

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MIKROBIOLOOGIA JA VIROLOOGIA ÕPPETOOL

**Inimese papilloomiviiruse tüüp 5 ja 11 Nano-lutsiferaasi geeni sisaldavate genoomide
loomine ning replikatsioonivõime kontrollimine**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Elina Lototskaja

Juhendaja: PhD Alla Piirsoo

Tartu 2019

INFOLEHT

Inimese papilloomiviiruse tüüp 5 ja 11 Nano-lutsiferaasi geeni sisaldavate genoomide loomine ning replikatsioonivõime kontrollimine

Inimese papilloomiviirused on kaheaheelalise DNA genoomiga viirused, mis nakatavad epiteelkoe keratinotsüüte. Nende elutsükkel on tihedalt seotud epiteelkoe diferentseerumise programmiga. Viiruse replikatsiooni uurimisel kasutatakse Southern blot ja PCR meetodeid, mis on palju aega- ja ressursi nõudvad. Üks võimalus selle probleemi lahenduseks on kasutada bioluminestsentsuse markereid replikatsiooni tuvastamiseks. Käesolev bakalaureusetöö keskendub inimese papilloomiviiruse tüüp 5 ja 11 genoomi Nano-lutsiferaasi (NLuc) bioluminestsentse markeri sisseviimisele, valmistatud konstruktide replikatsioonivõime tuvastamisele U2OS rakuliinis ja korrelatsiooni analüüsile replikatsiooni signaalide ja NLuc aktiivsuse vahel.

Märksõnad: Inimese papilloomiviirus (HPV), lutsiferaas, replikatsioon
CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Generation of human papillomavirus type-5 and type-11 Nano-luciferase containing genomes and analysis of their replication ability

Human papillomaviruses (HPVs) are double-stranded DNA viruses that infect keratinocytes. Their life cycle is tightly connected to the epithelial differentiation program. Southern blot and PCR are the common techniques to study virus replication; however, these methods are time and resource consuming. One way to resolve this problem is to use viral genomes containing bioluminescence markers. The main focus of this thesis is to insert Nano-luciferase (NLuc) gene into HPV5 and HPV11 genomes, to examine the replication capacity of the generated constructs in U2OS cell line, and to analyse the correlation between the obtained replication signals and NLuc activity.

Keywords: Human papillomavirus (HPV), luciferase, replication
CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Inimese papilloomiviirused.....	7
1.2 Genoomi ülesehitus.....	8
1.3 Inimese papilloomiviiruse valkude funktsioonid.....	9
1.4 HPV elutsükkel	11
1.4.1 Sisenemine rakku	12
1.4.2 Esialgne amplifikatsioon.....	12
1.4.3 Latentne periood	12
1.4.4 Vegetatiivse replikatsioon.....	13
1.4.5 Virionide kokkupakkimine ja väljumine rakust.....	13
1.5 HPV5.....	13
1.6 HPV 11.....	13
1.7 Bioluminestsentsi kasutamine laboritingimustes	14
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	16
2.1 Töö eesmärgid.....	16
2.2 Materjalid ja meetodika	17
2.2.1 Kasutatud plasmiidid	17
2.2.2 HPV5NLuc-pMC.BESBX ja HPV11NLuc-pMC.BESBX konstruktide tegemine	19
2.2.2.1 Transformatsioon	19
2.2.2.2 Plasmidi eraldamine.....	19
2.2.2.3 Restriktsioon ja DNA fragmentide puhastamine geelist.....	20
2.2.2.4 Ligeerimine ja transformeerimine.....	21
2.2.2.5 HPV11-E2-NLuc DNA sisaldavate kolooniate kontroll PCR abil	21
2.2.2.6 Restriktsioonanalüüs HPV5 ja HPV11 jaoks.....	22
2.2.3 HPV pisirõngaste genereerimine	22
2.2.3.1 Pisirõngaste kontroll restriktsioonanalüüsiga	23
2.2.4 U2OS rakuliini elektroporatsioon ja totaalse DNA eraldamine	23
2.2.4.1 Rakuliin ja sööde.....	23
2.2.4.2 U2OS transfektsioon elektroporatsiooni meetodil.....	24
2.2.4.3 Totaalse DNA eraldamine U2OS rakkudest	24
2.2.5 Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine	25
2.2.6 Southern blot.....	25

2.2.6.1 Restriktsioon	25
2.2.6.2 Geelelektroforees ja DNA ülekanne membraanile	25
2.2.6.3 Hübridisatsioon	26
2.3 Tulemused	27
2.3.1 HPV5NLuc ja HPV11NLuc konstruktide valmistamine	27
2.3.2 HPV5NLuc ja HPV11NLuc konstruktide replikatsioonivõime võrdlemine HPV5 ja HPV11 metsiktüüpi genoomidega	32
2.3.3 HPV5NLuc ja HPV11NLuc NLuc aktiivsuse mõõtmine ja korrelatsioon replikatsiooni signaalidega.....	34
2.4 Arutelu	36
KOKKUVÕTE	38
Summary	39
Tänuõnad	41
KASUTATUD KIRJANDUS	42
Kirjanduse loetelu	42
Kasutatud veebiaadressid	46
Lihtlitsents lõputöö elektrooniliseks avaldamiseks	48

KASUTATUD LÜHENDID

BS – sidumiskoht (*binding site*)

cNTP – tsütidiin trifosfaat (*cytidine triphosphate*)

dNTP – nukleosiid trifosfaat (*nucleoside triphosphate*)

EV – *Epidermodysplasia verruciformis*

FasL – Fas ligand on tüüp II transmembraanne valk, mis kuulub kasvaja nekroosi faktorite hulka (*Fas ligand*)

HPV – inimese papilloomiviirus (*Human papillomavirus*)

IMDM – *Iscove Modified Dulbecco Medium*

LB – lüsogeenne sööde (*lysogeny broth*)

ND10 – tuuma kehakesed (*nuclear bodies*)

ORF – avatud lugemisraam (*open reading frame*)

ori – replikatsiooni origin (*origin of replication*)

PBS – fosfaatpuhver (*phosphate-buffered saline*)

SB – Southern blot

TAE – tris-atsetaat-EDTA (*tris-acetate-EDTA*)

URR – ülesvoolu asuv regulatoorne ala (*upstream regulatory region*)

p53 – kasvaja supressorvalk 53 (*tumor supressorprotein 53*)

pRB – retinoblastoomi valk (*retinoblastoma protein*)

SISSEJUHATUS

Inimese papilloomiviirused (HPV – *Human Papillomavirus*) on kaheaheelalise DNA genoomiga viirused, mis nakatavad nii naha kui ka limaskestade basaalseid keratinotsüüte ja on sõltuvad nende diferentseerumise programmist. Papilloomiviirused levivad otsesel kokkupuutel infitseeritud naha- või limaskestaga. Tavaliselt püsib viirus organismis latentsena. Madalariski tüübid võivad aga tekitada healoomulisi kasvajaid – tüükaid, papilloome ja muid epiteeli vohandeid, ning kõrgeriski tüübid pahaloolumulisi kasvajaid. Kõige laiemalt levinud papilloomiviiruse poolt tekitatud pahaloolumuline kasvaja on emakakaelavähk. Samuti esineb ka teisi pea-, kaela-, naha- ja anogenitaalpiirkonna kasvajaid.

Kuigi see, et HPV-d põhjustavad emakakaela- ja teisi kasvajaid on avastatud juba aastakümneid tagasi, pole veel seniajani välja töötatud efektiivseid ravimeid nende vastu, kuna meie teadmised viiruse elutsüklist on lünklikud. See on põhjustatud sellest, et HPV elutsükkel on tihedalt seotud nakatava epiteelkoe diferentseerumisega ning viirusele soodsate tingimuste loomine laboritingimustes on üpris keeruline. Praegusel ajal kasutatakse selleks näiteks osteosarkoomi rakuliini U2OS, milles on võimalik saavutada keratinotsüütidega väga sarnast geenide ekspressiooni.

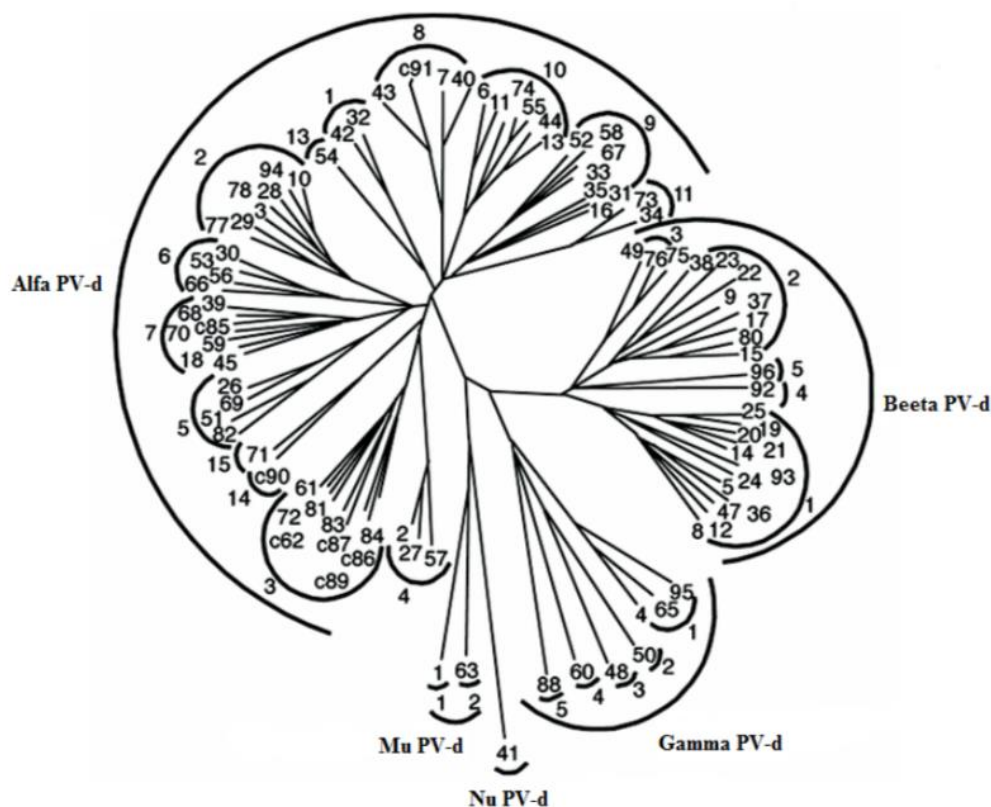
Papilloomiviiruse elutsükli uurimises on olulisel kohal viiruse replikatsiooni kulgemise uurimine. Laboratoorses tingimustes kasutatakse replikatsiooni analüüsiks tavaliselt Southern blot ja PCR meetodeid, mis on aega nõudvad ja kallid protseduurid. Selleks, et lahendada seda probleemi on võimalik kasutada bioluminestsentsi markereid replikatsiooni efektiivsuse kiireks analüüsimiseks.

Antud bakalaureusetöö esimeses osas kirjeldatakse inimese papilloomiviiruse elutsükli kulgemist, eraldi HPV tüüp 5 ja 11 viiruseid ja bioluminestsentsuse kasutamist laboritingimustes. Eksperimentaalse osa eesmärgiks on kloonida NLuc kodeeriv järjestus inimese papilloomiviiruse tüüp 5 ja 11 genoomidesse ning kontrollida nende replikatsioonivõimet U2OS rakkudes. Bakalaureusetöö koostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse viroloogia uurimisgrupis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Inimese papilloomiviirused

Inimese papilloomiviirused (HPV-d ehk *Human Papillomaviruses*) on viirused, mis nakatavad epiteelkoe keratinotsüüte. Papilloomiviirused (PV-d) on liigi- ja koespetsiifilised ning sõltuvalt tüübist nakatavad imetajaid, kalu, roomajaid ja linde. HPV genoom on umbes 8 kbp suurune tsirkulaarne kaheaheelaline DNA, mis ühenduses histoonidega moodustab minikromosoomi. Viirustel on membraanita ikosaedriline virion, mis on umbes 55 nm suurune (Pinidis *et al.*, 2016). Kapsiidi moodustavad kaks valku L1 ja L2, kusjuures L1 kattevalk on kõige konserveerunud ja seepärast klassifitseeritakse PV-d selle geeni nukleotiidsel järjestusel põhjal. Tänapäevaks on teada üle 370 PV tüüpi ja nendest üle 190 on HPV erinevad tüübid (<https://pave.niaid.nih.gov/>) (Joonis 1). Fülogeneesi alusel jagatakse HPV-d alfa-, beeta-, gamma-, mu- ja nu perekonda (Syrjänen, 2018).



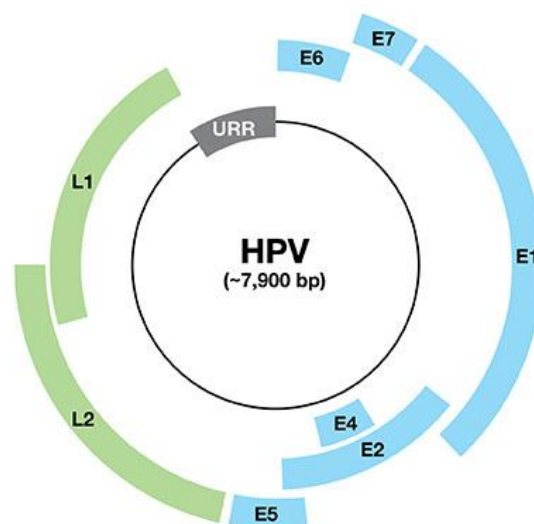
Joonis 1. HPV-de fülogeneetiline puu. Joonisel on näidatud HPV L1 kapsiidivalke kodeeriva DNA järjestuste erinevuse alusel kokkupandud fülogeneetiline puu. HPV-d jaotatakse 5 erinevasse perekonda: alfa, beeta, gamma, mu ja nu. Lisaks sellele liigitakse perekondi eraldi gruppideks vastavalt nende bioloogilisele erinevusele (Muudetud joonis Doorbar, 2006).

HPV-d jagatakse nende nakatamispiirkonna alusel limaskesti või nahka nakatavateks. Lisaks sellele jagatakse patoloogia iseloomu põhjal madala- ja kõrgeriski viirusteks (Sichero *et al.*, 2017). Kõrgeriski viiruste tüübid, nagu näiteks HPV18, HPV16, HPV31 jne, põhjustavad pahaloomuliste kasvajate teket. Madalariski tüübid võivad olla põhjuseks healoomuliste kasvajatele ehk tüügastele ja papilloomidele ning nende hulka kuuluvad näiteks HPV6 ja HPV11 jt tüübid. Tavaliselt kaovad nende poolt põhjustatud kasvajakasvaja ise aja möödudes tänu omandatud immuunsüsteemi vastusele (Rocha-Zavaleta *et al.*, 2004).

