

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Proteiinkinaaside roll HPV E1 valgu funktsioonide regulatsioonil

Magistritöö

30 EAP

Annika Laanemets

Juhendajad: Alla Piirsoo, PhD

Marko Piirsoo, PhD

Tartu 2020

INFOLEHT

Proteiinkinaaside roll HPV E1 valgu funktsioonide regulatsioonis

HPVd on väikesed DNA viirused, mis nakatavad naha-ja limaskestade epiteelkoe keratinotsüüte. Mõnikord kaasneb HPV nakkusega healoomuliste või pahaloormuliste kasvujate teke. Vastavalt kasvaja tekke riskile eristatakse madala ja kõrge riskiga HPV tüüpe. Madala riskiga HPV tüübid on nt HPV11, HPV6, HPV8. Kõrge riskiga HPV tüübid on nt HPV16, HPV18, HPV31, HPV45. PVde replikatsiooniks ja transkriptsiooniks vajalikud viirusvalgud E1 ja E2 on fosfoproteiinid ehk proteiinkinaasid osalevad nende stabiilsuse, aktiivsuse ja rakusisese lokaliseerimise regulatsioonis. Käesolev magistritöö keskendub HPV11 ja HPV18 E1 valkudes olevate konserveerunud fosforüülitatud seriinide funktsiooni uurimisele ja HPV18 E1 valgu fosforüülivate kinaaside leidmisele.

Märksõnad: HPV, replikatsioon, valk E1, proteiinkinaasid

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The role of protein kinases in the regulation of HPV E1 protein functions

HPVs are small DNA viruses that infect keratinocytes. Their life cycle is tightly linked to epithelial differentiation. HPV infection can cause common and genital warts or malignant tumors. HPVs are divided into low- and high-risk types based on their association with cancer and precancerous lesions. Low-risk HPV types are HPV11, HPV6, HPV8 etc. High-risk HPV types are HPV16, HPV18, HPV31, HPV45 etc. Viral helicase E1 and transcription factor E2 are phosphoproteins required for HPV replication and transcription. Protein kinases participate in the regulation of their activity, stability and subcellular localization. This master's thesis focuses on the identification of the conserved phosphosites in the HPV11 and HPV18 E1 proteins, analysing their function in the viral life cycle, and identification of potential kinases responsible for phosphorylation of the HPV18 E1 protein

Keywords: HPV, replication, E1 protein, protein kinases

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Papilloomiviirused.....	8
1.2 Inimese papilloomiviirused.....	8
1.3 HPV genoom ja struktuur.....	9
1.4 HPV elutsükkel.....	12
1.4.1 HPV rakku sisenemine ja varajane geeniekspressioon.....	12
1.4.2 Replikatsioon.....	13
1.4.3 Esialgne genoomi amplifikatsioon ehk transiente replikatsioon.....	14
1.4.4 Stabiilne säilumisfaas ehk latentne infektsioon.....	16
1.4.5 Vegetatiivne amplifikatsioon.....	17
1.4.6 Rakulised proteiinkinaasid PV elutsükli.....	17
1.4.7 Genoomi pakkimine ja viiruse väljumine rakust.....	21
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	22
2.1 Töö eesmärgid.....	22
2.2 Materjalid ja meetodika.....	23
2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid.....	23
2.2.2 Rakuliinid, bakteritüved ja kasutatud söötmed.....	27
2.2.3 Plasmidi paljundamine bakterites ja <i>mc</i> -de valmistamine.....	28
2.2.4 Restriksioonianalüüs.....	29
2.2.5 Transfektsioon U2OS rakkudesse.....	29
2.2.6 Totaalse DNA eraldamine.....	29
2.2.7 Southern blot.....	30
2.2.8 Nanolutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine.....	31
2.2.9 Immuunsadestamine (IP - <i>immunoprecipitation</i>).....	32
2.2.10 Tuuma ja tsütoplasma valgu ekstraktide valmistamine.....	32
2.2.11 Western blot.....	32
2.2.13 Valgu ekspressioon <i>E.colis</i>	33
2.2.14 Valgu puhastamine bakterirakust.....	33
2.2.15 Fosfosaitide määramine.....	34

2.3 Tulemused.....	36
2.3.1 Fosforüülitud aminohappejäägid HPV11 ja HPV18 E1 valkudes.....	36
2.3.2 Erinevate papilloomiviiruste E1 valgu aminohappeliste järjestuste võrdlemine.....	37
2.3.3 HPV11 ja HPV 18 mutantsete <i>minicircle</i> valmistamine.....	38
2.3.5 Mutantsete HPV11 ja -18 genoomide replikatsioonivõime analüüs.....	40
2.3.6 Kaseiin kinaas 2 ja tema inhibiitori mõju mutantsete HPV11 ja -18 genoomide replikatsioonivõimele.....	41
2.3.7 Mutantsete HPV11 ja -18 genoomidelt kodeeritavate E1 valkude analüüs.....	44
2.3.9 HPV18 HA märgisega E1 valgu ekspresseeriva plasmidi konstrueerimine.....	46
2.3.10 HPV18GST-E1HA valgu puhastamine bakterist.....	47
2.3.11 HPV18 E1 valgu fosforüülimise uurimine.....	48
2.3.12 HPV18 E1 valgu PKA, CDK2/E ja CK2 fosfosaitide tuvastamine.....	49
2. 4 Arutelu.....	50
2.4.2 E1 valgu fosfosaitide määramine ja nende roll viiruse elutsükklis.....	51
2.4.3 E1 valgus tuvastatud fosfosaitide fosforüülvate kinaaside leidmine.....	53
KOKKUVÕTE.....	55
SUMMARY.....	55
KASUTATUD KIRJANDUS.....	57
Kirjanduse loetelu.....	57
Kasutatud veebiaadressid.....	62
LISA 1.....	63
LISA 2.....	64
LISA 3.....	65
Lihtlisents.....	66

KASUTATUD LÜHENDID

ATM - ataksia-telangiiektaasia muteerunud (ingl. k *ataxia-telangiectasia mutated*)

bp - aluspaar (ingl. k *basepair*)

CDK - tsükliin-sõltuvad kinaasid (ingl. k *cyclin-dependent kinases*)

CK - kaseiin kinaas (ingl. k *casein kinase*)

DDR - DNA kahjustuse vastus (ingl. k *DNA damage response*)

dsDNA - kaheahelaline DNA (ingl. k *double stranded DNA*)

E2BS - E2 seostumiskoht (ingl. k *E2 binding site*)

ERK - ekstratsellulaarne signaalreguleeritud kinaas

FCS - vasika loote seerum (ingl. k *fetal calf serum*)

GST - Glutatioon-S-transferaas

HA - hemaglutiniin

HPV - inimese papilloomiviirus (ingl. k *human papillomavirus*)

IMDM - *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

IP - immuunsadestamine (ingl. k *immunoprecipitation*)

IPTG - isopropüül-β-D-tio-galaktopüranosiid

JNK - C-Jun N-terminaalne kinaas

LB - *Lysogeny broth*

MAPK - mitogeen aktiveeritud proteiin kinaas

mc - pisirõngas (ingl. k *minicircle*)

N.luc - nanolutsiferaas

NCR - mittekodeeriv piirkond (ingl. k *non-coding region*)

NES - tuuma eksportsignaal (ingl. k *nuclear export signal*)

NLS - tuuma lokaliseerimissignaal (ingl. k *nuclear localization signal*)

ORF - avatud lugemisraam (ingl. k *open reading frame*)

PAE - varajane poliadenüleerimissait (ingl. k *early polyadenylation site*)

PAL - hiline poliadenüleerimissait (ingl. k *late polyadenylation site*)

PCNA - prolifereruvate rakkude tuumaantigeen (ingl. k *proliferating cell nuclear antigen*)

PE - varajane promootor (ingl. k *early promoter*)

RFC - replikatsioonifaktor C

PKA - proteiin kinaas A

PKC - proteiin kinaas C

PL - hiline promootor (ingl. k *late promoter*)

PV - papilloomiviirus

ssDNA - üheaheelaline DNA (ingl. k *single-stranded DNA*)

TB - *Terrific Broth*

URR - pikk kontroll regioon (ingl. k *upstream regulatory region*)

wt - metsiktüüpi (ingl. k *wild type*)

SISSEJUHATUS

Inimese papilloomiviirused ehk HPVd (ingl. k *Human papillomaviruses*) on väikesed kaheaheelalise DNAGA (dsDNA) viirused papilloomiviiruste perekonnast. HPV levib naha või limaskestade kontakti kaudu. Kuigi enamustel juhtudel kulgeb infektsioon asümptomaatiliselt, põhjustavad osad HPVd kondüloome, papilloome ja tüükad. Kõrge riskiga HPV nakkus võib viia pahaloomulise kasvaja tekkeni. PVd nakatavad naha ja limaskestade keratinotsüüte ning nende elutsükkel on seotud epiteelkoe rakkude diferentseerumisega. HPV siseneb nahavigastuse kaudu epiteelkoe basaalkihi rakku, seal ekspresseeritakse varajased valgud E1 ja E2 ning toimub esialgne genoomi amplifikatsioon. Selle tulemusena on basaalkihi rakkudes väike arv viiruse genome. E1 valk seostub E2 valgu abil viiruse DNA replikatsiooni alguspunkti ehk *originiga*, harutab lahti DNA ahelad ning on oluline rakuliste faktorite seostumiseks *originile*. HPV genoomi replikatsiooni viivad läbi peremeesraku DNA polümeraas δ , polümeraas α -primaas, replikatsioonifaktor C, topoisomeraas I jt rakulised valgud. Peale esialgset amplifikatsiooni toimub stabiilne säilumisfaas, mille käigus replitseeruvad viiruse genoomid sünkroonselt peremeesrakkudega. Vegetatiivne amplifikatsioon toimub peaaegu täielikult diferentseerunud keratinotsüütides ja selle tulemuseks on suur koopiaarv viiruse genome. Viiruse genoomid pakitakse epiteelkoe ülemistes kihtides diferentseerunud keratinotsüütides ja viirused vabanevad koos surnud rakkudega epiteelkoe pinnalt. Kuna valgud E1 ja E2 on fosfoproteiinid, reguleerivad mitmeid PV elutsükli etappe proteiinkinaasid. PV valkude posttranslatsioonilisel fosforüülimisel on leitud seos valgu tuuma importimisel, replikatsiooni aktiivsusel, valk-valk interaktsioonide tekkel, valgu proteolüütilisele lagundamisele suunamisel ja genoomide jaotumisel tütarakkudesse.

Käesoleva magistritöö esimene osa annab ülevaate inimese papilloomiviiruste genoomi ülesehitusest, elutsüklist ja proteiinkinaaside rollist selles. Teises osas tuvastatakse HPVde E1 valkudes olevad fosforüülitud aminohapped, vaadeltakse fosforüülitud aminohohapete konserveerumist, uuritakse fosforüülimise mõju replikatsioonile ja valgu tekkele. Viimaks puhastatakse bakterist HPV18 E1 valk ja leitakse selles PKA, tsükliinE/CDK2 ja CK2 fosfosaidid. Magistritöö koostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Papilloomiviirused

Papilloomiviirused (PVd) on mitmekesised ja levinud DNA viirused. Enamasti on PV nakkus asümptomaatiline, kuid mõndadel juhtudel kaasneb sellega erinevate tüügaste või pahaloomuliste kasvajate teke. PVsid on isoleeritud paljudelt erinevatelt loomadelt, nt kaladelt, kahepaiksetelt ja enamikelt imetajatelt. PVd on eksisteerinud miljoneid aastaid ning pika aja jooksul koos peremeesorganismiga koevolutsioneerunud (Bernard, 1994), (Shadan ja Villarreal, 1995). PVd muteeruvad aeglaselt ning enamasti ei kandu ühelt liigilt teisele (Van Doorslaer, 2013). Aja jooksul on viirused kohanenud väga spetsiifiliselt nakatama kindlat peremeesorganismi ja kudet. Vastavalt nakatavale organismile ja koe tüübile jagatakse PVd perekondadeks: alfa-, beeta-, gamma-, delta-, epsilon-, zeta-, eeta-, theeta-, ioota-, kapa-, lambda-, mu-, nu-, Xi-, omikron-, ja pi- papilloomiviirused. Näiteks alfa PVd nakatavad enamasti limaskestast epiteelkude inimestel ja primaatidel; beeta, gamma, mu ja nu PVd nakatavad peamiselt inimese naha epiteelkihi keratinotsüüte; epsilon ja Xi PVd nakatavad veiseid; zeta PV nakatavad hobuseid; eeta ja theeta PVsid on leitud lindudelt; kapa PVd nakatavad jäneseid; omikron PVsid on leitud vaalalistelt (de Villiers et al., 2004).

PVdel on ikosaeedriline kapsiid, diameetriga ~55 nm, mille sisse on pakitud dsDNA. Viirused jagatakse tüüpideks nende peamist kapsiidivalgu L1 kodeeriva geeni avatud lugemisraami (ORF - *open reading frame*) nukleotiidses järjestuses põhjal. Uue tüübi L1 valgu kodeeriv DNA järjestus peaks olema vähemalt 10% erinev teadaolevate PVde samast järjestusest (de Villiers et al., 2004). Praeguseks on teada üle 400 tüübi PVsid, millest üle 200 nakatavad inimest (<https://pave.niaid.nih.gov/>).

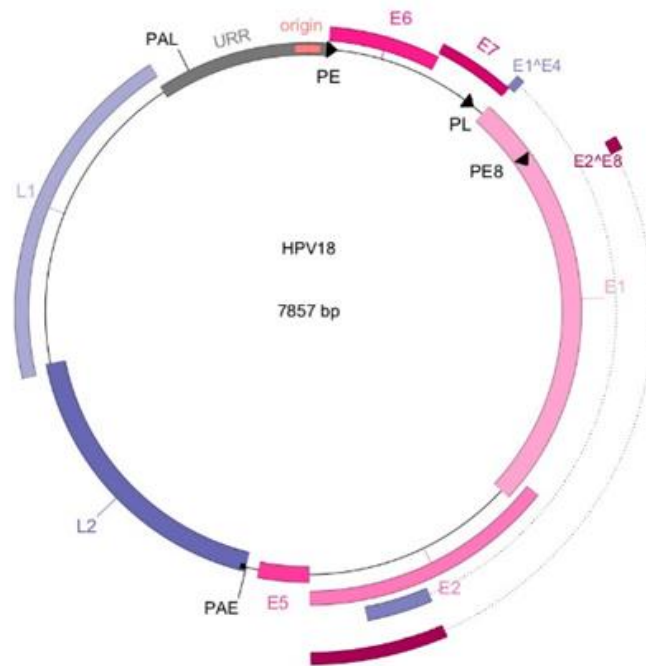
1.2 Inimese papilloomiviirused

HPVd nakatavad naha- ja limaskestast epiteelkoe basaalkihi keratinotsüüte. Vastavalt kasvaja tekke riskile jaotatakse PVd hea- ja pahaloomulisteks. Pahaloomulise ehk onkogeense HPV infektsioon on seotud enamike emakakaelavähi juhtumitega, veel võib HPV nakkus põhjustada peenise, päraku, tupe, suu, kõri, pea- ja kaelapiirkonna kasvajaid. Arvatakse, et ~5% inimestel esinevatest kasvajatest on põhjustatud HPV poolt ("*HPV and Cancer*" - *National Cancer Institute*). Pahaloomulisteks HPVdeks on HPV16, HPV18, HPV31 ja HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV68, HPV73 ja HPV82. Healoomulised

HPVd võivad põhjustada healoomulisi kasvajaid nagu tüükad, kondüloomid ja papilloomid kätel, jalgadel, huultel ja kurgumandlitel. Näiteks HPV1 ja HPV2 põhjustavad tüügaste teket jalgadel, HPV4 võib põhjustada tüügaste teket kätel, HPV6 ja HPV7 võivad põhjustada papilloome suus ning HPV11 ja HPV42 põhjustavad kondüloomide teket.

1.3 HPV genoom ja struktuur

HPV genoom on üsna konserveerunud ~8000 aluspaari (bp-*basepair*) suurune tsirkulaarne kovalentselt suletud dsDNA. Genoomi ülesehitus on näidatud joonisel 1 HPV18 näitel. HPV genoom on jagatud kolmeks piirkonnaks: varakult ekspresseeruv geenipiirkond, hiliselt ekspresseeruv geenipiirkond ja reguleeriv ala. Genoomis on mitmeid kattuvaid ORFe, millelt kodeeritakse valgud. Transkriptsioon algab mitmest promootorist, mille tulemusena sünteesitakse suures hulgas erinevaid mRNAsid. PV transkriptsioon toimub ühelt DNA ahelalt ja on polütsistroniline ehk üks mRNA kodeerib mitut erinevat valku. Mitmete HPVde varajane promootor (PE) asub pikas kontroll regioonis (URR - *upstream regulatory region*) ja hiline promootor (PL) asub *E7* lugemisraamis. PV *E1* ORFis asub PE8 promootor, mis on aktiivne kogu infektsioonitsükli vältel ja reguleerib $E8^E2$ valgu ekspressiooni (Straub et al., 2015). PV-de genoomis on kaks polüadenüleerimissaiti PAE ja PAL. PAE saidis lõppeb varajaste ja PAL saidis lõppeb hiliste transkriptide süntees. Varajaselt ekspressioonilt üleminek hilisele ekspressioonile on vajalik promootori ja polüadenüleerimissaidi vahetus (Jia et al., 2009), (Johansson ja Schwartz, 2013). HPV transkriptsioonikaart HPV18 näitel on näidatud joonisel 2.



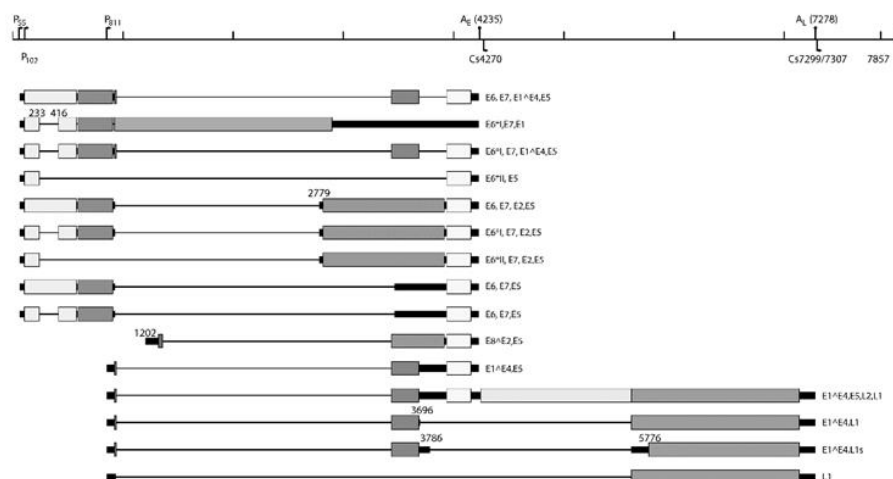
Joonis 1. HPV18 genoomne ülesehitus. HPV18 genoom on 7857 bp suurune tsirkulaarne kovalentselt suletud dsDNA. Varajased lugemisraamid *E1-E7* on märgitud roosaga, hilised lugemisraamid *L1* ja *L2* sinisega. Katkendlik joon näitab alternatiivse splaissingu tulemusena tekkivaid mRNAid, millelt transleeritakse HPV valgud $E1^E4$ ja $E2^E8$. HPV18 genoomis on mitu promootorit, millest joonisele on märgitud noolena PE (varajane promootor), PL (hiline promootor) ja PE8. Saidid PAE ja PAL tähistavad varajast ja hilist polüadenüeerimissaiti. URR on mittekodeeriv piirkond, kus asuvad *origin* ja transkriptsiooni reguleerivad cis-elementid.

