeLa sarnaselt mudelsüsteemina kasutatud hamstri rakuliiniga CHO....	40
3.5.	Intron promotori ja E1 valgu kodeeriva järjestuse vahel	42
3.6.	HPV-11 intronit sisaldavatelt E1 konstruktidelt sünteesitavad E1 mRNA- d splaissitakse erineva efektiivsusega	45
3.7.	Monotsistronselt mRNA-lt (Liider-) sünteesitav E1 valk lokaliseerub 95% juhtudest tsütoplasmas	48
	ARUTELU	51
	KOKKUVÕTE	57
	SUMMARY	58
	KASUTATUD KIRJANDUS	60

KASUTATUD LÜHENDID

- AM – aktseptormutatsioon
- bp – aluspaar (*basepair*)
- BPV – veise papilloomiviirus (*Bovine Papillomavirus*)
- BSA – veise seerum albumiin (*Bovine Serum Albumine*)
- CDK – tsükliin-sõltuv kinaas (*Cyclin-Dependent Kinase*)
- CHO – hiina hamstri munasarja rakuliin (*chinese hamster ovary*)
- CK2 – kaseiin kinaas II
- CMV – tsütomegaloviirus (*Cytomegalovirus*)
- DTT – ditiotretool
- E1[^]E4 – täispika E1 splaissitud vorm
- E1BS – valgu E1 seostumiskoht (*E1 binding site*)
- E2BS – valgu E2 seostumiskoht (*E2 binding site*)
- E2C – E2 repressorvorm ilma transaktivatsiooni domäänita
- E2TA – täispikk E2 valk (*E2 transactivator*)
- E6*I – E6 intronist splaissitud mRNA produkt
- E8[^]E2C – E2 repressorvorm ilma transaktivatsiooni domäänita ja E8 järjestusega
- EDTA – etüleendiamiintetraädikhape (*EthyleneDiamineTetraacetic Acid*)
- ERK – ekstratsellulaarselt reguleeritav kinaas
- HA – hemaglutiniin
- HPV – inimese papilloomiviirus (*Human Papillomavirus*)
- IF – immunofluorestsents (*immunofluorescence*)
- IMDM – *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
- JNK – Jun-valgu N-otsa kinaas
- kDa – kilodalton
- LCR – pikk kontrollpiirkond (*Long Control Region*)
- MAPK – mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas
- MO – minimaalne *origin*
- NES – tuuma ekspordi signaal (*Nuclear Export Signal*)
- NLS – tuuma lokaliseerimise signaal (*Nuclear Localisation Signal*)
- ORF – avatud lugemisraam (*open reading frame*)
- ori – replikatsiooni initsiatsiooniks vajalik DNA järjestus (*origin of replication*)
- p53 – põhiline kasvuregulaator rakus

pA – poliadenülatsioonisait
PBS – fosfaatpuhvriga soolalahus (*phosphate buffered saline*)
PCNA – jagunevate rakkude tuuma antigeen
PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)
PFA – paraformaldehüüd
pRB – retinoblastoomist avastatud kasvuregulaator
RPA – replikatsioonivalk A (*replication protein A*)
rpm – pöörded minutis (*revolutions per minute*)
RT-PCR – *real time* PCR
SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (Sodium DodecylSulphate)
SSC – naatriumkloriidi ja naatriumtsitraadi lahus (*saline-sodium citrate*)
SV40 – *simian virus 40*
TAE – Tris-atsetaat-EDTA puhver
TE – Tris-EDTA puhver
TK – tümidiinkinaas (*thymidine kinase*)
Tris – trihüdroksumetüülaminmetaan
URR – „ülesvoolu“ paiknev regulatsiooniala (*Upstream Regulatory Region*)

SISSEJUHATUS

Naistel on emakakaelavähk sageli esinev kasvaja ning ta on üks väheseid halvaloomulisi kasvajaid, mille tekke algpõhjus on täpselt teada – nakatumine papilloomiviirusega. Enamikest uuritud muutunud morfoloogiaga emakakaelarakkudest on leitud inimese papilloomiviiruse (HPV) DNA-d. $\frac{3}{4}$ neist juhtudest on kartsinoomi tekitajaks HPV-16 subtüüp. Papilloomiviirusega nakatutakse aktiivse suguelu alguses, kuid vähkkasvaja väljakujunemise oht tekib siis, kui viirusnakkus jääb stabiilselt püsima. Enamasti tõrjutakse nakkus organismist immuunsüsteemi poolt. Samas „kõrge riskiga” subtüüpide puhul (tekitavad vähkkasvajaid, nt. HPV-16) võib viiruse DNA tungida inimese kromosoomidesse ning seal püsima jääda.

Meie laboris on juba pikemat aega uuritud veise papilloomiviiruse tüüp-1 amplifikatsioonilist ja stabiilset DNA replikatsiooni. Viimastel aastatel on uurimisobjektideks valitud rida inimese papilloomiviiruse subtüüpe ja on konstrueeritud HPV-6, -11, -16 ja -18 replikatsioonivalke E1 ja E2 efektiivselt ekspresseerivad vektorid. Nende konstruktidel on õnnestunud uurida E1 valgu tasemest sõltuvat replikatsioonimehhanismi ümberlülitust ja analüüsida erinevusi nn „madala” (HPV-11, HPV-6) ja „kõrge” riskitüübi (HPV-16, HPV-18) HPV-de replikatsiooniprotsessides.

Käesoleva töö teoreetiline osa annab ülevaate papilloomiviiruste DNA replikatsiooniprotsessis osalevatest valkudest E1 ja E2 ning kirjeldatakse viiruse amplifikatsioonilist DNA replikatsiooni. Töö eksperimentaalses osas analüüsitakse HPV-11, HPV-16 ja HPV-18 erinevatelt E1 ekspressioonikonstruktidelt sünteesitava E1 valgu mõju URR plasmiidilt lähtuvale transientsele DNA replikatsioonile. Lisaks uuritakse võimalikke mehhanisme HPV-11 E1 valgu protsessimisel.

Töö on alustatud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia instituudis mikrobioloogia ja viroloogia õppetoolis ning jätkatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis Biomeditsiini keskuses. Olen tänulik juhendamise eest Ene ja Mart Ustavile ning kõigile teistele, kes mind selle töö valmimisel on aidanud.

TEOREETILINE OSA

1. Papilloomiviiruste üldiseloostus

Papilloomiviirused on väikesed DNA viirused, mis kuuluvad sugukonda *Papillomaviridae*. Looduslikes tingimustes on papilloomiviirused vägagi liigispetsiifilised, nakatades enamikke imetajaid, aga ka mõningaid linde. Ühte liiki nakatavad papilloomiviirused jagatakse DNA nukleotiidjärjestuse alusel eri subtüüpideks. Inimese papilloomiviiruse ehk HPV-sid on iseloomustatud üle saja (zur Hausen 2002).

1.1. Papilloomiviiruste klassifikatsioon

Papilloomiviirused pole mitte ainult liigispetsiifilised vaid ka koespetsiifilised, nakatades kindla organi epiteelkude. Üks osa HPV-dest põhjustab naha epiteelkoe healoomulisi vohandeid (soolatüükaid) kätel, jalgadel ja kehal. Ligikaudu 40 HPV-d nakatavad suguelundite limaskesti, põhjustades healoomulisi kasvajaid – kondüloome. Samas on neist mõned ohtlikumad, olles seotud emakakaelavähi tekkega. Seetõttu, sõltuvalt malignatsioonivõimest, jagatakse genitaalpiirkonna papilloomiviirused „madala riskiga” ja „kõrge riskiga” HPV-deks (de Villiers *et al.* 2004, Munger *et al.* 2004, zur Hausen 2002). „Madala riskiga” papilloomiviiruse, nagu näiteks HPV-6 ja HPV-11, käsitletakse pigem inimese limasepiteeli normaalse mikrofloora osana. Enamasti eemaldatakse sellised haiguskoled immuunsüsteemi poolt. „Kõrge riskiga” HPV-d, nagu HPV-16 ja HPV-18, võivad põhjustada emakakaela düsplaasiat ja -kartsinoome.

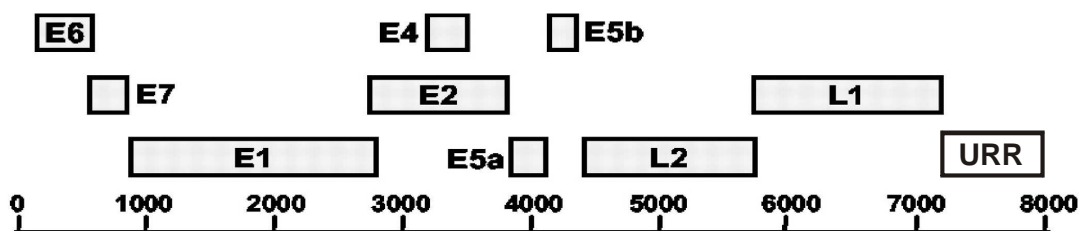
1.2. Papilloomiviiruste genoom ja kodeeritavad valgud

Papilloomiviirused on viiruste seas ühed väiksemad. Tema ümbriseta ikosaeedriline kapsiid sisaldab umbes 8 kb suurust tsirkulaarset kaheahelalist genoomset DNA-d. Genoom jagatakse kolmeks piirkonnaks: varajane kodeeriv ala (*early* – E), hiline kodeeriv ala (*late* – L), mittekodeeriv ala (*upstream regulatory region* – URR või

long control region – LCR). Kolm genoomi regiooni on kõikides papilloomviirustes eraldatud kahe poliadenülatsiooni saidiga(pA), mis omakorda jagatakse varajaseks pA ja hiliseks pA. Papilloomviiruse genoomi varajane regioon hõlmab üle 50% viiruse genoomi 5' poolest ja kodeerib kuut avatud lugemisraami ehk ORF-i (E1, E2, E4, E5, E6, E7). Hiline regioon, mis katab umbes 40% viiruse genoomist, asub varajasest regioonist allavoolu ja kodeerib L1 ja L2 ORF-e suure (L1) ja väikese (L2) kapsiidivalgu sünteesiks. Neist kahest valgust moodustub viiruse kapsiid (ld. capsid – laegas) – viiruse nukleiinhappeid ümbritsev valgukiht, mis koosneb kapsomeerühikutest ehk kapsomeeridest.

Viiruse varjastest valkudest on E1 ja E2 regulaatorvalgud, mis reguleerivad viiruse DNA sünteesi ja koordineerivad teiste viirusvalkude sünteesimist. Valgud E5, E6 ja E7 on nn. onkovalgud, mis sunnivad nakatunud rakku kiiremini kasvama ning paljunema muutes selle pilaaliseks kasvajakarakuks. Enamasti muudavad onkovalgud rakke kasvajakaradeks kahel moel: aktiveerivad rakkude kasvuretseptoreid või rikuvad rakutsükli kontrollmehhanisme. Papilloomiviirused kasutavad mõlemat rada. Onkovalk E5 aktiveerib kasvufaktorite retseptoreid, mistõttu saavad nakatunud rakud valeinformatsiooni pideva kasvamise ja pooldumise kohta. Onkovalgud E6 ja E7 rikuvad ära rakutuumas paikneva kasvukontrolli aparraadi. E6 valk interakteerub põhilise kasvuregulaatori p53-ga, takistades tema tegevust ning sundides rakku valku mitte tootma ja olemasolevat degradeerima. E7 valk interakteerub ja inaktiveerib teise olulise regulatorvalgu pRb.

Umbes 850 bp suurune kontrollregioon URR (10% HPV genoomist) ei oma valke kodeerivaid omadusi, kuid sisaldab viirusgenoomi replikatsiooniks ja transkriptsiooni regulatsiooniks vajalikke promotoreid ja *cis*-elemente.

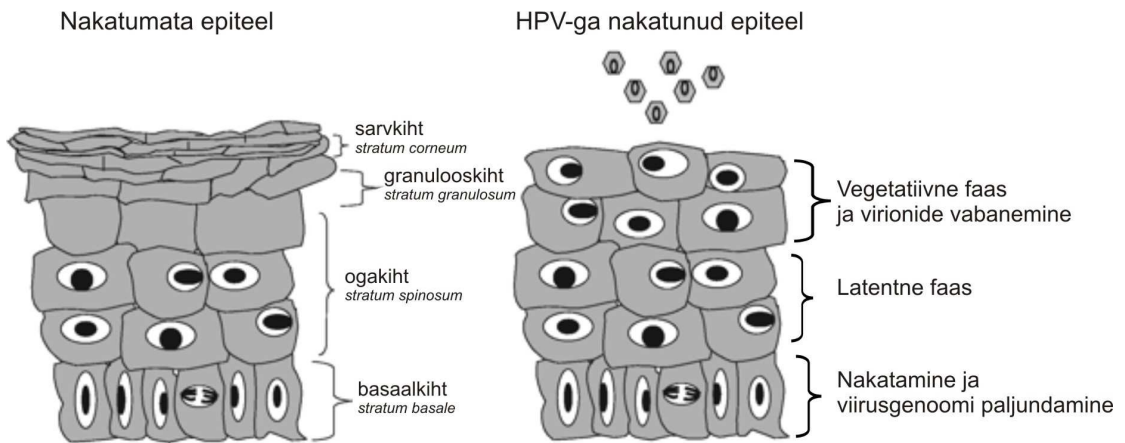


Joonis 1. HPV-11 genoomne ülesehitus. Näidatud on varajased (E) ja hilised (L) geenid ning mittekodeeriv ala URR (Stubenrauch *and* Laimins 1999).

2. Papilloomiviiruste elutsükkel

Naha pindmine osa, marrasknahk ehk epidermis, on pärisnahast eraldatud kileja basaalmembraaniga. Vahetult basaalmembraani peal asetsevad paljunemisvõimelised basaalkihi rakud, mis tagavad epidermise järjepideva uuenemise. Normaalse nakatamata basaalkihi raku jagunemisel migreerub tütarakk ülemistesse naha kihtidesse ning läbib diferentseerumisprotsessi. Talletades suures koguses lahustumatuid valke – keratiine – muutuvad basaalkihist lahkunud rakud oga- ning granulaarkihi rakkudeks, mis lõpuks täielikult sarvestuvad. Diferentseerunud rakud väljuvad rakutsüklist, kaotavad paljunemisvõime ning enamasti ei oma need rakud ka tuuma. Sarvestunud rakud kaitsevad nahka vigastuste ning mikroorganismide eest. Lõpuks sarvrakud surevad ja kooruvad soomustena nahapinnalt maha.

Papilloomiviirus nakatab haavakeste ja mikrovigastuste kaudu epiteelkoe basaalseid jagunemisvõimelisi rakke. Peale viirusgenoomi sisenemist endotsütoosi ehk rakumembraani sissesopistumise abil nakatunud rakku ja rakutuuma, vabaneb viirus oma kapsiidist ning algab varajaste valkude süntees. Kuna viiruse enda genoom on suhteliselt väike, kasutab ta oma DNA sünteesiks ja paljunemiseks peremeesraku masinavärki. Esmased kodeeritavad valgud suruvadki peremeesraku kontrollmehhanismid alla ning suunavad tema DNA paljundamise ja valgusünteesi aparaadid viiruse genoomi replitseerima. Et peremeesrakku mitte tappa, laseb viirus rakul toota ainult sada kuni kakssada viirusgenoomi koopiat. Kuna basaalkihi rakkudes hiliseid kapsiidivalke ei sünteesita toimub üsna peagi ümberlülitus latentsesse faasi. Latentses faasis replitseerub viiruse genoom sünkroonselt peremeesraku kromosoomidega, genoomi koopiaarv hoitakse suhteliselt madala ja konstantsena (Joonis 2). Kõrgelt diferentseerunud suprabasaalsetes rakkudes algab viiruse elutsükli vegetatiivne faas. Kui normaalses epiteelis kaotatakse ülemistes nahakihtides rakutuum, siis papilloomiviirusega nakatunud rakkudes hoitakse rakutsükli käigus ning rakutuum jääb alles. Viimases faasis toimub taas genoomi amplifikatsioon, ekspresseeritakse kapsiidivalgud ja assambleeritakse virionid. Papilloomiviiruse lüsogeensuse tõttu ei tapa ta peremesrakku ka nüüd ning viiruspartiklid vabanevad rakumembraani väljasopistumise ehk eksotsütoosi teel.



Joonis 2. Naha pindmine osa – epiteelkude. Normaalse ja HPV-ga nakatunud epiteeli erinevused. Näidatud on diferentseerumisel eristatavad nahakihid ja viiruse elutsükli faasid erinevates epiteelkoe kihtides (Longworth *and* Laimins 2004).

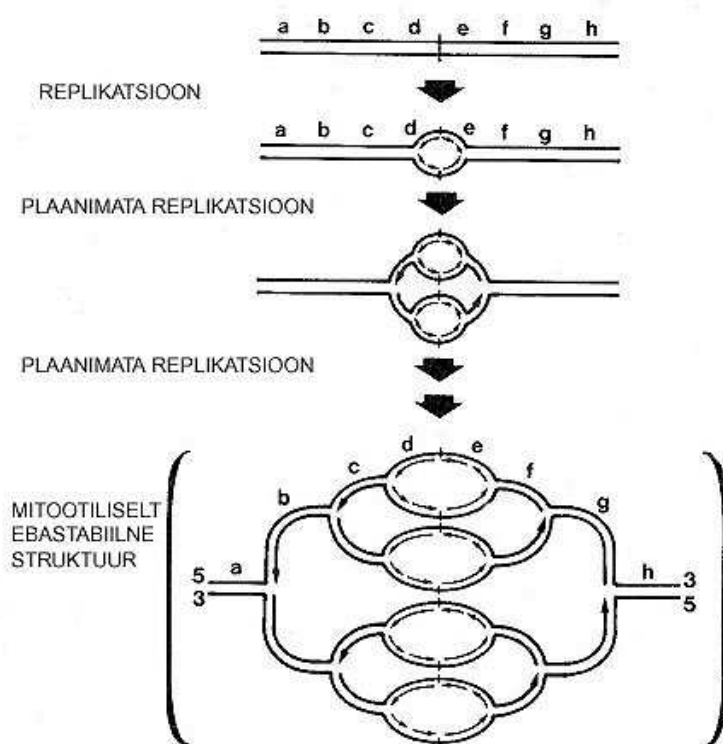
2.1. Papilloomiviiruse elutsükli ümberlülitus ühest faasist teise

Millistest faktoritest sõltub ümberlülitus ühest elutsükli faasist teise pole teada. HPV-31 puhul on välja pakutud, et ümberlülitus võiks olla seotud replikatsioonivalgu E1 kontsentratsiooni kõikumistega elutsükli jooksul. Kui E2 mRNA tase näidatakse püsivat nakkuse jooksul enamvähem konstantsena, tõuseb E1 mRNA tase vegetatiivses faasis märgatavalt (Ozbun *and* Meyers 1998). Nakatumise algul – amplifikatsioonil ja latentse faasi ajal – toimub HPV-31 E1 transkriptsioon E2-sõltuvalt varajaselt promootorilt P₉₇, vegetatiivses faasis transkribeeritakse aga E1 mRNA-d lisaks P₉₇ ka E7 lugemisraamis asuvalt diferentseerumis-sõltuvalt ja E2 regulatsioonist sõltumatult promootorilt P₇₄₂ (Klumpp *and* Laimins 1999). Lisaks arvatakse, et peale E1 ja E2 valkude tasemete mängib vegetatiivsesse faasi üleminekul rolli ka replikatsioonivalkude E1/E2 omavaheline suhe (Hubert *and* Laimins 2002).

2.2. Papilloomiviiruse amplifikatsioonilise DNA replikatsiooni erijuhud

Papilloomiviiruse vegetatiivses elutsükli faasis toimub viirusgenoomi süntees väga suurtes kogustes. Katsetes veise papilloomiviiruse tüüp 1-ga on näidatud, et kõrge E1 kontsentratsiooni juures muutub viiruse origin-ilt lähtuv replikatsioonilaad. Tekkiv DNA replikatsiooni mehhanism on sarnane „sibulakoore”-tüüpi DNA replikatsioonile, millele on iseloomulik koordineerimatu replikatsiooni initsiatsiooni-

ja elongatsiooniprotsesside toimumine (Männik *et al.* 2002). Uued initsiatsioonikompleksid formeeritakse *origin*-ile enne kui eelmised samal molekulil liikuvad replikatsioonikahvlid on jõudnud sünteesi lõpetada (Joonis 3). Mitu üksteisele järgnevat ja erineva kiirusega liikuvat replikatsioonikahvlit hakkavad teineteise tööd segama ning lagunevad enne DNA sünteesi lõpuleviimist. Selle tulemusena tekib täispikale reporter DNA-le vastavaid molekule vähe ning tulemuseks on lineaarsete DNA replikatsiooniproductide kogum. Samas BPV-1 E1 ekspresseerimisel madalal tasemel, toimub rohkem tasakaalus viiruselise DNA replikatsioon ning elongatsiooniprotsessis liikuvad replikatsioonikahvlid jõuavad enne uute initsiatsioonikomplekside moodustumist sünteesi lõpetada, mille tulemusel genereeritakse reporter-DNA suurusele vastavad replikatsiooniproductid (Männik *et al.* 2002).



Joonis 3. Sibulakoore-tüüpi replikatsiooni mudel. Replikatsiooni alguskohas formeeritakse initsiatsioonikompleksid enne kui eelmised replikatsioonikahvlid on jõudnud sünteesi lõpetada (Stark *and* Wahl 1984).