1.2 Genoomi ülesehitus

Kõik HPV-d kodeerivad 8 peamist valku: 6 varajast (E – *early*), mis osalevad viiruse reguleerimises funktsioonides ning 2 hilist (L – *late*) valku, mis osalevad viiruse pakkimises ja kapsiidi moodustamises. Varajane piirkond on vajalik viirusgenoomi replikatsiooniks ja transkriptsiooniks, rakutsükli moduleerimiseks, apoptoosi kontrolliks ja nakatunud raku füsioloogia muutmiseks. Kõikide nende valkude ekspressioon leiab aset infektsioonitsükli algusest kuni viimaste etappideni. Hiline piirkond vastutab eelkõige HPV genoomi pakkimise viiruspartiklitesse ja peremehe rakust väljumise eest ning selles olevate geenide avaldumine leiab aset ainult infektsioonitsükli lõpus (Graham, 2010).

Lisaks sellele jääb varajase ja hilise piirkonna vahele umbes 900 nukleotiidi pikkune mittekodeeriv URR (*upstream regulatory region*) piirkond, mis on oluline viirusgenoomi replikatsiooniks ja transkriptsiooniks (Harari *et al.*, 2014) (Joonis 2).

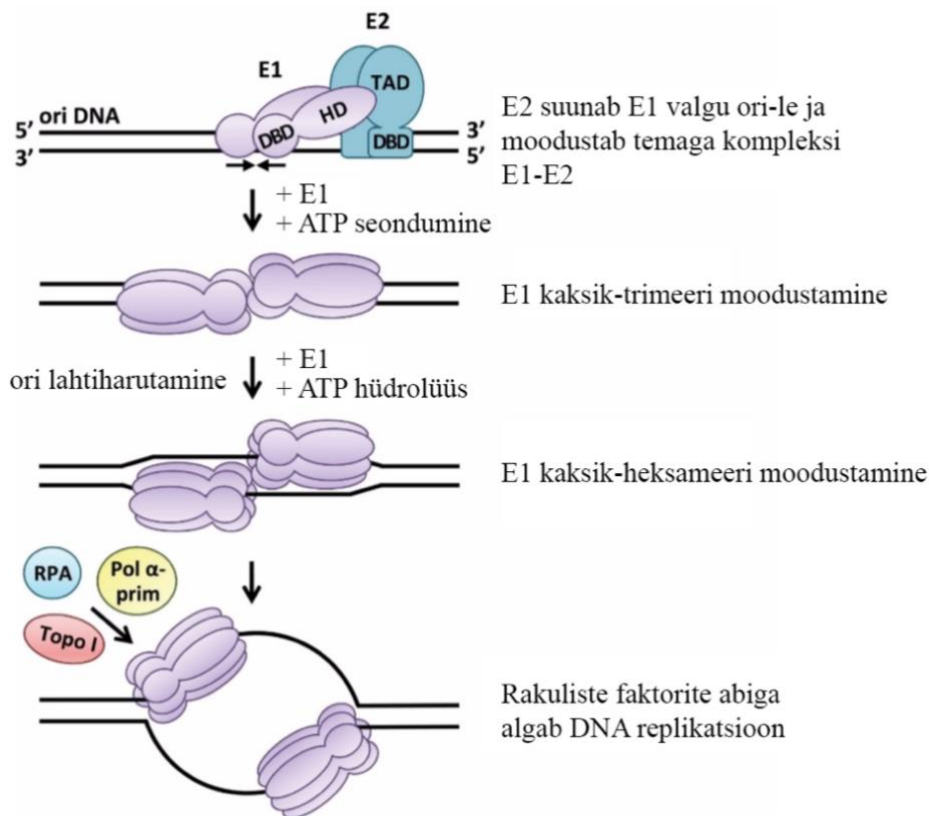


Joonis 2. HPV genoomi skemaatiline ülesehitus. HPV genoom on ligikaudu 8000 nukleotiidi pikkune ja jaguneb kolmeks piirkonnaks: varajane (joonisel tähistatud helesinisega avatud

lugemisraamid E1, E2, E4, E5, E6, E7), hiline (märgitud rohelisega lugemisraamid L1 ja L2) ning URR piirkond (Joonis on võetud Yu, 2017).

1.3 Inimese papilloomiviiruse valkude funktsioonid

E1 valk omab ATPaasi ja DNA helikaasi aktiivsust ning on absoluutselt vajalik viiruse DNA replikatsiooniks. Seondudes E2 valguga moodustab E1 heksameerse kompleksi, mis seostub DNA-ga ja harutab seda lahti (Joonis 3) (<https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-31/>). E1 valk jagatakse kolmeks funktsionaalseks segmendiks: N-terminaalne osa mis sisaldab reguleerivaid järjestusi, keskmine domään mis on vajalik DNA-ga seostumiseks ning C-terminaalne domään mis omab ATPaasi aktiivsust ja osaleb DNA lahtiharutamises (Bergvall *et al.*, 2013).



Joonis 3. E1 valgukompleksi seondumine DNA-ga. E2 valgu abiga seondub E1 dimeer E1BS (E1 *binding site*) replikatsiooni originis (ori) oleva E1 ori järjestusega. Seejärel ATP vabastab E2 valgu ning moodustatakse E1-e kaksik-trimeer. Lõpuks moodustub E1 kaksik-heksameerne kompleks, mis võimaldab alustada replikatsiooni rakuliste replikatsioonifaktorite poolt (Muudetud joonis Bergvall *et al.*, 2013)

E2 on viiruse replikatsiooni ja transkriptsiooni regulatsioonis osalev valk. Seondub spetsiifiliselt DNA-le ja reguleerib transkriptsiooni viiruse promootoritelt. Madalatel E2

kontsentratsioonidel aktiveeritakse viiruse transkriptsiooni ning kõrgel tasemel transkriptsioon inhibeeritakse (McBride, 2013). Koosneb N-terminaalsest transaktivatsiooni domäänist, C-terminaalsest DNA sidumise domäänist ning nende vahel paikneb seriini ja arginiini rikas piirkond (*Hinge*) (Graham, 2016; <https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-31/>). E8^{E2} valk moodustatakse splaissingu tulemusena E1 sees paiknevast E8 ORF-i järjestusest, E2 *hinge* piirkonnast ning E2 C-terminaalsest domäänist. Valk käitub kui replikatsiooni ja transkriptsiooni repressor, hoides genoomi koopiaarvu madalal (McBride, 2013).

E4 valk on transleeritud E1^{E4} mRNA-lt, mis on splaissingu produkt. Ta sisaldab E1 initsiaator koodonit ning E4 ORF paikneb E2 geenis (Doorbar, 2013). Kuigi E4 nimetatakse varajaseks valguks, ekspresseeritakse teda põhiliselt hilises faasis. Viiruse partikkelites teda ei leidu. Osaleb viirusgenoomi amplifikatsiooni toetamises, hiliste geenide ekspressiooni regulatsioonis, viiruste valmimises ning nende väljumises rakust (<https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-31/>).

E5 on lühike hüdrofoobne transmembraanne valk, mida leidub ainult mõnedes PV tüüpides (DiMaio ja Petti, 2013). Ta on üks kolmest PV poolt kodeeritud onkovaalgest. E5 aktiveerib mitmeid keratinotsüütide jagunemist soodustavaid signaaliradu (nt EGF). Samuti on ta võimeline inhibeerima FasL poolt põhjustatud apoptoosi ja soodustama sellega rakkude proliferatsiooni (Pang ja Thierry, 2013).

E6 on üks kolmest HPV onkovaalgest. Ta võib moodustada kompleksi E6AP ubikvitiin proteiin-ligaasiga, mis seondub p53 transkriptsioonifaktoriga ja läbi selle märgistab seda proteasoomseks lagundamiseks. Kõrge riskiga viirused kasutavad seda mehhanismi p53 funktsiooni inhibeerimiseks, mille tulemusena blokeeritakse rakkude minemine apoptoosi ja stimuleeritakse rakkude jagunemist (Pang ja Thierry, 2013).

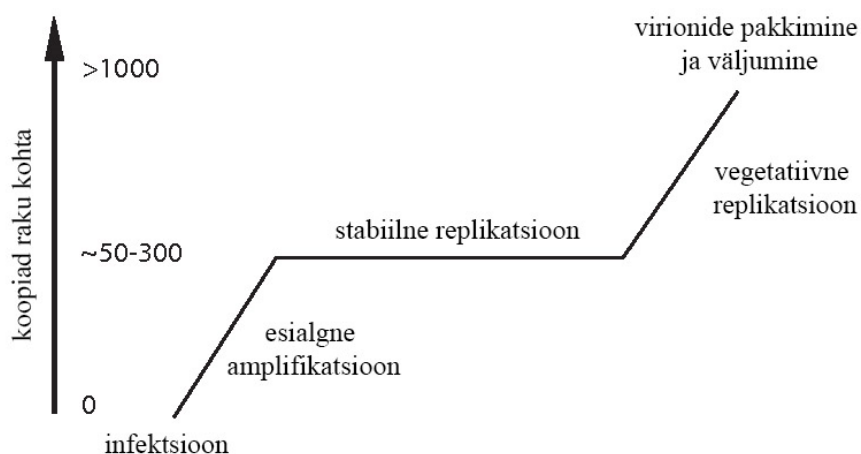
E7 töötab koos E6 valguga, võttes märklauaks peremehe retinoblastoomi (pRb) perekonda kuuluvad tuumorsupressorvalgud. pRb osaleb E2F transkriptsioonifaktori negatiivses kontrollis ning E7 seandumisel pRb valguga pRB degradeeritakse ja E2F transkriptsioonifaktor vabaneb soodustamaks rakulist transkriptsiooni. Tulemuseks on rakutsükli sunnitud jätkamine (Hoppe-Seyler *et al.*, 2018).

L1 ja L2 on mõlemad virioni kattevalgud. L1 mängib olulist rolli viiruse infektsiooni alustamises, kinnitades rakule läbi hepariinsulfaati retseptori (Buck *et al.*, 2013). L2 osaleb samuti infektsiooni algatamises ning aitab hiljem kaasa virioni kokkupanemisele ja DNA pakkimisele (Garcia-Vallve *et al.*, 2005).

1.4 HPV elutsükkel

HPV sihtmärgiks on mitmekihiline lameepiteel, mis koosneb põhiliselt erinevates differentseerumise staadiumites olevatest keratinotsüütidest. Viirus läbib enda elutsükli kolm replikatsiooni faasi: esialgne amplifikatsioon, stabiilne replikatsioon ja vegetatiivne replikatsioon (Joonis 4) (Fisher, 2015).

Selleks, et HPV saaks nakatada keratinotsüüte, on vajalikud naha mikrohaavandid, et viirus saaks seostuda mitmekihilise epiteeli basaalmembraaniga. Infitseeritud basaalsetes rakkudes säilitatakse viiruse genoomid madala koopiaarvuga (Doorbar *et al.*, 2012). Toimub E1 ja E2 valkude ekspressioon ning nende kinnitumine viiruse replikatsiooni origin-le, andes võimaluse rakulistel replikatsioonifaktoritel amplifitseerida viiruse episomaalset genoomi (Lazarczyk *et al.*, 2009). Viirused säilitavad stabiilse koopiate arvu raku kohta kuni viimase replikatsiooni faasini, kus koopiate arv suurendatakse ligikaudu 1000-ni ja alustatakse virionide pakkimist kapsiidi. Valmis virionid väljutatakse surnud rakkude pinna pealt naha koorumise käigus.



Joonis 4. HPV elutsükli replikatsiooni faasid. Viiruse infektsioonitsükli esineb kolm replikatsiooni faasi: esialgne amplifikatsioon, stabiilne replikatsioon, kus säilitatakse stabiilne HPV DNA koopiate arv 50-300 raku kohta ning sellele järgnev vegetatiivne replikatsioon. Kaks esimest faasi toimuvad epiteelkoe basaalkihtides ning viimane leiab aset virionide moodustamise ajal diferentseerunud keratinotsüütides (Muudetud joonis Fisher, 2015).

1.4.1 Sisenemine rakku

Kuigi tänapäeval pole veel täpselt teada, mis retseptorid osalevad HPV sisenemises rakku, arvatakse, et hepariinsulfaati proteoglykaan ning ka laminiin mängivad olulist rolli HPV kinnitumises rakule. Pärast kinnitumist läbib L2 valk struktuurse muutuse ja saab toimuda seondumine sekundaarsele retseptorile (Nguyen *et al.*, 2014). Sekundaarseks retseptoriks on membraanne valk α -6 integriin, mis mängib olulist rolli rakkudevaheliste ühenduste loomises. Virionid sisenevad rakku endotsütoosiga ning L1 valk lagundatakse raku lüsosüümide poolt. L2 moodustab aga kompleksi viiruslikku DNA-ga, liikudes edasi Golgi kompleksi (Aksoy *et al.*, 2017). Viirusliku DNA sisenemiseks rakutuuma on vajalik mitoos toimuv tuumamembraani lagunemine. Sisenedes tuuma, seob L2-kompleks ND10 tuuma kehakesi, mille abil tõmmatakse viiruse genoom peremehe kromosoomi lähedale. Rakutsükli interfaasis toimub kromosoomide dekontenseerumine ja läbi selle vabastatakse ND10. Rakulise kromosoomi dekontenseerumises osalevad faktorid eraldavad ka L2 valgu viiruse genoomist, mille järgi saab toimuda HPV replikatsioon ja transkriptsioon (McBride, 2017).

1.4.2 Esialgne amplifikatsioon

HPV replitseerub ekstrakromosomaalse episoomina peremeesrakus. Peaaegu kohe pärast rakutuuma sisenemist algatakse esialgne genoomi amplifikatsioon, millega saavutatakse umbes 50-300 koopiat raku kohta ja DNA säilib episoomidena (Nguyen *et al.*, 2014, Doorbar *et al.*, 2012). Esimesed viirusliku genoomi transkriptid on *E1* ja *E2*, mis kasutavad raku enda replikatsiooni masinavärki viirusgenoomi koopiaarvu suurendamiseks (Kadaja *et al.*, 2009). Esialgne viiruse replikatsioon peremeesrakus indutseerib DNA kahjustuse vastuse, mis omakorda soodustab viiruse genoomi edasist DNA replikatsiooni (McBride, 2017).

1.4.3 Latentne periood

Varajase replikatsiooni etapi jooksul saavutatud püsiv viirusliku DNA koopia arvule järgneb replikatsiooni järgmine faas – latentne periood ehk stabiilne säilumisfaas. Rakutsükli S-faasi käigus leiab aset viirusgenoomide kahekordistumine (Kadaja *et al.*, 2009) ning E2 valk kindlustab viirusgenoomide võrdse jaotumise tütarakkude vahel, kinnitades genoomid peremeesraku kromosoomidele (McBride, 2008). See toimub tänu E2-s paiknevale DNA-d siduvale domäänile ja transaktivatsiooni domäänile, mis ühineb peremehe kromatiiniga (McBride, 2013). Latentses olekus võivad viiruse genoomid paikneda basaalkihi rakkudes aastaid kuni immuunsüsteem kõrvaldab nad organismist (kui üldse kõrvaldab).