PV nakkuse esimestel perioodidel ekspresseeruv geenipiirkond tähistatakse tähega E (ing.k sõnast *early*) ja see koosneb kuni kuuest ORFist: *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6*, *E7*. Varajased valgud *E1*, *E2*, *E6* ja *E7* kodeeritakse polütsistronsetelt transkriptidelt (Harari et al., 2014). Mõndadelt HPVdelt on leitud ka valke *E3* ja *E8*, aga nende ekspressiooni ja funktsiooni kohta pole palju teada. Varakult ekspresseeruva geenipiirkonna geenid kodeerivad mittestruktuurseid valke, mis on olulised viiruse replikatsiooniks, raku keskkonna kohandamiseks tagamaks efektiivne nakkus, viiruse transkriptsiooniks, raku proliferatsiooniks ja transformatsiooniks (Harari et al., 2014). *E1* on vajalik replikatsiooni alustamiseks. *E2* valgud on vajalikud replikatsiooni *origini* äratundmiseks ja transkriptsiooniks. *E5*, *E6* ja *E7* on onkoproteiinid, mis häirivad rakutsükli regulatsiooni aidates kaasa rakkude mitootilise aktiivsuse säilimisele diferentseerivas epiteelis. *E5* on transmembraanne valk, mis aktiveerib rakulisi kasvufakotreid ja stimuleerib selle kaudu keratinotsüütide jagunemist ja kasvu (DiMaio ja Mattoon, 2001). *E6* seondub tuumorsupressorvalguga p53 ja suunab selle ubiquitiinsõltuval proteolüütilisele lagundamisele, et vältida p53 vahendatud rakutsükli seiskamist või nakatunud rakkude minekut apoptoosi. *E7* lagundab retinoblastoomi valkude perekonna tuumorsupressorvalke ning häirib

interferoon ja NFκB signaalradasid, mis võimaldavad viirusel immuunsüsteemi vältida (Huh et al., 2005), (Perea et al., 2000). E1^{E4} valk osaleb nii HPV varajastes eluetappides kui ka virionide pakkimisel ja vabanemisel (Nakahara et al., 2005). HPVd kodeerivad ka liitvalku E8^{E2}, mis reguleerib viiruse replikatsiooni ja transkriptsiooni, et säiliks madal koopiaarv viiruse episoomi viiruse elutsükli latentse faasis (McBride, 2013), (Straub et al., 2014). Valk E8^{E2} toimib kui konkurentne inhibiitor, mis suures kontsentratsioonis takistab täispika E2 valgu seostumist E2 seostumiskohtadele (E2BS - *E2 binding sites*) ja nii represseerib edaspidist replikatsiooni ja transkriptsiooni (Zobel et al., 2003).

Hiliselt ekspresseeruv geenipiirkond tähistatakse tähega L (ing. k sõnast *late*) ja see koosneb kahest ORFist: *L1* ja *L2*. Geenidelt *L1* ja *L2* kodeeritakse kapsiidi moodustamiseks olulisi valke. *L1* on peamine kapsiidivalk, mis moodustab ikosaeedrilise kapsiidi ja loob infektsioonil esmase kontakti rakuga, seostudes retseptoriga raku pinnal. *L2* valgul on oluline roll PV genoomi transpordil rakutuuma ja hiljem stabiilsel kapsiidi kokkupakkimisel.

URR on mittekodeeriv piirkond *L1* ORFi lõpu ja *E6* startkoodoni vahel. URR sisaldab cis-elemente, mis reguleerivad geeni varajast transkriptsiooni, viiruse amplifikatsiooni ja rakulist tropismi. Cis-elementid on *origin*, transkriptsiooni võimendajad (ingl. k *enhancers*), E2BSid jm piirkonnad, mis on vajalikud viiruse pikaajaliseks replikatsiooniks ning viiruse episoomide jaotamiseks tütarakkudesse (McBride, 2008). Lisaks on HPV genoomis lühem mittekodeeriv piirkond (NCR - *non-coding region*), mis asub *E5* stopkoodoni ja *L2* start koodoni vahel ja sisaldab kõrgelt konserveerunud PAE saiti.



Joonis 2. HPV18 transkriptsioonikaart. HPV transkriptsioon algab mitmest promootorist ja transkriptid on polütsistronsed. P55 ja P102 on varajased promootorid, millelt sünteesitakse varajased transkriptid: *E1*, *E2*, *E1^{E4}*, *E5*, *E6* ja *E7*. P1202 promootorilt algab valgu E2^{E8} RNA süntees. Varajaste transkriptide süntees lõpeb varajases poliädendüleerimissaidis AE. P811 on hiline promootor, millelt sünteesitakse transkriptid *E1^{E4}*, *E5*, *L1* ja *L2*. Hiliste transkriptide süntees lõpeb hilises poliädendüleerimissaidis AL. (<https://pave.niaid.nih.gov/>)

1.4 HPV elutsükkel

HPVd nakatavad naha ja limaskestade epiteelkoe keratinotsüüte ja nende elutsükkel on tihedalt seotud mitmekihilise epiteelkoe loomuliku struktuuriga. Limaskestade pinda katvas sarvestumata epiteelkihis eristatakse kolme kihti: basaalkiht, ogakiht ja pindmine kiht. Nahapinda kattev sarvestunud lameepiteel koosneb basaalkihist, ogakihist, sõmerkihist ja sarvkihist. Normaalse epiteeli alumise kihi moodustavad basaalmembraani külge kinnitunud jagunemisvõimelised basaalarakud. Basaalarakud jagunevad asümmeetriliselt uuteks basaalarakkudeks ja tütarakkudeks. Tütarakud eralduvad basaalmembraanist ning alustavad osana koe uuenemisprotsessist diferentseerumist, mille käigus nad migreeruvad epiteelkihi pinna suunas. Diferentseerumise käigus tütarakud väljuvad rakutsüklist ning muudavad geeniekspressiooni kuni lõpuks surnud keratinotsüüdid irduvad epiteelkihi pinnalt.

HPVd kasutavad oma elutsüklis kihilise epiteelkoe uuenemise protsesse, et vältida peremeesorganismi immuunvastust. Esialgu toimub varajaste valkude süntees, millel on regulatoorne roll replikatsioonil ja transkriptsioonil. Hiljem, epiteelkihi ülemistes kihtides kodeeritakse valgud, mis on olulised DNA pakkimisel, kapsiidi kokkupanekul ja virionide vabanemisel. HPV nakatab basaalkihi rakke. Virion jõuab basaalkihi keratinotsüütide juurde väikeste nahavigastuste kaudu. Alumistes epiteelkihi rakkudes, kus immuunvastus on kõige tugevam, replitseeritakse ekstrakromosomaalselt väikeses koguses viiruse genoome. Need basaalarakud moodustavad nakkuse reservuaari. HPV elutsükli edasised etapid toimuvad koos basaalkihi rakkude jagunemisega ning uued tekkinud tütarakud liiguvad järjest ülespoole epiteelkihi pealispinna suunas. Virionide kokku pakkimine ja vabanemine toimub pealmistes diferentseerunud keratinotsüütidest. HPV elutsükkel rakku sisenemisest kuni uute virionide vabanemiseni võtab vähemalt 3 nädalat, mis on sama aeg, mis kulub keratinotsüüdil täieliku diferentseerumise läbimiseks (Kadaja et al., 2009). Mõnikord jääb HPV DNA episoomina basaalkihi keratinotsüütidesse ja võib seal püsida latentses vormis aastaid või aastakümneid (Gravitt, 2012), (Doorbar 2013).

1.4.1 HPV rakku sisenemine ja varajane geeniekspressioon

HPV siseneb mikrovigastuse kaudu basaalkihi rakkudesse. Esmalt seostub viiruse kapsiidivalk L1 rakumembraani pinnal asuvate heparaansulfaat proteoglükaanidega (Giroglou et al., 2001), kutsudes viiruse kapsiidivalkudes esile konformatsioonilised muutused, mis on vajalikud viiruse seostumiseks sekundaarse retseptoriga, membraani läbimiseks ja virioni

lahtipakkimiseks (Selinka et al., 2003). Virioni lahtipakkimiseks on olulised proteiin konverteasid, mis lõikavad spetsiifiliselt L2 valku furiini konsensus saidis (Richards et al., 2006). Furiin on valk, mis asub peamiselt trans-Golgi võrgustikus ja osaleb eellasvalkude endoproteolüütilises töötlemises. Virion siseneb rakku endotsütoosi teel ja seejärel transporditakse viirus mööda trans-Golgi kompleksi endosomaalseid radasid tuuma (Bousarghin et al., 2003). Selle transpordi käigus eemaldub viiruselt kapsiid, genoom jääb seotuks valguga L2 kuni genoom-L2 kompleks on tuuma sisenenud (DiGiuseppe et al., 2014). Tuuma sisenemine toimub vaid mitoosi käigus, kui tuumamembraan on lõhustatud. L2-genoom kompleks liigub mööda mikrotuubuleid vesiikulis kondenseerunud kromosoomideni ja jääb vesiikulisse kuni mitoosi lõpuni (DiGiuseppe et al., 2016). L2-genoom kompleks interakteerub promüelotsüütiliste leukeemia tuumakehadega, millele järgneb PV varajaste transkriptide sünteesimine rakuliste transkriptsioonifaktorite abil (Day et al., 2004). Kui on toodetud piisavas hulgas valku E2, hakkab ta kontsentratsioonist sõltuvalt reguleerima varajaste transkriptide sünteesi seondudes URR regioonis paiknevatele E2BSdele. Piisavalt suur varajaste valkude kontsentratsioon võimaldab peremeesraku tuumas luua sobiva keskkonna, et saaks alata HPV replikatsioon.

1.4.2 Replikatsioon

PV elutsüklis eristatakse kolme staadiumit vastavalt sellele, millises epiteelikihis ta paikneb. Need kolm staadiumit on: esialgne genoomi amplifikatsioon, genoomi säilimine ehk latentne infektsioon ning vegetatiivne amplifikatsioon. Basaalkihi rakkudes toimub viiruse genoomi esialgne amplifikatsioon. Edaspidi toimivad PV ja peremeesraku replikatsioon sama sagedusega. Kuna HPV1 puudub DNA polümeraas on viiruse replikatsioon tihedalt seotud peremeesraku DNA sünteesiga ja viirus kasutab selleks peremeesraku replikatsioonisüsteemi. HPV valgud indutseerivad ebalooslikku raku proliferatsiooni ja ATM (ataksia-telangiektaasia muteerunud) vahendatud DNA kahjustuse vastust (DDR – *DNA damage response*), mis võimaldavad viiruse replikatsiooni diferentseerunud S-faasist väljunud rakkudes (Moody ja Laimins, 2009).

1.4.3 Esialgne genoomi amplifikatsioon ehk transiente replikatsioon

Esialgne genoomi amplifikatsioon toimub epiteeli basaalkihi rakkudes. Selle käigus toodetakse väike koopiarv viiruse episoomi, mida säilitatakse jagunevates rakkudes ekstrakromosomaalsete replitseerumisvõimeliste plasmiididena. Esialgse genoomi amplifikatsiooni käigus toodetakse 50-500 episoomi ühe raku kohta (McLaughlin-Drubin et al., 2004), (Prati et al., 2018). Replikatsiooniks vajalikud PV valgud on E1 ja E2, mis tagavad rakuliste replikatsioonifaktorite seondumise viiruse replikatsiooni *originile* ja millele järgneb viiruse episoomide koopiarvu kiire suurenemine. Arvatavasti toimub esialgne replikatsioon kahesuunaliselt teeta replikatsiooni mudeli kaudu (Orav et al., 2015), mille käigus kaks *origini* piirkonnas moodustunud replikatsioonikahvlit liiguvad vastassuundades, kuni kohtuvad tsirkulaarse molekuli replikatsiooni *origini* vastaspoolel. Moodustunud intermediaadid meenutavad teeta (θ) tähte. Tekkinud intermediaadid lahutatakse kaheks episoomiks topoisomeraaside abil.

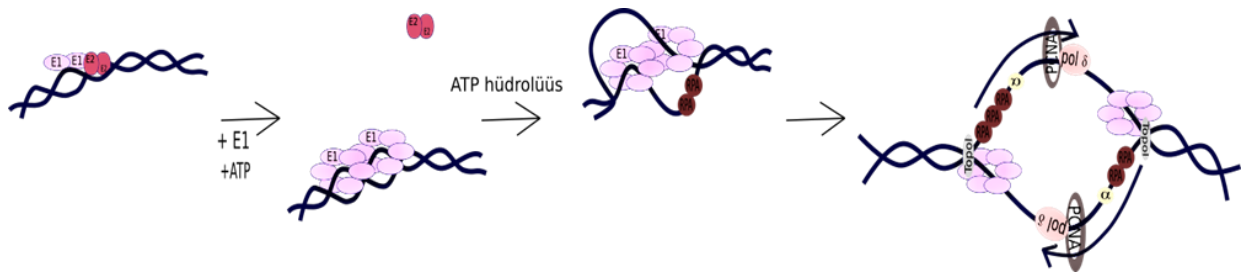
1.4.3.1 E1 valk esialgses amplifikatsioonis

E1 on ATP sõltuv DNA helikaas, mis on vajalik PV episoomide replikatsiooniks nakatunud rakkudes. E1 on oluline nii *origini* äratundmisel, dsDNA ahelate eraldamisel kui ka rakuliste replikatsioonifaktoritega seondumisel. Erinevate PVde E1 valk on tugevalt konserveerunud. E1 on toksiline ja seetõttu võib replikatsiooni mittetoimumise ajal paikneda tsütoplasmas. Mitmed uuringud on näidanud E1 valgu edasi-tagasi liikumist tuuma ja tsütoplasma vahel, kasutades selleks tuuma lokaliseerimissignaale (NLS - *nuclear localization signal*) ja tuuma eksportsignaale (NES - *nuclear export signal*) (Deng et al., 2004), (Yu et al., 2007), (Fradet-Turcotte et al., 2010). NLS järjestust sisaldavad valgud transporditakse tuuma α/β heterodimeeridest koosnevate importiinidega. NES järjestust sisaldavad valgud moodustavad kompleksi eksportiinide ja RanGTP-ga, mis aitavad kaasa nende tuumast välja viimisele. E1 valgu kuhjumine tuuma peatab rakutsükli S-faasis (Fradet-Turcotte et al., 2011). Arvatakse, et E1 on eriti oluline just esialgses amplifikatsioonis ja pärast piisava arvu PV episoomide olemasolu basaalkihi keratinotsüütides muutub viiruse replikatsioon E1-sõltumatuks (Egawa et al., 2012), (Kim ja Lambert, 2002).

E1 koosneb kuni 650-st aminohappest. Valgus eristatakse kolme funktsionaalset domeeni: N-terminaalne domeen, DNA sidumise domeen ja C-terminaalne domeen. N-terminaalses domeenis on 2 NLSi, enamus PVdes konserveerunud CRM1 sõltuv NES ning tsükliini

sidumismotiivi RXL. N-terminaalne domeen on vajalik optimaalseks viiruse replikatsiooniks ning polümeraas α -primaasi seostumiseks replikatsiooni *originile* (Morin et al., 2011), (Amin et al., 2000). DNA sidumisdomeen tunneb ära ja seostub spetsiifiliste järjestustega viiruse replikatsiooni *originil* (Chen ja Stenlund, 2001), (Ustav et al., 1991), (Titolo et al., 2003). C-terminaalne domeen on ensümaatiliselts aktiivne domeen, mis on vajalik E1 valgu kahekordse heksameeri moodustamiseks, ATPga seostumiseks ja dsDNA ahelate eraldamiseks. E1 valgu C-terminaalse domeeni lõpus paikneb konserveerunud struktuuritu aminohapete järjestus. Arvatakse, et see on oluline E1 valkudest koosneva heksameeri moodustamisel ja selle struktuuri säilimisel DNA ahelate lahti harutamise ajal (Whelan et al., 2012).

E2 on HPV peamine transkriptsiooniregulaator, aga osaleb ka DNA sünteesi initsiatsiooniks (Berg ja Stenlund, 1997). E2 valk seondub E1 valguga, et tagada võimalikult täpne E1 seostumine E1 seostumiskohaga *originil* (Blitz ja Laimins, 1991). ATP hüdrolyüüsi energiast sõltuvas protsessis lisatakse kompleksi veel E1 valgumolekule ja eemadatakse kompleksist E2 valk (Stenlund, 2003). Seejärel seondub E1 mitmete peremeesraku replikatsioonifaktoritega, nagu üheaahelalist DNA-d (ssDNA) siduv replikatsiooni valk A (RPA), topoisomeraas I, polümeraas α -primaas ja polümeraas δ . Võimalik, et viiruse replikatsiooniks on veel vajalikud replikatsioonifaktor C (RFC) ja proliferereervate rakkude tuumaantigeen (PCNA) (Melendy et al., 1995). Lisaks seostuvad E1-ga veel mitmed rakulised valgud nagu p80, hSNF5, histoon H1, E1BP ja p56, mis võivad aidata replikatsiooni reguleerida (Bergvall et al., 2013). DNA ahelate eraldamiseks peavad E1 valgud moodustama kahekordse heksameerist rõnga ümber dsDNA ning seejärel "sulatama" DNA ahelad lahti. Rõngas moodustuvad vesiniksidemed ssDNA suhkru-fosfaat jääkide ja kuue E1 heksameeris oleva valgu β -juuksenõel struktuuri spetsiifiliste aminohapete vahel (Enemark ja Joshua-Tor, 2006). ATP hüdrolyüüsi ja konformatsiooniliste muutuste tulemusena nihkuvad heksameeri rõngaga ümbritsetud dsDNAst väljaspoole ssDNA ahelad (Bergvall et al., 2013). E1 valgukompleks lahutab dsDNA-d bidireksionaalselt justkui pumbates ssDNA-d heksameerist välja. Topoisomeraas I seostub E1 valguga replikatsioonikahvli ees ja vähendab DNA superspiralisatsiooni. RPA seondub just lahti harutatud ssDNA mallidele (ingl. k *template*) ja kaitseb seda nii uuesti seondumise kui ka nukleaaside eest. Polümeraas α -primaas sünteesib replikatsiooni alustamiseks vajalikud praimerid. RFC ja RPA on olulised, et polümeraas α -primaas ei seostuks uuesti samale järjestusele, mille järgi on juba praimer sünteesitud. PCNA ja polümeraas δ seonduvad DNA 3`otsa moodustades valmis DNA polümeraasi kompleksi (Bergvall et al., 2013). Seega saab alata esialgne viiruse DNA süntees. Mudel HPV replikatsiooni initsiatsioonist on kujutatud joonisel 3.



Joonis 3. HPV replikatsiooni initsiatsiooni mudel. HPV valk E1 tunneb E2 valguga õiget seostumiskoha replikatsiooni *originil*. Seejärel seostuvad E1 valguga teised E1 molekulid ja E2 valgud lahkuvad kompleksist. E1 valgud moodustavad kahekordse heksameeri. ATP hüdrolüüsi ja konformatsiooniliste muutuste tulemusena sulatavad E1 heksameerid DNA ahelad lahti. RPA seostub just eraldatud DNA ahelale. Seejärel seostuvad *originile* ja E1 valguga rakulised replikatsioonifaktorid ja moodustub replikatsioonikompleks. Polümeraas α -primaas (α) sünteesib esialgse praimerit. Tõenäoliselt sünteesib ülejäänud ahela polümeraas δ (pol δ). Topoisomeraas I (TopoI) seostub replikatsioonikompleksi ette, et vähendada DNA superspiralisatsiooni. Replikatsioonifaktor C abil seondub kompleksiga PCNA, mis interakteerub mitmete teiste rakuliste valkudega.

