

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS – JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR – JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**POU transkriptsioonifaktor Oct6 mõju uurimine erinevate HPV-18 URRI  
sisaldavate plasmiidide replikatsioonile**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Lisett Liblekas

Juhendaja PhD Marko Piirsoo

TARTU 2019

## INFOLEHT

### **POU transkriptsioonifaktor Oct6 mõju uurimine erinevate HPV-18 URR-i sisaldavate plasmiidide replikatsioonile**

Papilloomiviirused on väikesed DNA viirused, mis nakatavad koe-ja liigispetsiifiliselt epiteelkihi keratinotsüüte. Inimese papilloomiviirused (HPV-d) on populatsioonis laialt levinud ning neid seostatakse nii vähi kui ka healoomuliste vohandite tekkega nahal. Viiruse elutsüklil koosneb kolmest staadiumist ning sõltub otseselt epiteelrakkude diferentseerumisest, mistõttu on sobivaid tingimusi koekultuuris üsna raske imiteerida. Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi papilloomiviiruse töörühm on leidnud viisi, kuidas uurida inimese papilloomiviiruste replikatsiooni U2OS rakuliinis. See võimaldab uurida ka peremeesraku ja viiruse vastasmõju, sest seni on vähe teada, kuidas rakulised transkriptsioonifaktorid mõjutavad viiruse elutsüklit. Antud mudelsüsteemi rakendades uuriti, millised rakusisesed POU homeodomään transkriptsioonifaktorid avalduvad U2OS rakuliinis ning milline on nende mõju viiruse replikatsioonile.

Märksõnad: HPV, HPV replikatsioon, POU homeodomeen transkriptsioonifaktor

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

### **Influence of POU transcription factor Oct6 on the replication of HPV-18 URR containing plasmids**

Papillomaviruses are an ancient group of viruses with small double-stranded DNA genomes. They are very species-specific and infect only mucosal and cutaneous squamous epithelial surfaces of the host cell. They are far-spread and associated with disorders, ranging from warts to cancers. Viral life-cycle consists of three stages that are directly related to epithelial cells differentiation. Papillomavirus workgroup in the Institute of Technology of Tartu University has discovered that it is possible to study papillomavirus replication in U2OS cell line. Virus-host cell interactions can be also studied in these cells, which are not very well understood, and their impact to viral life-cycle

This bachelor's thesis focuses on POU homeodomain transcription factors that are expressed in U2OS cell line, and their impact on papillomavirus replication.

Keywords: HPV, HPV replication, POU homeodomain transcription factors

CERC: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

## SISUKORD

<b>INFOLEHT</b> .....	<b>2</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	<b>4</b>
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	<b>5</b>
<b>1. KIRJANDUSLIK ÜLEVAADE</b> .....	<b>6</b>
1.1 Inimese papilloomiviirused.....	6
1.1.1 Inimese papilloomiviiruste genoomne ülesehitus ja viirusvalkude funktsioonid .....	7
1.1.2 Inimese papilloomiviiruse elutsüklil peremeesrakus.....	10
1.2 POU homeodomeen transkriptsioonifaktorid.....	15
1.2.1 POU homeodomeen transkriptsioonifaktorid ja DNA viirused .....	17
<b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA</b> .....	<b>19</b>
2.1 Bakalaureusetöö eesmärgid .....	19
2.2 Materjal ja meetodika .....	19
2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid.....	19
2.2.2 Kloneerimine. Plasmidi pGEX18URR konstrueerimine .....	20
2.2.3 U2OS rakkude kasvatamine ja transfektsioon.....	21
2.2.4 Eukariootsetest rakkudest episomaalse DNA eraldamine Hirt lüüsiga .....	22
2.2.5 Eukariootsetest rakkudest totaalse DNA eraldamine.....	22
2.2.6 Replikatsioonianalüüs Southern blot meetodil .....	23
2.2.6.1 1D geelelektroforees ja 2D geelelektroforees, DNA ülekandefiltrile.....	23
2.2.7 RNA eraldamine ja cDNA süntees .....	25
2.2.8 PCR ja reaalaaja PCR. PCR-i fragmentide kloneerimine pJET vektorisse ja plasmiidide puhastamine.....	25
2.3 TULEMUSED .....	27
2.3.1 Kloneerimine. Plasmidi pGEX18URR konstrukti konstrueerimine .....	27
2.3.2 POU homeodomeen faktorite avaldumise analüüs U2OS rakkudes .....	30
2.3.3 HPV origini sisaldavate plasmiidide replikatsiooni võime analüüs.....	32
2.3.4 HPV origini sisaldavate plasmiidide replikatsiooni mõjutamine Oct6 valguga poolt.....	36
2.4 ARUTELU .....	39
<b>KOKKUVÕTE</b> .....	<b>40</b>
<b>KIRJANDUSE LOETELU</b> .....	<b>42</b>
<b>LISAD</b> .....	<b>48</b>
LISA 1 .....	48
LISA 2 .....	48
<b>LIHTLITSENTS</b> .....	<b>49</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

- 1D** – ühedimensionaalne geelelektroforees
- 2D** – kahedimensionaalne geelelektroforees
- bp** – aluspaar
- BPV-1** - veise papilloomiviirus tüüp 1 (*Bovine Papillomavirus type 1*)
- CMV** – tsütomegaloviirus (*cytomegalovirus*)
- DBD** – DNA-d siduv domeen (*DNA binding domain*)
- DDR** – DNA kahjustuse vastus (*DNA damage response*)
- EV** – nahahaigus (*Epidermodyslapsia verruciformis*)
- E valgud** – varjased valgud (*early*)
- FBS** – veise loote seerum (*fetal bovine serum*)
- HPV** – inimese papilloomiviirus (*Human papillomavirus*)
- IMDM** – eukarüootsete rakkude sööde koekultuuris (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*)
- LB** – lüsogeenne sööde (*lysogeny broth*)
- L valgud** – hilised valgud (*late*)
- mc** – pisirõngas (*minicircle*)
- ND** – tuuma domeenid (*nuclear domain*)
- NFI** – tuuma faktor I (*nuclear factor I*)
- origin** – nukleotiidjärjestus, millelt alustatakse DNA replikatsiooni
- PAE** – varajaste geenide polüadenüleerimissignaali (*polyadenylation early*)
- PAL** – hiliste geenide polüadenüleerimissignaali (*polyadenylation late*)
- PBS** – fosfaadiga puhverdatud soolalahus (*phosphate buffered saline*)
- pRB** – retinoblastoomi valk
- p53** – tuumorsupressorvalk
- RDR** – rekombinatsioonist sõltuv DNA replikatsioon (*recombinant-dependent replication*)
- RPA** – replikatsiooni valk A, seob ja stabiliseerib üheaheelalist DNA-d (*replication protein A*)
- SV40** – ahviviirus (*Simian virus 40*)
- URR** – papilloomiviiruse mittekodeeriv regulatoorne järjestus (*upstream regulatory region*)

## SISSEJUHATUS

Inimese papilloomiviirused (HPV-d) on kaheaheelalise DNA-ga viirused, mis nakatavad imetajaid väga liigi- ja koespetsiifiliselt. Nende ikosaeedriline kapsiid ei ole võimeline nakatama retseptori puudumise tõttu epiteeli pindmist kihti, mistõttu on vajalik mikrovigastus nahal. Viiruse elutsüklil koosneb kolmest erinevast faasist, mille käigus muutub muuhulgas viirusgenoomide koopiate arv rakus.

POU homeodomeen transkriptsioonifaktorid on rakusisesed valgud, millel on väga mitmekülgne DNA-ga seondumise võimalus. Üksikud neist on avaldunud kõikides rakutüüpides, enamik on väga koespetsiifilised ning omavad olulist funktsiooni nii organismi arenguetappides kui ka homeostaasi säilimisel. Lisaks võivad POU valgud remodelleerida epigeneetiliselt kromatiini või reguleerida embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsust. Paljudel viirustel on väga vähe võimalikke transkriptsioonifaktoreid, mistõttu on viiruse transkriptsiooni regulatsioon väga peremeesrakust sõltuv. Seda, millised rakulised transkriptsioonifaktorid mõjutavad viiruse elutsükli, on siiani üsna vähe teada.

Käesolev bakalaureusetöö kirjanduse ülevaade keskendub papilloomiviiruste genoomi ülesehitusele ning elutsüklile. Samuti kirjeldatakse POU homeodomeen transkriptsioonifaktorite ülesehitust ning nende seost viirustega.

Uurimistöö eesmärk on konstrueerida HPV-18 pisirõnga suurune plasmid, mis sisaldaks replikatsiooniks vajalikku URR piirkonda. Samuti leida, millised valitud POU valkudest avalduvad papilloomiviiruse replikatsiooni toetavas U2OS rakuliinis ning milline on Oct6 mõju nii konstrueeritud plasmidi kui ka HPV-18 pisirõnga replikatsioonile.

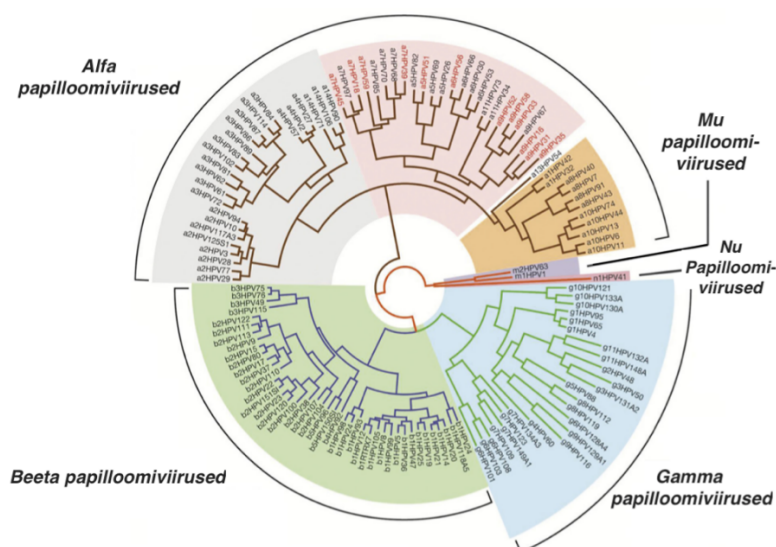
Bakalaureusetöö koostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

# 1. KIRJANDUSLIK ÜLEVAADE

## 1.1 Inimese papilloomiviirused

Papilloomiviirused (PV) on *Papillomaviridae* sugukonda kuuluvad väikese kaheahelalise tsirkulaarse DNA-ga viirused, mille ligikaudu 8000 aluspaari pikkune genoom replitseerub rakutuumas (Orth *et al.*, 1977). Nad on kõrge koespetsiifilisusega onkogeensed viirused. Praeguseks on identifitseeritud 376 erinevat PV tüve, millest 193 on suutelised inimest nakatama, kuid on leitud ka mõningaid viirustüvesid, mille peremeesorganismideks võivad olla peale imetajate kalad ja linnud, aga ka mõningad roomajad (Li *et al.*, 2009; Mavian *et al.*, 2016).

Fülogeneetiliselt jaotatakse inimest nakatavad papilloomiviirused (HPV-d) 5 eri perekonda kapsiidivalku L1 kodeeriva lugemisraami DNA järjestuste erinevuste järgi: alfa, beeta, gamma, mu ja nu (joonis 1).



**Joonis 1. Inimese papilloomiviiruste fülogeneetiline puu.** Joonisel on sugukonna *Papillomaviridae* kuuluvate inimest nakatavate papilloomiviiruste fülogeneetiline puu, mis on konstrueeritud kapsiidivalku L1 kodeeriva lugemisraami DNA järjestuste erinevuste põhjal. Limaskesti ja/või nahaepiteeli nakatavaid alfa papilloomiviiruseid on nii madala vähiriskiga (joonisel oranž) kui ka kõrge riskiga (joonisel heleroosa). Ainult epiteeli nakatavad alfa (joonisel hall), beeta (joonise roheline) ja gamma (joonisel sinine) inimese papilloomiviiruseid ei seostata enamasti vähiga, kuid osad beeta papilloomiviirused võivad olla kõrge riskiga viirused immuunpuudulikkuse all kannatavatel inimestel. Mu papilloomiviiruseid (joonisel lilla) ei seostata vähi tekkega, nemad tekitavad healoomulisi vohandeid kätel või jalgadel. Nu papilloomiviiruseid seostatakse samuti healoomuliste vohandite tekkega nahal. (Muudetud joonis Doorbar *et al.*, 2012)

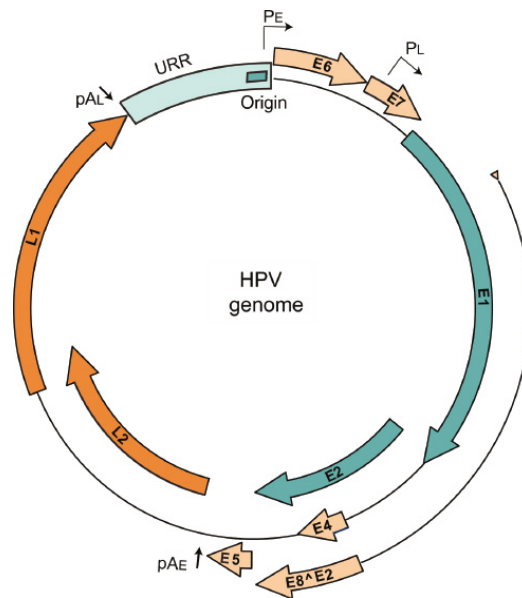
Bioloogilise vähiriski alusel jaotatakse papilloomiviirused kõrge ja madala riskiga viirusteks. Suurem osa papilloomiviiruseid beeta, gamma, mu ja nu perekonnast põhjustavad väga harva halvaloomulisi kasvajaid, nakatades ainult nahaepiteeli ja tekitades pigem healoomulisi muutusi nahal, milleks võivad olla soolatüükad. On näidatud, et beeta papilloomiviirused, näiteks HPV-5 ja HPV-8, võivad tekitada väga haruldase geneetilise eelsoodumusega *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) nahahaigust põdevatel inimestel vähki, sest immuunsüsteem ei suuda viirust organismist kõrvaldada. Nahale tekivad tüükalaadsed moodustised, mis võivad muutuda pahaloolumuliseks kasvajaks, eriti nendes nahapiirkondades, mis pole päikese eest kaitstud (Ramos *et al.*, 2002; de Jong *et al.*, 2018).

Osad alfa perekonda kuuluvad viirused loetakse kõrge riskiga viirusteks, nakatades nii nahaku kui ka limaskestaepiteeli. Kõrge riskiga viirused, nagu näiteks HPV tüübid 16, 18, 31, 33, 45 ja 52, võivad põhjustada pahaloolumuliste kasvajate teket genitaalpiirkonnas (nt emakakaela-, päraku- ja peenisevähk) või ka pea- ja suupiirkonnas (Hartwig *et al.*, 2017).

### **1.1.1 Inimese papilloomiviiruste genoomne ülesehitus ja viirusvalkude funktsioonid**

Papillomiviiruste genoom on kaheaahelaline tsirkulaarne DNA molekul. Genoom on jaotunud funktsionaalselt kolmeks osaks (joonis 2). Varane (E-*early*) osa kodeerib valke, mis on vajalikud viirusgenoomi replikatsiooniks, transkriptsiooniks ja muutuste esilekutsumiseks peremeesrakus. Hiline (L-*late*) osa kodeerib viiruse kapsiidivalke. Varajasi valke ekspresseerib viirus kogu elutsükli jooksul, kuid hilised ekspresseeruvad ainult produktiivses infektsioonis. Kolmandaks genoomi osaks on kuni 1000 aluspaari pikkune mitekodeeriv ala (URR- *upstream regulatory region*), milles asuvad viirusgenoomi replikatsiooniks ja transkriptsiooniks vajalikud *cis* elemendid. Papilloomiviiruste genoomi transkriptsioon on unipolaarne ning kõik lugemisraamid asuvad ühes DNA ahelas. Sarnaselt paljudele teistele viirustele on papilloomiviiruste transkriptid polütsistronsed ja iga transkript kodeerib mitut erinevat viirusvalku.

Varajane regioon hõlmab ~50% kogu genoomist ning kodeerib enamasti kuute lugemisraami: E1, E2, E4, E5, E6 ja E7 (McBride, 2017).

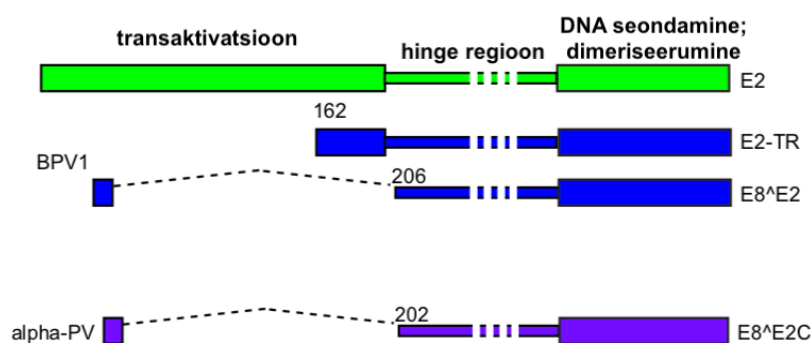


**Joonis 2. Inimese alfa papilloomiviiruse HPV-18 genoomikaart.** Inimest nakatava alfa papilloomiviiruse varajased lugemisraamid on märgitud rohelise (E1, E2) ja beežiga (E4, E5, E6, E7, E8+E2). Hilised lugemisraamid, mis kodeerivad kapsiidivalke L1 ja L2, on märgitud oranžiga. Varajase ja hilise regiooni vahele jääb mittekodeeriv regioon (URR), mis sisaldab replikatsiooni alguspunkti (*origin*), varajast P<sub>E</sub> ja hilist P<sub>L</sub> promootorit ning mitmete transkriptsioonifaktorite seondumisjärjestusi. Kolm regiooni on omavahel eraldatud kahe polüadenüleerimise signaaliga p(A): pA<sub>E</sub> ja pA<sub>L</sub>. (McBride, 2017)

Papilloomiviiruste **E1** valk on modulaarse struktuuriga multifunktsionaalne fosfovalk, mis on koos E2 valguga vajalik viirusgenoomi replikatsiooniks. E1 valk koosneb kolmest funktsionaalsest domeenist. Karboksüterminaalne domeen omab ATP-st sõltuvat helikaaset aktiivsust ning on oluline oligomeriseerumisel (Sun *et al.*, 1998). Karboksüterminaalsest domeenist ülesvoolu jääv ~160 aminohappeline osa omab DNA-d siduvat domeeni (tuntud ka kui DBD- *DNA binding domain*) (Sarafi ja McBride, 1995). Lisaks on E1 valgu aminoterminusel ~50 aminohappeline lõik, millel on tuumast väljumise- ja lokalisatsioonisignaal (Deng *et al.*, 2004). E1 valk interakteerub E2 valguga ning rakulise DNA polümeraasi α p70 subühikuga. E2 valk aitab moodustada E1-l kahte heksameerset kompleksi, mille tulemusel tekib helikaasne aktiivsus, mis algatab DNA ahelate kahesuunalise lahtihargnemise replikatsiooni initsiatsioonil (Bergvall *et al.*, 2013).

Kõikide papilloomiviiruste täispikal **E2** valgul on kaks konserveerunud domeeni: N-terminuses transaktivatsiooni domeen ning karboksüterminaalne DNA-ga seondumise domeen (McBride *et al.*, 1989). Nende vahele jääb varieeruva aminohappelise järjestuse ja pikkusega *hinge* regioon (joonis 3) (Giri ja Yaniv, 1988). E2 geenilt kodeeritud valgud on

olulised viiruse transkriptsiooni regulatsioonil, DNA replikatsiooni algatamisel tugevdades E1 seondumist replkatsiooni alguspunktile ning viiruse genoomide seondamisel peremeesraku kromosoomidele (Bernard *et al.*, 1989; Ilves *et al.*, 1999; Phelps ja Howley, 1987). E2 lugemisraamilt on võimalik saada alternatiivse splaissinguga erineva funktsiooniga geeniprodukte (joonis 3). Kõik E2 valgu lühemad produktid, näiteks E8<sup>∧</sup>E2, on tugevad viiruse transkriptsiooni ja replikatsiooni repressorid.



### Joonis 3. Papilloomiviiruse täispika E2 valgu domeenid ja lühemad transkriptid.

Täispika E2 valgu 3 funktsionaalset domeeni (joonisel roheline). Veise papilloomiviirus (BPV-*bovine papillomavirus*) kodeerib lisaks täispikale E2 valgule kahte repressorvalku E2-TR ja E8<sup>∧</sup>E2 (joonisel tumesinine). Alfa papilloomiviirused kodeerivad repressorvalku E8<sup>∧</sup>E2C (joonisel lilla). (Muudetud joonis McBride, 2013)

**E4** on liitvalk, mis transleeritakse spalissitud mRNA-lt (E1<sup>∧</sup>E4) ning selle kontsentratsioon on kõige kõrgem viiruse elutsükli hilistes etappides. Tema kõige olulisemaks funktsiooniks on seondumine raku keratiini filamentidega. Nii soodustab ta nakatunud raku epiteeli ülemistes kihtides keratiini võrgustiku ümberkorraldumise, mis omakorda soodustab valmis virionide vabanemist. Samuti on näidatud, et E4 valk on võimeline esile kutsuma rakutsükli peatumist G2/M faasis ning peremeesraku suunamist apoptoosi (Davy ja Doorbar, 2007).

**E5** on paljude, kuid mitte kõikide, papilloomiviiruste poolt kodeeritud lühike transmembraanne onkovalk. Selle valgu olulisust on kirjeldatud nii rakkude transformeerimises, rakutsükli ja kasvufaktorite signaalitugevuse mõjutamises, apoptoosi esilekutsumises kui ka immuunsüsteemi eest kõrvale põiklemises (DiMaio ja Petti, 2013).

**E6** on viiruse onkovalk, mille peamine sihtmärk rakus on tuumorsupressorvalk p53. Nii kõrge kui ka madala riskiga viirused seonduvad p53-ga, kuid kõrge riskiga viirustel on interaktsioon tugevam (Vande Pol ja Klingelutz, 2013). E6 valgu seondumisel p53-ga suunatakse

tuumorsupressorvalk ubikvitiin-sõltuvasse proteosoomsesse degradatsiooniratta. Ubikvitiinsõltuv proteolüütiline tuumorsupressorvalgu lagundamine või selle funktsiooni blokeerimine pärsib rakus apoptootilisi signaale, mis kõrvaldaks nakatunud raku (Scheffner *et al.*, 1993).

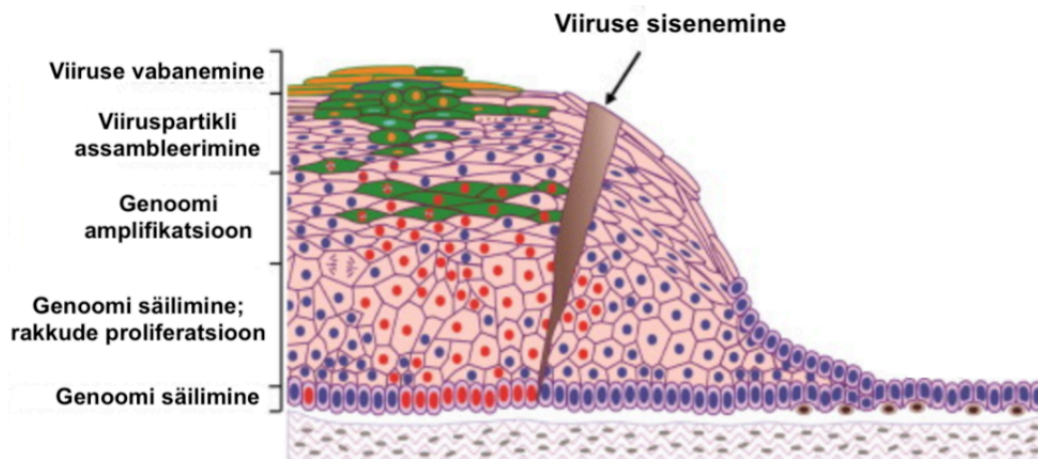
**E7** on samuti viiruse onkovalk, mille sihtmärgiks on peremeesrakus pRB perekonna tuumorsupressor valgud, millel on väga oluline roll nii DNA replikatsioonil, DNA reparatsioonil kui ka apoptoosi ja rakkude differentseerumise ära hoidmisel (Münger *et al.*, 1989). Kui kõrge riskiga HPV E7 valk seondub pRB valkudega, laguneb pRB ja E2F kompleks, mille tõttu vabanevad E2F transkriptsioonifaktorid, mis indutseerivad rakutsükli S-faasi toimumuseks vajalike geenide ekspressiooni. Lisaks suudab E7 segada interferoonide signaalülekannet organismis (Songock *et al.*, 2017).

Mõlema onkovalgu, nii E6 kui ka E7, peamine ülesanne inimese papilloomiviiruse elutsükliis on suunata ülemistes epiteelikihtides olevaid differentseerunud rakke uuesti rakutsükli S-faasi, et paljundada viiruse genoomi (Bodily ja Laimins, 2011).

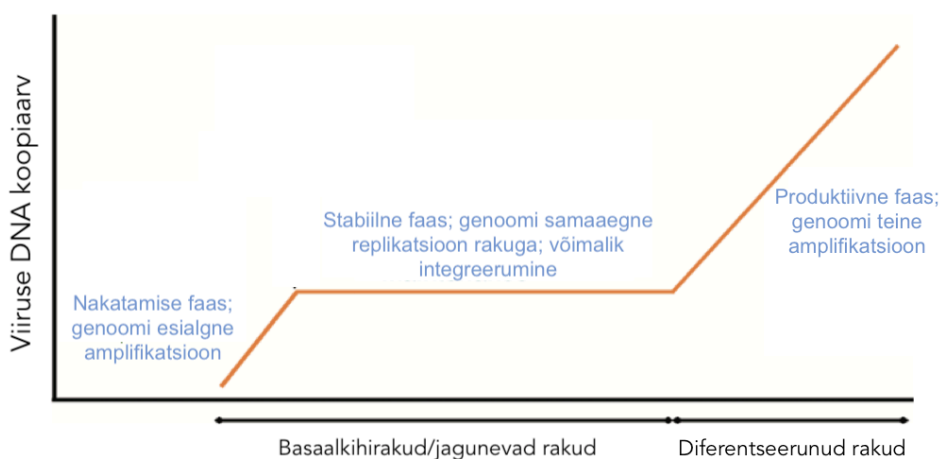
Papilloomiviiruse virionid on ikosaeedrilised ja koosnevad kahest kattevalgust: peamine kapsiidivalk **L1** ja minoorne **L2**. L1 sünteesitakse viiruse produktiivse infektsiooni viimases etapis, ülemistes epiteelikihtides ning moodustab viiruse sarnaseid partikleid (Buck *et al.*, 2013). L2 valk seondub viiruse tsirkulaarse DNA-ga, et hõlbustada selle pakkimist kapsiidi. Samuti on L2 oluline rakku sisenemisel, suurendades nakatumisvõimet (Wang ja Roden, 2013). L1 kapsiidivalk on väga immunogeenne, mille tõttu kasutatakse sellel baseeruvaid pseudovirione inimese papilloomiviiruse vaktsiinis, mis põhjustab neutraliseerivate antikehade teket organismis (Pouyanfard ja Müller, 2017).

### **1.1.2 Inimese papilloomiviiruse elutsükkel peremeesrakus**

HPV-de elutsükkel, või teisisõnu infektsioonitsükkel, on väga tihedalt seotud peremeesrakkude naha ja limaskestade mitmekihilise lameepiteeli epiteelkoe keratinotsüütide diferentseerumisega. Viiruse elutsükkel on illustratiivselt kujutatud joonisel 4.



**Joonis 4. Papilloomiviiruste elutsükkel mitmekihilises epiteelis.** Mitmekihilises lameepiteelis on HPV nakkuseks oluline mikrovigastuse olemasolu, et viirus pääseks basaalmembraanini. Juba nakatatud basaalarakkudes säilib viiruse genoom episoomina, mida on 50-100 koopiat raku kohta. Madalamates ja keskmistes epiteelikihtides olevad nakatunud rakud sunnitakse jagunema viiruse onkovalkude E6 ja E7 tõttu (joonisel punase tuumaga rakud). Keskmistes kihtides toimuv genoomi amplifikatsioon nõuab E4 valku ning rakud on enamasti S või G2 rakutsükli faasis (joonisel rohelised rakud ning värvitud punane tuum näitab viiruse replikatsiooni toimumist). Ülemistes epiteeli kihtides lahkuvad rakud rakutsüklist ning E4 olemasolul sünteesitakse kapsiidivalgud L1 ja L2, et toimuks viiruse genoomi pakkimine viiruspartiklisse (joonisel oranžid rakud). (Muudetud joonis Doorbar *et al.*, 2012)



**Joonis 5. Papilloomiviiruste genoomi koopiaarv elutsükli erinevates etappides.** Viiruse infektsioonis eristatakse kolme etappi: nakatamise faas ja genoomi esialgne amplifikatsioon, latentsel infektsioonil toimuv genoomi stabiilne replikatsioon ning nakkuse lõppfaasis produktiivne faas ja genoomi teine amplifikatsioon. (Muudetud joonis McBride, 2017)

Viiruse peremeesorganismi sisenemist ja elutsükli on küll kõige rohkem uuritud alfa papilloomiviiruste näitel, kuid põhilised aspektid on sarnased ka teiste inimest nakatavate papilloomiviirustega. Saab eristada kolme elutsükli etappi, mille käigus muutub muuhulgas viirusgenoomide koopiate arv rakus (joonis 5):

1. **Nakatamise faas** – rakku sisenemine, kapsiidi lagunemine, genoomi liikumine tuuma, esialgne amplifikatsioon, varajaste geenide ekspressioon

Inimese papilloomiviiruse virionid ei suuda retseptori puudumise tõttu otse epidermise lameepiteelile seostuda ja seda nakatada. Peremeesrakku sisenemiseks on esmalt vaja mikrovigastusi nahas, mille kaudu on võimalik viirusel nakatada jagunemisvõimelisi basaalkihi keratinotsüüte. Rakkude jagunemine, mida põhjustab haava või mikrovigastuse parandamine, on vajalik viirusele tuuma sisenemiseks.

Esmane L1 kapsiidivalgu seondumine basaalsete rakkude pinnal oleva hepariinsulfaat proteiinglükaaniga (HSPG) kutsub esile kapsiidi konformatsioonilised muutused, mille tõttu väheneb retseptori afiinsus ning viirus kantakse üle sekundaarsele retseptorile. On välja pakutud, et konformatsioonilisi muutusi võib põhjustada tsüklofiliin B (Harden ja Munger, 2017). Viiruspartiklis toimuvate konformatsiooniliste muutuste tagajärjel saab L2 kapsiidivalgu aminoterminus kättesaadavaks furiini proteaasidele, mis on vajalikud HPV infektsiooniks (Richards *et al.*, 2006).

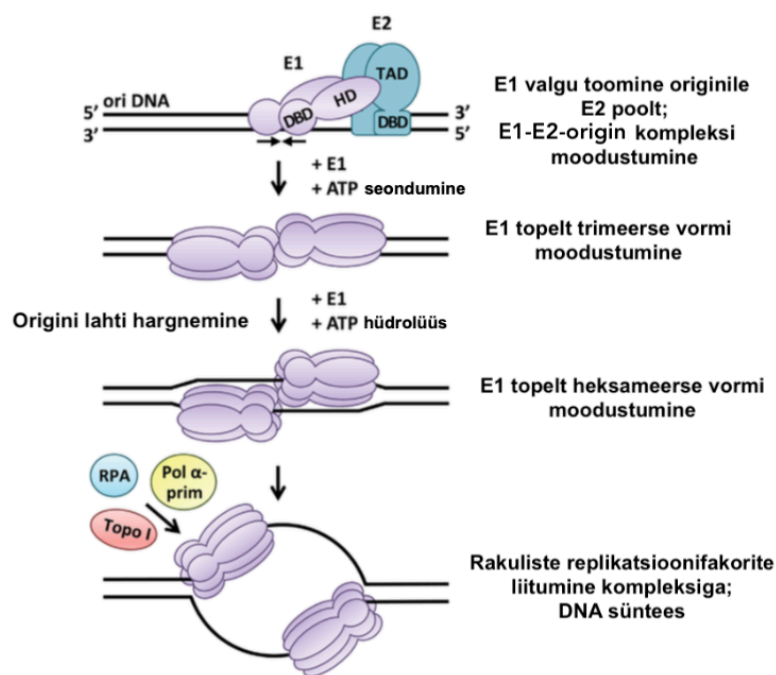
Viiruspartikkel siseneb rakku klaritiin-kalveoliin sõltuva endotsütoosiga. Seejärel läbib virion endosoomis konformatsioonilised muutused, mistõttu kapsiidivalk L1 dissotseerub genoomi ja L2 kompleksist, ning suunatakse lüsoosoomidesse (Bienkowska-Haba *et al.*, 2012). L2 valk seondub düneiiniga ning transpordib viiruse genoomi mööda mikrotoobileid rakutuuma. Viiruse genoomi sisenemiseks rakutuuma on vajalik mitoos ning tuumaümbrise lagunemine. (Pyeon *et al.*, 2009).

### **Esialgne amplifikatsioon**

Sarnaselt teiste DNA viirustega hoitakse ka inimese papilloomiviiruse L2-genoomi kompleksi tuuma domeenide 10 (ND10) läheduses (McBride, 2017). Need on väikesed tuumaplasmas laiali jaotunud sfäärilised kehakesed, kuhu on kogunenud mitmed tuumavalgud (nt Daxx ja Sp100), mis on olulised transkriptsiooni regulatsioonil, kasvu pidurdusel ja apoptoosis (Florin *et al.*, 2002). L2 valk on võimeline paigutama ümber tuumas olevaid valke, et hõlbustada varajast transkriptsiooni viiruse genoomilt (Florin *et al.*, 2002). Esmane transkriptsioon

viiruse genoomilt on kontrollitud rakuliste faktorite poolt, mille olemus on jäänud salapäraseks. Samas on andmeid, et sfäärilised ND10 kehakesed on olulised viirusevastases kaitses ja limiteerivad PV infektsiooni efektiivsust. (Becker *et al.*, 2003; Everett, 2006; Stepp *et al.*, 2013).

Varajased transkriptid kodeerivad muuhulgas E1 ja E2 valke, mis on vajalikud initsieerimaks viiruse genoomi replikatsiooni (joonis 6). Viiruse esialgne amplifikatsioon indutseerib peremeesrakus DNA kahjustuse vastuse (DDR-*DNA damage response*), mis arvatakse olevat vajalik viiruse elutsükli latentse faasi tekitamiseks (McBride, 2017).