1.4.4 Vegetatiivse replikatsioon

Kohe pärast seda, kui epiteelirakud eralduvad basaalmembraanilt, peatavad rakud jagunemise ja alustavad diferentseerumist (Kadaja *et al.*, 2009). Diferentseerumisega kaasneb ka raku mitootilise aktiivsuse peatamine. Viiruse onkovalk E7 loob diferentseerumist alustanud rakkudes S-faasi sarnast keskkonda viirusliku genoomi edasiseks replikatsiooniks (Bodily *et al.*, 2013). Kui infitseeritud rakud jõuavad suprabasaalsesse epiteelkihti, siis E1 ja E2 valgu transkriptsioon lülitub E2 poolt reguleeritud varajasest promootorilt viirusehilisele promootorile, mis põhjustab E1 ja E2 valgu taseme kasvu (Klumpp ja Laiminis, 1999) ja koopiate arv raku kohta jõuab umbes 1000-ni. Siis alustatakse koos varajaste geenidega ka L1 ja L2 kapsiidivalkude sünteesi (Kadaja *et al.*, 2009).

1.4.5 Virionide kokkupakkimine ja väljumine rakust

PV virionide kokkupakkimine toimub ainult tuumas ja seepärast omavad L1 ja L2 valgud tuuma lokalisatsiooni signaale (Darshan *et al.*, 2004). Kui kapsiid on tuumas kokkupakitud, moodustatakse L1 valkude vahel disulfiidsillad, mis soodustavad kapsiidi lõplikku küpsemist (Conway *et al.*, 2009). Küpsemine teeb kapsiidi stabiilsemaks ja ei lase proteaasidel seda lagundada (Buck *et al.*, 2005b). Seoses sellega, et PV ei ole lüütiline viirus, väljuvad virionid koos surnud rakkudega ülemistest epiteelikihtidest (Kadaja *et al.*, 2009).

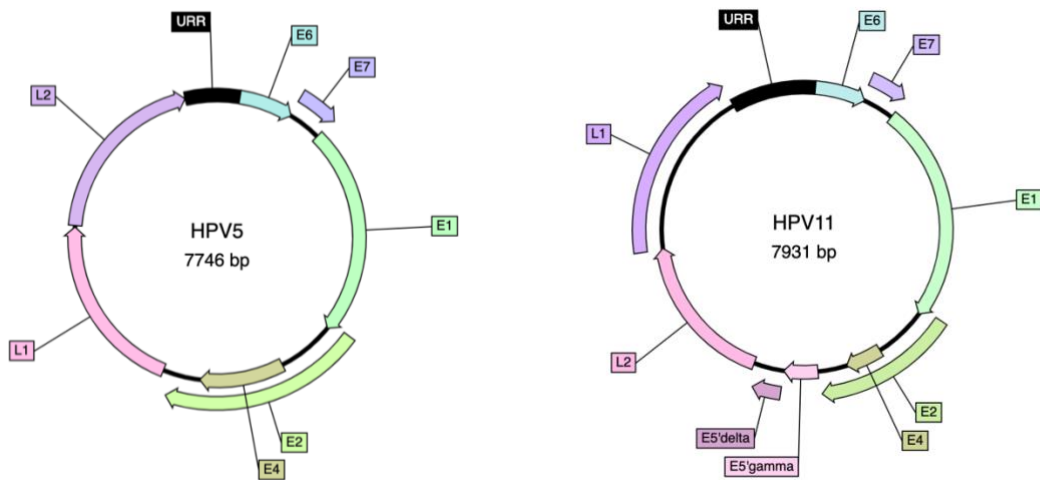
1.5 HPV5

HPV tüüp 5 kuulub beeta perekonna gruppi 1, mis nakatab naha epiteelkihti. HPV5 tuntakse kui naha lamerakulise kartsinoomi tekitajat *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) põdevatel inimestel ja arvatakse kõrgeriski tüübiks. EV on harva esinev autosomaalne retsessiivne nahahaigus, mis võib nõrgestatud immuunsüsteemiga isikutel põhjustada soomuseliste vohandite ja plekkide kasvu nahal (Orth, 2006). Lõpuks võivad healoomulised vohandid minna üle pahaloomulisteks ja põhjustada nahavähki (Shruti *et al.*, 2017). HPV5 püsib eluaeg organismis ning nakatanutel on alati risk saada pahaloomulist vähki eriti nahal, mis on eksponeeritud pikaajaliselt päikesekiirgusele (Kalinska *et al.*, 2016). HPV5 genoom on toodud Joonisel 5.

1.6 HPV11

HPV11 kuulub alfa perekonna gruppi 10 ja arvatakse madalariski tüübiks. Antud viiruse tüüpi seostatakse tihtipeale kõri papillomatoosiga ning genitaalsete ja perianaalsete tüügastega. Kõik HPV11 poolt põhjustatud vohandid taanduvad iseenesest (Klozar *et al.*,

2010). Kuigi teda loetakse madalriski tüübiks, põhjustab ta 4% juhtumitest agressiivset peenise vähki (Rubin *et al.*, 2001) ning võib olla ka anogenitaalse kartsinoomi põhjustajaks (Guimera *et al.*, 2013). HPV11 genoom on toodud Joonisel 5.



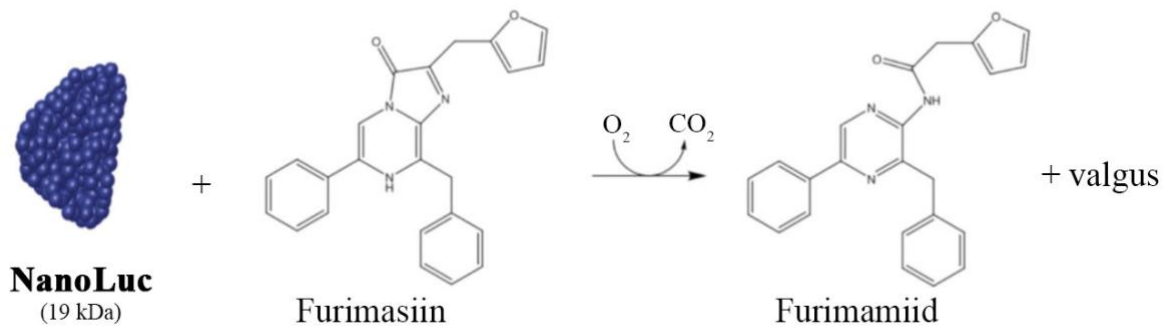
Joonis 5. HPV5 ja HPV11 genoomide ülesehitus. Genoomid on tehtud <http://www.molbiotools.com/WebDSV/index.html> lehel.

1.7 Bioluminestsentsi kasutamine laboritingimustes

Bioluminestsents on organismide poolt toodetud nähtav valgus, mis on keemilise reaktsiooni saagis, seega võib seda liigitada kemiluminestsentsi fenomeni alla. Valgusprodukti saamiseks kulgeb järgmine reaktsioon: substraat reageerib ensüümiga hapniku juuresolekul ning tulemuseks on ergastatud olekus produkt, mis hiljem minnes üle madalama energiaga olekusse eraldab energiat valgusena (Atkins ja Jones, 2008). Üks kõige laiemalt laboritingimustes kasutatav bioluminestsentsi tekitav ensüüm on lutsiferaas. Olenevalt organismist ja tema poolt kodeeritavatest lutsiferaasidest on olemas erinevaid keemilise struktuuriga substraate.

Tänapäeval kasutatakse lutsiferaaside valke molekulaarbioloogia, rakubioloogia, geenitehnoloogia jt uuringutes. Selle kasutamine võimaldab kindlaks teha ja kaardistada gene, uurida geeni ekspressiooni, jälgida haiguse levikut jne (Widder ja Falls, 2014). Meie laboris on konstrueeritud HPV18RLuc, HPV6RLuc ja HPV5RLuc genoomid, mis sisaldavad *Renilla* lutsiferaasi markergeeni (Toots *et al.*, 2017). *Renilla*-taoliste süsteemide kasutamine on aga piiratud nende suuruse, stabiilsuse ja madala aktiivsuse tõttu. Seepärast on väljatöötatud uus lutsiferaasi süsteem – NanoLuc (NLuc), mis on avastatud süvameres elavast krevetist *Oplophorus gricilirostris* (Hall *et al.*, 2012). Kuna eraldatud

modifitseerimata lutsiferaasi geen on halvasti ekspresseeritav ja ebastabiilne, siis efektiivse lutsiferaasi süsteemi saavutamiseks on seda geeni muteeritud. Keemiline reaktsioon NLuc bioluminestsentsuse saavutamiseks on toodud Joonisel 6 (England *et al.*, 2016). Võrreldes teiste lutsiferaasi süsteemidega, omab NLuc umbes 100 korda kõrgemat lutsiferaasi aktiivsust, mis võimaldab geeni ekspressiooni uurimisel kasutada väiksemat kogust uuritavat DNA-d ja palju vähem rakke. Lisaks sellele on lutsiferaasi aktiivsuse kestvus pikem ja vastav geen on väike – 515 nt (Hooper, 2018).



Joonis 6. Keemiline bioluminestsentsuse reaktsioon NLuc süsteemis. NLuc ensüümi reageerimisel furimasiin substraadiga hapniku juuresolekul eraldub produktina furimamiid ning valgus (Muudetud joonis England *et al.*, 2016).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

HPV replikatsiooni analüüsi teostatakse tavaliselt kasutades kas Southern blot (SB) või PCR meetodeid. Mõlemad meetodid võtavad palju aega ning on töömahukad ja kallid. Minu bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks on konstrueerida HPV5NLuc ja HPV11NLuc genoomid selleks, et muuta HPV replikatsiooni analüüs kiiremaks, lihtsamaks ja kvantitatiivsemaks.

Enne tööle asumist püstitati järgmised eesmärgid:

1. Kloneerida koodon-optimizeeritud NLuc ja ise protsessitav FMDV-2A (*Foot-and-Mouth Disease Virus 2A*) peptiidi kodeerivad järjestused E2 avatud lugemisraami vahetult pärast E1 Stop koodonit metsiktüüpi HPV5 ja HPV11 genoomi. NLuc ja FMDV-2A peptiidi järjestusele järgneb metsiktüüpi E2 avatud lugemisraam.
2. Kontrollida, kas valmistatud HPV5NLuc ja HPV11NLuc konstruktid on võimelised replitseerima U2OS rakuliinis ning võrrelda nende replikatsioonivõimet HPV5 ja HPV11 metsiktüüpi genoomidega.
3. Veenduda, et saadud NLuc signaalid vastavates HPVNLuc genoomidest korreleeruvad replikatsiooni signaalidega U2OS rakkudes.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Kasutatud plasmiidid

- **HPV5-pMC.BESPX** (11831 bp)

HPV5 genoom kloonitati plasmiidist pBR322-HPV5 pMC.BESBX plasmidi SacI saiti (Sankovski *et al.*, 2013). Seda plasmidi kasutatakse HPV5 pisirõngaste (ingl. *minicircle*) genereerimiseks.

- **HPV11-pMC.BESPX** (12015 bp)

Plasmidi konstrueerimiseks viidi HPV11 genoomne DNA pMC.BESPX vektori BamHI saiti (Orav *et al.*, 2015). Plasmidi kasutatakse HPV11 pisirõngaste genereerimiseks.

- **HPV5-E2-NLuc-pUC57** (4092 bp)

Plasmiid oli tellitud *GENEWIZ* ettevõttelt. Modifitseeritud pUC57 vektorisse oli kloonitud uus HPV5 genoomi jupp AdeI (DraIII) (CACTCA↓GTG) ja BstXI (CCATAGCA↓ATGG) unikaalsete restriksioonisaitide vahel. Modifitseeritud HPV5 genoomi osa sisaldab E1 avatud lugemisraami alates CACTCAGTG restriksioonisaadist kuni stop-koodonini. Sellele järgnevad 513 bp pikkune koodon-optimeeritud NLuc ja ise protsessitav FMDV-2A peptiidi kodeerivad järjestused ning E2 5'otsa kodeeriv järjestus kuni restriksioonisaadini CCATAGCAATGG.

- **HPV11-E2-NLuc -pUC57** (4603 bp)

Plasmiid oli samuti tellitud *GENEWIZ* ettevõttelt. Analoogselt HPV5 E2-NLuc plasmiidile, oli uus HPV11 genoomi jupp kloonitud pUC57 vektorisse SwaI (ATTT↓AAAT) ja SdaI (CCTGCA↓GG) unikaalsete restriksioonisaitide vahele. Modifitseeritud HPV11 genoomi osa sisaldab E1 avatud lugemisraami alates ATTTAAAT restriksioonisaadist, kuni stop-koodonini. Sellele järgnevad 513 bp pikkune koodon-optimeeritud NLuc ja ise protsessitav FMDV-2A peptiidi kodeerivad järjestused ning E2 5'otsa kodeeriv järjestus kuni CCTGCAGG restriksioonisaadini.

- **HPV5 metsiktüüpi genoomi sisaldav pisirõngas** (7746 bp)

Plasmiid oli valmistatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi Molekulaarse Viroloogia laboris, kasutades pisirõnga plasmidi tootmise tehnoloogiat. Plasmiid toodeti kasutades

HPV5-pMC.BESPX plasmidi. Erineb metsiktüvest ainult attR järjestuse poolest URR piirkonnas, mida saadi rekombinatsiooni tulemusena Φ C31 integraasiga.

- **HPV11 metsiktüüpi genoomi sisaldav pisorõngas (7931 bp)**

Plasmiid oli toodetud analoogselt eelnevalt kirjeldatud HPV5 metsiktüüpi genoomi sisaldava pisorõnga plasmidile. See toodeti kasutades HPV11-pMC.BESPX plasmidi.

2.2.2 HPV5NLuc-pMC.BESBX ja HPV11NLuc-pMC.BESBX konstruktid tegemine

2.2.2.1 Transformatsioon

Selleks, et suurendada edaspidises töös kasutatavate plasmiidide kogust, kasutati transformeerimiseks kompetentseid bakterirakke (*E. coli* tüvi DH5 α). Rakud säilitati -70 °C juures ning enne transformatsiooni sulatati jääl umbes 15 min. Bakteritele lisati 10 ng HPV5-E2-NLuc-pUC57 ja HPV11-E2-NLuc-pUC57 plasmidi ning inkubeeriti jääl 30 min. Seejärel teostati "kuum-šokk" (3 min 37 °C) ja tõsteti üheks minutiks tagasi jääle. Pärast seda lisati igasse tuubi 800 μ l LB söödet (10 g/L trüpton, 5 g/L pärmi ekstrakt, 10 g/L NaCl) ning inkubeeriti 1 h 37 °C juures. 50 μ l rakususpensiooni plaaditi 25 ng/ μ l kanamütsiini (Km) sisaldavatele LB agarile ning tassid inkubeeriti 37 °C juures üleöö.

Järgmisel hommikul täheldati kolooniate kasvu. Igalt tassilt valiti 2 kolooniat, et hiljem kasutada neid, kus kasv toimus kiiremini. Iga koloonia viidi 3 ml LB söötmesse koos 3 μ l Km (50 ng/ μ l). Katseklaasid inkubeeriti 5 h 37 °C ja 220 rpm juures loksutil (*Sanyo Orbital Incubator*).

Õhtul valiti mõlemast proovist parema kasvuga kloon ja viidi 40 μ l rakususpensiooni 40 ml LB söötmesse koos 40 μ l Km (50 ng/ μ l). Kolvid inkubeeriti loksutil üleöö 37 °C 220 rpm juures.