1.4.4 Stabiilne säilumisfaas ehk latentne infektsioon

Esialgse genoomi amplifikatsiooni tulemusena on basaalkihi rakkudes väike koopiaarv HPV episoomi. Edaspidi toimub viiruse DNA replikatsioon sünkroonselt peremeesraku replikatsiooniga. Latentse infektsiooni ajal kahekordistub viiruse genoom peremeesraku rakutsükli S-faasi ajal ja see jagatakse mitoosi käigus tekkinud tütarakkude tuumadesse. Võrdse jaotumise tagab E2 valk seondades viiruse DNAd raku mitootiliste kromosoomidega (Baxter et al., 2005), (You et al., 2004) (Ilves et al., 1999). E2 valguga N-terminaalses otsas on transaktiivatsiooni domeen, mis seondub peremeesraku kromatiiniga ja C-terminaalses otsas asuv DNA sidumise domeen interakteerub konserveerunud saitidega viiruse genoomis (Van Tine et al., 2004). Mitmetes HPV tüüpides on vajalik E2 seostumine bromodomeeni sisaldava valgu 4-ga (BRD4) või ChIR1-ga, et tagada E2 valguga seostumine mitootilise kromosoomiga (Oliveira et al., 2006), (You et al., 2004), (Parish et al., 2006). Episoomide säilimiseks on olulised viiruse onkoproteiinid E6 ja E7 (Thomas et al., 1999), (Oh et al., 2004). Onkoproteiinid võivad olla olulised, et immuunsüsteem ei eemaldaks viiruse episoomi kui võõr-DNAd. HPV valgud E6 ja E7 seostuvad suure afiinsusega immuunsüsteemi reguleerivatele valkudele ja nii blokeerivad mitmete immuunsüsteemiga seotud geenide ekspressiooni ja signaalradade aktiveerimist (Zhou et al., 2019). Nt HPV E7 valk surub alla Tolli-laadse retseptori 9 ekspressiooni nakatunud keratinotsüütides (Pacini et al., 2015), (Hasan et al., 2013). Tolli-laadne retseptor 9 tunneb rakkudes ära viiruse dsDNA ja aktiveerib signaalraja, mis viib proinflammatoorsete tsütokiinide vastuseni.

1.4.5 Vegetatiivne amplifikatsioon

Teine amplifikatsioon leiab aset mitmekihilise epiteeli diferentseerunud rakkudes ja selle käigus paljundatakse viiruse genoomi suure koopiaarvuni, eesmärgiga pakkida see kapsiididesse ja vabastada võimalikult palju virione. Tavalised epiteelkihi rakud väljuvad rakutsüklist ja lõpetavad jagunemise, kui nad eralduvad basaalmembraanilt. PV vajab replikatsiooniks DNA polümeraase ja replikatsioonifaktoreid, mis on olemas ainult mitootiliselt aktiivsetes rakkudes. Tõenäoliselt on olulised PVde onkoproteiinide interaktsioonid erinevate peremeesraku regulaatorvalkudega, et säilitada diferentseerunud keratinotsüütides viirusgenoomide replikatsioonivõime (Jeon et al., 1995), (Scheffner et al., 1990), (Dyson et al., 1989). Rakutsükli peatamiseks S-faasis häirivad onkoproteiinid tsükliine, tsükliin-sõltuvaid kinaase ja nende inhibiitoreid (Funk et al., 1997), (Jones et al., 1997). E7 valguga seotud põhjustatud pRb perekonna valkude inaktiveerimise tulemuseks on E2F transkriptsioonifaktorite vabanemine ja rakutsükli S-faasi sarnast keskkonda loovate geenide ekspressioon. Vegetatiivse amplifikatsiooni alustamiseks on vajalikud hilise promotori ja DDRi aktiveerimine (Klumpp ja Laimins, 1999; Moody ja Laimins, 2009). Hiline promotor on aktiivne ainult diferentseerunud rakkudes ja selle aktiveerimisel osaleb valk E7 (Bodily et al., 2013). ATM vahendatud DDRi käivitumise tagajärjel peatub rakutsükkel S/G2 faasis ja mitmed viiruse replikatsiooniks vajalikud rakulised faktorid liiguvad tuuma (Moody ja Laimins, 2009). Viiruse hilise genoomi amplifikatsioon võib toimuda rekombinatsioonist sõltuvalt ehk HPV indutseerib rakus DDR, mille tulemusena aktiveeritakse homoloogiline rekombinatsioon (Sakakibara et al., 2013), (Gillespie et al., 2012), (Moody ja Laimins, 2009). Homoloogiline rekombinatsioon viiakse läbi peale DNA sünteesi hilises S või varajases G2 faasis ja selle abil parandatakse rakus kaheahelalisi DNA katkeid. Rekombinatsioonist sõltuv replikatsioon on ühesuunaline ega vaja *origini* ja selle abil on võimalik sünteesida suurtes kogustes pikki konkatemeerseid DNA molekule. Rakulised faktorid võivad need molekulid lahutada monomeerseteks tsiruklaarseteks genoomideks (Orav et al., 2015).

1.4.6 Rakulised proteiinkinaasid PV elutsükli

Erinevate kinaaside vahendatud fosforüülimine reguleerib mitmeid PV elutsükli etappe. PV valgud E1 ja E2 on fosfoproteiinid, millede fosforüülimisel võivad osaleda MAPK (mitogeen

aktiveeritud proteiin kinaas), CK (kaseiin kinaas), CDK (tsükliin-sõltuv kinaas), PKA (proteiin kinaas A) ja PKC (proteiin kinaas C) perekonna kinaasid. Fosforüülimise tulemusena muutub valgu lokalisatsioon, konformatsioon, stabiilsus ja/või aktiivsus. PV valkude posttranslatsioonilisel fosforüülimisel on leitud seos valgu tuuma importimisel, replikatsiooni aktiivsusel, valk-valk interaktsioonide tekkel, valgu proteolüütilisele lagundamisele suunamisel ja genoomide jaotumisel tütarakkudesse. Tabelis 1 on välja toodud PV E1 valku arvatavalt fosforüülivad kinaasid ning nende funktsioon eukariootses rakus ja PV elutsükliis.

Tabel 1. PV elutsükliit reguleerivad kinaasid. Tabelis on välja toodud kinaasid, millel on leitud seos mõne PV elutsükli etapi reguleerimisega ja nende kinaaside peamine funktsioon eukariootses rakus. Lisaks on tabelis konsensusjärjestus, milles olevaid seriine või treoniine vastav kinaas sagedamini fosforüülib. X tähistab suvalist aminohapet. Y tähistab hüdrofoobset aminohapet. pS/pT tähistab fosforüülitud seriini/treoniini. Vastava kinaasi poolt fosforüülitav aminohape järjestuses on alla joonitud.

KINAAS	PEAMINE FUNKTSIOON	JÄRJESTUS	KINAAS PV ELUTSÜKLIS
CK1	Reguleerib mitmeid signaalradasid, mis on seotud transkriptsioonifaktorite tuuma-tsütoplasma transpordi, DNA reparatsiooni ja transkriptsiooniga.	<u>S/T</u> -X-X-(X)-S/T	Funktsioon teadmata
CK2	Reguleerib rakutsükliit, proliferatsiooni, DNA reparatsiooni ja represseerib apoptoosi.	<u>S/T</u> -X-X-E/D/pS/pT	Reguleerib valk-DNA interaktsioone ja E2 ning E1 valgu proteolüütilisele lagunemisele suunamist (Penrose ja McBride, 2000), inhibeerib latentset replikatsiooni (Schuck et al., 2013) ja on oluline transientse replikatsiooni toimumiseks (Piirsoo et al., 2019).
PKA	Reguleerib glükogeeni ja lipiidide metabolismi.	R-R-X- <u>S/T</u> -Y	Vajalik replikatsiooniks ja episoomide jaotumiseks tütarakkudesse (Sekhar ja McBride, 2012), (Zanardi et al., 1997).
PKC	Reguleerib geeniekspressiooni, valkude sekretsiooni, rakkude proliferatsiooni ja põletikuvastust.	X- <u>S/T</u> -X-R/K	Võib olla vajalik PV replikatsiooniks (Zanardi et al., 1997), (Bian et al., 2007).
JNK	Reguleerib stressivastust, raku proliferatsiooni.	R-S-X- <u>S/T</u> -X-P	Osaleb E1 valgu seostumisel importiinidega (Yu et al., 2007).
ERK	Osalevad mitoosi ja meioosi reguleerimisel.	P-X- <u>S/T</u> -P	Osaleb E1 valgu tuuma importimisel (Yu et al., 2007).

Cdk2/A	Oluline mitoosi S-faasi toimimiseks.	<u>S/T</u> -P-K-K	Võib osaleda E1 valgu tuumast tsütoplasmasse eksportimisel (Fradet-Turcotte et al., 2010), (Deng et al., 2004).
Cdk2/E	Reguleerib mitoosi ja G1 faasist S faasi minekut. Reguleerib tsentrosoomide duplikatsiooni	<u>S/T</u> -P-K-K	Oluline E1 valgu tuumas püsimiseks PV replikatsiooni ajal (Fradet-Turcotte et al., 2010), (Deng et al., 2004)..

PVde E2 valgu kontsentratsioon reguleerib replikatsiooni ja transkriptsiooni toimumist. Kui epiteelkihi alumistes rakkudes on E2 valgu suures koguses, siis suunatakse see proteolüütilisele lagunemisele, et säiliks madal koopiaarv viiruse genoomi basaalkihi rakkudes. Proteolüütilisele lagunemisele suunamine on reguleeritud fosforüülimise kaudu, mida arvatavasti viib läbi CK2 (Penrose et al., 2004). BPV E2 valgus S301 muutmine mittefosforüülitavaksalaniiniks viis valgu poolestusaja piknemisele, ubikvitineerimise ja proteolüütilisele lagunemisele suunamise vähenemisele (Penrose ja McBride, 2000). See modifikatsioon võib olla konserveerunud mitmetes PVdes ja nii reguleerida PVde episoomide koopiaarvu rakus.

CK2 ja CK1 fosforüülivad BPV E1 valgu C-terminaalse domeeni lõpus paiknevat S584, mis on konserveerunud osades PVdes (Lentz, 2002). Nt HPV11 E1 valgus asub sarnases järjestuses CK konsensusjärjestuses seriinipositsioonis 626 ja HPV5 E1 valgus S580. CK1 on perekond proteiinkinaase, mis toimivad peamiselt signaaliülekanne radade regulaatoritena eukaryootsetes rakkudes. CK1 isovormid osalevad Wnt signaalradades, transkriptsioonifaktorite tuuma-tsütoplasma vahelises liikumises, DNA reparatsioonis ja transkriptsioonis. CK2 on kahest subühikust α või α' ja beeta koosnev tetrameerne valk, mis osaleb rakutsükli reguleerimisel, DNA reparatsioonis, rakkude proliferatsioonis ja angiogeneesis. CK2 poolt fosforüülitatud aminohappeid on tuvastatud mitmetes PV tüüpides. Nt BPV1, HPV11, HPV31 E1 ja E2 valgus mõjutab CK2 DNA sidumisvõimet (Schuck et al., 2013). BPV E1 valgu N-terminaalses osas paiknevate aminohapete ja E2 valgus S290 ja S302 fosforüülimine CK2 poolt inaktiveerisid mõlema valgu DNA sidumisvõimet. Samade aminohapete muutmine mitte-fosforüülitavateksalaniinideks E2 valgus suurendas oluliselt BPV latentse replikatsiooni aktiivsust (Schuck et al., 2013). Samas on näidatud, et CK2 α katalüütiline subühik on vajalik HPV5, HPV11, HPV16, HPV18 ja HPV31 genoomi transientseks replikatsiooniks (Pirsoo et al., 2019). Nendest uuringutest järeldub, et CK2 reguleerib PVdes valk-DNA interaktsioone, inhibeerib latentset replikatsiooni ja on hädavajalik transientseks replikatsiooniks.

PVde replikatsiooni aktiivsust võivad reguleerida PKA ja PKC. PKA on cAMP-sõltuv proteiinkinaas, mis osaleb nt lipiidide metabolismis, glükogeeni regulatsioonis, aktiini tsütoskeleti destabiliseerimisel jpm protsessides. PKC perekonna kinaasid reguleerivad mitmeid signaalradasid ja osalevad geeniekspressioonis, valkude sekretsioonis, rakkude proliferatsioonis ja põletikuvastuse reguleerimisel. Varasemalt on näidatud, et BPV E1 valgu S109 fosforüülib PKA ja PKC ning selle seriini muutmine mitte-fosforüülitavaksalaniiniks suurendab replikatsiooni aktiivsust, samas kui S109 on muudetud fosforüleerimist mimikeerivaks glutamaadiks, siis replikatsiooni aktiivsus väheneb võrreldes *wt* BPVga (Zanardi et al., 1997). Selle põhjuseks võib olla fosforüülitud S109 sisaldava E1 valgu nõrgemast seostumisest *originiga* või nõrgemast seostumisest importiinidega (Zanardi et al., 1997), (Bian et al., 2007). Need uuringud näitavad, et PKA või PKC põhjustatud fosforüülimine viib BPV replikatsiooniaktiivsuse langemiseni.

HPV E1 valgu tuuma-tsütoplasma transport on reguleeritud fosforüülimise kaudu. Tõenäoliselt osalevad E1 valgu tuuma importimisel tsütoplasmas asuvad MAPK perekonna kinaasid ERK (ekstratsellulaarne signaalreguleeritud kinaas) ja JNK (C-Jun N-terminaalne kinaas), mis fosforüülides valgu NLS järjestust takistavad selle seostumist importiinidega. Näiteks fosforüülivad ERK ja JNK HPV11 E1 valgus S89 ja S93 ja selle tulemusena jääb E1 valk valdavalt tsütoplasmasse (Yu et al., 2007). ERKid on proteiinkinaasid, mis osalevad meioosi ja mitoosi reguleerimisel. JNKid reageerivad stressistimulatsioonidele, nagu tsütokiinid, ultraviolettkiirgus, kuumašokk ja osmootne stress.

HPV E1 valk sisaldab CRM-1-sõltuvat NES järjestust, mis reguleerib valgu eksporti tuumast tsütoplasmasse. S ja G2-faasis kuhjuvad rakutuumas tsükliin E ja A ning nende cdk-d. Cdk-d on ensüümid, mis koosnevad katalüütilisest cdk subühikust ja regulatoorsest tsükliini subühikust. Üldiselt on need kinaasid olulised eukarüootse raku DNA sünteesil ja rakutsükli G1/S-faasi ülemineku reguleerimisel. TsükliinE/CDK2 ja tsükliinA/CDK2 reguleerivad rakutsükli S-faasi minekut. Need kinaasid fosforüülivad mitme HPV E1 NES järjestust ja seega inhibeerivad valgu ekspordi tuumast tsütoplasmasse. HPV31 E1 valgu tuuma eksporti reguleerib CDK2 (Fradet-Turcotte et al., 2010), mis arvatavasti fosforüülib S92 ja S106. HPV11 E1 valgu NES järjestuse lähedal olevaid aminohappeid (S89, S93, S107 ja T468) saavad fosforüülida tsükliinA/CDK2 ja tsükliinE/CDK2 (Deng et al., 2004). See võib olla levinud mehhanism E1 valgu tuuma-tsütoplasma vahelise liikumise reguleerimiseks, sest paljud PVd sisaldavad RXL motiivi, mille kaudu toimub seostumine tsükliinE/CDK2ga (Ma et al., 1999). Arvatakse, et HPV E1 fosforüülimine tsükliinA või tsükliinE/CDK2 poolt tagab E1 püsivuse tuumas S-faasi

alguses ja ajal ning see võib olla mehhanism viiruse DNA replikatsiooni sünkroniseerimiseks peremeesraku DNA sünteesiga (Bergvall et al., 2013).

E2 valgu fosforüülimine on oluline kromatiiniga seostumisel ja mitmete valk-valk interaktsioonide tekkel. Nt HPV8 E2 valgus tõenäoliselt PKA fosforüülib aminohappe S253. See modifikatsioon on hädavajalik E2 valgu ja kromatiini interakteerumiseks (Sekhar ja McBride, 2012). Ilma selle modifikatsioonita seostub HPV8 valk E2 peremeesraku kromatiiniga palju nõrgemini ja selle tulemusena pole ta võimeline jagama HPV genome võrdselt tütarakkudesse ning ei saa tekkida latentset infektsiooni.

1.4.7 Genoomi pakkimine ja viiruse väljumine rakust

HPV elutsükli lõpetamisel ekspresseeritakse valgud L1 ja L2. Virioni küpsemine toimub pealmise kihi keratinotsüütides, kus kaob mitokondrite oksüdatiivne fosforüülimise võime ja redutseeriv keskkond muutub oksüdeerivaks, mis võimaldab disulfiidsildade teket L1 valkude vahele (Buck et al., 2005). Selle tulemusena tekivad stabiilised ja nakkuslikud virionid. Valmis partikkel koosneb 360 L1 molekulist, mis on seatud 72 pentameerseks kapsomeeriks (Buck et al., 2008). Arvatavasti on virioni vabanemiseks oluline ka kõrge E1^{E4} valgu kontsentratsioon, mis moodustab amüloidkiude ja lõhustab keratiini (Wang et al., 2004), (Doorbar et al., 1991), (Brown et al., 2006). Virionid vabanevad koos surnud keratinotsüütidega epiteelkihi kõige pindmisest kihist.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Magistritöö eesmärgiks on leida HPV11 ja HPV18 E1 valgus olevad *in vivo* fosforüülitud aminohapped ja võrrelda nende konserveerumist teiste PVdega. Seejärel valida välja konserveerunud järjestustes paiknevad fosforüülitud aminohapped ning uurida fosforüülimise funktsiooni HPV11 ja HPV18 näitel. Viimaseks eesmärgiks on puhastada bakterist eukariootsetele rakudele iseloomulikke posttranslatsiooniliste modifikatsioonideta HPV18 E1 valk ja leida kinaasid, mis fosforüülivad olulisemaid aminohappeid E1 valgus.

Töö tegemiseks püstitati järgmised ülesanded:

1.) Leida HPV11 ja HPV18 E1 valgus *in vivo* fosforüülitud seriinid ja treoniinid kasutades varem tehtud LC-ECI-MS/MS analüüsi andmeid.

2.) Uurida fosforüülitud aminohapete konserveerumust erinevate PVde E1 valkudes ja leida enim konserveerunud fosfosaidid.

3.) Valmistada aminohapete fosforüülimise mõju uurimiseks HPV11 ja HPV18 genoomide mutantsed pisirõngad (*mc - minicircle*), kus konserveerunud fosforüülitud aminohapped E1 valgus on muudetud, kas mitte-fosforüülitavaksalaniiniks või fosforüülimist mimikeerivaks glutamaadiks või aspartaadiks.

4.) Analüüsida saadud mutantsete genoomide replikatsioonivõimet, E1 valgu taset ja paiknemist U2OS rakkudes ning võrrelda mutantseid genoome metsiktüüpi (*wt - wild type*) genoomiga.

5.) Analüüsida CK2 rolli tuvastatud seriinide fosforüleerimises uurides CK2 madalmolekulaarse inhibiitori mõju valmistatud mutantide ja *wt* HPV genoomide replikatsioonile.