**Joonis 6. Papilloomiviiruse replikatsiooni initsieerimine BPV-1 minimaalse *origin*-i näitel.** Replikatsiooni initsieerib E2 valk (joonisel helesinine), mis toob E1 valgu (joonisel lilla) replikatsiooni *origin*-ile. Tekkiv E1-E2-DNA kolmikkompleks on oluline järgmiste E1 valgumolekulide liitumiseks, et moodustuks vahepealne E1 topelt trimeerne kompleks, mis muudetakse ATP hüdrolüüsiga topelt heksameerseks kompleksiks. Toimub DNA ahelate lahti harutamine ning rakuliste replikatsiooni faktorite (polümeraasi  $\alpha$  primaas, topoisomeraas I, replikatsiooni valk A jt.) lisandumine DNA-le. (Muudetud joonis Bergvall *et al.*, 2013)

## 2. Stabiilne faas ehk latentne infektsioon

Peale esialgset amplifikatsiooni püsib viiruse DNA episoomina, hoides genoomi stabiilset koopiarvu epiteeli basaalkihi rakkudes. Sündmused, mis reguleerivad viirusinfektsiooni üleminekut latentssesse faasi on teadmata. On välja pakutud kaks võimalikku varianti stabiilse

infektsiooni faasis toimuva viirusgenoomi replikatsiooni toimumiseks. Esimese võimalus on, et viiruse DNA replitseerub kord rakutsükli jooksul nagu raku DNA. Seega on viiruse replikatsiooni initsiatsioon täielikult kontrollitud peremeesraku replikatsiooni faktorite poolt (Hoffmann *et al.*, 2006). Mõned autorid aga väidavad, et papilloomiviirus replitseerub juhuslikult, s.t initsiatsioon viiruse replikatsiooni originilt ei ole rangelt kontrollitud, mille tõttu osa molekulale replitseerub rohkem kui ühel korral rakutsükli S-faasis, osad ühe korra ja mõned ei replitseeru üldse (Piirsoo *et al.*, 1996; Ravnán *et al.*, 1992). Erinevate replikatsiooni mehhanismide vahetamine võib olla seotud E1 kontsentratsiooniga. On näidatud, et kõrgemal E1 kontsentratsioonil ei ole HPV-16 replikatsiooni initsiatsioon keratinotsüütide W12 rakuliinis rangelt üks kord rakutsükli (Hoffmann *et al.*, 2006).

On leitud, et mõned onkogeensed papilloomiviirused integreeruvad sagedasti peremeesorganismi genoomi (Schwarz *et al.*, 1985). See pole viiruse elutsükli osa, vaid selle lõpp, sest puudub võimalus moodustada viirusgenoome, et need viiruspartiklisse pakkida ja uut peremeest nakatada (McBride ja Warburton, 2017).

### **3. Produktiivne infektsioon ja virionide vabanemine**

Vegetatiivse amplifikatsiooni alustamiseks on vaja E1 ja E2 valkude kõrget kontsentratsiooni ning hiliste promootorite aktivatsiooni. Kui viirusega nakatunud keratinotsüüdid jõuavad diferentseeruva epiteeli ülemistesse kihtidesse, siis HPV E1 ja E2 geenide ekspressioon E2-reguleeritud varaselt promootorilt inhibeeritakse ja indutseeritakse E2-sõltumatu hiline promootor, mistõttu tekib rakus kõrge E1 ja E2 valgu tase (Klumpp ja Laimins, 1999).

Hiline promootor on aktiivne ainult diferentseerunud epiteeli rakkudes ning selle aktiveerimisel osaleb E7 (Roman ja Munger, 2013). Lisaks on produktiivse infektsioonifaasi toimumiseks vaja rakulise DNA kahjustuse vastust (DDR), mis toob rakutuuma suures hulgas faktoreid, et alustada teist amplifikatsiooni (Moody ja Laimins, 2009). Arvatakse, et viirus replitseerub diferentseerunud rakkudes rekombinatsioonist sõltuva mehhanismi abil (*RDR-recombination dependent replication*), mille tulemusel aktiveeritakse homoloogiline rekombinatsioon (Gautam ja Moody, 2016; Sakakibara *et al.*, 2013).

Inimese papilloomiviiruse infektsioon lõppeb terminaalset diferentseerunud keratinotsüütides ning hõlmab L2 ja L1 kattevalgu sünteesi, viirusgenoomide pakkimist kapsiidi ja uute viiruspartiklite väljumist rakust.

Kuna papilloomiviirused ei ole lüütilised viirused, vabanevad virionid väliskeskkonda koos surnud rakkudega epiteeli kõige pindmistest kihtidest. Surnud keratinotsüütides kaob mitokondriaalne oksüdatiivne fosforüleerimine ning vahetult enne viiruse väljumist muutub redutseeriv keskkond oksüdeerivaks. See on viirusele kasulik, sest tekib palju disulfiidsildu L1 kapsiidivalkude vahel, mille tulemusel on tekkinud viiruspartiklid stabiilsemad (Buck *et al.*, 2005; Finnen *et al.*, 2003). On näidatud, et HPV-16 viiruspartiklite moodustumisel on rohke E4 valgu hulk abiks virionide väljumisel, moodustades amüloidkiude, mis lõhub keratiini struktuuri ning laseb viiruskapsiidil paremini assambleeruda (McIntosh *et al.*, 2008; Q. Wang *et al.*, 2003).

## 1.2 POU homeodomeen transkriptsioonifaktorid

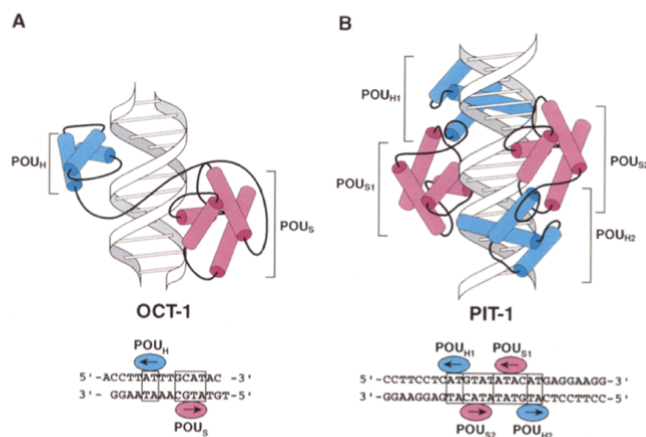
POU homeodomeen valgud on eukarüootide transkriptsioonifaktorid, mille DNA-d siduv domeen koosneb kahest erinevast osast: POU-spetsiifiline domeen (POU<sub>S</sub>) ning POU-homeodomeenist (POU<sub>H</sub>). Selline struktuurselt kaheosaline domeen annab POU perekonna transkriptsioonifaktoritele võime siduda DNA-d väga erineval viisil.



**Joonis 7. Lineaarne presentatsioon POU valkudest.** Joonisel on näidatud POU perekonna valkudele omane N-terminaalne transaktivatsiooni domeen (joonisel sinine), C-terminaalne POU spetsiifiline domeen (joonisel roheline) ja homeodomeen (joonisel kollane). Neid ühendab hüpervaraabel segment ehk linker (joonisel roosa).

POU domeen avastati 1988. aastal ning sai oma nime kolme imetaja Pit1, Oct1 ja Oct2 ning ümarussi UNC86 transkriptsioonifaktori nimetustest. POU spetsiifiline domeen koosneb ~75 aminohappest ning homeodomeen ~ 60 aminohappest (Sturm ja Herr, 1988). POU<sub>S</sub> domeenil on 4 alfa heeliksit, millest 2. ja 3. moodustavad heeliks-pööre-heeliks seondumismotiivi, samas kui POU<sub>H</sub> domeenil on kolm alfa heeliksit (joonis 7) (Malik *et al.*, 2018). Neid kahte kõrgelt konserveerunud POU domeeni ühendab hüpervaraabel segment, mille pikkus võib varieeruda 15-56 aminohappeni (Herr *et al.*, 1988). Oct1 ja Pit1 kristallstruktuuride põhjal on näidatud, et struktuuritu linker regiooni ülesanne on seondada omavahel POU domeenid, tõstmaks lokaalset kontsentratsiooni DNA-ga seondumisel ning määrata DNA-ga seondumise

mitmekülgsus. POU homeodomeen valkude DNA-ga sidumise mitmekesisust suurendab veelgi nende võime moodustada homo- ja heterodimeerseid komplekse nii teiste POU homeodomeen valkude kui ka muude transkriptsioonifaktoritega.

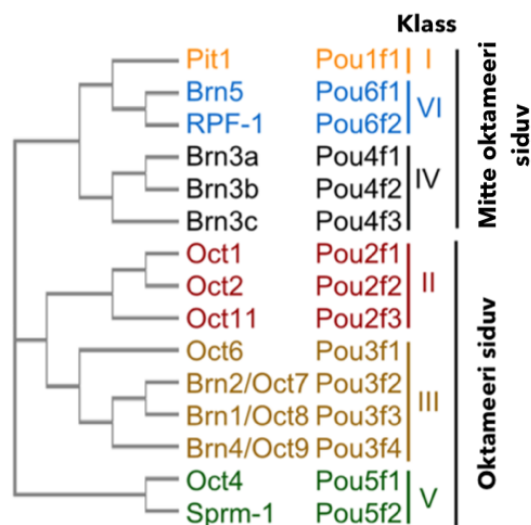


**Joonis 8. Oct-1 ja Pit-1 kristallstruktuur DNA-ga seotult.** (A) Oct-1 seondub DNA-l oktameersele elemendile (ATGCAAAT) monomeerina. POU<sub>S</sub> ja POU<sub>H</sub> domeenid seonduvad DNA eri külgedele, mille tõttu hüpervaraabel segment ületab DNA väikese vao. (B) Pit1 seondub DNA-l inverteeritud palindroomsele järjestusele (ATGTATATACAT) dimeerina pea-saba orientatsioonis ja hüpervaraabel segment ei ületa DNA väikest vagu. (Ryan ja Rosenfeld, 1997)

POU valgud omavad erinevaid seondumismotiive DNA järjestusest ja valgu oligomeriseerumisest sõltuvalt. Näiteks seondub Oct-1 monomeerina oktameersele elemendile, kuid seondudes herpesviiruse (HSV- *herpes simplex virus*) varajaste geenide ICP4 või ICP0 promootoritele, muutub POU<sub>H</sub> ja POU<sub>S</sub> domeenide orientatsioon teineteise suhtes. Pit-1 seob DNA-d hoopis homodimeerina ning olenevalt järjestusest, võivad mõlemad domeenid siduda DNA-d kas samalt või erinevalt poolt. Oct1 ja Pit1 erinevaid seondumisvõimalusi DNA-l on kujutatud joonisel 8.

POU domeen valgud on rühmitatud valgu järjestuse homoloogia põhjal 6 eraldiseisvasse klassi (joonis 9). Traditsiooniliselt kasutatakse ka biokeemilise aktiivsuse ehk oktameerse elemendi sidumise jaotust. POU transkriptsioonifaktor Oct1 avaldub kõikides rakutüüpides. Ülejäänud transkriptsioonifaktorid on väga koespetsiifilised ning arvatakse olevat olulised regulaatorid kudede ja organite morfogeneesis. Näiteks Oct4 reguleerib embrüonaalsete tüvirakkude pluripotentsust, samas Pit1 on varajastes arengustaadiumides ekspresseeritud

kesknärvisüsteemis, kuid hiljem vaid ajuripatsis (Phillips ja Luisi, 2000). Lisaks on näidatud, et Oct6 ekspresseerub normaalsetes, viiruse poolt nakatamata, basaalses kui ka diferentseerunud keratinotsüütides (Faus *et al.*, 1994).



**Joonis 9. POU homeodomeen valkude klassifikatsioon.** Joonisel on kuus eri värvidega POU homeodomeen valkude klassi. Traditsiooniliselt on valgud jaotatud oktameerse elementi ATGCAAAT sidumise järgi: seda siduvaks (klass II, III ja V) ja mitte siduvateks (klass I, IV, VI). Tänapäeval, peale valkude jaotust klassidesse, kasutatakse rohkem parempoolses tulpas olevaid valkude nimesid (Pou1f1, Pou6f1 jt). (Joonis muudetud Malik *et al.*, 2018)

### 1.2.1 POU homeodomeen transkriptsioonifaktorid ja DNA viirused

Paljudel viirustel on väga vähe võimalikke transkriptsioonifaktoreid, mistõttu on viiruse transkriptsiooni regulatsioon väga peremeesrakust sõltuv. Nii on näidatud, et Oct1 seondub herpesviiruse (HSV) oktameersele järjestusele, mille tõttu läbib konformatsioonilised muutused. Selle tunneb ära viiruse tugev transaktivaator valk VP16, mis seondub Oct1-ga ning algab varajaste geenide transkriptsioon, mis on iseloomulik viiruse lüütilisele infektsioonile (Coding ja O'Hare, 1989). Samuti on näidatud, et adenoviiruse replikatsiooniks on oluline nii NFI (*Nuclear Factor I*) kui ka Oct1 transkriptsioonifaktori olemasolu. Oct1 seondub viiruse pTP-pol kompleksiga (pTP - *precursor terminal protein*), mis on replikatsiooniks oluline kompleks, ning stabiliseerib ja tugevdab selle interaktsiooni *origin* piirkonnaga (Van Leeuwen ja Van Der Vliet, 1997).

Samuti on näidatud, et erinevad POU homeodomeen valgud on võimelised mõjutama HPV elutsükli. Näiteks on leitud, et Oct1 inhibeerib transkriptsiooni HPV-16 URR-ilt, mille tagajärjel väheneb viirusvalkude E1 ja E2 tase, mistõttu viirusgenoom replitseerub kehvemini

(Sibbet *et al.*, 1995). Erinevalt eelmisest näitest suudavad Skn1a ning Oct6 aktiveerida HPV-1A transkriptsiooni, samas kui Brn5-l ja Oct1-l selline mõju puudub (Andersen *et al.*, 1997). Kõrge riskiga HPV-del on väga tugevalt ekspresseeritud E6 ja E7 onkovaalgu, mis põhjustavad rakkude transformatsiooni. POU faktor Brn3a on HPV-16 ja HPV-18 URR piirkonnale seondudes transkriptsiooni aktiveeriv, samas kui Brn-3b toimib repressorina (Morris *et al.*, 1994; Ndisang *et al.*, 2006). Veel on huvitav, et eelnevalt mainitud Skn1a, mis muuhulgas indutseerib keratinotsüütide terminaalset diferentseerumist, suudab aktiveerida ka HPV-16 replikatsiooni (Kukimoto *et al.*, 2008).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Bakalaureusetöö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärk on konstrueerida HPV18 replikatsiooni *origini* sisaldav plasmid, mille suurus on sarnane HPV genoomiga ning võrrelda selle replikatsiooni HPV-18 pisirõngaga U2OS rakuliinis. Teiseks eesmärgiks on uurida, kas POU homeodomeen faktor Oct6 inhibeerib konstrueeritud HPV-18 origin sisaldava plasmidi replikatsiooni U2OS rakkudes.

Töö tegemiseks püstitati järgmised ülesanded:

1. HPV-18 pisirõnga URR piirkonda sisaldava plasmidi pGEXURR18 konstrueerimine
2. HPV-18 genoomi ja pGEXURR18 replikatsioonivõime võrdlus U2OS rakkudes
3. U2OS rakkudes ekspresseeruvate POU homeodomeen faktorite analüüs
4. HPV-18 genoomi ja pGEXURR18 replikatsiooni mõjutamine Oct6 valgu poolt

### 2.2. Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid

**pGEXFarI** on 7504 aluspaarist koosnev plasmid, mida kasutati vektorina pGEXURR18 konstrueerimisel. Sisaldab bla geeni, mis annab vektorile ampitsilliini resistentsuse ning lacI promootorit. Lisaks GST järjestust, mis kodeerib glutatioon-S-transferaasi, et kaitsta rakku reaktiivsete ühendite eest, mis tekivad endogeensete või eksogeensete ühendite lagunemise eest. Vektori kaart on välja toodud lisa 2.

**HPV-18 minicircle** on inimese papilloomiviiruse tüüp 18 täisgenoomi sisaldav plasmid. Plasmid toodeti pMC.BESPXHPV18 algplasmidist *E.coli* tüves ZYCY1003S2T *in vivo* rekombinatsiooni teel. Töös kasutati plasmidi, et võrrelda selle replikatsiooni pGEXURR18 ja pUCURR18 plasmiididega. Plasmidikaart on toodud lisa 2.

**HPV-18 E1 ekspressioonivektor (pM18-14)** sisaldab SV40 (*Simian virus 40*) replikatsiooni alguskohta, ampitsilliini resistentsusgeeni, CMV (tsütomegaloviirus) promootorit, polü-A järjestust ning 5' mittetransleeritav järjestus (tk *leader*). Töös kasutati E1 ekspressioonivektorit kotransfekteeritult pUCURR18 ja pGEXURR18 plasmiididega.

**HPV-18 E2 ekspressioonivektor (pQMN18E2)** koosneb pQMN vektorisse viidud CMV promootorist, 5' mittetransleerivast liiderjärjestusest, polü-A järjestust, ampitsilliini resistentsusgeenist ning HPV-18 E2 lugemisraamist, milles on E2 märgis (tag). Töös kasutati E1 ekspressioonivektorit kotransfekteeritult pUCURR18 ja pGEXURR18 plasmiididega.

**pUCURR18** on ligikaudu 4000 aluspaari suurune plasmiid, mis sisaldab HPV-18 URR järjestust. Lisaks lühikest mittefunktsionaalset osa E6 valgust, replikatsiooni alguspunkti pMB1 ja ampitsilliini resistentsusgeeni. Töös kasutati plasmidi pGEXURR18 ja HPV-18 pisirõnga replikatsiooni võrdlemiseks.

**pJET1.2/Blunt Cloning Vector** on 2974 aluspaari suurune plasmiid. See sisaldab IPTG poolt indutseeritavat T7 promootorit, pMB1 replikatsiooni alguspunkti ning ampitsilliini resistentsusgeeni.

**pcDNA3** on 5446 aluspaari suurune ekspressioonivektor, mis sisaldab CMV promootorit, SV40 replikatsiooni alguskohta, lac promootorit, ampitsilliini resistentsusgeeni ning T7 promootorit.

Töös kasutatud plasmiidid on saadud juhendajalt.

### **2.2.2 Kloneerimine. Plasmidi pGEX18URR konstrueerimine**

HPV-18 URR järjestust sisaldava 8000 aluspaari pikkuse plasmidi konstrueerimiseks lõigati HPV-18 pisirõngas plasmidi BamHI restriksiooniensüümiga, et eraldada HPV-18 URR järjestus. Lõikamise tulemusel tekkis antud plasmiidist kaks fragmenti, millest väiksem, 1127 aluspaari pikkune, sisaldab HPV18 URR järjestust. Vektorina kasutati pGEXFarI plasmidi, mida lõigati XbaI restriksiooniensüümiga. Antud lõikuse tulemusel tekib kaks fragmenti, millest suuremat, 6805 aluspaari pikkust, kasutati edaspidi kloneerimisel. Kloneerimise käik on skemaatiliselt esitatud lisas 1. Kõik restriksioonid teostati 37°C juures, kasutades Thermo Scientific *Fast Digest* ensüüme, vähemalt tunni aja jooksul kuni üleöö.

Vektori 5' fosfaatrühmade eemaldamiseks DNA iseligeerumise vältimiseks kasutati FastAP ensüümi ning 5' üleulatuvate otste täitmiseks kasutati *Klenow* ensüümi restriksiooni puhvris. DNA fragmendid eraldati 0,8% agarosgeelis, TAE puhvris (40 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA). Õigete fragmentide puhastamiseks geelist kasutati *Nucleospin DNA Purification Kit*'i tootjapoolse protokolliga.

Ligatsiooniks võeti vajalikke DNA fragmente suhtes 1 osa vektorit ja 5 osa inserti. Fragmendid ligeeriti 12 tunni jooksul 16°C juures, kasutades T4 DNA ligaasi ja selle puhvrit (Thermo Scientific). Saadud ligatsioonisegud transformeeriti *E.Coli* tüve DH5 $\alpha$  kompetentsetesse rakkudesse kuumaehmatuse (*heat shock*) meetodil. Jääl sulatatud kompetentsetele rakkudele lisati ligatsioonisegu, rakke inkubeeriti 10 minutit jääl, peale mida hoiti 45 sekundit 42°C juures ja jahutati jääl. Lisati 500  $\mu$ l LB-d (lüsogeenne sööde) ning inkubeeriti 1h 37°C juures. Rakud tsentrifugeeriti lauafuugiga 5 minutit 3000 rpm, resuspendeeriti 100  $\mu$ l söötmes ning plaaditi LB tassidele, mis sisaldas ampitsilliini

lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml. Seejärel pandi tekkinud kolooniad kasvama ning järgmisel päeval puhastati bakteritest plasmiidne DNA, millele teostati restriksioonanalüüs. pGEXURR18 plasmidi paljundamiseks transformeeriti plasmiidne DNA uuesti *E. Coli* DH5α rakkudesse, järgmisel päeval külvati tekkinud koloonia 2ml vedelsöötmesse, kasvatati 6 tundi, misjärel külvati kultuuri edasi 100ml LB vedelsöötmesse, millesse oli lisatud 100ug/ml ampitsilliini, ja kasvatati loksutil 220rpm, 12-16 tundi 37°C juures. Plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati firma *NucleoBond® Xtra Midi EF Kit*'i ning tootjapoolset protokollit ning kontrolliks teostati restriksioonanalüüs.

### 2.2.3 U2OS rakkude kasvatamine ja transfekterimine

Töös kasutati mudelsüsteemina U2OS rakuliini, mis pärineb inimese sääreluu osteosarkoomi rakkudest ning neil on sarnane morfoloogia epiteeli rakkudega.

U2OS rakke kasvatati 100mm diameetriga koekultuuri tassidel IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes, mis sisaldas 10% FCS (veise loote seerum) ning 1% penitsilliin-steptomütsiini. Kõikides eksperimentides kasutatud rakud kasvasid inkubaatoris 37°C juures 5% CO<sub>2</sub> sisaldusel.

Transfekteritavate DNA-de ruumalad viidi võrdseks vastava koguse TE-ga ning lisati 5 µl *carrier* DNA-d (10 mg/ml). Üheks transfektsiooniks kasutati rakke 100mm läbimõõduga koekultuuri tassilt, mis oli saavutanud ligikaudu 90%-lise konfluentsuse. Ette kasvatatud rakkudelt aspireeriti sööde ning pesti 1 kord 5ml 1xPBS lahusega (*phosphate buffered saline*). Seejärel lisati 2ml trüpsiini ning oodati, kuni rakud koekultuuritassidel lahti hakkasid tulema. Rakud koguti 25ml IMDM+10%FCS söötmesse ning tsentrifugeeriti 1200rpm, 5 minutit (*Eppendorf Centrifuge 5810 R*). Rakusade võeti üles täissöötmes, milles oli pH stabiilsuse säilitamiseks lisatud 5mM BES-Na, pH 7,5. Üheks transfektsiooniks võeti 250 µl rakke. Vajalik kogus DNA-d koos 50 µg *carrier* DNA-ga (kuumaga denatureeritud lõhe sperm DNA) pipeteeriti koos rakkudega 4 mm elektrodide vahega elektroporatsiooniküvettesse. Kasutati *Gene Pulser II (Biorad Instruments)* elektroporaatorit ning rakud elektroporeeriti pingel 220V, mahutavusega 975 uF. Kohe peale elektroporatsiooni kanti rakud värsket söödet sisaldavasse 15 ml Falconisse ning tsentrifugeeriti 1000rpm 5 minutit. Seejärel aspireeriti rakkudelt sööde ning rakusade suspendeeriti värskes söötmes ning plaaditi vastavalt vajadusele.

#### **2.2.4 Eukarüootsetest rakkudest episomaalse DNA eraldamine Hirt lüüsiga**

24h ja 72h peale transfektsiooni eemaldati koekultuuritassidelt sööde ning rakke pesti 2 korda 1xPBS lahusega. Rakke lüüsiti 1,6mL HIRT lüüsilahusega (0,5% SDS, 50 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA) 10 minutit, tase aeg-ajalt kallutades. Seejärel lisati tilkhaaval 400 µl 5M NaCl lahust ning segati, et kattuks kogu tassi pind. Rakulüsaat koguti kummimiilitsaga tuubi ning fuugiti 4°C juures 15 000 rpm, 15 minutit peale mida kanti supernatant uude tuubi. Lisati 0,7 mahtu isopropanooli, segati ning jäeti 10 minutiks -20°C juurde. Seejärel fuugiti uuesti 4°C juures 15 000 rpm 15 minutit, eemaldati supernatant ning lasti sademel kuivada. Sade lahustati 1,5ml Proteinaas K puhvris (20mM Tris-Cl pH8.0, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 0.2% SDS), mis sisaldas ensüümi proteinaas K lõppkontsentratsiooniga 0,2mg/ml. Proovi hoiti 1 tund 37°C juures, mille järel lisati võrdne maht fenool-kloroform segu (1:1). Järgnes fenool-kloroform töötlus alltoodud viisil (2.2.5). Sade lahustati 50 µl TE-s, mis sisaldas RNAasi lõppkontsentratsiooniga 20 µg/ml. Proovi hoiti 37°C juures 20 minutit ning jäeti üleöö 4°C juurde lahustuma.

#### **2.2.5 Eukarüootsetest rakkudest totaalse DNA eraldamine**

Totaalse DNA eraldamiseks pesti rakud 2ml 1xPBS-iga ning 60mm diameetriga tassidele lisati 400 µl proteinaas K lüüsipuhvrit (20mM Tris-Cl pH8.0, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 0.2% SDS), mis sisaldas ensüümi proteinaas K lõppkontsentratsiooniga 0,2mg/ml. Rakke lüüsiti 10 minutit toatemperatuuril, aeg-ajalt tase kallutades. Lüsaat koguti kummimiilitsaga 1,5ml *ependorfi* tuubi ning inkubeeriti loksutis 12-18 tundi, 1400rpm, 55°C juures. Seejärel lisati proovidele võrdne maht fenool-kloroform segu (1:1), segati vorteksil ning tsentrifugiti 13 000rpm juures 5 minutit. DNA-d sisaldav ülemine vesifaas kanti uude tuubi, kuhu lisati 2,5 mahtu 95% etanooli. Proove sadestati 30min -20°C juures, peale mida tsentrifugiti 13 000 rpm, 15 min, 4°C fuugis. Seejärel eemaldati supernatant ning lisati 250 µl külma 75% etanooli, tsentrifugiti 5 minutit, eemaldati supernatant ning sade kuivatati toatemperatuuril. Sade lahustati 35 µl TE-s (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA), mis sisaldas RNAasi lõppkontsentratsiooniga 20 µg/ml. Proove inkubeeriti 56°C juures 20 minutit ning jäeti üleöö 4°C juurde lahustuma. Järgmisel päeval mõõdeti DNA kontsentratsioonid ning proove säilitati -20°C.

## 2.2.6 Replikatsioonianalüüs Southern blot meetodil

Southern blot analüüsi teostamiseks võeti 3 µg või 5 µg episomaalset või totaalset DNA-d, lõigati restriktasidiga 30 µl-is, 37°C juures üleöö, kasutades Thermo Scientific *Fast Digest* ensüüme. U2OS rakuliini transfekteeritud plasmide lõigati lineariseerivate ensüümidega pUCURR18 XbaI, pGEXURR18 NcoI ja HPV-18 *minicircle* BglII-ga.

### 2.2.6.1 1D geelelektroforees ja 2D geelelektroforees, DNA ülekanne filtrile

#### 1D geelelektroforees

Lõigatud DNA kanti geelile ning lahutati geelelektroforeesil. Kasutati 0,8% TAE agarosgeeli, mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,2 µg/ml, ja vastavat puhvrit. Geelelektroforees viidi läbi madalal voltaažil (2-3 V/cm) 5 tunni jooksul kuni üleöö. Seejärel loksutati geeli 45 minutit denaturatsioonilahuses SOL A (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), peale mida loputati destilleeritud veega ning jäeti veel 30 minutiks loksuma SOL B neutralisatsioonilahusesse (1 M Tris pH-7,4, 1,5 M NaCl). Samal ajal lõigati kaks geeli suurust *Whatman* filterpaberit ja üks nailonmembraan (GVS LifeSciences). Klaasist vanni valati piisaval hulgal 10xSSC-d (1,5 M NaCl, 150 mM Na-tsitraat), asetati peale klaas, millele pandi 10xSSC-ga märjatud kaks suuremat filterpaberit. Seejärel rulliti välja õhumullid ning geel asetati tagurpidi filterpaberile. Geelile pandi peale samas suuruses nailonfilter ning rulliti veelkord, et ei jääks õhumulle. Kõige peale asetati kaks *Whatman* filterpaberit, mis kaeti salvrätide ja raskusega. Kapillaarne ülekanne toimus ~12 tunni jooksul. Järgmisel päeval nailonfilter kuivatati ning DNA rist-seoti filtrile, kasutades UV Stratalinker 1800 aparaati.

#### 2D geelelektroforees

2D geelelektroforees põhineb kahel erineval järjestikusel geelelektroforeesil, mis võimaldab lahutada molekule nii nende molekulmassi kui ka kuju järgi. Nii on võimalik lineaarseks lõigatud tsirkulaarse molekuli põhjal uurida erinevaid replikatsiooni vahevorme, mis viitavad vastava DNA replikatsiooni mehhanismile.

Esimeses etapis toimub DNA fragmentide lahutamine eelkõige molekulmassi järgi madala agarosisisaldusega geelis ja madalal voltaažil ilma etiidiumbromiidita. Seejärel lõigatakse geelist välja DNA fragmente sisaldavad ribad, keeratakse 90° ning ümber valatakse uus, kõrgema agarosisisaldusega geel. Teine elektroforees toimub etiidiumbromiidi juuresolekul, kõrgemal voltaažil lühemat aega ning külmemates tingimustes ~4°C juures. Etiidiumbromiid

seondub DNA lämmastikaluste vahele heeliksi väiksesse vaku, mistõttu aitab rohkem esile tuua ka molekuli kuju.

Üheks analüüsiks kasutati mõlemal juhul kolmest 100 mm diameetriga koekultuuri tassist eraldatud DNA-d (ca 150 ug). Proovid lineariseeriti ning kanti geelile. Tekkinud DNA fragmendid lahutati madala kontsentratsiooniga etiidiumbromiidiga 0,5%-lises agarosgeelis 0,5xTBE puhvris 15 tunni jooksul, rakendades pinget 0,5V/cm. Geelist lõigati välja DNA-d sisaldavad read, keerati 90° ning nende ümber valati uus, etiidiumbromiidi ja kõrgema agarosisisaldusega (1.2%) geel. Geelelektroforeesi teine dimensioon toimus 0,5xTBE puhvris ~5 tundi jooksul 4°C juures, pingel 180V. Pärast foreesi kanti DNA nailonfiltrile nagu on kirjeldatud ülal 2.2.6.1 1D geelelektroforees.

### **Hübridisatsiooniproovi valmistamine**

Kuna HPV-18 pisirõngas ja pUCURR18 sisaldavad HPV-18 *origin* piirkonda kasutati hübridiseerimiseks HPV-18 origin järjestust. pGEXURR18 jaoks tugevama signaali saamiseks kasutati lineariseeritud pGEXURR18 täispikka plasmidi. Mõlema proovi tegemiseks kasutati 200ng malli (*template*) järjestust, 30 µl vett ja 10 µl 5X puhvrit. Proove denatureeriti 100°C 10 minutit ja jahutati jääl. Seejärel lisati 3 µl C-mix'i (ei sisalda dCTP), 1 µl Klenow ensüümi ja 6 µl α-P<sup>32</sup>-dCTP märgitud isotoopi, inkubeeriti 37°C 15 minutit, lisati 2 µl dNTP mixi, peale mida tõsteti proovid 100°C juurde veel 10 minutiks. Seejärel jahutati jääl ning kanti prehübridisatsioonilahusesse, kus oli DNAd sisaldav nailonmembraan.

### **Hübridisatsioon**

Hübridisatsioon kestis vähemalt 16 tundi 65°C juures. Selleks, et vältida ebaspetsiifilist seondumist töödeldi filtrit enne hübridisatsiooni 25 ml prehübridisatsiooni lahusega (6xSSC, 5xDEN, 0,5%SDS, 100 ug/ml denatureeritud lõhe spermi DNA) vähemalt 45 minutit 65°C hübridisatsiooniahjus. Peale seda lisati lahusesse radioaktiivselt märgistatud proov, mis oli ette valmistatud nagu on kirjeldatud punktis 2.2.6.1 Hübridisatsiooniproovi valmistamine. Järgmisel päeval pesti filtrit kolme eelsoojendatud lahusega: pesulahusega I (3xSSC, 0,1% SDS) kaks korda 10 minutit, seejärel kaks korda 15 minutit pesulahusega II (1xSSC, 0,1% SDS) ning viimasena kaks korda 20 minutit pesulahusega III (0,1xSSC, 0,1% SDS). Filter kuivatati ning hübridisatsioonisignaali detekteerimiseks eksponeeriti filter röntgenfilmile või Typhoon fosfoimager ekraanile.

### 2.2.7 RNA eraldamine ja cDNA süntees

RNA eraldati U2OS transfektoerimata ja HPV-18 pisirõngaga transfektoeritud rakkudest *Quick RNA Miniprep Kit*'i (Zymo Research) protokoll järgi. Koekultuuritassidelt aspireeriti sõõde ning proovide homogeniseerimiseks lisati 600 µl RNA lüüsi puhvrit. Seejärel fuugiti lüsaati 1 minuti jooksul 12 000 rpm, mille järel kanti supernatant *Spin-Away™ Filter* kolonni. Et lahti saada genoomsest DNA-st tsentrifugeeriti kolonne 1 minut 12 000rpm, peale mida eemaldati kolonn koos sinna kinnitunud DNA-ga. Kolonnist läbi jooksnud RNA-le lisati 600 µl 95% etanooli ning segati korralikult ning pipeteeriti *Zymo-Spin™ IICG* kolonni, tsentrifugeeriti 30 sekundit ning kolonnist läbi jooksnud lahus visati minema. Järgnes kolonni pesu 400 µl RNA pesu puhvriga, misjärel tsentrifugeeriti kolonni 30 sekundit. Seejärel segati kokku 5 µl DNAas I ning 75 µl DNA lagundamise puhverit, mis pipeteeriti otse kolonni maatriksi keskele. Inkubeeriti toa temperatuuril 15 minutit ning tsentrifugeeriti 30 sekundit. Kolonnile lisati 400 µl RNA ettevalmistuspuhvrit, seejärel 700 µl RNA pesu puhvrit ja veelkord 400 µl pesu puhvrit. Peale iga puhvri lisamist tsentrifugeeriti kolonni 30 sekundit ja eemaldati kolonnist läbi jooksnud lahus. RNA elueeriti 50 µl DNAas/RNAas vabas vees. Kontsentratsioonid mõõdeti Nanodrop 1000 spektrofotomeetriga (*Thermo Fisher Scientific*) ning RNA säilitati -20°C. Selleks, et olla kindel, et proovidesse ei jää genoomset DNA-d, lisati 1 µg proovile 1 µl 10X DNAasi puhvrit MgCl<sub>2</sub>-ga, 1 µl DNAasi ning vett kuni 10 µl-ni. Proovi inkubeeriti 37°C juures 30 minutit. Seejärel lisati 1 µl 50mM EDTA-d, et inaktiveerida DNAas ja inkubeeriti 65°C juures 10 minutit. Seejärel jaotati mõlemad proovid kaheks, et kasutada ühte hiljem kontrollproovina. Kõikidele proovidele lisati 1 µl oligo (dT)<sub>18</sub> praimerit, hoiti 65°C juures 5 minutit ning jahutati jääl. Lisati 4 µl 5X reaktsiooni puhvrit, 1 µl *Ribolock* RNAasi inhibiitorit, 2 µl 10mM dNTP segu ning 1 µl ensüümi *RevertAid M-MulV RT*. Kontrollproovile jäeti ensüüm lisamata. Proove hoiti 60 minutit 42°C juures ning ensüüm inaktiveeriti 5 minuti jooksul 70 °C juures.

### 2.2.8 PCR ja reaala PCR. PCR-i fragmentide klonimine pJET vektorisse ja plasmiidide puhastamine

Reaala PCR-i läbiviimisel kasutati Mastercycler Gradient (Eppendorf) masinat. Uurimistöös kasutatud praimerid on toodud tabelis 1. Proovid kanti 384 auguga qPCR plaadile 10 µl kaupa kolme paralleelse kordusena. Iga proov sisaldas 0,5 µl cDNA-d, 2 µl 5x *EvaGreen* fluoresentsvärvi (Solis BioDyne), 0,5 µl 10 µM *forward* praimerit, 0,5 µl 10 µM *reverse* praimerit ning 6,5 µl vett.

**Tabel 1. Uurimistöös kasutatud parimerid**

<b>Praimeri nimetus</b>	<b>Forward praimer</b>	<b>Reverse praimer</b>	<b>Produkti pikkus bp</b>
<b>Oct6</b>	CCAAAGCGACAGGTAACGCA	GAGAAGAGGGCGTGTAGCGAAT	152
<b>Oct1</b>	AGCAACTACCCTCACAGTCAG	TGTGTTGTTGGAGGTGGTGTC	99
<b>Brn2</b>	GGAGGTGGTGAGAGTTTGGTT	TGTGGTGGAGTGTCCCTACT	100
<b>Brn3a</b>	GAACAGCAAGCAGCCTCACTT	CAGCAGCGTCTCGTCCAG	153
<b>Brn5</b>	TGCCTCTGCTCCTATCCCAAT	TCCCATCCTCATCCAGACTTG	94
<b>Skn1a</b>	GCTGGAGAAGTGGCTGAATGA	CCTACCAAATACTTCACTGAGGC	150

Et kontrollida produktide õigsust, tehti ka tava PCR analüüs kõikidele praimeridele. PCR-i reaktsiooni komponendid on toodud tabelis 2 ning PCR-i programm valiti 5x *HOT FIREPol Blend Master Mix Ready To Load* (Solis BioDyne) protokoll järgi (tabel 3).

**Tabel 2. PCR-i reaktsiooni komponendid ühe reaktsiooni kohta**

<b>Reaktsiooni komponent</b>	<b>Ruumala (µl)</b>
<i>5x HotFirePol Blend Master Mix Ready to Load</i>	4
<i>10 µM Forward ja reverse praimerite segu</i>	0,5
cDNA	0,5
MQ	15
<b>Kokku</b>	<b>20</b>

**Tabel 3. PCR-i programm**

<b>Reaktsioon</b>	<b>Temperatuur (°C)</b>	<b>Aeg</b>	<b>Tsüklite arv</b>
<b>Polümeraasi aktiveerimine</b>	95	15 min	1
<b>DNA denaturatsioon</b>	95	15 sek	
<b>Praimerite seondumine DNA-le</b>	60	50 sek	27
<b>DNA süntees</b>	72	30 sek	
<b>Poolikute PCR-i produktide täis-süntees</b>	72	10 min	

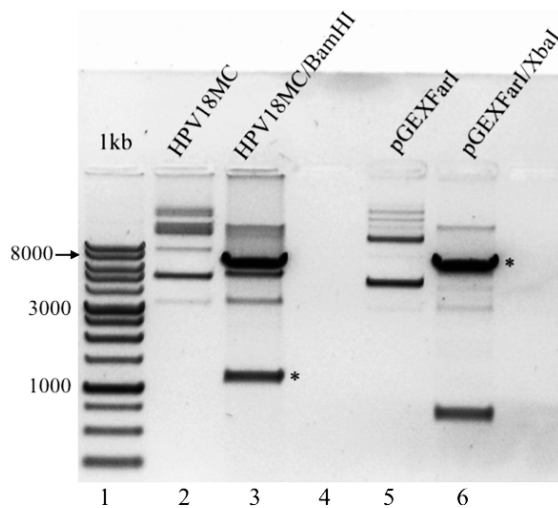
## **PCR-i fragmentide klonereimine pJET vektorisse ja plasmiidide puhastamine**

PCR-i proovist kanti 10 µl geelile ning 10 µl kasutati Brn3a, Brn5, Skn1a, Oct1 produktide klonereimiseks. DNA puhastamiseks PCR-i segust kasutati DNA *Clean&Concentrator Kit*'i ja järgiti selle protokoll (Zymo Research). DNA elueeriti 25 µl-is ja segati kokku reaktsioon: 15 µl DNA, 2 µl 10X *Ligase Buffer*, 1 µl *Blunting* ensüüm, et tõmbistada PCR-i fragmendi otsad. Proovi hoiti 70°C juures 5 minutit ning jahutati jääl, edasi lisati 1 µl pJET1.2/*Blunt Cloning Vector* ning 1 µl T4 DNA ligaas. Seejärel segati õrnalt *vortexil*, fuugiti lauafuugiga 3-5 sekundit, ning inkubeeriti 22°C juures 1,5t. Ligatsioonid transformeeriti DH5α kompetentsidesse kuumaehmatuse meetodil ülalkirjeldatud viisil (2.2.2) ning plaaditi LB tassidele, mis sisaldas ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100ug/ml. Tekkinud kolooniatest valiti üks, mis pandi üleöö 3 ml LB amp vedelsöötmesse kasvama ning järgmisel päeval puhastati bakteritest plasmiidne DNA. Seejärel teostati kõikidele restriksioonanalüüs BglII-ga, et näha kas PCR-i produkt on vektorisse sisse läinud. Õiged plasmiidid sekveneeriti kasutades Eesti Biokeskuse tuumiklabori teenust.

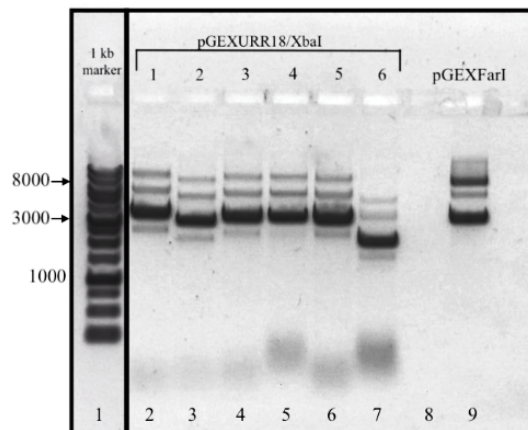
## **2.3 TULEMUSED**

### **2.3.1 Klonereimine. Plasmidi pGEX18URR konstrukti konstrueerimine**

HPV-18 URR järjestust sisaldav ligikaudu 8000 aluspaari pikkune plasmiid konstrueeriti selleks, et võrrelda selle replikatsiooni võimet sarnase pikkusega HPV genoomiga. Plasmidi tegemiseks lõigati HPV-18 minirõngas plasmidi BamHI restriksiooniensüümiga, mille tulemusel tekib kaks fragmenti, millest väiksem 1127 aluspaari pikkune, sisaldab HPV-18 URR järjestust. Vektorina kasutati pGEXFarI plasmidi, mida lõigati XbaI restriksiooniensüümiga. Antud lõikuse tulemusel tekkis samuti kaks fragmenti, millest suuremat, 6805 aluspaari pikkust kasutati edaspidi klonereimisel (joonis 10). Restriksioonid kanti 0,8% agarooosi sisaldusega TAE geelile ning lõigati välja õige suurusega fragmendid, mis puhastati geelist ning kasutati edaspidisel klonereimisel ülaltoodud viisil (2.2.2). Joonisel 11 on näha, et kuuest erinevast bakterikolooniast puhastatud plasmiidist oli mõistlik edasiseks uurimiseks kasutada kolooniaid 1-5 (joonisel 11 rajad 2-6).

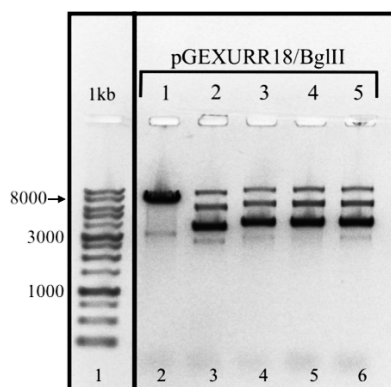


**Joonis 10. HPV-18 *minicircle* ja pGEXFarI lõikus.** Joonisel on näidatud HPV-18 *minicircle* ja pGEXFarI plasmiidid (rajal 2 ja 5) ning nende lõigatud vormid (HPV18MC/BamHI rajal 3 ja pGEXURR18/XbaI rajal 6). Tärniga on näidatud restriksioonil tekkivad 1127 ja 7504 aluspaari suurused fragmendid, mida kasutati klonereimiseks. Mõlemad plasmiidid on lõikunud osalselt, kuna geelil on näha ka minoorseid, lõikamata DNA-ga sarnaselt migreeruvaid fragmente.



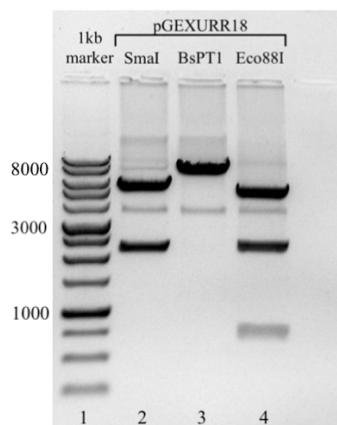
**Joonis 11. Kuuest bakterikolooniast puhastatud plasmiidid.** 1. rajal on suurusmarker. 2. kuni 7. rajal on erinevatest bakterikolooniatest puhastatud plasmiidid. Geelile kanti 0,5 ug DNA-d ning esmaseks võrdluseks, et näha kas klonereimine on õnnestunud, kanti 9. rajale vektorina kasutatav pGEXFarI lõikamata plasmiid.

Edaspidises restriksioonanalüüsis kasutati kolooniatest 1-5 puhastatud plasmide, mida lõigati BglII-ga. Selle restriктаasi ainus lõikekoht asub HPV-18 URR-is, mistõttu, peaks õige konstrukt lineariseeruma (joonis 12).



**Joonis 12. Bakterikolooniast puhastatud plasmiidide kontroll lineariseeriva ensüümiga BglIII.** Joonisel on 1. rajal 1kb marker, millest vasakul on numbriliselt fragmendi pikkus aluspaarides. Radadel 2-6 on plasmiidid, mida lõigati BglIII-ga. Kui konstrukti on õige, st HPV-18 URR piirkond on pGEXFarI vektoris, lineariseerib BglIII konstrukti. Joonisel on näha, et 2. rajal on ainus lineariseerunud konstrukti.

Viimaseks analüüsiks valiti 1. plasmiid (joonisel 11 ja 12 rada 2). Et olla kindel konstrukti õigsuses teostati restriksioonanalüüs kolme erineva ensüümiga: SmaI, mille lõikekoht asub URR-is kui ka vektoris; BspT1, mis lõikab ainult URR-is ning Eco88I, millel on 3 lõikekohta kui insert on vektoris, kuid 2, kui insert ei ole vektorisse sisse läinud. pGEXURR18 konstrukti lõplik restriksioonanalüüs on toodud joonisel 13.



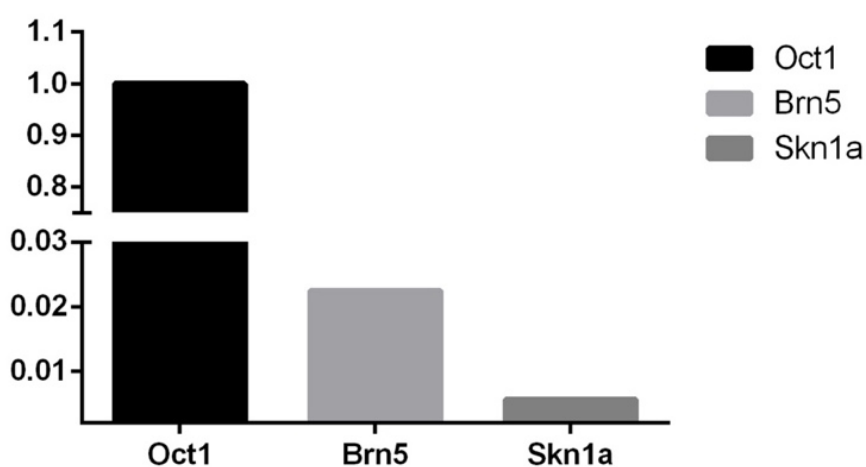
**Joonis 13. pGEXURR18 restriksioonanalüüs.** Joonisel on pGEXURR18 konstrukti restriksioonanalüüs. Esimesel rajal on 1kb marker ning 2.-4. rajal on eelnevate analüüside põhjal valitud plasmidi kontroll kolme ensüümiga. Teisel rajal on lõikus SmaI-ga, mille lõikekoht asub nii HPV-18 URR-is kui ka pGEXFarI vektoris. Joonisel on näha, et tekib 2 eri suurusega fragmendi. BspT1 lõikab ainult HPV-18 URR-is ning joonisel on näha, et tekib ainult 1 fragment. Järelikult on URR piirkond vektoris. Eco88I lõikab kolmest erinevast kohast, kui URR piirkond on vektoris sees ning kahest kohast, kui insert ei ole vektoris. Joonisel rajal 4 on näha, et tekib 3 eri suurusega fragmenti, mis kinnitab koos eelmiste analüüsidega, et tegu on õige plasmiidiga.

### 2.3.2 POU homeodomeen faktorite avaldumise analüüs U2OS rakkudes

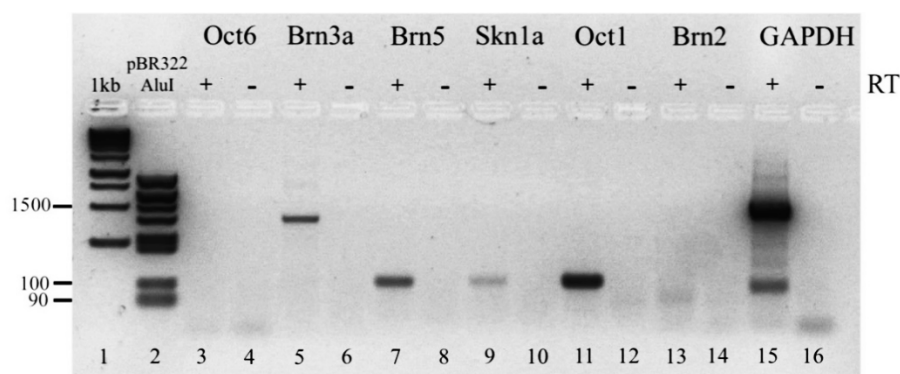
Selleks, et teada saada millised transkriptsioonifaktorid avalduvad U2OS rakuliinis teostati reaalaaja PCR analüüs kasutades valitud POU homeodomeen faktoritele spetsiifilisi praimerpaare (tabel 1). Proove analüüsiti ning selleks, et kontrollida nende õigsust tehti ka tava PCR analüüs, millele järgnes sekveneerimine. HPV-18 transfekteeritud U2OS rakkudest eraldati RNA ning sünteesiti pöördtranskriptaasiga cDNA. Seejärel tehti reaalaaja PCR analüüs ja tavaline PCR analüüs, mille produktide kontrolliks kanti 10 µl PCR-i segust 2% agarosisisaldusega TAE geelile.

Reaalaaja PCR-i tulemustest selgus, et U2OS rakuliinis ekspresseeruvad mõningal määral Skn1a, Brn3a, Brn5 ja Oct1, kuid Oct-6 ja Brn2 mitte. Kontrolliks kasutati GAPDH koduhoidjageeni (joonised 14 ja 15).

Kuna kirjandusest on teada, et Oct-6 ekspresseerub mitmekihilise epiteeli keratinotsüütides, mida HPV nakatab, vaadeldi edaspidistes katsetes just Oct-6 mõju HPV-18 pisitõnga ja pGEXURR18 plasmiidile.

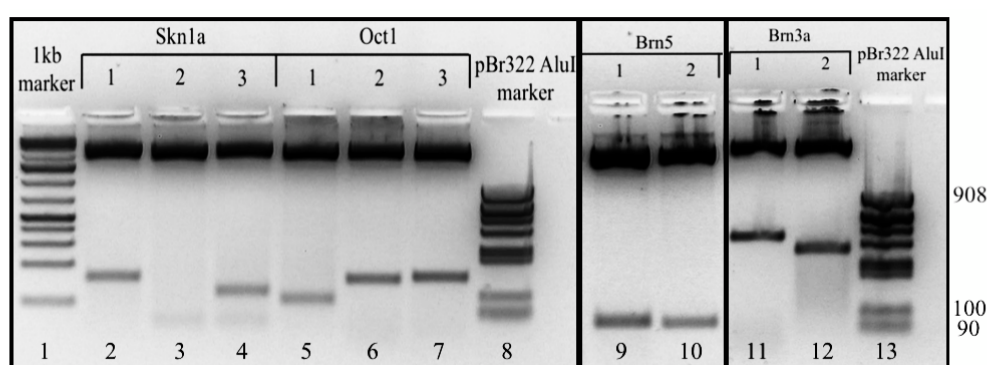


**Joonis 14. U2OS rakuliinis avalduvate POU valkude ekspressiooni võrdlus reaalaaja PCR analüüsiga.** Joonisel on näha kolm kõige kõrgemalt ekspresseeruvat POU homeodomeen valku (Oct1, Brn5, Skn1a) U2OS rakuliinis. Kuna enamik valkude ekspressioonitase oli nii madal ning selleks, et andmed oleks paremini kvantiseeritavad, vaadeldi Brn5 ja Skn1a ekspressiooni Oct1 suhtes. Võrreldes Oct1-ga avaldub Brn5 50 korda ja Skn1a 250 korda madalamalt.



**Joonis 15. POU transkriptsioonifaktorite avadumise analüüs PCR meetodil.** Joonisel on näidatud transkriptsioonifaktorite analüüs. 2% agarosisisaldusega TAE geelile kanti igast PCR-i segust 10 µl. Joonisel on 1. rajal 1kb marker ja 2. rajal pBR322AluI marker. Pluss (+) tähistab cDNA proovi, milles kasutati revertaasi, miinus (-) on kontrollproov, millest ei tohiks PCR-i produkti tekkida.

Jooniselt 15 on näha, et ainult Oct6 ei ekspresseeru HPV-18 pisirõngaga nakatatud U2OS rakkudes ning kõige nõrgemalt ekspresseerub Brn2. Kõik ülejäänud transkriptsioonifaktorid Brn3a, Brn5, Skn1a ja Oct1 ekspresseeruvad U2OS rakkudes. Kontrollina kasutati GAPDH koduhoidjageeni, mis on pidevalt ja kõrgel tasemel ekspresseeritud paljudes rakkudes. Selleks, et olla kindel, et U2OS rakuliinist tehtud cDNAdest amplifitseeritud fragmendid on tõesti avalduvate transkriptsioonifaktorite omad, kloneeriti 10 µl PCR-i produkti pJET1.2/*Blunt Cloning Vector* plasmidi ülaltoodud viisil (2.2.6).



**Joonis 16. Bakterist puhastatud erinevate POU homeodomeen faktorite fragmente sisaldavate plasmiidide restriktsoonanalüüs.** Joonisel on 1. rajal 1kb marker ning 8. ja 13. rajal pBR322AluI marker, millest paremal on toodud fragmendi suurus aluspaarides. Joonisel on näha bakterist puhastatud plasmiidid. Kõik proovid lõigati 20 µl-is ensüümiga BglII ning analüüsiti 2%TAE geelelektrofooresil.

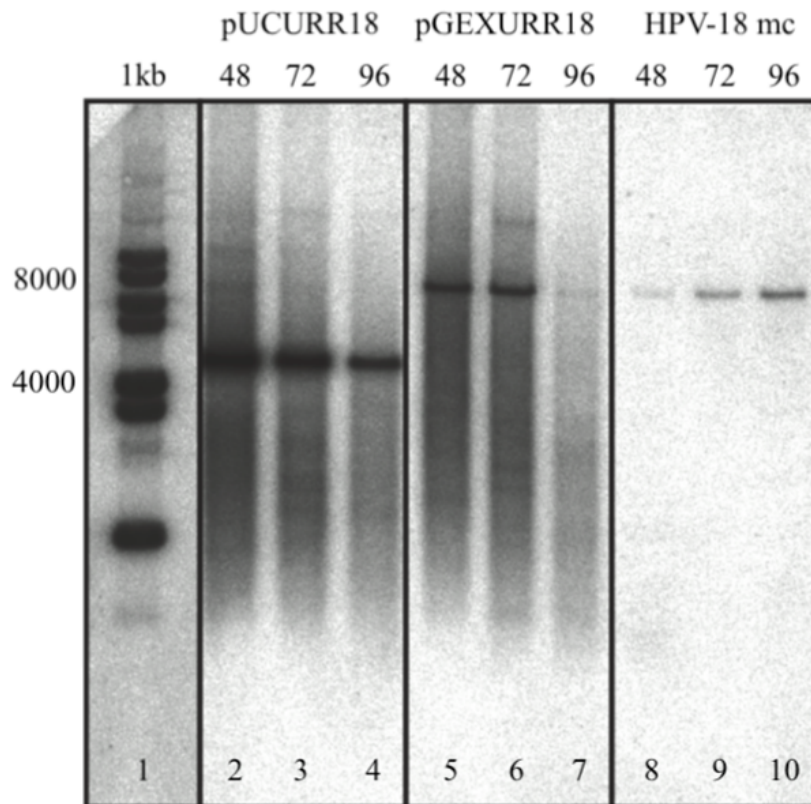
Sekvenerimise tulemusel selgus, et Skn1a 1. ja 3. plasmiid olid õiged (joonis 16 rajad 2 ja 4). Mõlemad fragmendid on identsed, kuid pikkuste erinevus tuleneb lisa BglIII lõikekoha tekkimisest PCR-i produkti otste tõmbistamisel. Oct1 plasmiididest saadeti sekvenerima 1. ja 2. plasmiid, millest 2. osutus õigeks. Brn5 1. koloonia plasmiid osutus sekvenerimise tulemusena samuti õigeks ning Brn3a mõlemad plasmiidid ei andnud sekvenerides õiget tulemust. Seega selgus sekvenerimise tulemusel, et PCR-i produktidest olid õiged Skn1a 1. ja 3. plasmiid, Oct1 2. plasmiid ning Brn5 1. plasmiid.

### 2.3.3 HPV origini sisaldavate plasmiidide replikatsiooni võime analüüs

Selleks, et võrrelda HPV-18 origin piirkonda sisaldavate plasmiidide pUCURR18 ja pGEXURR18 replikatsiooni HPV-18 pisirõngaga, transfekteeriti need U2OS rakkudesse ülaltoodud viisil (2.2.3). pUCURR18 ja pGEXURR18 plasmiidide puhul transfekteeriti lisaks HPV-18 E1 ja E2 ekspressioonivektorid. Täpsem transfektsiooni plaan on toodud tabelis 5. Replikatsiooni võime uurimiseks teostati 1D ja 2D geelelektroforees. Kui 1D võimaldab molekule lahutada peamiselt suuruse järgi, siis 2D elektroforeesiga on võimalik seda teha nii nende suuruse kui ka kuju põhjal. Nii on võimalik lineaarseks lõigatud tsirkulaarse molekuli põhjal uurida erinevaid replikatsiooni vahevorme, mis viitavad vastava DNA replikatsiooni mehhanismile. Joonisel 18 on näidatud 2D elektroforeesiga tuvastatavad theta-replikatsiooni mudelile iseloomulikud vahevormid.

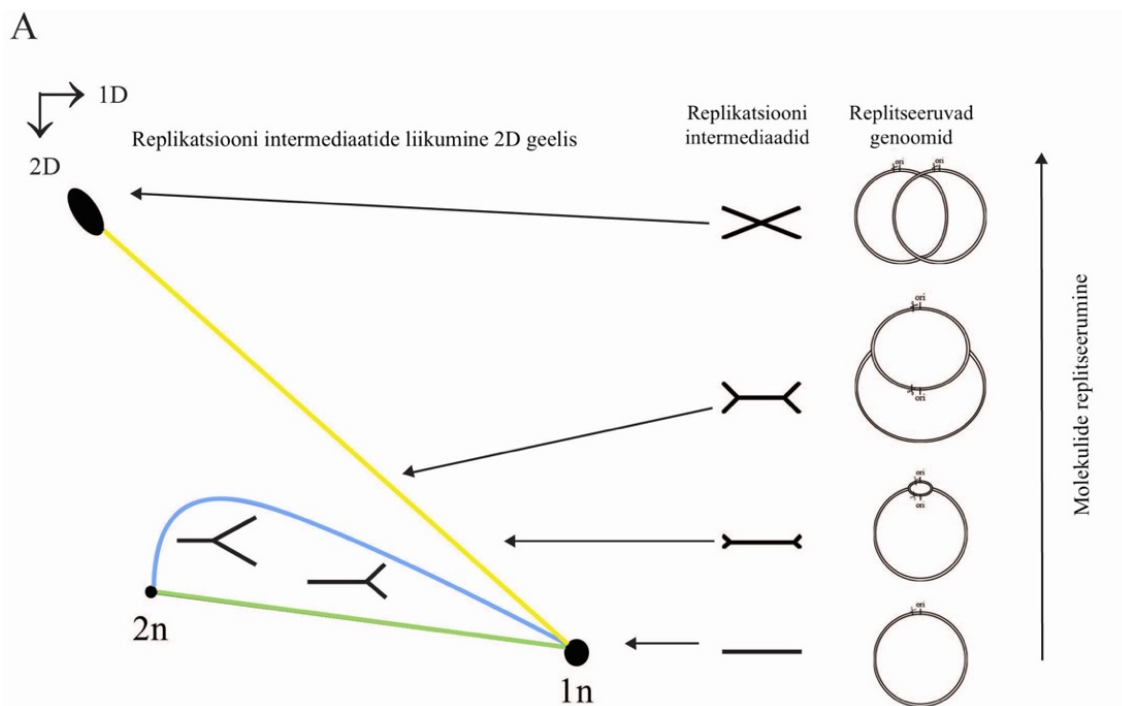
**Tabel 5. pUCURR18 ja pGEXURR18 transfektsiooni skeem 1D ja 2D geelelektroforeesiks**

Transfektsioon	Plasmiid	DNA kogus µg	
		1D	2D
1.	pUCURR18	1	2
	E1 (pM18-14)	0,25	0,4
	E2 (pQMN18E2)	0,5	1
2.	pGEXURR18	2	4
	E1 (pM18-14)	0,25	0,4
	E2 (pQMN18E2)	0,5	1
3.	HPV-18 <i>mc</i>	1	-



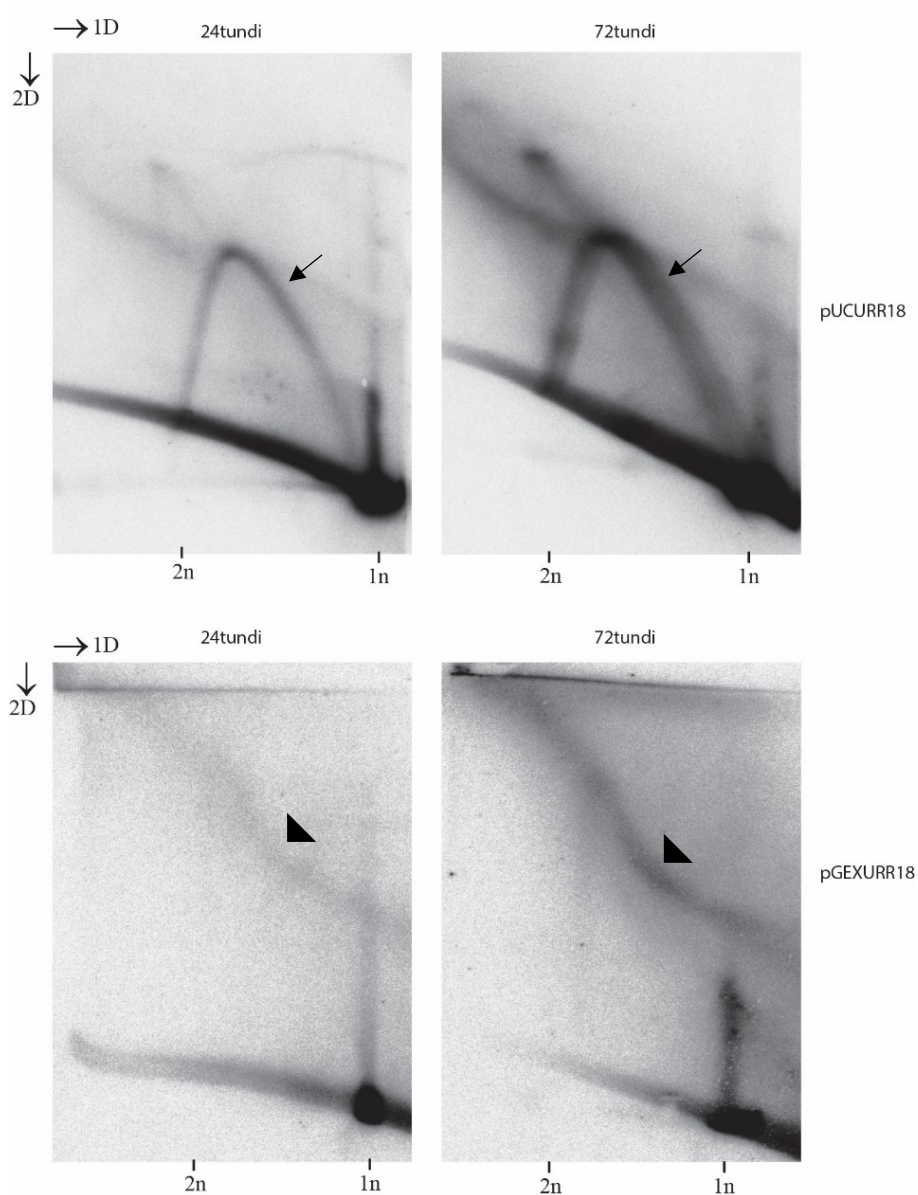
**Joonis 17. HPV-18 origini sisaldavate plasmiidide pUCURR18 ja pGEXURR18 ning HPV-18 *minicircle* replikatsiooni võrdlus ajas Southern blot meetodil.** Joonisel on 1. rajal 1kb marker, millest vasakul on numbriliselt fragmendi pikkus aluspaarides. Totaalne transfekteeritud rakkudest eraldatud DNA (5µg) lõigati uuritavat replikoni lineariseerivate ensüümidega (pUCURR18 lõigati ensüümiga XbaI, pGEXURR18 NcoI, HPV-18 *minicircle* BglII), lahutati 0,8% TAE agarosgeelil, kanti üle nailonfiltrile ning hübridiseeriti kasutades P<sup>32</sup> märgitud HPV-18 URR prooviga.

Kõik kolm plasmidi replitseeruvad U2OS rakuliinis (joonis 17). Kuna pUCURR18 ja pGEXURR18 plasmiididele on vaja kotransfekteerida E1 ja E2 ekspressioonivektoreid, on nende replikatsiooni signaal ajas langev, sest replikatsiooniks vajalikud valgud tulevad vektorilt, mille hulk väheneb rakkude jagunemise käigus. HPV-18 pisirõnga replikatsiooni signaal on ajas kasvav, mis näitab, et vastav HPV-18 replitseerub tihedamini kui peremeesraku genoom .



**Joonis 18. 2D analüüsiga leitavad tsirkulaarse kaheaahelalise DNA molekuli Theta-replikatsiooni mehhanismil tekkivad vahevormid, juhul kui molekul on lineariseeritud replikatsiooni alguspunkti lähedusest.** Joonisel on näidatud replikatsiooni vahevormide liikumist 2D elektroforeesil. 1n tähistab lineaarseid mittereplitseerunud molekule ning 2n peaaegu täielikult replitseerunud molekule. Sirge joon (joonisel roheline) väljendab lineaarseid mittereplitseeruvaid vahevorme. Unidireksionaalset replikatsiooni väljendab sinine joon, mille molekulidel on Y-struktuur. Bidireksionaalsele replikatsioonile on iseloomulikud topelt Y struktuurid, mida väljendab kollane joon.

Selleks, et teada saada, kas umbes 4 kb pikkune HPV-18 replikon (pUCURR18) ja viirusgenoomiga saranse suurusega 8 kb pikkune replikon (pGEXURR18) replitseeruvad kasutades sarnast mehhanismi, viidi läbi 2D geelelektroforees analüüs. Analüüsi tulemused on kujutatud joonisel 19. Jooniselt on näha, et HPV-18 origini sisaldavale pUCURR18 plasmiidile on iseloomulik theta mudeli unidireksionaalne replikatsioon. pGEXURR18 plasmidi replikatsiooni vahevormid ei vasta theta tüüpi replikatsiooni mudelile ning erineb selgelt pUCURR18 replikatsioonist. Samas on pGEXURR18 replikatsioonil tuvastatavad vahevormid mõnevõrra sarnased HPV-18 genoomi replikatsioonil tuvastatud tundmatute replikatsiooni vahevormidega (Orav et al., 2015).



**Joonis 19. 2D geelelektroforeesil leitavad pUCURR18 ja pGEXURR18 replikatsiooni vahevormid U2OS rakkudes analüüsituna Southern blot meetodil.** Transfekteritud rakkudest Hirt ekstraktsiooniga eraldatud DNA (150µg) lõigati uuritavat replikoni lineariseerivate ensüümidega (pUCURR18 lõigati ensüümiga XbaI ja pGEXURR18 NcoI), separeeriti 2D agarosgeelis ja analüüsiti Southern blot meetodil, nagu kirjeldatud Materjalides ja Meetodites. pUCURR18 joonisel on musta noolega näidatud unidireksionaalsele replikatsioonile iseloomulik joon, mille molekulidel on Y-struktuur. pGEXURR18 joonisel olevad mustad kolmnurgad näitavad veel tundmatuid replikatsiooni vahevorme. Joonisel on märgitud ka 1n ja 2n lineaarsete molekulide asukohad

### 2.3.4 HPV origini sisaldavate plasmiidide replikatsiooni mõjutamine Oct6 valguga

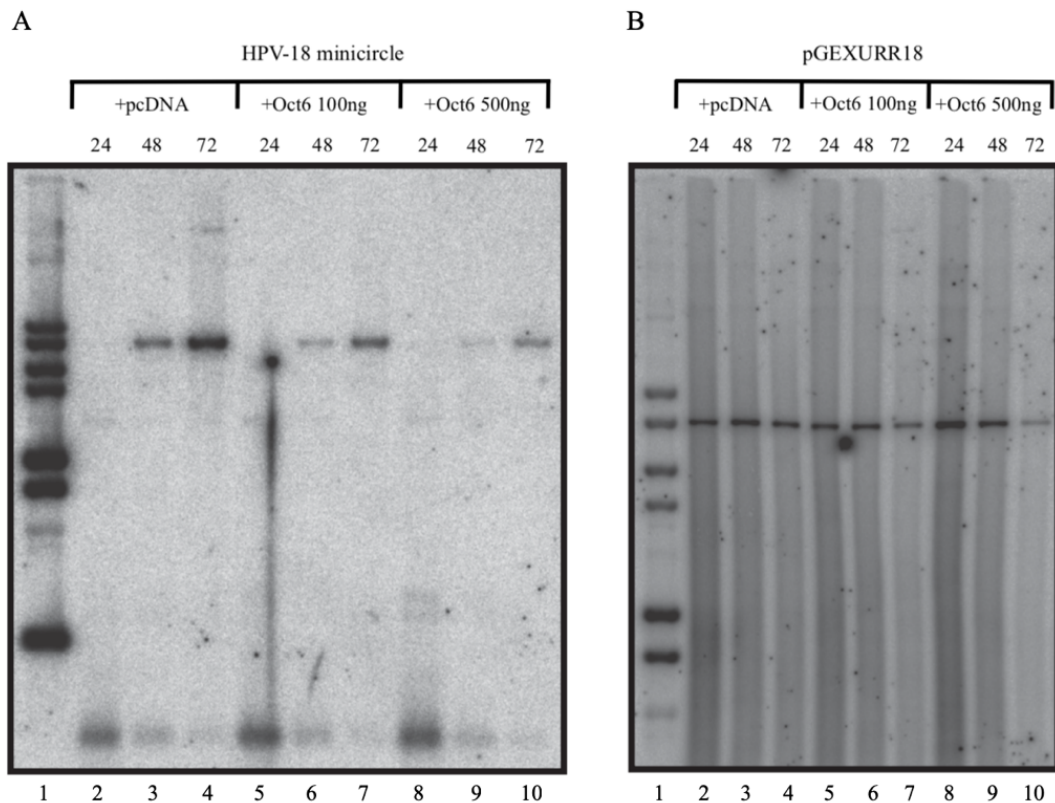
Reaalaja ja tava PCR-i analüüsi tulemustest selgus, et Oct6 ei ekspresseeru U2OS rakuliinis. Selleks, et näha milline on selle faktori mõju pGEXURR18 ja HPV-18 pisirõnga replikatsioonile, kotransfekteeriti Oct6 ekspressioonivektor koos plasmiididega U2OS rakkudesse. pcDNA plasmiid lisati kontrollina. Koostati transfektsiooni skeem (tabel 6) mis teostati ülaltoodud viisil(2.2.3):

**Tabel 6. Transfektsiooni skeem Oct6 mõju HPV-18 ja pGEXURR18 plasmiididele**

Transfekt-sioon	Replikon	Replikatsiooni faktor	Transkriptsiooni faktor	Carrier plasmiid
1.	HPV-18 <i>mc</i> 1µg	-	-	pcDNA 500ng
2.	HPV-18 <i>mc</i> 1µg	-	Oct6 100ng	pcDNA 400ng
3.	HPV-18 <i>mc</i> 1µg	-	Oct6 500ng	-
4.	pGEXURR18 2µg	E1 250ng E2 500ng	-	pcDNA 500ng
5.	pGEXURR18 2µg	E1 250ng E2 500ng	Oct6 100ng	pcDNA 400ng
6.	pGEXURR18 2µg	E1 250ng E2 500ng	Oct6 500ng	-

Jooniselt 20A radadel 2-4 on näha HPV-18 pisirõnga replikatsiooni tase juhul, kui teostati kotransfektatsioon pcDNA3 plasmiidiga. Transfekteerides 100ng Oct6-te koos HPV-18 pisirõngaga on 48t ja 72t möödudes replikatsiooni signaal nõrgem, kui ilma transkriptsioonifaktorita. Isegi suuremat replikatsiooni signaali nõrgenemist on näha 500ng Oct6 lisamisel. Joonisel 20B on näha, et Oct6 ekspressioonivektori mõju pGEXURR18 replikatsioonile ei ole nii suur, kui HPV-18 pisirõnga replikatsioonile. Väikseimas koguses 100ng Oct6-te inhibeerib nõrgalt plasmidi replikatsiooni signaali 72 tundi peale transfektsiooni, kuid 500ng Oct6 lisamisel on selgelt näha, et pGEXURR18 plasmidi replikatsiooni signaal on kõige nõrgem 72t peale transfektsiooni möödumist.

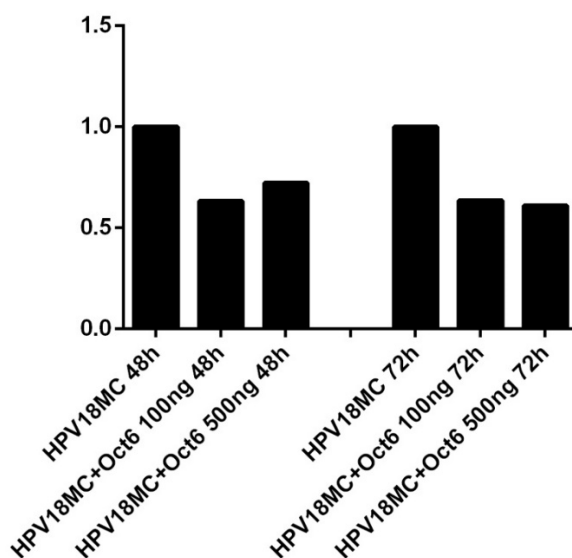
Jooniselt 20 järeldub, et Oct6 mõjub nii HPV-18 pisirõnga kui ka pGEXURR18 plasmidi replikatsioonile inhibeerivalt.



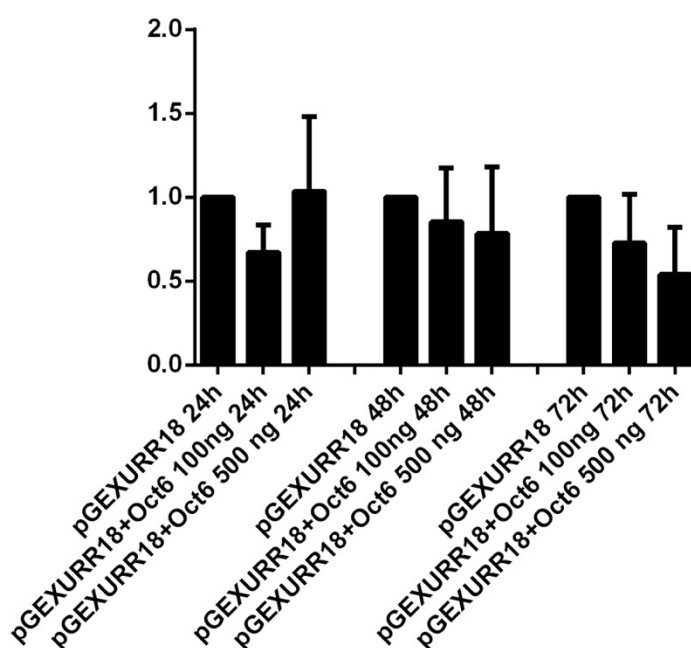
**Joonis 20. Oct6 mõju HPV-18 *minicircle* ja pGEXURR18 replikatsioonile analüüsituna Southern blot analüüsi meetodil.** Totaalne transfecteeritud rakkudest eraldatud DNA (3 $\mu$ g) lõigati uuritavat replikoni lineariseerivate ensüümidega: joonisel A on HPV-18 *mc* plasmidi lineariseeritud ensüümiga BglII ning selleks, et eemaldada sisse viidud replitseerumata viiruse plasmidid kasutati restriksiooniks ka DpnI. Joonisel B on pGEXURR18 lineariseeritud NcoI-ga. Restriksioonid lahutati 0,8% TAE agarosgeelil, kanti üle nailonfiltrile ning hübridiseeriti kasutades P<sup>32</sup> märgitud HPV-18 URR prooviga.

Oct6 mõju ulatus mõlema plasmidi replikatsioonile on illustreerivalt näha graafikutel (joonis 21 ja 22). HPV-18 pisirõnga replikatsiooni signaalid 24 tundi peale transfectsiooni ei olnud detekteeritavad mistõttu need jäeti graafikult välja. On näha, et 72 tundi peale transfectsiooni on 100ng ja 500ng Oct6 lisamisel HPV-18 pisirõnga replikatsioon nõrgem, kui ilma transkriptsioonifaktorita. Samas on 48 tundi peale 500ng Oct6 lisamist replikatsiooni signaal tugevam kui 100ng Oct6 lisamisel. Siit selgub, et Oct6 transkriptsioonifaktori mõju tuvastamiseks HPV-18 pisirõnga replikatsioonile tuleks sooritada lisa korduskatseid.

Jooniselt 22 näha, et pGEXURR18 replikatsiooni tase langeb vastavalt Oct6 kontsentratsioonidele. Nii on 48t ja 72t peale transfectsiooni Oct6 lisamisel pGEXURR18 replikatsioon inhibeeritud. Erinevad on 24 tunni tulemused, kus madalam Oct6 kontsentratsioon inhibeerib replikatsiooni tugevamalt kui kõrgem.



**Joonis 21. Oct6 mõju HPV-18 minicircle plasmiidile.** Joonisel on HPV-18 minicircle kvantiseeritud replikatsioonisignaali. Joonisele ei lisatud 24h ajapunkte, sest replikatsiooni signaal ei olnud detekteeritav. Seetõttu kujutati Oct6 kahe erineva kontsentratsiooni mõju mõlemal ajapunktil pcDNA suhtes.



**Joonis 22. Oct6 mõju pGEXURR18 replikatsioonile.** Joonisel on Oct6 transkriptsioonifaktori keskmine replikatsiooni signaali mõju pGEXURR18 plasmiidile. Veajooned näitavad kolme replikaadi standardhälvet. Kõikide ajapunktide replikatsiooni signaali keskmised väärtused arvutati pcDNA suhtes. Saadud tulemused on kolme sõltumatu katse keskmised.

## 2.4 ARUTELU

### 8 kb suuruse HPV-18 URR-i sisaldava replikoni replikatsiooni mehhanism

Meie laboris tehtud töödest on teada, et HPV-18 *origin* piirkonda sisaldava ~4000bp suuruse pUCURR18 plasmidi ja ~8000bp suuruse HPV-18 piserõnga plasmidi replitseerumise mehhanismid on erinevad (Marko Piirsoo, avaldamata andmed). Kuid pole teada, kas erinevus tuleneb replikoni suurusest, või on oluline E1 ja E2 valgu bilanss, mis on antud konstruktide replitseerumisel erinev, kuna genoomi replikatsioonil kodeerib neid valke viiruse genoom ise. Samas kui pUCURR18 plasmidi replikatsioonil tulevad E1 ja E2 valgud kotransfekteritud ekspressioonivektorilt. Selleks konstrueeriti HPV-18 piserõnga suurune plasmid, mis sisaldab HPV-18 URR piirkonda ning vajab replitseerumiseks U2OS rakuliinis viiruse E1 ja E2 valkude olemasolu. 1D geelelektroforeesi tulemustest selgus, et antud plasmid replitseerus U2OS rakkudes HPV-18 piserõnga plasmidiga võrreldava efektiivsusega. Samas 2D geelelektroforeesi tulemused näitasid, et pUCURR18 replitseerub loodud pGEXURR18 konstrukstist erinevalt, mistõttu ei ole põhjus plasmidiga koos transfekteritavate E1 ja E2 valkude bilansis, vaid replikonide erinevas suuruses. Üheks võimaluseks on, et replikatsiooniks vajalik viirusvalk E1 on suhteliselt vähese protsessiivsusega helikaas ja ei suuda efektiivselt lahti harutada DNA-d, mis on eelduseks *theta* tüüpi replikatsiooni kulgemisel.

### POU faktor Oct-6 mõju HPV replikatsioonile

Kirjandusest on teada, et mõned POU homeodomeen transkriptsioonifaktorid on võimelised mõjutama HPV transkriptsiooni, kuid mõju replikatsioonile pole veel kirjeldatud. Minu tehtud katsete analüüsil selgus, et huvitaval kombel on Oct6 transkriptsioonifaktoril HPV-18 piserõnga plasmidi replikatsioonile tugevam inhibeeriv mõju kui pGEXURR18 konstruktile. Üheks põhjuseks võib olla see, et kuigi mõlemad plasmidid sisaldavad URR piirkonda, võivad POU faktorite seondumiskohad olla ka väljaspool reguloorset URR piirkonda, mis pGEXURR18 konstrukstis puudub. Teisalt võib olla, et kuna replikatsiooniks vajalikud E1 ja E2 valgud transkribeeritakse ekspressioonivektorilt, siis nende ekspressioon on sõltumatu Oct6 olemasolust, samas kui Oct6 inhibeerib transkriptsiooni HPV-18 varaselt promootorilt. Selleks, et neid võimalusi eristada tuleb teha edasisi katseid.

## KOKKUVÕTE

Töö eesmärgiks oli teada saada, miks replitseerub ~4000bp suurune pUCURR18 plasmiid erineva mehhanismiga võrreldes ~8000bp suuruse HPV-18 pisirõnga plasmiidiga. Selleks konstrueeriti HPV-18 pisirõngaga sarnase suuruse ja selle URR piirkonda sisaldav U2OS rakuliinis replitseeruv plasmiid pGEXURR18. Lisaks taheti näha, kas POU transkriptsioonifaktoril Oct6 võib olla mõju nii HPV kui ka pGEXURR18 replikatsioonile.

Reaalaja ja tava PCR-i tulemustest selgus, et valitud POU homeodomeen transkriptsioonifaktoritest ekspresseeruvad U2OS rakuliinis mõningal määral Skn1a, Brn3a, Brn5 ja Oct1, kuid Oct6 ja Brn2 mitte. Kõige kõrgemalt ekspresseeruvad Oct1, Brn5 ja Skn1a. Edasiseks analüüsiks valiti Oct-6, mis ei avaldu U2OS rakkudes, kuid ekspresseerub epiteeli basaalses keratinotsüütides, mis on HPV nakkuse füsioloogilised märklauad. Seega on võimalik töötada ilma endogeense Oct6 avaldumise taustata. Meie tulemustest järeldus, et Oct6 inhibeerib nii HPV-18 pisirõnga kui ka pGEXURR18 replikatsiooni.

Konstrueeritud plasmiid pGEXURR18 replitseerub U2OS rakkudes kuid 2D geelelektroforeesi analüüsi tulemuste põhjal ei vasta plasmidi replikatsiooni vahevormid *theta* tüüpi replikatsioonile, nagu teeb seda pUCURR18 plasmiid, vaid omab veel tundmatut replikatsiooni mehhanismi.

## **Influence of POU transcription factor Oct6 on the replication of HPV-18 URR containing plasmids**

Lisett Liblekas

### Summary

Human papillomaviruses (HPVs) are an ancient group of viruses, that have ~8000 bp double-stranded circular genome. Their genome is maintained in host cells as nuclear extra-chromosomal element that requires two viral proteins (E1 and E2) and a set of cellular proteins for replication. Their life cycle is tightly related to host cell epithelial differentiation, which means they can only infect basal keratinocytes. There are three main stages in their life cycle. Initial transient replication phase, where viral genome is amplified up to 50-100 copies per cell. Secondly, in the maintenance phase, when virus maintains its genome copy number at a constant level and replicates approximately once per cell cycle. The final vegetative replication, where virus amplifies its genome up to ~1000 copies per cell, is carried out only in terminally differentiated keratinocytes. As a result, virus produces infectious virions.

Viruses do not encode many transcription factors, which makes them very reliable of the host cell. POU homeodomain transcription factors, that have extremely specific expression sites, except Oct1, have conserved binding sites in the HPV URR sequences. POU proteins have bipartite DNA binding domain, so they can associate with themselves or with other members of the POU family. Thereby they have very large flexibility in DNA binding. It has been shown, that some factors act as HPV transcription activator, while others as inhibitors.

The main purpose of this work was to generate HPV-18 minicircle size plasmid, that would have HPV-18 URR region and will replicate in U2OS cell line, when E1 and E2 proteins are provided in trans. In addition, to analyze which POU proteins are expressed in U2OS cell line and how Oct6 affects replication of HPV-18 minicircle and pGEXURR18 constructs.

I was able to generate the above-described constructs named pGEXURR18, and it replicates in U2OS cells. Its replication does not proceed via theta mechanism, but via yet unknown replication mechanism(s). The three POU factors, that are present in U2OS cell line are Oct1, Brn5 and Skn1a. Oct6, that plays an important role in controlling gene expression in normal epithelia, including epidemis, inhibits HPV-18 minicircle and pGEXURR18 replication.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Andersen, B., Hariri, A., Pittelkow, M. R., & Rosenfeld, M. G. (1997). Characterization of Skn-1a/i POU domain factors and linkage to papillomavirus gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(25), 15905–15913.
- Becker, K. A., Florin, L., Sapp, C., & Sapp, M. (2003). Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization. *Virology*, *314*(1), 161–167. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00447-1](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00447-1)
- Bergvall, M., Melendy, T., & Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology*, *445*(1–2), 35–56.
- Bernard, B. A., Bailly, C., Lenoir, M. C., Darmon, M., Thierry, F., & Yaniv, M. (1989). The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *Journal of Virology*, *63*(10), 4317–4324.
- Bienkowska-Haba, M., Williams, C., Kim, S. M., Garcea, R. L., & Sapp, M. (2012). Cyclophilins Facilitate Dissociation of the Human Papillomavirus Type 16 Capsid Protein L1 from the L2/DNA Complex following Virus Entry. *Journal of Virology*, *86*(18), 9875–9887.
- Bodily, J., & Laimins, L. A. (2011). Persistence of human papillomavirus infection: Keys to malignant progression. *Trends in Microbiology*, *19*(1), 33–39.
- Buck, C. B., Thompson, C. D., Pang, Y.-Y. S., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2005). Maturation of Papillomavirus Capsids. *Journal of Virology*, *79*(5), 2839–2846.
- Buck, Christopher B., Day, P. M., & Trus, B. L. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, *445*(1–2), 169–174.
- Coding, C. R., & O’Hare, P. (1989). Herpes simplex virus Vmw65-octamer binding protein interaction: A paradigm for combinatorial control of transcription. *Virology*, *173*(2),
- Davy, C., & Doorbar, J. (2007). G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology*, *368*(2), 219–226.
- de Jong, S. J., Imahorn, E., Itin, P., Uitto, J., Orth, G., Jouanguy, E., ... Burger, B. (2018). Epidermodysplasia verruciformis: Inborn errors of immunity to human beta-papillomaviruses. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUN).
- Deng, W., Lin, B. Y., Jin, G., Wheeler, C. G., Ma, T., Harper, J. W., ... Chow, L. T. (2004). Cyclin/CDK Regulates the Nucleocytoplasmic Localization of the Human Papillomavirus E1 DNA Helicase. *Journal of Virology*, *78*(24), 13954–13965.
- DiMaio, D., & Petti, L. M. (2013). The E5 proteins. *Virology*, *445*(1–2), 99–114. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.006>

- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, *30 Suppl 5*, F55-70.
- Everett, R. D. (2006). Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response. *Cellular Microbiology*, *8*(3), 365–374.
- Faus, I., Hsu, H. J., & Fuchs, E. (1994). Oct-6: a regulator of keratinocyte gene expression in stratified squamous epithelia. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(5), 3263–3275.
- Finnen, R. L., Erickson, K. D., Chen, X. S., & Garcea, R. L. (2003). Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. *Journal of Virology*, *77*(8), 4818–4826.
- Florin, L., Schäfer, F., Sotlar, K., Streeck, R. E., & Sapp, M. (2002). Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein 12. *Virology*, *295*(1), 97–107.
- Gautam, D., & Moody, C. A. (2016). Impact of the DNA Damage Response on Human Papillomavirus Chromatin. *PLOS Pathogens*, *12*(6), e1005613.
- Giri, I., & Yaniv, M. (1988). Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *The EMBO Journal*, *7*(9), 2823–2829.
- Harden, M. E., & Munger, K. (2017). Human papillomavirus molecular biology. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, *772*, 3–12.
- Hartwig, S., St Guily, J. L., Dominiak-Felden, G., Alemany, L., & De Sanjosé, S. (2017). Estimation of the overall burden of cancers, precancerous lesions, and genital warts attributable to 9-valent HPV vaccine types in women and men in Europe. *Infectious Agents and Cancer*, *12*(1), 1–10.
- Herr, W., Sturm, R. A., Clerc, R. G., Corcoran, L. M., Baltimore, D., Sharp, P. A., ... Ruvkun, G. (1988). The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. *Genes & Development*, *2*(12 A), 1513–1516.
- Hoffmann, R., Hirt, B., Bechtold, V., Beard, P., & Raj, K. (2006). Different Modes of Human Papillomavirus DNA Replication during Maintenance. *Journal of Virology*, *80*(9), 4431–4439.
- Ilves, I., Kivi, S., & Ustav, M. (1999). Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. *Journal of Virology*, *73*(5), 4404–4412.
- Klumpp, D. J., & Laimins, L. A. (1999). Differentiation-induced changes in promoter usage

- for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology*, 257(1), 239–246.
- Kukimoto, I., Mori, S., Sato, H., Takeuchi, T., & Kanda, T. (2008). Transcription factor human Skn-1a enhances replication of human papillomavirus DNA through the direct binding to two sites near the viral replication origin. *FEBS Journal*, 275(12), 3123–3135.
- Li, L., Barry, P., Yeh, E., Glaser, C., Schnurr, D., & Delwart, E. (2009). Identification of a novel human gammapapillomavirus species. *Journal of General Virology*, 90(10), 2413–2417.
- Malik, V., Zimmer, D., & Jauch, R. (2018). Diversity among POU transcription factors in chromatin recognition and cell fate reprogramming. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(9), 1587–1612.
- Mavian, C., Alejo, A., Labella, A. M., Alcami, A., Castro, D., López-Bueno, A., & Borrego, J. J. (2016). Concurrence of Iridovirus, Polyomavirus, and a Unique Member of a New Group of Fish Papillomaviruses in Lymphocystis Disease-Affected Gilthead Sea Bream. *Journal of Virology*, 90(19), 8768–8779.
- McBride, A. A., Byrne, J. C., & Howley, P. M. (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. *Natl. Acad. Sci. USA*, 86(2), 510–514.
- McBride, Alison A. (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, 445(1–2), 57–59.
- McBride, Alison A. (2017). Oncogenic human papillomaviruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1732).
- McBride, Alison A., & Warburton, A. (2017). The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLOS Pathogens*, 13(4), e1006211.
- McBride, Alison A. (2017). Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biological Chemistry*, 398(8), 919–927.
- McIntosh, P. B., Martin, S. R., Jackson, D. J., Khan, J., Isaacson, E. R., Calder, L., ... Doorbar, J. (2008). Structural Analysis Reveals an Amyloid Form of the Human Papillomavirus Type 16 E1 E4 Protein and Provides a Molecular Basis for Its Accumulation. *Journal of Virology*, 82(16), 8196–8203.
- Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2009). Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS Pathogens*, 5(10).
- Morris, P. J., Theil, T., Ring, C. J. A., Lillycrop, K. A., Moroy, T., & Latchman, D. S. (1994). The Opposite and Antagonistic Effects of the Closely Related POU Family

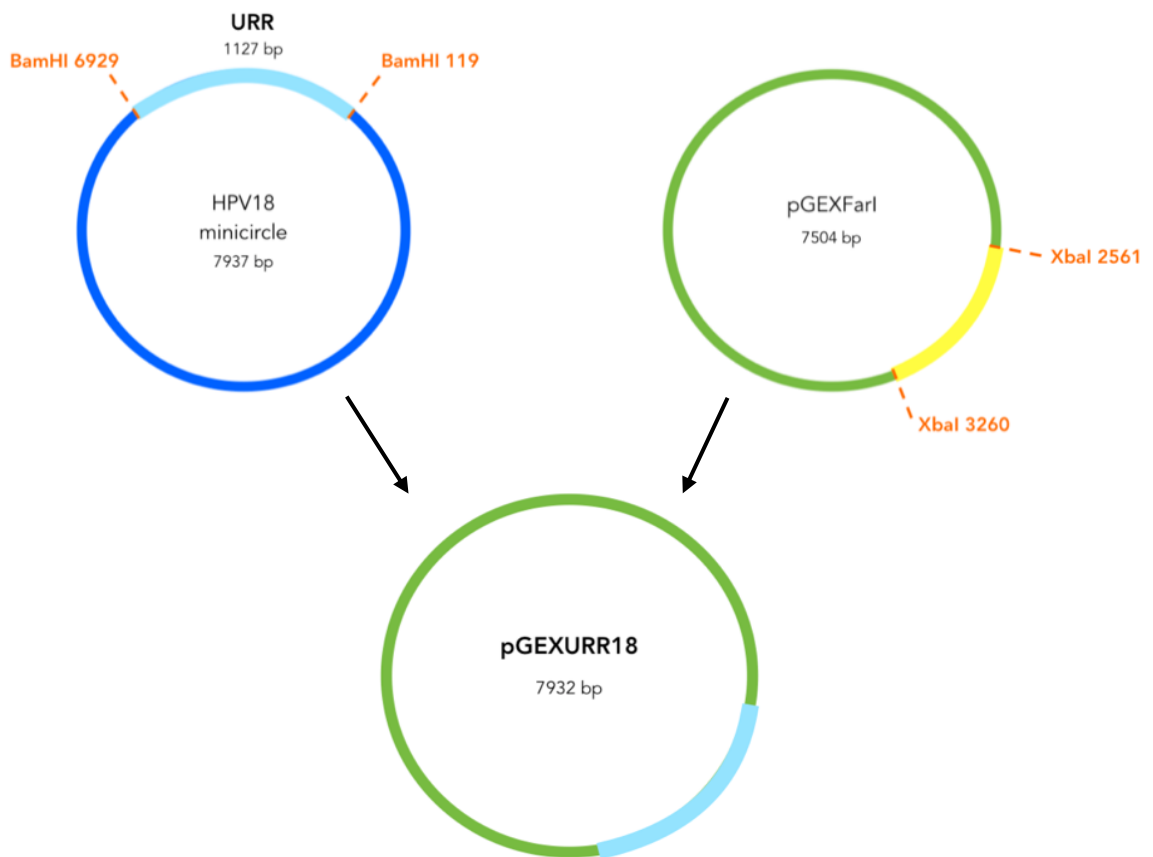
- Transcription Factors Brn-3a and Brn-3b on the Activity of a Target Promoter Are Dependent on Differences in the POU Domain. *Molecular and Cellular Biology*, 14(10), 6907–6914.
- Münger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E., & Howley, P. M. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8, 4099–105.
- Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E & Howley PM (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8, 4099–105.
- Ndisang, D., Faulkes, D. J., Gascoyne, D., Lee, S. A., Ripley, B. J., Sindos, M., ... Latchman, D. S. (2006). Differential regulation of different human papilloma virus variants by the POU family transcription factor Brn-3a. *Oncogene*, 25(1), 51–60.
- Orav, M., Geimanen, J., Sepp, E. M., Henno, L., Ustav, E., & Ustav, M. (2015). Initial amplification of the HPV18 genome proceeds via two distinct replication mechanisms. *Scientific Reports*, 5, 1–16.
- Orth, G., Favre, M., & Croissant, O. (1977). Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *Journal of Virology*, 24(1), 108–120.
- Phelps, W. C., & Howley, P. M. (1987). Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *Journal of Virology*, 61(5), 1630–1638.
- Phillips, K., & Luisi, B. (2000). The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *Journal of Molecular Biology*, 302(5), 1023–1039.
- Piirsoo, M., Ustav, E., Mandel, T., Stenlund, A., & Ustav, M. (1996). Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *The EMBO Journal*, 15(1), 1–11.
- Pouyanfar, S., & Müller, M. (2017). Human papillomavirus first and second generation vaccines—current status and future directions. *Biological Chemistry*, 398(8), 871–889.
- Pyeon, D., Pearce, S. M., Lank, S. M., Ahlquist, P., & Lambert, P. F. (2009). Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathogens*, 5(2).
- Ramoz, N., Rueda, L. A., Bouadjar, B., Montoya, L. S., Orth, G., & Favre, M. (2002). Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nature Genetics*, 32(4), 579–581.
- Ravnan, J. B., Gilbert, D. M., Ten Hagen, K. G., & Cohen, S. N. (1992). Random-choice replication of extrachromosomal bovine papillomavirus (BPV) molecules in heterogeneous, clonally derived BPV-infected cell lines. *J Virol*, 66(12), 6946–6952.
- Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. (2006). Cleavage of the

- papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(5), 1522–1527.
- Roman, A., & Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, *445*(1–2), 138–168.
- Ryan, A. K., & Rosenfeld, M. G. (1997). POU domain family values: Flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes and Development*, *11*(10), 1207–1225.
- Sakakibara, N., Chen, D., & McBride, A. A. (2013). Papillomaviruses Use Recombination-Dependent Replication to Vegetatively Amplify Their Genomes in Differentiated Cells. *PLoS Pathogens*, *9*(7), e1003321.
- Sarafi, T. R., & McBride, A. A. (1995). Domains of the BPV-E1 Replication Protein Required for Origin-Specific DNA Binding and Interaction with the E2 transactivator. *Virology*, *211*, 385–396.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., & Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, *75*(3), 495–505.
- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., & Zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, *314*(6006), 111–114.
- Sibbet, G. J., Cuthill, S., & Campo, M. S. (1995). The enhancer in the long control region of human papillomavirus type 16 is up-regulated by {PEF-1} and down-regulated by Oct-1. *Journal of Virology*, *69*(7), 4006–4011. Retrieved from
- Songock, W. K., Kim, S. man, & Bodily, J. M. (2017). The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. *Virus Research*, *231*, 56–75.
- Stepp, W. H., Meyers, J. M., & McBride, A. A. (2013). Sp100 Provides Intrinsic Immunity against Human Papillomavirus Infection. *MBio*, *4*(6), 1–13.
- Sturm, R. A., & Herr, W. (1988). The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. *Nature*, *336*, 601–604.
- Sun, Y., McCance, D. J., & Han, H. (1998). Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication. *Journal of General Virology*, *79*(7), 1651–1658.
- Van Leeuwen, H. C., Rensen, M., & Van Der Vliet, P. C. (1997). The Oct-1 POU homeodomain stabilizes the adenovirus preinitiation complex via a direct interaction with the priming protein and is displaced when the replication fork passes. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(6), 3398–3405.
- Vande Pol, S. B., & Klingelutz, A. J. (2013). Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, *445*(1–2), 115–137. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.026>

- Wang, J. W., & Roden, R. B. S. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445(1–2), 175–186.
- Wang, Q., Griffin, H., Southern, S., Jackson, D., Martin, A., McIntosh, P., ... Doorbar, J. (2003). Functional Analysis of the Human Papillomavirus Type 16 E1 E4 Protein Provides a Mechanism for In Vivo and In Vitro Keratin Filament Reorganization. *Journal of Virology*, 78(2), 821–833.

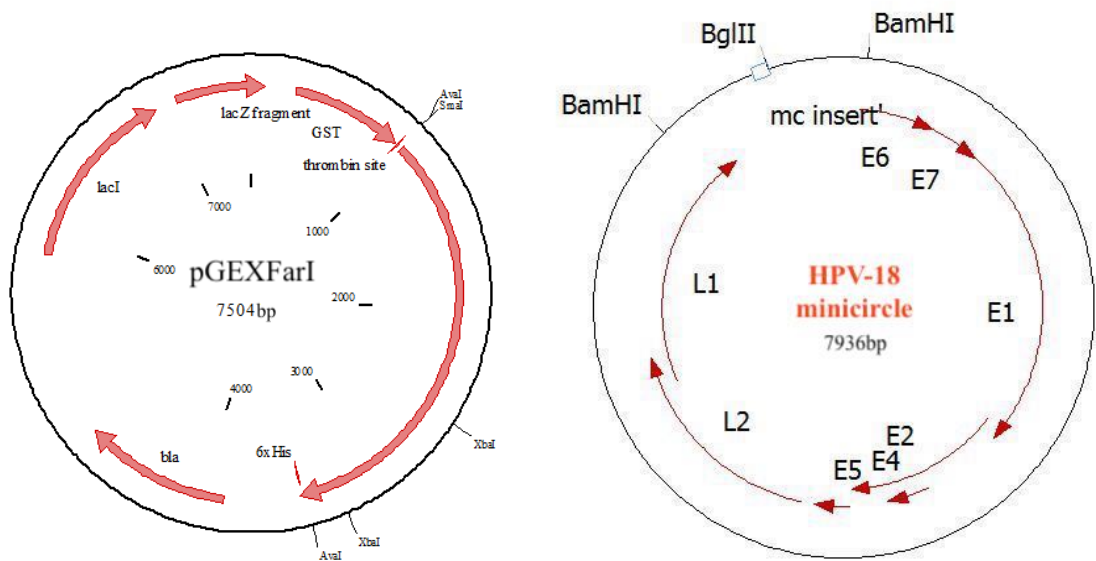
LISAD

LISA 1



Joonis 29. pGEXURR18 konstrukti kloneerimisskeem.

LISA 2



Joonis 23. pGEXFarI ja HPV-18 minicircle plasmidikaart

## LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lisett Liblekas

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose **POU transkriptsioonifaktor Oct6 mõju HPV-18 URR-i sisaldavate plasmiidide replikatsioonile**, mille juhendaja on Marko Piirsoo, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Lisett Liblekas*

*27.05.2019*