2.2.2.2 Plasmidi eraldamine

Plasmidi eraldamiseks bakteritest kasutati *Endotoxin-free Plasmid DNA Purification Midi kit-i* (*Thermo Fisher Scientific*). DNA puhastati tootja poolt väljatöötatud protokollil alusel toatemperatuuril. Alguks rakud tsentrifugeeriti (*Eppendorf Centifuge 5810 R*) 10 min 5000 rpm juures. Supernatandi eemaldamise järel resuspendeeriti bakterid 4 ml RES-EF puhvril ning lüüsi 4 ml LYS-EF puhvril. Lüüsi puhver neutraliseeriti, kasutades 4 ml NEU-EF puhvrit ning lüüsi tsentrifugeeriti 10 min 4 °C ja 5000 rpm juures. Kolvidele asetati DNA puhastamiseks ettenähtud kolonnid paberfiltritega, mis tasakaalustati 15 ml EQU-EF-puhvriga. Pärast tsentrifugeerimist kanti saadud supernatant, mis sisaldas plasmidset DNA-d, kolonnile. Edasi järgnes pesu: 5 ml FIL-EF, filter eemaldati, 35 ml ENDO-EF ja 15 ml WASH-EF. DNA elueeriti 5 ml ELU-EF puhvriga. Lahusele lisati 3 ml isopropanooli, segati vortexi abil 30 sek jooksul ning tsentrifugeeriti 30 min 4 °C ja 15 000 g juures, mille käigus

DNA sadenes välja. Sadet pesti 5 ml 70 % etanooliga, tsentrifuugiti 5 min 4 °C ja 15 000 g juures, eemaldati supernatant ja sade lahustati 250 µl H₂O vees.

DNA kontsentratsioonid mõõdeti kasutades Nanodrop-1000 spektrofotomeetrit (*Thermo Fisher Scientific*) 260 nm lainepikkusel.

2.2.2.3 Restriksioon ja DNA fragmentide puhastamine geelist

Selleks, et kloneerida NLuc kodeeriv järjestus vastavate HPV5 ja -11 genoomidesse, kasutati restriksiooni ning seejärel ligeeriti geelist puhastatud DNA fragmendid kokku. Restriksiooni reaktsioon sisaldas 5 µg iga proovi DNA-d, 2 µl igat restriктаasi ja 10xFastDigest puhvrit (*Thermo Fischer Scientific*) vastavalt reaktsiooni lõppmahule ja vajadusel H₂O-d lõppmahu korrigeerimiseks. Kasutatud restriктаasid on näidatud Tabelis 1.

Tabel 1. Töö käigus kasutatud restriктаasid.

Plasmiid	Restriктаas
HPV5-pMC.BESPX ja HPV5-E2-NLuc-pUC57	AdeI (DraIII) (katalooginumber FD1234)
	BstXI (FD1024)
HPV11-pMC.BESPX ja HPV11-E2-NLuc-pUC57	SwaI (SmiI) (FD1244)
	SdaI (FD1194)

Restriksiooni produktid eraldati 0,8% agarosgeelil, mis sisaldas 0,3 µg/ml etiidumbromiidi, geeli jookutati umbes 1 tund 100 V juures.

Ultravioletvalguse all lõigati geelist välja bändid:

1. HPV5-pMC.BESPX ja HPV11-pMC.BESPX puhul ülemised;
2. HPV5-E2-NLuc-pUC57 puhul alumine (1371 nt);
3. HPV11-E2-NLuc-pUC57 puhul tekkis 3 fragmenti, millest 2 alumist jooksid teineteisele väga lähedal, seepärast lõigati välja mõlemad alumised bändid (oodatav pikkus oli 1895 nt).

DNA puhastati geelist, kasutades *Zymo Gel Purification kit-i* (*Zymo Research*). Tsentrifuugimised teostati 13 000 rpm juures toatemperatuuril. Kõik väljalõigatud

fragmendid viidi 1,5 ml tsentrifuugi tuubidesse ja lisati 3 ruumala ADB lahust vastavalt geeli fragmentide massile. Seejärel inkubeeriti lahuses olevaid geelitükke 55 °C juures kuni geel oli täiesti sulanud. Sulatatud geelilahused viidi üle kolonnile, mis oli asetatud tuubi ja tsentrifuugiti 1 min. Seejärel lisati 200 µl Wash Buffer-it DNA pesemiseks ja tsentrifuugiti uuesti 30 sek. Pesemise etappi korrati veel üks kord. Lõpuks asetati kolonnid uutele tuubidele, lisati 10 µl H₂O ja tsentrifuugiti 1 min.

2.2.2.4 Ligeerimine ja transformeerimine

Agaroosgeelist puhastatud DNA fragmendid ligeeriti omavahel. Reaktsioon sisaldas 500 ng sisestatavat DNA-d ning 100 ng vektor DNA-d, 1 µl T4 DNA ligaasi (*Thermo Fisher Scientific*), 1 µl 10x reaktsiooni puhvrit ning kasutades H₂O viidi reaktsioonisegu lõppmahuni 10 µl. Ligeerimine toimus 16 °C juures üleöö. Ligeerimissegu transformeeriti DH5α kompetentsetesse rakkudesse samamoodi nagu on kirjeldatud punktis 2.2.2.1. Rakkude suspensioon tsentrifuugiti põhja, eemaldati peaaegu kogu supernatant ning resuspendeeriti rakud allesjäänud LB-s. Kogu rakususpensioon plaaditi LB + Km tassidele ja inkubeeriti 37 °C juures üleöö. Kasvavatest kolooniatest eraldati plasmiidid nagu kirjeldatud punktis 2.2.2.2.

2.2.2.5 HPV11-E2-NLuc DNA sisaldavate kolooniate kontroll PCR abil

Seoses sellega, et HPV11-E2-NLuc-pUC75 restriksiooni tulemusel tekkis 2 lähedal jooksvat DNA fragmenti, mis takistas eristada edasiseks kloneerimiseks vajalikku fragmenti suuruse järgi, siis kloneeriti mõlemad DNA-d HPV11-pMC.BESPX plasmidi. Seejärel kontrolliti HPV11-E2-NLuc järjestuse olemasolu saadud bakterite kolooniate PCR-i abil, kasutades HPV11 spetsiifilisi praimereid. Uuriti 29 kolooniat igalt tassilt ning positiivseks kontrolliks võeti 1 ng HPV11-pMC.BESPX plasmidi mallina. PCR-i teostati kasutades PCR Mastercycle aparati (*Eppendorf Scientific*). PCR reaktsiooniks võeti 3 µl 5x FIREpol PCR segu (*Solis BioDyne*), 1 pmol/µl praimereid 1 ja 2 (Tabel 2), 9 µl H₂O ning igast kolooniast proov. PCR programm on näidatud Tabelis 3. Oodatud PCRi produkt oli 1100 nt.

Tabel 2. Praimerid, mis kasutati töö käigus.

	Praimer	Järjestus
1	HPV11 E2 RV	TTACAATAAATGTAATGA
2	HPV11 E2 FW	GAAGCAATAGCCAAGCGT

Tabel 3. PCR teostamiseks koostatud programm. Tsükleid 2 – 4 korrati 25 korda.

Tsükkel	Temperatuur	Aeg
1	96 °C	12 min
2	96 °C	20 sek
3	58 °C	20 sek
4	72 °C	1 min 30 sek
5	72 °C	5 min
6	10 °C	5 min

PCR produktid eraldati 1,2% agarosgeelil, mis sisaldas 0,3 µg/ml etiidumbromiidi. Geeli jooksutati umbes 1 tund 150 V juures. Geeli vaadati UV-valguse all.

2.2.2.6 Restriksioonanalüüs HPV5 ja HPV11 jaoks

Saadud uued konstruktid nimetati HPV5NLuc-pMC.BESPX ja HPV11NLuc-pMC.BESPX. Konstruktide kontroll teostati restriksioonanalüüsi abil, kasutades võrdluseks HPV5-pMC.BESPX ja HPV11-pMC.BESPX konstrukte. HPV5 puhul lõigati igat plasmidi BamHI ja BglII restriктаasidega. HPV11 puhul EcoRV, KpnI ja XhoI restriктаasidega. Kõik restriктаasid olid ostetud firmast Thermo Fisher Scientific. Iga restriksioonisegu sisaldas 400 ng DNAd, 1 µl igat restriктаasi, 1 µl 10xGreen Buffer. Reaktsioonisegud viidi 10 µl lõppmahuni H₂O abil. Reaktsioonid inkubeeriti 30 min 37 °C juures ning seejärel lahutati 0,8% agarosgeelil 1 h 150 V juures.

2.2.3 HPV pisirõngaste genereerimine

Meie laboris kasutatakse HPV genoomide paljundamiseks n.n. pisirõngaste (*minicircle*) tootmissüsteemi, mis baseerub *E.coli* tüve ZYCY1003S2T kasutamisel (Kay *et al*, 2010).

E.coli tüvi ZYCY1003S2T sisaldab järjestusspetsiifilist rekombinaasi ΦC31 ja restriksiooni ensüümi SceI kodeerivat järjestust, mis on viidud L-arabinoosi P_{BAD} promootori kontrolli alla. L-arabinoosi lisamisel toimub integraasi ΦC31 vahendusel kohtspetsiifiline rekombinatsioon, mille tulemusena lõigatakse välja algplasmiidist suurem osa bakteriaalset DNA-d ning alles jääb kovalentselt suletud tsirkulaarne HPV genoom.

Pisirõngaste tootmist alustati HPV5NLuc-pMC.BESPX ja HPV11NLuc-pMC.BESPX konstruktide transformeerimisega ZYCY1003S2T rakkudes nii nagu on kirjeldatud punktis 2.2.2.1. 100 µl rakususpensiooni plaaditi LB+Km tassidele ja inkubeeriti 37 °C juures üleöö.

Sama päeva õhtul valmistati TB sööde (4,7 g TB pulber, 100 ml H₂O, 400 µl glütserool) ning autoklaaviti (120 °C 10 min). Järgmisel päeval pandi kasvama üks koloonia igalt tassilt 3 ml LB söötmesse, mis sisaldas 125 µg Km, 37 °C 220 rpm juurde üleöö. Järgmise päeva hommikul inokuleeriti 100 ml TB söödelt 100 µl starterkultuuriga, lisati 150 µl Km (50 µg/µl) ning pandi kasvama 37 °C ja 220 rpm juurde õhtuni. Sama päeva õhtul indutseeriti rekombinatsioon 100 ml LB, 4 ml 1 M NaOH ja 200 µl 20% L-arabinoosi lisamisega. Kolbid pandi tagasi loksutile 32 °C ja 220 rpm juurde üleööks. Järgmise päeva hommikul tõsteti temperatuur kaheks tunniks 37 °C-ni selleks, et tõsta SceI restriктаasi efektiivsust ning viia rekombinatsiooniprotsess lõpuni. Bakterid tsentrifugeeriti 10 min 5 000 rpm juures ja eemaldati supernatant. Plasmiidid eraldati *Nucleobond Xtra Midi kit*-i protokollil nagu on kirjeldatud punktis 2.2.2.2. DNA lahustati H₂O-s. Saadud pisirõngad nimetati HPV5NLuc ja HPV11NLuc.

2.2.3.1 Pisirõngaste kontroll restriksioonanalüüsiga

Saadud HPV5NLuc ja HPV11NLuc pisirõngad kontrolliti restriksiooniga. Võrdluseks kasutati HPV5 ja HPV11 metsiktüüpi genoome pisirõngaste kujul ning vastavaid algplasmide HPV5NLuc-pMC.BESPX ja HPV11NLuc-pMC.BESPX

1. HPV5 genoomi sisaldavad plasmiidid lõigati
 - a. SacI – genoomi lineariseerimiseks
 - b. BamHI – genoomi linealiseerimiseks

2. HPV11 metsiktüve pisirõngas ja HPV11NLucpMC.BESBX
 - a. HindIII – genoomi lineariseerimiseks
 - b. KpnI – genoomi lineariseerimiseks

Restriksiooniks kasutati 400 ng DNA-d lineariseerimiseks, 1 µl igat restriктаasi ja 1 µl 10xGreen Buffer. Samuti, võeti kontrolliks 1000 ng lõikamata DNA-d.

2.2.4 U2OS rakuliini elektroporatsioon ja totaalse DNA eraldamine

2.2.4.1 Rakuliin ja sööde

Töös kasutati U2OS osteosarkoomi rakke, mis kasvatati IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes, mis sisaldas 10% veise loote seerumit ning 1% penitsilliin-streptomütsiini (*Sigma-Aldrich*). Rakud inkubeeriti 37 °C ja 5% CO₂ juures.

2.2.4.2 U2OS transfektsioon elektroporatsiooni meetodil

Kõik HPV genoomid (HPV5, HPV5NLuc, HPV11 ja HPV11NLuc) transfekteeriti U2OS rakkudesse kasutades elektroporatsiooni meetodit. HPV5 puhul võeti 1800 ng ning HPV11 puhul 450 ng DNA-d. Igale proovile lisati 5 µl lõhe spermi kandja DNA-d.

24 h enne transfektsiooni jagati rakud, mis olid saavutanud ligikaudu 90% konfluentsuse uutele 100 mm läbimõõduga tassidele plaatides ühelt tassilt saadud rakud kahele tassile. Järgmisel päeval aspireeriti rakukultuurilt sööde ning pesti rakke 5 ml PBS lahusega (2,7 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 4,3 mM Na₂HPO₄), lisati 1 ml 0,25% trüpsiini-EDTA lahust (*Sigma-Aldrich*) rakkude eemaldamiseks tassilt. Rakud loeti üle kasutades rakuloendurit (Countess automated cell counter, *Invitrogen*) ning ühe plasmidi transfektsiooniks kasutati umbes 10⁶ rakke. Transfektsiooni jaoks vajalik kogus rakke (4x10⁶) tsentrifugeeriti 5 min 300 g ja 20 °C juures. Seejärel eemaldati supernatant ja rakud resuspendeeriti 1 ml söötmes. Igale DNA proovile lisati 250 µl rakususpensiooni ning kogu lahus viidi elektroporatsiooni küvettidesse. Transfekteerimine viidi läbi *Gene Pulser XCell* (*Bio-Rad Instruments*) abil, 220 V pinge ja 975 µF mahtuvuse juures. Peale poratsiooni viidi rakususpensioonid uutesse 15 ml suurustesse tsentrifugeerimis- ja inkubatsioonitubidesse, kuhu oli eelnevalt lisatud 4 ml söödet ning tsentrifugeeriti 5 min 300 g ja 20 °C juures. Rakud resuspendeeriti 9 ml söötmes. Iga proov jagati järgmisel viisil: kolme kaevu 6-kaevuliselt plaadil (2 ml kaevu kohta, edaspidi kasutati totaalse DNA eraldamiseks) ja kuuele kaevule 96-kaevulisel plaadil (100 µl kaevu kohta, edaspidi kasutati lutsiferaasi signaalide mõõtmiseks). Rakke inkubeeriti 2, 3 ja 4 päeva.