6.) Valmistada konstruktsioon, millelt ekspresseeritakse bakteris HPV18 E1 valku.

7.) Puhastada HPV18 E1 valk bakterist ja leida kinaasid, mis katalüüsivad enim konserveerunud fosfosaitide fosforüülimist.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid

HPV11-E1HA *wt mc* on ~8 kbp suurune HPV11 viiruse täispikka genoomi sisaldav plasmiid. Plasmiid on väga sarnane looduses esineva HPV11 genoomiga ja transfekteerituna U2OS rakkudesse replitseerub sarnaselt *wt* HPV11-ga (Pirsoo et al., 2019). E1 lugemisraami on viidud peale 15 nukleotiidi gripiviiruse hemaglutiniini (HA) epitoobi märgist kodeeriv järjestus. Lisaks sisaldab plasmiid URR piirkonnas lühikest 36 bp pikkust fragmenti, mis on pMC.BESPX plasmiidist pärit multikloneerimissaidi ja rekombinatsiooniprotsessi tagajärjel tekkinud attR järjestuse jääkjärjestus. Plasmidi restriksioonikaart on välja toodud lisas 1.

HPV18-E1HA *wt mc* on ~8 kbp suurune HPV18 viiruse täispikka genoomi sisaldav plasmiid. Plasmiid on väga sarnane looduses esineva HPV18 genoomiga ja transfekteerituna rakkudesse replitseerub sarnaselt *wt* HPV18-ga (Pirsoo et al., 2019). E1 lugemisraami on viidud peale 15 nukleotiidi HA epitoobi märgist kodeeriv järjestus. Lisaks sisaldab URR piirkonnas sarnaselt ülalkirjeldatud plasmiidiga 36 bp pikkust lisajärjestust.

HPV18-Nluc *mc* on ~8,6 kbp suurune HPV18 viiruse täispikka genoomi sisaldav *mc*, mis sisaldab koodon-optimeeritud nanolutsiferaas (N.luc) järjestust koos FMDV viiruse ise-protsessitava peptiidiga 2A (*2A region of the foot-and-mouth disease virus (FMDV)*) (Pirsoo et al., 2019). Kõik ülalmainitud plasmiidid on pärit Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi viroloogia labori kogust.

HPV18-E1HA-N.luc *wt mc* on ~8,6 kbp suurune HPV18 viiruse täispikka genoomi sisaldav *mc*, mis sisaldab HA märgist E1 ORFis ja koodon-optimeeritud N.luc järjestust koos FMDV viiruse ise-protsessitava peptiidiga 2A. Konstrukti tegemiseks lõigati välja koodon-optimeeritud N.luc järjestus koos FMDV viiruse ise-protsessitava peptiidiga 2A HPV18-N.luc algplasmiidist kasutades restriktase HpaI ja AatII ja see kloneeriti HPV18-E1HA algplasmidi vastavate unikaalsete restriksioonisaitide vahele. Plasmidi restriksioonikaart on välja toodud lisas 2.

HPV11-E1HA S626A ja HPV11-E1HA S626D on HPV11 täispikka genoomi sisaldavad *mc*-d, kus lisaks esineb E1 ORFis HA märgist kodeeriv järjestus ja seriini (S626) kodeeriv koodon on muudetud mitte-fosforüülitavaksalaniini või fosforüleerimist mimikeerivaks aspargiinhapet kodeerivaks. Siin ja edaspidi on kogu aminohapete numeratsioon vastavalt referentsgenoomis

olevale (<https://pave.niaid.nih.gov/>). Mutantse *mc* tegemiseks kasutati PCR mutageneesi ja tabelis 2 olevaid praimerid.

Table 2. PCR mutageneesiks kasutatud praimerid, et muuta HPV11 E1 valgus S626 kodeeriv koodonalaniini või aspargiinhapet kodeerivaks. Rohelisega on märgitud koodon, mis kodeerib seriini asemelalaniini või glutamiinhapet.

Praimer	
1 Forward primer HPV11 S626A s	CTAGACATTGAGGATGCAAGAGGACGAGGAAGATG
2 Reverse primer HPV11 S626A as	CATCTTCCTCGTCCTCTGCATCCTCAATGTCTAG
3 Forward primer HPV11 S626D s	CTAGACATTGAGGATGAAAGAGGACGAGGAAGATG
4 Reverse primer HPV11 S626D as	CATCTTCCTCGTCCTCTTTCATCCTCAATGTCTAG

PCR reaktsiooniks segati kokku järgmised reagentid: 1x Pfu puhver + MgSO₄, 0,2 mM dNTP *mix*; 1 µM praimerid; 18 ng DNA mall HPV11 pMC.BESBX; 2 µl Pfu DNA polümeraas; 1 µl GC-rikkale DNAlle ettenähtud reagent; MQ 50 µl-ni. PCR-programmi esimene etapp on matriitsi DNA esialgne denatureerimine 3 minuti jooksul (95 °C). Reaktsiooni teises osas toimub 18 sünteesi tsüklit: 30 sekundit denatureerimist (95 °C), 30 sekundit praimerite seostumist (58 °C) ja 22 minutit DNA sünteesi (72 °C). Viimane samm on jahutamine temperatuurini 10 °C. Produktid analüüsiti 0,8% TAE-agaros geelil, mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,2 µl/ml, pingel 100 V. PCR produktid lõigati geelist välja ja puhastati *ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit*-iga vastavalt tootjapoolsetele juhistele ja resuspendeeriti 15 µl MQ vees. Puhastatud DNA sadestati. Selleks lisati DNA lahusele 1/10 ruumala 5 M NaCl ja 2,5 ruumala 96% etanooli. Segati vortexil, tsentrifugeeriti 4 °C juures 10 minutit. Eemaldati supernatant ja lisati 150 µl 70% etanooli. Tsentrifugeeriti (*MicriCL 21R Microcentrifuge, 24 x 1.5/2.0mL rotor*) 4 °C juures 10 minutit. Eemaldati supernatant, sade kuivatati ja suspendeeriti MQs. Puhastatud PCR produktid ligeeriti pJET1.2/*blunt* vektorisse. Vektor:sisestatav DNA suhe oli 1:5. Reaktsiooni lisati 2x T4 ligaasi puhver (*T4 DNA ligase buffer*) ja T4 DNA ligaas (Thermo Scientific). Reaktsioon toimus 16 °C juures 16 h. Plasmidi paljundamiseks transformeeriti ligeermissegu kompetentsetesse DH-5α bakterirakkudesse. pJET1.2/S626A ja pJET1.2/S626D kloneeriti HPV11-E1HA *wt* algplasmidi unikaalsete restriksioonisaitide SmaI ja SbfI vahele ja valmistati *mc-d* (ptk 2.2.3).

HPV11-E1HA-4SA ja HPV11-E1HA-4SE on HPV11 täispikka genoomi sisaldavad *mc-d* kus E1 ORFis on HA märgist kodeeriv järjestus ja 4 seriini (S89, S93, S96 ja S107) kodeerivat koodonit on muudetud mitte-fosforüülitavaksalaniini või fosforüleerimist mimikeerivaks glutamiinhapet kodeerivaks. HPV11 *wt mc* sisaldab nendes positsioonides fosforüülituid seriine. Mutantsete *mc-de* valmimiseks telliti sünteetilised DNAd (Genewiz), mis sisaldasid

vajalikke mutatsioone ülalmainitud seriine kodeerivates koodonites. DNAd kloneeriti HPV11-E1HA algplasmidi *NheI* ja *Eam1105I* unikaalsete restriksioonisaitide vahele. Kloneerimiseks lõigati HPV11-E1HA algplasmidi restriктаasidega *NheI* ja *Eam1105I*, kanti restriksioonisegud 0,8% TAE-agarosgeelile ja teostati geelelektroforees pingel 100 V. Geelist lõigati välja ~8000 bp suurune DNA ja puhastati *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* abil, DNA sadestati kasutades etanooli ja NaCl, elueeriti 20 µl MQ vees ja seejärel ligeeriti kokku geelilt lõigatud HPV11-E1HA DNA ja tellitud DNA järjestus. Ligeermiseks kasutati T4 ligaasi ja T4 10x ligaasi puhvrit. Reaktsioon toimus 16 °C juures 16 h. Ligeeritud DNA paljundati DH5-alfa bakterirakkudes ja nendest tehti *mc-d* (ptk 2.2.3).

HPV18-E1HA-N.luc 4SA ja HPV18-E1HA-N.luc 4SE on ülalkirjeldatud HPV11-E1HA-4SA ja HPV11-E1HA-4SE plasmiididega sarnase põhimõttega tehtud. E1 ORFis on HA märgist kodeeriv järjestus ja neli seriini (S93, S97, S110, S120) kodeerivat koodonit on muudetudalaniini või glutamiinhapet kodeerivaks. HPV18 genoomi kloneeriti unikaalsete restriksioonisaitide *NheI* ja *AatII* vahele firmast Genewiz tellitud järjestus, mis sisaldas vajalikke mutatsioone S93, S97, S110, S120 muutmiseksalaniinks või glutamaadiks. Lisaks kloneeriti plasmidi koodon-optimeeritud N.luc järjestus koos FMDV viiruse ise-protsessitava peptiidiga 2A. Vastav järjestus lõigati välja HPV18-N.luc algplasmiidist kasutades restriктаase *HpaI* ja *AatII* ning kloneeriti HPV18-E1HA-4SA ja HPV18-E1HA-4SE plasmiididesse vastavate saitide vahele. Valmis plasmide paljundati bakterirakkudes ja valmistati *mc-d* (ptk 2.2.3). Kõiki valmis mutantseid *mc* genoome kontrolliti restriksioonianalüüsi ja sekveneerimise teel.

HPV11 ja HPV18 E1 ekspressioonivektorid (pMHE1-11 ja -18) on E1 valku ekspresseerivad plasmiidid, milles pQM-NTag/Ai+ vektorisse on kloneeritud järjestikku paiknevad HPV11 (nukleotiidid HPV11 genoomis 102–2781) või HPV18 (nukleotiidid HPV 18 genoomis 105–2887) E6, E7 ja E1 lugemisraamid. pQM-NTag/Ai+ vektor sisaldab SV40 (*Simian viirus 40*) replikatsiooni alguskohta, polü-A järjestust, ampitsilliini resistentsusgeeni ja tsütomegaloviiruse (CMV) promootorit. E6 ja E7 ORFid on startkoodoni mutatsiooniga inaktiveeritud (Kadaja et al., 2007). Plasmiid on pärit Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi viroloogia labori kogust.

pJET1.2/blunt kloneerimisvektor (Thermo Scientific) on 2974 bp suurune PCR produktide kloneerimiseks kasutatav plasmiid, mis sisaldab mitmeid kloneerimissaite, T7 promootorit ja β-laktamaas geeni, mis tagab resistentsuse ampitsilliinile. Vektor sisaldab bakteri enesetapu geeni (*eco47IR*), mis lõhustatakse DNA järjestuse ligeerimisega plasmidi. Selle tulemusena

moodustavad kolooniaid ainult rekombinantset DNAd sisaldavad bakterirakud. See tagab suure tõenäosuse, et kõik kasvanud bakterikolooniad sisaldavad kloneeritud PCR produkti.

pGEXTEV on ~5000 bp suurune bakteriaalne ekspressioonivektor. pGEXTEV plasmiid sisaldab N-terminaalset GST (Glutatioon-S-transferaas) aafiinsusmärgist, TEV proteaasi lõikamissaiti ja lac operoni, mis koosneb lac operaatorist, tac promootorist ning lacZ reportergeeni kodeerivast järjestusest. pGEXTEV plasmidi kloneerimissaitide vahele lac operoni kontrolli alla kloneeritakse huvipakkuv valku kodeeriv järjestus. Lac operon on *E.colis* ja mitmetes teistes bakterites esinev laktoosi transpordiks ja metabolismiks oluline kolmest geenist (lacZ, lacY, lacA) koosnev operon, mis on aktiivne laktoosi või laktoosianaloogide, nt IPTG (isopropüül-β-D-tio-galaktopüranosiid), olemasolul. AmpR geen tagab ampitsilliini resistentsuse. GST on ~26 kDa suurune valk, mis konjugeerub redutseeritud glutatiooniga. See võimaldab GST märgist sisaldavat valku siduda glutatiooniga kaetud sefaroos kerakestega ja nii eraldada huvipakkuv valk teistest rakus olevatest valkudest. TEV proteaas on tubaka viirusest (TEV - *tobacco etch virus*) pärit väga spetsiifiliselt valku lagundav ~27 kDa suurune ensüüm ja seda saab kasutada aafiinsusmärgise eemaldamiseks rekombinantsetest liitvalkudest (ingl. k *fusion proteins*). Plasmiid saadi Prof. Mart Loogi (Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituut) laborist. Plasmidi restriksioonikaart on välja toodud lisa 3.

PGEXTTEV-HPV18E1HA on PGEXTEV plasmiid, kuhu BamHI ja Sall restriksioonisaitidesse tac promootori ette on kloneeritud HPV18 HA märgisega E1 valku kodeeriv järjestus. HPV18 HA-märgisega E1 valk kloneeriti PCR abil kasutades HPV18-E1HA *wt mc* genoomi mallina ja järgmiseid praimereid: 5`-GGATCCGCTGATCCCACTTACCCCTAC-3` ja 3`-GTCGACTCATAGTGGTCTATGATTTTG-5`. PCRi tegemiseks segati kokku järgnevad reagentid: 1x *Phusion* HF puhver; 0,2 mM dNTP; 1 μM mõlemad praimerid; 100 ng HPV18E1HA *wt* DNA; 1,5 μl DMSO; 0,5 μl *Phusion* DNA polümeraas, MQ 25 μl-ni. PCR-programmi esimene etapp oli matriitsi DNA esialgne denatureerimine 30 sekundit 98 °C. Reaktsiooni teises osas toimus 25 sünteesi tsüklit: 10 sekundit denatureerimist (98 °C), 15 sekundit praimerite seostumist (60 °C) ja 70 sekundit DNA sünteesi (72 °C). Viimane sünteesietapp kestis 10 minutit 72 °C juures. Seejärel jahutati segu temperatuurini 4 °C. Produktid analüüsiti 0,8% TAE-agaros geelil, mis sisaldas etiidumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,2 μl/ml pingel 100 V. PCR produktid lõigati geelist välja ja puhastati *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit*-iga vastavalt tootjapoolsetele juhistele ja resuspendeeriti 15 μl MQ vees. Puhastatud DNA sadestati ja suspendeeriti MQs. Puhastatud PCR produkt ligeeriti pJET/*blunt* 1.2 kloneerimisvektorisse ja paljundati DH5-alfa bakterirakkudes. Teises etapis kloneeriti E1HA valku kodeeriv järjestus pGEXTEV plasmidi BamHI ja Sall

unikaalsete restriksioonisaitide vahele. Kõik selle töö raames tehtud konstruktid kontrolliti restriksioonianalüüsi ja sekveneerimise abil. Sekveneerimiseks saadeti proovid Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklaborisse.

2.2.2 Rakuliinid, bakteritüved ja kasutatud söötmed

U2OS rakuliini rakud pärinevad inimese osteosarkoomist. U2OS rakkude morfoloogia sarnaneb lameepiteeli rakkude omaga ja nendes ekspresseeritakse metsiktüüpi pRb ja p53 valke, mille tõttu sobivad nad HPV replikatsiooni uurimiseks (Geimanen et al., 2011). U2OS rakkudes toimuvad esialgne genoomi amplifikatsioon ning stabiilne ja vegetatiivne replikatsioon. Mitmed uuringud on näidanud, et HPV replikatsioon ja transkriptsioon, toimuvad U2OS rakkudes sarnaselt patsientide koeproovidest analüüsitule (Sankovski et al., 2014), (Isok-Paas et al., 2015), (Geimanen et al., 2011). U2OS rakke kasvatati IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes, mis sisaldas 10% FCSi (vasika loote seerum - *fetal calf serum*) ning 1% penitsilliin-streptomütsiini (Sigma-Aldrich). Kõikides eksperimentides kasvatati rakke inkubaatoris 37 °C juures ja CO₂ sisaldusel 5%.

Escherichia coli tüvi ZYCY10P3S2T pärineb BW27783 *E.coli* tüvest ja seda kasutatakse *mc-de* tootmiseks. Bakterite genoomi on lisatud järjestusspetsiifilise rekombinaasi ΦC31 ja restriksiooniensüümi SceI kodeerivad järjestused.

DH5-alfa bakterirakud on *E.coli* rakud, mida kasutatakse plasmiidse DNA paljundamiseks. Baktereid kasvatati LB söötmes (*Lysogeny broth*). Kõik kompetentsed bakterirakud saadi Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi viroloogia laborist

BL21DE3RP bakterirakud on transformatsiooniks ja T7 RNA polümeraas-IPTG indutseeritud valkude ekspressiooniks kasutatavad *E.coli* rakud. Tüves on lambda DE3 faag, mis kannab T7 RNA polümeraasi lacUV5 promootori kontrolli all. See tagab, et T7 RNA polümeraasi ekspresseerumist indutseerib IPTG. Rakud ei sisalda proteaase Lon ja OmpT. Tänu sellele lagunevad nendes rakkudes ekspresseeritud heteroloogsed valgud vähem. Baktereid kasvatati LB söötmes. Bakteritüvi saadi Prof. Mart Loogi laborist Ervin Valgult.

2.2.3 Plasmidi paljundamine bakterites ja *mc*-de valmistamine

2.2.3.1 Pisorõngaste (*mc*) tehnoloogia

Pisorõngad on järjestusspetsiifilise rekombinatsioonimehhanismi abil toodetud plasmiidid. Nende tegemiseks kasutatakse pMC.BESPX plasmidi, mis sisaldab bakteriofaag Φ C31 integraasi äratundmisjärjestusi attB ja attP, 32 restriksiooniensüümi SceI lõikekohta, multikloneerimissaiti, bakteriaalset replikatsiooni alguskohta ColE1 ja kanamütsiini resistentsusgeeni. Pisorõngaid toodetakse *E.coli* tüve ZYCY10P3S2T rakkudes. HPV pisorõngaste tootmiseks kloneeritakse vastava HPV genoomi DNA järjestus algplasmiidis pMC.BESPX olevate attB ja attP rekombinatsioonisaitide vahele arabinoosi promotori kontrolli alla. L-arabinoosi lisamisel bakterikultuurile leiab aset bakteritüve integraasi Φ C31 vahendatud järjestusspetsiifiline rekombinatsioon. Protsessi kõrvalprodukt ehk algne pMC.BESPX vektor lagundatakse restriksiooniensüümi SceI poolt. Vältimaks pMC.BESPX-HPV konstrukti lagundamist enne rekombinatsiooni toimumist, toimub pisorõngaste tootmisprotsess 32 °C juures, mis on optimaalne temperatuur bakteriofaagi Φ C31 integraasi rekombinaaseks aktiivsuseks, kuid mitte SceI endonukleaaseks aktiivsuseks (Kay et al, 2010).

2.2.3.2 Plasmidi paljundamine

Kompetentsed bakterirakud (50 μ l) sulatati jääl. Seejärel lisati 10-100 ng DNAd. Segu inkubeeriti jää peal 30 minutit, seejärel tõsteti 3 minutiks 37 °C juurde ja siis 2 minutiks jääle. Lisati 600 μ l LB söödet ja inkubeeriti 45 minutit 37 °C juures. Viimaks plaaditi 150 μ l bakterirakke LBs ampitsilliini või kanamütsiini sisaldavale plaadile ja kasvatati 12-18 h 37 °C juures. Seejärel tõsteti üks koloonia plaadilt 3 ml LB vedelsöötmesse, mis sisaldas ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 μ g/ml või kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 μ g/ml. Baktoreid kasvatati 14-18 h, 37 °C loksutil 220 rpm juures.