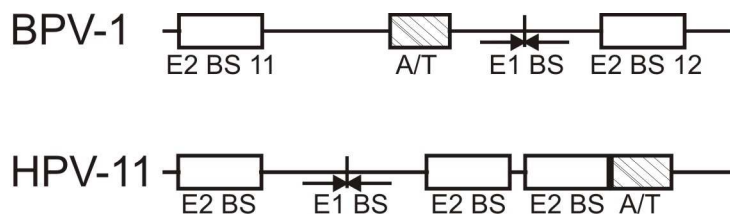
Erinevaid restriksiooniensüüme, CsCl gradienti, ultratsentrifuugimist ja nii ühe- kui kahedimensionaalset geelektroforeesi kasutades on välja selgitatud, et ülereplikatsioonil tekkinud erineva suurusega lineaarsed ja tsirkulaarsed DNA

fragmendid sisaldavad papilloomiviiruse URR piirkonda ning sellega külgnevaid genoomi osasid (Männik *et al.* 2002). Emakakaela kartsinoomidest on leitud HPV genoomi osad integreerituna peremeesraku kromosoomistikku ning enamasti sisaldavad need osad viiruse URR piirkonda ja sellega külgnevaid E6, E7 onkovalke kodeerivaid järjestusi. Taoline *origin*-i piirkonna ülereplikatsioon ja ebatüüpiliste DNA replikatsiooni vaheproduktide tekkimine võib olla seotud „kõrge riskiga” HPV-de integreerumisega peremeesraku kromosoomi ning patogeensete vähivormide tekkimisega.

3. Papilloomiviiruste DNA replikatsiooniks vajalikud faktorid

3.1. *Cis*-elemendid papilloomiviiruse DNA replikatsiooniks

Papilloomiviiruste transientses amplifikatsioonilises replikatsioonis vajalikud *cis*-elemendid asuvad genoomi URR piirkonnas. Veise papilloomiviiruse tüüp 1 puhul nimetatakse umbes 90 aluspaarist *cis*-järjestusi sisaldavat piirkonda minimaalseks oriiks (MO) (Ustav M. *et al.* 1991). MO sisaldab E1 valgu seostumiskohta (E1BS), kahte E2 valgu seostumiskohta (E2BS) ning replikatsiooni alguskoha lahtikeerdumist hõlbustav A/T rikast piirkonda (Joonis 4). Praeguseks on teada, et ka inimese papilloomiviiruse replikatsiooni *origin* sisaldab samu elemente, mis BPV-1 minimaalne ori, kuid erinevad sellest seostumiskohtade arvu ja A/T rikka piirkonna paigutuse suhtes. Näiteks HPV-11 URR piirkond sisaldab 3 E2BS-i ning A/T rikas piirkond ei asu mitte vahetult enne E1BS-i vaid 3' suunas koheselt peale kolmandat E2BS-i (Joonis 4) (Hartley *and* Alexander 2002). Lisaks on leitud erinevusi replikatsiooni *origin*-ides ka HPV-de eri subtüüpide vahel. Näiteks HPV-18 puhul on näidatud, et replikatsiooni *origin*-ina on võimeline töötama sünteetiline oligonukleotiid, mis sisaldab kahte E2BS-i (Sverdrup *and* Khan 1995). HPV-1a puhul aga piisab madala replikatsioonitaseme saavutamiseks vaid E1BS-ist. Replikatsioonitaseme tõus on saavutatav E2 valgu ja E2BS-ide lisamisel (Gopalakrishnan *and* Khan 1994) või duplitseerides *origin*-is sisalduvat E1 seostumisjärjestust (Gopalakrishnan *et al.* 1995).



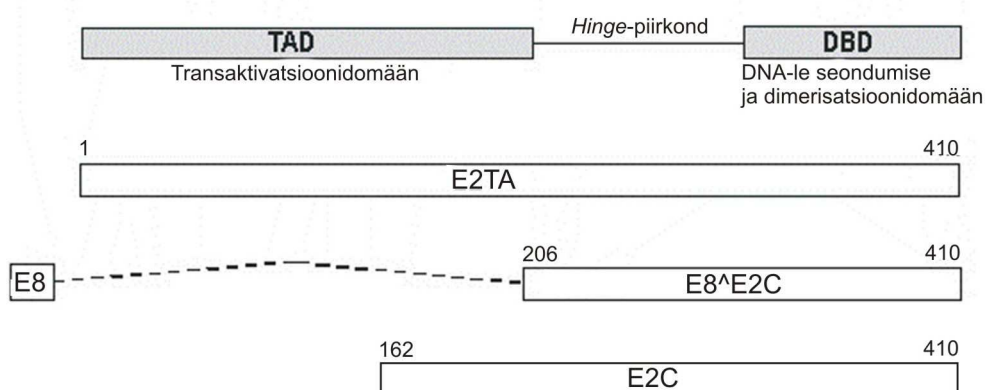
Joonis 4. BPV-1 ja HPV-11 DNA replikatsiooniks vajalike minimaalsete *cis*-elementide skeemid. Valgete kastidega on märgitud E2 valgu seondumiskohad, viirutatud kastiga A/T rikas ala ning nooltega E1 valgu seondumiskohad (Hartley *and* Alexander 2002, Ustav E. *et al.* 1993).

3.2. *Trans*-faktorid papilloomiviiruse DNA replikatsiooniks

Viiruslikest *trans*-faktoritest on papilloomiviiruse DNA replikatsiooniks absoluutselt vajalikud kaks valku – E1 ja E2 (Chiang *et al.* 1992, Del Vecchio *et al.* 1992, Frattini *and* Laimins 1994, Piirsoo *et al.* 1996, Remm *et al.* 1992, Ustav M. *et al.* 1991). Ülejäänud replikatsiooniks vajalikud faktorid assambleerib viirus, enda DNA sünteesiks, peremeesraku masinavärgist.

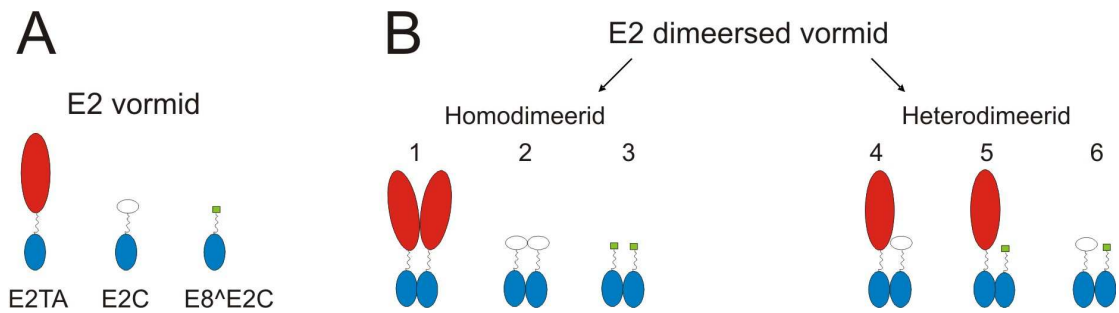
3.2.1. E2 valk

Papilloomiviiruste E2 valk on multifunktsionaalne valk, osaledes viiruse transkriptsiooni regulatsioonis, DNA replikatsiooni initsiatsioonis ja viirusgenoomi edasikandmisel tütarakkudesse. Praeguseks on teada kolm E2 ORF-ilt kodeeritavat valku – E2TA, E2C ja E8^{E2C} (Joonis 5). E2 geeniproductide funktsioneerimiseks peavad nad seostuma oma palindroomsele järjestusele (ACCN₆GGT) DNA-l, mis on esindatud mitmes korduses viiruse genoomi replikatsiooni *origin*-is (Li *et al.* 1989) ning ühes korduses E2-sõltuvate promootorite järjestuses.



Joonis 5. BPV-1 E2 valgu skemaatiline joonis. Täispikk E2 valk koosneb N-terminaalsest transaktivatsioonidomäänist, hinge piirkonnast ning C-terminaalsest DNA-le seondumise ja dimerisatsiooni domäänist. E2 repressorvalk (E8^{E2C}) koosneb lühikesest E8 ORF-st ja C-terminaalsest osast E2 ORF-ist (McBride *et al.* 1989).

Täispikk E2 valk (E2TA) koosneb kolmest osast (Joonis 5): N-terminaalne transaktivatsioonidomään, C-terminaalne DNA-le seostumise ja dimeriseerumise domään ning neid kahte eraldav *Hinge*-regioon. Kolmest kodeeritavast E2 valgust omab transaktiveerivat funktsiooni vaid täispikk E2 valk (E2TA), ülejäänud kahel puudub N-terminaalne domään, mistõttu nad käituvad transkriptsiooni repressoritena (Joonis 6 A). Samas omavad kõik kolm E2 vormi C-terminaalset DNA-le seostumise ning dimerisatsiooni domääni, võimaldades lühematel E2 vormidel konkureerida E2TA-ga seostumiskohtade pärast DNA-l ning moodustada erinevaid dimeere (Joonis 6 B). Praeguseks on välja selgitatud, et E2 repressorvormide seostumine E2TA-ga ja heterodimeerse vormi moodustumine, ei muuda teda replikatsioonis inaktiivseks – täispika E2 valgu abistavad omadused DNA replikatsioonil säiluvad (Kurg *et al.* 2006).

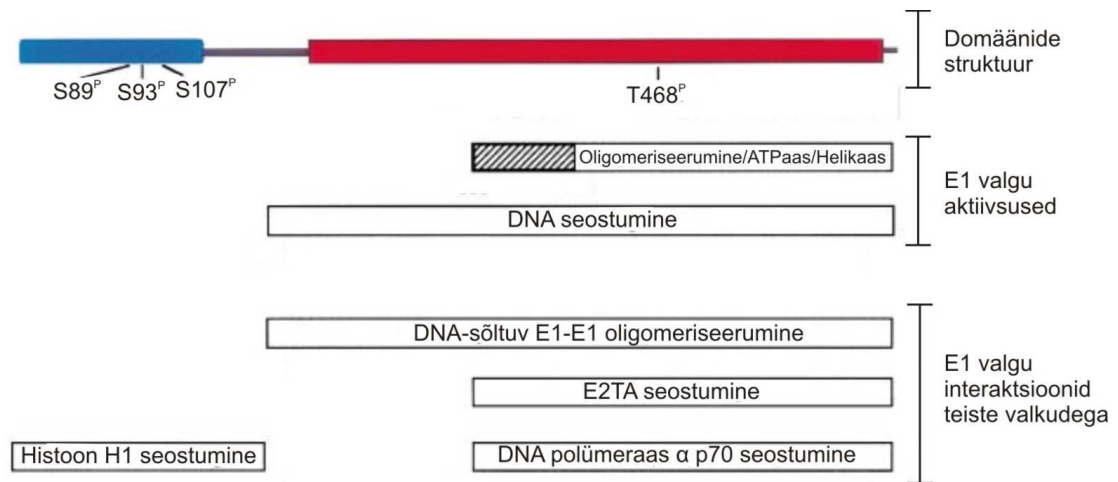


Joonis 6. E2 vormid (A) ja dimeerid (B). (B) 1 – E2TA homodimeer; 2 – E2C homodimeer; 3 – E8^{E2C} homodimeer; 4 – E2TA-E2C heterodimeer; 5 – E2TA-E8^{E2C} heterodimeer; 6 – E2C-E8^{E2C} heterodimeer. Skeem on koostatud artikli (Kurg *et al.* 2006) põhjal.

3.2.2. E1 valk

E1 valk täidab põhilise replikatsioonivalgu funktsioone, omades *origin*-i äratundmiseks, DNA ahelate lahtisulatamiseks ja helikaasina töötamiseks vajalikke aktiivsusi (Hughes *and* Romanos 1993, Seo *et al.* 1993a, Yang L. *et al.* 1991). Ligikaudu 68 kDa valk koosneb kolmest domäänist (Joonis 7): N-terminuses paiknev domään, mille funktsioonid pole täpselt teada, varieeruva pikkusega keskosa, mida seostatakse DNA-d siduva aktiivsusega ja C-terminaalne domään, mis omab ATPaasid ja helikaasid ning lisaks ka E2 valguga seostumise aktiivsusi. E1 valgu ATPaasid ja helikaasid aktiivsus avaldub vaid heksameerses olekus (Fouts *et al.* 1999, Rocque *et al.* 2000, Sedman J. *and* Stenlund 1998, White *et al.* 2001). Sarnane heksameerne kompleks moodustub ka SV40 suure T-antigeeni puhul (Mastrangelo *et al.* 1989). Nii SV40 suure T-antigeeni kui ka papilloomiviiruste E1 puhul ümbritseb replikatsioonivalgu kompleks DNA-d nii, et see läbib heksameerse tsentri (Joonis 8 D). E1 valgu 3′ → 5′ heksameerse helikaasi funktsionaalsust on näidatud mitmesugustel erinevatel substraatidel – kaheaahelalistel DNA fragmentidel, tsirkulaarsel kaheaahelalisel DNA-l ning tsirkulaarsel üheaahelalisel DNA-l, millel on osalised kaheaahelalised regioonid (Seo *et al.* 1993a, Yang L *et al.* 1993). *In vitro* replikatsiooni katsega on näidatud, et kõrge E1 kontsentratsiooni korral initsieeritakse replikatsioon ka siis kui substraadil puudub *origin*-i piirikond. Madalatel E1 kontsentratsioonidel on aga *origin*-ilt algava replikatsiooni toimumiseks

absoluutselt vajalik E2 valgu olemasolu (Kuo *et al.* 1994, Liu *et al.* 1995, Yang L. *et al.* 1991).

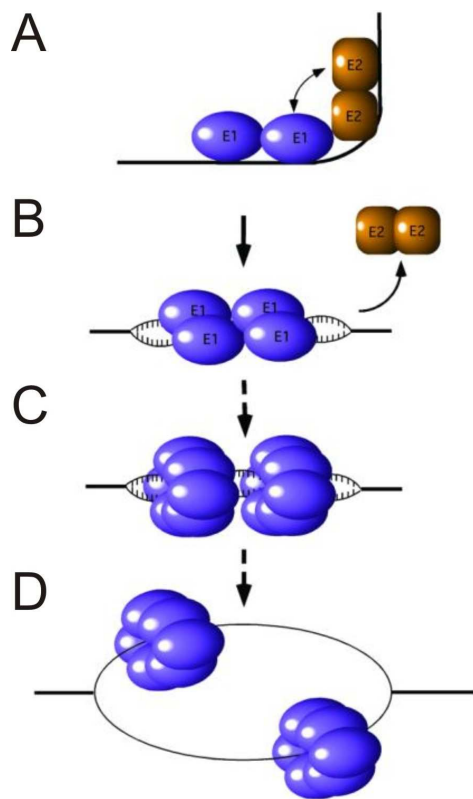


Joonis 7. HPV-11 E1 valgu struktuur, aktiivsused ja interaktsioonid teiste valkudega. Näidatud on domäänide struktuurne paigutus, E1 aktiivsuste eest vastutavad piirkonnad ning peremeesraku valkudega interakteeruvad regioonid. Domäänide arhitektuuri skeemil on ära märgitud fosforüleeritavad seriini ja treoniini jäägid, numbrid viitavad aminohapetele (Wilson *et al.* 2002).

3.2.2.1. E1 seostumine DNA-le

BPV-1-1 on identifitseeritud 18 bp pikkune järjestus, mis on piisav spetsiifiliseks E1 seostumiseks (Holt *et al.* 1994, Mendoza *et al.* 1995, Sedman T. *et al.* 1997, Ustav M. *et al.* 1991). Nimetatud järjestus asub viiruse replikatsiooni *origin*-is, mis sisaldab, lisaks E1 palindroomsele järjestusele, E1BS-ile, kahte E2BS-i ja A/T rikast piirkonda (vt. peatükk 3.1. *Cis*-elemendid papilloomiviiruse DNA replikatsiooniks). Replikatsiooni *origin*-il märgistatakse esmalt, E1 ja E2 kompleksi moodustumisega, ära replikatsiooni alguspunkt ning seejärel initsieeritakse kahe heksameerse E1 kompleksi teke (Joonis 8) (Enemark *et al.* 2000, Sedman J. and Stenlund 1998). Efektiveks E1-DNA kompleksi formeerumiseks on vajalikud 5' ja 3' suunas asuvad külgmised mittespetsiifilised regioonid (Holt *et al.* 1994). Keemilise *footprinting*-u (Sanders and Stenlund 1998, Sanders and Stenlund 2000, Sanders and Stenlund 2001, Sedman T. *et al.* 1997), DNaaS I (Sedman T. *et al.* 1997, Ustav M. *et al.* 1991, Yang L. *et al.* 1991) ja eksonukleas III (Holt *et al.* 1994) katsetega on tõestatud, et E1

assambleerumine *origin*-i järjestusele kaitseb temast 5' ja 3' jäävaid külgmisi järjestusi.



Joonis 8. Skemaatiline joonis E1 valgu assambleerumisest DNA-le ja konversioonist heksameerseks replikatiivseks DNA helikaasiks. **A** – E1 valk seondub koos E2 valguga järjestus-spetsiifiliselt *origin*-i piirkonnaga formeerudes E1-E2-DNA kompleksi. Kompleksi moodustumisega kaasneb DNA järsk painutamine (Gillitzer *et al.* 2000). **B** – ATP-sõltuva protsessi tulemusena tõrjutakse E2 kompleksist välja ning uued E1 molekulid liidetakse kompleksiga tekitades heksameerse E1 vormi. **C** – DNA lahtisulamine mõlemal pool E1 kompleksi. **D** – mõlemale DNA ahelale assambleerub E1 heksameerne helikaas (Enemark *et al.* 2002).

Efektiivseks E1 valgu laadimiseks *origin*-ile on, peale E1 ja E2 seostumiskoha, vajalik viirusliku transkriptsioonifaktori E2 ja dimeerse E1 kompleksi moodustumine (Lusky *et al.* 1994, Seo *et al.* 1993b, Yang L. *et al.* 1991). E2 valk tõstab E1 järjestusspetsiifilisust palindroomse järjestuse suhtes DNA-l (Bonne-Andrea *et al.* 1997, Sedman T. *et al.* 1997, Seo *et al.* 1993b) ning stimuleerib E1 võimet *origin*-i lahti harutada (Gillette *et al.* 1994, Sanders and Stenlund 2000, Seo *et al.* 1993b). Peale E1-E2-DNA kompleksi moodustumist, seonduvad ori piirkonda uued E1

molekulid ning E1 oligomeriseerub. Oligomeriseerumine tõrjub ATP-sõltuvalt E2 valgu kompleksist välja (Sanders *and* Stenlund 1998, Sanders *and* Stenlund 2000, Sanders *and* Stenlund 2001). E1-DNA kompleksi moodustumisel hakkab *origin*-i piirkond mõlemalt poolt E1 kompleksi lahti sulama ning lõpuks assambleeruvad kummalegi DNA ahelale E1 heksameersed helikaasid (Joonis 8).

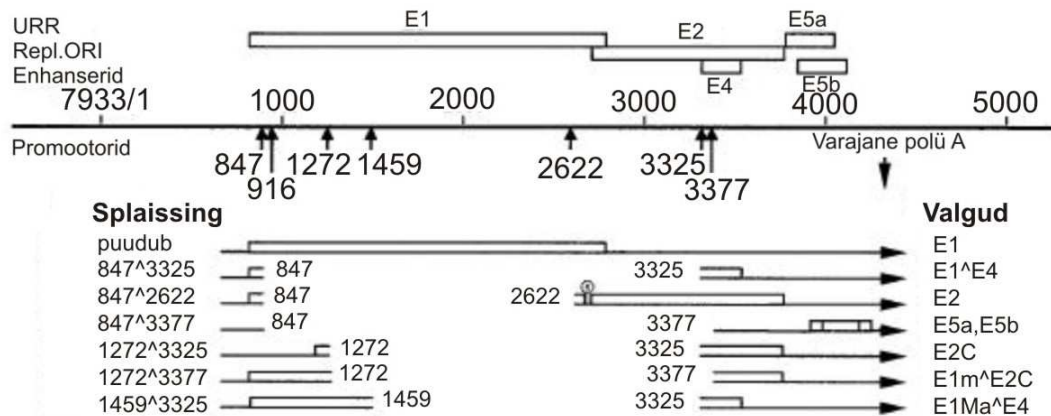
3.2.2.2. E1 interaktsioonid rakuliste valkudega

Kuna papilloomiviiruste genoom on suhteliselt väike (umbes 8000 bp), kasutab viirus oma DNA replikatsiooniks rakulist masinavärki. Rakulised replikatsioonivalgud osalevad replikatsioonikompleksi moodustumisel, DNA kaksikahela lahtikeerdumisel ja polümeraaside laadimisel replikatsioonikompleksile, mille tagajärjel initsieeritakse DNA süntees (Melendy *et al.* 1995). Vajalikest rakulistest faktoritest on praeguseks *in vitro* katsetega identifitseeritud replikatsioonivalk A (RPA), replikatsioonifaktor C, jagunevate rakkude tuuma antigeen (PCNA), DNA polümeraas α -primaas ja DNA polümeraas δ . E1 valgu seosutmine DNA polümeraas α -primaasiga aitab papilloomiviiruse *origin*-ile kohale tuua teisi rakulisi replikatsioonivalke (Masterson *et al.* 1998, Park *et al.* 1994). Nii SV40 T antigeen kui ka papilloomiviiruste E1 valk interakteerub polümeraas α -primaasi heterotetrameeriga. HPV-11 (Amin *et al.* 2000, Conger *et al.* 1999) ja HPV-16 (Masterson *et al.* 1998) puhul on näidatud, et DNA polümeraas α -primaasi p70 subühik konkureerib E2 valguga E1-l asuvate järjestustega seostumise poolest (Joonis 6; E1 interaktsioonid teiste valkudega). Järelikult saab DNA polümeraas α -primaas seostuda initsiatsioonikompleksiga alles peale E2 vabastamist.

3.2.2.3. E1 regulatsioon mRNA splaissimise kaudu

Viirusgenoomi efektiivseks paljundamiseks on vajalik täispika E1 valgu süntees. Looduslikes tingimustes hoitakse E1 valgu taset suhteliselt madalana. Imselt viiks E1 valgu liiga kõrge kontsentratsioon viiruse DNA replikatsiooni kontrolli alt välja – tõestatud labori tingimustes kõrge E1 valgu kontsentratsiooni korral (Männik *et al.* 2002). Täispika E1 valgu sünteesi kontrollimiseks kasutab näiteks inimese papilloomiviiruse tüüp 11 ühe variandina alternatiivset mRNA splaissingut, mille tõttu toimub enamikes polütsistronsetes pre-mRNA-des splaissing kas 847 nt-st kuni

2622 nt-ni (tekib E2 valk) või 847 nt-st kuni 3325 nukleotiidini (tekib E1^E4 valk) (Joonis 9). Kunstlikes ekspressioonitingimustes on täispika E1 valgu kõrgem tase saavutatud HPV-11-1 ja HPV-18-1 põhilise splaissingu doonorsaidi muteerimisega algusega 4. koodoni juurest (Deng *et al.* 2003).



Joonis 9. HPV-11 varajased lugemisraamid E1 kuni E5b ning nende poolt kodeeritud valgud. Vertikaalsete nooltega on tähistatud splaissingu doonor- (847, 916, 1272, 1459) ja aktseptorkohad (2622, 3325, 3377). E1 sisaldavate mRNA-de splaissinguproduktid on esitatud vasakus tulpas ja neile vastavad valkude nimetused paremas tulpas (Deng *et al.* 2003).

3.2.2.4. E1 post-translatsiooniline modifikatsioon ja lokalisatsioon tuuma

E1 valgu funktsioneerimiseks on vaja teda aktiivselt tuuma importida. Mõnest aluselise aminohappes koosnev tuuma lokalisatsiooni signaal NLS identifitseeriti esimesena SV40 T antigeenil importiin α -ga interakteeruva motiivina (Goldfarb *et al.* 1986). BPV-1 E1 omab N-terminuse lähedal kaheosalist NLS-i (Leng *et al.* 1994, Lentz *et al.* 1993). Klassikaline NLS-sõltuv import tuuma on kaheastmeline protsess. Esimeses etapis toimub tuuma transporditava valgu seostumine tema NLS järjestuse kaudu importiin α/β kompleksiga, millele järgneb seostumine tuumapoori kompleksiga. Teises etapis toimub translokatsioon läbi membraani, kus Ran-GTP interaktsiooniga vabastatakse kompleksist importiin β (Gorlich *and* Kutay 1999, Macara 2001). Inimesel on 6 importiin α valku ($\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ ja $\alpha 7$) (Hogarth *et al.* 2006), millest kolmel ($\alpha 3$, $\alpha 4$ ja $\alpha 5$) on näidatud interaktsioon BPV-1 E1-ga *in vitro*. Võimalik, et ka *in vivo* tingimustes kasutatakse E1 tuuma transportimiseks importiin α/β rada (Bian *et al.* 2007). α/β transpordi kasutamine E1 puhul on

kooskõlas ka teiste uuringutega, kus kirjeldatakse mitmete teiste papilloomiviiruse valkude – L1 (HPV-11, HPV-16 ja HPV-45), L2 (HPV-16) ja E6 (HPV-16) – transportimist tuuma α 1/ β 1 raja kaudu (Darshan *et al.* 2004, Le Roux *and* Moroianu 2003, Nelson *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2003, Nelson *et al.* 2000). Tundub, et papilloomiviirused kasutavad põhilise mehhanismina suuremate viiruslike valkude transportimiseks tuuma NLS-sõltuvat α / β rada.

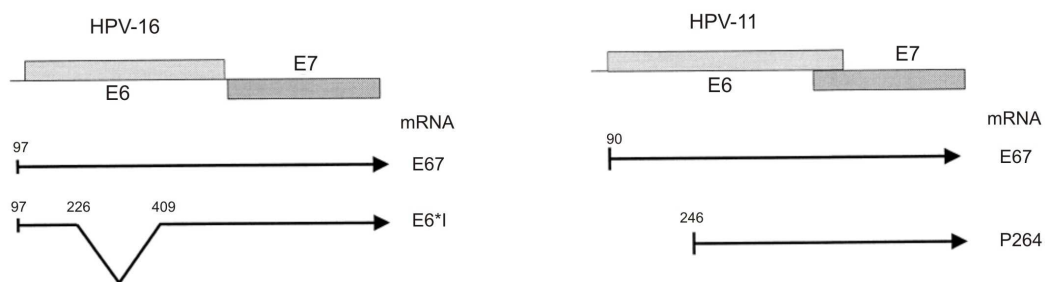
Efektiivne import tuuma on sageli modulleeritud ka fosforüleerimisega (Jans *and* Hubner 1996) või sumoüleerimisega (Terui *et al.* 2004). E1 valgu lokalisatsiooni ja repliatsiooni aktiivsust reguleerivad tsükliin/tsükliin-sõltuvad kinaasid (cdk-d). HPV-11 ja BPV-1 E1 valgud seonduvad tsükliin E-ga kõrge afiinsusega. *In vivo* BPV-1 E1 valgu fosforüleerimine tsükliin E/cdk2-ga tõstab tema eksporti tuumast välja (Hsu *et al.* 2007). Samas HPV-11 puhul on E1 fosforüleerimine cdk2 poolt oluline tuumas püsimiseks ja efektiivseks replikatsiooni initsieerimiseks viiruse *origin*-ilt (Deng *et al.* 2004, Lin *et al.* 2000, Ma *et al.* 1999). HPV-11 E1 omab nelja potentsiaalset tsükliin-kinaasi fosforüleerimissaiti: S89, S93, S107 ja T468, millele kõigile järgneb proliini jääk (Joonis 7). S107 asub potentsiaalse tuuma ekspordi signaali läheduses ning fosforüleerimine S107-st tsükliin E/cdk2 või tsükliin A/cdk2-ga inaktiveerib tuuma ekspordi signaali NES (Deng *et al.* 2004). *In vitro* tingimustes on näidatud, et E1 valgu fosforüleerivad kas cdk 2 või cdk1 kompleksid sobiva tsükliiniga, kuid ei fosforüleeri tsükliin D/cdk4 kompleks (Ma *et al.* 1999). Seega on E1 valk tuumas vaid S ja G2 faasis, kui cdk2 ja cdk1 on aktiivsed, ühendades seeläbi E1 valgu tuumas säilimise ja HPV DNA replikatsiooni peremehe rakutsükliga. Fosforüleerimine S89 ja S93-st MAPK, ERK või JNK-ga on kriitiline etapp efektiivseks E1 importimiseks tuuma (Yu *et al.* 2007). Enamik E1-st lokaliseerub tsütoplasmas kui muteeritakse kas NLS motiiv, MAPK substraadi sait või MAPK sidumise motiiv. Siiski toetasid NLS mutatsiooniga E1 valgud mõningal määral transientset replikatsiooni. Ilmselt osa E1 valgust imorditakse tuuma tugevat NLS signaali omava, E1 valgu funktsionaalse partneri, E2 „kukil”(Zou *et al.* 2000).

3.2.2.5. E1 valgu transleerimine polütsistronselt mRNA-lt ning E6, E7 lugemisraamide tähtsus E1 valgu ekspressioonil

Papilloomiviiruse replikatsioonivalgu E1 ekspressioonitase on osutunud madalaks, kui E1 ORF on kloonitud vektorisse ilma külgneva järjestuseta (Remm et al. 1999). Ekspressioonitase tõuseb märgatavalt kui E1 avatud lugemisraami ette vektoris on kloonitud 700-900 bp-ne järjestus HPV genoomist. Vajalikuks osutunud ala sisaldab kahte avatud lugemisraami E6 ja E7 valkudele ning asub, nii viiruse genoomis, kui kunstlikes E1 ekspressioonivektorites, vahetult enne E1 ORF-i. Kompaktses HPV genoomis paikneb ainus varajane promootor E6 geeni ees ning sellelt toimub varajaste geenide E6, E7, E1 ja E2 ekspressioon. cDNA kloonimise ja pöörd-transkriptaas PCR-iga on selgunud, et mitmed HPV transkriptid kodeeritakse bitsistronselt või polütsistronselt mRNA-lt (Doorbar *et al.* 1990, Rohlf *et al.* 1991, Sherman *et al.* 1992). Näiteks HPV-18-1 ekspresseeritakse E1 valku E6, E7 ja E1 sisaldavalt mRNA-lt (Remm et al. 1999).

Paljud DNA viirused, nagu näiteks SV40 (Fanning 1998, Khoury *et al.* 1980, Whalen *et al.* 1999) ja inimese adenoviirused (tüüp 2, 11 ja 15), kasutavad geeniekspressiooni reguleerimiseks mRNA splaissingut (Chow *et al.* 1979, Kanopka *et al.* 1998, Larsson *et al.* 1991). HPV-31 puhul arvatakse, et E6 ORF-is 211-412 nt juures paikneva introni splaissing võib mõjutada E1 ja E2 geeniekspressiooni. E6 avatud lugemisraamis tehtud splaissoonid või -aktseptor mutatsioonid vähendavad HPV-31 genoomi transientse DNA replikatsiooni taset (Thomas *et al.* 1999). Ilmselt läbivad enamik E1 kodeerivatest mRNA-dest splaissingu E6 ORF-is ja viiruse DNA replikatsioon on maha-reguleeritud introni splaissimata jätmisega (Hubert *and* Laimins 2002). Kogu E6 introni järjestuse puudumine ei viinud aga kõrge replikatsiooni efektiivsuseni, mistõttu võib arvata, et splaissing E6 ORF-is ei ole ainuke negatiivne E1 ekspressiooni reguleerimise meetod. E6 introni 3' otsa asendamisel heteroloogse introniga toimus replikatsioon, võrreldes metsiktüüpi HPV-31 genoomiga, samaväärselt. mRNA splaissingu protsess võib suurendada E1 kodeeriva mRNA stabiilsust ja on seega vajalik efektiivseks E1 protsessimiseks (Hubert *and* Laimins 2002).

„Kõrge riskiga” (HPV-16, -18 ja -31) ja „madala riskiga” (HPV-11, -6) papilloomiviirustel on E6 lugemisraamis leitud struktuurne erinevus. „Kõrge riskiga” HPV-del esineb E6 avatud lugemisraamis intron (Joonis 10) ning splaissitud mRNA produkti nimetatakse E6*I mRNA-ks (Smotkin *and* Wettstein 1986). „Madala riskiga” HPV-del E6 ORF-is intronit ei ole ning E6 ees asuvalt promootorilt (HPV-11 P₉₀) sünteesitakse vaid täispikka polütsistronset mRNA-d. „Madala” ja „kõrge” riskiga HPV-de erinevusi E6 avatud lugemisraamis on uuritud eelkõige onkovalgu E7 protsessimise seisukohast lähtudes (Stacey *et al.* 1995). Replikatsioonivalgu E1 protsessimise eripärast „madala riskiga” HPV-del pole siiani eriti midagi teada.



Joonis 10. HPV-16 ja HPV-11 osaline genoomne organisatsioon ja mRNA struktuurid. Ülemine rida mõlemal tulbal näitab E6 ja E7 avatud lugemisraamide paigutust genoomis. Nooltega jooned tähistavad tekkivaid mRNA struktuure ning numbritega on märgitud promootorite asukohad ja splaissingu kohad mRNA-l (Stacey *et al.* 1995).

EKSPERIMENTAALNE OSA

1. TÖÖ EESMÄRGID

Produktiivse elutsükli jooksul on HPV avatud lugemisraamid ekspresseeritud polütsistronse mRNA-na kahelt viiruslikult promootorilt – üks neist on varajane promootor, mis on diferentseerumisest sõltumatu, ning teine on hiline promootor, mis aktiveeritakse peale peremeesraku diferentseerumist granulooskihi ja sarvkihi rakkudeks. Viiruse DNA replikatsiooniks ja peremeesraku üle kontrolli saavutamiseks vajalikud varajased valgud – E1, E2, E6, E7, E5 – ekspresseeritakse esmalt E6 lugemisraami ees paiknevast diferentseerumisest sõltumatult promootorilt. Rakkude suundumisel diferentseerumisele lülitatakse sisse E7 avatud lugemisraamis asuv hiline promootor, millelt transkribeeritakse replikatsiooniks ning kapsiidi assambleerumiseks vajalikke valke. Looduslikes tingimustes hoiab viirus oma põhilise replikatsioonivalgu E1 taset madalal, tõstes seda vaid siis kui on vaja kiirelt oma genoomi koopiaarvu suurendada – näiteks nakatumise algfaasis jätkusuutlikuks paljunemiseks, või hilisemas faasis virionide assambleerumiseks.

Labori tingimustes on tõestatud, et papilloomiviiruse DNA replikatsiooniks on minimaalselt vajalikud viiruslikud elemendid replikatsioonivalgud E1 ja E2 ning nende seostumiskohti omav *origin*-i piirkond DNA-l. Mõned aastad tagasi tehti meie laboris kindlaks, et kõrgetel E1 tasemetel muutub BPV-1 URR-i sisaldavatelt plasmiididelt lähtuv replikatsioonilaad – lülitatakse ümber ebatüüpilisele replikatsiooni moodusele, mille tulemusel toimub tugev *origin*-i piirkonna ülereplikatsioon. Tulemuseks saadakse palju erineva suurusega URR piirkonda sisaldavaid lineaarseid fragmente (Männik *et al.* 2002). Need fragmendid sarnanevad oma ülesehituselt emakakaelakartsinoomi rakkudest leitud integreeritud HPV-de järjestustega, millest tekkis hüpotees, et sarnaselt veise papilloomiviirusega võiks ka inimese papilloomiviiruste puhul kõrgetel E1 valgu kontsentratsioonidel põhimõtteliselt aset leida tasakaalust väljaviidud sibulakoore-tüüpi DNA replikatsioon. Viimastel aastatel on meie laboris õnnestunud konstrueerida efektiivselt HPV-11, -16 ja -18 täispikka E1 valku ekspresseerivad vektorid. Need konstruktid

võimaldavad meil süsteemsemalt uurida ja võrrelda „madala” (HPV-11) ja „kõrge” (HPV-16 ja -18) riskiga HPV-de DNA replikatsiooni.

Minu töö eesmärgiks oli testida konstrueeritud HPV-11, HPV-16 ja HPV-18 E1 ekspressioonivektorite mõju vastava HPV subtüübi URR plasmiidilt lähtuvale transientssele DNA replikatsioonile teise viirusvalgu E2 juuresolekul. Lisaks püüan mimikeerida viiruse varajast ja hilist promootorit kunstlike promootoritega ning selgitada vastavalt mono- ja polütsistronsetelt mRNA-delt ekspresseeritavate E1 valkude protsessimise eripärasid.

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Rakuliinid ja söötmed

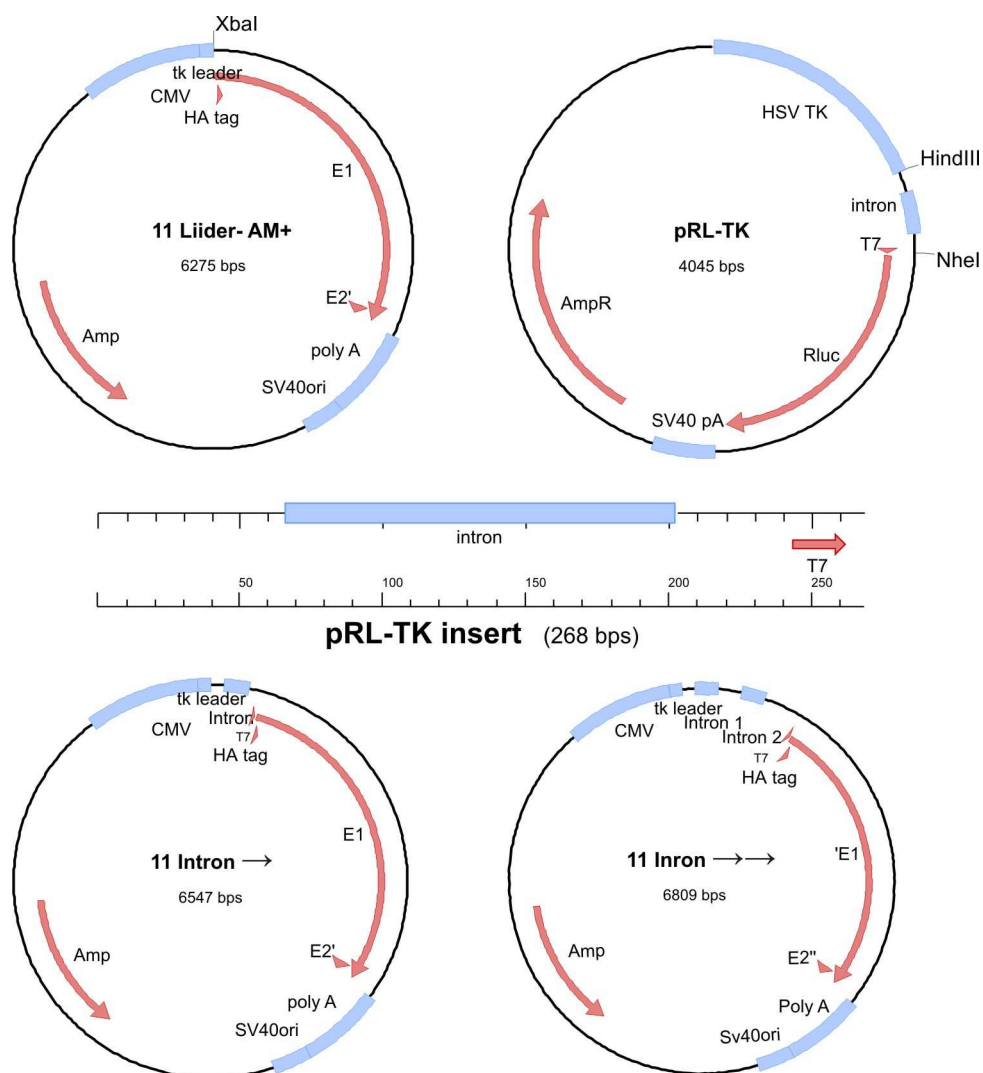
Töös kasutati rakuliine CHO (hamstri rakuliin) ja HeLa, mida kasvatati vastavalt F12 söötmes (Sigma) ja IMDM söötmes (GibcoBRL), kuhu oli lisatud 10% vasika loote seerumit (Sebak) ning antibiootikumi penitsilliini 100 IU/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml segu. Rakke inkuberiti 37°C ja 5% CO₂ sisalduse juures. Transfektsiooniks kasutati 80-90% konfluentsuseni kasvanud rakkudega plaate (~2 x 10⁶ rakku), transfektsioon viidi läbi elektroporatsiooni meetodil Gene Pulser XCell elektroporaatori abil (Bio-Rad Instruments), kasutatud pinge oli 220 V ja mahutavus 975 µF. Poratsioonijärgselt kanti rakud 60 mm koekultuuri plaatidele.

2.2. Kasutatud plasmiidid ja valkude ekspressioonivektorid

1. **pQM-NTag/Ai+** (Quattromed Ltd.). Sisaldab CMV promootorit, 3F12 epitoop tag'i.
2. **11Liider-**. E1 ekspressioonivektor, kuhu on kloonitud HPV-11 E1 geeni järjestus (viiruse genoomist nukleotiidid 823 kuni 2781). E1 geeni alguses 4. koodoni juures olev põhiline splaiss-doonor sait (AGGT) deleteeriti ning selle asemele lisati gripiviiruse hemaglutiniini (HA) epitoop *tag*. HA-*tag* viidi sisse ka kõikidele teistele HPV-11, HPV-16 ja HPV-18 E1 ekspressioonivektoritesse (plasmiidid punktides 3-9).
3. **11Liider- AM+**. E1 ekspressioonivektor, kuhu on kloonitud HPV-11 E1 geeni järjestus (HPV-11 genoomist nukleotiidid 823 kuni 2781). Punktmutatsiooniga on rikutud E1 geenis olev splaiss-aktseptor sait (2622 nt juures) – ACA → ACC.
4. **11Liider+**. E1 ekspressioonivektor, kuhu on kloonitud HPV-11 E6, E7 ja E1 geeni järjestused (nt 102 kuni 2781). E6 ja E7 avatud lugemisraamidesse on ATG koodon rikutud ning E6/E7 järjestus käitub kui liiderjärjestus E1 geeni ees. ATG koodon on rikutud ka kõikides teistes HPV-11, HPV-16 ja HPV-18 liiderjärjestusega E1 ekspressioonivektorites (plasmiidid punktides 5, 7, 9).

5. **11Liider+ AM+**. E1 ekspressioonivektor, kuhu on kloneeritud HPV-11 E6, E7 ja E1 geenide järjestused (nt 102 kuni 2781). Punkt-mutatsiooniga on rikutud E1 geenis olev splaiss-aktseptor sait (2622 nt juures) – ACA → ACC.
6. **16Liider-**. E1 ekspressioonivektor, kuhu on kloneeritud HPV-16 E1 geeni järjestus (HPV-16 genoomist nukleotiidid 859 kuni 2814).
7. **16Liider+**. E1 ekspressioonivektor, kuhu on kloneeritud HPV-16 E6, E7 ja E1 geenide järjestused (HPV-16 genoomist nukleotiidid 83 kuni 2814).
8. **18Liider-**. E1 ekspressioonivektor, kuhu on kloneeritud HPV-18 E1 geeni järjestus (HPV-18 genoomist nukleotiidid 944 kuni 2887).
9. **18Liider+**. E1 ekspressioonivektor, kuhu on kloneeritud HPV-18 E6, E7 ja E1 geenide järjestused (HPV-18 genoomist nukleotiidid 105 kuni 2887).
10. **pQMNE2HPV11**. Ekspressioonivektorisse on kloneeritud HPV-11 E2 geeni järjestus (HPV-11 genoomist nukleotiidid 2723 kuni 3826).
11. **pQMNE2HPV16**. Ekspressioonivektorisse on kloneeritud HPV-16 E2 geeni järjestus (HPV-16 genoomist nukleotiidid 2756 kuni 3853).
12. **pQMNE2HPV18**. Ekspressioonivektorisse on kloneeritud HPV-18 E2 geeni järjestus (HPV-18 genoomist nukleotiidid 2817 kuni 3914).
13. **pUCURR_{HPV11}**. Sisaldab HPV-11 URR piirkonda (HPV-11 genoomist nukleotiidid 7022 kuni 94) pUC19 vektoris.
14. **pUCURR_{HPV16}**. Sisaldab HPV-16 URR piirkonda (nt 6361 kuni 282) pUC19 vektoris.
15. **pUCURR_{HPV18}**. Sisaldab HPV-18 URR piirkonda (nt 6929 kuni 124) pUC19 vektoris.
16. **pM11E1**. Sisaldab 3F12 epitoopi, mis asub valgus neljanda aminohappejäägi järel, ning HPV-11 E1 järjestust (nt 832 kuni 2781), milles on muteeritud splaissingukohad positsioonides 847 ja 2622.
17. **pRL-TK** (Promega). Sisaldab HSV tümidiinkinaasi promootorit, kimäärset intronit ja *Renilla* lutsiferaasi geeni.

2.3. Konstrueeritud E1 ekspressioonivektorid



Joonis 11. pRL-TK vektorist introni kloneremisskeem 11 Liider- AM+ E1 ekspressioonivektorisse. Tõmbi klonereimise tulemusel saadi kaks uut E1 ekspressioonivektorit, kus ühel juhul on, CMV promotori ja E1 valku kodeeriva järjestuse vahele, ligeerunud 1 intron ning teisel juhul 2 intronit.

pRL-TK vektori kimäärse introni klonereimine *HindIII* ja *NheI* ensüümidega 11Liider- AM+ plasmidi *XbaI* saiti, CMV promotori ja E1 valku kodeeriva järjestuse vahele. Tõmbi klonereimise tulemusel saadi kaks uut E1 ekspressioonivektorit:

1. **11-intron** → **AM+**, kus CMV promotori ja E1 valku kodeeriva järjestuse vahele ligeerus üks intron.

2. **11-intron** →→ **AM+**, kus CMV promotori ja E1 valku kodeeriva järjestuse vahele ligeerus kaks intronit.

2.4. Transfektsioon elektroporatsiooni meetodil

Ühe transfektsiooni jaoks võeti üks 100 mm läbimõõduga koekultuuri tass 80-90% konfluentsuseni kasvanud rakke ($\sim 2 \times 10^6$ rakku). Tassidelt eemaldati sööde ning rakke pesti 2 korda 1x PBS'iga, seejärel lisati 1 tassi kohta 2 ml 0,25% trüpsiinilahust ja oodati, kuni rakud plastiku küljest lahti tulid. Rakud koguti koos trüpsiinilahusega 50 ml koekultuuri tuubi, mis sisaldas 5 ml söödet. Tuube tsentrifugeeriti *Eppendorf Centrifuge 5810 R* tsentrifuugiga 1000 rpm 20°C juures 10 minutit. Sööde eemaldati ning rakud suspendeeriti transfektsiooniks vajalikus söötmehulgas (ühe transfektsiooni kohta 250 µl), millele oli lisatud NaBES puhvrit lõppkonsentratsioonini 5mM. Kuvetti lisati rakususpensioonile 0.5 µg kandja DNAd (*carrierDNA*; lõhe või heeringa spermi DNA) ning uuritav plasmiidne DNA. Transfektsiooniks kasutati *Gene Pulser XCell* (Bio-Rad Instruments) elektroporaatorit. Mõlema kasutatud rakuliini puhul rakendati 220 V pinget ja 975 µF. Seejärel pipeteeriti kuvetti värsket söödet, rakud suspendeeriti ning kanti 15 ml koekultuuri tuubi, mis sisaldas 4 ml söödet. Tsentrifugeeriti 1000 rpm 20°C juures 10 minutit, sööde aspireeriti ning rakud resuspendeeriti värskes söötmes ning kanti 60 mm või 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassidele.

2.5. Eukariootsetest rakkudest episomaalse DNA eraldamine Hirt lüüsi meetodil

Rakkudelt eemaldati sööde ning tase pesti 2 korda 1xPBS-iga. PBS-i jäägid aspireeriti ning rakkudele lisati 0,8 ml Hirt lüüsi lahust (0.5% SDS, 50 mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA). Rakke inkubeeriti tassidel toatemperatuuril 15 minutit. Seejärel lisati 0,2 ml 5M NaCl lahust lõppkonsentratsioonini 1M. Tasse hoiti 4°C juures üleöö. Lüsaat koguti kummispaatliga mikrotsentrifuugi tuubidesse ning fuugiti lauatsentrifuugiga (*Heareus Biofuge Fresco*) 15 minutit 13 000 rpm 4°C juures. Supernatant pipeteeriti uude mikrotsentrifuugi tuubi ning DNA sadestati 0,6 ruumala

isopropanooliga. Seejärel tseentrifuugiti 13 000 rpm 4°C juures ja sade võeti üles 0,2 ml Sol IV (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,2% SDS), kuhu oli lisatud proteinaas K lõppkontsentratsioonini 0.1 µg/µl ning inkubeeriti 30 minutit 56°C juures. Seejärel lisati fenool:kloroformi segu (1:1), segati *vortex*´il ning tseentrifuugiti 2 minutit 13 000 rpm. Ülemine vesifaas tõsteti uude tuubi ja nukleiin happed sadestati 2,5 ruumala 96% etanooliga, Hoiti 30 minutit -20°C juures ning fuugiti 10 minutit 13 000 rpm. DNA sade pesti 70% etanooliga, tseentrifuugiti 3 minutit 13 000 rpm, kuivatati ning suspendeeriti 30 µl TE-s, mis sisaldas 20 µg/ml RNAas A-d. Lahust inkubeeriti 37°C juures 1 tund.

2.6. Replikatsioonianalüüs (*Southern blot* meetodil)

Hirt lüüsi meetodil eraldatud episomaalset DNA-d restrikteeriti *DpnI*-ga, mis lõikab katki rakkudesse elektroporeeritud ja seal mitte replitseerunud bakteriaalse päritoluga metüleeritud plasmiidse DNA. Lisaks restrikteeriti proove lineariseeriva ensüümi *HindIII*. Restriksioon kestis 18 tundi temperatuuril 37°C. DNA lahutati geel-elektroforeesil 1% agarosgeelis 1xTAE puhvril. Geel denatureeriti lahuses A (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) 30 minutit, loputati destilleeritud veega ning neutraliseeriti lahuses B (1 M Tris pG 7.4, 1,5 M NaCl) 30 minutit. DNA kanti geelilt filtrile (*Hybond-N+*, *Amersham Pharmacia Biotech*) kapillaarse ülekande meetodil ning seoti filtriga UV Stratalinker 1800 (*Stratagene*) abil. Kõigepealt blokeeriti mittespetsiifiline seondumine prehübridisatsiooniseguga (6x SSC, 5x Denhardti reaktiiv, 0.5x SDS, 200 µg/ml kandja DNA, mis denatureeriti enne 100°C 10 minutit). Prehübridisatsioon toimus 1 tund 65°C juures. Seejärel hübridiseeriti filter spetsiifilise prooviga, mille valmistamisel kasutati *DecaLabel*TM *DNA Labeling Kit*-i (*Fermentas*) ja radioaktiivset $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP ("*Du Pont NEN*"). Hübridisatsioon kestis 12-20 tundi 65°C juures ning seejärel pesti filtrit 3 korda 15 minutit pesulahusega I (2xSSC, 0,1% SDS) ja 3 korda 15 minutit pesulahusega II (1xSSC, 0,1% SDS). Hübridisatsioonisignaali detekteeriti eksponeerides filtrit röntgenfilmile (*Fuji*).

2.7. Valkude ekspressiooni analüüs (*Western blot* meetodil)

Rakkude lugemine: Enne valgualanalüüsi loeti rakud kasutades Bürkeri hemotsütomeetrit. Selleks eemaldati tassidelt sööde ning rakke pesti 2 korda 1xPBS-

iga. Seejärel lisati plaatidele 1 ml PBS-EDTA lahus. Pärast 10 minutilist inkubatsiooni toatemperatuuril suspendeeriti rakud lahusesse ning tõsteti 1.5 ml tuubi. 20 µl saadud suspensioonist eraldati rakkude lugemiseks ning ülejäänud tsentrifugeeriti 3000 rpm juures 2 minuti jooksul põhja.

Peale tsentrifugeerimist aspireeriti sööde ning rakud võeti üles 45 µl 1xPBS-is ja lüüsi 45 µl 2x *Laemmli* puhvril (100mM Tris-HCl pH 6.8, 200mM DTT, 4% SDS, 0,2% broomfenoolsinine, 20% glütserool). Lüsateid kuumutati temperatuuril 100°C 10 minutit ning fuugiti 13 000 rpm 10 minutit. Supernatandis olevad valgud lahutati geelelektroforeesil 10% SDS-poliakrüülamiidgeelis 1xSDS jooksupuhvril (125 mM Tris, 0,96 M glütsiin, 0,5% SDS). Valgud kanti geelist üle 0.45 µm poori läbimõõduga PVDF filtrile Immobilon™ (Millipore) semi-dry ülekandepuhvril (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% etanool) poolkuivas ülekande aparaadis ("Bio-Rad Instruments") pingel 15V 45 minuti jooksul. Filter blokeeriti 1 tunni jooksul 5% lõssipulbri lahuses 1xPBS-is. Järgnevalt inkubeeriti filtrit E1 detekteerimiseks peroksüdaasiga konjugeeritud 12CA5 epitoobi vastase antikehaga 3F10-HRP (Roche) (lahjendus 1:1000) 1 tund 2% lõssipulbri lahuses. Seejärel pesti filtrit 15 minutit pesulahuses (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20), vahetades lahust 5 korda. Signaal detekteeriti ECL™ *kit*'i (Amersham Pharmacia Biotech) abil, eksponeerides filtrit röntgenfilmile (Fuji).

2.8. Immunofluorestsents analüüs

Tassidelt eemaldati sööde ning rakke pesti 2 korda 1xPBS-iga. Rakud fikseeriti kas metanool-atsetooni või 4% paraformaldehüüdiga (PFA). Metanool-atsetooni seguga tase hoiti -20°C juures 10 minutit, PFA-ga tase toatemp. 10 minutit. Tassidelt eemaldati fikseerimissegud ning PFA-ga tase pesti 2x 5 minutit 0.2% PBS-Triton X-100 lahusega. Seejärel pesti kõikide fikseerimismeetodite puhul tase 3x 5 minutit 1x PBS-iga. Mittespetsiifiline seondumine blokeeriti 30 minuti jooksul 1xPBS'iga, kuhu oli lisatud 0.1% BSA. Blokeerimislahus eemaldati ning katteklasidele fikseeritud rakke inkubeeriti primaarse 12CA5 epitoobi vastase hiire HA-7 antikehaga (Sigma) (lahjendus 1:1000) 1 tund PBS-BSA lahuses. Katteklase pesti 3x 5 minutit 1xPBS-iga. Sekundaarse antikehana kasutati hiire immunoglobuliini (Ig) vastast Alexa 488 konjugeeritud antikeha (Invitrogen) (lahjendus 1:1000 või 1:10 000). Inkubeeriti 1 tund PBS-BSA lahuses ning pesti 3x 5 minutit 1xPBS-iga. Alusklasidele lisati

vastavalt katteklaasi suurusele sulundusvedelikku (0.5M TrisCl pH 8.0, 50% glütserool) ning katteklaasid asetati rakud **allapoole** alusklaasidele. Liigse sulundusvedeliku eemaldamiseks ja katteklaaside kinnitamiseks vajutati neile mõõdukalt paberkäterätiga peale. Proove kuivatati üleöö pimedas 4°C juures.

2.9. RNA analüüs

RNA eraldamine: RNA eraldamiseks kasutati Trizol[®] Reagenti (Invitrogen). Selleks eemaldati tassidelt sööde ning rakke pesti 1xPBS-iga. Lisati 2 ml Trizol lahust, suspendeeriti mõned korrad ning lahus koos lüüsunud rakkudega tõsteti 2x 1.5 ml tuubidesse. Inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril, lisati 0.2 ml kloroformi, segati 15 sekundit ning inkubeeriti uuesti 2-3 minutit toatemperatuuril. Seejärel tsentrifugeeriti 11 600 rpm (12 000g) 15 minutit 4°C juures ning ülemine vesifaas tõsteti uude tuubi. RNA sadestati 0.5 ml isopropanooliga, inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril ja tsentrifugeeriti 11 600 rpm 10 minutit 4°C juures. Supernatant eemaldati ja sadet pesti 1 ml 75% etanooliga, segati *vortex*-il ning tsentrifugeeriti 5000 rpm 5 minutit 4°C juures. RNA suspendeeriti vastavalt sademe hulga RNAasi vabas vees ning inkubeeriti 10 minutit 55°C juures. RNA kontsentratsioon ja puhtusaste mõõdeti *Spektrophotometer* ND-100 (NanoDrop) aparaadiga.

RNA süntees cDNA-ks: cDNA sünteesiks kasutati *First Strand cDNA synthesis kit-i* (Fermentas) ja 1 µg transfekteeritud CHO rakkudest eraldatud totaalset RNA-d. Praimeriks kasutati *kit-is* olevat Oligo(dT) praimerit. Ülejäänud süntees toimus vastavalt *kit-is* ettenähtud protokollile.

cDNA-lt CMV promotori ja E1 ORF-i vahelise ala üles amplifitseerimine

PCR-i segu:

1. 10x Taq polümeraasi puhver 2.5 µl
2. 2 mM dNTP mix 2.5 µl
3. 25 mM MgCl₂ 2 µl
4. pCGSeq2 praimer 1 µl
5. 11E1 Backw1 praimer 1 µl
6. cDNA või plasmiidne DNA 1 µl/20 pg
7. Taq polümeraas 0.3 µl

8. H₂O 14.7 µl

PCR-i programm:

1. 96°C 3 minutit
2. 95°C 1 minutit
3. 63°C 30 sekundit
4. 72°C 1 minutit
5. Go To 2 Rep 35
6. 72°C 10 minutit
7. Hold 15°C

Saadud PCR-i produktid lahutati geel-elektroforeesil 0.8% agarosgeelis 1x TAE puhvril.

3. TULEMUSED

3.1. HPV-11, -16 ja -18 E1 valgu ekspressioon erinevatelt E1 ekspressioonivektoritelt

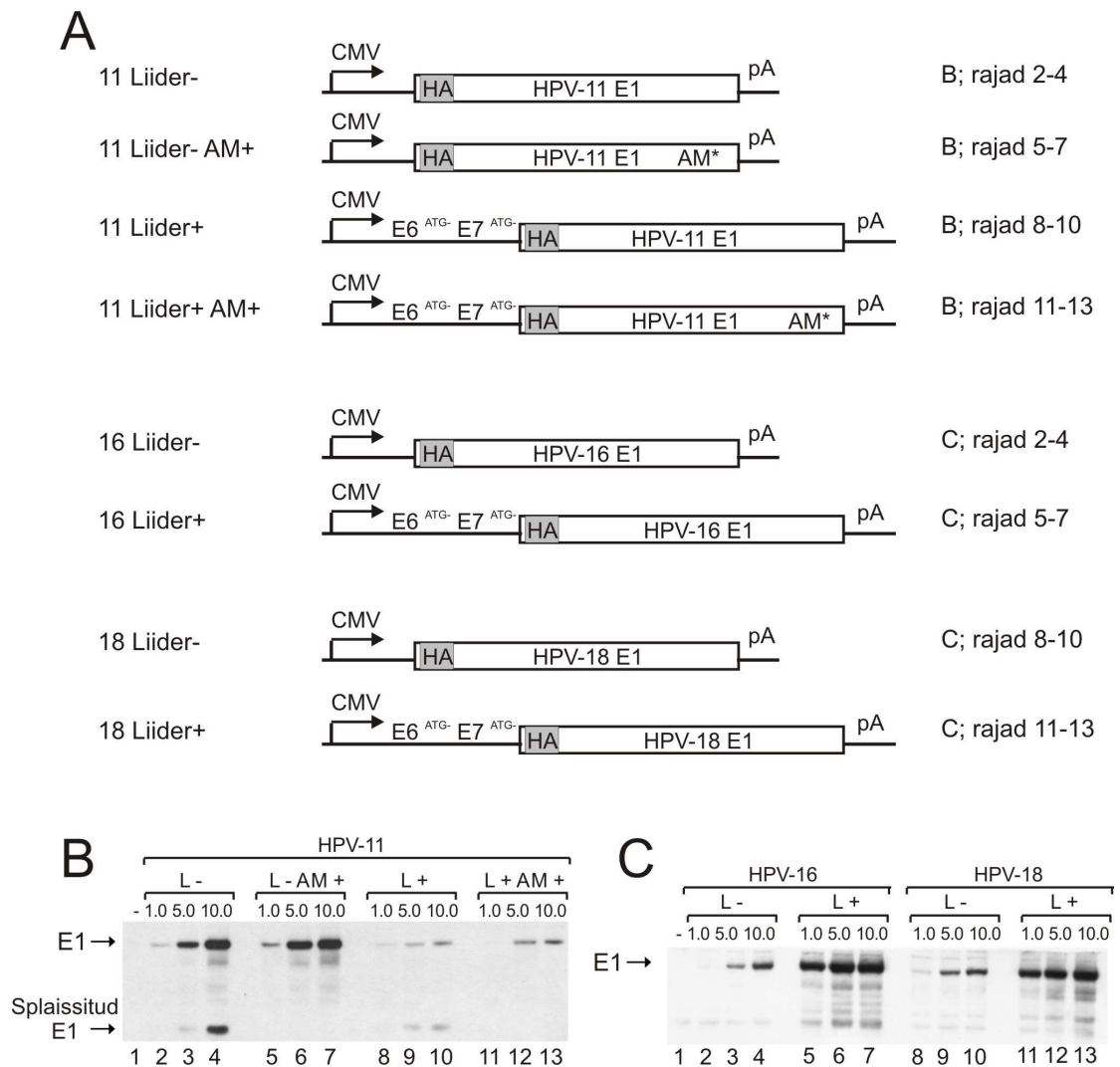
BPV-1-l on täispika E1 valgu sünteesimine laboritingimustes suhteliselt hõlbus, HPV-de puhul on aga kõrge täispika E1 valgu ekspressioon tekitanud mitmesuguseid probleeme nii meie kui teistes laborites. Looduslikes tingimustes kasutab viirus E1 reguleerimiseks alternatiivset splaissingut, mistõttu enamik küpsetest E1 mRNA-dest sisaldab vaid osa E1 kodeerivast järjestusest. Lühemad E1 vormid ei ole aga võimelised täispikka E1 valgu replikatsiooniprotsessis asendama. HPV-11-1 ja HPV-18-1 põhilise splaissingu doonorsaidi muteerimine E1 valgu 4. koodoni juures tõstis täispika E1 valgu taset märgatavalt (Deng *et al.* 2003). Meie laboris väljatöötatud E1 ekspressioonivektorites on põhilise splaissingu doonorsaidi muteerimine lahendatud kavalalt – selle asemele on sisse viidud gripiviiruse hemaglutiniini epitoop *tag*, millega on võimalik *Western blot* meetodil detekteerida ja võrrelda HPV-11, -16 ja -18 E1 ekspressioonivektoritelt sünteesitavate E1 valkude tasemeid kasutades HA-*tag*-i vastast antikeha 3F10-HRP.

Võttes arvesse asjaolu, et looduslikes tingimustes toimub viiruse elutsükli jooksul E1 valgu ekspressioon kahelt erinevalt viiruslikult promootorilt, konstrueeriti meie laboris kaks komplekti CMV promootorit sisaldavaid E1 ekspressioonivektoreid kõigi kolme erineva HPV tarvis (Joonis 12 A). Esimesel komplektil E1 vektoritel mimikeerib CMV promootor varajast viiruslikku promootorit, paiknedes E6 lugemisraami ees ja transkribeerides E6, E7 ja E1 ORF-e sisaldavat polütsistronset mRNA-d (Liider+). Viirusel sünteesitakse sellelt mRNA-lt lisaks E1 valgule ka E6 ja E7 valke. Meie laboris on konstrueeritud lisaks metsiktüüpi (E6 ja E7 valkude kodeerivaid järjestusi sisaldavatele) E1 ekspressioonikonstruktidele ka E1 ekspressioonivektorid, mille puhul deleteeriti E6 ja E7 ORF-idel ATG koodonid. Deletsiooni tulemusel ei sünteesita nendelt vektoritelt onkovalke E6 ja E7. Kuna antud töös vaadeldakse HPV-de DNA replikatsiooni, mille puhul E6 ja E7 valke vaja ei ole, kasutati E1 ekspresseerimiseks E6/E7 ATG⁻ E1 konstrukte. Teisel komplektil E1 vektoritel võiks CMV promootor mimikeerida viiruse hilist promootorit, mis

paikneb E7 lugemisraamis vahetult E1 valku kodeeriva ala ees, transkribeerides monotsistronset, ainult E1 ORF-i sisaldavat, mRNA-d (Liider-).

HPV-16 ja HPV-18 E1 ekspressioonivektoritelt efektiivseks täispika E1 valgu ekspresseerimiseks ülaltoodud modifikatsioonidest piisab (Joonis 12 C). HPV-11-1 tekib aga lisaks täispikale E1 valgule ka lühemaid E1 vorme (Joonis 12 B, splaissitud E1 signaal). Varasemad andmed on näidanud, et need lühemad E1 vormid korjavad rakuüsteemist välja tsükliin E/CDK komplekse ning inhibeerivad näiteks HeLa rakkudes HPV transientset DNA replikatsiooni (Lin *et al.* 2000). Tsükliin E/CDK kompleksid on vajalikud E1 valgu post-translatsiooniliseks modifitseerimiseks ja replikatsioonifunktsioonide aktiveerimiseks. Efektiivseks täispika E1 valgu sünteesiks ja kontrollimaks, kas replikatsiooni inhibitsioon on seotud alternatiivse splaissinguga, muteeriti HPV-11 E1 konstruktidel splaissingu aktseptorsait algusega 2622. nukleotiidist, mille tulemusel ei sünteesita trankeeritud E1 valke (võrdle splaissitud E1 signaali Joonisel 12 B radadel 4 ja 7 või 10 ja 13).

E1 valgu ekspressioonitasemete hindamiseks HPV-11, HPV-16 ja HPV-18 E1 konstruktidelt transfekteeriti need CHO rakkudesse 1.0, 5.0 ja 10.0 µg-s kogustes. Info kasutatud E1 ekspressioonikonstruktid (11Liider-, 11Liider- AM+, 11Liider+, 11Liider+ AM+) kohta on esitatud peatükis „Materjal ja meetodika” ning skeemid on välja toodud joonisel 12 A. Kuna E1 valgu ekspressioonikatsed on teostatud paralleelselt replikatsioonianalüüsidega, on rakkudesse transfekteeritud koos E1 ekspressioonivektoritega ka 5.0 µg E2 ja 0.5 µg URR plasmiidid. 24 tunni möödudes eraldati rakkudest totaalne valgulüsaat. Võrreldavate tulemuste saamiseks loeti enne lüüsimist rakud ning lugemistulemust arvesse võttes kanti foreesile 50 000. rakule vastav kogus lüsaati. Seejärel analüüsiti E1 valgu tasemed *Western blot* meetodil kasutades HA-tag-i vastast spetsiifilist antikeha 3F10-HRP.



Joonis 12. (A) Kasutatud, CMV promootorit sisaldavad, E1 ekspressioonivektorite skeemid, mis erinevad üksteisest HPV tüve, E6 ja E7 avatud lugemisraamide olemasolu ning aktseptormutatsiooni sisseviimise poolest. (B) HPV-11 ja (C) HPV-16 ning HPV-18 gripiviiruse hemaglutiniini (HA) epitoopt sisaldavatel E1 konstruktidelt ekspresseeritavate valkude *Western blot* analüüsid. CHO rakkudesse transfekteeriti 1.0, 5.0 ja 10.0 µg-s kogustes E1 ekspressioonikonstrukte koos vastava HPV 5.0 µg E2 ja 0.5 µg URR plasmiididega. Valgulüsaat eraldati 24 tundi peale transfektisooni ning E1 valgu tase detekteeriti *Western blot* analüüsil 3F10-HRP antikehaga. Pildil B HPV-11 E1 ekspressioonikonstruktidelt Liider- (rajad 2-4), Liider- AM+ (rajad 5-7), Liider+ (rajad 8-10) ja Liider+ AM+ (rajad 11-13) sünteesitud E1 valgud. Pildil C HPV-16 (rajad 2-7) ja HPV-18 (rajad 8-13) E1 ekspressioonikonstruktidelt Liider- (rajad 2-4 ja 8-10) ning Liider+ (rajad 5-6 ja 11-13) sünteesitud E1 valgud.

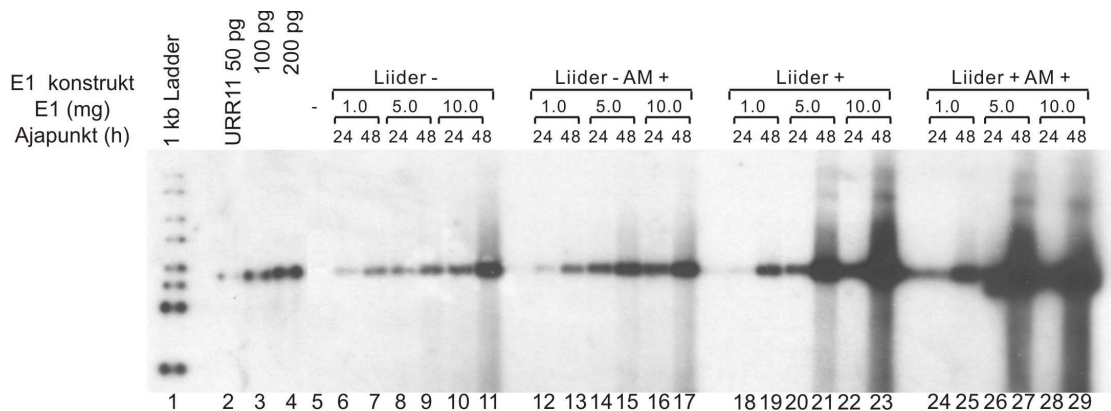
Joonisel 12 B ja C on näha, et kõikidelt konstrueeritud E1 ekspresioonivektoritelt toimub täispika E1 valgu ekspressioon. Võrreldes E1 ekspresioonivektoreid ja neile vastavaid E1 valgu tasemeid on näha, et HPV-11 puhul omavad kõrgemat E1 taset monotsistronselt mRNA-lt (Liider-) sünteesitud E1 valgud (võrdle omavahel pildi B radasid 2-4 ja 5-7 ning 8-10 ja 11-13). Samas HPV-16-1 ja HPV-18-1 ekspresseeritakse E1 efektiivsemalt polütsistronselt mRNA-lt (Liider+) (võrdle omavahel pildi C radasid 2-4 ja 5-7 ning 8-10 ja 11-13). Siinkohal võivad olulist rolli mängida E6 ja E7 järjestuses asuvad regulatoorsed elemendid, mis „kõrge riskiga” papilloomiviirusetel omavad E1 protsessingul positiivset efekti, „madala riskiga” HPV-del aga võivad sarnased regulatoorsed elemendid üldse puududa või omada vastupidist – negatiivset efekti.

Efektiivseks transientseks replikatsioonikatseks on vaja rakkudesse transfekteerida vastav E1 ekspresioonivektor, homoloogne E2 ekspresioonikonstrukt ning replikatsiooni matriitsina kasutatav HPV *origin*-i piirkonda sisaldav plasmiid. E2 olemasolu rakus aitab E1 valgul spetsiifiliselt seonduda viirusgenoomi URR piirkonnale ning stimuleerida E1 võimet *origin*-i lahti harutada (Gillette *et al.* 1994, Sanders *and* Stenlund 2000, Seo *et al.* 1993b). Kõikidelt pQM vektorisse sisestatud HPV-11, HPV-16 ja HPV-18 E2 valgu kodeerivatelt järjestustelt toimub E2 valgu süntees tugeva tsütomegaloviiruse IEE (CMV) promootori alt. E2 valgu detekteerimiseks on tema N-terminusse lisatud BPV-1 E2 epitoop *tag* (3F12). *Tag*-i lisamine E2 järjestusse võimaldab meil detekteerida E2 valgu taset, rikkumata seejuures tema funktsionaalseid omadusi (labori avaldamata andmed).

3.2. Eri tüüpi ekspresioonivektoritelt sünteesitavad HPV-11 E1 valgud initsieerivad üksteisest erineva DNA replikatsiooni

Papilloomiviiruste DNA replikatsiooni uurimisel on pikka aega kasutatud hea mudelsüsteemina CHO rakuliini. Ka käesolevas töös teostatakse enamik katseid CHO rakkudes. Antud katse eesmärgiks oli uurida, kuidas toetavad erinevad HPV-11 E1 ekspresioonikonstruktidelt sünteesitavad E1 valgud transientset DNA replikatsiooni reporterplasmiidide URR järjestustelt CHO rakuliinis. Selleks kotransfekteeriti rakkudesse erinevad E1 ekspresioonivektorid koos 5.0 µg E2 ja 0.5 µg URR

plasmiididega. E1 taset rakus reguleeriti ekspresioonivektorite tiitrimisega 1.0, 5.0 ja 10.0 µg-ni. E2- ja *origin*-i konstruktid kogused valiti eelnevalt teostatud katsete põhjal (avaldamata andmed) ja hoiti kõikides järgnevates analoogsetes katsetes konstantsetena. 24 ja 48 tunni möödudes eraldati rakkudest episomaalne DNA fraktsioon (madalmolekulaarne), mida töödeldi *DpnI* ja lineariseeriva *HindIII* ensüümiga. *DpnI* ensüüm fragmenteerib bakteriaalselt metüleeritud (rakkudesse transfekteeritud) plasmidi ning jätab puutumata eukarüootsetes rakkudes *in situ* replitseerunud DNA. Replikatsioonisignaali detekteerimiseks kasutati *Southern blot* analüüsil radioaktiivselt märgitud HPV-11 URR-spetsiifilist proovi. Parelleelselt replikatsioonikatsega eraldati rakkudest ka valgulüsaat, millest E1 ekspresioonitase detekteeriti *Western blot* meetodil HA tag-i vastase antikehaga 3F10-HRP (Joonis 12 B).



Joonis 13. HPV-11 E1 konstruktidelt sünteesitavad E1 valgud initsieerivad episomaalselt URR plasmiidilt lähtuvat transientse DNA replikatsiooni CHO rakkudes üksteisest erinevalt. CHO rakkudesse kotransfekteeriti vastavalt 1.0, 5.0 ja 10.0 µg kogustes HPV-11 E1 Liider- (rajad 6-11), Liider- AM+ (rajad 12-17), Liider+ (rajad 18-23) ja Liider+ AM+ (rajad 24-29) ekspresioonikonstruktid koos 5.0 µg E2 ekspresiooniplasmidi ja 0.5 µg pUCURR11 reporterplasmidiga. Negatiivse kontrollina transfekteeriti rakke ainult *carrier* DNA-ga (rada 5), suurusmarkerina kasutati 1 kb DNA Ladderit (Fermentas) (rada 1) ja replikatsioonisignaali markerina *HindIII* lineariseeritud pUCURR11 plasmidi (rajad 2-4). 24 ja 48 tundi peale transfektsiooni eraldatud episomaalsest DNA-st $\frac{1}{3}$ restrikteeriti *HindIII/DpnI*-ga, analüüsiti *Southern blot* meetodil ning hübridiseeriti radioaktiivselt märgitud HPV-11 URR prooviga.

Joonisel 13 esitatud pildilt on näha, et *origin*-i plasmiididelt lähtuv DNA replikatsioon on detekteeritav kõigi nelja E1 konstrukti poolt sünteesitud E1 valkude korral.

Mõõdukas DNA replikatsioon toimub monotsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valgu puhul (Liider-) (Joonis 13, rajad 6-17), kuigi *Western blot* analüüsilt on näha, et E1 valk ekspresseerub väga efektiivselt (Joonis 12 B, rajad 2-7). Replikatsioonisignaal on aga tugevam nende E1 valkude puhul, mida ekspresseeritakse polütsistronselt mRNA-delt (Liider+) (Joonis 13, rajad 18-29). Valgualanaliis näitab siin aga vastupidist tendentsi (12 B, rajad 8-13) – Liider+ konstruktidelt sünteesitud E1 valkude tase on madalam kui Liider- E1 konstruktidelt sünteesitud E1 valkude puhul. Tekkinud situatsioon, kus E1 valku ekspresseeritakse palju, aga replikatsioonisignaal on madal ning vastupidi, viitab liiderjärjestuse (E6 ja E7) olulisele rollile E1 valgu funktsioonide avaldumisel.

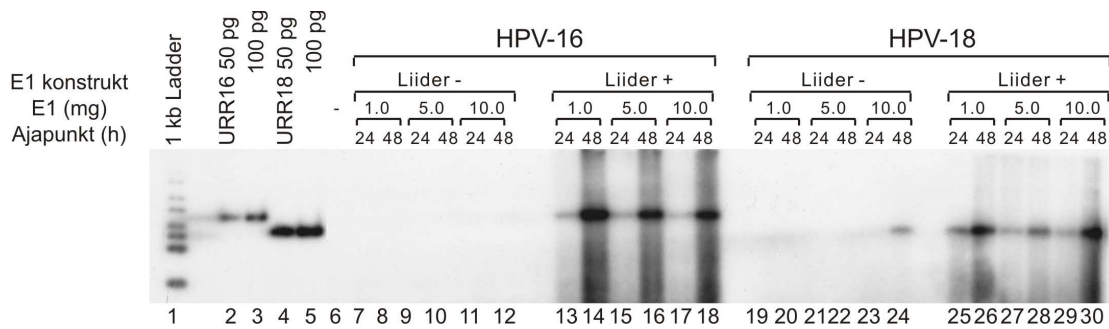
Aktseptormutatsiooni sisseviimine Liider- ja Liider+ HPV-11 E1 ekspressioonivektoritesse, mille tagajärjel ei sünteesita lühemaid E1 valgu vorme, võiks kirjanduse andmetele toetudes replikatsiooniaktiivsust tõsta. Minu poolt teostatud katses CHO rakuliinis ei takista lühemad E1 vormid transientse DNA replikatsiooni toimumist (võrdle Joonis 13 radasid 6-11 ja 12-17 või 18-23 ja 24-29). Ilmselt ei suuda lühemad E1 vormid asendada replikatsiooniprotsessis täispikka E1 valku (replikatsioonisignaal ei tõuse) ning see ei konkureeri täispika E1 valguga ka tsükliin E/CDK seostumise pärast (replikatsioonisignaal ei lange).

Lisaks tekitab HPV-11 polütsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valk üle kogu foreesiraja ulatuva smääri, mis koosneb erineva pikkusega replikatsiooniproduktidest (Joonis 13, rajad 20-23 ja 26-29). Smääri esinemine on detekteeritav 48 tunni ajapunktis, mis viitab, et kuskil 24 ja 48 tunni vahel muutub URR plasmiidilt lähtuv replikatsioonilaad. Sarnaseid erineva pikkusega replikatsiooniprodukte on meie laboris täheldatud ka varem veise papilloomiviiruse puhul (Männik *et al.* 2002). *Origin*-i ja külgnevate järjestuste amplifitseerimist tekitav ebatüüpiline DNA süntees toimub just kõrgete E1 valgu tasemete juures, kui viiruse *origin*-ilt algav replikatsiooni initsiatsioon läheb kontrolli alt välja. Enamiku nähtavast DNA replikatsiooni kogusignaalist moodustab üle foreesiraja ulatuv smäär.

3.3. „Kõrge riskiga” HPV subtüüpide 16 ja 18 Liider- ja Liider+ E1 konstruktidelt sünteesitavad E1 valgud initsieerivad URR-i sisaldavalt plasmiidilt replikatsiooni CHO rakkudes üksteisest erinevalt

HPV-16 ja HPV-18 Liider- ja Liider+ E1 konstruktide võrdlemiseks kotransfekteeeriti CHO rakkudesse E1 ekspresioonivektorid koos vastava HPV subtüübi E2 ja URR plasmiididega. 24 ja 48 tunni möödudes eraldati rakkudest episomaalne DNA analoogselt eelmise katsega. Paralleelselt replikatsioonikatsega detekteeriti ka E1 valgude tasemed *Western blot* meetodil (Joonis 12 C). $\frac{1}{3}$ eraldatud episomaalsest DNA-st restrikteeriti *DpnI* ja *HindIII* ensüümidega ning analüüsiti *Southern blot* meetodil. Hübridisatsiooniproovi sünteesiks kasutati HPV-16 ja HPV-18 URR fragmente. Replikatsioonikatse tulemused on esitatud joonisel 14. Mõlema „kõrge riskiga” HPV tüve DNA replikatsioonisignaalid on võrreldavad HPV-11 replikatsioonianalüüsiga – DNA replikatsioon on efektiivsem polütsistronselt mRNA-lt (Liider+) sünteesitud E1 valkude puhul. Kui HPV-11-l toetab monotsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valk URR plasmiidilt lähtuvat DNA replikatsiooni vaid vähesel määral, siis HPV-16-l ja HPV-18-l ei toimu replikatsioon isegi kõrgetel E1 tasemetel. Vaid väga vähesel määral on replikatsioonisignaali näha HPV-18-l 48 tunni ajapunktis 10.0 µg-se E1 ekspresioonivektori transfekteeerimisel (Joonis 14, rada 24).

Lisaks toimub HPV-16 ja HPV-18 polütsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valkude puhul, sarnaselt eelneva HPV-11 replikatsioonikatsega, URR plasmiidide sibulakoore-tüüpi DNA replikatsiooni initsiatsioon (Joonis 14, rajad 14,16,18 ja 26, (28), 30). Jooniselt on näha, et HPV-16 süsteemis toimub amplifikatsiooniline DNA replikatsioon mõnevõrra efektiivsemalt kui HPV-18 süsteemis (võrdle radasid 13-18 ja 25-30). Samas HeLa rakuliinis, kus HPV genoomi osad, s.h. *origin*-i piirkond, on integreerunud peremeesraku kromosoomi, toimub DNA replikatsioon HPV-18 süsteemis efektiivsemalt kui HPV-16 süsteemis (Kadaja *et al.* 2007).

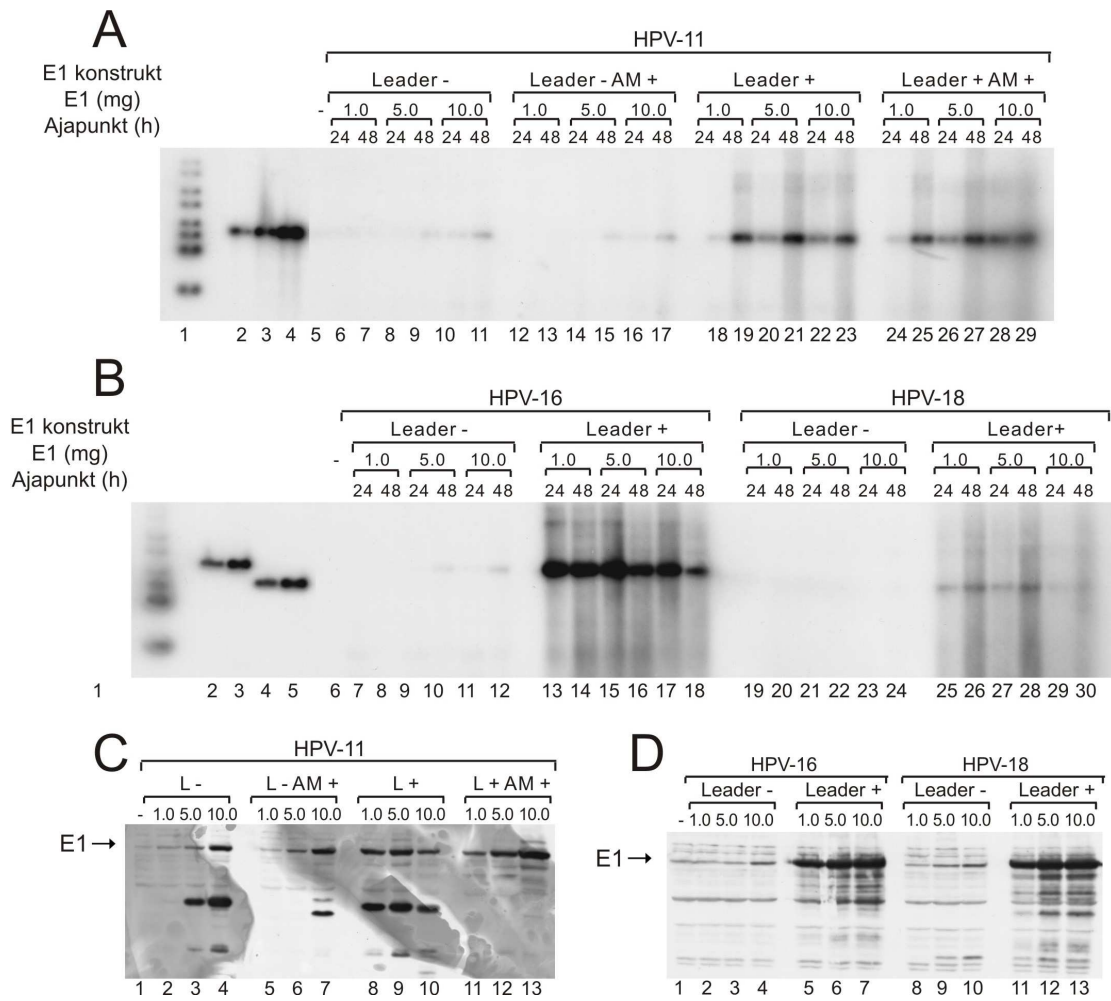


Joonis 14. HPV-16 ja HPV-18 Liider- ja Liider+ E1 konstruktidelt sünteesitavad E1 valgud initsieerivad episomaalselt URR plasmiidilt lähtuvat transientset DNA replikatsiooni üksteisest erinevalt. CHO rakkudesse kotransfekteeriti vastavalt 1.0, 5.0 ja 10.0 μg kogustes HPV-16 (rajad **7-18**) ja HPV-18 (rajad **19-20**) E1 Liider- (rajad **7-12** ja **19-24**) ning Liider+ (rajad **18-23** ja **25-30**) ekspressioonikonstruktid koos 5.0 μg E2 ekspressiooniplasmiidi ja 0.5 μg pUCURR11 reporterplasmiidiga. Negatiivse kontrollina transfekteeriti rakke ainult *carrier* DNA-ga (rada **6**), suurusmarkerina kasutati 1 kb DNA Ladderit (Fermentas) (rada **1**) ja replikatsioonisignaali markerina HindIII lineariseeritud pUCURR16 (rajad **2, 3**) ja pUCURR18 plasmidi (rajad **4, 5**). 24 ja 48 tundi peale transfektsiooni eraldatud episomaalsest DNA-st $\frac{1}{3}$ restrikteeriti *HindIII/DpnI*-ga, analüüsiti *Southern blot* meetodil ning hübridiseeriti radioaktiivselt märgitud HPV-11 URR prooviga.

3.4. HPV-de replikatsioon ja E1 valgu süntees toimub inimese rakuliinis HeLa sarnaselt mudelsüsteemina kasutatud hamstri rakuliiniga CHO.

Minu töös on enamik koekultuurikatseid teostatud hamstri munasarjast eraldatud rakkudes CHO. Meie laboris on HPV replikatsioonimehhanisme uuritud lisaks mitmetes inimese rakuliinides – HeLa, SiHa, C33A, HaCat, 293, 143. HeLa ja SiHa rakuliinid on saadud emakakaelavähi rakkudest ning nende rakkude kromosoomi on integreerunud vastavalt HPV-18 ja HPV-16 genoomi osad. C33A ja HaCat rakud on aga immortaliseeritud inimese keratinotsüüdid, kust pole HPV DNA-d leitud. Antud töös on lisaks CHO rakuliinis teostatud katsetele esitatud võrdluseks kõrvale sarnased katsed HeLa rakuliinist. Võrreldavate tulemuste saamiseks on kõik katse tingimused jäetud samaks eelnevalt CHO rakuliinis teostatud katsetega – rakkudesse kotransfekteeriti 1.0, 5.0 ja 10.0 μg -s kogustes E1 ekspressioonivektorid koos 5.0 μg E2 ja 0.5 μg URR plasmiididega. 24 ja 48 tunni möödudes eraldati rakkudest

episomaalne DNA. Paralleelselt replikatsioonianalüüsiga teosati ka E1 ekspressiooni tasemete analüüs *Western blot* meetodil (Joonis 15 C ja D).



Joonis 15. (A) ja (B) on HPV-11, HPV-16 ja HPV-18 replikatsioonianalüüsid ning (C) ja (D) E1 valgu ekspressiooni analüüsid. (A) ja (C) piltide puhul on HeLa rakkudesse kotransfekteeritud 1.0, 5.0 ja 10.0 µg kogustes HPV-11 E1 Liider- (A rajad 6-11, C rajad 2-4), Liider- AM+ (A rajad 12-17, C rajad 5-7), Liider+ (A rajad 18-23, C rajad 8-10) ja Liider+ AM+ (A rajad 24-29, C rajad 11-13) ekspressioonikonstruktid koos 5.0 µg E2 ekspressiooniplasmiidi ja 0.5 µg pUCURR11 reporterplasmiidiga. (B) ja (D) piltide puhul on HeLa rakkudesse kotransfekteeritud HPV-16 (B rajad 7-18, D rajad 2-7) ja HPV-18 (B rajad 19-20, D rajad 8-13) E1 Liider- (B rajad 7-12 ja 19-24, C rajad 2-4 ja 8-10) ning Liider+ (B rajad 18-23 ja 25-30, D rajad 5-7 ja 11-13) ekspressioonikonstruktid koos vastava HPV tüve 5.0 µg E2 ekspressiooniplasmiide ja 0.5 µg URR-i sisaldavate reporterplasmiididega.

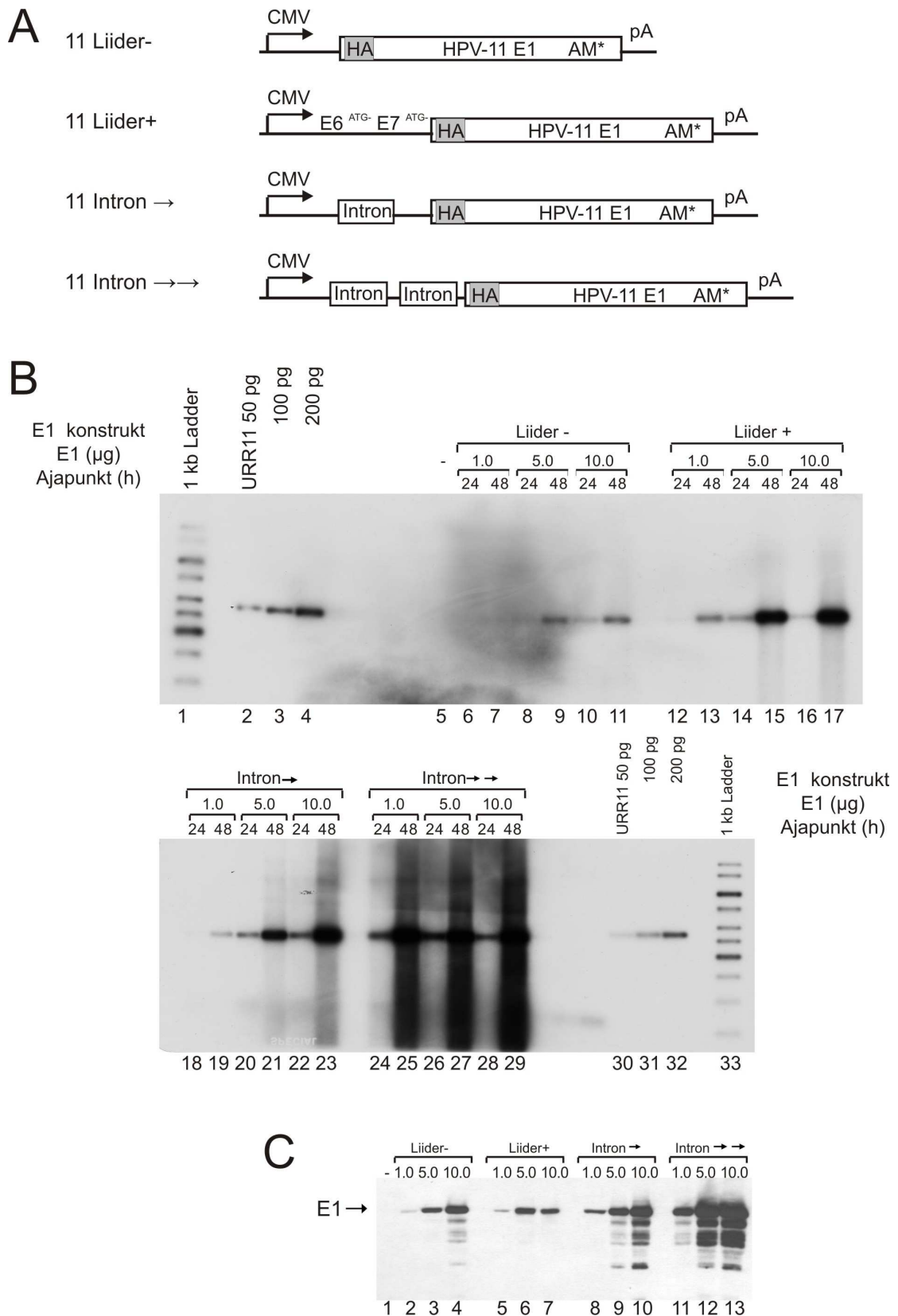
Jooniselt 15 C on näha, et HPV-11-l toimub nii monotsistronselt kui polütsistronselt mRNA-lt sarnane E1 valgu ekspressioon. HPV-16-l ja HPV-18-l on

aga Liider- konstruktidelt sünteesitava E1 valgu tase, võrreldes polütsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 tasemega, vaevu detekteeritav (võrdle Joonis 15 D radasid 2-4 ja 5-7 või 8-10 ja 11-13). Analoogne tulemus kajastub ka replikatsioonianalüüsis – kui HPV-11-l on 10.0 µg-se E1 ekspressioonivektori transfekteerimisel mõningast DNA replikatsiooni isegi näha (Joonis 15 A, rajad 11 ja 17), siis HPV-16-l ja HPV-18-l ei toeta monotsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valgud transientset DNA replikatsiooni üldse (Joonis 15 B, rajad 7-12 ja 19-24). Samas polütsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valgud toetavad kõigi HPV tüvede transientset, URR plasmiidilt lähtuvat, DNA replikatsiooni (Joonis 15 A, rajad 18-29 ning Joonis B, rajad 13-18 ning 25-30). Huvitav on aga asjaolu, et kui HPV-11-l ja HPV-16-l sünteesitakse rohkem reporterplasmiidiga ühepikkuseid DNA molekule, siis HPV-18-l on replikatsioonisignaal näha rohkem hajusa smäärina kui diskreetse bändina (võrdle Joonis 15 A radasid 18-29 ja Joonis 15 B radasid 13-18 ja 25-30). Ilmselt jõuab HPV-11 ja HPV-16 puhul elongatsiooniprotsess tihedamini lõpuni kui HPV-18 süsteemis, kus tekib rohkem varieeruva suurusega *origin*-i sisaldavaid replikatsiooniprodukte.

3.5. Intron promotori ja E1 valgu kodeeriva järjestuse vahel

Varasem töö HPV-18 puhul on näidanud, et efektiivseks E1 valgu ekspresseerimiseks on vaja E1 sünteesida E6, E7 ja E1 ORF-e sisaldavalt polütsistronselt mRNA-lt (Remm et al. 1999). Võtsime selle teadmiseks oma HPV-18 E1 ekspressioonivektori disainimisel. Liiderjärjestusega E1 ekspresseerub tõesti madalal tasemel, liiderjärjestusega E1 aga efektiivselt (Joonis 15 D). Madala riskiga HPV-11 Liider-konstruktilt sünteesitava E1 valgu suhteliselt kõrge ekspressioonitase *Western blot* analüüsil oli mõnevõrra üllatav (Joonis 12 B). Samas kõigis eelnevates replikatsioonikatsetes on edukamalt funktsioneerinud polütsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valgud. HPV-11 polütsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valgu tase jääb aga suhteliselt nõrgaks, mis viitab sellele, et E1 ekspressioonitase ei peagi efektiivseks DNA replikatsiooni toetamiseks olema liialt kõrge. Seega puuduvad selged põhjused, miks peab E1 valgu protsessima ilmtingimata polütsistronselt mRNA-lt.

Erinevaid E6 ja E7 järjestusi võrreldes jäi silma „kõrge riskiga” HPV-del E6 avatud lugemisraamis paiknev intron. Võimalik, et splaiissing E6 ORF-ist mõjutab positiivselt E1 edasist protsessingut ribosoomidel, sealte edasi post-translatsioonilist modifitseerimist Golgi kompleksis, importiinidega seostumist ning importi tuuma. „Madala riskiga” HPV-del ei esine E6 avatud lugemisraamis intronit ning ilmselt protsessitakse polütsistronselt mRNA-lt kodeeritavaid valke, sealhulgas E1, teiste mehhanismide järgi (Stacey *et al.* 1995). Kui „kõrge riskiga“ HPV-del sõltub E1 protsessing ja sellele järgnev funktsioneerimine DNA replikatsioonil E6 ORF-is oleva introni splaiissimisest, võiks kunstliku introni paigutamine E1 geeni ja promotori vahele, taastada näiteks HPV-18-1 ekspressiooni efektiivsuse ja replikatsiooni aktiivsuse. HPV-11 puhul on eesmärgiks välja selgitada, kas sünteetilise introni kloneerimine promotori ja uuritava geeni vahele, põhjustab muutusi E1 mRNA protsessimisel ja millist mõju see avaldab E1 replikatsioonifunktsioonile. Selle välja selgitamiseks konstrueeriti 11-intron→ AM+ ja 11-intron→→ AM+ E1 ekspressioonivektorid. Info kloneerimise kohta on peatükis „Materjal ja meetodika“ ning skeemid on välja toodud joonisel 16 A. Replikatsioonisignaali võrdlemiseks transfekteeriti CHO rakkudesse, lisaks konstrueeritud introniga E1 ekspressioonivektoritele, ka HPV-11 Liider- ja Liider+ E1 konstruktid koos E2 ja URR plasmiididega. Kõigilt neljalt E1 konstruktil toimub efektiivne E1 valgu ekspressioon. Iseäranis kõrge ekspressioon avaldub nii ühe kui kahe introniga E1 konstrukti puhul (Joonis 16 B, rajad 8-13). Kontrollidena kasutatud Liider- ja Liider+ E1 konstruktidelt ekspresseeritavate E1 valkude tase ja replikatsiooniaktiivsus on kooskõlas varem tehtud katsega (Joonis 12 B) – monotsistronselt mRNA-lt sünteesitakse E1 valku efektiivsemalt kui polütsistronselt mRNA-lt (võrdle Joonis 16 B radasid 2-4 ja 5-7), replikatsioonisignaal on aga tugevam Liider+ E1 konstruktil sünteesitud E1 valgu puhul (võrdle Joonis 16 A radasid 6-11 ja 12-17).



Joonis 16. (A) Kasutatud, CMV promootorit sisaldavad, E1 ekspressioonivektorite skeemid, mis erinevad üksteisest E6 ja E7 avatud lugemisraamide olemasolu ning intronite arvu poolest. **(B)** Transientne DNA replikatsiooni analüüs URR plasmidi sisaldavateelt

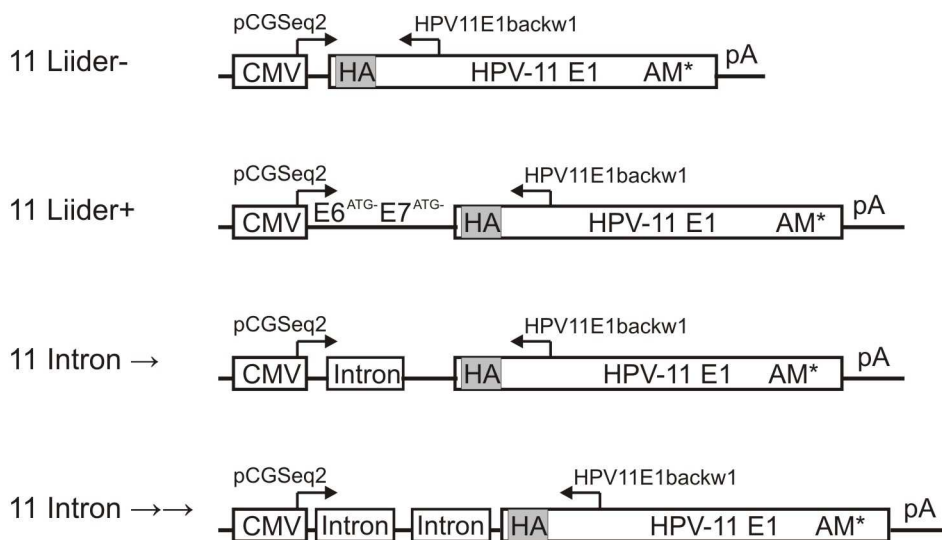
reporterplasmiididelt. CHO rakkudesse kotransfekteeriti vastavalt 1.0, 5.0 ja 10.0 µg kogustes HPV-11 E1 Liider- (rajad **6-11**), Liider+ (rajad **12-17**), Intron → (rajad **18-23**) ja Intron →→ (rajad **24-29**) ekspresioonikonstruktid koos 5.0 µg E2 ekspresiooniplasmiidi ja 0.5 µg pUCURR11 reporterplasmiidiga. Negatiivse kontrollina transfekteeriti rakke ainult *carrier* DNA-ga (rada **5**), suurusmarkerina kasutati 1 kb DNA Ladderit (Fermentas) (rada **1, 33**) ja replikatsioonisignaali markerina HindIII lineariseeritud pUCURR11 plasmiidi (rajad **2-4, 30-32**). 24 ja 48 tundi peale transfektsiooni eraldatud episomaalsest DNA-st $\frac{1}{3}$ restrikteeriti HindIII/DpnI-ga, analüüsiti *Southern blot* meetodil ning hübridiseeriti radioaktiivselt märgitud HPV-11 URR prooviga. (C) Paralleelselt replikatsioonianalüüsiga teostatud E1 valgu ekspresioonanalüüs 24 tundi peale transfektsiooni. *Western blot* meetodil HA-tag'i vastase 3F10-HRP antikehaga on detekteeritud HPV-11 E1 ekspresioonikonstruktidelt Liider- (rajad **2-4**), Liider+ (rajad **5-7**), Intron → (rajad **8-10**) ja Intron →→ (rajad **11-13**) ekspresseeritud E1 valgud.

Ühe kunstliku introniga (Intron →) E1 konstruktilt sünteesitav E1 valk toetab transientset DNA replikatsiooni sarnaselt E6/E7/E1-polüsistroomselt mRNA-lt sünteesitud E1 valguga (võrdle Joonis 16 B radasid 12-17 ja 18-23). Tõestades, et introni olemasolu promootori ja kodeeriva järjestuse vahel, on oluline E1 valgu protsessingul. E1 konstruktilt, kus CMV promootori ja E1 kodeeriva järjestuse vahel on kaks intronit (Intron →→) initsieerib sünteesitud E1 valk URR plasmiidilt aga tugeva sibulakoore-tüüpi DNA replikatsiooni (rajad 24-29). Varieeruva pikkusega *origin*-i sisaldavaid replikatsiooniprodukte on iseäranis palju just reporterplasmiidist allpool, mis viitab sellele, et initsiatsioonikompleksid formeeruvad *origin*-ile enne kui elongatsiooniprotsess on jõudnud DNA sünteesi lõpetada. Replikatsioonisignaal, mis jääb reporterplasmiidist kõrgemale, viitab aga reparatsiooni- ja rekombinatsiooniprotsesside toimumisele. See signaal on, võrreldes lühemate replikatsiooniproduktide signaaliga, nõrgem.

3.6. HPV-11 intronit sisaldavatelt E1 konstruktidelt sünteesitavad E1 mRNA-d splaissitakse erineva efektiivsusega

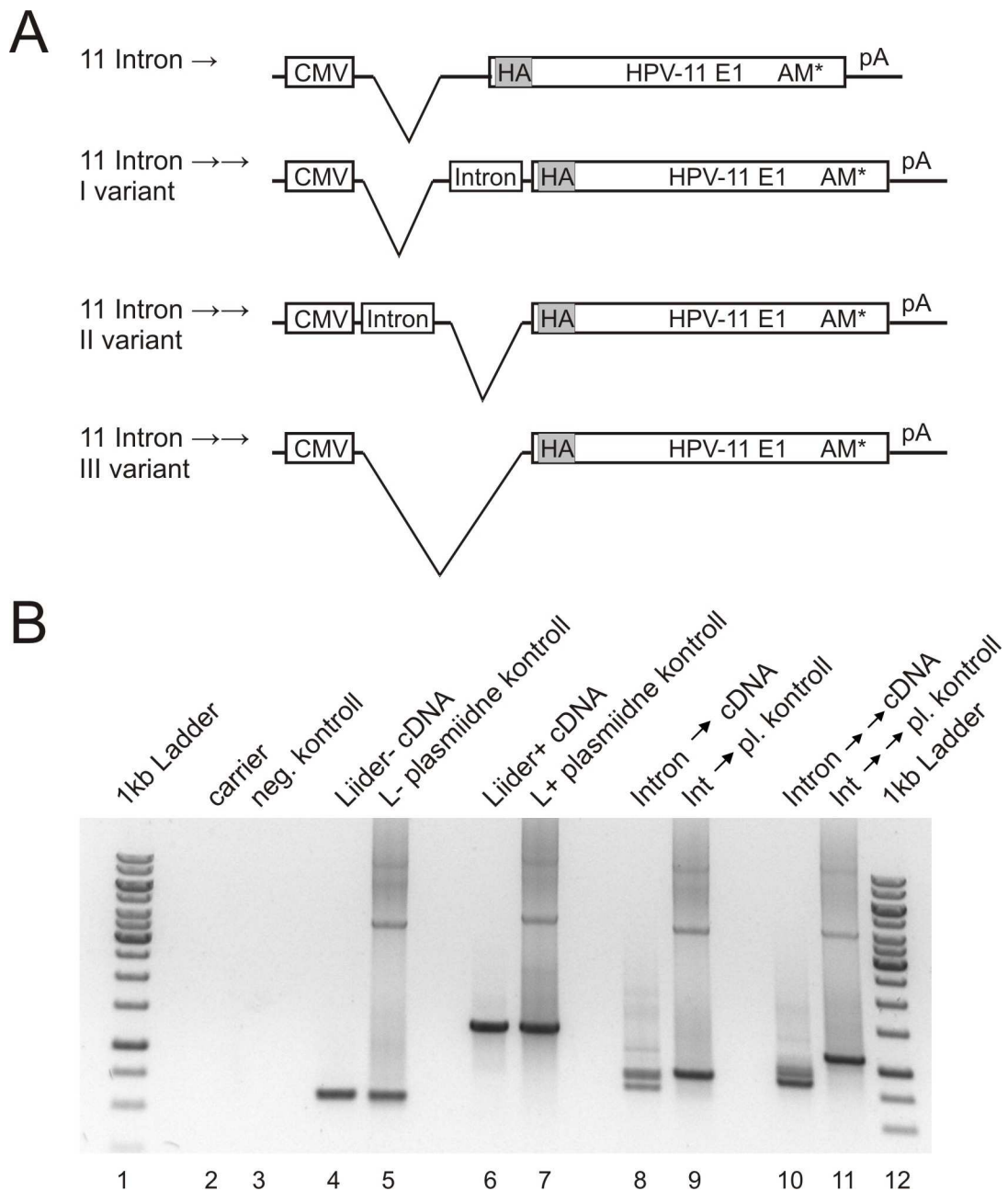
Introniga E1 konstruktidelt replikatsioonanalüüs tõstas küsimuse – kui efektiivselt toimub nendelt konstruktidelt sünteesitud mRNA splaissing ning, milliseid splaissingukohti kasutatakse kahe introniga E1 konstrukti puhul (võimalikud

variandid toodud Joonisel 18 A). Selleks kotransfekteeriti CHO rakkudesse HPV-11 Liider-, Liider+, Intron → ja Intron →→ E1 konstruktid koos E2 ja URR plasmiididega. Rakkudest eraldati totaalne RNA ning analüüsiti RT-PCR-iga. Splaissingu toimumise detekteerimiseks amplifitseeriti üles meid huvitav CMV promotori ja E1 kodeeriva järjestuse vahele jääv ala. Selleks kasutati *Forward* praimerit HPV11E1backw1 CMV promotorst ning *reverse* praimerit pCGSeq2 E1 järjestusest (praimerite seondumiskohad näidatud Joonisel 17).



Joonis 17. Praimerite seondumine HPV-11 E1 ekspressioonivektoritele. pCGSeq2 seondub CMV promotoris asuvalle järjestusele ja HPV11E1backw1 seondub E1 valku kodeeriva järjestuse esimesse kolmandikku.

mRNA analüüsis kasutati kontrollidena Liider- ja Liider+ konstrukte, mille puhul ei splaissita sünteesitavat mRNA-d uuritavast piirkonnast (Joonis 17, rajad 4 ja 6). Lisaks on mRNA splaissingu toimumise kontrollimiseks amplifitseeritud üles vastav järjestus E1 ekspressioonivektoritelt (Joonis 18 B, rajad 5, 7, 9, 11). Ühe introniga E1 konstruktilt sünteesitud mRNA puhul on näha kahte bändi (rada 8). Neist üks tähistab ilmselt splaissimata (PCR-i fragment jookseb kontrollplasmiidile vastava bändiga sama kõrgel) ja teine splaissitud mRNA-d. Kuna fragmentide intensiivsus on suhteliselt võrdne, võiks öelda, et ühe introniga E1 konstrukti puhul toimub introni osaline 50/50 splaissing (rada 8).



Joonis 18. HPV-11 E1 konstruktidelt Liider- (rada 4), Liider+ (rada 6), Intron → (rada 8) ja Intron →→ (rada 10) sünteesitud E1 sisaldavate mRNA-de analüüs. Negatiivse kontrollina transfekeeriti rakke ainult *carrier* DNA-ga (rada 2), PCR-i negatiivne kontroll asub rajal 3. Positiivsete kontrollidena kasutati vastavalt E1 ekspressiooniplasmiidilt üles amplifitseeritud uuritavat piirkonda (rajad 5, 7, 9 ja 11), suurusmarkerina kasutati 1 kb DNA Ladderit (Fermentas) (rada 1, 12).

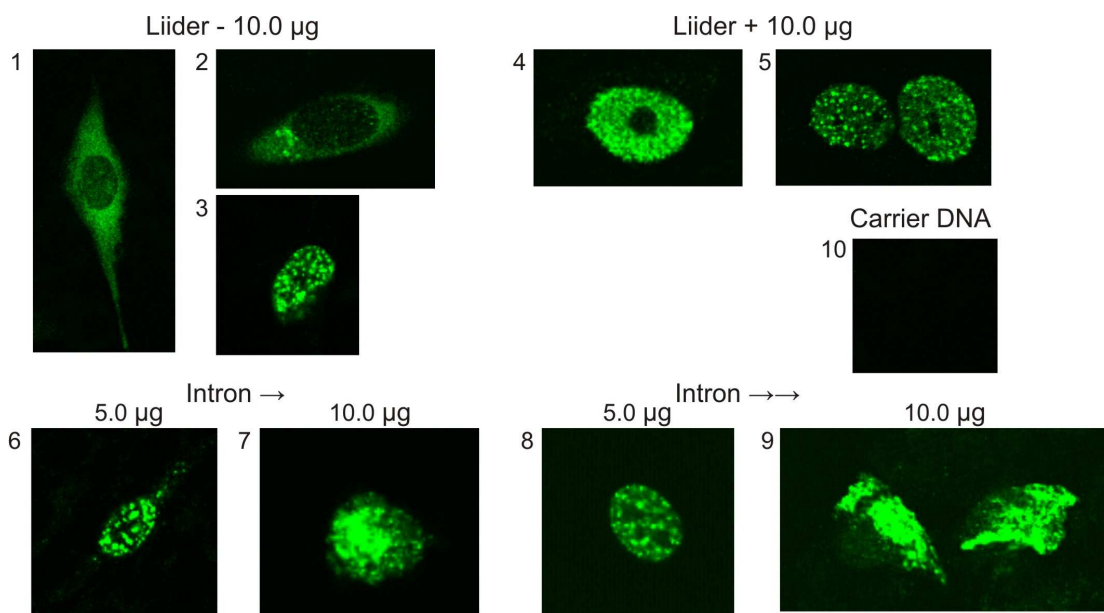
Kahe introniga konstruktilt (Intron →→) sünteesitud mRNA-dest splaissitakse enamik (umbes 80%) (Joonisel B rada 10) CMV promootori ja E1 valku kodeeriva järjestuse vahelt esimesest doonorsaidist ja viimasest aktseptorsaidist (Joonis 19 A

toodud Intron→→ splaissingu variant III). Taoliste splaissinguprotsesside toimumine võib mimikeerida „kõrge riskiga“ HPV-de E6 avatud lugemisraamis paikneva introni splaissingu olulisust ning selgitada edasise mRNA protsessingu eripärade tekkimist.

3.7. Monotsistroonselt mRNA-lt (Liider-) sünteesitav E1 valk lokaliseerub 95% juhtudest tsütoplasmas

E1 valgu transport ja modifitseerimine funktsionaalseks valguks on tihedalt seotud fosforüleerimisega ja sumoüleerimisega. Näiteks HPV-11 puhul on E1 fosforüleerimine cdk2 poolt oluline tuumas püsimiseks ja efektiivseks replikatsiooni initsieerimiseks viiruse *origin*-ilt (Deng *et al.* 2004, Lin *et al.* 2000, Ma *et al.* 1999). Eelnev introniga E1 konstruktide replikatsioonianalüüs näitas selgelt, et HPV-11 replikatsioonivalgu E1 funktsioneerimiseks on oluline tema protsessing. Sellega seoses tõstati hüpotees, et E1 valk ei jõua oma lõplikku funktsioneerimiskohta tuuma tagasi ning jääb mõnda tsütoplasma kompartmenti püsima. Selle hüpoteesi kontrollimiseks transfekteeriti CHO rakkudesse Liider-, Liider+, Intron →, Intron →→ E1 ekspressioonivektorid. 24 tunni möödudes fikseeriti rakud katteklasile ning teostati immunofluorestsentsanalüüs. Kuna varasemad katsed on näidanud, et E2 on E1 abistav valk, osaledes näiteks E1 efektiivsel seostumisel tema funktsioneerimiskohale DNA-I (Bonne-Andrea *et al.* 1997, Sedman T. *et al.* 1997, Seo *et al.* 1993b). Selleks transfekteeriti rakkudesse lisaks E1 konstruktile ka E2 ekspressioonivektor ning URR plasmidid.

Minu poolt teostatud immunofluorestsentsanalüüsilt on näha, et Liider+, Intron→ ja Intron→→ E1 konstruktidelt sünteesitud E1 valgud lokaliseeruvad rakutuuma (Joonis 17, pildid 4-9), monotsistroonselt mRNA-lt (Liider-) sünteesitud E1 valgud aga mitte (Joonis 19, pildid 1 ja 2). Samas esineb ka erandeid – umbes 5% juhtudest jõuab ka monotsistroonselt mRNA-lt sünteesitav E1 valk tuuma (pilt 3), millega on selgitatav madalal tasemel toimuv DNA replikatsioon (Joonis 13 ja 16 A, rajad 6-11). Selleks, et eristada monotsistroonselt ja polütsistroonselt mRNA-lt sünteesitud E1 valke, võidakse rakus kasutada mingit märgistust, mille puhul splaissosoomi läbinud E1 mRNA-l tagatakse E1 valgu aktiveerumine ja lokaliseerimine tuuma. Siiski pole täpselt teada, milliste mehhanismide alusel toimub ühe või teise E1 valgu puhul efektiivne protsessing, seetõttu vajab nende küsimuste lahendamise edasist jätkuvat analüüsi.



Joonis 19. HPV-11 E1 konstruktidelt sünteesitud E1 valgud lokaliseeruvad erinevatesse raku kompartmentidesse. Gripiviiruse hemaglutiniini (HA) epitoop *tag*'iga HPV-11 E1 Liider- (pildid **1-3**), Liider+ (pildid **4, 5**), Intron → (pildid **6, 7**) ja Intron →→ (pildid **8, 9**) konstruktidelt sünteesitavate E1 valkude immunofluorestsentsanalüüs 24 tundi peale transfektsiooni. E1 valgu signaal detekteeriti primaarse HA-7 antikehaga ning sekundaarse hiire immunoglobuliini (Ig) vastase Alexa 488-ga konjugeeritud antikehaga. Kontrolliks on CHO rakke transfekteeeritud carrier DNA-ga (pilt **10**).

Nii ühe (Intron →) kui kahe introniga (Intron →→) E1 konstruktidelt sünteesitav E1 valk lokaliseerub, sarnaselt polütsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valguga, tuuma (Joonis 19, pildid 6, 7, 8 ja 9). Märkimist väärrib aga pilt 9, kus 10.0 µg-se kahe introniga konstrukti transfekteeerimisel, ekspresseerub E1 valk tõenäoliselt niivõrd kõrgel tasemel, et tuumamembraan ei ole survele vastu pidanud ning on vabastab tuumas oleva materjali tsütoplasmasse. Antud katse puhul 10.0 µg-se kahe introniga E1 konstrukti transfekteeerimisel olid kõik rakud sama fenotüübiga. Vastavalt jooniselt 16 A nähtud replikatsioonisignaalile toimub nende rakkude populatsioonis tervikuna ilmselt ka väga intensiivne transientne DNA ülereplikatsioon.

Lisaks on näha, et E1 valk ei ole jaotunud tuumas ühtlaselt vaid koguneb fookustesse. Need fookused võiksid tähistada URR plasmiidilt lähtuvat transientse DNA

replikatsiooni tsentreid, kuhu on koondunud ka peremeesraku replikatsiooni masinavärk. Meelis Kadaja on näidanud HPV positiivsetes HeLa ja SiHa rakkudes integreeritud URR-ilt lähtuva replikatsiooni puhul kahte või kolme potentsiaalse replikatsioonitsentri ilmumist (avaldamata andmed). Võimalik, et E1 ja E2 valgud mobiliseerivad peremeesraku replikatsiooni masinavärki nii, et amplifikatsioonilise DNA replikatsiooni faasis toimub DNA replikatsioon põhiliselt viiruslikult *origin*-ilt, mis on integreerunud peremeesraku koosseisu (HeLa ja SiHa). Samas peab episomaalselt URR plasmiidilt lähtuva DNA replikatsiooni võimalike tsentrite tekkimist edaspidi uurima, näiteks mõne rakulise valguga kolokalisatsiooni seisukohast lähtudes.

ARUTELU

Inimese papilloomiviiruste avatud lugemisraamid on ekspresseeritud polütsistronse mRNA-na kahelt viiruslikult promootorilt – varajaselt diferentseerumisest sõltumatult ja hiliselt promootorilt, mis aktiveeritakse peale peremeesraku diferentseerumist granuloos- ja sarvkihi rakkudeks. Viiruse DNA replikatsiooniks ja peremeesraku üle kontrolli saavutamiseks vajalikud viiruslik valgud – E1, E2, E6, E7, E5 – ekspresseeritakse esmalt varajaselt, E6 lugemisraami ees paiknevalt, promootorilt. Rakkude suundudes diferentseerumisele lülitatakse sisse E7 avatud lugemisraamis asuv hiline promootor, millelt transkribeeritakse replikatsiooniks ning kapsiidi assambleerumiseks vajalikud valgud. Meid huvitava replikatsioonivalgu E1 taset hoiab viirus looduslikes tingimustes suhteliselt madalal tasemel, tehes seda mitmel erineval moel: erinevate promootorite sisse ja välja lülitamisega, nende aktiivsuste reguleerimisega E2 valgu abil, pre-mRNA splaissinguga põhilisest splaissingu doonorsaidist (4. koodoni juurest), mRNA stabiilsusega, ebatüüpilise polütsistronse mRNA translatsioonimehhanismiga ning mehhanismidega, mis reguleerivad valgu lokaliseerimist ja stabiilsust (Deng et al. 2003, Malcles et al. 2002, Remm et al. 1999). BPV-1-1 oli täispikka E1 valgu ekspresseerivate plasmiidide konstrueerimine suhteliselt hõlbus. Seevastu täispika ja funktsionaalse HPV-de E1 valgu ekspresseerimiseks on olnud vajalik erinevate modifikatsioonide sisseviimine – liiderjärjestuse E6 ja E7 lisamine E1 valgu kodeeriva järjestuse ette, põhilise splaissingu doonorsaidi asendamine gripiviiruse hemaglutiniini (HA) epitoop *tag*-iga ning HPV-11 puhul splaissingu aktseptorsaiti punktmutatsiooni sisseviimine 2622. nukleotiidis.

Minu poolt läbi viidud erinevate HPV subtüüpide E1 valgu analüüsid näitavad, et „madala riskiga“ ja „kõrge riskiga“ HPV-del toimub E1 valgu süntees, sõltuvalt E1 ekspressioonivektori tüübist, mõneti erinevalt. Näiteks HPV-11 puhul toimub CHO rakkudes kõrgem E1 valgu ekspressioon monotsistronse mRNA puhul, HPV-16-1 ja HPV-18-1 transleeritakse aga monotsistronselt mRNA-lt E1 valgu suhteliselt madalal tasemel. Polütsistronselt mRNA-lt toimuv E1 valgu süntees omab aga vastupidist tendentsi – kui „kõrge riskiga“ HPV subtüüpide puhul ekspresseeritakse E1 valgu efektiivselt, siis „madala riskiga“ HPV-del jääb E1 signaal tagasihoidlikumaks. Sarnane E1 valgu ekspressiooni erinevus on täheldatav ka HeLa rakkudes, kus HPV-

16 ja HPV-18-1 on E1 signaal monotsistronse mRNA puhul vaevu detekteeritav. HPV-11-1 aga ekspresseeritakse nii mono- kui polütsistronsel mRNA-lt E1 valku enam vähem võrdsetel tasemetel. Siinkohal võivad olulist rolli mängida E6 ja E7 liiderjärjestuses asuvad erinevad võimalikud regulatoorsed elemendid. Võimalik, et „kõrge riskiga” papilloomiviirused omavad E6 ja E7 järjestuses mõnda E1 protsessingut positiivselt mõjutavat elementi, mis „madala riskiga” HPV-del puudub või omab vastupidist – negatiivset efekti. Nende järjestuste lähemal uurimisel jäi silma „kõrge riskiga“ HPV-de puhul E6 ORF-is asuv intron, mille splaissing võiks positiivselt mõjutada polütsistronses mRNA-s kolmanda valguna protsessitava E1 edasist käekäiku. Splaissingu toimumine elimineeriks seejuures protsessitud mRNA-lt E6 ja E7 valgu sünteesi. „Madala riskiga” HPV-del ei esine E6 avatud lugemisraamis intronit ning võimalik, et nende puhul reguleeritakse polütsistronsel mRNA-lt kodeeritavaid valke, sealhulgas E1, teiste mehhanismide järgi (Stacey *et al.* 1995). Samas pakkus huvi, mis juhtub HPV-11 süsteemis siis kui promotori ja kodeeriva järjestuse vahel oleks intron. Kimäärse introni lisamine, CMV promotori ja E1 valgu kodeeriva järjestuse vahele, tõstis E1 valgu ekspressiooni, võrrelduna polütsistronsel mRNA-lt sünteesitud E1 valgu tasemega, mitmeid kordi. Seega võiks arvata, et introni olemasolu „madala riskiga“ HPV E1 valgu kodeeriva järjestuse ees mõjaks positiivselt E1 valgu protsessingule. Samaaegselt saab ka järeldada, et „kõrge riskiga“ HPV-del võib introni splaissing E6 ORF-ist olla üks moodusi E1 valgu taseme reguleerimiseks. Võimalik, et nimetatud introni splaissimata jätmisel kasutatakse alternatiivseid splaiss-saite, mille tulemusel transleeritakse polütsistronsetelt mRNA-delt teiste funktsioonidega viiruse valke või replikatsioonis inaktiivseid E1 valke.

Replikatsioonisignaali võrdlemisel omavad „madala” ja „kõrge” riskiga HPV-d sarnast DNA replikatsiooni pilti. Kõikide HPV subtüüpide puhul on DNA replikatsioon edukamad need E1 valgud, mis on sünteesitud polütsistronsel mRNA-lt. Samas monotsistronsel mRNA-lt transleeritud E1 valkude puhul on täheldatavad mõningad erinevused. Kui HPV-11-1 toetab monotsistronsel mRNA-lt sünteesitud E1 valk URR plasmiidilt lähtuvat DNA replikatsiooni vaid vähesel määral, siis HPV-16-1 ja HPV-18-1 ei toimu replikatsioon isegi 10.0 µg E1 ekspressioonikonstrukti rakkudesse transfekteerimisel. Ka inimese rakkudes (HeLa) omavad „madala riskiga” ja „kõrge riskiga” HPV subtüüpid sarnast DNA

replikatsiooni pilti – efektiivsemalt toetavad DNA replikatsiooni polütsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valgud. Samas kui CHO rakkudes toetab HPV-11 monotsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valk URR plasmiidilt lähtuvat DNA replikatsiooni mõõdukal tasemel, siis HeLa rakkudes on võib olla mõningast replikatsiooni näha 10.0 µg E1 ekspressioonikonstrukti rakkudesse transfekteerimisel 48 tunni ajapunktis.

Kui võrrelda HPV-11 replikatsioonikatsete tulemusi CHO ja HeLa rakuliinis, ei toimu HeLa rakuliinis monotsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valgu puhul URR plasmiidilt lähtuvat DNA replikatsiooni üldse. Samas CHO rakkudes oli mõningast signaali isegi näha. Võimalik, et see on seotud E1 ekspressiooniaktiivsusega, kuid võib olla seletatav ka HeLa-s toimuva E1 sünteesi eripäraga. Varasemalt on tõestatud HeLa rakkudes, et lühemad inimese papilloomiviiruse replikatsioonivalgu E1 vormid korjavad rakusüsteemist välja tsükliin E/CDK kompleksid ning inhibeerivad viiruse DNA replikatsiooni (Lin *et al.* 2000). Tsükliin E/CDK kompleksid on vajalikud E1 valgu post-translatsiooniliseks modifitseerimiseks ja replikatsioonifunktsioonide aktiveerimiseks. Võimalik, et monotsistronselt mRNA-lt sünteesitavad E1 valgud ei suuda konkureerida integreerunud HPV-18 genoomilt (HeLa) sünteesitava lühema E1N valguga tsükliin E/CDK pärast ning jääb seetõttu aktiveerimata. Samas polütsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 toetab DNA replikatsiooni ning võimalik, et need E1 valgud suudavad edukamalt konkureerida E1N-vormiga tsükliin E/CDK kompleksi pärast.

Aktseptormutatsiooni sisseviimine HPV-11 E1 ekspressioonikonstruktidesse, mille tulemusel ei sünteesita lühemaid E1 valgu vorme, võiks, kirjanduse andmetele tuginedes, replikatsiooniaktiivsust tõsta. Minu poolt tehtud katsetes CHO ja HeLa rakuliinis aga ei takista lühemad E1 vormid transientse DNA replikatsiooni toimumist. Samas on teada, et HeLa rakkudesse on integreerunud HPV-18 genoomi segment, kus on E1 valku kodeeriv järjestus katki. Seega võib C-terminuseta ja inhibeerivate omadustega E1 valkude süntees toimuda vaid integreeritud HPV genoomi osalt. Replikatsioonisignaalid on visuaalselt sarnased aktseptormutatsiooniga ja -mutatsioonita E1 valkude puhul. Järelikult ei ole E1N vormide süntees seotud alternatiivse splaissinguga 2622. nukleotiidi juures.

Amplifikatsioonilist DNA replikatsiooni võib seostada papilloomiviirustel kahe elutsükli faasiga – esimese faasiga, kohe peale nakatumist, ning viimase, vegetatiivse, faasiga, vahetult enne virionide valmimist. Looduslikes tingimustes hoiab viirus täispika E1 valgu taset madalal, tõstes seda vaid siis kui on vaja kiirelt oma genoomi koopiaarvu suurendada – näiteks virionide assambleerumiseks. Ka nakatumise algfaasis on viirusel jätkusuutlikuks paljunemiseks vaja koheselt oma genoomi koopiaarv üles saada. Replikatsioonianalüüsides nii CHO kui HeLa rakkudes on näha, et kõigi kasutatud HPV subtüüpide puhul tekitavad polütsistroonselt mRNA-lt sünteesitud E1 valgud sibulakoore-tüüpi ebatüüpilise DNA replikatsiooni. Smääri esinemine on eelkõige detekteeritav 48 tunni ajapunktis, mis viitab, et kuskil 24 ja 48 tunni vahel muutub URR plasmiidilt lähtuv replikatsioonilaad. Sarnaseid replikatsiooniprodukte on meie laboris täheldatud ka varem – BPV-1 URR-i sisaldavate plasmiidide DNA replikatsioonil CHO rakkudes (Männik et al. 2002). Taoline ori ja külgnevate järjestuste amplifitseerimist tekitav DNA süntees toimub just kõrge E1 valgu taseme juures, kui viiruse *origin*-ilt algav replikatsiooni initsiatsioon läheb kontrolli alt välja ning enamiku nähtavast kogusignaalist moodustab üle foresiraja ulatuv smäär. Huvitav on aga asjaolu, et kui HPV-11-1 ja HPV-16-1 sünteesitakse rohkem reporterplasmiidiga ühepikkuseid DNA molekule, siis HPV-18-1 on replikatsioonisignaal näha rohkem hajusa smäärina kui diskreetse bändina. Ilmselt jõuab HPV-11 ja HPV-16 puhul elongatsiooniprotsess sagedamini lõpuni (diskreetsete bändide osakaal suurem) kui HPV-18 süsteemis, kus tekib rohkem varieeruva suurusega *origin*-i sisaldavaid replikatsiooniprodukte. HPV-18 DNA on leitud kasvajakududes enamasti integreeritud kujul. Samas HPV-16 puhul on viiruse genoom leitud pigem episoomina.

Varasem töö HPV-18 puhul on näidanud, et efektiivseks E1 valgu ekspresseerimiseks on vaja E1 sünteesida E6, E7 ja E1 ORF-e sisaldavalt polütsistroonselt mRNA-lt (Remm et al. 1999). Käesoleva töö tulemused demonstreerivad samuti, et introni olemasolu HPV E1 mRNAs tõstab E1 valgu taset rakkudes. See on kooskõlas üldiselt aktsepteeritud arusaamaga, et splaissosoomi läbinud mRNA-d transporditakse eukariootsetes rakkudes efektiivsemalt tuumast tsütoplasmasse kui splaissingu mitteläbinud eukariootsed mRNA-d. Huvitav on siinkohal asjaolu, et HPV-de E1 mRNA sisaldab lisaks E1-le ka E6, E7 ja E2 ORF-idelt sünteesitud informatsiooni, kuid vaid „kõrge riskiga“ HPV-de puhul on avastatud E6 ja E7 järjestustes intron.

Seega võib eeldada, et „kõrge riskiga“ HPV-de puhul on E1 valgu tase juba vaikimisi kõrgemal tasemel kui „madala riskiga“ HPV-de puhul. Seetõttu võiks „kõrge riskiga“ nakatunud rakkudel olla suurem oht langeda HPV sibulakoore-tüüpi DNA replikatsiooni ohvriks läbi viiruse onkogeene sisaldavate lineaarsete viirusfragmentide integratsiooni peremeesraku genoomi. Kliinilistes proovides pole siiani tõepoolest leitud integreerunud „madalasse riskigrupi“ kuuluvate viiruste DNA-d. See võib olla põhjustatud E1 valgu madalast tasemest, mis ei loo eeldusi viiruse integratsiooniks. Teisalt ei saa loobuda ka teooriast, et „madala riskiga“ HPV-d integreeruvad sama sagedasti kui „kõrge riskiga“ HPV-d, kuid „madala riskiga“ HPV onkogeenid ei suuda tagada nakatunud rakkudele kasvueelset normaalsete rakkude ees. Teisisõnu ei toimu „madala riskiga“ HPV-ga nakatunud rakkude klonaalset ekspansiooni nii nagu „kõrge riskiga“ HPV-de puhul.

Antud töö tulemused diferentseerumata rakuliinis CHO näitavad, et E6/E7 liiderjärjestus on vajalik E1 rolli realiseerumiseks, vastasel juhul lokaliseerub valk tsütoplasmasse, kus ta ei ole võimeline oma ülesandeid täitma. Üheks lokaliseerumise erinevuse põhjuseks võiks siinkohal välja tuua post-translatsioonilise modifikatsiooni. On teada, et HPV-11 E1 valk omab nelja potentsiaalset tsükliin-kinaasi fosforüleerimissaiti: S89, S93, S107 ja T468, milledele kõigile järgneb proliini jääk. Nende saitide fosforüleerimisega kindlate tsükliin kinaaside poolt tagatakse E1 valgu aktiveerimine ja tuuma lokaliseerumine. Kui neid saite ei fosforüleerita või tehakse seda teiste kinaaside poolt, jääb E1 valk inaktiivseks ning lokaliseerub tsütoplasmasse. Post-translatsiooniline modifikatsioon võib olla seotud polütsistronse mRNA ja introniga konstruktidelt sünteesitud mRNA splaissosoomi läbimisega. Splaissosoomi läbinud mRNA puhul võidakse kasutada mingit märgistust, mille puhul tagatakse E1 valgu aktiveerimine ja lokaliseerumine tuuma. Samas võib E1 valgu lokaliseerumise eripära olla seotud ka peremeesraku diferentseerumisastmega. Mitmetes diferentseerunud rakkudes teostatud inimese papilloomiviiruse uuringute puhul on näidatud, et kõrge replikatsioonivalgu E1 ekspressioon on eelkõige seotud E7 ORF-is oleva hilise promotori sisselülitamisega. Viiruse seisukohast on äärmiselt oluline, et stabiilselt rakkudes püsimise faasis, kus viiruse DNA replikatsioon toimub statistiliselt üks kord rakutsükliks, oleks viiruse replikatsioonivalgu ekspressioon madal. Seetõttu on võimalik, et funktsionaalset E1 valku sünteesitakse diferentseerumata rakkudes vaid suhteliselt nõrgalt promotoriilt

p97 (minul Liider+ konstrukt) ning suhteliselt tugevalt hiliselt E7 promootorilt ekspresseeritav (lekkiv) E1 valk hoitakse tsütoplasmas (Liider- konstrukt). Võib ette kujutada olukorda, kus keratinotsüütide diferentseerumise käigus aktiveeritakse järkjärgult ka E7 ORF-is olev promootor, kuid E1 lokaliseerub (ladustub) tsütoplasmasse. Teatud raku diferentseerumise etapil võivad aga toimuda kriitilised muutused näiteks mRNA splaissingu või valgu tuuma transpordi mehhanismides, mis suunavad varasemalt tsütoplasmas ladestunud E1 valgu tuuma ning põhjustavad viiruse genoomi vegetatiivse amplifikatsioonilise DNA replikatsiooni. Seega üldine splaissingumustri muutumine rakkudes võib olla HPV elutsükli oluliselt mõjutavaks faktoriks.

Sarnane E1 ekspressiooni puudutav stsenaarium on ette kujutatav ka vähi rakkude puhul, kus HPV integratsiooni peetakse pahaloomuliste protsesside käivitamisel peamiseks faktoriks. HPV genoomi integratsiooni võivad põhjustada aga sibulakooretüüpi replikatsioonil tekkivad lineaarsed viiruse genoomi fragmendid. Lineaarsete DNA fragmentide integratsioon on, rõngasmolekulidega võrreldes, võrratult palju efektiivsem. Sibulakoore- replikatsioon, ja seeläbi lineaarsete HPV fragmentide teke sõltub aga E1 valgu tasemest raku tuumas. E1 taseme tõusu üheks põhjuseks võib olla ka E7-s oleva promootori sisselülitumine ja/või splaissingumustri muutumine rakkudes. Alternatiivne splaissing on vähirakkudes aga laialt kirjeldatud protsess ning võib seega olla initsieerivaks faktoriks HPV DNA integratsioonil.

Antud tööd võib käsitseda kui esmast katset mõistmaks viiruslike replikatsioonivalkude regulatsioonimehhanisme diferentseerumata rakkudes. Edasised tööd on plaanis läbi viia diferentseerunud rakuliinides, mille puhul võiks hilist promootorit mimikeerivalt CMV promootorilt sünteesitav E1 valk lokaliseeruda tuuma ja seal aktiivselt DNA replikatsiooniprotsessis osaleda.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse ülevaade inimese papilloomiviirustest (HPV-dest), keskendudes rohkem replikatsioonimehhanismidele ja viiruselise replikatsioonivalgu E1 kirjeldamisele. Eksperimentaalses osas uuritakse konstrueeritud HPV-11, HPV-16 ja HPV-18 E1 ekspressioonivektorite mõju rakkudesse kotransfekteeritud URR plasmiididelt lähtuvale transientssele DNA replikatsioonile. Lisaks toodakse välja huvitavad aspektid E1 valgu ekspresseerimisel monotsistronselt ja polütsistronselt mRNA-lt.

Töö tulemused:

1. Nii „madala riskiga“ (HPV-11) kui „kõrge riskiga“ (HPV-16 ja HPV-18) inimese papilloomiviirustel toimub, sarnaselt veise papilloomiviiruse tüüp 1-ga, kõrgetel E1 valgu tasemetel sibulakoore-tüüpi DNA replikatsioon.
2. Replikatsioonis aktiivse E1 valgu ekspresseerimiseks on vaja teda protsessida polütsistronselt, E6, E7 ja E1 avatud lugemisraame sisaldavalt, mRNA-lt.
3. Sibulakoore-tüüpi DNA amplifikatsiooniline replikatsioon on seotud polütsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valgu protsessimisega. Monotsistronselt mRNA-lt sünteesitud E1 valg ei ole võimeline toetama URR plasmiidilt lähtuvat DNA replikatsiooni.
4. E6 avatud lugemisraamis oleva introni splaissing omab E1 protsessimisel positiivset efekti.
5. Sünteetilise introni kloneerimine promootori ja E1 valgu kodeeriva järjestuse vahele võimaldab sünteesitava E1 valgul toetada amplifikatsioonilise DNA replikatsiooni.
6. Monotsistronsetelt mRNA-delt sünteesitud E1 valgud ladestuvad rakus tsütoplasmasse, kus need ei ole võimelised oma ülesandeid täitma. Samas polütsistronselt mRNA-lt ja sünteetilise introniga E1 konstruktidelt sünteesitud E1 valgud lokaliseeruvad tuuma ning toetavad transientsset DNA replikatsiooni hästi.

SUMMARY

Regulation of Human papillomavirus replication protein E1 expression and its effect on DNA replication efficiency

Human papillomaviruses are small species-specific DNA tumour viruses that cause cervical cancer. For DNA replication minimally is needed viral replication proteins E1 and E2. The E1 protein is the replication origin recognition factor and viral helicase, which in cooperation with E2 facilitates recognition and effective loading of the host cell replication complexes at the papillomavirus origin in the Upstream Regulatory Region (URR). Since papillomavirus genome is quite compact and consists of two promoters the E1 protein, and presumably other viral proteins, is translated from polycistronic mRNA that includes coding sequences for the E6, E7 and E1 proteins. In undifferentiated basal cells viral oncoproteins E6, E7 and replication protein E1 is under the control of early promoter which is located upstream the first coding sequence E6. This promoter is under the control of E2 protein. After the host cell differentiation to suprabasal cells virus activates additionally to early promoter its late promoter within the E7 coding sequence for effective production of viral replication proteins E1 and E2. It has been shown earlier **in bovine papillomavirus research** that in high concentrations of E1 protein onion skin type of DNA amplification occur, resulting various sizes of origin containing DNA fragments. These fragments are similar to integrated HPV genome fragments found in cervical cancer cells which indicates that this kind of replication may occur also among human papillomaviruses.

In this study we show onion skin-type of DNA replication from HPV-11, HPV-16 and HPV-18 ori containing plasmids, mediated by high concentrations of E1 protein produced from polycistronic mRNA similarly to early viral promoter E1 translation mode. Alternatively, E1 protein, when produced from monocistronic mRNA, does not support transient DNA replication. It is shown that in case of high risk HPV-s intron within E6 ORF is important to effective E1 protein processing. Chimeric intron between CMV promoter and E1 coding sequence induces DNA amplificational replication, similarly to E1 protein that is produced from polycistronic mRNA. In immunofluorescent analysis it is shown that in case of monocistronic mRNA E1 is

located mostly in the cytoplasm while in case of polycistronic mRNA it is transferred into the nucleus, where it can function as a replication protein.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Amin AA, Titolo S, Pelletier A, Fink D, Cordingley MG, Archambault J. 2000. Identification of domains of the HPV11 E1 protein required for DNA replication in vitro. *Virology* 272: 137-150.
- Bian XL, Rosas-Acosta G, Wu YC, Wilson VG. 2007. Nuclear import of bovine papillomavirus type 1 E1 protein is mediated by multiple alpha importins and is negatively regulated by phosphorylation near a nuclear localization signal. *J Virol* 81: 2899-2908.
- Bonne-Andrea C, Tillier F, McShan GD, Wilson VG, Clertant P. 1997. Bovine papillomavirus type 1 DNA replication: the transcriptional activator E2 acts in vitro as a specificity factor. *J Virol* 71: 6805-6815.
- Chiang CM, Dong G, Broker TR, Chow LT. 1992. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol* 66: 5224-5231.
- Chow LT, Broker TR, Lewis JB. 1979. Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2. *J Mol Biol* 134: 265-303.
- Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 274: 2696-2705.
- Darshan MS, Lucchi J, Harding E, Moroianu J. 2004. The 12 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors. *J Virol* 78: 12179-12188.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17-27.
- Del Vecchio AM, Romanczuk H, Howley PM, Baker CC. 1992. Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol* 66: 5949-5958.
- Deng W, Jin G, Lin BY, Van Tine BA, Broker TR, Chow LT. 2003. mRNA splicing regulates human papillomavirus type 11 E1 protein production and DNA replication. *J Virol* 77: 10213-10226.
- Deng W, Lin BY, Jin G, Wheeler CG, Ma T, Harper JW, Broker TR, Chow LT. 2004. Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* 78: 13954-13965.
- Doorbar J, Parton A, Hartley K, Banks L, Crook T, Stanley M, Crawford L. 1990. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* 178: 254-262.
- Enemark EJ, Stenlund A, Joshua-Tor L. 2002. Crystal structures of two intermediates in the assembly of the papillomavirus replication initiation complex. *Embo J* 21: 1487-1496.
- Enemark EJ, Chen G, Vaughn DE, Stenlund A, Joshua-Tor L. 2000. Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Mol Cell* 6: 149-158.
- Fanning E. 1998. Introduction to simian virus 40: getting by with more than a little help from its host cell. *Dev Biol Stand* 94: 3-8.
- Fouts ET, Yu X, Egelman EH, Botchan MR. 1999. Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. *J Biol Chem* 274: 4447-4458.
- Frattoni MG, Laimins LA. 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204: 799-804.

- Gillette TG, Lusky M, Borowiec JA. 1994. Induction of structural changes in the bovine papillomavirus type 1 origin of replication by the viral E1 and E2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8846-8850.
- Gillitzer E, Chen G, Stenlund A. 2000. Separate domains in E1 and E2 proteins serve architectural and productive roles for cooperative DNA binding. *Embo J* 19: 3069-3079.
- Goldfarb DS, Garipey J, Schoolnik G, Kornberg RD. 1986. Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* 322: 641-644.
- Gopalakrishnan V, Khan SA. 1994. E1 protein of human papillomavirus type 1a is sufficient for initiation of viral DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9597-9601.
- Gopalakrishnan V, Walker S, Khan SA. 1995. Stimulation of human papillomavirus type 1a DNA replication by a multimerized AT-rich palindromic sequence. *Virology* 214: 301-306.
- Gorlich D, Kutay U. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 607-660.
- Hartley KA, Alexander KA. 2002. Human TATA binding protein inhibits human papillomavirus type 11 DNA replication by antagonizing E1-E2 protein complex formation on the viral origin of replication. *J Virol* 76: 5014-5023.
- Hogarth CA, Calanni S, Jans DA, Loveland KL. 2006. Importin alpha mRNAs have distinct expression profiles during spermatogenesis. *Dev Dyn* 235: 253-262.
- Holt SE, Schuller G, Wilson VG. 1994. DNA binding specificity of the bovine papillomavirus E1 protein is determined by sequences contained within an 18-base-pair inverted repeat element at the origin of replication. *J Virol* 68: 1094-1102.
- Hsu CY, Mechali F, Bonne-Andrea C. 2007. Nucleocytoplasmic shuttling of bovine papillomavirus E1 helicase downregulates viral DNA replication in S phase. *J Virol* 81: 384-394.
- Hubert WG, Laimins LA. 2002. Human papillomavirus type 31 replication modes during the early phases of the viral life cycle depend on transcriptional and posttranscriptional regulation of E1 and E2 expression. *J Virol* 76: 2263-2273.
- Hughes FJ, Romanos MA. 1993. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res* 21: 5817-5823.
- Jans DA, Hubner S. 1996. Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev* 76: 651-685.
- Kadaja M, Sumerina A, Verst T, Ojarand M, Ustav E, Ustav M. 2007. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *Embo J* 26: 2180-2191.
- Kanopka A, Muhlemann O, Petersen-Mahrt S, Estmer C, Ohrmalm C, Akusjarvi G. 1998. Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins. *Nature* 393: 185-187.
- Khoury G, Alwine JC, Dhar R, Gruss P, Lai CJ, Segal S, Seif I. 1980. Regulation of SV40 gene expression through RNA splicing. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 44 Pt 1: 41-54.
- Klumpp DJ, Laimins LA. 1999. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology* 257: 239-246.
- Kuo S, Liu J, Broker T, Chow L. 1994. Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J Biol Chem* 269: 24058-24065.
- Kurg R, Tekkel H, Abroi A, Ustav M. 2006. Characterization of the functional activities of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein single-chain heterodimers. *J Virol* 80: 11218-11225.

- Larsson S, Kreivi JP, Akusjarvi G. 1991. Control of adenovirus alternative RNA splicing: effect of viral DNA replication on RNA splice site choice. *Gene* 107: 219-227.
- Le Roux LG, Moroianu J. 2003. Nuclear entry of high-risk human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein occurs via several pathways. *J Virol* 77: 2330-2337.
- Leng X, Wilson V, Xiao XL [corrected to Leng X. 1994. Genetically defined nuclear localization signal sequence of bovine papillomavirus E1 protein is necessary and sufficient for the nuclear localization of E1-beta-galactosidase fusion proteins [published erratum appears in *J Gen Virol* 1994 Dec;75(Pt 12):3688]. *J Gen Virol* 75 (Pt 9): 2463-2467.
- Lentz M, Pak D, Mohr I, Botchan M. 1993. The E1 replication protein of bovine papillomavirus type 1 contains an extended nuclear localization signal that includes a p34cdc2 phosphorylation site. *J Virol* 67: 1414-1423.
- Li R, Knight J, Bream G, Stenlund A, Botchan M. 1989. Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome. *Genes Dev* 3: 510-526.
- Lin BY, Ma T, Liu JS, Kuo SR, Jin G, Broker TR, Harper JW, Chow LT. 2000. HeLa cells are phenotypically limiting in cyclin E/CDK2 for efficient human papillomavirus DNA replication. *J Biol Chem* 275: 6167-6174.
- Liu J, Kuo S, Broker T, Chow L. 1995. The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J Biol Chem* 270: 27283-27291.
- Longworth MS, Laimins LA. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 362-372.
- Lusky M, Hurwitz J, Seo Y. 1994. The bovine papillomavirus E2 protein modulates the assembly of but is not stably maintained in a replication-competent multimeric E1-replication origin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8895-8899.
- Ma T, Zou N, Lin BY, Chow LT, Harper JW. 1999. Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 382-387.
- Macara IG. 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 570-594, table of contents.
- Malcles MH, Cueille N, Mechali F, Coux O, Bonne-Andrea C. 2002. Regulation of bovine papillomavirus replicative helicase e1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Virol* 76: 11350-11358.
- Männik A, Rünkorg K, Jaanson N, Ustav M, Ustav E. 2002. Induction of the Bovine Papillomavirus origin "onion skin"-type DNA replication at high E1 protein concentrations in vivo. *J. Virol.* 76: 5835-5845.
- Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA. 1998. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* 72: 7407-7419.
- Mastrangelo IA, Hough PV, Wall JS, Dodson M, Dean FB, Hurwitz J. 1989. ATP-dependent assembly of double hexamers of SV40 T antigen at the viral origin of DNA replication. *Nature* 338: 658-662.
- McBride A, Byrne J, Howley P. 1989. E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 510-514.
- Melendy T, Sedman J, Stenlund A. 1995. Cellular factors required for papillomavirus DNA replication. *J Virol* 69: 7857-7867.

- Mendoza R, Gandhi L, Botchan MR. 1995. E1 recognition sequences in the bovine papillomavirus type 1 origin of DNA replication: interaction between half sites of the inverted repeats. *J Virol* 69: 3789-3798.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 78: 11451-11460.
- Nelson LM, Rose RC, Moroianu J. 2002. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* 277: 23958-23964.
- . 2003. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 interacts with Kap beta2 and Kap beta3 nuclear import receptors. *Virology* 306: 162-169.
- Nelson LM, Rose RC, LeRoux L, Lane C, Bruya K, Moroianu J. 2000. Nuclear import and DNA binding of human papillomavirus type 45 L1 capsid protein. *J Cell Biochem* 79: 225-238.
- Ozbun MA, Meyers C. 1998. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology* 248: 218-230.
- 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* 91: 8700-8704.
- 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* 15: 1-11.
- Remm M, Brain R, Jenkins JR. 1992. The E2 binding sites determine the efficiency of replication for the origin of human papillomavirus type 18. *Nucleic Acids Res* 20: 6015-6021.
- Remm M, Remm A, Ustav M. 1999. Human papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism. *J Virol* 73: 3062-3070.
- Rocque WJ, et al. 2000. Replication-associated activities of purified human papillomavirus type 11 E1 helicase. *Protein Expr Purif* 18: 148-159.
- Rohlf M, Winkenbach S, Meyer S, Rupp T, Durst M. 1991. Viral transcription in human keratinocyte cell lines immortalized by human papillomavirus type-16. *Virology* 183: 331-342.
- Sanders CM, Stenlund A. 1998. Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *Embo J* 17: 7044-7055.
- . 2000. Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *J Biol Chem* 275: 3522-3534.
- . 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* 276: 23689-23699.
- Sedman J, Stenlund A. 1998. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol* 72: 6893-6897.
- Sedman T, Sedman J, Stenlund A. 1997. Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J Virol* 71: 2887-2896.
- Seo YS, Muller F, Lusky M, Hurwitz J. 1993a. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 702-706.
- Seo YS, Muller F, Lusky M, Gibbs E, Kim HY, Phillips B, Hurwitz J. 1993b. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2865-2869.

- Sherman L, Alloul N, Golan I, Durst M, Baram A. 1992. Expression and splicing patterns of human papillomavirus type-16 mRNAs in pre-cancerous lesions and carcinomas of the cervix, in human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *Int J Cancer* 50: 356-364.
- Smotkin D, Wettstein FO. 1986. Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4680-4684.
- Stacey S, Jordan D, Snijders P, Mackett M, Walboomers J, Arrand J. 1995. Translation of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from bicistronic mRNA is independent of splicing events within the E6 open reading frame. *J Virol* 69: 7023-7031.
- Stark GR, Wahl GM. 1984. Gene amplification. *Annu Rev Biochem* 53: 447-491.
- Stubenrauch F, Laimins LA. 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* 9: 379-386.
- Sverdrup F, Khan S. 1995. Two E2 binding sites alone are sufficient to function as the minimal origin of replication of human papillomavirus type 18 DNA. *J Virol* 69: 1319-1323.
- Terui Y, Saad N, Jia S, McKeon F, Yuan J. 2004. Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J Biol Chem* 279: 28257-28265.
- Thomas JT, Hubert WG, Ruesch MN, Laimins LA. 1999. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8449-8454.
- 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* 90: 898-902.
- 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* 10: 4321-4329.
- Whalen B, Laffin J, Friedrich TD, Lehman JM. 1999. SV40 small T antigen enhances progression to >G2 during lytic infection. *Exp Cell Res* 251: 121-127.
- White PW, Pelletier A, Brault K, Titolo S, Welchner E, Thauvette L, Fazekas M, Cordingley MG, Archambault J. 2001. Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem* 276: 22426-22438.
- Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* 24: 275-290.
- Yang L, Li R, Mohr IJ, Clark R, Botchan MR. 1991. Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature* 353: 628-632.
- Yang L, Mohr I, Fouts E, Lim D, Nohaile M, Botchan M. 1993. The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5086-5090.
- Yu JH, Lin BY, Deng W, Broker TR, Chow LT. 2007. Mitogen-activated protein kinases activate the nuclear localization sequence of human papillomavirus type 11 e1 DNA helicase to promote efficient nuclear import. *J Virol* 81: 5066-5078.
- Zou N, Lin B, Duan F, Lee K-Y, Jin G, Guan R, Yao G, Lefkowitz E, Broker T, Chow L. 2000. The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association. *J. Virol.* 74: 3761-3770.
- zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-350.