2.2.4.3 Totaalse DNA eraldamine U2OS rakkudest

2, 3 ja 4 päeva möödudes aspireeriti 6-kaevu plaatidelt sööde, rakud pesti PBS-iga ning lisati 0,5 ml lüüsipuhvrit Sol IV (20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1 g/l mM EDTA, 0.2% SDS). Seejärel lisati lüsaadile Proteinaas K (lõppkontsentratsiooniga 200 µg/ml), kõrgmolekulaarne DNA lõhuti tõmmates rakususpensiooni korduvalt läbi 23G süstlanõela ja lüsaat inkubeeriti üleöö 56 °C juures. Valkude eemaldamiseks pipeteeriti lahusele juurde 500 µl fenool-kloroformi segu (1:1), segati vortex-il ning tsentrifugeeriti toatemperatuuril 3 min 13 000 rpm juures. Ülemine, läbipaistev faas, mis sisaldas DNA-d, viidi ettevaatlikult uutesse tubidesse. Seejärel lisati 900 µl 96% etanooli, segati vortexi abil ning tsentrifugeeriti 15 min 15 000 rpm ja 4 °C juures. Supernatandi eemaldamise järel lahustati sade 100 µl TE-s (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0), kuhu oli eelnevalt lisatud 40 ng RNAas A ja inkubeeriti 37 °C juures 1 tund.

Seejärel sadestati DNA ümber, lisades 10 µl 5M NaCl ning 250 µl 96% etanooli. Proovid segati vortex-i abil ning tsentrifuugiti 15 min 15 000 rpm ja 4 °C juures. Supernatant eemaldati ja lisati 100 µl 75% etanooli, tsentrifuugiti 7 min 15 000 ja 4 °C juures. Supernatant eemaldati uuesti ja sade lahustati 30 µl H₂O-s.

Lahuses oli segu genoomsest, mitokondriaalsest ja viiruslikust DNA-st. DNA kontsentratsioonid mõõdeti Nanodrop spektrofotomeetri abil 260 nm juures.

2.2.5 Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine

Lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks aspireeriti kõikidelt proovidelt sööde vastavatel päevadel ja asetati rakud -20 °C juurde. Rakud lüüsi ühekordses passiivses lüüsipuhvris (*Promega*) kasutades 40 µl lüüsipuhvrit kaevu kohta 10 min toatemperatuuril. 10 µl lüsaate tõsteti valgetele plaatidele kahes replikaadis. Ühest mõõdeti NLuc aktiivsust, teisest aluselise fosfataasi aktiivsust. NLuc aktiivsust mõõdeti kasutades *Nano-Glo Luciferase Assay System kit*-i (*Promega*). Igale proovile lisati 25 µl furimasiin substraati lahjendatud puhvriga vahekorras 1:200. Aluselise fosfataasi aktiivsuse mõõtmiseks lisati igale proovile 25 µl aluselist fosfataasi CSPD kemiluminesentsset substraati (*Tropix*). Proove inkubeeriti 10 min toatemperatuuril. Kemiluminesentsi mõõdeti luminomeetriga (*Glomax 96 Microplate Luminometer*). Iga proovi jaoks normaliseeriti NLuc aktiivsus aluselise fosfataasi aktiivsusega.

2.2.6 Southern blot

2.2.6.1 Restriktsioon

Saadud totaalsed DNA-d analüüsiti kasutades Southern blot meetodit. HPV5 ja HPV5NLuc ning HPV11 ja HPV11NLuc analüüsiks kasutati vastavalt 5 µg ja 3 µg totaalset DNA-d. Totaalne DNA inkubeeriti SacI ning HindIII restriktsiooniensüümidega vastavate HPV5 ja HPV11 genoomide lineariseerimiseks ja DpnI ensüümiga transfekteeritud bakterist puhastatud DNA lõikamiseks. Igat restriктаasi võeti 1,2 µl ja 4 µl 10x FastDigest rohelist puhvrit ning lõppmaht viidi 40 µl-ni, kasutades H₂O-d. Reaktsioon viidi läbi 37 °C juures 3 tundi. Positiivseks kontrolliks kasutati 500 pg samamoodi lineariseeritud HPV5 ja HPV11 puhastatud pisirõnga DNA-d.

2.2.6.2 Geelelektroforees ja DNA ülekanne membraanile

Reaktsiooni produktid lahutati 0,8% agarosgeelil, mis sisaldas 0,3 µg/ml etiidiumbromiiti. Geel jooksutati 1xTAE puhvris üleöö 30 V juures. Järgmisel päeval geel loputati A lahuses

(0.5M NaOH, 1.5M NaCl) 40 min selleks, et denatureerida kaheaahelaline DNA. Seejärel pesti destilleeritud veega ja loputati B lahuses (1M Tris pH 8.0, 1.5M NaCl) 30 min. Lõpuks kanti DNA geelist üle nailon membraanile (*Millipore*) kapillaarse ülekande abil 10x SSC lahuses (1.5M NaCl, 150 mM Na₃C₆H₅O₇). Ülekanne viidi läbi üleöö.

2.2.6.3 Hübridisatsioon

Ülekande lõppemisel viidi läbi DNA ristsidumine membraanile, kasutades UV valgust (*Stratalinker*). Selleks, et vältida mittespetsiifilist sidumist, inkubeeriti membraan prehübridisatsiooni lahuses (16 ml H₂O, 9 ml 20x SSC, 3 ml 50x Denhardt-i lahus, 1.5 ml 10% SDS, 0.6 ml 100 °C juures denatureeritud lõhe spermi DNA (10 µg/µl)) 65 °C juures keerlevates torudes 1 – 2 tundi.

Hübridisatsiooniproovide sünteesiks lineariseeriti HPV5 ja HPV11 minicircle DNA-d SacI ja HindIII restriктаasidega ning puhastati geelist nagu eelnevalt kirjeldatud. Hübridisatsiooni proovid sünteesiti, kasutades mallina 150 ng HPV5 ja HPV11 lineariseeritud ja puhastatud DNA-d ning *DecaLabel TM DNA Labeling Kit*-i (*Thermo Fisher Scientific*).

Kit-i protokollil lisati DNA-le 10 µl dekanukleotiid praimereid ning viidi 100 °C juurde 10-ks minutiks ning seejärel 4-ks minutiks jääle. Lisati 3 µl mix C, mis sisaldab kõiki dNTP-d välja arvatud dCTP, 1 µl Klenow Fragment ja 4 µl α-32P-dCTP isotoopi (*Hartman Analytics*) ning inkubeeriti 37 °C juures 15 min. Seejärel lisati 4 µl dNTP-d ja inkubeeriti 15 min 37 °C juures, uuesti 10 min 100 °C juures ja viidi jääle. Valmisseguga viidi vastavatesse membraanidega tuubidesse ja inkubeeriti 65 °C juures üleöö.

Järgmisel päeval pesti membraanid pesulahustega, mis olid eelnevalt soojendatud 65 °C-ni. Kõik pesemised teostati 65 °C juures. 1. lahusega (3xSSC, 0,1% SDS) pesti 2 korda 5 min. Seejärel pesti 2. lahusega (1xSSC, 0,1% SDS) üks kord 15 min ning 3. lahusega (0,2xSSC, 0,1% SDS) samuti üks kord 10 min.

Membraanid eksponeeriti röntgenfilmile (*Agfa*) -70 °C juures üleöö ja ilmutati järgmisel päeval.

2.3 Tulemused

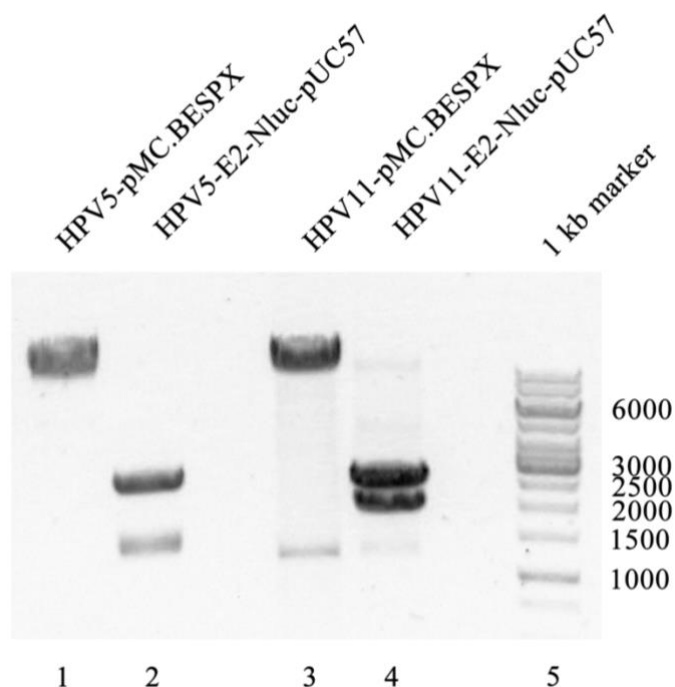
2.3.1 HPV5NLuc ja HPV11NLuc konstruktid valmistamine

Selleks, et valmistada HPV5NLuc-pMC.BESPX ja HPV11NLuc-pMC.BESPX algplasmiidid, lõigati vastavaid metsiktüüpi genoome sisaldavaid algplasmide HPV5-pMC.BESPX ja HPV11-pMC.BESPX ning NLuc kodeerivat järjestust sisaldavaid plasmide HPV5-E2-NLuc-pUC57 ja HPV11-E2-NLuc-pUC57 restriksiooni ensüümidega ja lahutati tekkinud produktid 0,8% agarosgeelil. Valitud endonukleaasidele spetsiifilised järjestused esinevad kasutatud HPV genoomides üks kord. HPV5 puhul kasutati AdeI (DraIII), mis tunneb ära CACTCA↓GTG järjestust ja BstXI, mis tunneb ära CCATAGCA↓ATGG saiti. Restriksiooni reaktsioon tekitab DNA fragmendid pikkusega 11 116 ja 715 bp HPV5-pMC.BESPX puhul ning 2721 ja 1371 bp HPV5-E2-NLuc-pUC57 puhul. HPV11 puhul kasutati restriksiooni ensüüme SmaI, mis tunneb ära ATTT↓AAAT järjestust, ja SdaI, mis tunneb ära CCTGCA↓GG saiti. Oodatavate fragmentide pikkused olid 10 773 ja 1242 bp HPV11-pMC.BESPX puhul ning 2708 ja 1895 bp HPV11-E2-NLuc-pUC57 puhul (Joonis 7). DNA fragmendid lahutati agarosgeelil. Geelist lõigati välja HPV5-pMC.BESPX ja HPV11-pMC.BESPX ülemised bändid ning HPV5-E2-NLuc-pUC57 1371 nt pikkused lõigud. Seoses sellega, et HPV11-E2-NLuc-pUC57 plasmidi töötlemisel restriksiooni ensüümisega tekkis kaks üksteisele väga lähedal jooksvat fragmenti, otsustati puhastada mõlemad fragmendid geelist välja.

Puhastatud DNA lõigud ühendati omavahel ligeerimisega ning ligeerimisproduktid transformeeriti DH5 α kompetentsetesse rakkudesse. HPV5-pMC.BESPX 11 116 nt fragment ligeeriti HPV5-E2-NLuc 1371 bp fragmendiga (saadi konstrukti HPV5NLuc-pMC.BESPX). HPV11NLuc-pMC.BESPX algplasmidi tegemisel ligeeriti kaks DNA fragmenti HPV11-pMC.BESPX algplasmidi fragmendiga ning vajaliku DNA olemasolu kontrolliti tekkinud bakterite kolooniates PCR-iga kasutades HPV11-spetsiifiliseid primereid. Kontrolli tulemusena valiti HPV11-E2-NLuc DNA-d sisaldavad bakterid ning kasutati neid edasises töös (Joonis 8). Seega, HPV11-pMC.BESPX 10 773 bp fragmendi ja HPV11-E2-NLuc 1895 bp fragmendi ligeerimine andis konstrukti HPV11NLuc-pMC.BESPX. Plasmiidide HPV5NLuc-pMC.BESPX ja HPV11NLuc-pMC.BESPX DNA puhastati bakteritest. Saadud algplasmiidide kontsentratsioonid on toodud Tabelis 4.

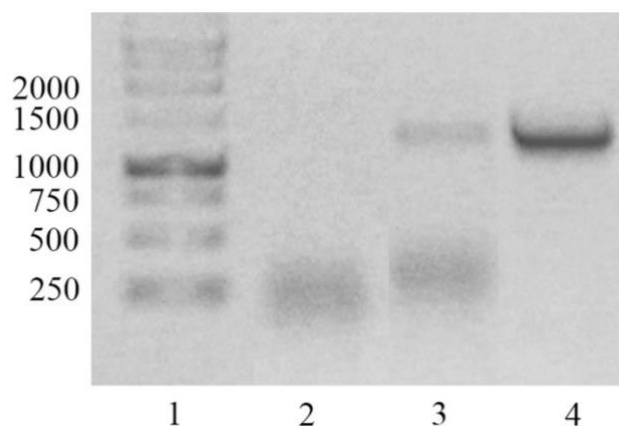
HPV5NLuc-pMC.BESPX ja HPV11NLuc-pMC.BESPX algplasmiidide õigsust kontrolliti restriksioonanalüüsiga. Oodatavate DNA lõikude pikkused on toodud Tabelis 5

ning saadud tulemused Joonisel 9. Analüüs näitas, et saadud HPV5NLuc-pMC.BESPX ja HPV11NLuc-pMC.BESPX algplasmiidid olid õiged.



Joonis 7. Kloneerimiseks vajalike fragmentide saamiseks tehtud restriktiooni reaktsioon.

Radadel 1 ja 2 on näidatud vastavalt HPV5-pMC.BESPX ja HPV5-E2-NLuc DNA lõigatud AdeI ja BstXI restriктаasidega. Oodatavaks pikkuseks HPV5-pMC.BESPX puhul oli 11 116 ja 715 bp (lühem fragment puudub pildil kuna on geelist välja jooksnud) ning HPV5-E2-NLuc-pUC57 puhul 2721 ja 1371 bp. Radadel 3 ja 4 on näidatud vastavalt HPV11-pMC.BESPX ja HPV11-E2-NLuc-pUC57 plasmide lõigatud SwaI ja SdaI restriктаasidega. Oodatavaks pikkuseks HPV11-pMC.BESPX puhul oli 10 773 ja 1242 bp ning HPV11-E2-NLuc-pUC57 puhul 2708 ja 1895 bp. Rajal 5 on GeneRuler 1 kb DNA marker.