Mc-de tegemiseks tõsteti 100 μ l LB vedelsöötmes kasvanud baktoreid 100 ml TB (*Terrific Broth*) söötmesse, kuhu oli lisatud kanamütsiin (50 μ g/ml). Baktoreid kasvatati 14 h loksutil (220 rpm). Hommikul lisati induktsioonisegu (100 ml LB; 4 ml 1 M NaOH; 200 μ l 20% L-arabinoos) ja kasvatati 8 h 32 °C ja 220 rpm juures loksutil. Seejärel tsentrifugeeriti (Sorvall tsentrifuug, rootor SS-34) bakterid põhja 6000 rpm juures 10 minutit. Plasmidne DNA eraldati *NucleoBondR Xtra MidiEF kiti-ga (mc-d)* või *FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit-iga* (teised plasmiidid) vastavalt tootjapoolsetele juhistele.

2.2.4 Restriktsioonianalüüs

Restriktsioonianalüüsiks kasutati *Thermo Fischer Scientific* kiiresti lõikavaid (*FastDigest*) ensüüme ja 10x puhvrit (*FastDigest Green Buffer, Thermo Scientific*). Restriktsioonisegu inkubeeriti 60 minutit 37 °C juures ja kanti 0,8% TAE-agarosgeelile, mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,2 µl/ml. Geelelektroforees teostati foreesivannis 1X TAE puhvril 1-2 h pingel 100 V.

2.2.5 Transfektsioon U2OS rakkudesse

Valmistatud mutantsete HPV genoomide replikatsiooni ja valgu tekke uurimiseks transfekkeeriti need elektroporatsiooni meetodil U2OS rakkudesse. Konfluentsed rakud 10 cm läbimõõduga tassil jagati 24 tundi enne transfektsiooni kahe tassi vahel. Rakud pesti PBSga, trüpsiiniga lahti, lisati IMDM söötmega tuubi ja tseentrifuugiti (*Eppendorf Centrifuge 5810R*, rootor A-4-62) 1000 rpm ja 20 °C juures 5 minutit. Eemaldati supernatant ja rakud suspendeeriti värskes IMDM söötmes kasutades 250 µl söödet ühe transfektsiooni kohta. Segusse lisati 50 µg *carrier* DNA ja uuritav HPV DNA. ~250 µl transfektsioonisegu pipeteeriti elektroporatsiooni küveti. Elektroporatsiooniks kasutati *Gene Pulse XCell* masinat ja poreeriti 220 V juures mahtuvusel (*capacity*) 975 µF. Poreeritud rakud pipeteeriti värskesse söötmesse, segati õrnalt ja kasvatati 1-3 päeva inkubaatoris. 24 h pärast transfektsiooni vahetati sööde. Replikatsiooni uurimiseks kasvatati rakke 6 auguga kasvuplaadil (ühe augu läbimõõt ~2 cm), ühe augu kohta kasutati 2 ml söödet. Valkude ekspressiooni uurimiseks kasvatati rakke 10 cm läbimõõduga tassil 10 ml söötmes.

2.2.6 Totaalse DNA eraldamine

Valmistatud *mc*-de replikatsiooni uurimiseks eraldati transfekkeeritud rakkudest erinevatel ajapunktidel (48, 72, 96 h peale elektroporatsiooni) totaalne DNA ja analüüsiti seda *Southern blot* meetodil. Plaadilt eemaldati sööde ja rakud pesti 2 korda PBSga. 6 auguga plaadile lisati Sol IV lahust (20 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,2% SDS) 0,5 ml ühe augu kohta. Oodati 5 minutit ning seejärel tõsteti lüsaat tuubi. Igale lüsaadile lisati proteinaas K (0,2 µg/µl). Viskoossuse vähendamiseks tõmmati lüsaat 3x läbi süstla. Seejärel inkubeeriti lüsaati 56 °C juures 18 h. Järgmisel päeval lisati 1x ruumala fenool-kloroformi segu ja segati vorteksil. Tseentrifuugiti (*Heraeus Biofuge pico, Microlitre rootor 24 x 1.5/2 ml*) 3 minutit 13000 rpm ja

vesifaas pipeteeriti puhtasse tuubi. Vesifaasile lisati 2x ruumala 96% etanooli, segati ja inkubeeriti -20 °C juures 20 minutit. Tsentrifugiti (*MicriCL 21R Microcentrifuge, 24 x 1.5/2.0mL rotor*) 4 °C ja 14 000 rpm juures 15 minutit. Supernatant eemaldati ja sade resuspendeeriti 100 µl TEs, mis sisaldas RNAasi (lõppkontsentratsioon 20 µg/ml). Inkubeeriti 1 h 37 °C juures. DNA sadestamiseks lisati DNA lahusele 1/10 ruumala 5 M NaCl ja 2,5 ruumala 96% etanooli. Segati vortexil ja inkubeeriti 20 minutit -20°C juures. Tsentrifugiti (*MicriCL 21R Microcentrifuge, 24 x 1.5/2.0mL rotor*), 4°C ja 14000 rpm juures 10 minutit. Eemaldati supernatant ja lisati 1x ruumala 70% etanooli. Tsentrifugiti 4 °C ja 14000 rpm juures 10 minutit. Eemaldati supernatant, sade kuivatati ja suspendeeriti 40 µl MQ-s.

2.2.7 Southern blot

2.2.7.1 Restriksioon

Southern bloti teostamiseks võeti 4 µg eraldatud totaalset DNAd ja lõigati seda lineariseerivate ensüümidega. HPV18 genoomidega transfekteeritud rakkudest eraldatud DNA lõigati BglI ja DpnI-ga (Thermo Scientific). HPV11 genoomidega transfekteeritud rakkudest eraldatud DNA lõigati HindIII ja DpnI-ga (Thermo Scientific). Restriksiooni toimumiseks inkubeeriti segusid 37 °C juures 1 h. DpnI restriктаasi töötlus on vajalik, et lõigata mittereplitseerunud bakteriaalse metülatsioonimärgisega DNA.

2.2.7.2 Geelelektroforees ja DNA ülekanne filtrile

Seejärel kanti lõigatud DNAd 0,8% TAE agarosgeelile, mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,2 µl/ml. Geelelektroforeesi teostati pingel 50 V 6-8 h. Seejärel loksutati geeli 45 minutit denaturatsioonilahuses SOLA (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl). Geel loputati destilleeritud veega ja siis loksutati seda 30 minutit neutralisatsioonilahuses SOLB (1 M Tris pH-7,4; 1,5 M NaCl). Lõigati välja geeli suurune nailonfilter ja 2 filterpaberi tükki. Klaasist vanni valati 1 liiter 10xSSC-d (1,5 M NaCl; 150 mM Na₃C₆H₅O₇), asetati peale klaas ja kahekordne 10xSSC-s märjatud filterpaber ning rulliti välja õhumullid. Paberi peale asetati tagurpidi geel. Geeli peale asetati nailonfilter, rulliti välja õhumullid, järgmiseks kaks filterpaberit, pakk salvrätte, klaas ja raskus. DNA ülekanne geelilt filtrile toimus ~18 h. Järgmisel päeval kuivatati nailonfilter ning teostati DNA ristseoseline sidumine filtrile UV Stratalinker 1800 aparaadiga.

2.2.7.3 Hübridisatsiooniproovide valmistamine

Hübridisatsiooniproovide mallidena kasutati BglI või HindIII restriктаasisdega lineariseeritud ja agarosgeelist puhastatud HPV18 ja HPV11 täispikki genome. Proovi valmistamiseks segati kokku 150 ng vastavat DNAd, 15 µl vett ja 5 µl 5x puhvrit/juhuslikke 10 nukleotiidiseid praimereid. Segu inkubeeriti 5 minutit 100 °C juures. Seejärel asetati segud jääle. Igasse tuubi lisati 1,5 µl Cmixi (dNTP-d v.a. dCTP); 4 µl alfa-P³²-dCTP; 0,5 µl Klenowi ensüümi. Inkubeeriti 15 minutit 37 °C juures. Seejärel lisati 2 µl dNTP mixi ja inkubeeriti 10 minutit 37 °C juures. Reaktsioon peatati 1 µl 0,5 M EDTA lisamisega. Proove inkubeeriti 10 minutit 100 °C juures ja seejärel jahutati jääl.

2.2.7.4 Hübridisatsioon

Esiteks pandi käima pre-hübridisatsioon hübridisatsiooniproovi ebaspetsiifilise seondumise vältimiseks nailonfiltrile. Selleks inkubeeriti nailonfiltrit 30 ml-s hübridisatsioonilahuses (6x SSC; 5x Denhard reagent (Thermo Scientific); 0,5% SDS; 0,1 mg/ml carrier DNA) 65 °C juures 1 tund hübridisatsiooniahjus keerlevas torus. Seejärel lisati hübridisatsiooniproovid lahusele. Hübridisatsioon toimus ~20 tundi 68 °C juures hübridisatsiooniahjus. Järgmisel päeval peatati hübridisatsioon valades filtrite pealt ära hübridisatsioonilahus ning filtreid pesti. Esmalt pesti filtreid 2x20 minutit lahus 1-ga (2xSSC; 0,1% SDS), seejärel 30 minutit lahus 2-ga (1xSSC; 0,1% SDS) ja viimaseks 2x15 minutit lahus 3-ga (0,1xSSC; 0,1% SDS). Filter eksponeeriti röntgenfilmile (AGFA) ja ilmutati.

2.2.8 Nanolutsiferaasi aktiivsuse mõõtmine

Transfekteeritud rakke kasvatati 48 ja 72 h. Seejärel eemaldati sööde ja rakud pesti 1x PBSga. N.luc aktiivsuse mõõtmiseks kasutati Promega *Nano-Glo^R Luciferase Assay* kitti. Rakud lüüsi 40 µl lüüsipuhvris (1x *Passive Lysis buffer*) ja inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril. 10 µl lüüsi lüüsi 96 auguga valgele plaadile ja lisati 20 µl 200x puhvris (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,5 mM EDTA) lahjendatud N.luc substraat. Lutsiferaasi aktiivus mõõdeti Promega GLOMAX luminomeetriga ja analüüsiti kasutades *Exceli* tarkvara. Tulemuste normaliseerimiseks mõõdeti proovides aluselise fosfataasi aktiivsust lisades 10 µl lüüsitud rakkudele 20 µl *Tropix^R CSPD^R Ready-to-Use* substraati (Thermo Fischer Scientific). Segu inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril ja seejärel tuvastati luminomeetriga aluselise fosfataasi aktiivus.

2.2.9 Immuunsadestamine (IP - immunoprecipitation)

Valmistatud mutantsete genoomide E1 valgu ekspressiooni ja lokaliseerimiseks immuunsadestati HA märgist sisaldav E1 valk vastava HPV genoomiga transfekteeritud U2OS rakkudest. Eelnevalt transfekteeritud ja 3 päeva 10 cm tassil kasvatatud U2OS rakud pesti PBSga, trüpsiniseeriti ja tseentrifuugiti (*Eppendorf Centrifuge 5810R*, rootor A-4-81) 1000 rpm juures 5 min 50 ml tuubi põhja. Rakkudele lisati 3 ml RIPA puhvrit (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA; 0,01% TritonX-100; 0,1% SDS) ja proteaasi inhibiitorid (PIC - *protease inhibitor cocktail*). Lüsaati inkubeeriti 15 minutit jääl ja seejärel homogeniseeriti süstla abil kasutades 22G läbimõõduga nõela. Lüsaadile lisati 20 µl sefaroos-proteiin-G-antikeha segu. Sefaroos-proteiin-G-antikeha segu tegemiseks pesti sefaroos-proteiin-G kerakesi 2x PBS-ga, 1x RIPA puhvriga ja viimaks resuspendeeriti sefaroos-proteiin-G 1 ml RIPA puhvrisk. Seejärel lisati segule 3 µl *rabbit-anti-HA* antikeha (Labas). Segu inkubeeriti 30 minutit õrnalt segades, seejärel lisati see lüsaatidele ning inkubeeriti 18 h 4 °C juures rootoril pööreldes (*end-over-end*). Seejärel tseentrifuugiti (*Eppendorf Centrifuge 5810R*, A-4-81 rootor) segu, 4000 rpm ja 4 °C juures 5 minutit. 10 µl supernatandist pipeteeriti puhtasse tuubi ja segati 10 µl 2x Laemmli puhvrisk (100 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% SDS; 0,2% broomfenool sinine; 20% glütserool; 200 mM DTT). Sade pesti 3x RIPA puhvriga ja suspendeeriti 20 µl 1x Laemmli puhvrisk.

2.2.10 Tuuma ja tsütoplasma valgu ekstraktide valmistamine

Tuuma ja tsütoplasma ekstrakti eraldamiseks kasutati *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kiti* (Thermo scientific) ja fraktsioneeriti vastavalt tootjapoolsetele juhistele.

2.2.11 Western blot

Enne geelile kandmist inkubeeriti proove 5 minutit 98 °C juures. Proovid kanti 8% (E1HA valk/GST-E1HA) või 12% (GAPDH/GST/lamiin B) SDS-poliakrüülamiid geelile. Elektroforees teostati 1x SDS jooksupuhvrisk (25 mM Tris, 192 mM glütsiin, 0.1% SDS) foresivannis 90 minutit voolutugevusel 20 mA ühe geeli kohta. PVDF membraan (Naxo) niisutati metanoolis ja pesti MQ ja transferpuhvriga (25 mM Tris; 192 mM glütsiin; 7% etanool). Valkude ülekandmiseks geelilt membraanile pandi geel ja membraan filterpaberite ja svammide vahele järjekorras: svamm, 2 filterpaberit, geel, membraan, 2 filterpaberit, svamm ja

kinnitati kaante vahele. Ülekanne teostati foreesivannis 1 l transferpuhvris voolutugevusel 370 mA, 110 minutit. Pärast ülekannet loksutati membraani ebaspetsiifilise antikeha seostumise vältimiseks 1 h blokeerimislahuses (5% piimapulber ja 0,1 % Tween PBSis). Seejärel loksutati membraani 1 h antikeha lahuses (antikeha; 2,5% piimapulber; 0,05% Tween, PBS) ja pesti 3x10 minutit PBS-T pesulahusega (1xPBS; 0,1% Tween). HA märgisega E1 valgu tuvastamiseks kasutati 3F10 *rabbit-anti-HA-HRP* antikeha lahjenduses 1:1500. GAPDH ja lamiini tuvastamiseks kasutati antikehi *mouse-anti-GAPDH* lahjenduses 1:5000 ja *mouse-anti-lamiin B* lahjenduses 1:350. Pärast 1 h antikehaga inkubeerimist ja membraani pesu lisati GAPDH ja lamiini membraanile sekundaarne antikeha *goat-anti-mouse-HRP* (LabAs) lahjenduses 1:10 000. Membraani loksutati 1 h antikeha lahuses ja pesti 3x10 minutit PBS-T pesulahusega. Antikehaga konjugeeritud HRP ensüümi aktiivsuse määramiseks kasutati kemiluminesentsi meetodil töötavat *SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate* või *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific) kitti vastavalt tootja protokollile. Signaalid visualiseeriti röntgenfilmile.

2.2.13 Valgu ekspresioon *E.colis*

Valgu ekspresseerimiseks transformeeriti (ptk 2.2.3) kompetentsed BL21DE3RP bakterirakud DNaga (pGEXTEV-HPV18E1HA). Baktreid kasvatati 37°C juures ampitsilliini sisaldaval LB tassil. Seejärel koguti bakterimass ja kasvatati 50 ml vedelsöötmes (LB ja ampitsilliin lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml). Kasvatati 2-4 h 37°C juures, 220 rpm. Seejärel tõsteti 10-20 ml bakterikultuuri 1 l vedelsöötmesse (1 liiter LB ja ampitsilliin lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml). Kasvatati 37 °C juures, 200 rpm kuni OD 0,5-ni. Lisati IPTG lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM ja inkubeeriti üleöö 16°C juures loksutil 200 rpm.

2.2.14 Valgu puhastamine bakterirakust

2.2.14.1 Puhastamiseks kasutatud lahused

GST LÜÜSIPUHVER

50 mM Tris-HCl, pH 7.5	2 mM DTT
300 mM NaCl	1 mg/ml lüsotsüüm
1% Triton X-100	PIC
5% glütserool	MQ

<u>GST PUHVER B</u>	<u>GST PUHVER C</u>	<u>GST PUHVER E/ELUEERIMISPUHVER</u>
50 mM Tris-HCl, pH 7.5	50 mM Tris-HCl, pH 7.5	50 mM Tris-HCl, pH 7.5
600 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
1% Triton X-100	0,1% NP-40	25 mM L-glutatioon
5% glütserool	5% glütserool	NaOH kuni pH 7.5
1 mM DTT	1 mM DTT	0,1% NP-40
MQ	MQ	5% glütserool
		1 mM DTT
		MQ

2.2.14.2 Valgu puhastamine

Üleöö kasvanud bakterid tsentrifuugiti (Sorvall, SLA-1500 rootor) 6000 rpm, 10 minutit, 4°C. Bakterimass lüüsi GST lüüsi puhvril (1 l – 30-40 ml lüüsi puhvrit). Proove inkubeeriti 30 minutit, 4°C juures pöörlemisega (*end-over-end*). Peale inkubeerimist sonikeeriti proove sonikaatoriga 55% võimsusega, 4x20 sekundit. Tsentrifuugiti (RC-5 tsentrifuug, SS-34 rootor) 40 minutit, 15 000 rpm. Tsentrifuugimise ajal pesti 400 µl GST-sefaroos kerakesi 4x 1 ml lüüsi puhvriga ja resuspendeeriti 1 ml lüüsi puhvril. 50 ml tuubis segati kokku pestud GST-sefaroos ja lüsaat. Inkubeeriti 3 h, 4°C juures pöörledes. Lüsaat sefaroos kerakestega kanti 5 ml kolonnile ja vedelik lasti kolonnist läbi joosta. Kolonni pesti 4x4 ml GST puhver B-ga. Järgmiseks pesti kolonn 4 ml GST puhver C-ga. Elueerimiseks pipeteeriti 200 µl GST puhver E-d kolonni maatriksi keskele ja oodati 5 minutit ning seejärel lasti puhvril läbi kolonni puhtasse endorfi tilkuda. Elueerimist korrati kokku 4 korda. Puhastatud valk külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80 °C juures. Valku analüüsiti 8% polüakrüülamiid geelil ja *western blot* analüüsiga (ptk 2.2.11). Valgu nähtavaks muutmiseks geelil värviti seda *PageBlue* (Thermo Scientific) värviga (1h, 22 °C) ja pesti destilleeritud veega (3x15 minutit).

2.2.15 Fosfosaitide määramine

2.2.15.1 Kinaasi katsed

Kinaasi katsed uurimaks HPV18GST-E1HA valgu fosforüleerimist teostati kasutades järgnevaid reaktsioonisegusid.

- PKA reaktsioonisegu: 1x PKA puhver (40 mM Tris, pH 7.4; 20 mM MgCl₂; 50 µM DTT); ATP (500 µM); 1 µl gamma-P³²-ATP; BSA (0,2 µg); 3 µg HPV18GST-

E1HA ja 200 ng PKA. Reaktsiooni ruumalaks oli 20 µl. PKA ensüüm saadi professor Mart Loogi laborist Rait Kivi käest. Reaktsiooni lasti toimuda 2, 5, 10, 30 ja 60 minutit. Positiivse kontrollina kasutati PKA mudelsubstraati Nth1 valku (0,2 µg reaktsiooni kohta). Nth1 valk saadi professor Mart Loogi laborist Mihkel Ördilt;

- TsükliinA, tsükliinB või tsükliinC/CDK2 reaktsioonisegu: 1x CDK puhver (150 mM NaCl; 20 mM Tris pH 7.4; 5 mM MgCl₂); ATP (500 µM); 1 µl gamma-P32-ATP ; BSA (0,2 µg); 3 µg HPV18GST-E1HA, 0,5 µg mudelsubstraati H1 ja 1 ng vastavat kinaasi. Reaktsiooni ruumalaks oli 20 µl. Kinaasid saadi professor Mart Loogi laborist Mihkel Ördilt. Reaktsioonid toimusid 40 minutit;
- CK2 reaktsioonisegu: 1x PK puhver (New England Biolabs); ATP (200 µM); 1 µl gamma-P32-ATP; 3 µg HPV18GST-E1HA ja 1 µl CK2 (0,5 µg; 500 ühikut). Reaktsiooni ruumalaks oli 20 µl. CK2 kinaas telliti *New England Biolabs* ettevõttest. Reaktsioon toimus 5, 10, 20, 40 ja 60 minutit.

Reaktsioonid peatati 2x Laemmli puhvri lisamisega. Proovid kanti 8% poliakrüülamiid geelile ja teostati elektroforees, voolutugevusel 25 mA, 70 minutit. Seejärel värviti geeli 1h *coomassiga* (0,5 g *Coomassie* sinine; 90 ml MQ; 90 ml metanool; 20 ml etaanhape), loputati 2 h loputuslahusega (90 ml MQ; 90 ml metanool; 20 ml etaanhape), kuivatati, eksponeeriti ekraanile ja analüüsiti *Phospho imager* masinaga.

2.2.15.2 Fosfosaitide määramine MS analüüsi abil

MS analüüsiks segati kokku kinaaside reaktsioonid nagu eelmises peatükis, aga ilma gamma-P32-ATPta. Lisaks tehti iga kinaasi kohta üks kontrollreaktsioon, milles segati kõik reagendid kinaasi reaktsiooniseguks v.a. kinaas. Reaktsioonid toimusid 40 minutit toatemperatuuril, pärast mida need külmutati. Reaktsioonid saadeti TÜTI proteoomika tuumiklaborisse, kus teostati MS analüüs. MS tulemuste analüüsimiseks kasutati Skyline ja Exceli tarkvara.

2.3 Tulemused

2.3.1 Fosforüülitud aminohappejäägid HPV11 ja HPV18 E1 valkudes.

Kõigepealt analüüsiti eelnevalt Alla Piirsoo jt poolt tehtud HPV18 ja HPV11 E1 LC-ECI-MS/MS eksperimendi tulemusi. Selles katses üle-ekspresseeriti 293FT rakkudes HPV11 ja HPV18 HA-märgist sisaldavat E1 valku. Valk puhastati rakkudest IP meetodil ja saadeti LC-ECI-MS/MS analüüsiks TÛTI proteoomika tuumiklaborisse. Saadud tulemuste analüüsimiseks kasutati Skyline ja Exceli tarkvara. Fosforüülituks loeti aminohapped, millede fosforüülimise tõenäosus oli suurem kui 0,5 (50%).

HPV11 valgus tuvastati kaheksa fosforüülitud aminohappejääki ja HPV18 E1 valgus tuvastati viis fosforüülitud aminohappejääki. HPV11 LC-ECI-MS/MS eksperimendil saadi 70% E1 valgu katvus ning HPV18 LC-ECI-MS/MS eksperimendi katvus oli ~50%. HPV11 E1HA valgu analüüs kattis kokku 64 seriini/treoniini, mis on ~71% kõikidest fosforüülitavatest aminohapetest. HPV18 E1HA valgus analüüsiti kokku 42 seriini/treoniini, mis on ~45% kõikidest fosforüülitavatest aminohapetest. HPV11 E1HA valgus tuvastati fosforüülitud seriinid positsioonides 60, 89, 93, 96, 104, 107, 626 ja fosforüülitud treoniin positsioonis 57. HPV18 E1 valgus tuvastati fosforüülitud seriinid positsioonides 93, 97, 110, 120 ja fosforüülitud treoniin positsioonis 94. Kokkuvõttev informatsioon LC-ECI-MS/MS eksperimendist koos fosforüülitud aminohappejääke sisaldavate peptiidide ja fosforüülitud aminohapete positsioonidega E1 valgus on esitatud tabelis 2.

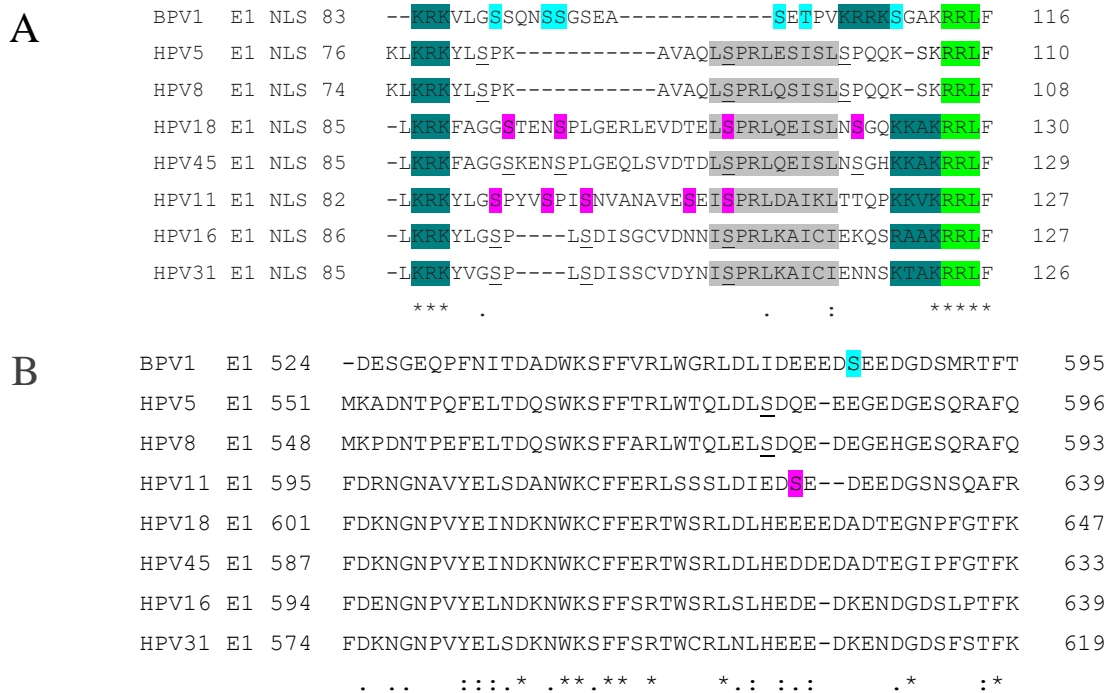
Tabel 3. HPV11 ja HPV18 E1 valgus *in vivo* fosforüülitud aminohappejäägid. Tabelis on välja toodud peptiidid, mis sisaldavad fosforüülitud treoniini/seriini. Sulgudes olev number näitab vastava aminohappejäägi fosforüülituse tõenäosust. Viimases veerus on fosforüülitud aminohappe positsioon E1 valgus.

VALK	Identifitseeritud peptiid ja S/T fosforüleerituse tõenäosus	S/T positsioon
HPV11 E1	HIT(0.554)QNS(0.446)VEAQALFNR	57
HPV11 E1	HIT(0.035)QNS(0.965)VEAQALFNR	60
HPV11 E1	YLGS(0.996)PYVS(0.005)PIS(0.018)NVANAVES(0.573)EIS(0.409)PR	89,104.
HPV11 E1	YLGS(0.021)PYVS(0.165)PIS(0.814)NVANAVES(0.003)EIS(0.997)PR	96,107.
HPV11 E1	KYLGS(1)PYVS(0.951)PIS(0.049)NVANAVESEIS(1)PR	89, 93, 107
HPV11 E1	KYLGS(0.065)PYVS(0.254)PIS(0.682)NVANAVESEISPR	96
HPV11 E1	LSSSLDIEDS(1)EDEEDGSNSQAFR	626

HPV18 E1	FAGGS(0.046)T(0.732)ENS(0.222)PLGER	94
HPV18 E1	FAGGS(0.937)T(0.063)ENS(1)PLGER	93,97
HPV18 E1	FAGGS(0.508)T(0.508)ENS(0.984)PLGER	93, 94, 97
HPV18 E1	LEVDTELS(1)PR	110
HPV18 E1	LQEISLNS(1)GQK	120

2.3.2 Erinevate papilloomiviiruste E1 valgu aminohappeliste järjestuste võrdlemine

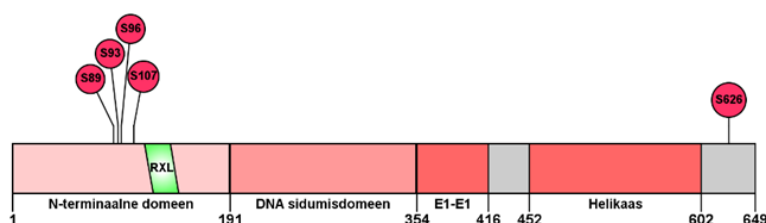
Järgmiseks kasutati Clustal Omega tarkvara erinevate PVde E1 valgu aminohappeliste järjestuste joondamiseks. Võrreldi fosfosaite sisaldavaid piirkondi teiste PVdega. Analüüs näitas, et väga konserveerunud on PVde E1 valgu N-terminaalne osa, kus asuvad 4 fosforüülitud seriini, mis leiti LC-ECI-MS/MS analüüsis nii HPV11-s kui HPV18-s. Selles piirkonnas asuvad ka NES, NLS ja RXL motiiv (Bergvall et al., 2013). Osades PVdes on C-terminaalse domeeni otsas HPV11 S626-ga sarnases positsioonis üksik seriin. BPV1 E1 valgus paikneb sarnases järjestuses CK1/CK2 poolt fosforüülitud seriin (S584) (Lentz, 2002). Selles analüüsis tuvastatud fosforüülitud seriine sisaldavate piirkondade joondamine kaheksa teise PVga on kujutatud joonisel 4



Joonis 4. Eelnevalt tehtud LC-ECI-MS/MS eksperimendis tuvastatud E1 valgus fosforüülitud seriine sisaldavate järjestuste võrdlemine teiste PVde E1 valkude järjestustega. Joonise A paneel näitab N-terminaalses domeenis HPV11 ja HPV18 E1 valgus fosforüülitud seriine sisaldavate järjestuste võrdlemist. Joonise B paneel võrdleb C-terminaalses domeenis paiknevat piirkonda, milles leiti, et HPV11 E1 valgus fosforüülitud S626. Katseliselt

tuvastatud fosforüülitud seriinid on märgitud joonisel lillaga. Sinisega on märgitud aminohapped, mis on leitud olevat fosforüülitud BPV E1 valgus selles piirkonnas (Lentz et al., 2006). Aminohapped, mis võivad olla fosforüülitud on alla joonitud. Neli fosforüülitud seriini HPV11 ja HPV18 E1 valgu N-terminaalses domeenis asuvad tugevalt konserveerunud piirkonnas. Selles piirkonnas asuvad ka enamuse PVde kahest osast koosnev NLS (joonisel märgitud tumerohelise) ja tsükliinE/CDK2 sidumismotiiv RXL (joonisel märgitud rohelisega). Osadel PVdel asub selles piirkonnas ka NES järjestus (joonisel märgitud halliga). C-terminaalse domeeni osa, kus leiti HPV11 E1 valgus fosforüülitud S626, sisaldab ka mitut tugevalt konserveerunud piirkonda. Tärnid tähistavad tugevalt konserveerunud aminohappeid, kus sama aminohape asub sellises positsioonis kõigil kaheksal joondamiseks kasutatud PVde E1 valgus. Punktid tähistavad nõrgemini konserveerunud aminohappeid, milles sama aminohape asub selles positsioonis osadel joondamiseks kasutatud PVdel.

Mitmed selles eksperimendis tuvastatud seriinid asuvad sarnastes positsioonides ka paljudes teistes PVde tüüpides ja võivad olla fosforüülitud. Seetõttu otsustati edasi uurida, mis võiks olla selle modifikatsiooni funktsioon. Enim konserveerunud fosforüülitud seriinide paiknemine E1 valgus HPV11 näitel on näha joonisel 5.



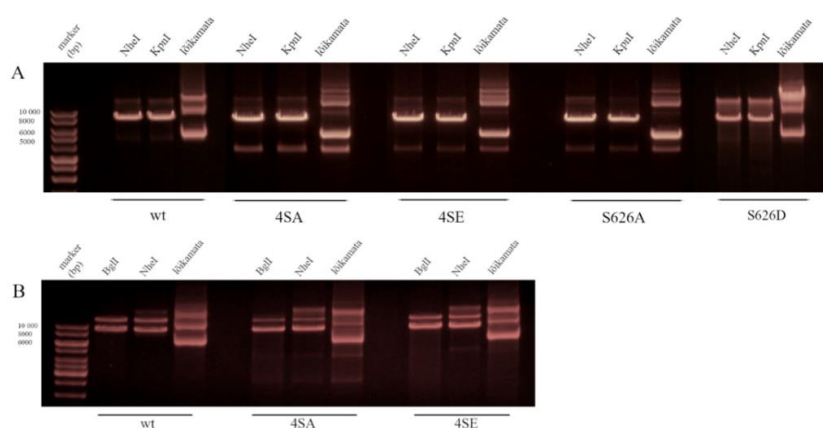
Joonis 5. Enim konserveerunud fosforüülitud seriinid HPV11 E1 valgus. E1 valgus koosneb kolmest domeenist: N-terminaalne domeen, DNA sidumisdomeen ja C-terminaalne domeen. C-terminaalne domeen koosneb E1-E1 interaktsioonimultimeriseerumise domeenist, mis on vajalik E1 valgudest koosneva heksameeri tekkeks ning helikaasest osast, mis on ensümaatilisel aktiivne ja ATP abil “sulatab” lahti kaheaheelalise DNA. RXL on N-terminaalses domeenis paiknev tsükliinE/CDK2 sidumismotiiv, mis on oluline valgu tuuma-tsütoplasma transpordil (Deng et al., 2004), (Fradet-Turcotte et al., 2010). Neli HPV11 ja HPV18 E1 valgus tuvastatud fosforüülitud seriini asuvad N-terminaalses domeenis tugevalt konserveerunud RXL motiivi ees. HPV11 E1 valgu C-terminaalses domeenis tuvastati üksik fosforüülitud seriin S626, mis asub ka üsna konserveerunud piirkonnas.

2.3.3 HPV11 ja HPV 18 mutantsete *minicircle*te valmistamine.

Eelnevas peatükis tuvastatud fosfosaitide funktsiooni uurimiseks valmistati mutantsed pisirõngad, kus vastavad fosforüülitud aminohapped on muudetud, kas mitte-fosforüülitavaksalaniiniks või fosforüleerimist mimikeerivaks glutamaadiks või aspartaadiks. HPV11 *mc-s* muudeti S89, S93, S96 ja S107alaniiniks ja glutamaadiks (HPV11-E1HA 4SA ja HPV11-E1HA 4SE mutandid). HPV18 markergenoomid sisaldavad N.luc-i ja E1 valgus S93, S97, S110 ja S120 on muudetudalaniiniks ja glutamaadiks (HPV18-E1HA-N.luc 4SA ja HPV11-E1HA-N.luc 4SE mutandid). Nende valmistamiseks konstrueeriti DNA järjestus, telliti valmistatud järjestus firmast Genewiz ja kloneeriti see HPV11-E1HA või HPV18-E1HA *wt* genoomi. HPV18 markergenoomidesse kloneeriti ka N.luc järjestus koos FMDV peptiidiga 2A. PCR

mutageneesi kasutades valmistati HPV11 *mc*, milles S626 muudetialaniiniks ja aspartaadiks (HPV11-E1HA S626A ja HPV11-E1HA S626D mutandid). Mutantseid pisirõngaid paljundati *E.coli* tüves ZYCY10P3S2T ning bakterist puhastatud plasmide analüüsiti restriksioonanalüüsi ja sekveneerimise teel.

Valmis HPV11 markergenome lõigati ensüümidega NheI ja KpnI ning HPV18 markergenome lõigati ensüümidega NheI ja BglI. Lõigatud genome analüüsiti agaros geelil. NheI restriksioonisaite kasutati HA märgise genome viimiseks ja see lõikab plasmidi üks kord E1 ORFis paikneva HA märgise juurest. KpnI lõikab HPV11 markergenome üks kord nukleotiidi 4803 juurest lineariseerides plasmidi. BglI lõikab HPV18 markergenome üks kord nukleotiidi 8340 juurest lineariseerides plasmidi. Võrdluseks kasutati HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc *wt mc* genome. HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc *wt* ja mutantsete genome restriksioonanalüüsi tulemused on näidatud joonisel 6. Kõik valmistatud mutantsed genome lõikusid sarnaselt HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc vastava *wt mc* genomile. HPV11-E1HA *mc* genome on ~8000 bp suurus. HPV18-E1HA-N.luc *wt mc* genome on ~8600 bp suurus. Sellest kõrgemal on näha ~12 000 või ~12600 bp suurused algplasmidid, mis näitas, et homologne rekombinatsioon *mc* valmistamisel ei olnud täielik. Kuna aga algplasmid ei replitseeru eukariootses rakus, ei mõjuta see edasisi analüüse. HPV11 markergenome 4SA, 4SE ja S626A mutantsetel genome oli lineariseeritud plasmidist allpool näha denatureerunud DNAd.



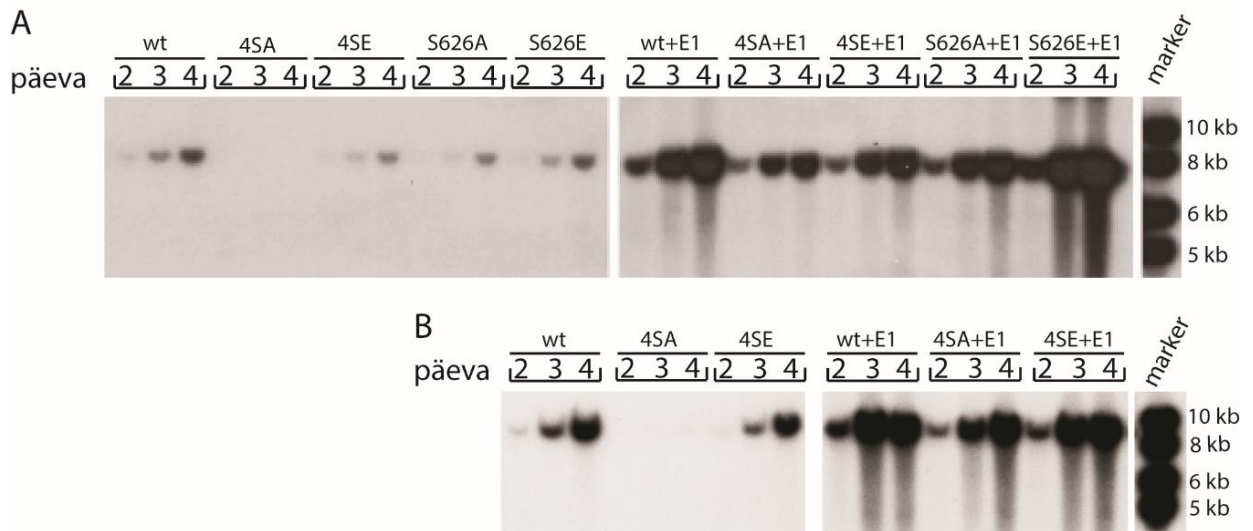
Joonis 6. HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc *wt* ja valmistatud mutantide restriksioonanalüüs. 4SA ja 4SE mutantsetel genome on HPV11 ja HPV18 E1 valgus nelja lähestikku paiknevat *in vivo* fosforüülitud seriini kodeeriv koodon muudetudalaniini või glutamiinhapet kodeerivaks. S626A ja S626D mutantsetes genome on vastavas positsioonis seriin kodeeriv koodon muteeritudalaniini või aspargiinhapet kodeerivaks. A paneelil on HPV11-E1HA *wt* ja valmistatud mutantsed *mc*-d. B paneelil on HPV18-E1HA-N.luc *wt* ja valmistatud mutantsed *mc*-d. Geelile kanti NheI, KpnI või BglI-ga lõigatud ning lõikamata genomeid ja teostati geelelektroforees. Kõik valmistatud mutantsed genome on ~8000 või ~8600 bp suurused ja lõikuvad sarnaselt *wt mc* genomile. NheI ja KpnI lineariseerivad plasmidi.

2.3.5 Mutantsete HPV11 ja -18 genoomide replikatsioonivõime analüüs

Kõigepealt uuriti, kas valitud seriinide fosforüülimine HPV11 ja HPV18 E1 valgus mõjutab viiruse genoomi replikatsioonivõimet. 0,6 µg HPV11-E1HA *wt* ja mutantseid genoome ning 1 µg HPV18-E1HA-N.luc *wt* ja mutantseid genoome transfekteeriti 10^6 U2OS rakkudesse elektroporatsiooni meetodil. Iga genoomiga transfekteeritud rakud jagati 3 augu vahel 6 *well*isel plaadil. 48, 72 ja 96 h peale transfektsiooni eraldati rakkudest totaalne DNA ja teostati *Southern blot* analüüs. Kontrolliks tehti kotransfektsioon, mille käigus koos muteeritud ja *wt* HPV genoomidega transfekteeriti rakkudesse 50 ng mutatsioonideta HPV11 või HPV18 E1 valgu ekspressioonivektorit.

HPV11E1-HA ja HPV18E1-HA-N.luc *wt* ja mutantsete genoomide replikatsiooni *Southern blot* analüüsi tulemused on joonisel 7. Tulemustest selgus, et HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc mutantsed *mc-d* replitseerusid sarnaselt, millest võis oletada, et konserveerunud järjestuses olevate aminohapete fosforüülimisel oli sama funktsioon erinevates HPV tüüpides. HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc 4SE mutandid replitseerusid peaaegu nagu *wt* genoomid. Nii HPV11-E1HA kui ka HPV18-E1HA-N.luc 4SA mutantsete genoomide replikatsioonivõime oli väike ja *Southern blot* analüüsis polnud 4SA mutantide DNAd näha. Nendest tulemustest järeldus, et efektiivseks replikatsiooniks oli oluline, et HPV11 genoomis oleksid fosforüülitud kas kõik või mõned seriini jäägid positsioonides S89, S93, S96 või S107 ning HPV18 genoomis S94, S97, S110 või S120. HPV11-E1HA S626A ja S626D mõlemad mutantsed genoomid replitseerusid natukene nõrgemini kui *wt* genoom. Kuna erinevus *wt* ja mõlema S626 mutandi genoomi replikatsioonil oli väike, siis võibolla ei olnud see fenotüüp seotud fosforüülimisega ja natukene nõrgem replikatsioon tulenes mutatsiooni tekitamisest.

E1 valgu ekspressioonivektori ja mutantse genoomi olemasolul rakus toimusid kõigi mutantide ja *wt* genoomi replikatsioonid sama efektiivselt. E1 valgu ekspressioonivektor võimendas replikatsiooni, mis viitab, et HPV replikatsioonivõime sõltus E1 valgu kontsentratsioonist rakus. Üldiselt võis järeldada, et 4SE mutantsete genoomide natuke nõrgem replikatsioonivõime ja 4SA mutantsete genoomide väga väike replikatsioonivõime oli põhjustatud mutatsioonide sisseviimisest ja kõik genoomid olid replikatsioonivõimelised mutatsioonideta E1 valgu olemasolul rakus.

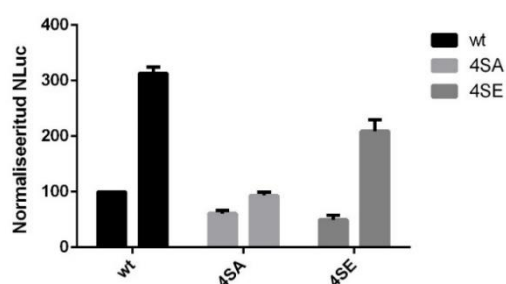


Joonis 7. HPV11-E1HA wt, 4SA, 4SE, S626A ja S626D ning HPV18-E1HA-n.luc wt, 4SA ja 4SE genoomide replikatsioon U2OS rakkudes 2, 3 ja 4 päeva peale transfektsiooni. Joonise A paneelil on HPV11-E1HA wt ja mutantsete genoomide DNA autoradiograafia signaalid. Joonise B paneelil on HPV18-E1HA-n.luc wt ja mutantsete genoomide DNA autoradiograafia signaalid. 4SA ja 4SE mutantsetel genoomidel on HPV11 ja HPV18 E1 valgus nelja lähestikku paiknevat *in vivo* fosforüülitud seriini kodeeriv koodon muudetudalaniini või glutamiinhapet kodeerivaks. S626A ja S626D mutantsetes genoomides on vastavas positsioonis seriin kodeeriv koodon muteeritudalaniini või aspargiinhapet kodeerivaks. 4SA mutantse genoomi DNAd ei ole võimalik *Southern blot* analüüsiga tuvastada ehk replikatsiooni efektiivsus on palju madalam kui teistel genoomidel. 4SE mutante genoom replitseerub sarnaselt wt genoomiga. HPV11 mutantsete markergenoomide S626A ja S626D replikatsioonivõime on natuke nõrgem, aga üsna sarnane wt genoomi replikatsiooniga. Kui kotransfekteerida koos vastava HPV genoomiga ka mutatsioonideta E1 ekspressioonivektor, siis on wt ja kõik mutantsete genoomid replikatsioonivõimelised.

2.3.6 Kaseiin kinaas 2 ja tema inhibiitori mõju mutantsete HPV11 ja -18 genoomide replikatsioonivõimele

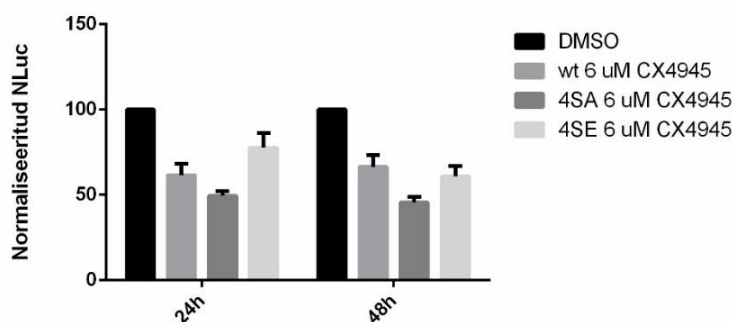
Meie töögrupis oli eelnevalt tehtud uuringuid, mis näitasid, et CK2 inhibiitor CX4945 inhibeerib mitmete HPV tüüpide replikatsiooni. Sellest lähtuvalt otsustati uurida, kas CX4945 mõjutab valmistatud mutantsete *mc*-de replikatsioonile erinevalt. Kuna 4SE mutandid sisaldavad fosforüülimist mimikeerivaid asendusi, siis neid fosforüüliva kinaasi inhibeerimine või lisamine ei tohiks mõjutada mutantse genoomide replikatsioonivõimet. Sellest saaks järeldada, kas CK2 on oluline vaadeldavate seriinide fosforüülimisel. CX4945 mõju uurimiseks kasutati HPV18-E1HA-N.luc genoomi ja teostati lutsiferaasi katse. Selleks transfekteeeriti U2OS rakke HPV18-E1HA-N.luc wt, 4SA ja 4SE markergenoomidega ja 24 h peale transfektsiooni lisati rakkudele DMSO või CX4945 lõppkontsentratsioonis 6 μ M. CX4945 on lahjendatud DMSOs ja sellepärast kasutati seda kontrollina. 24 ja 48 h peale DMSO ja inhibiitori lisamist lüüsi rakud ja mõõdeti luminomeetriga lutsiferaasi aktiivsus. Eelnevalt meie laboris tehtud katsed on näidanud, et N.luc aktiivsuse määr on lineaarses sõltuvuses

genoomi replikatsiooni efektiivsusega (Pirsoo et al., 2019). Sooviti leida, kas ja kui palju HPV *wt* genoomi replikatsioonivõime CK2 α inhibiitori juurseolekul erineb 4SA ja 4SE mutantsete genoomide replikatsioonivõimest. Tulemuste normaliseerimiseks mõõdeti aluselise fosfataasi aktiivsust. HPV18-E1HA-N.luc genoomiga transfekteeritud ja 48 h inkubeeritud proov võeti kontrolliks ehk 100%-ks ning teised andmed olid arvatud vastavalt kontrollile. Lutsiferaasi katse tulemused on esitatud joonistel 8 ja 9. Joonisel 8 on võrreldud *wt*, 4SA ja 4SE genoomi replikatsioonivõimet. 4SE genoomi replikatsioonivõime 24 h peale DMSO lisamist oli ~3x nõrgem kui *wt*, aga 48 h peale DMSO lisamist oli ainult 1,5x nõrgem *wt* genoomi replikatsioonivõimest. 4SA genoomi replikatsioonivõime oli 24 h peale DMSO lisamist ~1,6x ja 48 h ajapunktil ~3x väiksem *wt* genoomi omast.



Joonis 8. HPV18-E1HA-N.luc *wt*, 4SA ja 4SE genoomide replikatsioonivõime U2OS rakkudes 48 ja 72 h peale transfektsiooni DMSO juuresolekul. 4SA ja 4SE mutantsetel genoomidel E1 valgus nelja lähestikku paiknevat *in vivo* fosforüülitatud seriini kodeeriv koodon muudetudalaniini või glutamiinhapet kodeerivaks. 4SE genoomi replikatsioonivõime 48 h peale transfektsiooni on ~3x madalam ja 72 h peale transfektsiooni on ~1,5x madalam kui *wt* genoomil vastavatel ajapunktidel. 4SA genoomi replikatsioonivõime on 48 h ajapunktis ~1,6x ja 72 h ajapunktis ~3x madalam *wt* genoomi replikatsioonivõimest. Andmed on esitatud kolme korduse normaliseeritud keskmiste väärtustena +/- SD (n=3).

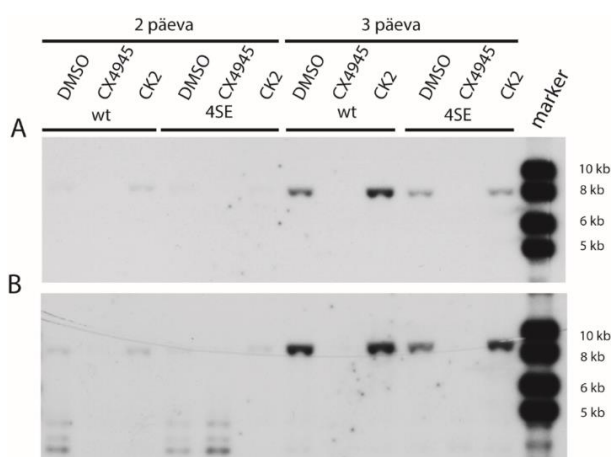
Joonisel 9 on võrreldud CX4945 mõju HPV18-E1HA-N.luc *wt*, 4SA ja 4SE genoomide replikatsioonivõimele. 6 μ M CX4945 inhibeeris nii *wt* kui ka mutantsete markergenoomide replikatsioonivõimet. Kõige enam mõjutas CX4945 4SA genoomi replikatsiooni. Inhibiitori mõju *wt* ja 4SE genoomi replikatsioonile oli mõlemas ajapunktis üsna sarnane.



Joonis 9. CX4945 mõju HPV18-E1HA-N.luc *wt*, 4SA ja 4SE genoomide replikatsioonivõimele. 100% replikatsioonivõimeks võeti *wt*, 4SA ja 4SE genoomid DMSO juuresoleku. 4SA ja 4SE mutantsetel genoomidel on E1 valgus nelja lähestikku paiknevat *in vivo* fosforüülitatud seriini kodeeriv koodon muudetudalaniini või

glutamiinhapet kodeerivaks. CX4945 inhibeerib nii *wt* kui mutantsete genoomide replikatsioonivõimet. *Wt* genoomi replikatsioonivõime DMSO kontrolli suhtes CX4945 juuresolekul on 24 h peale DMSO/CX4945 lisamist ~62% ja 48 h peale DMSO/CX4945 lisamist ~66%. 4SA genoomi replikatsioonivõime DMSO suhtes on 24 h peale DMSO/CX4945 lisamist ~50% ja 48 h peale DMSO/CX4945 lisamist ~46%. 4SE genoomi replikatsioonivõime DMSO suhtes on 24 h peale DMSO/CX4945 lisamist ~77% ja 48 h peale DMSO/CX4945 lisamist ~61%. Kõige enam mõjutab CX4945 4SA genoomi replikatsiooni. *Wt* ja 4SE genoomid replitseeruvad inhibiitori juuresolekul üsna sarnaselt.

Tulemuste kinnitamiseks tehti lisaanalüüs, milles transfekteriti U2OS rakke 200 ng pCMV vektori ja 200 ng HPV11-E1HA või 300 ng HPV18-E1HA-N.luc *wt* ja 4SE genoomidega. Mõndadele transfekteritud rakkudest lisati järgmisel päeval CX4945 lõppkontsentratsioonis 6 μ M. Tehti ka üks kotransfektsioon, kus koos HPV genoomidega transfekteriti rakkudesse 200 ng CK2 α (CSNKA1) ekspressioonivektorit. 48 ja 72 h peale transfekterimist eraldati rakkudest totaalne DNA ja teostati *Southern blot* analüüs. HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc analüüsi tulemused on näha joonisel 10. Tulemustest selgus, et CX4945 inhibeeris replikatsiooni nii HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc *wt* kui 4SE genoomide puhul, aga nähtavat erinevust nende vahel ei olnud. CK2 α lisamine ei mõjutanud või muutis replikatsiooni toimumise aktiivsust natuke suuremaks. Nendest tulemustest võis järeldada, et tõenäoliselt ei olnud CK2 α oluline HPV11 S89, S93, S96 ja S107 ning HPV18 S93, S97, S110 ja S120 fosforüülimisel ega olnud põhjus, miks HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc 4SA genoomid replitseerusid nõrgemini. Kuna CX4945 inhibeeriv mõju mitmete HPV tüüpide replikatsioonile läbi E1 valgu on varasemalt näidatud, võib oletada, et HPV11 ja HPV18 E1 valgus on veel fosforüülitavaid aminohappeid, millede fosforüülimine on oluline modifikatsioon, mis reguleerib replikatsiooni toimumist, aga mida ei tuvastatud selles LC-ECI-MS/MS eksperimendis piiratud E1 valkude kattuvuse tõttu.



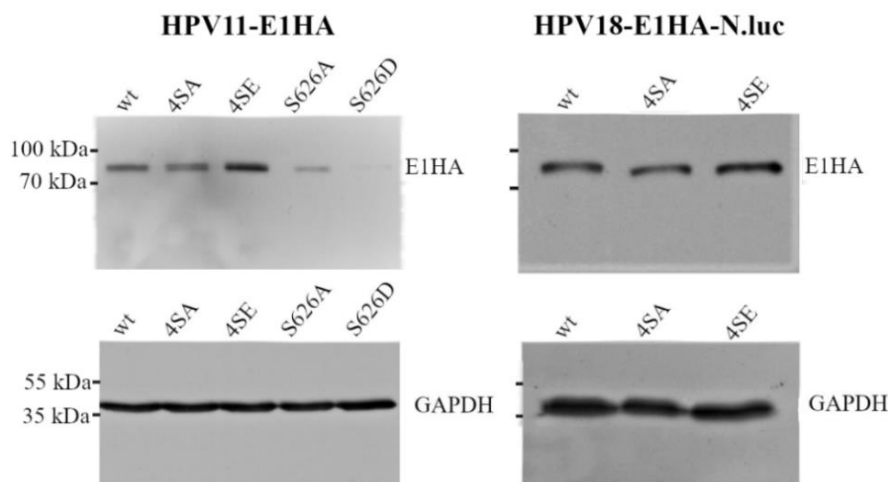
Joonis 10. Joonise A paneelil on HPV11-E1HA *wt* ja 4SE markergenoomi ja joonise B paneelil HPV18-E1HA-N.luc *wt* ja 4SE markergenoomi replikatsioon CK2 inhibiitori (CX4945) ja CK2 juuresolekul. 4SE mutantsetel markergenoomidel on E1 valgus nelja lähistikku paiknevat *in vivo* fosforüülitatud seriini kodeeriv koodon muudetud glutamiinhapet kodeerivaks. Kontrolliks kasutati DMSOt. CK2 inhibiitori CX4945 lisamisel ei ole replikatsioon *Southern blot* analüüsiga tuvastatav ei *wt* ega 4SE genoomil. CK2 lisamine kas natuke suurendab või ei mõjuta *wt* ja 4SE genoomi replikatsioonivõimet.

2.3.7 Mutantsete HPV11 ja -18 genoomidelt kodeeritavate E1 valkude analüüs

2.3.7.1 Mutantsete HPV11 ja -18 genoomidelt kodeeritavate E1 valkude tase rakus

Järgmiseks vaadeldi, kas nelja seriini fosforüülimine mõjutab E1 valgu taset U2OS rakkudes. Selleks transfecteeriti 10^6 U2OS rakkudesse 1500 ng HPV11-E1HA ja 2000 ng HPV18-E1HA-N.luc wt, 4SA ja 4SE genoomid. Valgu taset vaadeldi ka HPV11-E1HA S626A ja S626D genoomidega transfecteeritud rakkudes. Kolm päeva pärast transfectsiooni lüüsi rakud, immuunsadestati valk kasutades HA-märgist ära tundvat antikeha ja sefaroosi ning teostati *western blot* analüüs kasutades anti-HA-HRP antikeha. Kontrolliks analüüsiti ka GAPDH valgu olemasolu, mis näitab, kas kõikides proovides oli ligikaudu sama kogus valku. HPV11-E1HA wt, 4SA, 4SE, S626A ja S626D ning HPV18-E1HA-N.luc wt, 4SA ja 4SE E1 ja GAPDH valkude tasemed 72 h pärast transfectsiooni on näha joonisel 11.

Tulemustest selgus, et kõik proovid sisaldasid ligikaudu samas hulgas GAPDH valku (joonis 11, alumised paneelid). Nii HPV11-E1HA kui ka HPV18-E1HA-N.luc wt, 4SA ja 4SE genoomide mutantide korral ekspresseerus E1 valku sama palju. HPV11-E1HA S626A ja S626D mutantsetest genoomidest E1 valgu tase oli väiksem, mis võis olla põhjus, miks need genoomid replitseerusid natuke halvemini kui wt genoom (joonis 7).

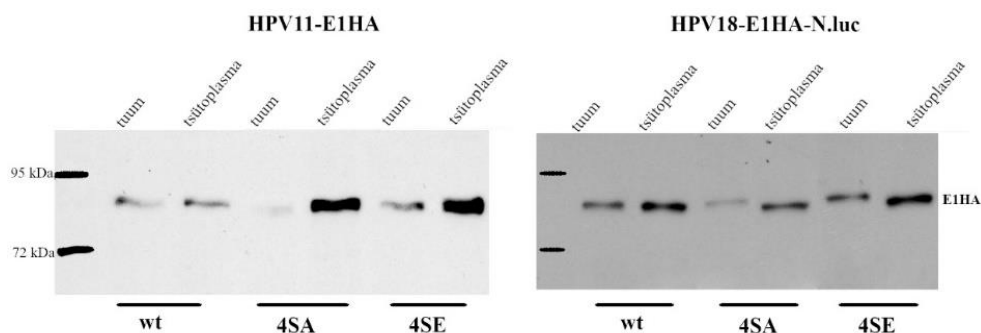


Joonis 11. HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc wt ja mutantsete E1 ja GAPDH valkude tase U2OS rakkudes 72 h peale transfectsiooni. 4SA ja 4SE mutantsetel genoomidel on HPV11 ja HPV18 E1 valgus nelja lähestikku paiknevat *in vivo* fosforüülitud seriini kodeeriv koodon muudetudalaniini või glutamiinhapet kodeerivaks. S626A ja S626D mutantsetes genoomides on vastavas positsioonis fosforüülitud seriin kodeeriv koodon muteeritudalaniini või aspargiinhapet kodeerivaks. E1 ja GAPDH valkude ekspressiooni analüüsiti *western blot* meetodil ja selleks kasutati anti-HA-HRP ja anti-GAPDH antikehasid. Mõlema HPV wt, 4SA ja 4SE genoomi transfectsiooni korral on E1 ja GAPDH tasemed rakus ligikaudu samad. HPV11-E1HA S626A ja S626D E1 valkude tase peale transfectsiooni on madalam kui wt genoomil.

2.3.7.1 Mutantsete HPV11 ja -18 genoomidelt kodeeritavate E1 valkude paiknemine rakus.

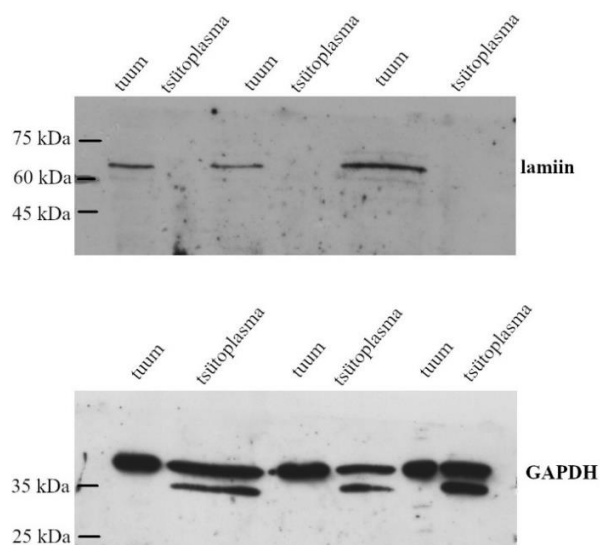
Järgmiseks vaadeldi E1 valgu lokalisatsiooni U2OS rakkudes. ~10⁶ U2OS rakke transfecteeriti 1500 ng HPV11-E1HA ja 2000 ng HPV18-E1HA-N.luc *wt*, 4SA ja 4SE genoomidega. Kolme päeva pärast rakud lüüsi, fraktsioneeriti tuuma ja tsütoplasma ekstraktideks, immuunosadestati E1 valk ja analüüsiti *western blot* analüüsiga kasutades anti-HA-HRP antikeha. Fraktsioneerimise kontrolliks analüüsiti ka lamiini ja GAPDH valgu olemasolu. Lamiin asub rakutuumas ja GAPDH peamiselt tsütoplasmas.

E1 valgu *western blot* analüüsi tulemused on kujutatud joonisel 12. Analüüsi tulemustest selgus, et HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc *wt* genoomidega transfecteeritud rakkudes leidis E1 valku tuumas ja tsütoplasmas peaaegu võrdselt või oli natuke rohkem valku tsütoplasmas. HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc 4SA mutantse genoomiga transfecteeritud rakkudes leidis E1 valku palju rohkem tsütoplasmas ja väikses hulgas tuumas. 4SE genoomide puhul olid E1 valgu tasemed *wt* ja 4SA genoomidega võrreldes vahepeal: tuuma E1 valgu tase oli sarnane *wt* genoomide E1 tasemega, aga märgatavalt suurem kui 4SA genoomide E1 valgu tase tuumas. 4SE genoomidelt kodeeritud E1 valku leidis tsütoplasmas rohkem kui tuumas.



Joonis 12. HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc *wt*, 4SA ja 4SE E1 valgu paiknemine U2OS rakkudes. 4SA ja 4SE mutantsetel genoomidel on HPV11 ja HPV18 E1 valgus nelja lähestikku paiknevat *in vivo* fosforüülitud seriini kodeeriv koodon muudetudalaniini või glutamiinhapet kodeerivaks. 72 h peale transfectiooni eraldati rakkudest tuuma ja tsütoplasma ekstraktid ning teostati *western blot* analüüs. Nii HPV11 kui ka HPV18 korral leidis *wt* ja 4SE E1 valku tsütoplasmas ja tuumas peaaegu võrdselt või natuke rohkem valku tsütoplasmas. 4SA mutantsetel genoomidelt kodeeritud E1 valku paikneb tuumas vähem kui *wt* ja 4SE mutantset E1 valku.

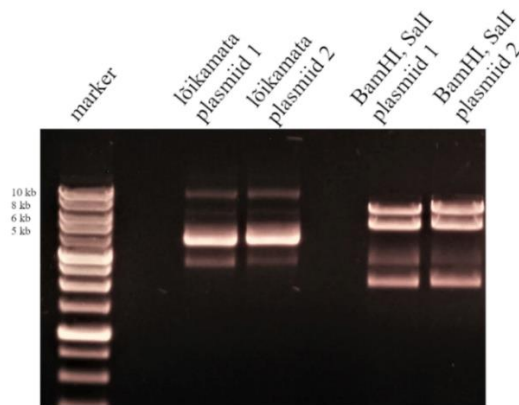
Kontrollkatse tulemused on esitatud joonisel 13. Kontrollkatse tulemustest on näha, et lamiin paiknes ainult tuumas. GAPDH-i detekteeriti tsütoplasmas ja tuumas. Tsütoplasma fraktsioon sisaldas GAPDH rohkem erinevate vormide ekspressiooni tõttu. Järelikult eraldati fraktsioneerimise tulemusena edukalt raku tuuma ja tsütoplasma ekstraktid. Tulemustest võis järeldada, et HPV11 S89, S93, S96 ja S107 ning HPV18 S93, S97, S110 ja S120 fosforüülimine oli oluline modifikatsioon E1 valgu tuuma-tcütoplasma transpordil.



Joonis 13. Lamiin ja GAPDH tasemed HPV11-E1HA ja HPV18-E1HA-N.luc *wt*, 4SA ja 4SE genoomidega transfekteeritud U2OS rakkudest eraldatud tuuma ja tsütoplasma ekstraktides. Lamiin ja GAPDH analüüsiti kasutades *western blot* meetodit. Lamiin on ligikaudu ~70 kDa suurune valk ja paikneb tuumas. GAPDH on ~37 kDa suurune valk ja teda leidub nii tuumas kui tsütoplasmas, aga tsütoplasmas on GAPDH rohkem.

2.3.9 HPV18 HA märgisega E1 valku ekspresseeriva plasmiiidi konstrueerimine

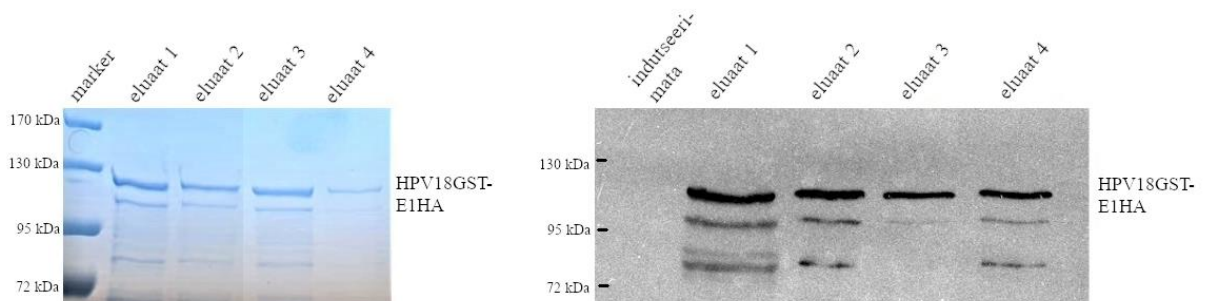
Plasmiiidi konstrueerimiseks paljundati PCR abil E1HA DNA järjestus HPV18-E1HA *wt mc-lt*. Paljundatud DNA järjestus ligeeriti pJET/*blunt* 1.2 klonereimisvektroisse, paljundati bakteris ja eraldati plasmiidne DNA. Seejärel lõigati pGEXTEV plasmiiidi ensüümidega BamHI ja SalI ja pJET1.2/E1HA plasmiidist lõigati välja E1HA valku kodeeriv järjestus kasutades samu ensüüme. Lõigatud DNA puhastati geelist ja ligeeriti kokku, paljundati bakteris ja eraldati plasmiidne DNA. Valmis pGEXTEV-HPV18E1HA plasmiiide kontrolliti restriksioonianalüüsi ja sekveneerimise teel. Restriksioonianalüüsiks lõigati kahte valmis plasmiiidi ensüümidega BamHI ja SalI. Geelile kanti ~7000 bp suurused lõikamata plasmiiidid ja kahe ensüümiga lõigatud DNAd. BamHI ja SalI lõikamise tulemusena lõikub plasmiidist välja ~2000 bp suurune HA-märgist sisaldav E1 valku kodeeriv DNA ja ~5000 bp suurune lineaarne pGEXTEV plasmiid. Restriksioonianalüüsi tulemused on esitatud joonisel 14.



Joonis 14. pGEXTEV-HPV18E1HA plasmidi restriksioonianalüüs. Geelile kanti kaks lõikamata pGEXTEV-HPV18E1HA plasmidi ning BamHI ja SalI lõigatud pGEXTEV-HPV18E1HA plasmiidid. BamHI ja SalI lõigates lõikub plasmidist välja ~2000 bp suurune HPV18 E1HA valku kodeeriv järjestus ja ~5000 bp suurune pGEXTEV plasmiid.

2.3.10 HPV18GST-E1HA valgu puhastamine bakterist

PGEXTEV-HPV18E1HA plasmiid transformeeriti kompetentsetesse BL21DE3RP bakteritesse. Baktereid kasvatati 37 °C juures loksutil OD 0,5-ni. Seejärel indutseeriti valgu ekspressiooni IPTG lisamisega. Baktereid kasvatati veel 14 h 16 °C juures loksutil ja seejärel rakud lüüsi. Valgu puhastamiseks kasutati GST-sefaroosi ja valku elueeriti kolonnist 4x 200 µl elueerimislahuses. Puhastatud valk analüüsit 8% akrüülamiid geelil ja *western blot* analüüsiga, kasutades HA märgist ära tundvat antikeha 3F10 *rabbit-anti-HA-HRP*. Pildidel on näha HPV18GST-E1HA liitvalk ~110 kDa juures. Kõige rohkem valku sisaldab eluaat 1, mis saadi esimese elueerimise tulemusena. Järgmised kaks eluaati sisaldasid valku peaaegu võrdses koguses. Viimane eluaat sisaldas natuke vähem valku. Mõlemal pildil on näha ka allpool olevaid valke, mis on arvatavasti C-terminaalsest otsast lagunev HPV18GST-E1HA valk.



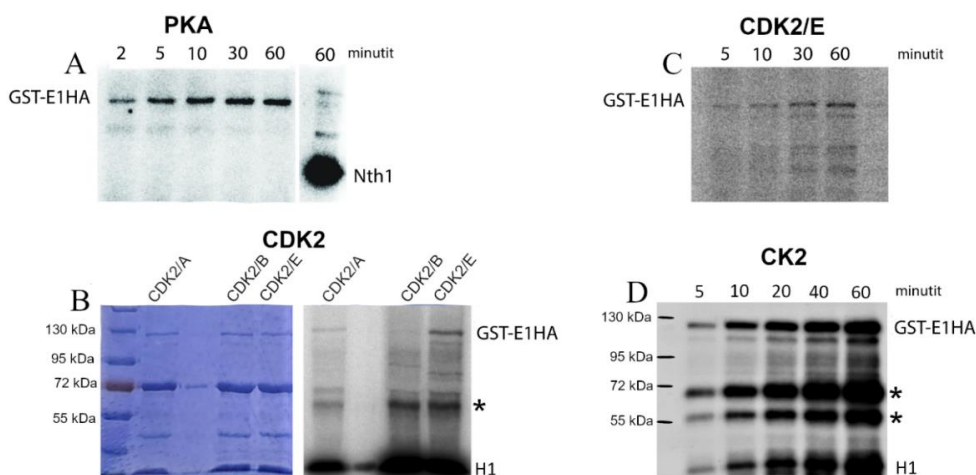
Joonis 15. *PageBlue* värviga värvitud geel ja *western blot* analüüsi pilt bakterist puhastatud HPV18GST-E1HA valgust. Valk puhastati nelja eluaadina. Puhastatud liitvalk on ~110 kDa suurune. Kõige rohkem valku leidub eluaadis 1. Teine ja kolmas eluaat sisaldavad peaaegu võrdses hulgas valku. Vähem on valku eluaadis 4. *Western blot* analüüsi esimesele rajale kanti indutseerimata lüüsitud bakterirakud, mis näitab, et pildil olev valk tekib IPTG lisamise tulemusena.

2.3.11 HPV18 E1 valgu fosforüülimise uurimine

Uuriti, kas HPV18GST-E1HA valgu fosforüülivad PKA, tsükliinA/CDK2, tsükliinB/CDK2, tsükliinE/CDK2 ja CK2 proteiinkinaasid. Selleks segati kokku kinaasireaktsioon *E.coli* tüvest puhastatud HPV18GST-E1HA valgu ja vastava kinaasiga. P32-gamma-ATP autoradiograafia signaalid vastavate kinaaside reaktsioonides on esitatud joonisel 19. Ligikaudse reaktsioonikiiruse leidmiseks peatati reaktsioonid erinevatel ajapunktidel. Joonise A paneelil on näha, et PKA fosforüülib HPV18GST-E1HA valgu kõikides kasutatud ajapunktides ja peale ~10 minutit reaktsiooni toimumist enam uusi fosfosaite ei lisandunud. Kontrolliks kasutati Nth1 valku, mille kohta oli eelnevalt teada, et seda fosforüülib PKA.

TsükliinA/CDK2, tsükliinB/CDK2 ja tsükliinE/CDK2 reaktsioonidest pärit autoradiograafia signaalid on näha joonisel 19 paneelil B. Reaktsioonidel lasti toimuda 40 minutit toatemperatuuril. Tulemused näitasid, et HPV18GST-E1HA valgu fosforüülivad tsükliinA/CDK2 ja tsükliinE/CDK2, aga mitte tsükliinB/CDK2. Kontrolliks lisati igale reaktsioonile histoon H1. CDK2/E reaktsiooni toimumist vaadeldi ka ajas 5, 10, 30 ja 60 minutit peale ensüümi lisamist (joonis 19 C paneel).

Joonise 19 D paneelil on näidatud, et CK2 fosforüülib HPV18GST-E1HA valgu. CK2 reaktsioonidel lasti toimuda 5, 10, 20, 40 ja 60 minutit. Kontrolliks kasutati histooni H1.



Joonis 16. PKA, tsükliinA/CDK2 (CDK2/A), tsükliinB/CDK2 (CDK2/B), tsükliinE/CDK2 (CDK2/E) ja CK2 osalus HPV18GST-E1HA fosforüülimisel. A paneelil on näha, et PKA osaleb HPV18GST-E1HA valgu fosforüleerimisel. PKA reaktsiooni kontrolliks kasutati valku Nth1. B paneelil on vasakul pool *coomass*iga värvitud geel, millele oli kantud kinaasireaktsioon CDK2/A, CDK2/B või CDK2/E-ga. Kõik reaktsioonid toimusid 40 minutit toatemperatuuril. Kontrolliks lisati igale reaktsioonile histooni H1 (joonisel H1). * tähistab tundmatut valku. Joonisel on näha, et HPV18GST-E1HA fosforüülimisel osalevad CDK2/A ja CDK2/E. Joonise C paneelil on näha autoradiograafia signaalid HPV18GST-E1HA ja CDK2/E reaktsioonist 5, 10, 30 ja 60 minutit peale kinaasi lisamist reaktsioonile. D paneelil on näha CK2 osalus HPV18GST-E1HA fosforüülimisel 5, 10, 20, 40 ja 60 minutit peale kinaasi lisamist reaktsioonile. Kontrolliks lisati igale reaktsiooniseigule histooni H1.

2.3.12 HPV18 E1 valgu PKA, tsükliinE/CDK2 ja CK2 fosfosaitide tuvastamine

PKA, CDK2 ja CK2 poolt fosforüleeritud HPV18 E1 valgus olevate aminohapete jääkide tuvastamiseks teostati kinaasireaktsioonid ilma radioaktiivse ATP-ta ja saadeti need MS analüüsiks TÛTI proteoomika tuumiklaborisse. HPV18GST-E1HA liitvalk koosneb 898 aminohappest, millest 110 on fosforüülitavad seriinid/treoniinid. Kõik reaktsioonid toimusid 40 minutit toatemperatuuril. Negatiivse kontrollina saadeti MS analüüsi valku sisaldav kinaasireaktsioon ilma kinaasita. Üheski negatiivse kontrollreaktsiooni tulemustest ei leitud ühtegi fosforüülitud aminohappejääki. Selle eksperimendi kokkuvõtavad tulemused on esitatud tabelis 4.

PKA eksperimendi tulemustest leiti kolm fosforüülitud seriini: S93, S321/S322 ja S645. Analüüsi katvus oli ~61%. Analüüsis tuvastati 61 seriini/treoniini, mis on ~55% kõikidest fosforüülitavatest aminohapetest.

CDK2 eksperimendis tuvastati kaheksa tsükliinE/CDK2 poolt fosforüülitavat aminohapete ja üks seriin (S120), mida fosforüülisid nii tsükliinA/CDK2, tsükliinB/CDK2 kui ka CDK2/E. CDK2/E poolt fosforüülitavad aminohapped lisaks S120 olid järgmised: S93, S97, T107, S110, T474, S553 ja T645. Tuvastatud seriinide seas oli ka neli seriini, millede muteerimist uuriti eelnevates katsetes. Nende seriinide muutminealaniiniks põhjustas HPV18 replikatsioonivõime langust ja E1 valgu jäämise tsütoplasmasse. Need seriinid on tugevalt konserveerunud paljudes PVdes, sh HPV11-s. Analüüsi katvus oli ~62%. Analüüsis tuvastati 66 seriini/treoniini, mis on ~60% kõikidest fosforüülitavatest aminohapetest.

CK2 eksperimendis tuvastati kaks fosforüülitud treoniini T94 ja T107. Analüüsi katvus oli ~55%. