

TARTU ÜLIKOOL
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MIKROBIOLOOGIA JA VIROLOOGIA ÕPPETOOL

Jelizaveta Geimanen

**Hübriidset origini sisaldavate episomaalselt
replitseeruvate vektorsüsteemide testimine koekultuuri
tingimustes**

Magistritöö

Juhendaja: Ene Ustav, PhD.

TARTU
2004

SISUKORD

SISUKORD	2
SISSEJUHATUS	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
TEOREETILINE OSA	8
1. PAPILLOOMIVIIRUSED.....	8
1.1. Üldiseloomustus.....	8
1.2. Virioni struktuur.....	8
1.3. Papilloomiviiruse genoom	9
1.4. DNA replikatsiooni staadiumid.....	10
1.4.1. Viiruse DNA replikatsiooniks vajalikud trans - faktorid.....	10
1.4.2. Replikatsiooniks vajalikud cis – elemendid.....	12
1.5. BPV11 E2 valgu seondumine kromatiiniga	13
2. POLÜOOMIVIIRUSED.....	16
2.1. Üldiseloomustus.....	16
2.2. Polüoomiviiruste genoom	16
2.3. Polüoomiviiruse DNA replikatsioon.....	18
3. EPSTEIN-BARR'i VIIRUS.....	21
3.1. Üldiseloomustus.....	21
3.2. Virioni struktuur.....	21
3.3. Epstein-Barr'i viiruse genoom	22
3.5. Epstein-Barr'i viiruse DNA replikatsiooniks ja säilimiseks vajalikud faktorid	23
4. EPISOMAALSED HÜBRIIDSED VIIRUSVEKTORID	27
4.1. Veise papilloomiviirusel baseeruvad heteroloogsed vektorid	27
4.2. Epstein-Barr'i viirus kui geeniekspressiooni süsteem.....	27
4.3. Polüoomiviiruse kasutamine geeniekspressiooni süsteemides.....	28
4.4. Episomaalsed hübriidsed vektorid	28
EKSPERIMENTAALNE OSA	29
TÖÖ EESMÄRGID	29
MATERJAL JA METOODIKA	30
TULEMUSED JA ARUTELU	39
Hübriidsete originiplasmiidide edasine täiustamine ja optimeerimine.....	40
Hübriidsete originiplasmiidide transientse replikatsioonivõime testimine hiire rakkudes.....	44
Hübriidsete originiplasmiidide stabiilse replikatsioonivõime testimine	46
Transfekteeritud rakkude analüüs FACS-il (läbivoolu tsütomeetria analüüs)	46
Episomaalses olekus säilumise testimine	49
Plasmiidide kadumise kineetika	52
JÄRELDUSED	54
KOKKUVÕTE	57
SUMMARY	58
KASUTATUD KIRJANDUS	59
LISAD	65

SISSEJUHATUS

Polüoomi-, papilloomi- ja Epstein-Barr'i viirused on väikesed DNA viirused, mis on looduses väga laialt levinud. Papilloomiviiruse ja Epstein-Barr'i viiruse genoom ei integreeru üldjuhul peremehe kromosoomi, aga sellest hoolimata säilivad nad episomaalsete molekulidena rakkude jagunemise jooksul viiruse elutsükli latentsses faasis. Need viirused replitseeruvad kui ekstrakromosomaalsed plasmiidid, seostudes raku kromosoomidega viiruseliste erivalkude abil, kasutades selleks spetsiifilisi seondumise kohti viiruse genoomis.

Polüoomiviirused teadaolevalt sellist tütarrakkudesse edasikandumise mehhanismi ei oma. Seetõttu hiire polüoomiviiruse (PyV) amplifikatsioonil põhinev vektorsüsteem koos PyV suure-T antigeeniga (LT) on kiireks ja efektiivseks võimaluseks võõr-DNA ekspressiooniks rakus, kuid samas puudub tal säilimisfunktsioon. Polüoomiviiruse origini koostisesse kuuluv enhaanser sisaldab endas viiruse valgu LT seondumiskohti, mida võib asendada teiste erinevate viiruste võimendusjärjestustega nagu näiteks Epstein-Barr'i viiruse EBNA-1-le vastav FR-element, papilloomiviiruse E2-le vastav MME-element ja Kaposi sarkoomi viiruse LANA seondumiskohtadega element. Lähtudes sellest on tekkinud mõte konstrueerida kimäärne vektorsüsteem, vahetades omavahel viiruste sarnaste funktsioonide eest vastutavaid komponente ning uurida selliste hübriidsete vektorsüsteemide käitumist.

Käesoleva töö teoreetiline osa annab ülevaate veise papilloomiviiruse tüüp 1-st, hiire polüoomiviirusest ja Epstein-Barr'i viirusest ning kirjeldab nende viiruste DNA replikatsiooni. Töö eksperimentaalne osa seisneb hiire polüoomiviiruse replikoni ja BPV1 E2 valgu või EBV EBNA-1 valgu seostumiskohti sisaldavate plasmiidide konstrueerimises ja nende vektorite stabiilse replikatsioonivõime testimises koekultuuri tingimustes. Antud töös testitavad plasmiidid sisaldavad fluorestseeruva valgu ekspressioonikasseti ja sellist neomütsiini markergeeni konfiguratsiooni, mis tagab bakterirakkudes kanamütsiini resistentsuse ning eukarüoodi rakkudes neomütsiini resistentsuse (ehk G418). Stabiilseks säilimiseks on BPV1 E2 või EBV EBNA-1 seostumiskohad seotud PyV minimaalse originiga moodustades hübriidse origini. Konstrueeritud plasmiidid annavad võimaluse uurida rakkudes stabiilse säilimise mehhanisme vastavate viiruseliste valkude juuresolekul. Sellised plasmiidid peaksid olema efektiivseks süsteemiks eksogeensete geenide ülekandmiseks eukarüootsetesse rakkudesse.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi viroloogia ja mikrobioloogia õppetooli juures. Juhendamise, õpetuste, nõuannete ja toetuse eest olen väga tänulik Ene Ustavile ja Mart Ustavile. Kasulike nõuannete ja igakülgse abi eest tänan kogu mikrobioloogia ja viroloogia õppetooli inimesi.

KASUTATUD LÜHENDID

- AP1** – aktivaatorvalk 1 (*activator protein 1*)
- Aux** - replikatsiooni abijärjestus (*auxiliary sequences*)
- bp** - aluspaari (*base pair(s)*)
- BPV1** - veise papilloomiviirus tüüp 1 (*Bovine Papillomavirus Type 1*)
- BS** - seondumis koht (*binding site*)
- BSA** - veise seerum albumiin (*bovine serum albumin*)
- C** – karboksü- (*carboxy-*)
- CIAP** - vasika soole aluseline fosfataas (*calf intestine alkaline phosphatase*)
- CMV** - tsütomegaloviirus (*Cytomegalovirus*)
- CRPV** - küüliku papilloomiviirus (*cottontail rabbit papillomavirus*)
- d1EGFP** – destabiliseeritud roheliselt fluorestseeruv valk, mille poolestusaeg on 1 tund
- DPV** - põdra papilloomiviirus (*deer papillomavirus*)
- DS** - *Dyad symmetry* element
- DUE** – DNA lahtiharutamise element (*DNA unwinding element*)
- E** – varane (*early*)
- E1BS** – valgu E1 seostumiskoht (*E1 binding site*)
- E2BS** - valgu E2 seostumiskoht (*E2 binding site*)
- E2TA** –E2 transkriptsiooni transaktivaator
- E2TR** - E2 transkriptsiooni repressor
- EBER** – Epstein-Barr'i viiruse poolt kodeeritud RNAd (*Epstein-Barr virus encoded RNAs*)
- EBNA** - Epstein-Barr'i viiruse tuumaantigeen (*Epstein-Barr virus nuclear antigen*)
- EBP-2** – EBNA-1-ga seonduv valk-2 (*EBNA-1 binding protein 2*)
- EBV** - Epstein-Barr'i viirus (*Epstein-Barr virus*)
- EDTA** - etüleendiamiintetraat (*ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EGFP** – võimendatud roheliselt fluorestseeruv valk (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)
- FACS** – fluorestsentsaktiveeritud rakusorteeriija (*Fluorescence activated cell sorter*)
- FR** - *Family of repeats*
- G418** - antibiootikum genetitsiin
- gp** - glükoproteiin
- HaPV** – hamstri polüoomiviirus (*hamster polyomavirus*)
- HPV** - inimese papilloomiviirus (*human papillomavirus*)

IgG - immuunoglobuliin G
IM - infektsioosne mononukleos
IMDM - *Iscove`s modified Dulbecco`s medium*
IR - *Inverted repeat*
kb - tuhat aluspaari (*kilobases*)
L – hiline (*late*)
LB - Luria-Bertani sööde
LCR – pikk kontrollpiirkond (*long control region*)
LMP – latentse faasi membraanivalk (*latent membrane protein*)
LT - suur T antigeen (*large T antigen*)
MCS - polülinter (*Multiple Cloning Sites*)
MLV - hiire leukeemia viirus (*Murine leukemia virus*)
MME - minikromosoomi säilituselement (*Minichromosome Maintenance Element*)
MO - minimaalne replikatsiooni alguspunkt (*core origin*)
MT - keskmine T antigeen (*middle T antigene*)
N - amino-
NCOR – replikatsiooni negatiivse kontrolli element (*Negative Control Element of Replication*)
NLS - tuuma lokalisatsiooni signaal (*nuclear localization signal*)
ORE – origini äratundmise element (*origin recognition element*)
ORF - avatud lugemisraam (*open reading frame*)
ORI - replikatsiooni alguspunkt (*origin*)
oriLyt - lüütilise faasi replikatsiooni alguspunkt
oriP - latentse replikatsiooni alguspunkt
PBS - fosfaat puhverdatud soolalahus (*phosphate- buffered saline*)
PCNA – jagunevate rakkude tuuma antigeen (*proliferating cell nuclear antigen*)
PEA1 – polüoomiviiruse enhaanser A-ga seonduv valk 1 (*polyomavirus enhancer A binding protein 1*)
PMS-1 – plasmidi säilimise järjestus (*Plasmid Maintenance Sequence*)
PP2A – proteiinfosfataas 2A (*protein phosphatase 2A*)
PyV - hiire polüoomiviirus (*murine polyoma virus*)
RFC - replikatsioonifaktor C (*Replication factor C*)
RKV – küüliku polüoomiviirus (*rabbit polyoma virus*)
RPA - replikatsioonivalk A (*replication protein A*)
rpm – pööret minutis (*revolutions per minute*)

SDS - naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecyl sulphate*)
SSC - naatriumkloriidi ja naatriumtsitraadi lahus (*sodium chloride/sodium citrate buffer*)
ST - väike T antigeen (*small T antigen*)
SV40 - reesusmakaagi viirus tüüp 40 (*Simian Virus 40*)
TAE - Tris- atsetaat puhver (*Tris-acetate/EDTA electroforesis buffer*)
Tag - valgu epitoop
TE - Tris-EDTA puhver (*Tris-EDTA buffer*)
TMV – tubaka mosaiigiviirus (*Tobacco mosaic virus*)
TR - terminaalne kordusjärjestus (*terminal repeat*)
Tris - trishüdroksümetüülaminmetaan
U – unikaalne ala (*unique region*)
URR - ülemine regulaatorpiirkond (*Upstream Regulatory Region*)
wt – metsiktüüp (*wild type*)
ZEBRA – Epstein-Barr'i viiruse replikatsiooni aktivaator Z (*Z Epstein-Barr virus replication activator*)

TEOREETILINE OSA

1. PAPILLOOMIVIIRUSED

1.1. Üldisloomustus

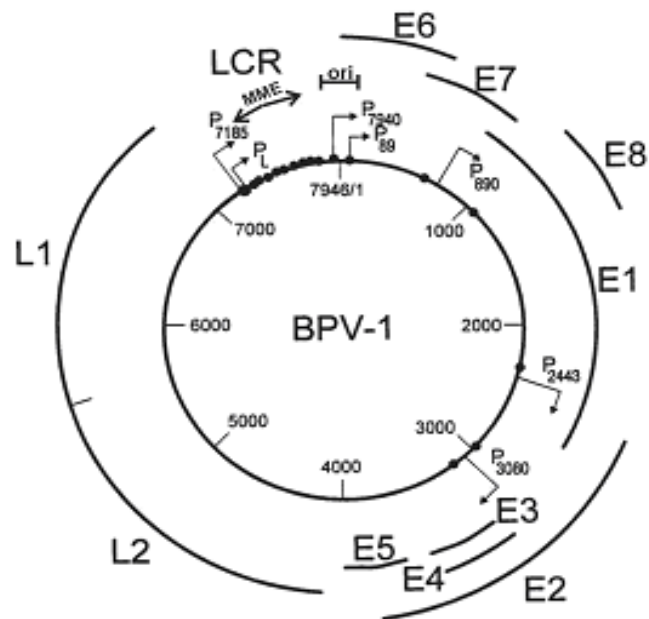
Papilloomiviirused on looduses väga laialt levinud, neid on leitud paljudel kõrgematel selgroogsetel. Papilloomiviirused esinevad pea kõikidel loomadest ja lindudel, eriti palju subtüüpe on kirjeldatud inimesel (Knipe, D. M. ja Howley, P., 2001). Papilloomiviiruste nimetused tulenevad nende peremeeste ingliskeelsetest nimetustest: Bovine – BPV1 – veiste papilloomiviirus, Cottontail rabbit – CRPV – küüliku papilloomiviirus, Deer – DPV – põdra papilloomiviirus, Human – HPV – inimese papilloomiviirus. Veiste papilloomiviirusi on teada kuus erinevat subtüüpi (järjestushomoloogia alusel), inimese papilloomiviirusi on üle 100. Nende hulgas on madala (HPV6, HPV11) ja kõrge riskiga papilloomiviirused (HPV16, HPV18) vastavaid nende võimele põhjustada hea- või pahaloomulisi papilloome. Sama liigi eri subtüübid on nummerdatud avastamise järjekorras (näiteks: BPV1, BPV2, BPV3, jne). Üldiselt on papilloomiviirused tugevalt liigispetsiifilised ja ei ole näiteid, et ühele liigile omane papilloomiviirus nakataks teist liiki (Knipe, D. M. ja Howley, P., 2001; Flores *et al.*, 1997).

1.2. Virioni struktuur

Papilloomiviirused on väikesed (52-55 nm diameetriga), ümbriseta, ikosaeedrilise sümmeetriaga DNA viirused. Viirusosakesed valmivad vaid kõrgelt diferentseerunud epiteelirakkudes. Kapsiid koosneb 72 kapsomeerist (60 heksameeri ja 12 pentameeri). Peamine kapsiidivalk L1 on umbes 55 000 daltonit ja moodustab umbes 80% kogu viiruse kapsiidivalkudest. Minoorne valk L2 on umbes 70 000 daltonit. Need kaks valku ekspresseeritakse hilistelt promotoritelt.

1.3. Papilloomiviiruse genoom

Papilloomiviiruse genoom on kaheaahelaline superspiraliseeritud ja kovalentselt suletud DNA rõngasmolekul (tsirkulaarne DNA), pikkusega umbes 8 kb. Genoomne ülesehitus on kõikidel papilloomiviirustel suhteliselt sarnane. Papilloomiviiruste genoomi ahelatest on kodeeriv ainult üks, mis tähendab, et kõik geenid ekspresseeritakse samalt ahelalt. BPV1 genoom sisaldab 10-t avatud lugemisraami ehk ORF-i, mis on klassifitseeritud kui varased (8 varase regiooni lugemisraami E1- E8) või hilised ORF-id (L1 ja L2) (joonis 1).



Joonis 1. BPV1 genoom. Näidatud varased (E1-E8) ning hilised (L1 ja L2) lugemisraamid. Nooled kujutavad promotoreid. Näidatud on mittekodeeriv ala LCR. E2 seostumiskohad on tähistatud mustade ringidega. Samuti on näidatud replikatsiooni ORI (ori) ja säilumiseks vajalik MME – element (Knipe, D. M. ja Howley, P., 2001).

E1 on viiruselise DNA replikatsioonivalk, millel on mitmeid erinevaid aktiivsusi nagu helikaasne, ATP-aasne aktiivsus, DNA-d siduv võime jne; E2 on viiruseline modulaatorivalk: on nii aktivaatoriks kui repressoriks transkriptsioonil, on replikatsioonivalk jne. E4 ja E3 ORF-id kattuvad teineteisega ja E2-ga. E4 ekspresseerub koos teiste hiliste valkudega diferentseerunud rakkudes ja on tõenäoliselt vajalik epiteelirakkude tsütoskeleti lagundamiseks. E5, E6, E7 on peremeesraku transformatsiooniga seotud viirusevalgud ning L1 ja L2 on hilised struktuursed valgud. L ORF-idelt ekspresseeruvad valgud ainult diferentseerunud rakkudes. Erinevate

papilloomiviiruste genoomide primaarses järjestuses on võimalik leida homoloogseid konserveerunud alasid, ka on erinevatel viiruste subtüüpidel konserveerunud genoomne organisatsioon. Kõikide papilloomiviiruste genoomides on varase ja hilise regiooni vahel mittekodeeriv ala (LCR ehk URR), mis on umbes 1 kb pikkune. Selle ala suurus võib varieeruda erinevate papilloomiviiruste genoomides. Mittekodeerivas alas paiknevad replikatsiooni alguspunkt (*ori*) ja mitmed transkriptsiooni ja replikatsiooni kontrolljärjestused (Knipe, D. M. ja Howley, P., 2001).

1.4. DNA replikatsiooni staadiumid

Papilloomiviiruse elutsükkel võib eristada kolme viiruse DNA replikatsiooni staadiumi. Viirus siseneb epiteelkoe basaalkudedesse (näiteks vigastuste korral) retseptorvahendatud endotsütoosi teel. Pärast sisenemist raku toimub viiruse lahtipakkimine ja viiruse genoomse DNA liikumine raku tuuma. Rakutsükli jõudmisel S-faasi toimub viiruse genoomi algne amplifikatsiooniline replikatsioon, kus selle arv tõuseb 50-100 koopiani ühe peremeesraku kohta. Seejärel toimub üleminek kontrollitud ehk stabiilsele replikatsioonile, kus koopiaarv raku kohta jääb muutumatuks, st. viiruse genoom paljuneb enam-vähem sünkroonselt rakulise genoomiga. Viiruse genoom püsib latentsena nakatunud raku tuumas kuid või isegi aastaid. Kolmas staadium on viiruse genoomi vegetatiivne replikatsioon, mis on vajalik viiruse paljunemiseks. See staadium algab, kui nakatunud rakud jõuavad naha normaalse arengu käigus pealmistesse epiteelikihtidesse ja on saavutanud kõrge diferentseerumisastme. Selles staadiumis toimub jälle kontrollimatu replikatsioon, suureneb ka L1 ja L2 geenide ekspressioon ja valmivad virionid. Viiruse elutsükli seisukohast on oluline, et ei toimuks viiruse genoomi integratsiooni peremeesraku kromosoomi. Vastasel juhul kaasneb enamasti healoomuliste kasvajate teke nakatunud rakkudest (soolatüükad, kondüloomid).

1.4.1. Viiruse DNA replikatsiooniks vajalikud *trans* - faktorid

Papilloomiviiruste DNA replikatsiooniprotsessi uuringutes on peamiseks mudeliks olnud veise papilloomiviiruse tüüp 1 (BPV1). Ainult kaks viiruselist valku – E1 ja E2 - on vajalikud selleks protsessiks, kõik teised hädavajalikud komponendid saadakse peremeesraku replikatsioonikompleksist (Ilves, I *et al.*, 1999). BPV1

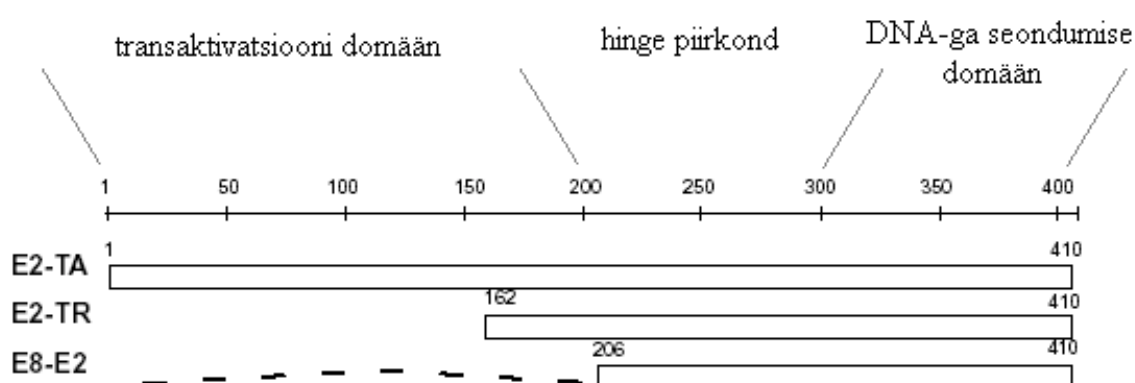
deletsioonimutandid E1 ORF-i osas on defektsed plasmiidi replikatsioonil (Groff, D. E. ja Lancaster, D., 1986; Rabson, M. F. *et al.*, 1986; Ustav, M ja Stenlund, A., 1991). Need andmed tõestavad, et täispikk E1 geeni produkt on vajalik replikatsioonifaktor. Täispikka E1 geeni produkti on leitud BPV1-transformeeritud näriliste rakkudes ja see on 68 kuni 72 kDa suurune. E1 on tuumavalk, fosforüleeritud oma N- ja C- otstest. Ta on DNA-sõltuv ATPaasne DNA helikaas (Titolo, S. *et al.*, 1999), mis omab spetsiifilist ja mittespetsiifilist DNA-ga seondumise aktiivsust. DNA-le seondub ta astmeliselt heksameerse topeltkompleksina origini ümber. BPV1 E1 valk kuulub viiruseliste replikatsiooni initsiaatorvalkude hulka, mille uurituim esindaja on SV40 suur T-antigeen, millega E1-l on teatud sarnasus (Lambert, P. F. 1991).

Papilloomiviiruste E2 valk reguleerib viiruste transkriptsiooni ja replikatsiooni ja seepärast on ta väga oluline viiruse elutsükklis. BPV1 E2 ORF kodeerib kolme valku. Täispikk geeni produkt on 48 kDa suurune. BPV1 täispikk E2 on transkriptsiooni transaktivaator (E2TA). E2TA koosneb kolmest domäänist: N-terminuses on transkriptsiooni ja replikatsiooni aktivatsiooni domään (järjestused 1-192); C-terminus on oluline DNA-le seondumiseks ja dimeriseerumiseks (järjestused 310-410); nende vahel asub *hinge* regioon (järjestused 192-310) (joonis 2) (McBride, A. *et al.*, 1989; Allikas, A. *et al.*, 2001). E2TA aktiveerib transkriptsiooni mõningatelt viiruse promootoritelt, seostudes seal paiknevatele E2-seondumiskohtadele. Need E2 seostumiskohad asuvad enhaanser-elementide piirkonnas LCR-is (O'Connor, M. *et al.*, 1995). BPV1 kodeerib ka kahte lühikest valgu E2 vormi, mis toimivad kui repressorvalgud, need on E2C (30 kDa) ja E8/E2 (28 kDa) (joonis 2) (Hubbert, N. L. *et al.*, 1988). E2 repressorvormid, omades DNA seondumise domääni, takistavad transkriptsiooni, seostudes ise vastavate E2 seostumissaitidega ja blokeerides sellega täispika valgu seostumise või moodustades heterodimeere E2 transaktivaatoriga. E2TA seostub DNA-le üldjuhul kui homodimeer (Bernard, B. A. *et al.*, 1989; Bouvard, V. *et al.*, 1995; Romanczuk, H. *et al.*, 1990).

Viiruse DNA replikatsioon nõuab täispikka E2 transaktivaatorit, E1 valku ja replikatsiooni origini sisaldavat DNA ahela ala. Replikatsiooni origin koosneb E1 seondumissaidist ümbritsetuna mõlemast küljest E2 seondumissaitidega. BPV1 E1 valk omab ori-spetsiifilist DNA-ga seostumisvõimet, DNA-sõltuvat ATPaasset aktiivsust ja DNA helikaasset aktiivsust ning moodustab kompleksi E2 transaktivaatoriga (Sedman J. ja Stenlund, A., 1995; Sedman, J. ja Stenlund, A., 1998). E2 mängib replikatsioonis arvatavasti abistavat rolli ning võimendab ja reguleerib E1 valgu funktsioone (Sedman, J. *et al.*, 1996).

Plasmiidid, mis sisaldavad minimaalset BPV1 replikatsiooni origini, võivad lühiajaliselt replitseeruda rakkudes, mis ekspresseerivad E1 ja E2 valke, aga aja jooksul kaob replitseerunud DNA ära. Pikaajaline, stabiilne säilimine sellistele plasmiididele saavutatakse täiendavate E2 seondumissaitide lisamisega minimaalsele originile E1 ja E2 valgu juuresolekul (Piiroo, M. *et al.*, 1996). Plasmiidse DNA seostumine mitootilise kromatiiniga toimub minikromosoomi säilituselemendi (MME) vahendusel ning E2 valgu juuresolekul ja seeläbi tagatakse plasmiidi jõudmine tütarrakkudesse.

Papilloomiviiruse E2 valk võtab osa ka viiruse genoomi virioni pakkimisest. E2 valk omab seega mitut funktsiooni ja on oluline viiruse elutsükli erinevates etappides.

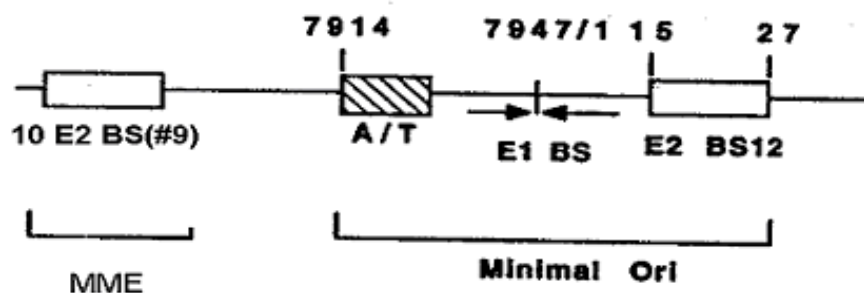


Joonis 2. E2 ja tema repressorvormid ning valgu domäänide asetus (McBride, A. ja Myers, G. 1997).

1.4.2. Replikatsiooniks vajalikud *cis* – elemendid

Papilloomiviiruste replikatsiooni alguspunkt asub mittekodeerivas regioonis (URR) ülalpool varaseid lugemisraame (Auborn, K. J. *et al.*, 1994). Replikatsiooni initsiatsioon toimub 48-52-nukleotiidiliselt järjestuselt, mis sisaldab E1 valgu seostumiskohta (E1BS), E2 valgu seostumiskohta (E2BS) ja A/T-rikast järjestust, mis on vajalik DNA ahelate lahtisulatamise hõlbustamiseks replikatsiooni initsiatsioonifaasis. See on minimaalne ori (MO) (Ustav, E. *et al.*, 1993; Piiroo, M. *et al.*, 1996). Stabiilseks ekstrakromosomaalseks replikatsiooniks on vaja veel nn. minikromosoomide säilimisjärjestust (Minichromosome Maintenance Element - MME), mis koosneb vähemalt kuuest E2 valgu seostumiskohast. Erinevate papilloomiviiruste URR järjestused sisaldavad erineva arvu E2 seondumissaite. BPV1 mittekodeerivas alas sisaldub 12 E2 seondumissaiti, mis koos moodustavad minikromosoomide

säilimisjärjestuse (Ilves, I. *et al.*, 1999; Ustav, E. *et al.*, 1993; Skiadopoulos, M. ja McBride, A. *et al.*, 1998). MME-s asuvatele E2 seondumissaitidele kinnitub viiruseline E2 valk (dimeerinena), vahendades viiruse genoomi seondumist peremeesraku kromatiinile (Ilves, I. *et al.*, 1999). Kromatiinile seondumine omakorda tagab viirusgenoomide püsijäämise tuumas ja nende võrdse jagunemise tütarakkude vahel mitoosis. Allpool on skeemina esitatud BPV1 minimaalne origin ja MME-na töötav kunstlikult loodud element, mis koosneb 10-st E2BS-st (joonis 3):



Joonis 3. BPV1 *origin* skemaatiliselt. Tühjad ristkülikud kujutavad E2 valgu seondumiskohti, nooled tähistavad E1 valgu seondumiskohti; viirutatud ristkülik kujutab A/T -rikast järjestust (Ustav, E. *et al.*, 1993).

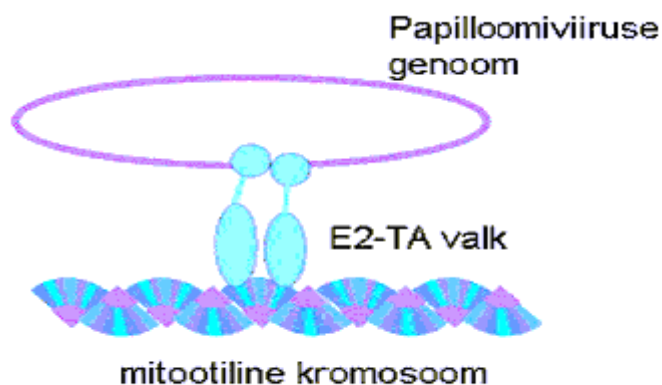
Algselt loeti plasmidi stabiilsuse eest vastutavateks *cis*-järjestusteks ka nn. PMS1 (Plasmid Maintenance Sequence) (Lusky, M. ja Botchan, M., 1984) ning NCOR1-elemente (Negative Control Element of Replication) (Roberts, J. M. ja Weintraub, H. 1986 (1)). Nende järjestuste deleteerimine hilisemates uuringutes ei mõjutanud aga pikaajalist replikatsiooni. Seega PMS1 ja NCOR1 ei ole stabiilsel säilimisel olulised (Päärsoo, M. *et al.*, 1996; Schwartzman, J. B. *et al.*, 1990).

1.5. BPV11 E2 valgu seondumine kromatiiniga

Viiruse DNA võime säilida jagunevates peremeesrakkudes sõltub edukast segregatsioonist mitoosifaasis. Hiljutised uurimised näitasid, et need funktsioonid on tagatud viiruse genoomi mittekovalentse seondumisega kromosoomidele (Abroi, A. *et al.*, 2004).

Paljud uuringud näitasid, et viiruseline replikatsioonifaktor E2 on parim kandidaat nõutavaks adapteriks kromatiinile seondumisel (joonis 4). Lehman ja Botchan oletasid, et lisaks E2-le osaleb viiruse genoomi seostumisel kromosoomidele viiruseline

valk E1. Kuid tegelikkus on näidanud, et BPV1 URR-i sisaldavate plasmiidide korral võib E2 valk olla piisav kromatiinile seondumise tagamiseks. On võimalik, et E1, nagu ka mingid teised viiruselised valgud aitavad kas otseselt või kaudselt kaasa E2 valgu tööprotsessile, kuid E2 valk ise on peamine viiruseline faktor selles protsessis.



Joonis 4. Mudel genoomi segregatsiooniks. BPV1 E2 transaktivaatorvalk on vajalik viiruse genoomi stabiilseks episomaalseks säilimiseks. Skeemil on näidatud, kuidas papillomiviiruse genoom läbi E2 kui adaptervalgu on seotud raku kromosoomidega (McBride).

Huvitav on pöörata tähelepanu sellele, et kromatiiniga seostumine toimub nii lühiajalises replikatsiooniprotsessis, kui ka pikaajalisel stabiilsel säilimisel. See fakt ütleb, et viiruse genoomi seostumine kromatiinile võib toimuda kohe pärast seda, kui piisav E2 tase rakus on saavutatud, mitte pikaajalise protsessi tulemusena.

BPV1 E2 valk on üles ehitatud kui moodulvalk, kus N-terminaalne osa formeerub selgelt piiritletud transaktivatsiooni alana, C-terminaalne osa spetsiifilise dimerisatsiooni- ja DNA-d siduva alana ja milles kaks piirkonda on teineteisega seotud painduva nn. *hinge* piirkonnaga. Kõik need domäänid on vajalikud E2 valgu seostumisel viiruse genoomi MME piirkonnale pikaajalisel säilimisel (Abroi *et al.*, 2004).

Bastien ja McBride on varasemalt näidanud, et E2 *hinge* regioon ning DNAd siduv domään ei ole olulised kromosoomidega seostumisel. Kasutades rekombinantset valku, selgus et BPV1 E2 transaktivatsiooni domään üksi on täiesti piisav kromosoomidega assotsieerumiseks (Bastien, N. ja McBride, A. A., 2000). E2 kaks lühemat supressorvormi (E2-TR ja E8/E2), kus on olemas DNAGA seonduv osa, kuid puudub transaktivatsioonidomään, ei ole võimelised kromatiiniga seostuma. Teadmine, et täispikk E2 seostub mitoetilise kromatiiniga ning tema supressorvormid seda ei tee, lubavad oletada, et assotsiatsiooniks on oluline E2 N-terminaalne

transaktivatsioonidomään (Skiadopoulos, M. ja McBride, A., 1998). E2 seostub mitootilise kromatiiniga ka viiruse DNA puudumisel.

2. POLÜOOMIVIIRUSED

2.1. Üldiseloomustus

Polüoomiviirus avastati 1953. aastal (Ludwig Gross), kui uuriti hiire leukeemia viirust (MLV), mis indutseeris kasvajaid vastsündinutel hiirtel. Oma nimetuse on viirus saanud sellest, et ta põhjustas kasvajaid paljudes kudedes.

Genoomide väiksuse, nende onkogeensete omaduste ja *in vitro* süsteemide olemasolu tõttu kasutatakse polüoomiviirusi sageli kui mudeleid DNA replikatsiooni uuringutes.

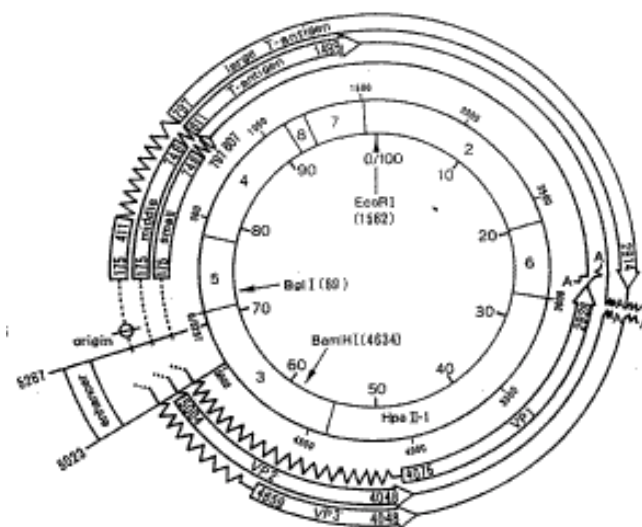
Siiani teadaolevalt on identifitseeritud 12 erinevat viiruse tüüpi. Nendeks on hiire polüoomiviirus (PyV), inimese polüoomiviirused (JCV, BKV), hamstri (HaPV), veise (BPyV), küüliku (RKV) jt.. Polüoomiviirused on liigispetsiifilised.

Polüoomiviirusi iseloomustab ikosaeedriline virion, mille diameeter on umbes 45 nm. Polüoomiviirustel on kolm kapsiidivalku: VP1 (peamine), VP2 ja VP3 (minoorsed). Viiruseline DNA partiklis on superspiraliseeritud, kompleksis rakuliste histoonidega (Knipe, D. M. ja Howley, P., 2001). Nakatumisvõimelised virionid moodustavad ainult 0,1- 1% kõikidest virionidest, teised on kas pseudovirionid või tühjad kapsiidid.

2.2. Polüoomiviiruste genoom

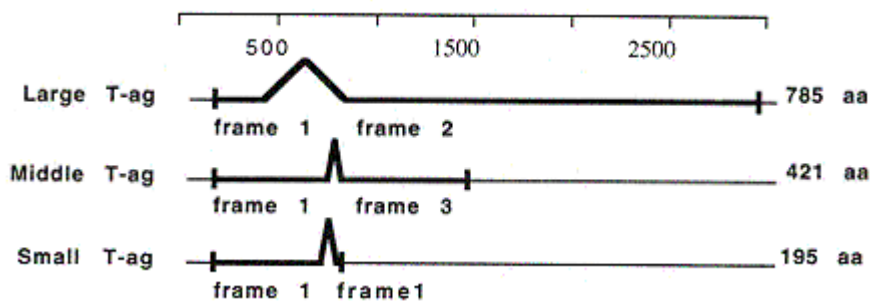
Polüoomiviiruste genoom on kaheaahelaline rõngasmolekul pikkusega 5,2 kb (joonis 5) ja selle nukleotiidne järjestus on teada. Nii peremees-raku tuumas kui virionis on DNA superspiraliseerituna pakitud rakulistesse histoonidesse sarnaselt raku kromosoomidega. DNA-ga on seotud nelja tüüpi rakulisi histoone: H2A, H2B, H3 ja H4, puudub vaid histoon H1 (Knipe, D. M. ja Howley, P., 2001). Polüoomiviiruse genoom on organiseeritud nii, et oleks võimalik pakkida maksimaalne informatsioon (kuus geeni) minimaalsesse ruumi. Selline paradoks on saavutatud kahelt ahelalt kodeerimise ja kattuvate geenialade abil. Genoom koosneb varasest (E) ja hilisest (L) regionist. Nende vahel asub ca 400 aluspaari pikkune mittekodeeriv ala - regulatoorne regioon, kus asuvad replikatsiooni alguspunkt, varane ja hiline promootor ning

enhaanser (võimendusjärjestus), mis kontrollib transkriptsiooni ja replikatsiooni aktiivsusi. Replikatsioon toimub replikatsioonikahvlite kahesuunaalse liikumise teel.



Joonis 5. Hiirte polüoomiviiruse (PyV) genoom skemaatiliselt. Kujutatud on varased geenid –T antigeenid (ST, MT, LT) ja hiline piirkond, kust ekspresseeritakse VP1, VP2 ja VP3 valgud (Knipe, D. M. ja Howley, P., 2001).

Varasest piirkonnast toodetakse “large T” ehk suurt T antigeeni, “middle T” ehk keskmist T antigeeni ning “small T” ehk väikest T antigeeni (joonis 6).



Joonis 6. Large T, middle T ja small T antigeenide saamiseks sünteesitakse ühesugune pre-mRNA, millest alternatiivse splaisingu teel saadakse erinevad T antigeenid (Howley, 1996).

Suur T antigeen (LT) mängib peamist rolli infektsiooni efektiivsuse reguleerimisel. See on 795 aminohappeline valk, ainukene viiruseline produkt, mis on vajalik algseks viiruse DNA replikatsiooniks. Selleks on tal mitu biokeemilist aktiivsust: võime seostuda kindla järjestusega DNA-l; ATP-d hüdrolyüsiv ehk ATPasne aktiivsus; DNA kaksikahelat lahtikeerav ehk helikaasne aktiivsus.

Teiseks on suur T antigeen vajalik transkriptsiooni regulatsiooniks - seostudes DNA-ga, lülitab see viirusgeenide transkriptsiooni ümber varaselt piirkonnalt hilisele; võimalik, et omab ka otsest võimet mingeid rakulisi promotoreid aktiveerida.

Keskmine T antigeen (MT) on 432 aminohappe pikkune valk, mis mängib rolli viiruse pakkumises, reguleerib peamise kapsiidi valgu VP1 fosforüleerimist. MT on onkogeen ja koos LT-ga ta kujundab ümber esialgsed raku funktsioonid. On näidatud, et MT interakteerub *src*, *fun*, *yes* ja/või fosfoinositiid-kinaasiga (Knipe, D. M. ja Howley, P., 2001).

Väike T antigeen (ST) pole hädavajalik, kuid mõningatel tingimustel suurendab see viiruse tumorigeensust katseloomadel. Biokeemiline funktsioon - seostub fosfataas PP2A-ga ja tõenäoliselt inaktiveerib selle.

Hilisest piirkonnast toodetakse 3 valku: VP1 ehk virionivalk 1, mis on peamine virioni komponent; VP2 ja VP3 ning inimese viirusel lisaks LP1 ehk "agnoproteiin".

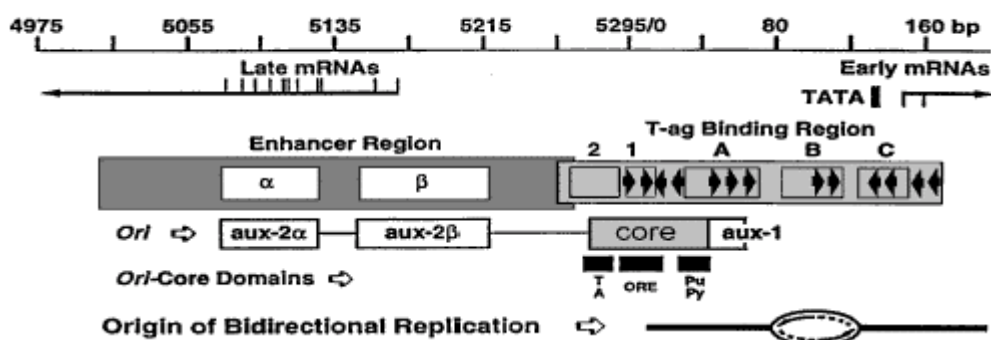
2.3. Polüoomiviiruse DNA replikatsioon

Kõik teadaolevad eukarüootsed DNA replikatsiooni originid sisaldavad kohustuslike elementidena transkriptsioonifaktorite seostumisalasid, mille funktsiooniks on osaleda regulatsioonis, et otsustada, kus ja millal aktiveerub origin S-faasi jooksul. Polüoomiviiruse DNA replikatsiooni origin omab enhaanserjärjestusi, mis määravad origini aktiivsuse.

Polüoomiviiruse DNA replikatsioon toimub tuumas, kus tsirkulaarne DNA molekul eksisteerib minikromosoomi vormis. Viiruseline LT antigeen ja rakulised replikatsioonivalgud on replikatsiooni *trans* - faktorid. Suur T antigeen on ainus viiruseline valk, mis on vajalik viiruse DNA sünteesiks. Tähtsat rolli mängib LT interaktsioon tema seondumiskohtadega origini regioonis. Polüoomiviiruse suur T antigeen seostub pentanukleotiidsele G(G/A)GGC alale, mis esineb 12-koopialises korduses viiruse DNA-s.

Polüoomiviiruse DNA replikatsiooniks on *cis* järjestusena vajalik ORI piirkond, mis koosneb replikatsiooni abijärjestustest (*auxiliary sequences*) ja ORI südamikust (*origin core*) (joonis 7). Ori on defineeritud paljudel polüoomiviirustel, näidatud on nende erinevused ja sarnasused (DePamphilis, M. L. ja Bradley, M. K., 1986).

Vajalikud abijärjestused on *aux1* ja *aux2*, mis moodustavad seostumiskohad mitmetele transkriptsioonifaktoritele ja aktiveerivad replikatsiooni.



Joonis 7. PyV regulatoorne piirkond. Skeemil on näidatud viiruse ORI koos abijärjestuste, “core” või “südamiku” ning selles olevate domäänidega. LT pentanukleotiidsed seostumiskohad on märgistatud mustade nooltega. Näidatud on ka enhaanser-regioonid, mis osalevad transkriptsioonil ja replikatsioonil (Knipe, D. M. ja Howley, P., 2001).

Polüoomiviiruse replikatsiooni initsiatsioonivalk suur T antigeen interakteerub viiruse originiga. Topelt-heksameerne kompleks moodustub ORE ümber (Bell, S. P. ja Stillman, B., 1992; Mastrangelo, I. A. *et al.*, 1989). Heksameerne kompleks on vajalik origini struktuuri lahtiharutamiseks, seega LT omab helikaasset aktiivsust (Wessel, R. *et al.*, 1992). Lahtihargnemine algab puriin/pürimidiinirikas elemendis (DUE), samaaegselt toimub AT-rikka elemendi DNA ahelate avanemine (Natale, D. A. *et al.*, 1993; Parsons, R. *et al.*, 1990). AT-element võimaldab edasise ahelate hargnemise, toimub replikatsiooni mulli laienemine mõlemas suunas. Uuringud polüoomiviirustega on näidanud, et AT-elementi lahtihargnemine on eraldivaadeldav LT antigeeni algsest seondumisest origini järjestusele (Chen, M. H. ja Benjamin, T. L., 1997). Lahtihargnemise käigus interakteerub LT antigeeni kompleks replikatsioonivalguga RP-A (Dornreiter, I. *et al.*, 1992). Vajalik on ATP hüdrolüüs ning topoisomeraas I juuresolek (Dean, F. B. *et al.*, 1987; Dodson, M. *et al.*, 1987). Kui DNA pole enam kaheahelaline, ei seonu LT antigeen ahelatele spetsiifiliselt. Preinitsiatsiooni kompleksi võtab vastu DNA polümeraas α -primaas (Dornreiter, I. *et al.*, 1992; Dornreiter, I. *et al.*, 1990), moodustub initsiatsiooni kompleks. Süntees kulgeb kahesuunaliselt LT antigeeni helikaasse aktiivsuse kaasabil. Replikatsioonifaktor C (RFC) koos prolifereruva raku tuumaantigeeni (PCNA) ja DNA polümeraas δ -ga replikatsioonikompleksi kaasosalistena aitavad kaasa, seda nii juhtiva kui mahajääva

ahela sünteesile (Tsurimoto, T. *et al.*, 1990; Tsurimoto, T. ja Stillman, B., 1991; Waga, S. *et al.*, 1994).

Ori-südamiku kõrval asuvad lisajärjestused on DNA sünteesiks tähtsad. Need enhaanserelemendid sisaldavad seondumissaite transkriptsioonifaktoritele. Polüoomiviiruse enhaanser sisaldab mitmeid PEA-1, AP-1 jt. seondumissaite (DePamphilis, M. L., 1993; Martin, M. *et al.*, 1988). Polüoomiviiruse enhaanseri võib asendada seondumissaitidega erinevatele faktoritele nagu c-Jun, veise papilloomiviiruse (BPV1) E2 valk, Gal4 - kaotamata replikatsiooni toetavat funktsiooni (Bennett-Cook, E. R. ja Hassell, J.A., 1991; Guo, W. *et al.*, 1996; Nilsson, M. *et al.*, 1991). Hiire polüoomiviirus nõuab enhaanserelemendi olemasolu replikatsiooniks *in vivo*. Enhaanserelemendid ei ole vajalikud *in vitro* DNA replikatsiooniks (Bullock, P. A. *et al.*, 1997).

Papilloomiviiruse MME element, mis koosneb E2 valgu multimeersetest seondumissaitidest, võib E2 juuresolekul anda polüoomiviiruse core-originile replikatsiooni enhaanseri funktsiooni, kui vähemalt kaks E2 seondumissaiti asendavad wt PyV replikatsiooni enhaanseri (Abroi, A. *et al.*, 2004).

3. EPSTEIN-BARR'i VIIRUS

3.1. Üldisloomustus

Epstein–Barr'i viirus (EBV) on lümfotroopne herpesviirus, mis kuulub gamma-herpesviiruste perekonda. Epstein-Barr'i viirus on oluline inimese patogeen, mis pidevalt nakatab enamikku inimestest ülemaailmaselt (90%) (Knipe, D. M. ja Howley, P., 2001). Epstein-Barr'i viirus on oma nime saanud teadlaste järgi, kes esimestena leidsid viiruse partikleid Burkitti lümfoomist eraldatud rakkudest. Viirus on üsna liigi- ja rakutüübispetsiifiline, uuritakse teda seetõttu põhiliselt koekultuuris kasvatatavates inimese transformeerunud rakuliinides. EBV-le on iseloomulik duaalne tropism - viirus nakatab lisaks B-lümfotsüütidele (valdavalt mitteproduktiivne, latentne infektsioon) ka epiteeli rakke (produktiivne infektsioon). Kõige sagedami põhjustab Epstein-Barr'i viirus infektsiooset mononukleoosi (IM). IM tekib sagedamini vanemas eas saadud primaarse infektsiooni korral ja on tavaliselt iseenesest mööduv, kuna kutsus esile tugeva immuunsüsteemi vasturünnaku. EBV-d seotakse ka kasvajate tekkega, seda põhiliselt kahe erineva tüübiga. Esimene on Burkitti lümfoom, mis on oma nime saanud Briti arsti Denis Burkitti järgi, kes kirjeldas 1940-ndatel aastatel teatud Ida-Aafrika piirkondades lastel kõige enam esinevat vähkkasvajad (10 juhtu 100000 inimese kohta aastas). Teine on ninaneelu vähk, eriti levinud Hiinas ja Kagu Aasias. Üsna tuntud on ka EBV seos Hodgkin'i haigusega (teatud lümfoom).

3.2. Virioni struktuur

Epstein–Barr'i viiruse virioni morfoloogia on paljudele herpesviirustele tüüpiline. Genoom on pakitud ikosaedrilsesse nukleokapsiidi, mis on 110 nm-se läbimõõduga ning koosneb 162 kapsomeerist. Nukleokapsiidi ja viiruse lipiidse välismembraani vahel on amorfne valguline tegument. Tegument sisaldab mitut viiruse poolt kodeeritud glükoproteiini, peamised neist on gp 350/220, mis seondatakse peremeesraku pinnaretseptoritega, soodustades sellega viiruse sisenemist raku (Cooper, N. R. 1994; Li, Q. *et al.*, 1995).

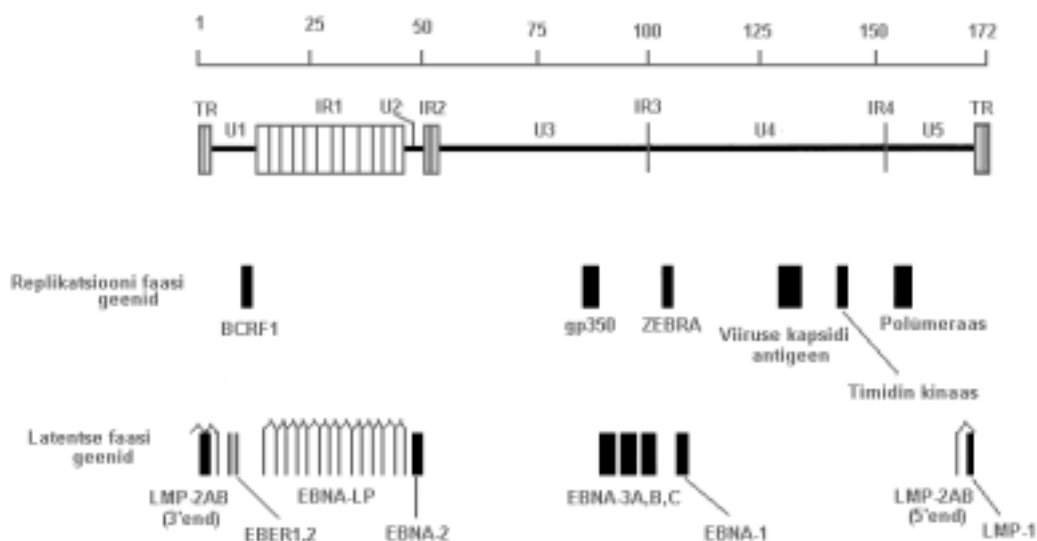
3.3. Epstein-Barr'i viiruse genoom

EBV genoom on kaheaheelaline DNA molekul pikkusega 172 kb, mis on pakitud ümber valgulise südamiku. Kapsiidi sees on DNA lineaarne, kummagi ahela 3' otsas üks nukleotiid üle (joonis 8). Rakku jõudes otsad modifitseeritakse ja ligeeritakse kokku terminaalse kordusjärjestuste (TR) kaudu. Seega tekib raku sees rõngasjas kaheaheelaline DNA (Fennewald, S. *et al.*, 1984; Knipe, D. M. ja Howley, P., 2001).

Viiruse genoom sisaldab palju kordusjärjestusi. Otstes on terminaalsed kordusjärjestused, nende suurus on umbes 540 bp. Genoomi sisemiste kordusjärjestuste (IR1- IR4) arv on varieeruv. Sisemiste kordusjärjestuste vahel asuvad erineva pikkusega unikaalsed alad (U1-U5) (Knipe, D. M. ja Howley, P., 2001; Laux, G. *et al.*, 1985).

EBV genoom sisaldab kahte funktsionaalselt erinevat DNA replikatsiooni alguspunkti (*oriP* ja *oriLyt*). Latentses faasis toimub replikatsioon *oriP*-lt, seda üks kord rakutsüklis sünkroonselt peremeesraku jagunemisega (Yates, J. L., 1996). Lüütilises faasis algab replikatsioon originilt *oriLyt*, mida genoomis on kaks koopiat, lüütiliseks replikatsiooniks piisab vaid ühest.

EBV genoom sisaldab umbes 90 geeni, 9 neist ekspresseeritakse B-lümfotsüütides latentse infektsiooni jooksul. Need on tuuma antigeenid EBNA-1, -2, -3A-C, -LP ja kolm latentse faasi membraanivalku LMP-1, -2A ja -2B. Latentses faasis transkribeeritakse veel kaks RNA geeni EBER-1 ja EBER-2. Ülejäänud valke kodeerivad geenid ekspresseeritakse viiruse replikatsiooni ning viiruse lüütilise tsükli vältel.



Joonis 8. Epstein-Barr'i viiruse genoom ja tähtsamate geenide lokalisatsioon. Genoom on 172 000 bp kaheaheelaline DNA, milles on mitu unikaalset regiooni (U1-U5), sisemised kordusjärjestused (IR1-IR4) ja terminaalse kordusjärjestuste domäänid (TR). Mõned Epstein-

Barr'i viiruse geenid ekspresseeritakse viiruse replikatsiooni tsükliks, teised aga ekspresseeritakse B-lümfotsüütides latentse infektsiooni korral. On näidatud EBNA (*Epstein-Barr'i virus nuclear antigen*)-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP, LMP (*latent membrane protein*)-1 ja LMP-2 (A,B), EBER-id (*Epstein-Barr'i virus encoded RNAs*), ZEBRA (*Z Epstein-Barr'i virus replication activator*) ja teisi valke kodeerivaid regioone (Straus, S. E. *et al.*, 1993).

3.4. Epstein-Barr'i viiruse elutsükkel

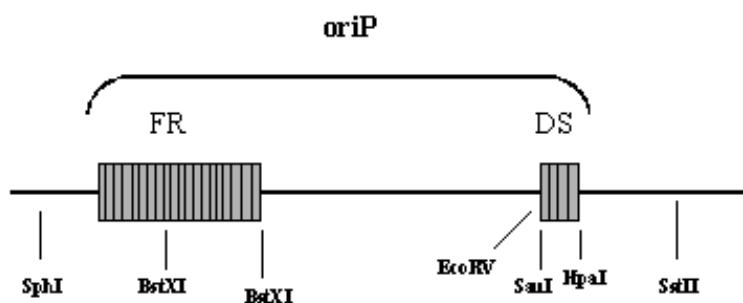
Viiruse levik toimub valdavalt sülje vahendusel. Nakatuvad eeldatavasti kõigepealt neelu, süljenäärmete ja keele epiteeli rakud, kus viirus on võimeline suhteliselt efektiivselt paljunema - produktiivne faas. Neelust satub viirus verre ja nakatab nn. puhkavaid B-lümfotsüüte, kus infektsioon püsib peamiselt latentsena.

Viiruse latentse replikatsiooni käivitamiseks on vajalik latentse faasi origini (*oriP*) ala ning kuni üheksa latentse faasi valgu olemasolu. Latentsetest valkudest on otseselt replikatsiooniks vajalik *oriP*-le seonduv EBNA-1. Ülejäänud valgud osalevad viirusele sobivate tingimuste loomisel rakus, eelkõige stimuleerides mitteprolifereeruvate B-lümfotsüütide jagunemist. Latentses faasis toimuva replikatsiooni omapäraks on genoomi säilimine rõngasja episoomina tuumas ja selle episoomi koopiaarvu kindel kontroll, kus viiruse koopiaarv raku kohta püsib vahemikus 10-400. Viiruse reaktivatsiooni keskseks regulaatoriks on BZLF-1 geen (produkti nimetatakse ZEBRA), mis reguleerib mitmete, nii viiruseliste kui ka rakuliste, geenide transkriptsiooni ja osaleb raku signaaliülekanderadade ümberreguleerimises. Samuti osaleb see valk otseselt lüütilise replikatsiooni initsiatsioonil, seondudes lüütilisele replikatsiooni originile (*oriLyt*). Seega kasutab viirus latentses ja produktiivses faasis erinevaid replikatsiooni origine.

3.5. Epstein-Barr'i viiruse DNA replikatsiooniks ja säilimiseks vajalikud faktorid

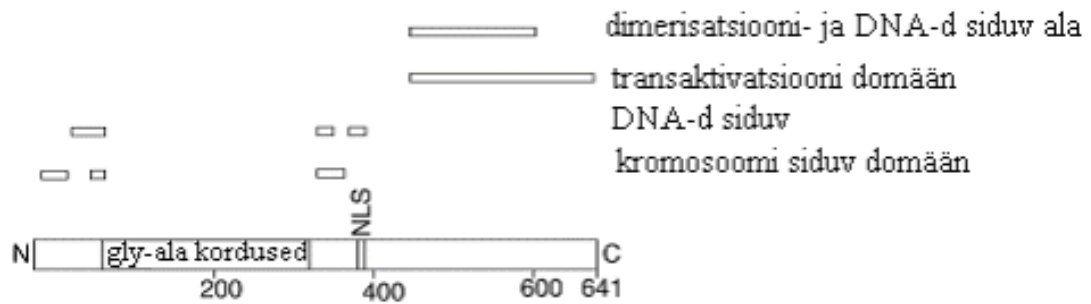
Viiruselise plasmiidse DNA replikatsiooniks ja säilimiseks jagunevates peremeesrakkudes on vajalikud latentne replikatsiooni origin - *oriP* ja EBNA-1 valk (Kirchmaier, A. L. ja Sugden, B., 1995; Mackey, D. *et al.*, 1995; Yates, J. *et al.*, 1984; Harrison, S. *et al.*, 1994).

OriP on 1,7 kb pikkune regioon, mis koosneb kahest funktsionaalselt erinevast elemendist - DS (*dyad symmetry*) ja FR (*family of repeats*), mis sisaldavad vastavalt 4 ja 20 EBNA-1 valgu seostumiskohta (Rawlins, D. R. *et al.*, 1985; Reisman, D. *et al.*, 1985) (joonis 9). Viiruse DNA replikatsioon initsieeritakse DS elemendi sees ning aktivatsiooniks vajab see EBNA-1 valgu seostumist sellele elemendile (Gahn, T. A. ja Schildkraut, C. L., 1989). EBNA-1 valgu ja FR elemendi vahendusel tagatakse viiruse plasmiidse DNA säilimine jagunevates peremeesrakkudes ning soodustub mõnede viiruse latentsete geenide transkriptsioon. Mõlemad protsessid on teostatavad ka sõltumata DS elemendist (Krysan, P. J. *et al.*, 1989; Reisman, D. ja Sugden, B., 1985; Gahn, T. A. ja Schildkraut, C. L., 1989), vaid FR osaleb plasmiidide seondumises kondenseerunud kromosoomidega (Hung, S. C. *et al.*, 2001; Marechal, V. *et al.*, 1999; Kanda, T. *et al.*, 2001; Ito, S. and Gotoh, E., 2002). Epstein-Barr'i viiruse stabiilseks säilimiseks on FR järjestuse kahekümnest EBNA-1 seondumiskohast hädavajalikud ainult kuus (Wysokenski, D. A. ja Yates, J. L., 1989).



Joonis 9. Epstein-Barr'i viiruse *oriP*. Hallid ristkülikud kujutavad FR ja DS elemente (Yates, J.L. *et al.*, 2000).

Epstein-Barr'i viiruse EBNA-1 on fosforüleeritav valk, mille N- ja C-terminaalsed osad on omavahel seotud glütsiini/alaniini - rikaste lühikeste kordusjärjestuste kaudu. EBNA-1 sisaldab 641 aminohapet ning seondub DNA-ga homodimeerinena. C-terminaalne osa sisaldab endas dimerisatsiooni- ja DNA-d siduvat domääni (Wilson, J. B. *et al.*, 1996). N-terminaalne osa on vajalik peremeesraku kromatiinile seondumiseks (Marechal, V. *et al.*, 1999; Hung, S. C. *et al.*, 2001) (joonis 10).



Joonis 10. EBNA-1 valgu domäänne struktuur (Van Craenenbroeck, K. *et al.*, 2000).

EBNA-1 valk on ka transkriptsiooni aktivaator; seostudes FR alale töötab ta kui transkriptsiooni enhaanser (Reisman, D. ja Sugden, B., 1986). Võimendusefekt ilmneb sõltumatult FR ja DS elementide orientatsioonist ja kaugusest (Middleton, T. ja Sugden, B., 1994; Gahn, T. A. ja Sugden, B., 1995). Täispika *oriP* regiooni alternatiiviks võib olla FR järjestus seotuna mingite teiste replikatsioonioriginidega, näiteks asendades DS elemendi inimese teatud DNA lõiguga, mis sisaldab funktsionaalset replikatsiooni origini (Wade-Martins, R. *et al.*, 1999; Aiyar *et al.*, 1998; Krysan, P. J. *et al.*, 1989, Kapoor, P. ja Frappier, L., 2003).

EBNA-1 on multifunktsionaalne valk; peale replikatsiooni ja transkriptsiooni-aktivatsiooni funktsiooni osaleb EBNA-1 valk Epstein-Barr'i viiruse DNA assotsieerumisel rakuliste kromosoomidega. EBNA-1 on ühelt poolt seostunud kromosoomidega, teiselt poolt seostudes FR elemendiga vahendab EBV genoomi stabiilset säilumist.

EBNA-1 mutantidega seotud uurimised näitavad, et mitoetilisele kromosoomile seondumine on tähtis plasmiidide segregatsioonil. EBNA-1 mutantsel viirusel, kus on deleteeritud aminohapped 325 kuni 376, toimub replikatsioon korralikult, kuid ta ei ole võimeline mitoetiliste kromosoomidega seonduma ning seega ka toetama *oriP* plasmiidide säilumist jagunevates peremeesrakkudes (Shire, K. *et al.*, 1999; Wu, H. *et al.*, 2000). Teine EBNA-1 mutatsiooniga viirus, kus on deleteeritud aminohapped 8 kuni 67 N-terminaalses alas, on osaliselt defektne segregatsioonil ning seondub mitoetiliste kromosoomidega halvemini võrreldes metsiktüüpi EBNA-1 valguga (Wu, H. *et al.*, 2002).

EBNA-1 valgu mitoetiliste kromosoomidega seondumise mehhanism sai selgeks pärast EBNA-1-ga interakteeruva EBP-2 valgu (EBNA-1 *binding protein 2*) identifitseerimist. EBP-2 on kõrgelt konserveerunud valk, mis interakteerub EBNA-1 valguga sõltumata sellest, kas see on FR elemendiga seotud või mitte (Kapoor, P. ja Frappier, L., 2003).

Kokkuvõttes võib öelda, et EBV genoomi pikaajaline replikatsioon ja stabiilne säilimine sõltub rakuliste ja viiruseliste faktorite koostööst.

4. EPISOMAALSED HÜBRIIDSED VIIRUSVEKTORID

4.1. Veise papilloomiviirusel baseeruvad heteroloogsed vektorid

69% viiruselisest BPV1 DNA-st, mis koosneb varasest regioonist (E), on piisav järjestus hiire rakkude transformatsiooniks, mis säilib kui stabiilne ekstrakromosomaalne multikoopiaalne element, ilma et ta oleks nakkusvõimeline (Lowy, D. R. et al., 1980; Sarver, N. et al., 1981; Uemura, N. et al., 1992). Varast ala on edukalt kasutatud klonerimisvektorites (Pavlakis, G. N. and Hamer, D. N., 1983, Sambrook, J. et al., 1985 jt.).

Edasised vektori täiustamised olid suunatud vektorite pikaajalisega säilumise toetamisele peremeesrakkudes, selleks et kindlustada meid huvitava geeni produktsioon pika aja jooksul rakkudes, mis ekspresseerivad E1 ja E2 valke. Need vektorid sisaldavad papilloomiviiruse minimaalset origini (MO), papilloomiviiruse *minichromosome maintenance element*'i (MME), mis koosneb vähemalt kahest E2 valgu seostumiskohast ja leiavad kasutust E1 ja E2 ekspresseerivates rakkudes (Ilves, I. et al., 1999; Ustav, E. et al., 1993; Skiadopoulos, M. ja McBride, A. et al., 1998).

4.2. Epstein-Barr'i viirus kui geeniekspressiooni süsteem

Tavaliselt Epstein-Barr'i viirusel põhinevate episomaalsete vektorite koosseisus peaks olema replikatsiooni origin (*oriP*) ning EBNA-1 valgu kodeeriv järjestus, mis mõlemad tagavad hea vektori segregatsiooni ja replikatsiooni paljudes rakkudes, kaasa arvatud inimese epiteeli-, fibroblasti- ja lümfoomirakud (Mecsas, J. and Sugden, B., 1987; Yates, J., et al., 1984; Lupton, S. and Levine, A. J., 1986). EBV ekspressioonisüsteemides on hädavajalik eukarüootse selektsiooni markergeeni olemasolu, sest segregatsioon Epstein-Barr'i viirusel baseeruvatel plasmiididel on ebatäiuslik ja plasmiidid kaovad aja jooksul (Sclimenti, C.R. and Calos, M. P., 1998; Mücke, S., et al., 1997).

4.3. Polüoomiviiruse kasutamine geeniekspressiooni süsteemides

Polüoomiviirusel põhinevate vektorite replikatsiooniks transfekteeritud rakkudes on vajalik funktsionaalne origin, suur T antigeen ja viiruse replikatsiooniks vajalike rakuliste valkude olemasolu. Eukarüootse selektsioonikasseti olemasolu (näiteks, neomütsiini resistentsusgeeni) annab võimaluse selekteerida plasmiidid transfekteeritud rakkudes. Hiire polüoomiviiruse (PyV) kaasabil loodud vektorsüsteem on üsna efektiivne võõrgeeni DNA ekspresseerimiseks, kuid see omab ka mõningaid piiranguid. Peremehe valik on piiratud hiire ja roti rakkudega. Permissiivsete rakkude transfektsioon rekombinantsete polüoomiviirusvektoritega, mis sisaldavad PyV origini järjestusi, on piiratud transientse perioodiga.

4.4. Episomaalsed hübriidsed vektorid

Optimaalne vektorsüsteem, mis oleks kasutatav ka geeniteraapia eesmärkidel, peaks tagama meid huvitava võõrgeeni (a) stabiilse pikaajalise kõrgel tasemel produktsiooni; (b) omama kõrget transfektsiooni efektiivsust; (c) samuti ei tohiks see integreeruda peremeesraku kromosoomi, mis võib kahjustada nii raku oma DNA-d kui mõjutada vektori koosseisu, või mõjuda edaspidi selliselt, et põhjustab onkogeenset transformatsiooni.

Kuivõrd iga viiruseline vektorsüsteem omab tugevaid ja nõrku külgi, on kimäärsed vektorid loodud kombineerimaks erinevate viirus-süsteemide iseärasusi. Paljutõotav vektorsüsteem peab aga olema püsiv *in vivo* pikaajalise perioodi jooksul, seetõttu on hakatud looma episomaalselt säiluvaid plasmide, mis kombineerivad erinevate vektorite eelised. Polüoomiviiruse origin, panduna BPV1 või EBV põhinevatesse vektorisse, tagab polüoomiviiruse replikatsioon taseme (Roberts, J. M. and Weintraub, H., 1986, (2)). Need vektorid on väga perspektiivsed valkude transientseks ületootmiseks. On loodud ka Epstein-Barr'i järjestustel (EBNA-1 ja *oriP*) põhinevad hübriidsed vektorsüsteemid, millele on lisatud retroviiruste, adenoviiruste või herpesviiruste elemente (Grignani, F. *et al.*, 1998).

Hübriidseid episomaalseid vektoreid võib kasutada geeniteraapias, lootuses ekspresseerida meile huvi pakkuv geen kõrge koopiaarvuni jagunevates rakkudes ja seda võimalikult pika ajaperioodi jooksul.

EKSPERIMENTAALNE OSA

TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva töö esmaseks ülesandeks oleks disainida ja konstrueerida uued viiruselised kimäärsed ekspressioonisüsteemid, mis replitseeruks eukarüootsetes rakkudes kui episoomid ehk oleks rakkudes kunstlikeks minikromosoomideks. Teiseks ülesandeks on testida nende vektorsüsteemide efektiivsust ning pikaajalist säilumise võimalikkust imetajarakkudes. Episomaalsed replitseeruvad hübriidsed vektorplasmiidid peaks seega omama võimet nii amplifikatsiooniks kui ka kandumiseks ja jaotumiseks tütarakkudesse.

Väikeste DNA viiruste hulgast valitud hiire polüoomiviiruse (PyV) originil põhinev vektorsüsteem koostöös PyV suure-T antigeeniga (LT) annab kiire ja efektiivse võimaluse võõr-DNA-d kõrgel tasemel rakus ekspresseerida, kuid see on piiratud transientses perioodiga permissiivsetes hiire rakkudes.

Veise papilloomi- ja Epstein-Barr'i viirused kasutavad oma genoomi säilitamiseks selle sidumist peremeesraku mitootilistele kromosoomidele. Sellist funktsiooni täidavad BPV1E2 valk ning EBV EBNA-1 valk, seondudes ühelt poolt oma seostumiskohti sisaldavate elementidega ning teiselt poolt mitootiliste kromosoomidega. Kuna MME ja FR elemendid on iseseisvad segregatsiooni eest vastutavad üksused ja töötavad replikatsioonist sõltumatult (vastava origini juuresolek pole selleks hädavajalik), koostati meie laboris sellised konstruktid süsteemi, mis sisaldab polüoomiviiruse minimaalse origini (MO) ning papilloomiviiruse E2 või Epstein-Barr'i viiruse EBNA-1 seostumiskohti. Olid juba tehtud eelkatsed, mis näitasid häid tulemusi hübriidsete originide töövõime osas transientses süsteemis.

Käesoleva töö eesmärgiks on selgitada välja, kas on võimalik selliste hübriidsete originiplasmiidide pikaajaline episomaalne säilumine rakuliinides, mis ekspresseerivad konstitutiivselt kõiki vajalikke viiruselisi trans-faktoreid – PyV LT koos kas BPV1 E2 valguga või EBV EBNA-1 valguga.

MATERJAL JA METOODIKA

Bakteritüved ja söötmed

Kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 α , tehti kompetentsed rakud RF meetodiga. Bakterid kasvatati LB söötmes (10 g/l trüptooni, 5 g/l pärmiekstrakti, 10 g/l NaCl), kuhu oli lisatud kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 25 μ g/ml või ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 μ g/ml, sõltuvalt sellest, millist resistentsusgeeni paljundatav plasmiid sisaldas.

Rakuliinid ja söötmed

Kasutati hiire fibroblastide rakuliine COP5/Puro/E2/LT (konstrueeris I. Hääl) ja COP5/Puro/LT/EBNA-1 (konstrueeris K. Janikson). Hiire rakuliinis COP5 ekspresseeritakse stabiilselt kõiki PyV T-antigeene (Tyndall *et al.*, 1981). Rakuliinis COP5/Puro/E2/LT toodetakse konstitutiivselt lisaks LT-le ka papilloomiviiruse valku E2, mida ekspresseeritakse retroviiruse LTR-is oleva promootori alt koos puromütsiini selektsiooni markeriga. Rakuliinis COP5/Puro/EBNA-1/LT ekspresseeritakse stabiilselt PyV LT-antigeen ja EBV EBNA-1 samades selektsioonitingimustes. Rakke kasvatati IMDM (GibcoBRL) söötmes, millele oli lisatud 10% veiste loote seerumit (Sebac) ning penitsilliini 100 IU/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml. Rakkude selekteerimiseks lisati söötmesse antibiootikum puromütsiini lõppkontsentratsiooniga 2,5 μ g/ml. Rakke inkubeeriti koekultuuri plastiktassidel 37°C ja 5% CO₂ sisalduse juures.

Algplasmiidid

pEGFP-C1 (lisa 1)

pEGFP-C1 plasmiid sisaldab inimese tsütomegaloviiruse (CMV) varase promootori, võimendatud roheliselt fluorestseeruva valgu geeni järjestuse, MCS (*Multiple Cloning Sites* - polülinker), SV40 varase mRNA polüadenüleerimise signaali (polüA), f1 üheaahelalise DNA origini, bakteriaalse promootori Kan^R geeni ekspresseerimiseks, SV40 varase promootori, kanamütsiini/neomütsiini resistentsuse

geeni järjestuse, Herpes simplex viiruse (HSV) tümidiin kinaasi (TK) geeni polüA ning pUC plasmidi replikatsiooni origini (*Clontech*).

pd1EGFP-N1 (lisa 2)

pd1EGFP-N1 plasmid sisaldab inimese tsütomegaloviiruse (CMV) varase promootori, d1EGFP (destabiliseeritud EGFP) reportergeeni, MCS, SV40 varase mRNA poliadenüleerimise signaali (polüA), f1 üheahelalise DNA origini, bakteriaalse promootori Kan^R geeni ekspresseerimiseks, SV40 varase promootori, kanamütsiini/neomütsiini resistentsuse geeni, (HSV) tümidiin kinaasi geeni polüA ning pUC plasmidi replikatsiooni origini (*Clontech*).

QCTMOE2pA (lisa 3)

QCTMOE2pA plasmid sisaldab tühja ekspressioonikasseti CMV promootoriga ja polüA-ga, neo- geeni koos promootoriga, bakteriaalse origini ja polüoomiviiruse minimaalse replikatsiooni origini (MO) ning papilloomiviiruse 10-t E2 valgu seondumiskohta sisaldava elemendi (MME) (tehtud J. Geimaneni poolt).

pUCMO/FR (lisa 4)

pUCMO/FR on kommertsiaalsel pUC18 vektoril põhinev plasmid, mis sisaldab ampitsilliini resistentsusmarkerit, polüoomiviiruse minimaalset ori ja Epstein-Barr'i viiruse 20-t EBNA-1 valgu seondumiskohta - FR järjestust (labori kogudest).

Plasmiidide klonereimine

Klonereimiseks vajalike DNA-de restriksioon viidi läbi firma *MBI Fermentas* ensüüme kasutades. Ensüümi kogus sõltus DNA hulgast ja inkubatsiooni ajast. Reaktsioon toimus 37°C juures ensüümidele sobivas puhvril 1 tunni jooksul, osalise lõikuse puhul 15 minuti jooksul. Vektori lõikamisel lisati restriksioonisegule pool tundi enne reaktsiooni lõppu 1 ühik aluselist fosfataasi (*calf Intestine Alkaline Phosphatase* – CIAP), mis eemaldab DNA 5' otsast fosfaatijäägi. Selline töötlus aitab järgnevas ligeerimisreaktsioonis ära hoida vektoriotste omavahelist kokkuligeerumist. Reaktsiooni peatamiseks inaktiveeriti aluseline fosfataas segu kuumutamiseks 85°C juures 10 minutit. Saadud DNA fragmendid lahutati geel-elektroforeesil 0,8%-lises või 1,2%-lises agarosgeelis, seejärel puhastati DNA geelist välja, kontrolliti geel-elektroforeesil,

ligeeriti ning transformeeriti, kasutades esitatud protokolle. Bakteritest eraldatud plasmiidne DNA kontrolliti esmalt geel-elektroforeesil suuruse järgi võrrelduna algplasmiidiga, suuruse poolest sobivad plasmiidid seejärel kontrolliti restriksioonanalüüsiga.

Fenooltöötlus

Selleks, et puhastada DNA-d, lisati TE puhvrit 100 µl-ni ja sama ruumala fenool-kloroform-isoamüülalkohooli segu (25:24:1), tsentrifugeeriti korraks ning tõsteti ülemine vesifaas uude tuubi, DNA sadestati 30 minuti jooksul – 20°C juures 4 µl 5 M NaCl ja 500 µl 96% etanooliga. Tsentrifugeeriti, etanool aspireeriti, sade pesti 70%etanooliga, lahustati sade 10 µl-s TE puhvris.

DNA puhastamine agarosgeelist

DNA fragmentide agarosgeelist puhastamiseks kasutati *Ultra Clean DNA Purification Kit*-i. Geelitükk (1xTAE puhvris valmistatud sobiva %-ga agarosgeel), mis sisaldas vajalikku DNA fragmenti lõigati UV valguses agarosgeelist skalpelliga välja, kaaluti ning lisati 3 mahtu *Ultra Salt* puhvrit (1 mg = 1 µl). Geel sulatati 56 °C juures 5 minuti jooksul, segades aeg-ajalt. Lahustunud geeli ja puhvri segule lisati 5 µl +1 µl iga oodatava DNA µg kohta *Ultra Bind* maatriksit, mis oli eelnevalt suspendeeritud *vortex*'il, ning seda lahust inkubeeriti pidevalt segades 5 minutit toatemperatuuril. *Ultra Bind* maatriks on ränioksiid, soola lahuses moodustab DNA sellega tugevaid ioonseid sidemeid. Pärast 10 sekundit tsentrifugeerimist lauafuugiga (Heraeus Biofuge Pico) 13 000 rpm eemaldati vesifaas, sade suspendeeriti 1ml *Ultra Wash* puhvris ja uuesti tsentrifugeeriti 13 000 rpm 5 sekundit. Eemaldati vesifaas ja tsentrifugeeriti uuesti 13 000 rpm 5 sekundit ja eemaldati võimalikud vesifaasi jäägid. Sade lahustati kasutatud maatriksihulgast 2 korda suuremas mahus TE puhvris inkubeerides 5 minutit toatemperatuuril, ioonsed sidemed DNA ja maatriksi vahel katkevad ning DNA lahustub puhvris. Sade eraldati tsentrifugeerides 13 000 rpm 1 minut. DNAd sisaldav TE puhver tõsteti ümber uude tuubi (*Eppendorf*).

DNA fragmentide ligatsioon

Geelist puhastatud ja geel-elektroforeesil suuruse järgi kontrollitud DNA fragmendid segati kokku nii, et vektorit ja inserti võeti ligeerimiseks molaarse kontsentratsiooni võrdses või 3-kordses inserti ülehulgas. Fragmendid ligeeriti 2 tundi toatemperatuuril või 12 tunni jooksul 16°C juures üleöö, kasutades 5 ühikut T4 DNA ligaasi ja vastavat ligaasi 10x puhvrit. Ligeerimise lõpus inaktiveeriti ensüüm 65°C juures 10 minutit.

Bakterite transformatsioon kuumaehmatus (*heat shock*) meetodil

Ligatsioonisegule (10–20 µl) lisati 200µl kompetentseid *E.Coli* DH5a rakke ja segati ettevaatlikult. Rakke inkubeeriti 15-30 minutit jääl, seejärel tehti kuumaehmatus, inkubeerides segu 42°C juures 1 minut ning jahutati jääl. Segule lisati 0,8 ml LB söödet ning inkubeeriti 37°C juures 1 tund loksutades. Rakud tsentrifugeeriti lauafuugiga 3500 rpm 1 minut, kallati ära enamik söötmet. Rakud resuspendeeriti allesjäänud söötmes ning plaaditi LB tassidele, mis sisaldasid kanamütsiini lõppkontsentratsioonis 25 µg/ml või ampitsilliini lõppkontsentratsioonis 100 µg/ml, vastavalt sellele, millist resistentsusgeeni plasmiid sisaldas.

Plasmiidse DNA eraldamine aluselise lüüsiga (minipreparatsioon)

2 ml LB-söötmes kasvatatud bakterid tsentrifugeeriti lauafuugiga (Heraeus Biofuge Fresco) 4°C juures 13 000 rpm 1 minut. Sööde eemaldati ning rakud suspendeeriti 100 µl külmas lüüsilahuses I (50 mM glükoos, 25 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0). Lisati 200 µl lüüsilahust II (0,2 M NaOH, 1% SDS), segati õrnalt (keerates tuubi ettevaatlikult ja hoides jääl), lisati 150 µl külma neutralisatsiooni lahust III (60 ml 5 M kaalium atsetaati, 11,5 ml jää-äädikhapet ja 28,5 ml vett) ja inkubeeriti jääl 5 min. Tsentrifugeeriti 5 min 13000 rpm 4°C juures, tõsteti supernatant üle uude tuubi ning sellele lisati 2 mahtu 96% etanooli. Segati lahus *vortex*'il ja segu inkubeeriti -20°C juures 30 minutit ning tsentrifugeeriti 4°C juures 13 000 rpm 15 minutit. Vedelik aspireeriti, sade pesti 1 ml 70% etanooliga ja seejärel fuugiti 4°C juures 13000 rpm 2

minutit. Etanool eemaldati, sade kuivatati ning lahustati 50 µl TE puhvrts, mis sisaldas RNAasi lõppkontsentratsioonini 20 µg/ml, lahust inkubeeriti 56 °C juures 15 minutit.

Plasmiidse DNA eraldamine aluselise lüüsiga (midipreparatsioon)

Plasmiidide eraldamiseks kasutati *Eppendorf Perfectprep Plasmid Midi Kit*'i. 14-16 tundi 50 ml söötmes kasvatatud bakteri kultuur tsentrifugeeriti 3000 rpm 10 minuti jooksul, kasutades Sorvall RC-5B tsentrifugeerija ja rootorit HS-4. Sööde valati pealt. Kasutati firma *Eppendorf* valmistatud lahused *Solution I*, *Solution II* ja *Solution III*. Rakud suspendeeriti 4 ml külmas lüüsilahuses *Solution I*-s vortex'i kaasabil. Seejärel inkubeeriti lahust 10 min toatemperatuuril ning siis 5 min jääl. Rakud lüüsi 4 ml lahuses *Solution II* ning inkubeeriti uuesti 5 min jääl. Lüüsaat neutraliseeriti 4 ml külma lahuse *Solution III* lisamisega, segati tuubi pöörates. Seejärel inkubeeriti lüsaati jääl 10 minutit ning tsentrifugeeriti lahust 14 000 rpm rotoriga SS-34 4°C juures 10 minuti jooksul. Supernatant pipeteeriti uude 50 ml tuubi ning sellesse segati juurde 10 ml külma *Perfectprep DNA Binding Matrix*-it. Suspensiooni inkubeeriti 5 min jääl. Seejärel valati lahus 50 ml tuubi asetatud kolonnile *Midi Spin Column* ning tsentrifugeeriti 3500 rpm rootoriga HS-4 5 min. Filtraat visati ära ning kolonni lisati 10 ml pesulahust *Diluted Purification Solution* (DPS). Tsentrifugeeriti (rootor HS-4) 4°C juures 3500 rpm 5 minutit. Veel üks kord filtraat visati ära, kolonnile valati peale 10 ml pesulahust DPS ja tsentrifugeeriti 5 min 3500 rpm. Filter asetati uue tuubi peale. Puhastatud plasmiidne DNA elueeriti kolonnist 3 ml *Elution Buffer*-iga, mis oli eelsoojendatud 65°C-ni, tsentrifugeerides 5 min 3500 rpm HS-4 rootoriga. DNA sadestati -20°C juures 70 µl 5 M NaCl, 60 µl *Mussel Glycogeni* ja 6 ml 96% etanooliga umbes 30 minuti jooksul. Seejärel tsentrifugeeriti lahust 13 000 rpm 15 min SS-34 rootoriga 4°C, DNA sade pesti 5 ml 70% etanooliga ning koguti tsentrifugeerides 15000 rpm 4°C juures 20 min, pesti jälle 5 ml 70% etanooliga ning jälle tsentrifugeerides 15 000 rpm 15 min. Etanool eemaldati, DNA sade kuivatati ning lahustati 100-200 µl TE puhvrts.

Transfektsioon

Plasmiidid transfekkeeriti eukarüoodi rakkudesse elektroporatsioonimeetodil. Kasutati COP5/Puro/LT/E2 ja COP5/Puro/LT/EBNA-1 rakuliini. Ühe transfektsiooni

jaoks võeti üks poolkonfluentne 100 mm koekultuuri tass rakke (~2-3 miljonit rakku). Rakkudelt aspireeriti sööde, pesti 2 korda 1x PBS-iga, seejärel lisati tassi kohta 1 ml 0,25% trüpsinilahust, oodati kuni rakud plastiku küljest lahti tulid, suspendeeriti ning koguti rakud 15 või 50 ml koekultuuri tuubi, kus on 5 ml söödet. Seejärel rakud tsentrifuugiti *Eppendorf 5810R* fuugiga 1000 rpm 20°C juures 10 minutit ning aspireeriti sööde ja resuspendeeriti transfektsiooniks vajalikus söötme hulgas (ühe transfektsiooni kohta 250µl), millele oli lisatud Na-BES puhvrit pH 7.5 lõppkonsentratsioonini 5 mM. Küvetis segati 250 µl rakususpensiooni *carrier*'iga (5 µl - 50 µg kandja DNAd - lõhe või heeringa spermi DNA) ja plasmiidse DNA-ga ning elektroporeeriti (*BioRad* Gene Pulser II). Kasutatud pinge ja mahtuvus oli 220 V ning 975 µF. Seejärel pipeteeriti rakud küvetist 4 ml seerumiga söötmesse läbipesemiseks, tsentrifuugiti 1000 rpm 20°C juures 5 minutit. Sööde aspireeriti ning resuspendeeriti rakud värskes söötmes ning kanti 60 mm või 100 mm koekultuuri tassidele. Rakke inkubeeriti koekultuuri plastiktassidel 37°C ja 5% CO₂ sisalduse juures.

Replikatsioonianalüüs (Southern blot)

Transfekteeritud rakkudest teatud ajamomendil eraldati episomaalne või totaalne DNA, sõltuvalt eesmärgist.

Episomaalse DNA eraldamine aluselise lüüsi meetod

Episomaalne DNA eraldati aluselise lüüsi meetodil erinevatel ajapunktidel pärast transfektsiooni. Rakkudelt eemaldati sööde ning tase pesti 2 korda 1x PBSiga. Seejärel lüüsi rakud kandes tassile 600 µl lüüsilahuse I ja lüüsilahuse II segu (suhtes 1:2) ja kallutades plaati, kuni lahus muutus viskoosseks. Tasse hoiti 10 minutit jääl. Seejärel lisati igale tassile 300 µl jahutatud lahust III, kallutati ja hoiti veel 10 minutit jääl. Lüsaaat koguti 1,5 ml tuubidesse ning fuugiti lauafuugiga 13000 rpm 4°C juures 10 minutit. Supernatant kanti üle uude tuubi ja DNA sadestati 0,6 ruumala isopropanooliga. Seejärel tsentrifuugiti 13 000 rpm 4°C juures 10 minutit ja kuivatatud saded suspendeeriti 0,2 ml lahuse IV (20 mM Tris- HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,2% SDS), millele oli lisatud proteinaas K lõppkonsentratsioonini 0,2 µg/µl ja inkubeeriti 65°C juures 30 minutit. Seejärel ekstraheeriti proovid fenool-kloroform-isoamüülalkohol seguga (25:24:1), ning sadestati 2,5 ruumala etanooliga. DNA sade

pesti 70% etanooliga, kuivatati ja suspendeeriti 20 µl TE-s, mis sisaldas 20 µg/ml RNAasi ja inkubeeriti 65°C juures 20 minutit.

Totaalse DNA eraldamine

Totaalse DNA eraldamiseks eemaldati rakkudelt sööde ning tase pesti 2 korda 1x PBSiga. Seejärel lüüsi rakud kandes tassile 600 µl lahust IV, millesse oli lisatud proteinaas K lõppkontsentratsioonini 0,2 µg/µl ja kallutades plaati kuni lahus muutus viskoosseks. Lüsaat koguti 1,5 ml tuubidesse ja inkubeeriti 56°C juures 12-16 tundi. Seejärel lisati võrdne maht fenool-kloroform-isoamüülalkohool segu (25:24:1), tuubi sisu segati *vortex*'il ning tsentrifugeeriti 13 000 rpm 2 minutit. Vesifaas kanti uude 2 ml tuubi ning sadestati 2,5 mahtu 96% etanooliga, sade koguti tsentrifugeerimisel 13 000 rpm 4°C juures 10 minuti jooksul. Sade lahustati 300 µl TE puhvril, mis sisaldas RNAasi lõppkontsentratsiooniga 10 µg/ml ja lahust inkubeeriti 37°C juures 1 tund. DNA sadestamiseks lisati 60 µl 10 M NH₄OAc ja 2 mahtu 96% etanooli ning asetati proovid -20 °C juurde vähemalt 30 minutiks. Tsentrifugeeriti 13 000 rpm 4°C juures 10 minutit. DNA sade pesti 70% etanooliga, kuivatati korralikult ning suspendeeriti 40 µl TE-s. Eraldatud totaalse DNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga lainepikkusel 260nm.

Saadud episomaalset või totaalset DNAd restrikteeriti ensüümiga *DpnI* (tunneb ära ja lõikab siseseid bakteris metüleeritud plasmiidset DNA-d, ei lõika eukarüootse rakus sünteesitud DNA-d) ja lineariseeriva ensüümiga. Restriksioon kestis temperatuuril 37°C juures 12-16 tundi. DNA lahutati elektroforeetilisel (150 V ja 120 mA) 0,8% või 1,2% agarosgeelil 1xTAE puhvril. Pärast foreesi loksutati geeli 15 minutit 0,2 M HCl lahuses (ainult totaalse DNA analüüsil), seejärel denatureeriti loksutades lahuses A (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) 45 minutit ja neutraliseeriti lahuses B (1 M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl) 30 minutit. DNA kanti geelist filtrile („Hybond-N⁺”, *Amersham Pharmacia Biotech*) kapillaarse ülekande abil ning fikseeriti DNA membraanile seejärel UV Starlinker 1800-ga (Stratagene). Filter hübridiseeriti vektor-spetsiifilise prooviga, märgistatud α³² fosforiga. Proovi valmistamiseks kasutati *DecaLabel*TM *DNA Labeling Kit*'i (MBI Fermentas) ja isotoopi α³²P-dCTP (Du Pont NEN). Kõigepealt blokeeriti mittespetsiifiline seondumine preühübridisatsioonisegu abil (6x SSC, 5x Denhardti reaktiiv, 0,5% SDS, 200 µg/ml heeringa spermi kandja DNAd,

mis denatureeriti eelnevalt 100°C juures 10 minutit). Prehübridisatsioon toimus 65°C juures 1 tund. Proovi valmistamiseks segati 1,5 ml tuubis 100-150 ng DNA *template*'it, dekanukleotiidpraimerid, reaktsiooni puhver ning viidi ruumala deioniseeritud veega 40 µl-ni. Segu inkubeeriti 100°C juures 10 minutit ja jahutati seejärel jääl. Lisati 3 µl MixC (-dCTP), 6 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (50µCi) ja 5U Klenowi fragmenti (*exo*-) ning segu inkubeeriti 37°C juures 5-10 minutit. Seejärel lisati 4 µl dNTP segu ning inkubeeriti 37°C juures veel 10 minutit. Reaktsioon peatati 1 µl 0,5 M EDTA lisamisega. Hübridisatsioon kestis 12-20 tundi 65°C juures. Seejärel filtrit pesti 3x 15 minutit pesilahusega I (2x SSC, 0,2% SDS) ja seejärel 3x 15 minutit pesulahusega II (0,2x SSC, 0,1% SDS). Filter kuivatati filterpaberil ja seejärel hübridiseerunud DNA detekteeriti, eksponeerides filtrit röntgenfilmile ja/või kasutades tarkvara *ImageQuant* (Molecular Dynamyc) fosfoimageri.

Transfekteritud rakkude analüüs (läbivoolu tsütomeetria meetod)

Transfekteritud rakke analüüsiti läbivoolu tsütomeetria meetodiga, kasutades *Becton-Dickinson FACS Calibur*, *CellQuest* tarkvaraga. Rakkudelt aspireeriti sööde, pesti PBS-iga, trüpsiniseeriti, suspendeeriti ning koguti pool rakususpensioonist 15 ml koekultuuri tuubi, kuhu oli eelnevalt lisatud värsket söödet. Mõtmiseks kogutud rakud tsentrifuugiti (5 min. 1000 rpm *Eppendorf 5810R*), aspireeriti sööde ja resuspendeeriti PBS-is (1 ml). Ülejäänud rakkudele lisati sobiv kogus söödet ja asetati tagasi 37°C ja 5% CO₂ sisalduse juurde kappi.

Antud katsetes on mõõdetavad kolm parameetrit - saab kindlaks teha osakeste (rakkude) suurus, pinnastruktuuri ja helendamist.

EGFP/d1EGFP ekspressioon oli kvantitatiivselt analüüsitud läbivoolu tsütomeetriaga lainepikkusel 488nm. Rakud analüüsiti 3 minutit ning pandi paika sobiv voolutuskiirus (500-1000 rakku sekundis).

Helenduse detekteerimisel saadud andmed väljastati hiljem graafikutena. Negatiivseks kontrolliks olid kasutuselolevate plasmiididega transfekteritud rakke kasutati rakkude autofluorestsentsi kindlaksmääramiseks. 1% negatiivse kontrolli DNA-ga transfekteritud rakkude autofluorestsentsist arvestati taustafluorestsentsiks.

MO/MME/Neo/GFP ja MO/MME/Neo/dGFP kadumise kineetika oli arvestatud EGFP ekspressiooni andmetest päevade kaupa 0 kuni 57-ni, pEGFP-C1 ja pdEGFP-N1 plasmididele 12 päeva jooksul ning 37 päeva jooksul MO/FR/Neo/dGFP plasmidi

jaoks. Kasutati esimest järku reaktsiooni (*rate-of-loss*) kadumisekineetika mudelit: *rate of loss* (λ) = $(-1/t)(\ln N_t/N_0)$, kus N_0 on fluorestseeruvate rakude protsent katse alguses ja N_t on helendavate rakude protsent t generatsiooni pärast.

TULEMUSED JA ARUTELU

Papilloomi- ja Epstein-Barr'i viiruse genoomid säiluvad peremeesrakkudes kui ekstrakromosomaalsed plasmiidid. Nende viiruste replikoni stabiilne säilumine sõltub vastavatest viiruselistest *cis*-elementidest ja *trans*-faktoritest.

BPV1 transientseks replikatsiooniks piisab minimaalsest originist (MO), stabiilseks ekstrakromosomaalseks säilumiseks on vaja lisaks ka nn. minikromosoomide säilumisjärjestus (MME), mis koosneb E2 valgu seostumiskohtadest. Need on BPV1 poolset minimaalsed *cis*-elemendid viiruse DNA replikatsiooniks. Ainult kaks BPV1 viiruselist valku – E1 ja E2 - on *in trans* vajalikud viiruselise DNA replikatsiooniks viiruse poolt. Papilloomiviiruste E2 valgud reguleerivad viiruste replikatsiooni ja transkriptsiooni ulatust. MME-s olevatele E2 seondumissaitidele kinnituvad viiruse E2 valgud vahendavad viiruse genoomi seondumist peremeesraku mitootilise kromatiiniga, mis on replikatsioonist lahutatav E2 funktsioon.

EBV DNA latentseks replikatsiooniks ja säilimiseks jagunevates peremeesrakkudes on vajalikud latentne replikatsiooni origin – *oriP*, koos selles sisalduva segregatsioonielemendiga FR koostöös EBNA-1 valguga. Sarnaselt BPV1 E2 valgule, seondub ka EBNA-1 ühelt poolt peremeeskromosoomidega ja teiselt poolt - viiruselisel DNA-l olevatele EBNA-1 seondumiskohtadele, kindlustades EBV genoomi kandumise tütarrakkudesse ja stabiilse säilumise.

Vaid hiire polüoomiviiruse kaasabil loodud vektorsüseemid pakuvad omalt poolt küll kiire ja efektiivse võimaluse esitleda ja ekspresseerida võõr-DNA-d permisiivsetes rakkudes. Et see on lüütiline viirus, siis PyV origini plasmiidide replikatsioon on piiratud vaid transientse lühiajalise perioodiga.

Meie laboris olid eelnevalt juba disainitud ori-süsteemid, mis sisaldavad PyV minimaalset origini lingituna BPV1valgu E2 seostumiskohtadele vastavate järjestustega (tavaliselt 2-10 E2BS, mis kokku moodustavad nn. *Minichromosome maintenance* elemendi - MME) või siis EBV-süsteemist FR-elementiga. Nende origini-konstruktide transientseks replikatsiooniks piisab viiruseliste valkude LT ja E2 või siis LT ja EBNA-1 ekspressioonist hiire rakuliinides.

Selliste originiplasmiidide pikaajalise episomaalse säilumise uurimiseks on võimalik kasutada laboris olemasolevaid rakuliine COP5/Puro/LT/E2 ja COP5/Puro/LT/EBNA1, mis konstitutiivselt ekspresseerivad kõiki replikatsiooniks vajalikke viiruselisi valke. Need topelt-ekspresseerivad rakuliinid, kuhu on plaanitud transfekteerida hübriidsete originide konstruktid, on ise puromütsiini resistentsed.

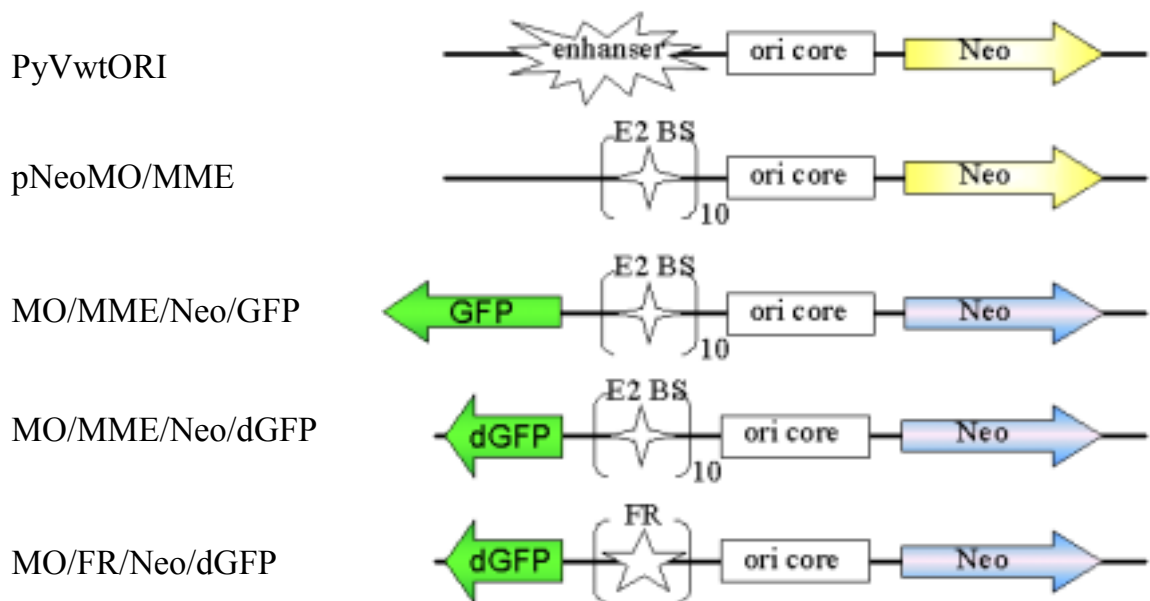
Hübriidsete originiplasmiidide edasine täiustamine ja optimeerimine.

Lähtusin plasmiididest, mis sisaldavad 10 BPV1 E2 seostumiskohta (E2BS) või 20 EBV EBNA-1 seostumiskohta (FR) ja polüoomiviiruse origini ilma enhaanserita (minimaalset origini PyVMO) (vt joonis 12). Nagu oli eespool öeldud, olid mõningad kontrollplasmiidid eelnevalt laboris juba olemas (PyVwtORI ja pNeoMO/MME), neid oli mul plaanis võrrelda minu poolt täiustatud ja täiendatud testplasmiididega.

Rida selliseid testplasmide tuli disainida ja kloneerida.

1. Minu origini konstruktid sisaldavad lisaks võõrgeeni ekspresioonikasseti (esialgselt tühi, olemas vastavad klonerimis-saidid), millesse on haaratud meie laboris eelnevalt väljatöötatud võõrgeeni detekteerimist ja kasutamist hõlplastav E2 tag-ide süsteem. Epitop tag'ide kasutamine rekombinantse DNA tehnoloogias seisneb selles, et valk tehakse immunoreaktiivseks olemasolevate antikehade suhtes kasutades selleks lühikese peptiidse epitoobi lisamist uuritavale valgule (kas valgu N- või C-terminusse), see kergendab suvalise organismi suvalise valgu kodeeriva geeni ekspressiooni testimist ja selle valgu lokaliseerimise kindlakstegemist rakus.
2. Originiplasmiidide stabiilse episomaalse säilumise uurimiseks oli vaja lisada hübriidsetesse vektorsüsteemidesse markergeeninäina fluorestseeruvat valku kodeeriva geeni järjestus (pikaealine võimendatud EGFP või lühiealine destabiliseeritud d1EGFP). Selleks oli võimalik ära kasutada tühi võõrgeeni ekspressiooni kasseti. Kuna GFP valku on võimalik detekteerida ka elavas rakus, oli võimalik kasutada nii mikroskoopi detekteerimiseks, kui sain ma kasutada transfekteeritud rakkude analüüsiks läbivoolu tsütomeetria meetodit. Tag võimaldab määrata valgu taset Western-analüüsil (töötas valgu N-terminuses, pole näidatud).
3. Rakkude jälgimiseks selektsiooni tingimustes on põhikonstruktidesse lisatud ka neomütsiini selektsioonimarkeri ekspresioonikasseti, mis võimaldab kasutada neomütsiini selektsiooni (G418 selektsiooni) hiire rakkudes, samas oli kasseti disainitud selliselt, et võimaldas ka bakterirakkudes plasmidi paljundamisel kasutada kanamütsiini resistentsust (lisatud sai vastav bakteripromootori ala geeni koosseisu), andes seega lisavõimaluse plasmidi mitte liiga suureks paisutada (oli võimalik deleteerida ampitsilliini geeni ala plasmidi koosseisust).

Alljärgnevalt on skemaatiliselt kujutatud põhilised kasutatud plasmiidid (joonis 12):



Joonis 12. Käesolevas töös kasutatud plasmiidid. PyVwtORI on võrdlusplasmiid, mis sisaldab polüoomiviiruse ORI koos enhaanseriga (PyV wt ORI) ja Neo selektsiooni markerit; pNeoMO/MME sisaldab polüoomiviiruse minimaalset ORI koos 10-ne BPV1 E2 valgu seostumiskohaga (E2BS) ja Neo selektsiooni markerit, see on ka võrdlusplasmiid; konstrueeritud plasmiidid MO/MME/Neo/GFP, MO/MME/Neo/dGFP ja MO/FR/Neo/dGFP sisaldavad polüoomiviiruse minimaalset ORI koos kas E2 seostumiskohtadega või FR järjestusega, neomütsiini geeni ja EGFP/d1EGFP valgu kodeerivat järjestust.

Plasmidi MO/MME/Neo/GFP konstrueerimine (lisa 7)

Konstrueerimaks plasmidi, mis sisaldaks CMV promootoriga ja E2Tag'iga tühja ekspressioonikassetti, polüA-d, neo- geeni ekspressioonikassetti, bakteriaalset origini, polüoomiviiruse replikatsiooni origini (MO) ja papilloomiviiruse 10-t E2 valgu seondumiskohta (MME) ning millesse peaks sisestama EGFP kodeeriva järjestuse, kasutasin algkonstrukti QCTMOE2pA (lisa 5) ja kommertsiaalset pEGFP-C1 plasmidi (lisa 1).

QCTMOE2pA konstrukti lõikasin *XbaI* ja *BamHI* ensüümidega (lisa 5), restriksioonisegule lisasin aluselist fosfataasi. Lõigatud DNA fragmendid lahutasin geel-elektroforeesil (0,8% agarosgeelis) ning suurema DNA fragmeendi puhastasid kasutades eespool kirjeldatud geelist DNA fragmentide puhastamise meetodikat.

pEGFP-C1 plasmidi lõikasin *NheI* ja *BamHI* ensüümidega (lisa 1). Lõigatud DNA fragmendid lahutasin geel-elektroforeesil. Vajalik DNA fragment on 821 bp, puhastasid selle geelist.

Restriktsiooni teel plasmiididest QCTMOE2pA ja pEGFP-C1 saadud vastavad fragmendid ligeerisin kokku. Vaatamata sellele, et need plasmiidid olid lõigatud erinevate restriктаasidega, saab neid ligeerida, sest et ensüümid *NheI* ja *XbaI* annavad omavahel sobivad otsad.



XbaI

NheI

Joonis 13. Restriktsiooni saidid ensüümidele *XbaI* ja *NheI*.

Rakke transformeeriti nagu on kirjeldatud eespool. Kloneeritud plasmidi minipreppe kontrollisin agarosforeesil suuruse järgi võrrelduna lähteplasmiidiga QCTMOE2pA ning seejärel restriktionanalüüsiga. Õiget plasmidi nimetasin **MO/MME/Neo/GFP**.

Plasmidi MO/MME/Neo/dGFP konstrueerimine (lisa 8)

MO/MME/Neo/GFP (lisa 7) plasmiidist asendasin täispika roheliselt fluorestseeruva valgu (wtEGFP) geeni kodeeriva ala destabiliseeritud variandiga roheliselt fluorestseeruvast valgust (d1EGFP), mille poolestusaeg on 1 tund. See vahetus oli mõeldud vältimaks pikaajalise valgu järelfluorestsentsi, seda eriti lühikese ajaperioodi testimistes.

Edasiseks kloneerimiseks kasutasin pd1EGFP-N1 (lisa 2) plasmidi, mida lõikasin *SnaBI* ja *MunI* ensüümidega. Lõigatud DNA fragmendid lahutasin geel-elektroforeesil ning puhastasin, vajalik fragment, mis sisaldab CMV promootorit ja d1EGFP valgu kodeerivat ala on 1292 aluspaari pikkune.

MO/MME/Neo/GFP plasmidi lõikasin samade ensüümidega (*SnaBI* ja *MunI*) (lisa 7). Lõigatud fragmendid töötlesin CIAP-iga. Sellest plasmiidist edasiseks kloneerimiseks on vajalik 3841 aluspaari pikkune fragment, mis sisaldab 10-t E2 valgu seondumiskohta ja polüoomiviiruse replikatsiooni minimaalset origini, CMV promootorit, polüA-d, SV40 varast promootorit, kanamütsiini/neomütsiini resistentsuse geeni. Fragmendi eraldas geel-elektroforeesil, puhastasin.

Restriktsiooni teel plasmiididest MO/MME/Neo/GFP ja pd1EGFP-N1 saadud vastavad fragmendid ligeerisin. Kloneeritud plasmidi miniprepid kontrollisin suuruse

järgi agarosforeesil võrrelduna lähteplasmiidiga MO/MME/Neo/GFP ja seejärel restriksioonanalüüsiga. Plasmiidi nimetasin **MO/MME/Neo/dGFP**.

Plasmiidi MO/FR/Neo/dGFP konstrueerimine (lisa 9)

Selle konstrukti puhul oli eesmärgiks vahetada ära hübriidsete originide kassetid, minna üle polüoomi-papilloomi süsteemilt polüoomi- Epstein-Barr'i viiruse süsteemile. MO/FR/Neo/dGFP plasmiidi kloonimiseks kasutasin olemasolevat MO/MME/Neo/dGFP plasmiidi ja algplasmiidi pUCMO/FR (lisa 6). MO/MME/Neo/dGFP plasmiidist fragmendi 10-ne E2 valgu seondumiskohaga ja polüoomiviiruse minimaalse replikatsiooni originiga asendasin pUCMO/FR plasmiidist võetud järjestusega, mis sisaldab 20 EBNA-1 valgu seondumiskohta (FR) ja polüoomiviiruse minimaalset replikatsiooni origini (MO).

Kuna MO/MME järjestuse väljalõikamiseks ei leidnud ühtegi sobivat üksiklõikamissaiti, kasutasin osalist restrikteerimist. Restriksiooni viisin läbi enne ühe ensüümiga (*EclI36II*). Lõikamine toimus 37°C juures 5 minuti jooksul, rohelistes 1x puhvril, mille ensüümi efektiivsus on ainult 20-50%. Reaktsiooni panin 0,1 ühikut ensüümi. Kontrollisin restriksiooni foreesil, lõikasin välja lineaarse fragmendi, puhastasin geelist ja lõikasin seda lineaarset fragmenti *SbfI* (*Fermentase* analoog *SdaI*) ensüümiga. Sellest plasmiidist edasiseks kloonimiseks vajalik fragment oli 4692 aluspaari pikkune (lisa 8).

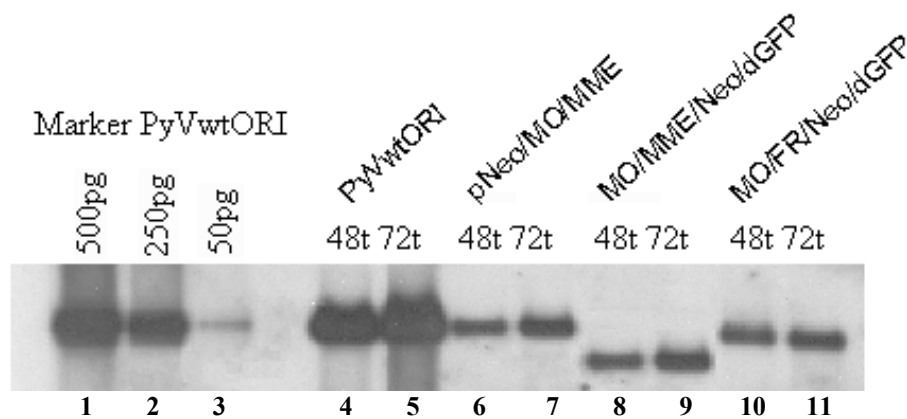
Plasmiidi pUCMO/FR lõikasin sama ensüümidega *SdaI* ja *EclI36II*. Fragmendi eraldas geel-elektroforeesil, edasiseks kloonimiseks oli vajalik 957 aluspaari pikkune fragment, mis sisaldas MO/FR järjestus (lisa 6). Vajaliku fragmendi lõikasin geelist välja, puhastasin, kasutades eespool kirjeldatud meetodit.

Restriksiooni teel plasmiididest MO/MME/Neo/dGFP ja pUCMO/FR saadud vastavad fragmendid ligeerisin. Rakud transformeerisin. Kloonitud plasmiidid kontrollisin restriksioonanalüüsiga. Saadud plasmiidi nimetasin **MO/FR/Neo/dGFP**.

Hübriidsete originiplasmiidide transientse replikatsioonivõime testimine hiire rakkudes

Hübriidse origini ümberdisainitud plasmiidid, mis sisaldavad PyV minimaalset origini seotuna BPV1 MME-elementiga (MO/MME/Neo/GFP ja MO/MME/Neo/dGFP), peaks eelduste kohaselt initsieerima replikatsiooni PyV LT ja BPV1 E2 juuresolekul kaksikekspreseerivas hiire rakuliinis COP5/Puro/LT/E2. Transientne ehk lühiajaline replikatsiooni analüüs on neis rakkudes minu poolt läbi viidud. Uuritavate plasmiidide replikatsiooni signaale saan võrrelda eelnevalt testitud nn. metsikut tüüpi ehk wt täispika PyV origini konstrukti replikatsiooni signaaliga ja eelnevalt küllalt hästi PyV DNA replikatsiooni initsieerinud konstruktiga pNeoMO/MME, milles hübriidne origini kassett on analoogne minu poolt kasutatutega. Varasemas hübriidse origini konstrukti pNeoMO/MME on olemas erinevused võrrelduna minu GFP-seeria konstruktidega, mis seisneb selles, et seal olev neomütsiini geen lubab küll G418 selektsiooni eukarüootides, kuid ei võimalda kanamütsiini resistentsust bakteris (plasmidi paljundamiseks kasutatakse Amp^R), sest neo geeni koosseisus puudub vastav bakteri-promootori ala, mis minu konstruktidest sai lisatud, andes neomütsiini geeni alalt kaheüsteemse selektsiooni võimaluse (Neo^R/Kan^R), millega seoses vähenes plasmiidide suurus ampitsilliini geeni võrra. Ka on lisatud võõrgeeni kassett (antud juhul sisaldab see GFP kodeerivat ala). PyV wt origin (PyVwtORI) koosneb *core*-originist (ehk minimaalsest originist ehk MO) ja kõrvalolevast polüoomiviiruse enda enhaanserelementist, mis varasemates katsetes oli küll hea initsieerija, aga tal puudus stabiilsust tagav funktsioon, seda nii LT kui ka LT/E2 juuresolekul (I.Hääle avaldamata andmed).

Rakkudesse viidi elektroporatsiooni teel võrdne kogus lähteplasmidi, ajapunktid võeti 48 ja 72 tunni möödudes poratsiooni algusest, kusjuures eraldasid episomaalse madalmolekulaarse DNA vastavalt eespool antud eeskirjale. Foreesimarkeritena kasutasin lineaarseks lõigatud PyVwtORI konstrukti, ka olid replitseeruvad DNA sãmplid lineariseeritud.



Joonis 12. Transientse replikatsiooni analüüs 48 ja 72 tundi pärast poratsiooni. COP5/Puro/LT/E2 ja COP5/Puro/LT/EBNA1 rakkudesse transfekteeisin 0,5 µg vastavat origini konstrukti. Eraldatud episomaalse DNA proovid restrikteerisin lineariseeriva ensüümiga *MluI*. Reaktsioonisegusse lisasin ka *DpnI*, mis on bakteri-metülatsiooni tundlik ja lõikab tükkideks vaid sisseviidud bakteris paljundatud DNA-d (jääb geelis alla äärde, pole näidatud).

Replikatsiooni analüüs näitab, et transfekteeeritud uuritav plasmiidid MO/MME/Neo/dGFP (joonis 12 rada 8-9) initseerib replikatsiooni sama efektiivsusega nagu teeb seda võrdlusplasmiid pNeoMO/MME (joonis12 rada 6-7). Järeldus siit – minu poolt sisseviidud ümberkorraldused origini plasmidi koosseisus pole muutnud selle võimet küllalt efektiivselt initseerida replikatsiooni LT/E2 rakuliinis. Polüoomiviiruse enhaanserita minimaalse orini analoogne plasmiid annaks vaid vaevumärgatava väga nõrga replikatsiooni signaali (mitte näidatud, T. Silla, I. Hääle avaldamata andmetest). Ühegi PyV/BPV1 MO/MME süsteemi hübriidse originikonstruktide puhul pole DNA amplifikatsiooni tase siiski võrreldav kõrge amplifikatsiooni tasemega, mis vastaks wt polüoomiviiruse originiplasmidi replikatsioonisignaali tasemele (rajad 4-5).

Replikatsioonivõime ülesvõimendamise samavõrdsele võrreldavale tasemele MO/MME süsteemiga on saavutatav ka polüoomiviiruse enhaanserita minimaalse origini kõrvale linkides enhaanserelemendiks EBV FR elemendi, mis sisaldab korduses EBNA-1 valgu äratundmise saite (MO/FR/Neo/dGFP rada 10-11, LT/EBNA-1 positiivne rakuliin). Kuigi võrrelduna metsiktüüpi PyV originiplasmiidiga (PyVwtORI) on replikatsiooni signaal ka siin siiski nõrgem (joonis 12 rajad 11-12 võrrelduna radadega 4-5).

Labori varasematest kogemustest on teada, et originiplasmiidide stabiilseks säilimiseks peab algne amplifikatsioon siiski toimima, samas wt polüoomiviiruse origini

plasmiid vaatamata oma kõrgele ülesamplitseerumisele ei püsi stabiilsena ei LT, ei LT/E2 hiire rakuliinis.

Hübriidsete originiplasmiidide stabiilse replikatsioonivõime testimine

Edasine töö oli suunatud kontrollimaks, kas konstruktid MO/MME/Neo/GFP, MO/MME/Neo/dGFP ja MO/FR/Neo/dGFP jäävad episomaalselt ja stabiilselt püsima. Pikaajast hübriidsete originiplasmiidide jälgimist võimaldas neomütsiini geeni ekspressioonikassett, mis võimaldas G418 selektsiooni transfekteeritud rakuliinides COP5/Puro/LT/E2 ja COP5/Puro/LT/EBNA-1. Pikema ajaperioodi vältel, umbes kaks kuud ja rohkem analüüsiti nii episomaalset kui kogu st. totaalset DNA-d. Katsed viidi läbi nii selektsiooni tingimustes kui selektsioonita. Kuna origini plasmiidid sisaldavad neomütsiini markergeeni, aga COP5-põhinevad rakuliinid on ise puromütsiini resistentsed, siis annab see võimaluse selekteerida hübriidsed plasmiidid neomütsiini järgi (G418) ja tagada/kontrollida puromütsiini järgi E2 või EBNA-1 olemasolu rakkudes. Üldjuhul topeltselektsiooni siiski ei kasutatud, kuna see kippus olema liiga ränk rakkudele.

Ori-plasmiididega transfekteeritud COP5/Puro/LT/E2 ja COP5/Puro/LT/EBNA-1 rakke selekteerisin kasutades antibiootikumi G418 lõppkontsentratsiooniga 800µg/ml. Transfekteeritud rakud hoidsin pidevalt kasvamas ja passeerisin neid selektiivsetes tingimustes 2 - 3 kuud. Vajadusel periooditi paralleelselt kasvatasin rakke ka mitteselektiivsetes tingimustes. DNA analüüs toimus paralleelselt kineetika testimistega, viimast võimaldas rohelise helendava valguga ekspressioonikassett. GFP-ekspressiooni mõõdeti võrdlevalt nii pika- kui lühikese poolestusajaga valguga vormidele (EGFP ja d1EGFP). DNA analüüsi andmed on esitatud alljärgnevalt koos FACS-i mõõtmistega.

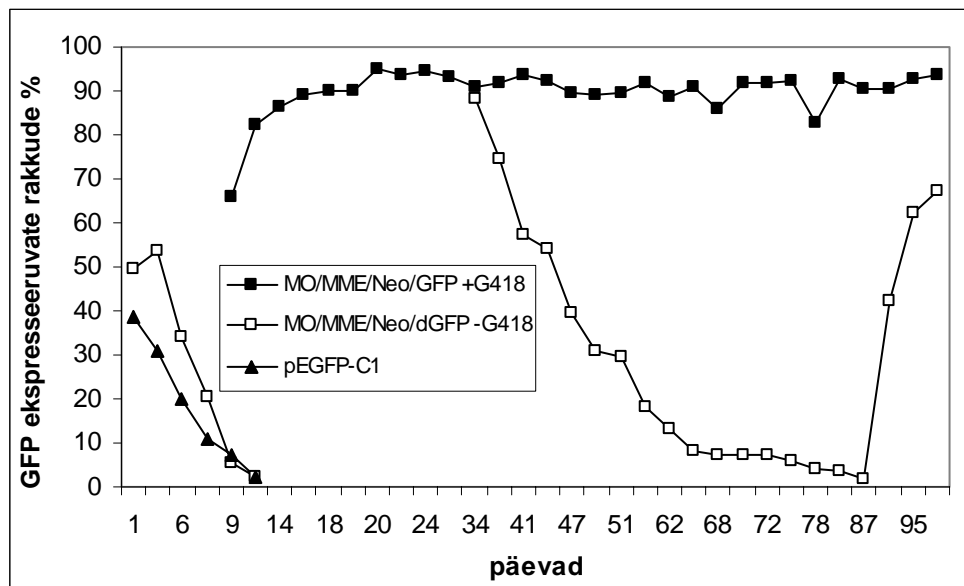
Transfekteeritud rakkude analüüs FACS-il (läbivoolu tsütomeetria analüüs)

Geeniteraapia vektorites ja muudeski hübriidsetes ekspressioonisüsteemides on oluline saavutada meid huvitava võõrgeeni pikaajaline piisaval tasemel tootmine uuritavas testsüsteemis. Hübriidsete plasmiidide säilimisvõimet ja kadumise kineetikat

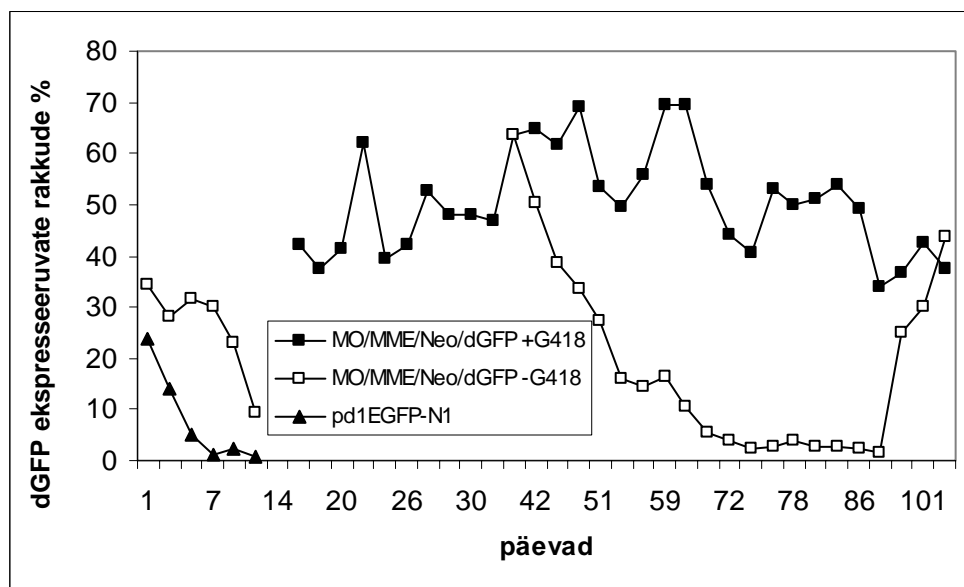
võimaldas kasutada võõrgeeni kassetti sisseviidud helendava valgu EGFP geenijärjestus. Analüüsisin kasutades läbivoolu tsütomeetria meetodit (Becton-Dickinson FACSCalibur System). COP5/Puro/LT/E2 (hiljem ka COP5/Puro/LT/EBNA-1) rakke transfekteerisin hübriidsete ori-plasmiididega, kasutades eespool kirjeldatud meetodikat. Negatiivse kontrollina kasutasin *carrier* DNA-ga transfekteeritud rakke, mille abil oli võimalik eristada rakkude autofluorestsentsi uuritava EGFP fluorestsentsist. Seejuures lahutatakse rakkude autofluorestsentsist umbes 1% maha ning see loetakse taustafluorestsentsiks. Taustafluorestsents lahutatakse hiljem GFP valgu fluorestsentsist. Positiivse kontrollina kasutasin kommertsiaalseid pEGFP-C1 ja pd1EGFP-N1 plasmide.

Esiteks, kontrollisin polüoomiviiruse minimaalset origini ja papilloomiviiruse MME elementi sisaldavaid plasmide nende võime osas säiluda stabiilselt rakkudes ja kindlustada sellega GFP-d sisaldavate rakkude hulga säilumine populatsioonis, mis kindlustab uuritava testgeeni pikaajalise produktsiooni - helendava valgu ekspressiooni. MO/MME/Neo/GFP ja MO/MME/Neo/dGFP plasmiididega transfekteeritud rakud passeerisin selektsiooni tingimustes 98-101 päeva (oli tehtud mitu paralleelset katset mõlema konstrukti korral). Igal passeerimisel võtsin teatud ajaperioodi järel (enamasti 2 päeva tagant) osa rakke selleks, et määrata EGFP-d (d1EGFP-d) ekspresseerivate rakkude arvulist suhet läbivoolu tsütomeetria meetodil. Fluoresteerivate (EGFPd ekspresseerivate) rakkude protsendi arvutasin iga ajapunkti võtmisel ning saadud andmed väljastasin graafikutena. Pika elueaga EGFP-d ekspresseeritavate rakkude korral fluorestsentsi tase tõusis selektsiooni tingimustes (G418) maksimumi lähedale (ca 90%) (joonis 13), lühiealise destabiliseeritud d1EGFP (eluga 1 tund) tase kõikus rohkem, olles 40-70% vahel (joonis 14). Võrdlevalt kasutati kaht helendava valgu süsteemi arvates, et probleemiks võiks olla järelhelendus pikaajalise valgu puhul, seda eriti lühemate testimisperioodide korral.

Kui rakkudele, mis olid pikema perioodi vältel kasvanud selektsiooni tingimustes, jäänud püsima teatud ekspressiooni tasemele (ca 90% EGFP korral ja ca 40% d1EGFP korral), vahetasin söötme ilma antibiootikumi lisamiseta, siis 55 päeva jooksul langes EGFP-d sisaldavate rakkude tase 90%-lt kuni alla 1-2%-ni (ja ca 40%-lt kuni alla 1%-ni d1EGFP korral). Seejärgsel selektsiooni taastumisel (sööde sisaldas uuesti antibiootikumi), taastus EGFP ekspresseerivate rakkude tase jälle endistele tasemetele (joonised 13, 14).



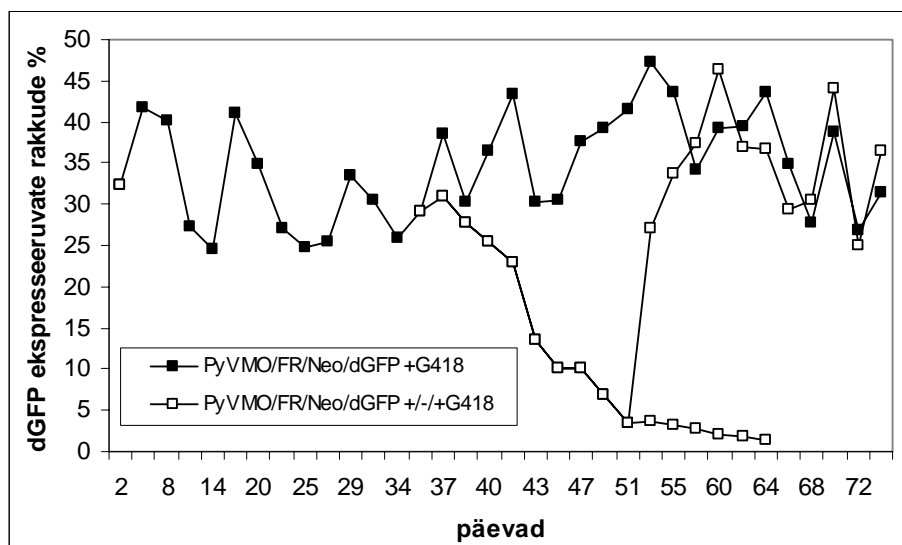
Joonis 13. EGFP ekspressioon COP5/Puro/LT/E2 rakkudes selektiivsetes ja mitteselektiivsetes tingimustes (MO/MME/Neo/GFP).



Joonis 14. d1EGFP ekspressioon COP5/Puro/LT/E2 rakkudes selektiivsetes ja mitteselektiivsetes tingimustes (MO/MME/Neo/dGFP).

Teiseks, analüüsisin polüoomiviiruse MO-d ja Epstein-Barr'i viiruse FR elementi sisaldavate hübriidsete plasmiidide võimet pikaajaliselt säiluda. COP5/Puro/LT/EBNA-1 rakke transfekeeriti MO/FR/Neo/dGFP plasmiidiga. Rakke passeerisin seleksiooni tingimustes 74 päeva vältel (oli tehtud mitu paralleelset katset). Igal passeerimisel võtsin osa rakke välja d1EGFP ekspresseerivate rakkude tuvastamiseks. Saadud andmed on kajastatud graafikutena. Destabiliseeritud d1EGFP-d ekspresseeritavate rakkude tase oli seleksiooni tingimustes 35 – 40% (joonis 15),

mitteselektiivsetes tingimustes langes aga d1EGFP-d sisaldavate rakkude arv kuni 1-2 %-ni 37 päeva jooksul. Pärast G418 selektsioon taastamist, taastus endine tase uuesti. (joonised 15).

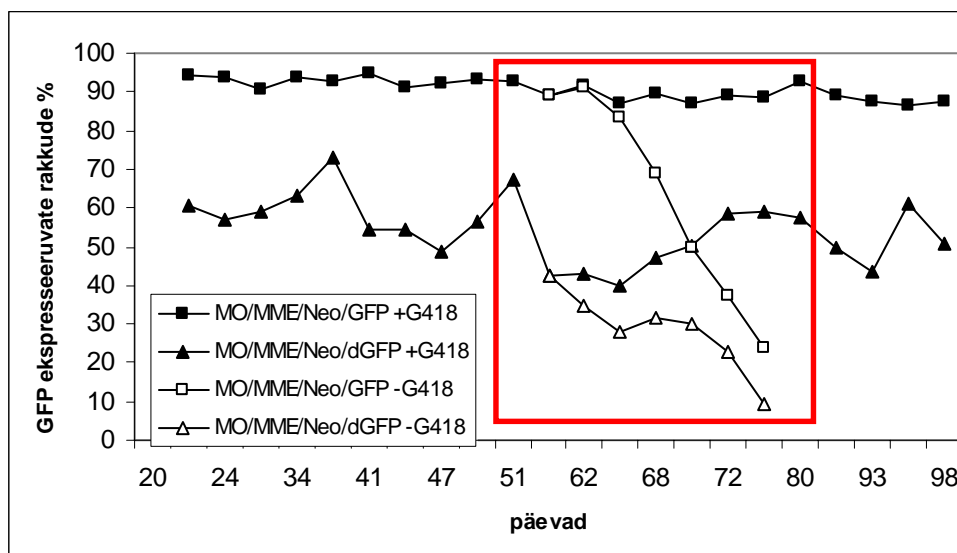


Joonis 15. d1EGFP ekspressioon COP5/Puro/LT/EBNA-1 (MO/FR/Neo/dGFP) rakkudes selektiivses ja mitteselektiivses tingimustes.

Nende katsete tulemustest selgus, et hübriidsed plasmiidid MO/MME/Neo/GFP, MO/MME/Neo/dGFP ja MO/FR/Neo/dGFP säiluvad rakkudes pika perioodi jooksul. Nagu oli näidatud, selektiivses tingimustes säiluvad nad 2-3 kuud, kindlustades sel viisil testgeeni pikaajalise produktsiooni.

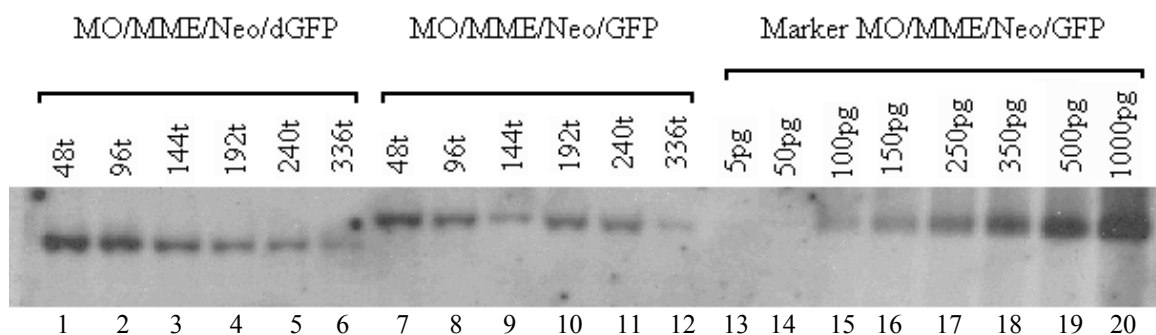
Episomaalses olekus säilumise testimine

Katsete jooksul, kui selektsiooni surve oli ära võetud, helenduva valguga fluorestseerunud MO/MME/Neo/dGFP- ja MO/MME/Neo/GFP-transfekteeritud COP5/Puro/LT/E2 rakuliinis hakkas aja jooksul ära kaduma. Põhjused, mis tingivad helenduse kadumise võivad olla mitmesugused: plasmidi ebahühtlane jaotumine rakkudes, plasmidi kadumine üldse rakkudest või EGFP ekspressiooni juhtiva CMV promotori inaktivatsioon jms. Selleks, et enam selgitada fluorestseerumise kao põhjusi, analüüsisin paralleelselt FACS analüüsile rakkudes oleva viiruselise DNA sisaldust. Rakkudele, mis sisaldavad hübriidset originiplasmidi ja mis olid olnud eelnevalt genetiisini selektsiooni all 56 päeva, vahetasin tavalise antibiootikumita söötme (joonis 16 riskülikuga tähistatud ala).



Joonis 16. Fluorestseerivate rakkude % (MO/MME/Neo/GFP ja MO/MME/Neo/dGFP sisaldavate rakkude %) G418 seleksioonil ja ilma seleksioonita. Ajapunktides, kus on jälgitud EGFP ekspressiooni kadu (punases ruudus), on võetud paralleelselt ka totaalne DNA analüüsiks.

Peale seleksiooni eemaldamist iga teine päev lisaks FACS-i mõõtmistele eraldasid rakkudest ka totaalset DNA, kasutades eespool kirjeldatud meetodikat. Paralleelselt jätkasin EGFP-sisaldavate plasmiidide kadumise kineetika mõõtmist läbivoolutsütomeetria meetodil (FACS-il). See katse kestis umbes kaks nädalat. Igast ajapunktist sarnaselt korjatud totaalset DNA-st võtsin analüüsiks 10µg ja lineariseerisin seda *MluI* ensüümiga, lahutasin elektroforeetilisel 0.8% agarosgeelis. Markerina kasutasin lineariseeritud MO/MME/Neo/GFP plasmidi (5-1000 pg). Filtri hübridiseerisin vektori-spetsiifilise prooviga. Hübridiseerunud DNA-d detekteerisin eksponeerides filtrit fosfoimageris ning kvantiteerisin saadud replikatsiooni signaalidele vastavad bändid kasutades tarkvara *ImageQuant* (Molecular Dynamyc) (joonis 17).

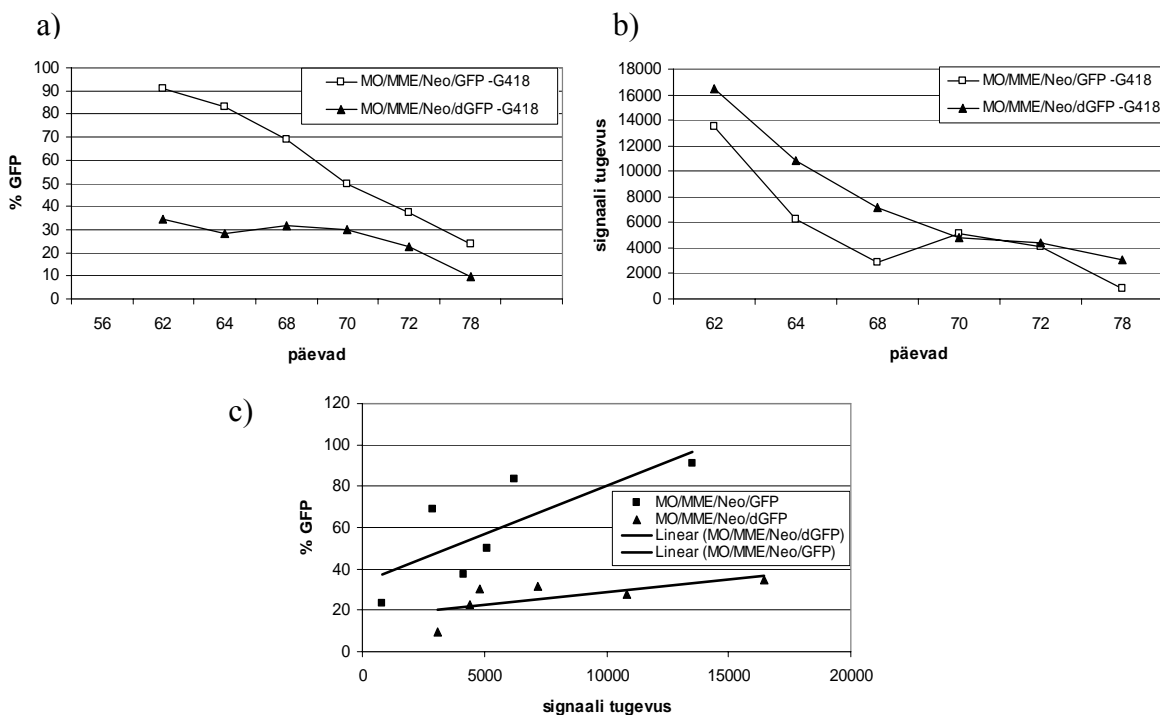


Joonis 17. Southern blot analüüs replikatsiooni produktidele. Ajapunktid 48, 96, 144, 192, 240, 336 tunni möödudes seleksiooni surve mahavõtmisest. Pildil on näidatud totaalne DNA (mis sisaldab endas ka episomaalse DNA), mis oli lõigatud lineariseeriva *MluI* ensüümiga. Rajad 1-6

– 10 µg totaalset DNA-d MO/MME/Neo/dGFP plasmidi sisaldavatest rakkudest; 7-12 – 10 µg totaalset DNA-d MO/MME/Neo/GFP plasmidi sisaldavatest rakkudest ja 13-20 – markerplasmid MO/MME/Neo/GFP (5 – 1000 pg).

Totaalse DNA analüüs näitas, et uuritavad plasmiidid pole integreerunud ja on põhimõtteliselt võimelised püsima väga kaua episomaalsena rakkudes, seda selektsiooni lisandumisel. Episoomide arv selektsiooni äravõtmisel järkjärgult väheneb rakupopulatsioonis, mis viitab pigem replitseerunud plasmiidide ebaühtlasele segregatsioonile tütarakkude vahel, mis viib plasmiidide järkjärgulisele vähenemisele.

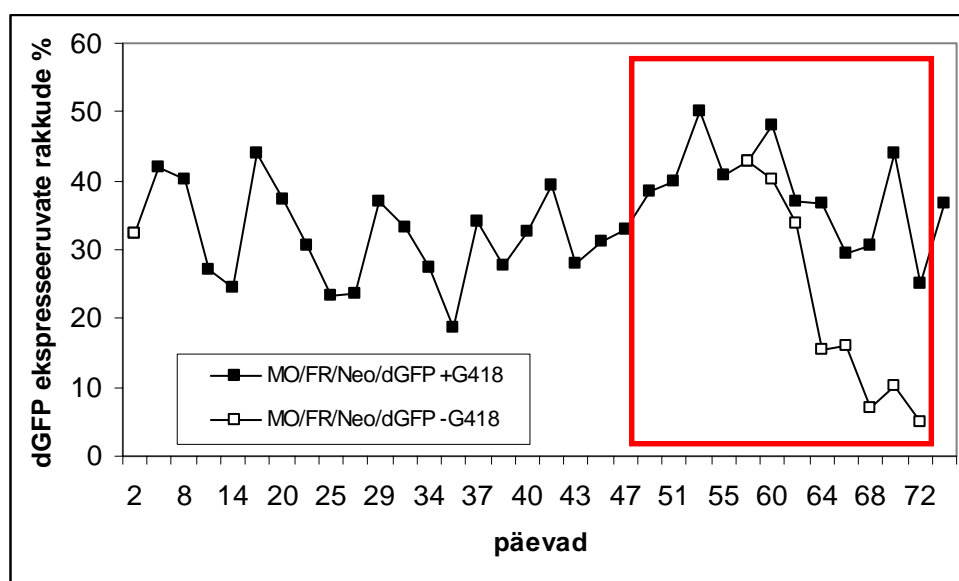
Nagu eespool oli märgitud, samaaegselt totaalset DNA eraldamisega paralleelselt mõõtsin EGFP fluorestseeruvate rakkude taset FACS-iga. Mõlema katse andmetel on koondatud ühele graafikule ja languse kõverad on teineteisega võrreldavad (joonis 18).



Joonis 18. MO/MME/Neo/GFP ja MO/MME/Neo/dGFP kadumise kineetika. (a) MO/MME/Neo/GFP ja MO/MME/Neo/dGFP plasmiidide rakkudest kadumise kineetika, mis oli mõõdetud helenduse kadumist testides kasutades läbivoolu tsütomeetria meetodit. (b) MO/MME/Neo/GFP ja MO/MME/Neo/dGFP plasmiidide rakkudest kadumise kineetika, mis oli analüüsitud DNA kadumissignaali kvantiteerimisega. (c) Läbivoolu tsütomeetriaga saadud andmed võrrelduna episomaalse DNA sisalduse mõõtmise andmetega rakkudest, mõlemad katsed olid tehtud paralleelselt, rakud kasvasid mitteselektiivsetes tingimustes.

Analoogne kadumise katse oli tehtud rakkudega COP5/Puro/LT/EBNA-1 rakuliinis, kuhu oli transfekteeritud MO/FR/Neo/dGFP hübriidne originiplasmid.

Rakkudele, mis oli 57 päeva selektsiooni surve all, panin ilma antibiootikumita söötme. Fluorestseeruvate rakkude protsent (40%) hakkas langema (joonis 19). Analoogselt eelmise katsega oli korjatud totaalne DNA ja ka mõõdetud läbivoolutsütomeetria meetodiga rakkude EGFP helendust. Korjatud totaalsest DNAST 10 μ g sai lineariseeritud *MluI* ensüümiga, kantud agarosforeesile. Saadud bändid, mis vastavad stabiilse replikatsiooni signaalidele kvantiteerisin kasutades tarkvara *ImageQuant* (Molecular Dynamics). DNA analüüsi tulemused olid analoogsed ja ei ole näidatud, küll aga on toodud kvantiteerimise tulemused. FACS analüüsil ja kvantiteerimisel saadud andmed vormistasin võrdlevate graafikutena.



Joonis 19. Fluorestseeruvate rakkude % G418 selektsioonil ja ilma selektsioonita (MO/FR/Neo/dGFP transfektsioon COP5/Puro/LT/EBNA-1 rakuliinis). Ajapunktides (välja toodud punases ruudus), kus jälgiti EGFP-positiivsete rakkude kadu selektsiooni puudumisel, oli samal ajal võetud totaalse DNA proov.

Nii läbivoolu tsütomeetria andmed kui ka DNA eraldamise katsed tõendavad erinevate testimise mooduste kokkulangevust. DNA kadumise languskõverad, mis saadi nende erinevate meetoditega, on võrreldavad.

Plasmiidide kadumise kineetika

Transfekteeritud rakuliinid COP5/Puro/LT/E2 (MO/MME/Neo/GFP, MO/MME/Neo/dGFP transfektsioon) ja COP5/Puro/LT/EBNA-1 (MO/FR/Neo/dGFP

transfektsioon) kasvasin eksperimendi alguses selektsiooni tingimustes, nagu on kirjeldatud materjali ja meetodika osas. Fluorestseeruvate rakkude protsent oli 90% ja 40% plasmiidides, mis sisaldasid vastavalt kas EGFP või d1EGFP. Fluorestseeruvate rakkude protsent langes pärast G418 selektsiooni eemaldamist. Vähenenud EGFP/d1EGFP ekspresseerivate rakkude protsent arvestati igal võetud ajapunktil (iga 2. päev) (joonis 16, 19). Kuna mitteselektiivsetes tingimustes kaovad enamik episoomse 2-3 nädala jooksul rakkudest ära, siis iga plasmidi kohta oli arvestatud kadumise kineetika ja see on esitatud tabeli kujul (Tabel 1), vastavad graafikud on toodud lisades.

Selleks, et iseloomustada kadumise kineetikat st. kiirust, kasutati esimest järku reaktsioonile vastavat arvutust: (*rate-of-loss*) kadumise kiirus (λ) = $(-1/t)(\ln N_t/N_0)$, kus N_0 on fluorestseeruvate rakkude protsent katse alguses ja N_t on helendavate rakkude protsent t generatsiooni pärast. Kadumise kiirust oli võrreldud mittereplitseeruvate võrdlusplasmiididega. Uuritavatest plasmiididest, mis sisaldavad MO/MME süsteemi, kadumise kiirus rakkude generatsioonis oli ca 6%, mida loetakse piisavalt heaks (Wade-Martins, R. *et al.*, 1999). MO/FR süsteemis on see veidi kiirem –13-14% ning kontroll plasmiidide kadumise kiirus oli 22-30%.

Tabel 1. Kontroll-plasmiidide (ei oma replikatsiooni origini) ja uuritavate hübriidsete originiplasmiidide kadumise kiirus generatsioonis. Esitatud on erinevate test-seeriade andmed.

Plasmiidid	Rakkude kadumise kineetika generatsioonis (%)
MO/MME/Neo/GFP 1. Seeria	5.48
MO/MME/Neo/GFP 2. Seeria	6.46
MO/MME/Neo/dGFP 1. Seeria	6.55
MO/MME/Neo/dGFP 2. Seeria	5.87
MO/FR/Neo/dGFP 1. Seeria	13.08
MO/FR/Neo/dGFP 2. Seeria	13.55
Kontroll plasmiidid	
pEGFP-C1	21.7
Pd1EGFP-N1	29.75

JÄRELDUSED

Oleme konstrueerinud kaks kasutatavat erinevat episomaalset hübriidset vektorsüsteemi, mis põhinevad

1. hiire polüoomiviirusel (PyV) ja veise papilloomiviirusel tüüp 1 (BPV);
2. hiire polüoomiviirusel (PyV) ja Epstein Barr viirusel (EBV).

Miks siis ikkagi ei ole hea vaid näiteks BPV1-l põhinev vektorsüsteem? E2 valk BPV1 süsteemis võib töötada kui transkriptsiooni enhaanser, kui replikatsiooni enhaanser ja ka kui adaptervalk, mis kindlustab viiruse genoomi kandumise tütarakkudesse. Selleks seostub E2 ühelt poolt oma seostumissaitidele (E2BS) viiruse genoomis ja teiselt poolt mitootilise raku kromatiinile.

E2 sidumissaitidest kunstlikult koostatud tandem-element (6-10 E2 BS #9 – tugev sidumise affiinsus) koos BPV1 *core*- origini elemendiga (minimaalne origin – MO) originiplasmiidi koosseisus võimaldab E2 valgul täita kõiki eelpool mainitud funktsioone. Selline element (säilumis-funktsioonis kui *minichromosome maintenance* element – MME) koos E2 kui adaptervalguga kindlustab põhimõtteliselt veise papilloomiviirusel tüüp 1 (BPV1) põhinevatele episomaalsetele vektoritele edasikandumise tütarakkudesse ja peaks võimaldama pikaajalise säilumise.

E1 ja E2 valk on vajalikud *trans*- faktorid papilloomiviiruse originiplasmiidide replikatsiooniks.

Miks BPV1-l põhinevad universaalsed vektorid, mis koosneks vaid BPV1 viiruselise DNA replikatsiooni *cis*- ja *trans*- elementidest ei ole leidnud massilist kasutust? Üks põhjustest seisneb tõenäoliselt selles, et on väga raske saavutada esialgset kõrget amplifikatsiooni taset kunstlikus süsteemis. Et nii valk E2 kui viiruseline replikatsioonivalk E1 täidavad hulk funktsioone, on nende valkude ekspresseerimine rakus viiruse elu eri etappidel erinev ja komplitseeritud. Tänapäevani ei ole leitud sobivat süsteemi E1 ja E2 õige vahekorra reguleerimiseks, kindlustamiseks selliste BPV1 originiplasmiidide algne amplifikatsioon ja edasine pikaajaline säilumine rakkudes (labori senised kogemused BPV1 süsteemis).

Seetõttu olid meie lootused pandud hübriidsetele süsteemidele. Et polüoomiviiruste infektsioonis algne amplifikatsiooniline replikatsioon on väga võimas, viies viiruse koopia arvu väga kõrgele, siis sellest lähtuvalt ka meie püüde mõistlikult ära kasutada seda polüoomiviiruste efekti. Mudelsüsteemiks valisime esialgu hiire polüoomiviiruse (PyV).

Polnud mõistlik kasutada wt- origini *in cis* koos vajaliku LT-ga *in trans*, mis kippus üle töötama. Kõigepealt eemaldasime wt polüoomiviiruselt enhaanser elemendi ja jätsime alles *core* origini, mis veel LT juuresolekul rakkudes replitseerub, kuigi minimaalsel tasemel. Oli mõistlik asendada wt enhaanser-element kunstlike enhaanser-elementidega teistest viirusest.

Järeldus 1: Oleme tõestanud, et on võimalik anda ja säilitada algne replikatsiooni võimendusefekt hiire rakuliinis hübriidsele viiruselisele origini-süsteemile, mis koosneb polüoomiviiruse (PyV) MO-st *in cis* ja LT valgust *in trans* vähemalt kahel juhul:

- a) kui enhaanseri asendus-elementideks *in cis* on tandemina paigutatud seostumissaidid BPV1 valgule E2 (MME-element) ja see valk E2 ise *in trans*,
- b) kui enhaanserelemendiks on EBV FR-element, mis kujutab endast tandemina paiknevaid sidumise kohti EBV valgule EBNA-1 *in cis* ja *in trans* see valk EBNA-1 ise.

Need tulemused on tõestatud algse transientse replikatsiooni testkatsetes.

Järeldus 2: See algne amplifikatsiooni-tase on piisav ja küllaldane, et kindlustada sellistele vektorsüsteemidele pikaajaline rakus püsimine selektsiooni tingimustes, mis on samuti eespool toodud pikaajalistes katsetes tõestatud.

Järeldus 3: Süsteem tagab võõrgeeni kasseti koosseisus oleva meid huvitava testgeeni piisavalt kõrge ekspressiooni taseme. Helenduva valgu näol kasutatust leidnud testgeen võimaldas mul läbi viia FACS- analüüsi nii plasmidi säilumise jälgimise kui ka kadumise kineetika mõõtmiste osas. Samas on oluline säilitada selline ekspresseeruva valgu produktsioon pika ajaperioodi vältel, mis polnud probleem selektsiooni kaasabil.

Järeldus 4: BPV1 MME-elementi lisamine origini koosseisu võimaldas BPV1 valgul E2 täita linkervalgu funktsiooni episomaalse hübriidse originiplasmidi ja peremeesraku kromosoomide vahel mitoosi faasis, sest eelpool toodud katsetes on tõestatud selliste plasmidide võime stabiilselt episomaalselt säiluda. Kaudselt näitab see, et need ülesamplifitseerunud plasmiidid rakus põhimõtteliselt jagunesid tütarakkuse vahel, tõenäoliselt küll mitte päris võrdselt, kuid need plasmiidid viiakse tütarakkudesse episoomidena. Ebaühtlase jagunemise põhjusi on mitmeid: kas on plasmidi sisaldavate rakkude jagunemise kiirus aeglasem võrreldes plasmidi mittesisaldavate rakkude jagunemise kiirusega, või EGFP valgu toksilisus pärsib rakkude jagunemist, või plasmidide koopiate arv jaotatakse ebaühtlaselt tütarakkude

vahel (ühele rohkem, teisele vähem) Seega lõppjärgeldusena võib öelda, et süsteem täitis talle pandud lootused.

Järeldus 5: EBV FR-elementi lisamine hübriidse origini koosseisu võimaldas EBV EBNA-1 valgul täita tema adaptervalgu funktsioone.

Järeldus 6: Et eespool oli vektorsüsteemide üheks puuduseks toodud integratsiooni võimalikkus peremeesraku kromosoomi, mis ühelt poolt võib halvasti mõjuda rakkudele, teisalt võib see pärssida testgeeni ekspressiooni, samuti on oht transformatsioonilisteks muutusteks integratsiooni korral. Meie süsteemi eeliseks võib sellised võimalused välistada, sest DNA analüüs näitab, et see on säilinud episomaalsena, vähenede rakkudest proportsionaalselt GFP-d ekspresseerivate rakkude vähenemisega. Tõestatud on pikaajalise episomaalse säilumise võimalikkus sellisele süsteemile selektsioonivõimaluse lisamisel.

Samas paralleelselt testitud wt origini kontekstis olevate säilituselementidega konstruktide korral tuvastasin integratsiooni (minu mitteesitatud andmed).

Need hübriidsed süsteemid, mida on kirjeldatud eespool, annavad võimaluse ekspresseerida meile huvipakkuvat geeni piisavalt kõrgel tasemel selekteerivates tingimustes pika aja jooksul jagunevates rakkudes.

Retroviirussüsteeme kasutades võib vahendada LT ja E2 või LT ja EBNA-1 ekspressiooni erinevates rakuliinides, et rakud oleksid võimelised toetama PyV origini sisaldavate plasmiidide replikatsioonivõimet. Pealegi, võib luua transgeenseid loomi, mis ekspresseerivad mõlemat valku (LT ja E2 või LT ja EBNA-1) ning kasutada neid märklauaks geneetiliste defektide parandamiseks. On võimalik ka konstrueerida mudelsüsteeme kasutamaks selliseid süsteeme erinevate haiguste raviks.

Töös toodud andmed lisanduvad T.Silla ja I. Hääle eelnevalt kogutud andmetele, mis koos peaks andma publikatsiooniks piisava informatsiooni.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö kirjanduslik osa annab ülevaate veise papilloomiviiruse tüüp 1st (BPV1), hiire polüoomiviirusest (PyV) ja Epstein-Barr'i viirusest (EBV).

Käesoleva töö eksperimentaalses osas püstitati üheks eesmärgiks optimeerida kaksikhübriidsed vektorsüsteemid selliselt, et oleks võimalik kontrollida nende stabiilset säilumist hiire rakuliinides, mis ekspresseerivad kõiki vajalikke viiruselisi valke. Teiseks eesmärgiks püstitati vektorite säilumise kineetika uurimine.

On võrreldud kaht eri süsteemi, mõlemad vektorsüsteemid kasutavad hübriidsete originide kassette. Üks neist on polüoomiviiruse ja papilloomiviiruse baasil konstrueeritud originikassett, mis sisaldab polüoomiviiruse replikatsiooni alguskohta (MO) ilma enhaanserita koos kümne BPV1 valgu E2 seostumiskohaga (MME-element). Teine hübriidne origin on konstrueeritud polüoomiviiruse ja Epstein-Barr'i viiruse baasil ning sisaldab polüoomiviiruse minimaalset replikatsiooni alguskohta koos 20 EBV valgu EBNA-1 seostumiskohaga (FR-element). BPV1 MME ja EBV FR elemendid PyV minimaalse originiga koos viiruseliste valkudega LT/E2 ja LT/EBNA-1, on piisavad *cis*- ja *trans*-elemendid, tagamaks hübriidsetele originiplasmiididele säilumise funktsioon.

Kaksikhübriidsed vektorsüsteemid sisaldavad ka võõrgeeni ekspressioonikassetti, kuhu praegu oli lisatud helenduva valgu EGFP/d1EGFP kodeerivad alad. Kuna EGFP valku on võimalik detekteerida ka elavas rakus, kasutasin ma seda eelist säilumise kineetika uurimisel.

Töö tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

Minu poolt eelnevalt planeeritud, disainitud ja optimeeritud kimäärsed plasmiidid käituvad igati vastavalt ootustele: replitseeruvad piisavalt efektiivselt, võimaldavad võõrgeeni efektiivset ekspressiooni eukarüootsetes rakkudes ning kanduvad episoomina edasi tütarakkudesse.

SUMMARY

The bovine papillomavirus type 1 (BPV1) minichromosome maintenance element (MME), comprising of the multimeric papillomaviral protein E2 binding sites and depending on the protein E2, could provide the replication enhancer functions and the stable maintenance functions to the mouse polyomavirus (PyV) core origin plasmids in the presence of the mouse polyoma large-T-antigen (LT). In double expression mouse fibroblast cell lines of polyoma LT and papilloma E2 (COP5/LT/E2) the reporter plasmids comprising of PyV minimal origin linked with synthetic papillomaviral E2 binding sites (two to ten) show the capacity to be maintained for the long timeperiods - the episomal status of hybrid origins monitored for more than 3 months. The quantitative time course monitoring of long-term expression of EGFP, switched to the reporter plasmid, was close to the maximal level (ca 90%) in the presence of selection as measured by the flow cytometry. The described chimeric systems make it possible to express a gene of interest for an extended time period over several generations.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abroi, A., Ilves, I., Kivi, S. and Ustav, M. (2004) Analysis of chromatin attachment and partitioning functions of bovine papillomavirus type 1 E2 protein. *Journal of Virology*, 78(4), 2100-2113
- Aiyar, A., Tyree, C. and Sugden, B. (1998) The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *EMBO J.* 17(21):6394-403
- Allikas, A., Ord, D., Kurg, R., Kivi, S. and Ustav, M. (2001) Roles of the hinge region and the DNA binding domain of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein in initiation of DNA replication. *Virus Res*, 70, 6169-6179
- Auborn, K. J., Little, R. D., Platt, T. H. K., Vaccariello, M. A and Schildkraut, C. L. (1994) Replicative intermediates of human papillomavirus type 11 in laryngeal papillomas: Site of replication initiation and direction of replication. *Cell Biology*, 91, 7340-7344
- Bastien, N. and McBride, A. A. (2000) Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes. *Virology*, 270, 124-134
- Bell, S. P. and Stillman, B. (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, 357, 128-134
- Bennett-Cook, E. R. and Hassell, J. A. (1991) Activation of polyomavirus DNA replication by yeast GAL4 is dependent on its transcriptional activation domains. *EMBO J*, 10, 959-969
- Bernard, B. A., Bailly, C., Lenoir, M.-C., Darmon, M., Thierry, F. and 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, 4317-24
- Bouvard, V., Storey, A., Pim, D. and Banks, L. (1995) Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J*, 13, 5451-5459
- Bullock, P. A., Joo, W. S., Sreekumar, K. R. and Mello, C. (1997) Initiation of SV40 DNA replication in vitro: analysis of the role played by sequences flanking the core origin on initial synthesis events. *Virology*, 227, 460-473
- Chen, M. H. and Benjamin, T. L., (1997) Roles of N-glycans with α 2,6 as well as α 2,3-linked sialic acid in infection of polyoma virus. *Virology*, 233, 440-442
- Cooper, N. R. (1994). Early Events in Human Herpesvirus Infection of Cells. *Cellular Receptors for Animal Viruses*. ed. E. Wimmer, 365-388
- Dean, F. B., Bullock, Y., Murakami, Wobbe, C. R., Weissbach, L. and Hurwitz, J. (1987) Simian virus40 (SV40) DNA replication: SV40 large T antigen unwinds DNA containing the SV40 origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 84, 16-20
- DePamphilis, M. L. and Bradley, M. K. (1986) Replication of SV40 and polyomavirus chromosomes. *The Papovaviridae*. Plenum Press, New York, 99-246
- DePamphilis, M. L. (1993) Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin. *Annu Rev. Biochem*, 62, 29-63

- Dodson, M., Dean, F. B., Bullock, P., Echols, H. and Hurwitz, J. (1987) Unwinding of duplex DNA from the SV40 origin of replication by T antigen. *Science*, 238, 964-967
- Dornreiter, I., Erdile, L. F., Gilbert, I. U., Von, W. D., Kelly, T. J. and Fanning, E. (1992) Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *EMBO J*, 11, 769-776
- Dornreiter, I., Hoss, A., Arthur, A. K. and Fanning, E. (1990) SV40 T antigen binds directly to the large subunit of purified DNA polymerase alpha. *EMBO J*, 9, 3329-3336
- Fennewald, S., van Santen, V. and Kieff, E. (1984) Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. *Journal of Virol.*, 51(2), 411-419
- Flores, E. R. and Lambert, P. F. (1997) Evidence for a Switch in the Mode of Human Papillomavirus Type 16 DNA Replication during the Viral Life Cycle. *Journal of Virology*, 71, 7167-7179
- Gahn, T. A. and Sugden, B. (1995) An EBNA-1-dependent enhancer acts from a distance of 10 kilobase pairs to increase expression of the Epstein-Barr virus LMP gene. *Journal of Virology*, 69(4), 2633-2646
- Gahn, T. A. and Schildkraut, C. L. (1989) The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell*, 58(3), 527-35
- Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G. P. and Pelicci, P. G. (1998) High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.*, 58, 14-19
- Groff, D. E. and Lancaster, D. (1986) Genetic analysis of the 3' early transformation and replication functions of bovine papillomavirus type 1. *Virology*, 150, 221-230
- Guo, W., Tang, W. J., Bu, X., Bermudez, V., Martin, M. and Folk, W. R. (1996) AP1 enhances polyomavirus DNA replication by promoting T-antigen-mediated unwinding of DNA. *Journal of Virology*, 70, 4914-4918
- Harrison, S., Fisenne, K. and Hearing, J. (1994) Sequence requirements of the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *Journal of Virology*, 68 (3), 1913-1925
- Hubbert, N. L., Schiller, J. T., Lowy, D. R. and Androphy, E. J. (1988) Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 85(16), 5864-5868
- Hung, S. C., Kang, M. S. and Kieff, E. (2001) Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 1865-1870
- Ilves, I., Kivi, S. and 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, 4404-4412
- Ito, S. and Gotoh, E. (2002) Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 is highly colocalized with interphase chromatin and its newly replicated regions in particular. *J Gen Virol*, 83(10), 2377-83

- Kanda, T., Otter, M. and Wahl, G. M. (2001) Coupling of mitotic chromosome tethering and replication competence in Epstein-Barr virus-based plasmids. *Molecular and Cellular Biology*, 21(10), 3576-88
- Kapoor, P. and Frappier, L. (2003) EBNA1 Partitions Epstein-Barr Virus Plasmids in Yeast Cells by Attaching to Human EBNA1-Binding Protein 2 on Mitotic Chromosomes. *Journal of Virology*, 77(12), 6946-6956
- Kirchmaier, A. L. and Sugden, B. (1995) Plasmid Maintenance of Derivatives of *oriP* of Epstein-Barr Virus. *Journal of Virology*, 69(2), 1280-1283
- Knipe, D. M. and Howley, P. Fields Virology 4nd eds. Papillomavirus, 2197-2222; Polyomavirus, 2141-2166; Epstein-Barr virus, 2575-2615
- Krysan, P. J., Haase, S. B. and Calos, M. P (1989) Isolation of human sequences that replicate autonomously in human cells. *Molecular and Cellular Biology*, 9, 1026-1033
- Lambert, P. F. (1991) Minireview. Papillomavirus DNA Replication. *Journal of Virology*, 65, 3417-3420
- Laux, G., Freese, U. K. and Bronchium, G. W. (1985) Structure and evolution of two related transcription units of Epstein-Barr virus carrying small tandem repeats. *Journal of Virol*, 56(3), 987-95
- Li, Q., Turk, S. M. and Hutt-Fletcher, L. M. (1995) The Epstein-Barr Virus (EBV) BZLF2 Gene Product Associates with the gH and gL Homologs of EBV and Carries an Epitope Critical to Infection of B cells but Not of Epithelial Cells. *Journal of Virology*, 69 (7), 3987-3944.
- Lowy, D. R., Dvoretzky, I., Shober, R., Law, M., Engel, L. and Howley, P. M. (1980) *In vitro* tumorigenic transformation by a defined sub-genomic fragment of bovine papilloma virus DNA. *Nature (London)*, 287, 72-74
- Lupton, S. and Levine, A. J. (1986) Characterization of the genetic signals required for Epstein-Barr virus plasmid maintenance. *In Cancer Cells 4/DNA Tumor Viruses*, 543-553. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Lusky, M. and Botchan, M. (1984) Characterization of the bovine papilloma virus plasmid maintenance sequenses. *Cell*, 36, 391-401
- Mackey, D., Middleton, T. and Sugden, B. (1995) Multiple Regions within EBNA1 Can Link DNAs. *Journal of Virology*, 69, (10), 6199-6208
- Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M. and Nicolas, J. C. (1999) Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *Journal of Virology*, 73, 4385-4392
- Martin, M., Piette, J., Yaniv, M., Tang, W. J. and Folk, W. R. (1988) Activation of polyomavirus enhancer by a murine activator protein 1 (AP1) homolog and two contiguous proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 5839-5843
- Mastrangelo, I. A., Hough, P. V., Wall, J. S. Dodson, M., Dean, F. B. and 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. A, Bolen, J. B. and Howley, P. M. (1989) Phosphorylation sites of the E2 transcriptional regulatory proteins of bovine papillomavirus type 1. *Journal of Virology*, 63(12), 5076-5085

- McBride, A. and Myers, G. (1997) The E2 Proteins. In Myers, G., Baker, C., Munger, K., Sverdrup, F., McBride, A. and Bernard, H.-U. (ed.) *Human Papillomaviruses 1997. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos NM.*
- Mecasas, J. and Sugden, B. (1987) Replication of plasmids derived from bovine papilloma virus type 1 and Epstein-Barr Virus in cells in culture. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 3, 87-108
- Middleton, T. and Sugden, B. (1994) Retention of plasmid DNA in mammalian cells is enhanced by binding of the Epstein-Barr virus replication protein EBNA1. *Journal of Virology*, 68 (6), 4067-4071
- Mücke, S., Polack, A., Pawlita, M., Zehnpfennig, D., Massoudi, N., Bohlen, H., Doerfler, W., Bornkamm, G., Diehl, V. and Wolf, J. (1997) Suitability of Epstein-Barr virus-based episomal vectors for expression of cytokine genes in human lymphoma cells. *Gene Ther*, 4, 82-92
- Natale, D. A., Umerek, R. M. and Kowalski, D. (1993) Ease of unwinding is a conserved property of yeast replication origins. *Nucleic Acids Res*, 21, 555-560
- Nilsson, M., Forsberg, M., You, Z., Westin, G. and Magnusson, G. (1991) Enhancer effect of bovine papillomavirus E2 protein in replication of polyomavirus DNA. *Nucleic Acids Res*, 19, 7061-7065
- O'Connor, M., Chans, S. and Bernard, H. (1995) Transcription factor binding sites in the long control region of the genital HPVs in Myers, G., Bernard, H., Baker, C., Halpern, A., Delius, H., Icenogel, J., editors. *Human Papillomaviruses* Los Alamos National Laboratory, LA-UR 95-3675, III-21-40
- Parsons, R., Anderson, M. E. and Tegtmeyer, P. (1990) Three domains in the simian virus 40 core origin orchestrate the binding, melting, and DNA helicase activities of T antigen. *Journal of Virology*, 64, 509-518
- Pavlakakis, G. N. and Hamer, D. N. (1983) Regulation of a metallothionein-growth hormone hybrid gene in bovine papilloma virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 80, 397-401
- Piirsoo, M., Ustav, E., Mandel, T., Stenlund, A. and Ustav, M. (1996) *Cis* and *trans* requirements for stable episomal maintenance of the BPV1 replicator. *The EMBO Journal*, 15, 1-11
- Rabson, M. S., Yee, C., Yang, Y. -C. and Howley, P. M. (1986) Bovine papillomavirus type 1 3'early region transformation and replication functions. *Journal of Virology*, 60, 626-634
- Rawlins, D. R., Milman, G., Hayward, S. D., Hayward, G. S. (1985) Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell*, 42(3), 859-68
- Reisman, D. and Sugden, B. (1986) Transactivation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen *Molecular and Cellular Biology*, 6 (11), 3838-3846
- Reisman, D., Yates, J. and Sugden, B. (1985) A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. *Molecular and Cellular Biology*, 5(8), 1822-1832
- Roberts, J. M. and Weintraub, H. (1986) Copy number control of DNA replication in SV40-BPV1 hybrid replicons. In *Cancer cells 4/DNA Tumor Viruses*, 555-559. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

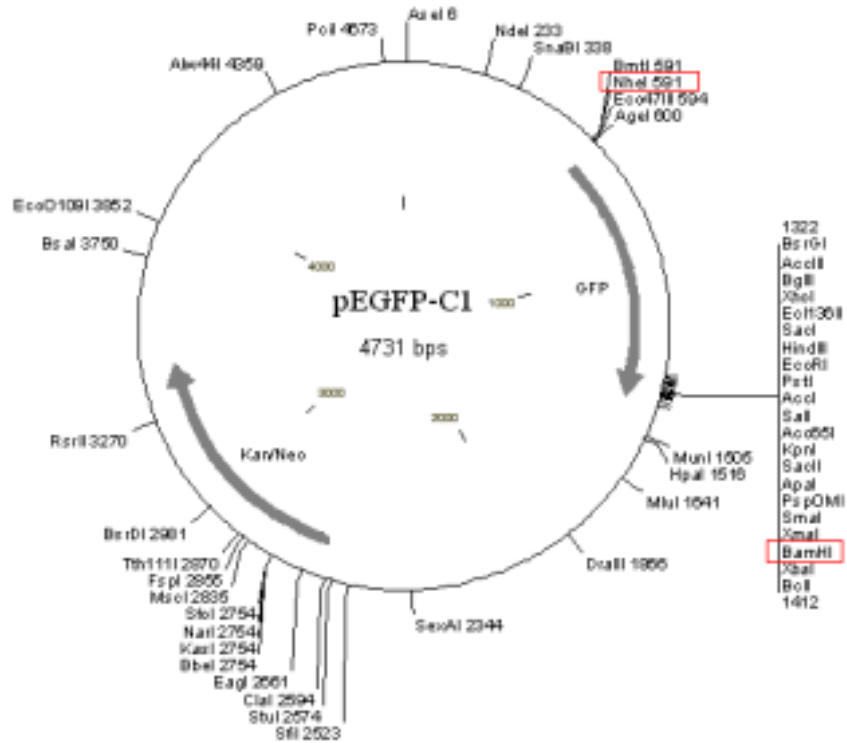
- Roberts, J. M. and Weintraub, H. (1986) Negative control of DNA replication in composite SV40-bovine papilloma virus plasmids. *Cell*, 46, 741-752
- Romanczuk, H., Thierry, F., Howley, P. M. (1990) Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *Journal of Virology*, 64, 2849-59
- Sambrook, J., Rodgers, L., White, J. and Gething, M. (1985) Lines of BPV-transformed murine cells that constitutively express influenza virus hemagglutinin. *EMBO J.*, 4, 91-103
- Sarver, N., Gruss, P., Law, M., Khoury, G. and Howley, P. M. (1981) Bovine papilloma virus deoxyribonucleic acid: a novel eucaryotic cloning vector. *Mol. Cell. Biol.*, 1, 486-496
- Schwartzman, J. B., Adolph, S., Martin- Parras, L. and Schildkraut, C. L. (1990) Evidence that Replication Initiates at Only Some of the Potential Origins in Each oligomeric Form of Bovine Papillomavirus Type 1 DNA. *Molecular and Cellular Biology*, 3078-3086
- Scrimanti, C. R. and Calos, M. P. (1998) Epstein-Barr virus vectors for gene expression and transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9, 476-479
- Sedman, J. and Stenlund, A. (1995) Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus *in vivo* and *in vitro*. *The EMBO Journal*, 14, 6218-6228
- Sedman, J. and Stenlund, A. (1998) The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *Journal of Virology*, 72(8), 6893-6897
- Sedman, T., Sedman, J. and Stenlund, A. (1996) Binding of the E1 and E2 Proteins to the Origins to the Replication of Bovine Papillomavirus. *Journal of Virology*, 71, 2887-2896
- Shire, K., Ceccarelli, D. F., Avolio-Hunter, T. M. and Frappier, L. (1999) EBP2, a human protein that interacts with sequences of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 important for plasmid maintenance. *Journal of Virology*, 73(4), 2587-2595
- Silla, T., Hääl, I., Abroi, A. and Ustav, M. The Bovine Papillomavirus Type 1 Minichromosome Maintenance Element is Functional in Heterologous Systems. (avaldamata andmed)
- Skiadopoulos, M. and McBride, A. (1998) Bovine papilloma type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *Journal of Virology*, 72, 2079- 2088
- Straus, S. E., Cohen, J. I., Tosato, G., Meier, J. (1993) Epstein-Barr Virus Infections: Biology, Pathogenesis, and Management. *Ann Intern Med*, 118, 45-58
- Titolo, S., Pelletier, A., Sauve, F., Brault, K., Wardrop, E., White, P. W., Amin, A., Cordingley, M. G. and Archambault, J. (1999) Role of the ATP-binding domain of the human papillomavirus type 11 E1 helicase in E2-dependent binding to the origin. *Journal of Virology*, 73, 5282-93
- Tsurimoto, T. and Stillman, B. (1991) Replication factors required for SV40 DNA replication in vivo. II. Switching of DNA polymerase alpha and delta during initiation of leading and lagging strand synthesis. *J Biol Chem*, 266, 1961-1968
- Tsurimoto, T., Melendy, T. and Stillman, B. (1990) Sequential initiation of lagging and leading strand synthesis by two different polymerase complexes at the SV40 DNA replication origin. *Nature (London)*, 292, 595-600

- Tyndall, C., La Mantia, G., Thacker, C. M., Favaloro, J., Kamen, R. (1981) A region of the polyoma virus genome between the replication origin and late protein coding sequences is required in cis for both early gene expression and viral DNA replication. *Nucleic Acids Res.* 11, 9(23), 6231-6250
- Uemura, N., Ozawa, K., Tojo, A., Takahashi, K., Okano, A., Karasuyama, H., Tani, K. and Asano, S. (1992) Acquisition of interleukin-3 independence in FDC-P2 cells after transfection with the activated c-H-ras gene using a bovine papillomavirus-based plasmid vector. *Blood* 80, 3198-3204
- Ustav, E., Ustav, M., Szymanski, P. and Stenlund, A. (1993) The bovine papillomavirus origin of replication requires a binding site for the E2 transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 898-902
- Ustav, M. and Stenlund, A. (1991) Transient replication of BPV1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *The EMBO Journal*, 10, 449-457
- Van Craenenbroeck, K., Vanhoenacker, P. and Haegeman, G. (2000) Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. *Eur J Biochem*, 267(18), 5665-5678
- Wade-Martins, R., Frampton, J. and James, M. R. (1999) Long term stability of episomal vectors carrying large genomic DNA inserts in human cells. *Nucleic Acids Research*, 27 (7), 1674-1682
- Waga, S., Bauer, G. and Stillman, B. (1994) Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J. Biol Chem*, 269, 10923-34
- Wessel, R., Schweizer, J. and Stahl, H., (1992) Simian virus 40 T-antigen DNA helicase is a hexamer which forms a binary complex during bidirectional unwinding from the viral origin of DNA replication. *Journal of Virology*, 66, 804-815
- Wilson, J. B., Bell, J. L. and Levine, A. J. (1996) Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *The EMBO Journal*, 15(12), 3117-3126
- Wu, H., Ceccarelli, D. F. and Frappier, L. (2000) The DNA segregation mechanism of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *EMBO Rep*, 1(2), 140-144
- Wu, H., Kapoor, P. and Frappier, L. (2002) Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *Molecular and Cellular Biology*, 76(5), 2480-90
- Wysokenski, D. A. and Yates, J. L. (1989) Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, 63(6), 2657-2666
- Yates, J. L. (1996) Epstein-Barr virus DNA replication. In DePamphilis, M. L. (ed.), *DNA Replication in Eukaryotic Cells*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 751-773
- Yates, J. L., Sarah, M. C. and Bashaw, J. M. (2000) The Minimal Replicator of Epstein-Barr Virus oriP. *Journal of Virology*, 74(10), 4512-4522
- Yates, J., Warren, N., Reisman, D. and Sugden, B. (1984) A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proceeding from the National Academy of Science*, 81, 3806-3810

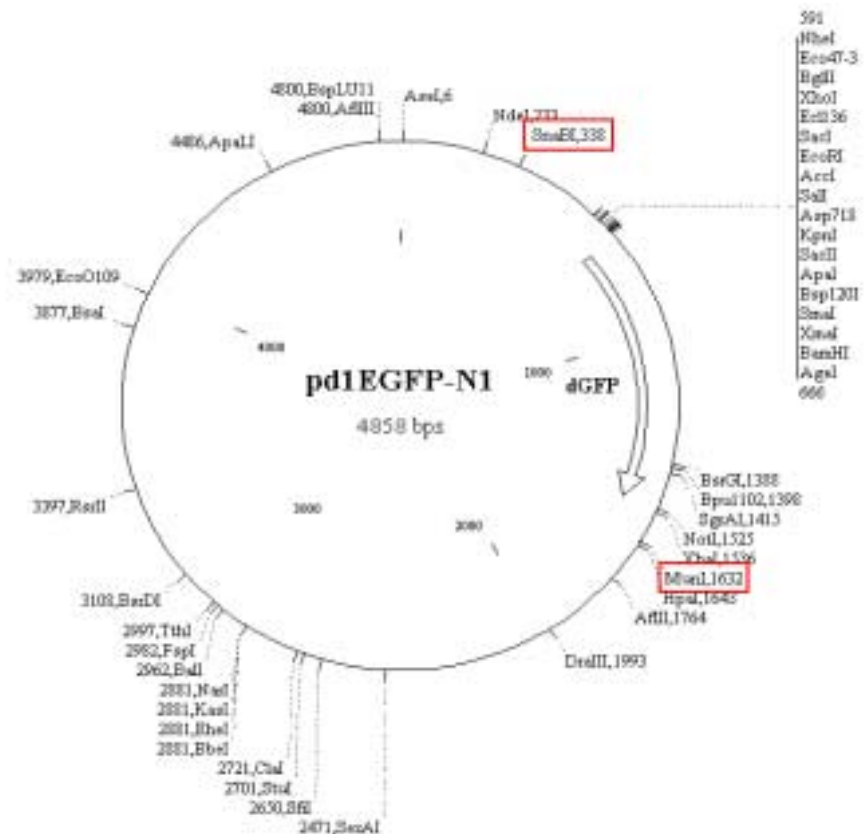
LISAD

I. Kasutatud plasmiidid

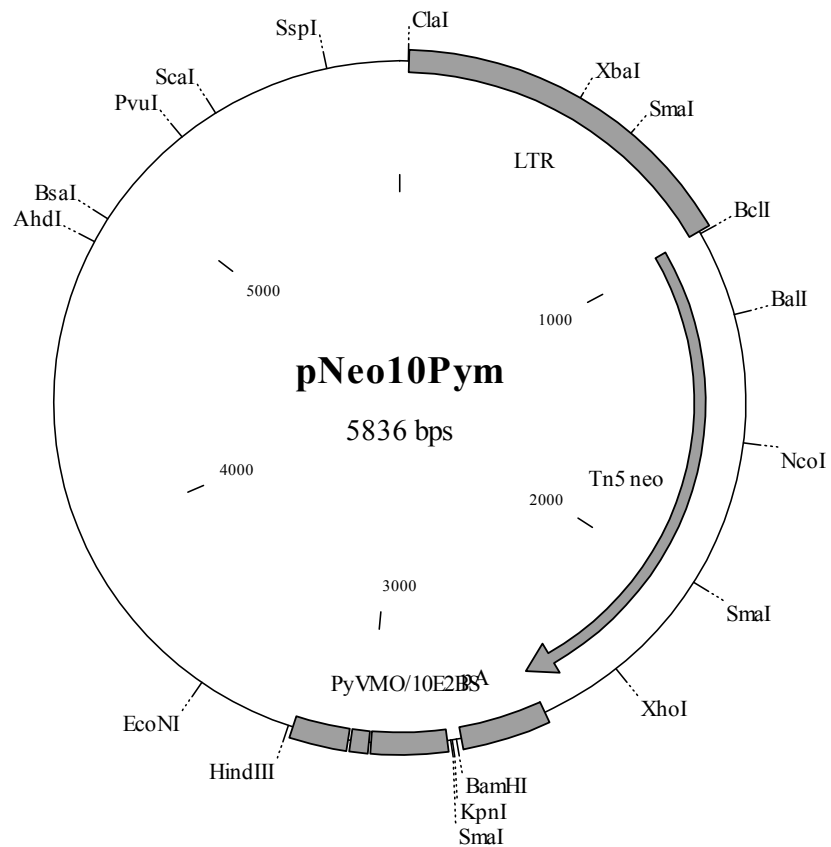
1. algplasmiid pEGFP-C1



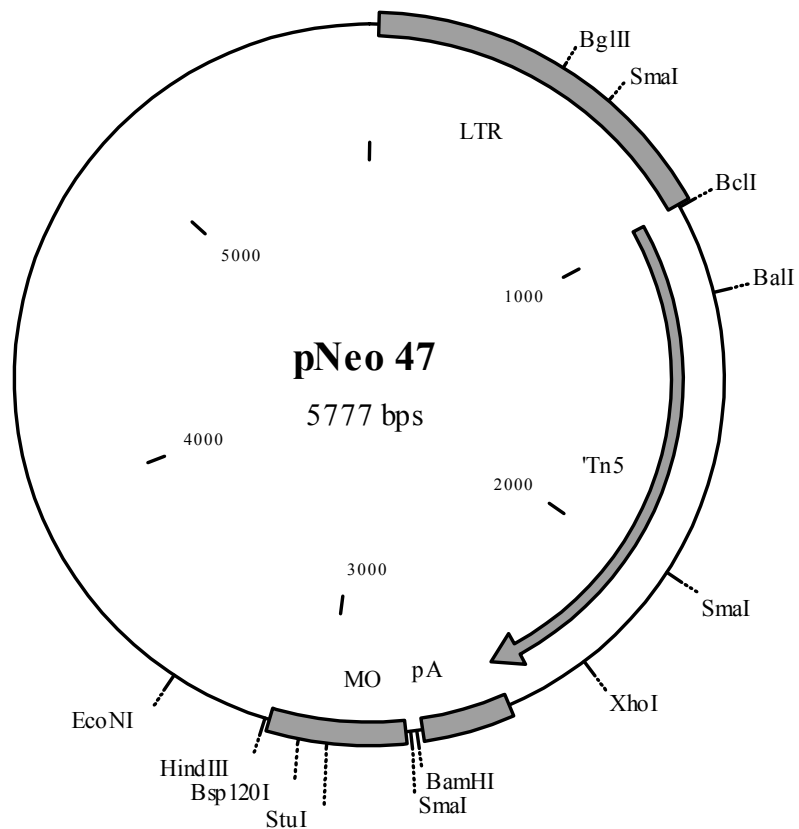
2. algplasmiid pd1EGFP-N1



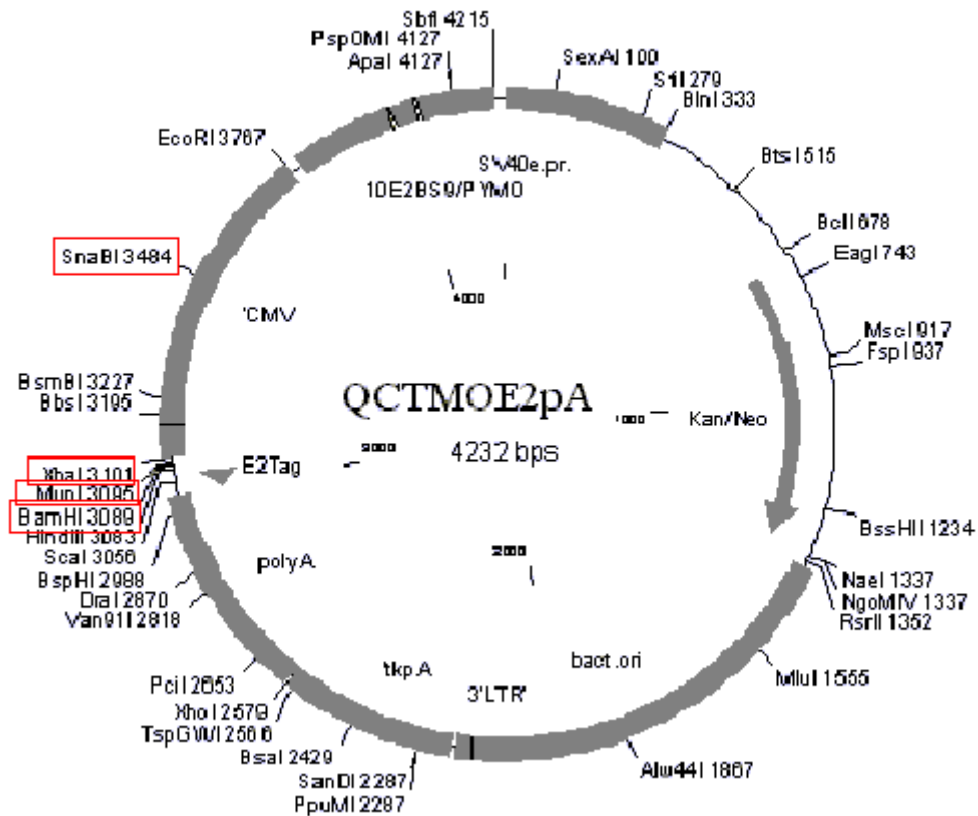
3. võrdlus plasmid pNeoMO/MME (I.Hääl); plasmiid sisaldab 10 BPV1 E2 seostumiskohti (10E2BS) ja polüoomiviiruse ORI ilma enhaanserita (PyV MO).



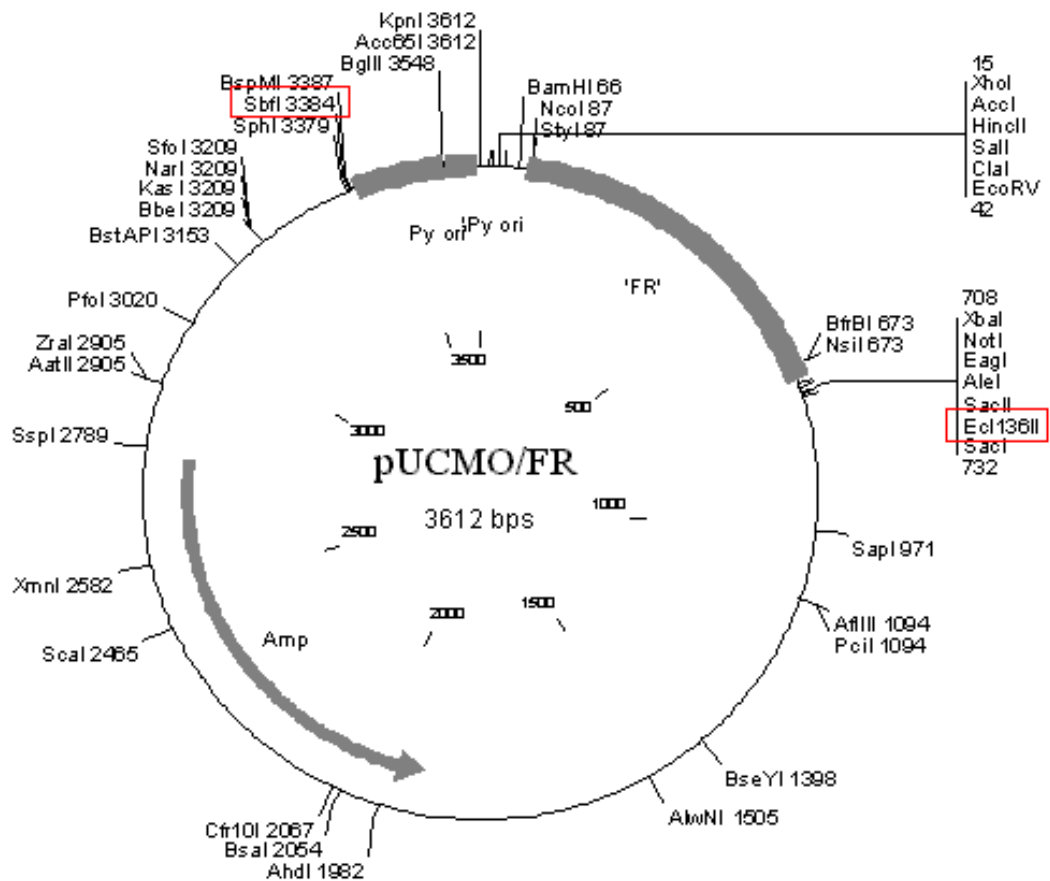
4. võrdlus plasmid PyVwtORI (I.Hääl); plasmiid sisaldab polüoomiviiruse ORI koos enhaanseriga (Py wt. ORI).



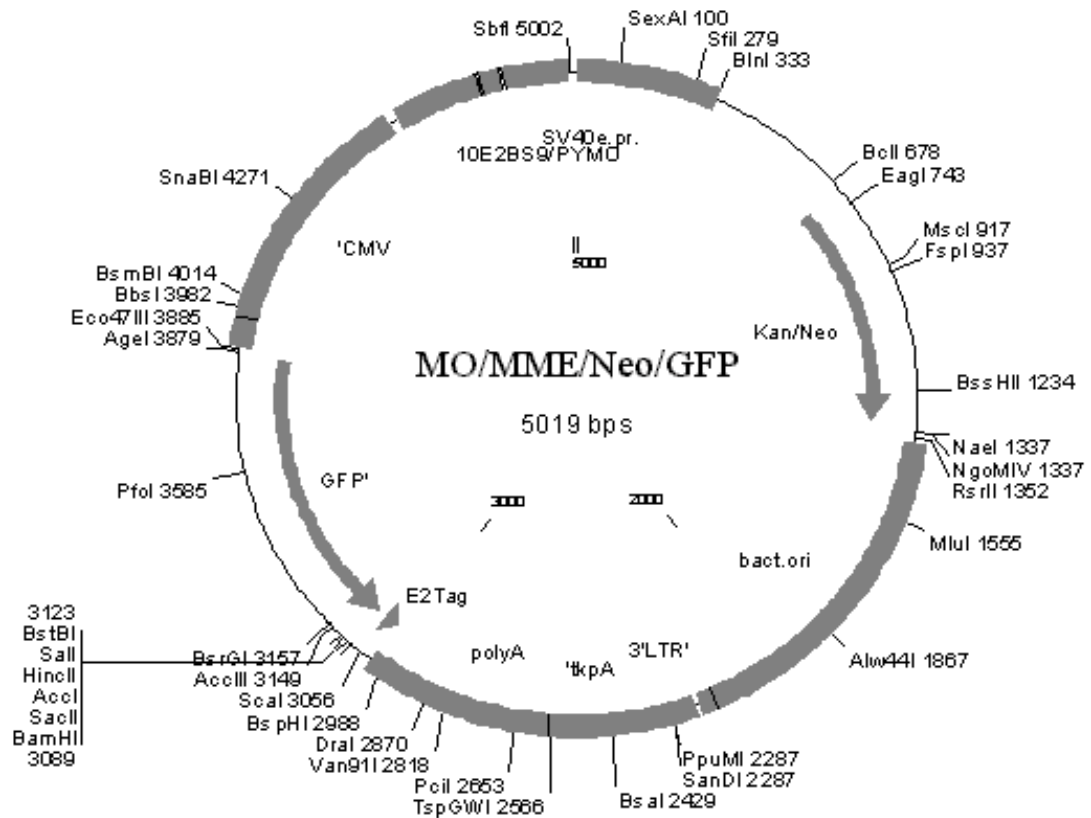
5. algplasmiid QCTMOE2pA (Q- seeria, C-tag, Neo- geeni kassett, MO-PyV minimaalne ORI, E2 valgu seostumiskohad ja polüA sait)



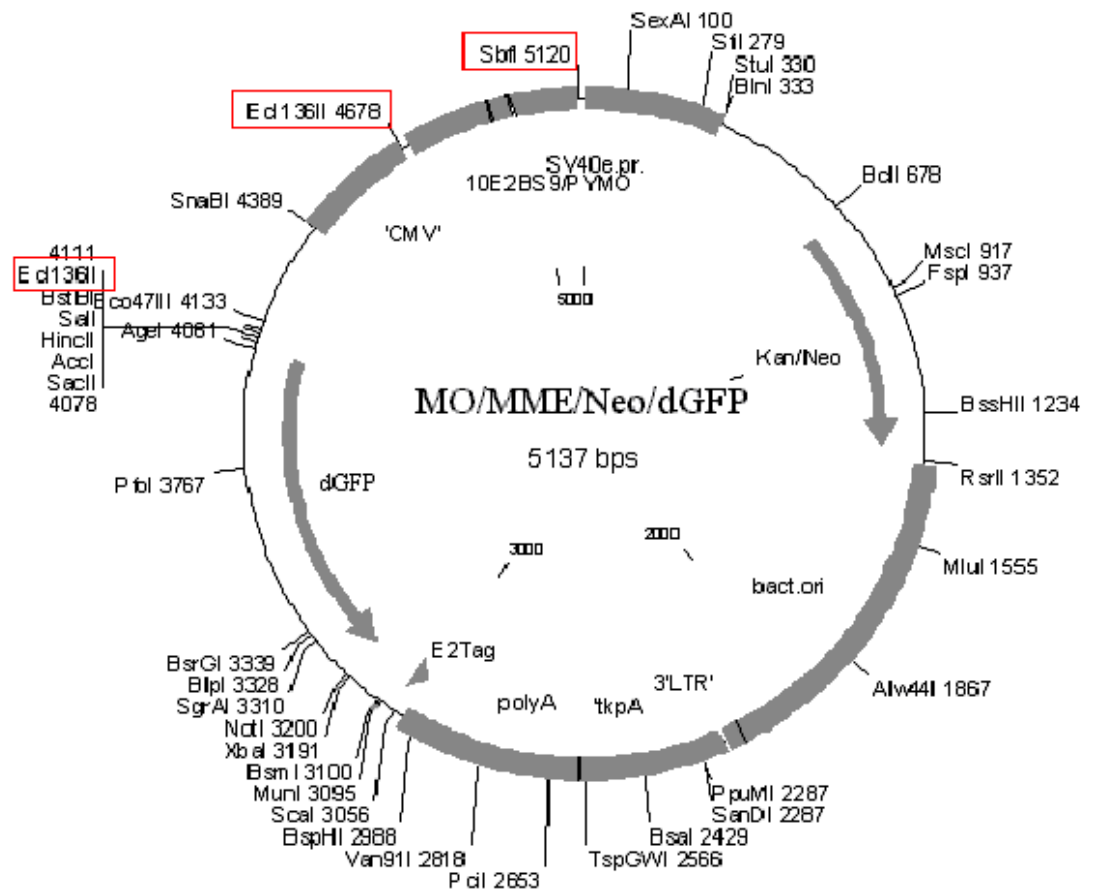
6. algplasmiid pUCMO/FR



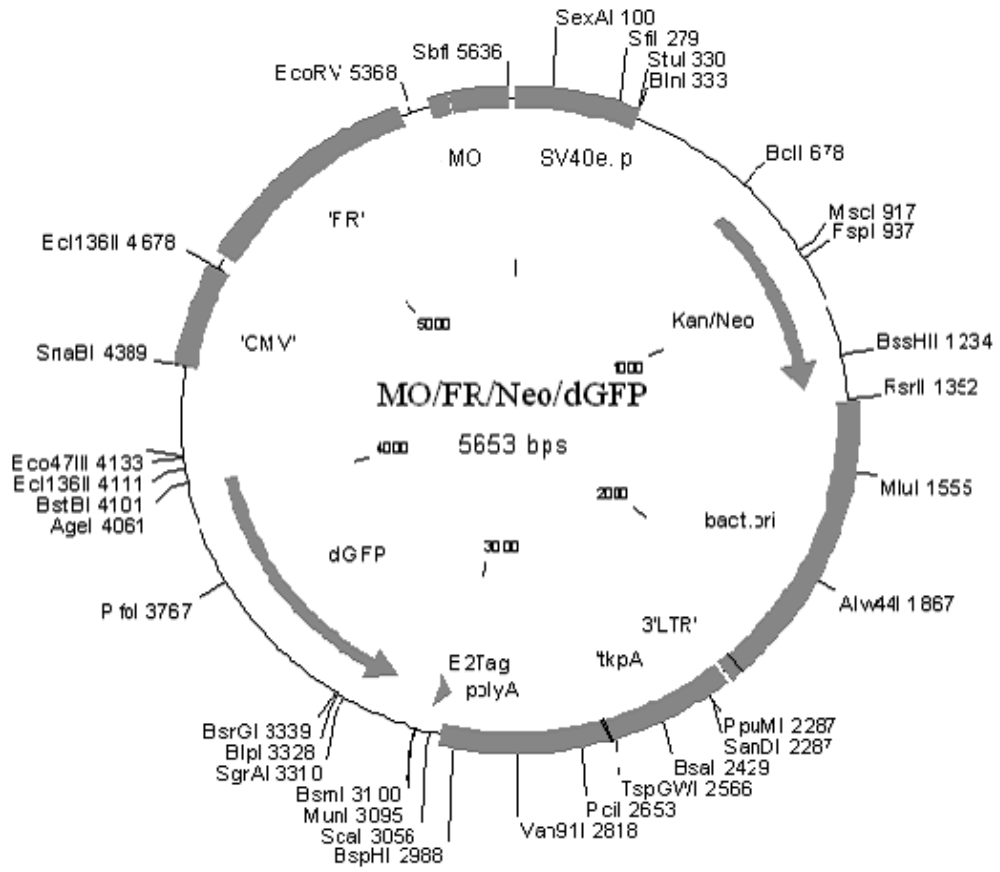
7. kloneeritud plasmid MO/MME/Neo/GFP



8. kloneeritud plasmid MO/MME/Neo/dGFP



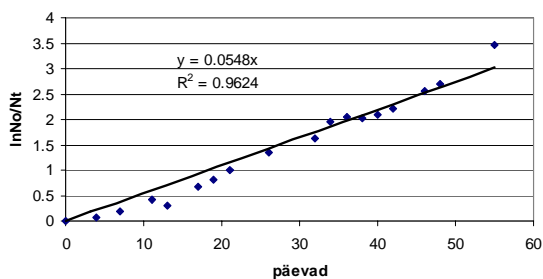
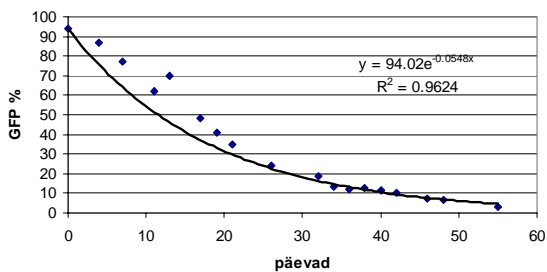
9. kloneeritud plasmid MO/FR/Neo/dGFP



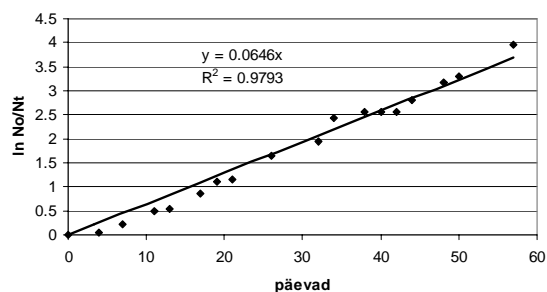
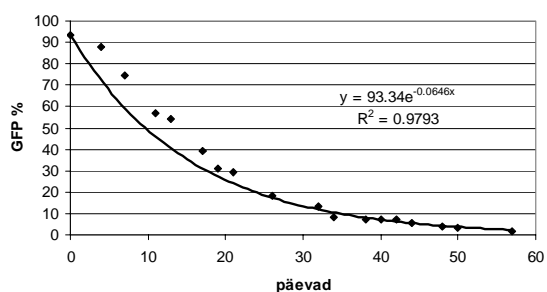
II. Plasmiidide kadumise kineetika esitatud lineaarsete ja eksponentsiaalsete diagrammidega

1. MO/MME/Neo/GFP

a) 1. seeria

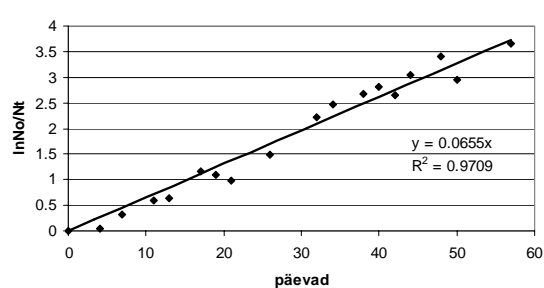
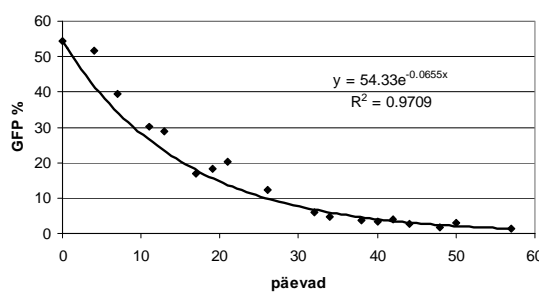


b) 2. seeria

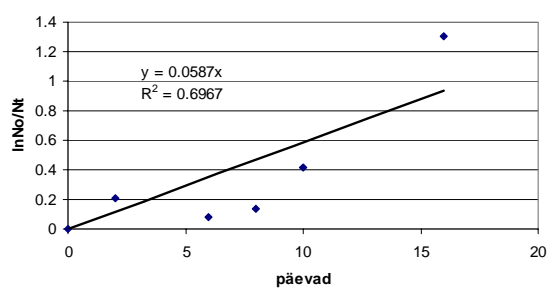
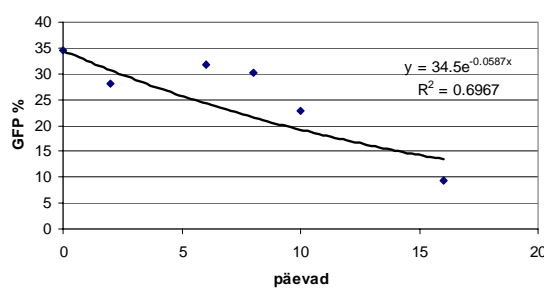


1. MO/MME/Neo/dGFP

a) 1. seeria

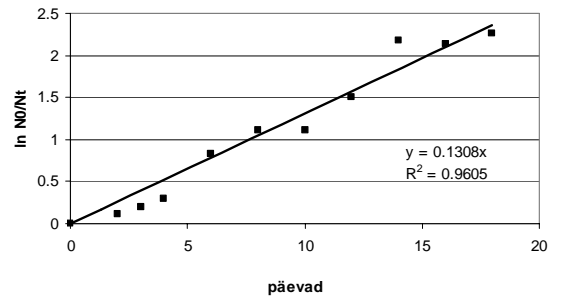
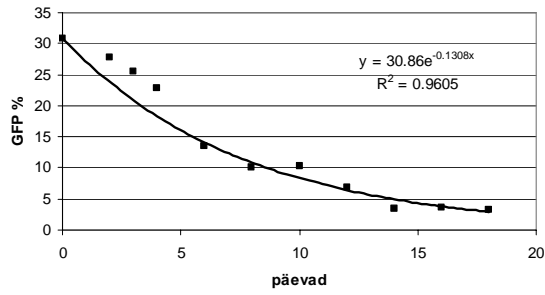


b) 2. seeria

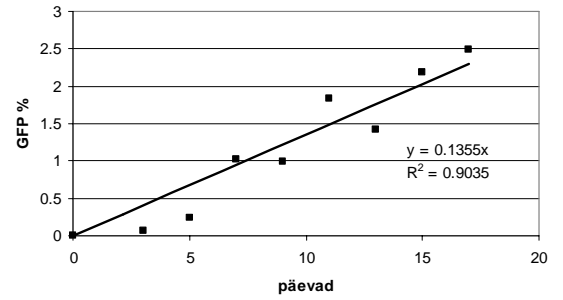
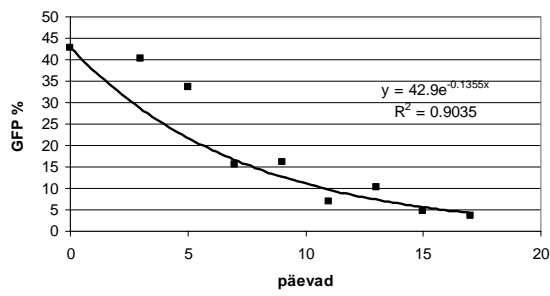


2. MO/FR/Neo/dGFP

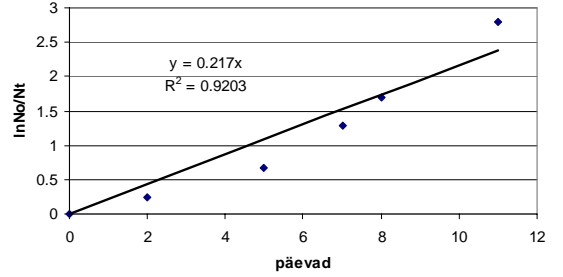
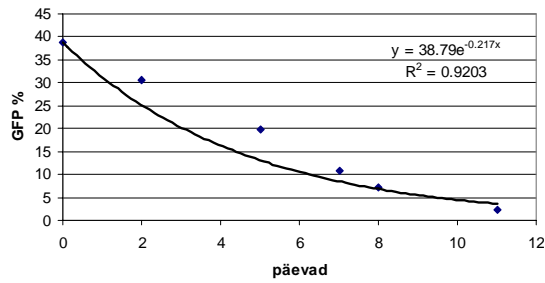
a) 1. seeria



b) 2. seeria



3. pEGFP-C1



4. pd1EGFP-N1