Joonis 8. HPV11-E2NLuc DNA sisaldavate kolooniate kontroll PCR meetodil, kasutades HPV11 spetsiifiliseid praimereid (esitatud on representatiivne pilt). 1. rajal on GeneRuler 1 kb DNA marker. Rajal 2 on HPV11NLuc DNAd mitte sisaldavate bakterite analüüsi tulemus. 3. rajal on

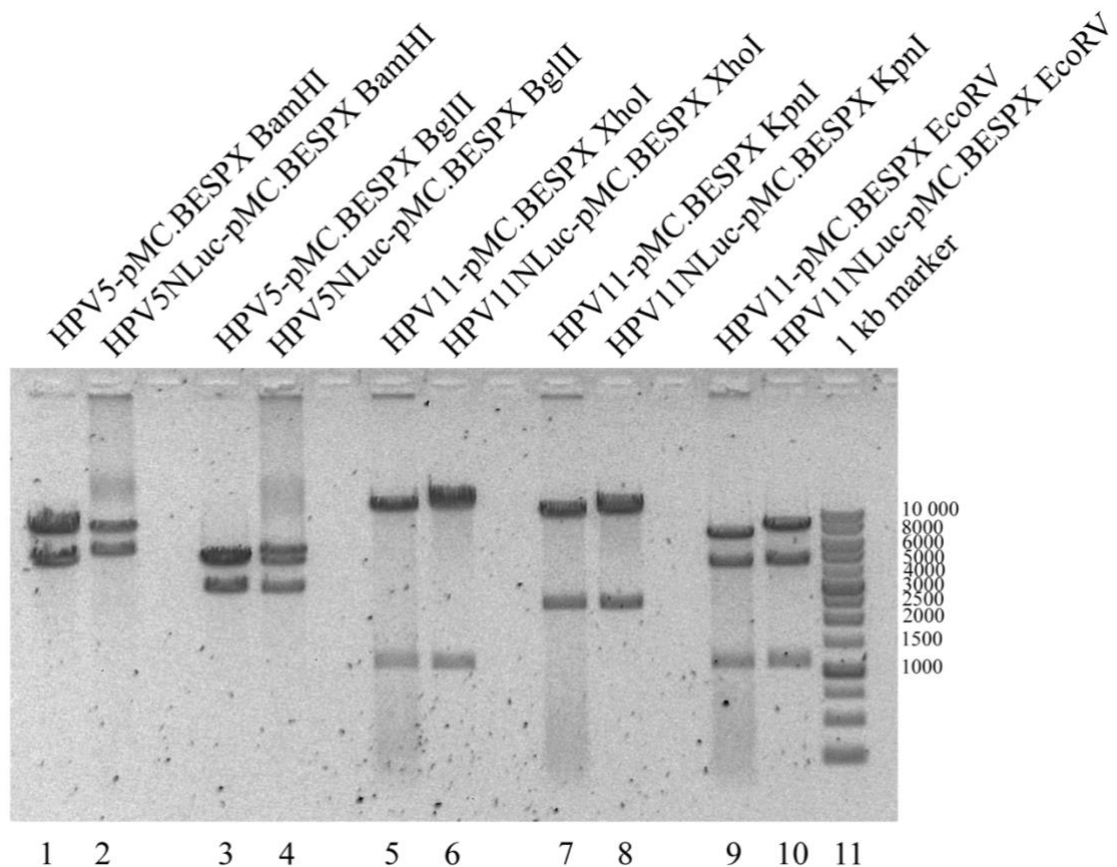
HPV11NLuc DNA fragmenti sisaldav PCRi produkt, 1100 nt. 4. rajal on PCRi produkt saadud kasutades HPV11.pMC.BESPX algplasmidi mallina positiivseks kontrolliks (1100 nt).

Tabel 4. Valmistatud algplasmiidide kontsentratsioonid (ng/μl).

Plasmiid	Kontsentratsioon
HPV5NLuc-pMC.BESPX	229
HPV11NLuc-pMC.BESPX	278

Tabel 5. Ligeerimisejärgsel restriksioonianalüüsil kasutatud restriктаasid ning nendega lõikamise tulemusel oodatavate DNA fragmentide pikkused (bp). HPV5 juures kasutati BamHI ja BglII ning HPV11 puhul EcoRV, KpnI ja XhoI restriктаase. Fragmentid, mis on tähistatud *, sisaldavad NLuc järjestust pikkusega 656 nt.

HPV5-pMC.BESPX		HPV5NLuc.pMC:BESPX	
Restriктаas	Fragmendi suurus	Restriктаas	Fragmendi suurus
BamHI	4506	BamHI	5162 *
	7325		7325
BglII	4531	BglII	5187 *
	2981		2981
	4319		4319
HPV11-pMC.BESPX		HPV11NLuc.pMC.BESPX	
Restriктаas	Fragmendi suurus	Restriктаas	Fragmendi suurus
EcoRV	6216	EcoRV	6860 *
	4182		4182
	1617		1617
KpnI	9625	KpnI	10269 *
	2390		2390
XhoI	10903	XhoI	11547 *
	1112		1112



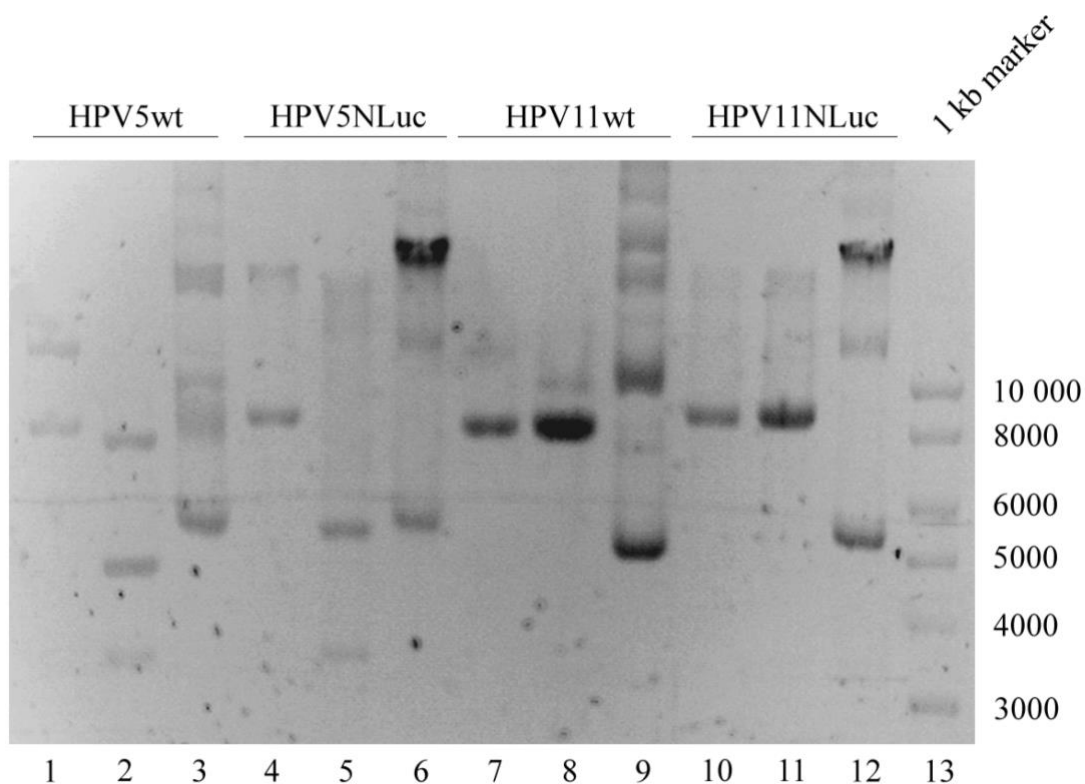
Joonis 9. HPV5NLuc-pMC.BESPX ja HPV11NLuc-pMC.BESPX konstruktide restriksioonanalüüs. Kontrolliks võeti HPV5-pMC.BESPX ja HPV11-pMC.BESPX algplasmiidid. Restriksioonis kasutati kõiki plasmiidide 400 ng. 1. ja 2. rajal on näidatud HPV5-pMC.BESPX ja HPV5NLuc-pMC.BESPX plasmiidid lõigatud BamHI restriктаasiga. 3. ja 4. rajal HPV5 ja HPV5NLuc algplasmiidid on lõigatud BglII restriктаasiga. Radadel 5 ja 6, 7 ja 8, 9 ja 10 on näidatud HPV11 ja HPV11NLuc algplasmiid lõigatud XhoI, KpnI ja EcoRV restriктаasidega vastavalt. 11. rajal O'GeneRuler 1kb DNA marker.

HPV5NLuc-pMC.BESPX ja HPV11NLuc-pMC.BESPX algplasmiidide kasutati pisirõngaste valmistamiseks. Pisirõngaste DNA-de valmistamise käigus eemaldati rekombinatsiooniga umbes 3 kbp suurune bakteriaalne osa HPV5NLuc-pMC.BESPX ja HPV11NLuc-pMC.BESPX algplasmiididest ning pisirõngaste HPV5NLuc ja HPV11NLuc genoomide lõplik suurus oli umbes 8 kbp. Pisirõngaste HPV5NLuc ja HPV11NLuc DNA kontsentratsioonid on näidatud Tabelis 6. Saadud NLuc järjestust sisaldavad genoomid kontrolliti geelelektroforeesil restriksioonanalüüsiga ning võrdluseks olid võetud HPV5 ja HPV11 metsiktüüpi pisirõngaste DNA-d. HPV5 metsiktüüpi pisirõngas ja HPV5NLuc DNA lõigati SacI ja BamHI endonukleasidega lineariseerimiseks ning geelile oli pandud ka 1000 ng lõikamata DNA-d. HPV11 metsiktüüpi pisirõngas ja HPV11NLuc DNA lõigati HindIII ja KpnI restriктаasidega lineariseeritud vormi tekitamiseks ning samuti kasutati lõikamata 1000

ng DNA-d (Joonis 10). Restriksioonianalüüs näitas, et saadud HPV5NLuc ja HPV11NLuc pisirõngad olid õiged. Saadud genoomide kaardid on esitatud Joonisel 11.

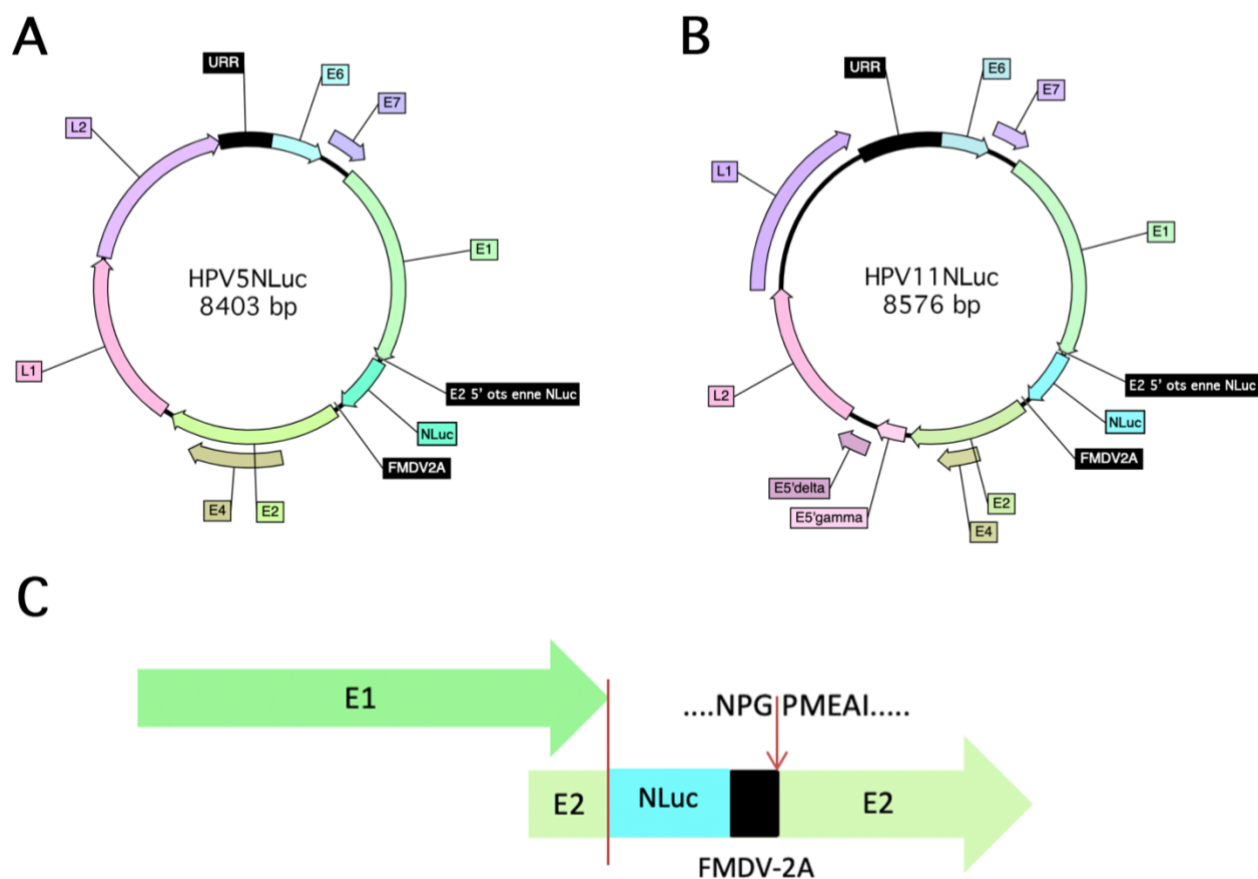
Tabel 6. Valmis pisirõngaste HPV5NLuc ja HPV11NLuc DNA kontsentratsioonid (ng/μl).

Pisirõngas	Kontsentratsioon
HPV5NLuc	233
HPV11NLuc	331



Joonis 10. HPV metsiktüüpi ja NLuc sisaldavate pisirõngaste suuruse restriksioonanalüüs.

HPV5 pisirõngaid lõigati SacI ja BamHI restriksionaasidega (rajad 1, 2, 4, 5). BamHI tekitas HPV5 puhul kaks fragmenti kuna mõned algplasmidi genoomid ei läbinud rekombinatsiooni lõpuni. Seepärast on mõlema HPV5 puhul näha üleval jooksvaid bände, mis vastavad suuruse poolest algplasmiididele. Teine bänd on HPV5 metsiktüve puhul 4506 nt ning HPV5NLuc puhul 5162 nt pikkune. HPV11 pisirõngaid lineariseeriti HindIII ja KpnI restriksionaasidega (rajad 7, 8, 10, 11). Rajadel 3, 6, 9 ja 12 on lõikamata 1000 ng DNA-d.



Joonis 11. HPV5NLuc ja HPV11NLuc genoomide ülesehitused ja sisseviidud NLuc'i sisaldavate järjestuste illustratiivne pilt. A. HPV5NLuc genoomi kaart. URR – *upstream regulatory region*. B. HPV11NLuc genoomi kaart. C. NLuc konstrukti illustreeriv skeem. NLuc ja ise protsessitav FMDV-2A peptiid on viidud sisse vahetult pärast E1 stop koodonit E2 lugemisraami. FMDV-2A lõikab iseennast LLNFDLLKLAGDVESNPG↓P kohas enne proliini, millega alustatakse täispikka E2 valku kodeeriv lugemisraam.

2.3.2 HPV5NLuc ja HPV11NLuc konstruktide replikatsioonivõime võrdlemine HPV5 ja HPV11 metsiktüüpi genoomidega

Saadud HPV5NLuc ja HPV11NLuc pisirõngaste genoomide replikatsioonivõimet uuriti U2OS rakkudes. Selleks transfekteeriti HPV5NLuc, HPV11NLuc, HPV5 metsiktüüpi ja HPV11 metsiktüüpi genoomid U2OS rakkudesse. Osa rakke plaaditi 96 kaevuga plaatidele lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks ning teine osa plaaditi 6 kaevuga plaatidele viiruse DNA analüüsiks SB meetodiga. Rakud inkubeeriti 2, 3 ja 4 päeva.

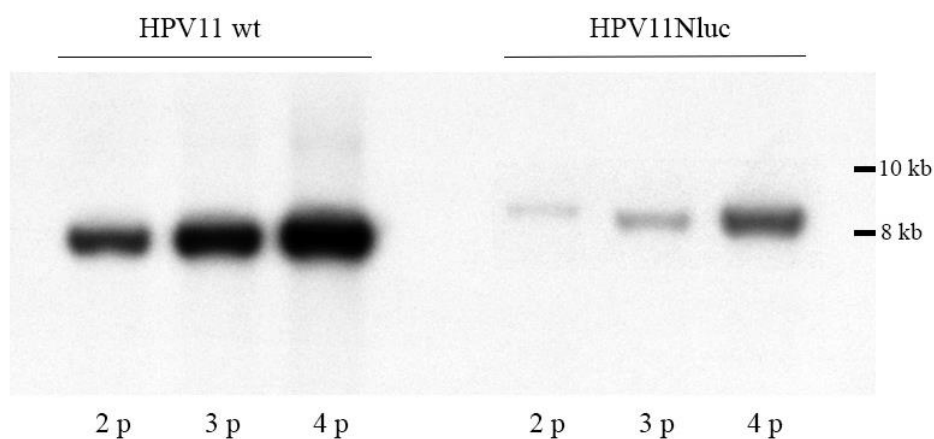
Viiruse DNA analüüsiks SB meetodiga lüüsi rakud ja eraldati totaalne DNA. Saadud DNA kontsentratsioonid on toodud Tabelis 7.

Tabel 7. U2OS rakkudest eraldatud totaalse DNA kontsentratsioonid (ng/μl).

Transfekteeritud genoom	2. päev	3. päev	4. päev
HPV5NLuc	353	621	835
HPV5 metsiktüüp	345	610	876
HPV11NLuc	354	587	954
HPV11 metsiktüüp	404	650	843

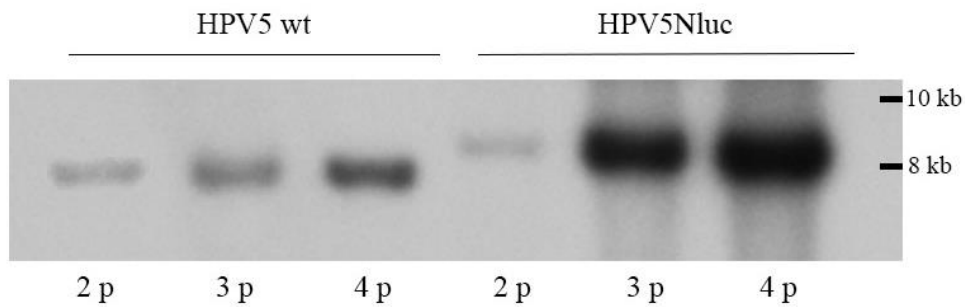
HPV5NLuc ja HPV5 metsiktüüpi genoomide analüüsiks lõigati 5 μg totaalselt DNA-d SacI ja DpnI restriksiooniensüümidega. SacI lõikab HPV5 järjestust 5'-GAGCT↓C-3', lineariseerides HPV5 genoomi. DpnI lõikab ainult bakteriaalselt metüleeritud DNA 5'-GA↓TC-3' järjestust. DpnI kasutamine aitab eristada U2OS rakkudes replitseeritud HPV DNA transfekteeritud DNA-st. HPV11NLuc ja HPV11 metsiktüüpi replikatsiooni analüüsiks kasutati 3 μg totaalselt DNA-d lõigatud HindIII ja DpnI restriksiooni ensüümidega. HindIII lõikab järjestust 5'-A↓AGCTT-3' lineariseerides HPV11 genoomi. DNA fragmendid eraldati 0,8% agarosgeelil.

Seejärel kanti DNA geelilt üle membraanile ja hübridiseeriti radioaktiivselt märgitud HPV5 või HPV11 piserõnga DNA proovidega. Radioaktiivsete signaalide intensiivsus näitab viiruse DNA taset U2OS rakkudes (Joonised 12 ja 13).



Joonis 12. HPV11 metsiktüve ja HPV11NLuc replikatsiooni signaalide võrdlus U2OS rakkudes.

U2OS rakud transfekteeriti HPV11 genoomidega ja inkubeeriti 2, 3 ja 4 päeva (p). Totaalne DNA töödeldi HPV11 lineariseeriva ensüümiga ja DpnI-ga ning analüüsiti SB meetodiga.

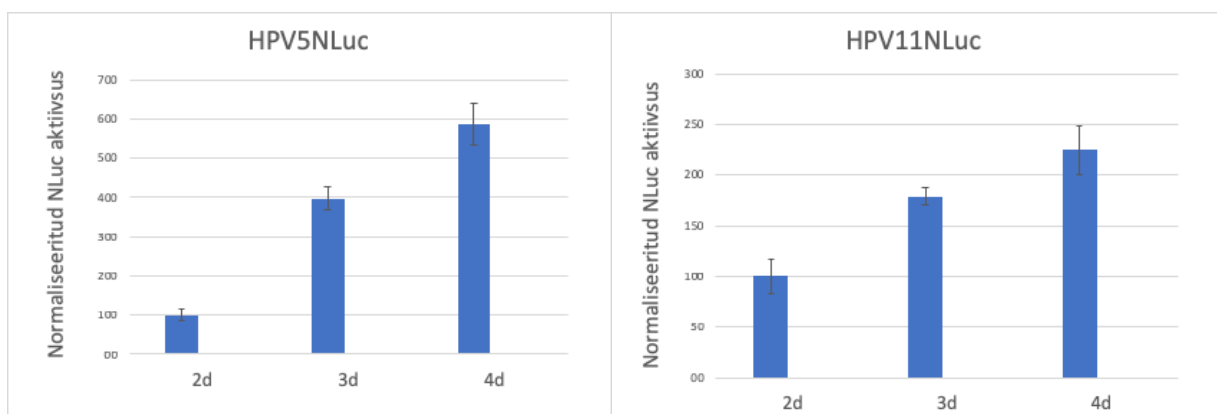


Joonis 13. HPV5 metsiktüve ja HPV5NLuc replikatsiooni signaalide võrdlus U2OS rakkudes. Mõlemad genoomid transfekeeriti U2OS rakkudesse. Rakud inkubeeriti 2., 3. ja 4. päeva (p) ning eraldati totaalne DNA. Totaalne DNA lõigati HPV5 genoomi lineariseeriva ensüümiga ja DpnI-ga ning analüüsiti kasutades SB meetodi.

2.3.3 HPV5NLuc ja HPV11NLuc NLuc aktiivsuse mõõtmine ja korrelatsioon replikatsiooni signaalidega

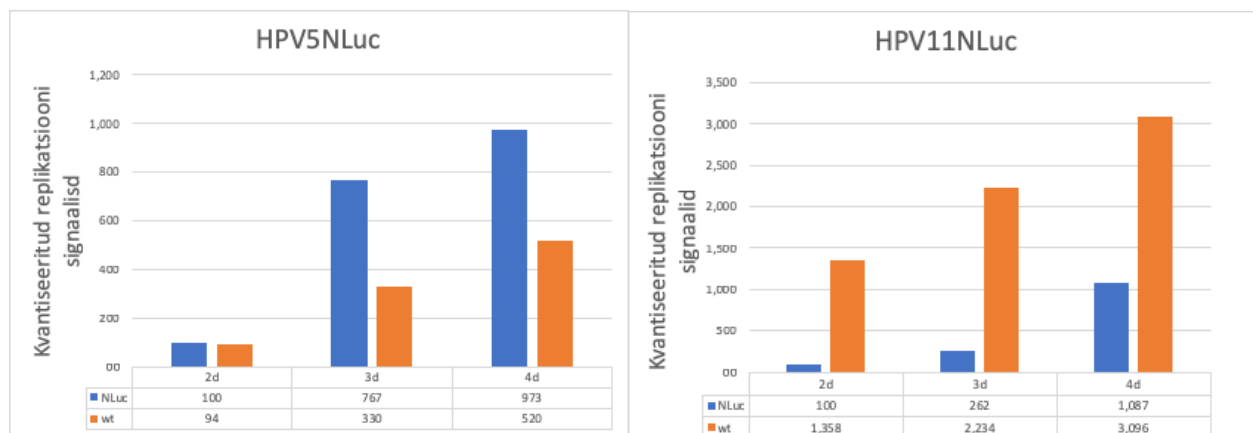
HPV5NLuc ja HPV11NLuc puhul mõõdeti nii NLuc kui ka aluselise fosfataasi aktiivsusi ning viimast kasutati NLuc aktiivsuse normaliseerimiseks. Normaliseeritud 2. päeva NLuc aktiivsus võeti edaspidi 100%-ks ja selle alusel arvutati kõik järgnevatel päevadel saadud signaalid. Katse oli HPV5NLuc-iga korratud 2 korda (iga kord neljas korduses) ja andmetest võeti keskmine +/- standard viga. HPV11NLuc puhul tehti katse ainult üks kord neljas korduses ning saadud andmetest võeti keskmine +/- standard viga (Joonis 14). Replikatsiooni signaalide kvantiseerimiseks kasutati ImageQuant programmi. Kvantiseeritud replikatsiooni signaalid on toodud Joonisel 15.

NLuc ja replikatsiooni signaalide korrelatsiooni analüüsiti HPV5NLuc genoomi puhul ning selleks kasutati lineaarse regressiooni analüüsi. Tulemused on toodud Joonisel 16.

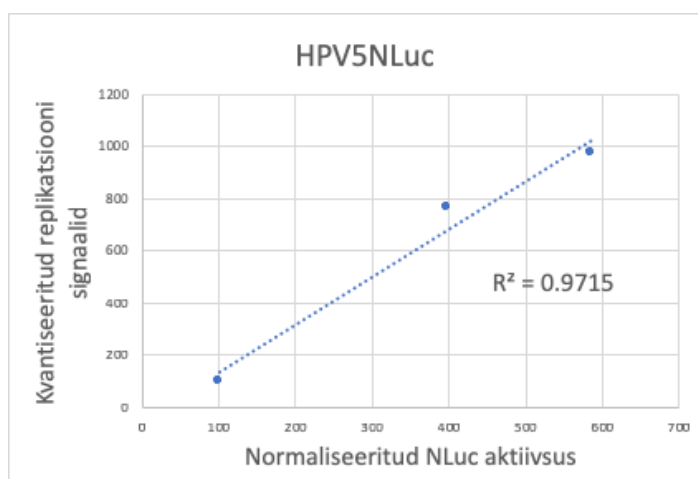


Joonis 14. HPV5NLuc ja HPV11NLuc normaliseeritud lutsiferaasi aktiivsused 2, 3 ja 4 päeval. Mõlemal juhul võeti esimeses ajapunktis saadud signaalid 100%-ks ning ülejäänud signaalid arvutati selle suhtes. Näha on sujuvat signaalide intensiivistumist, mis viitab sellele, et viiruse genoomi replikatsioon on toimunud. HPV5NLuc puhul on andmed esitatud keskmise väärtusena saadud kahest

sõltumatust katsest, mis olid tehtud neljas korduses. HPV11NLuc andmed on esitatud keskmise väärtusena saadud ühest katsest, mis oli sooritatud samuti neljas korduses. Mõlema puhul on graafikule lisatud ka standard viga.



Joonis 15. SB-i meetodiga saadud HPV5 wt, HPV11 wt, HPV5NLuc ja HPV11NLuc replikatsiooni signaalide kvantiseerimine. Mõlema genoomi puhul on märgata signaalide kasvu.



Joonis 16. HPV5NLuc genoomi normaliseeritud NLuc aktiivsuse ja replikatsiooni signaalide korrelatsioon. Kasutati lineaarse regressiooni analüüsi, mis näitas statistilist olulisust ($R^2 = 0,9715$, $p = 0,0012$) NLuc aktiivsuse ja replikatsiooni signaalide vahel.

2.4 Arutelu

Sugulisel teel levivatest infektsioonidest on tänapäeval kõige sagedasemad HPV nakkused. Tihtipeale suudab inimese organismi immuunsüsteem infektsiooniga ise hakkama saada, kuid esineb ka HPV tüüpe, mis on põhjuseks emakakaela vähi ja teiste anogenitaal- ja suu kartsinoomide tekkele (McLaughlin-Drubin, 2015). Seepärast on HPV infektsioonitsükli uurimine väga tähtis taoliste kasvajate ravimeetodite väljatöötamisel.

Seoses sellega, et HPV poolt kodeeritud E1 ja E2 valgud on ainukesed viiruse replikatsiooniks absoluutselt vajalikud viirusvalgud, on nende uurimine vajalik HPV replikatsiooni inhibeerivate ravimite väljatöötamiseks. Enamasti toimub tänapäeval viiruse replikatsiooni tuvastamine SB ja PCR meetodeid kasutades. Need on aga väga kallid, töö- ja ajamahukad uurimismetoodikad.

Hiljuti on Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi viroloogia laboris välja töötatud ja kirjeldatud modifitseeritud HPV5, HPV11, HPV16 ja HPV18 genoomid mis sisaldavad *Renilla* lutsiferaasi (RLuc) kodeerivat järjestust (Toots 2017). On näidatud, et RLuc aktiivsus korreleerub HPV genoomi koopiaarvuga ning seega võib HPV replikatsiooni taset esitada RLuc aktiivsuse kaudu. Samas on HPV elutsükli uurimises RLuc efektiivse kasutamise põhilisteks takistusteks RLuc kodeeriva järjestuse pikkus (ta suurendab HPV genoomi 936 nt võrra) ning ATPst sõltuvus. Lisaks sellele takistab RLuc-i suhteliselt madal aktiivsus selle kasutamist ravimikandidaatide skriiningutes, mis teostatakse kasutades võimalikult vähe rakke ja söödet. Nende probleemide lahenduseks otsustasime kasutada uutset luminescentset valku – NanoLuc (NLuc), mis omab *Renilla* lutsiferaasi ees hulga eeliseid, nagu väiksem suurus (172 versus 312 aminohapet), kõrgem stabiilsus ning umbes 100 korda suurem aktiivsus.

Minu töö eesmärgiks oli kloneerida NLuc geen HPV5 ja HPV11 E2 valgu avatud lugemisraami ning uurida valmis uute genoomide replikatsioonivõimet U2OS rakuliinis.

Valmistatud genoomide replikatsiooni efektiivsused erinesid viiruse metsiktüve genoomidest. HPV5NLuc replikatsioon toimus efektiivsemalt kui metsiktüve oma ning HPV11NLuc puhul olid replikatsiooni signaalid nõrgemad. Selle tulemuse üheks võimalikuks põhjuseks võib olla NLuc geeni sisse viimisega seotud muutused viiruse transkriptide mustris või tasemes. Näiteks on teada, et täispikk E2 valk on transkriptsiooniline aktivaator, aga alternatiivse

splaissingu tulemusena ekspresseeritud E8^{E2} on tugev transkriptsiooniline repressor. Täispika E2 ja N-terminaalselt trunkeeritud E8^{E2} valkude bilanss mõjutab viiruse geenide ekspressiooni ning replikatsiooni taset. On võimalik, et mõlema viiruse tüübi puhul sisestatud geen, kas soodustas või surus maha teatud splaissingu produkte, mis omakorda muutis replikatsiooni efektiivsust.

Lisaks sellele uuriti HPV5NLuc puhul NLuc aktiivsuse ja replikatsiooni signaalide korrelatsiooni. Tulemuseks saadi statistiliselt oluline lineaarne seos nende kahe vahel. Sarnane tulemus oli saadud kasutades HPV18NLuc genoomi U2OS rakkudes (Piirsoo et al., 2019). Saadud tulemus viitab sellele, et NLuc aktiivsus representeerib HPV genoomi koopia arvu ning võib olla kasutatud HPV genoomi replikatsiooni efektiivsuse kvantitatiivseks uurimiseks U2OS rakkudes.

HPV5Nluc ja HPV11Nluc konstruktide valmistamine annab võimaluse kasutada neid erinevates HPV replikatsiooni uurivates projektides. Uute genoomide olulisemateks eelisteks on ajaline ja materiaalne võit. Nimelt võtab NLuc aktiivsuse mõõtmine umbes 30 minutit, aga HPV genoomi analüüs SB meetodiga kestab umbes 4 – 5 päeva. Kuna NLuc omab suurt aktiivsust, siis on signaalide tuvastamiseks vaja väikest hulka HPVNLuc-positiivseid rakke, mis võimaldab kasutada 96 või 384 kaevuga plaate totaalse DNA eraldamiseks ning analüüsiks SB-i meetodiga kasutatakse vähemalt 15 korda rohkem rakke. Lisaks sellele, oleme näidanud et NLuc sisaldavad HPV genome võib efektiivselt kasutada ka inimese primaarsetes keratinotsüütides, mis on HPVdele loomulikud peremeesrakkud (Piirsoo et al., 2019).

KOKKUVÕTE

Inimese papilloomiviirused on nahka- ja limaskesti nakatavad viirused. Nende replikatsiooni uurimiseks kasutatakse peamiselt SB ja PCR meetodeid, mis on väga aeganõudvad, kallid ja suuremahulised. HPV replikatsiooni protsessi uurimise kiirendamiseks otsustati kasutada bioluminestsentsi ja selleks kloonitati bioluminestsentsuse geen NLuc kahte HPV genoomi. Bakalaureusetöö raames valmistati HPV5NLuc ja HPV11NLuc konstruktid. Nende replikatsioonivõimet uuriti U2OS rakuliinis ja tehti järgmised järeldused:

- Valmistatud konstruktid on võimelised replitseerima U2OS rakuliinis
- HPV5NLuc genoom replitseerub paremini võrreldes metsiktüvega
- HPV11NLuc genoomi replikatsiooni signaalid on metsiktüvega võrreldes veidi madalamad
- HPV5NLuc lutsiferaasi signaalid korreleeruvad hästi replikatsiooni signaalidega
- NLuc geeni sisaldavaid genoome on võimalik kasutada HPV replikatsiooni uurimiseks

Generation of human papillomavirus type-5 and type-11 Nano-luciferase containing genomes and analysis of their replication ability

Elina Lototskaja

Summary

Human papillomaviruses (HPVs) are double-stranded DNA viruses that infect both epithelial and mucosal basal keratinocytes and their life cycle strictly depends on epithelial differentiation program. HPV are spread through direct contact with infected mucosa and skin. The virus usually stays in the human body in latent form. However, low-risk HPV types may cause benign tumours such as warts, papillomas, and other epithelial hyperplasias, while high-risk types may cause malignant tumours. The most prevalent carcinoma caused by HPV is cervical cancer. Also, different types of HPVs might cause cancers in head, neck, skin, and anogenital regions. Despite the prevalence of HPV infections, no specific treatment has been worked out so far, since epithelial differentiation-dependent viral life cycle renders laboratory research problematic and challenging.

Research on the HPV replication plays critical role in the study of the virus' life cycle. Southern blot and PCR are most common techniques used in the laboratories for the analysis of viral genome replication. However, these methods are expensive and time consuming. This issue can be resolved by using bioluminescence markers for a fast, sensitive and cost-effective analysis of viral replication.

The objectives of this thesis are (1) to clone codon optimized NLuc and FMDV-2A gene sequences into HPV5 and HPV11 E2 open reading frames immediately after E1 stop codon (2) to analyse the replication efficiency and NLuc activity of the generated constructs in the U2OS cell line, and (3) to evaluate the correlation between the replication signals and NLuc activity.

The obtained results revealed that the novel HPV5NLuc and HPV11NLuc genomes were functional and able to replicate in U2OS cells. However, their replication efficiency differed from that of the respective wild type genomes. Compared to the wild type genomes, the HPV5NLuc replicated more effectively, whereas replication competence of HPV11NLuc was slightly reduced. The possible reasons of the observed phenomenon might lie in the

alterations of the virus's transcript pattern or protein expression levels caused by the insertion of the NLuc gene.

Also, statistically significant correlation between HPV5NLuc replication level and NLuc activity was observed. These results indicate that NLuc activity represents the HPV genome copy number and might be used for quantitative evaluation of HPV genome replication efficiency in the U2OS cells.

Generation of the novel HPV5NLuc and HPV11NLuc constructs allows using them in various HPV replication research projects. The main advantages of the created genomes are their high sensitivity as well as time- and cost-efficiency. Moreover, we have demonstrated that HPV genomes containing NLuc can be effectively used in human primary keratinocytes that are natural host cells for HPVs (Pirsoo *et al.*, 2019).

TÄNUSÕNAD

Soovin avaldada tänu minu juhendajale Alla Piirsoole tema abi, nõu, aja ja kannatlikkuse eest lõputöö kirjutamisel. Lisaks sellele on ta õpetanud mulle erinevaid laboris kasutatavaid meetodeid, andnud väärtuslikke nõuandeid ning aidanud katsete läbiviimisel. Samuti soovin tänada Marko Piirsood minu töö vormistamisel abi ja nõu eest ning tänada labori assistenti Regina Pipitšit tema juhendamise ja seletuste eest laboritöös.

KASUTATUD KIRJANDUS

Kirjanduse loetelu

Aksoy, P., Gottschalk, E. and Meneses, P. (2017). HPV entry into cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, **772**, pp.13–22.

Atkins, P. ja Jones, L. 2008. Keemia alused. Teekond teadmiste juurde. Neljas väljaanne. p. 773–774. W.H. Freeman & Co, Basingstoke, New York.

Bergvall, M., Melendy, T. and Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology*, **445**(1-2), pp.35–56.

Bodily, J., Hennigan, C., Wrobel, G. and Rodriguez, C. (2013). Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by E7 and the cell cycle. *Virology*, **443**(1), pp.11–19.

Buck, C., Thompson, C., Pang, Y., Lowy, D. and Schiller, J. (2005). Maturation of Papillomavirus Capsids. *Journal of Virology*, **79**(5), pp.2839–2846.

Buck, C., Day, P. and Trus, B. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, **213**, pp.169–174.

Conway, M., Alam, S., Christensen, N. and Meyers, C. (2009). Overlapping and independent structural roles for human papillomavirus type 16 L2 conserved cysteines. *Virology*, **393**(2), pp.295–303.

Darshan, M., Lucchi, J., Harding, E. and Moroianu, J. (2004). The L2 Minor Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 16 Interacts with a Network of Nuclear Import Receptors. *Journal of Virology*, **78**(22), pp.12179–12188.

Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, **110**(5), pp.525-541.

Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I., Stoler, M., Broker, T. and Stanley, M. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, **30**, pp.55–70.

Doorbar, J. (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, **445**(1-2), pp.80–98.

DiMaio, D. and Petti, L. (2013). The E5 proteins. *Virology*, **445**(1-2), pp.99–114.

England, C., Ehlerding, E. and Cai, W. (2016). NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. *Bioconjugate Chemistry*, **27**(5), pp.1175–1187.

Fisher, C. (2015). Recent Insights into the Control of Human Papillomavirus (HPV) Genome Stability, Loss, and Degradation. *Journal of Clinical Medicine*, **4**(2), pp.204–230.

García-Vallvé, S., Alonso, Á. and Bravo, I. (2005). Papillomaviruses: different genes have different histories. *Trends in Microbiology*, **13**(11), pp.514–521.

Graham, S. (2010). Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future Microbiology*, **5**(10), pp.1493–1506.

Graham, S. (2016). Human Papillomavirus E2 Protein: Linking Replication, Transcription, and RNA Processing. *Journal of Virology*, **90**(19), pp.8384–8388.

Guimerà, N., Lloveras, B., Alemany, L., Iljazovic, E., Shin, H., Jung-II, S., de Sanjose, S., Jenkins, D., Bosch, F. and Quint, W. (2013). Laser capture microdissection shows HPV11 as both a causal and a coincidental infection in cervical cancer specimens with multiple HPV types. *Histopathology*, **63**(2), pp.287–292.

Hall, M., Unch, J., Binkowski, B., Valley, M., Butler, B., Wood, M., Otto, P., Zimmerman, K., Vidugiris, G., Machleidt, T., Robers, M., Benink, H., Eggers, C., Slater, M., Meisenheimer, P., Klaubert, D., Fan, F., Encell, L. and Wood, K. (2012). Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate. *ACS Chemical Biology*, **7**(11), pp.1848–1857.

Harari, A., Chen, Z. and Burk, R. (2013). Human papillomavirus genomics: past, present and future. *Curr Probl Dermatol.*, **45**, pp.1–18.

Hoppe-Seyler, K., Bossler, F., Braun, J., Herrmann, A. and Hoppe-Seyler, F. (2018). The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends in Microbiology*, **26**(2), pp.158–168.

Kadaja, M., Silla, T., Ustav, E. and Ustav, M. (2009). Papillomavirus DNA replication — From initiation to genomic instability. *Virology*, **384**(2), pp.360–368.

Kalinska-Bienias, A., Kalowska, M., Kwiek, B., Jakubowska, B., Ishii, N., Hashimoto, T., Kowalewski, C. and Wozniak, K. (2016). Efficacy and safety of perilesional/intralesional triamcinolone injections in oral mucous membrane pemphigoid. *British Journal of Dermatology*, **174**(2), pp.436–438.

Klozar, J., Tachezy, R., Rotnáglová, E., Košlabová, E., Saláková, M. and Hamšíková, E. (2010). Human papillomavirus in head and neck tumors: epidemiological, molecular and clinical aspects. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, **160**(11-12), pp.305–309.

Klumpp, D. and Laimins, L. (1999). Differentiation-Induced Changes in Promoter Usage for Transcripts Encoding the Human Papillomavirus Type 31 Replication Protein E1. *Virology*, **257**(1), pp.239–246.

Lazarczyk, M., Cassonnet, P., Pons, C., Jacob, Y. and Favre, M. (2009). The EVER Proteins as a Natural Barrier against Papillomaviruses: a New Insight into the Pathogenesis of Human Papillomavirus Infections. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **73**(2), pp.348–370.

McBride, A. (2008). Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res*, **72**, pp.155–205.

McBride, A. (2013). The Papillomavirus E2 proteins. *Virology*, **445**(1-2), pp.57–79.

McBride, A. (2017). Oncogenic human papillomaviruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **372**.

Nguyen, H., Ramírez-Fort, M. and Rady, P. (2014). The biology of human papillomaviruses. *Curr Probl Dermatol*, **45**, pp.19–32.

Orth, G. (2006). Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses. *Seminars in Immunology*, **18**(6), pp.362–374.

Pang, C. and Thierry, F. (2013). Human papillomavirus proteins as prospective therapeutic targets. *Microbial Pathogenesis*, **58**, pp.55–65.

Piirsoo, A., Piirsoo, M., Kala, M., Sankovski, E., Lototskaja, E., Levin, V. and Ustav, M. (2019). Activity of CK2 α protein kinase is required for efficient replication of some HPV types. *PLOS Pathogens*, **15**(5), p.e1007788.

Rocha-Zavaleta, L., Ambrosio, J., Mora-Garcia, M., Cruz-Talonia, F., Hernandez-Montes, J., Weiss-Steider, B., Ortiz-Navarrete, V. and Monroy-Garcia, A. (2004). Detection of antibodies against a human papillomavirus (HPV) type 16 peptide that differentiate high-risk from low-risk HPV-associated low-grade squamous intraepithelial lesions. *Journal of General Virology*, **85**(9), pp.2643–2650.

Pinidis, P., Tsikouras, P., Iatrakis, G., Zervoudis, S., Koukouli, Z., Bothou, A., Galazios, G. and Vladareanu, S. (2016). Human Papilloma Virus' Life Cycle and Carcinogenesis. *MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine*, **11**(5), pp.48–54.

Rubin, M., Kleter, B., Zhou, M., Ayala, G., Cubilla, A., Quint, W. and Pirog, E. (2001). Detection and Typing of Human Papillomavirus DNA in Penile Carcinoma. *The American Journal of Pathology*, **159**(4), pp.1211–1218.

Shruti, S., Siraj, F., Singh, A. and Ramesh, V. (2017). Epidermodysplasia verruciformis: three case reports and a brief review. *Acta Dermatovenerologica Alpina Pannonica et Adriatica*, **26**(3).

Sichero, L., El-Zein, M., Nunes, E., Ferreira, S., Franco, E. and Villa, L. (2017). Cervical Infection with Cutaneous Beta and Mucosal Alpha Papillomaviruses. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **26**(8), pp.1312–1320.

Syrjänen, S. (2018). Oral manifestations of human papillomavirus infections. *European Journal of Oral Sciences*, **126**(S1), pp.49–66.

Toots, M., Ustav, M., Männik, A., Mumm, K., Tamm, K., Tamm, T., Ustav, E. and Ustav, M. (2017). Identification of several high-risk HPV inhibitors and drug targets with a novel high-throughput screening assay. *PLOS Pathogens*, **13**(2), p.e1006168.

Widder, E. and Falls, B. (2014). Review of Bioluminescence for Engineers and Scientists in Biophotonics. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, **20**(2), pp.232–241.

Yu, M. (2017). Rethinking Human Papillomavirus Vaccine for Oral and Oropharyngeal Cancer Prevention and Global Implementation. *Jemi-Pearls*, **2**, pp.1–8.

Kasutatud veebiaadressid

Hooper, K. (2019). *Size Does Matter: NanoLuc® Technologies Advance Virology Research*. <http://www.promega.ee/resources/pubhub/2018/tpub-202-size-does-matter-nanoluc-technologies-applied-to-virology/> (Kasutatud 17.05.2019).

DNA Sequence Editor (*WebDSV*) <http://www.molbiotools.com/WebDSV/index.html> (Kasutatud 23.02.2019)

The PapillomaVirus Episteme (PaVE) <https://pave.niaid.nih.gov/> (Kasutatud 02.05.2019)

IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. **Human Papillomaviruses. Volume 90 (2007)**. <https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-31/> (Kasutatud 03.05.2019)

Lihtlitsents lõputöö elektrooniliseks avaldamiseks

Mina, Elina Lototskaja (sünnikuupäev: 13.09.1996),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Inimese papilloomiviiruse tüüp 5 ja 11 Nano-lutsiferaasi geeni sisaldavate genoomide loomine ning replikatsioonivõime kontrollimine

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Elina Lototskaja
Tartus, 23. 05. 2019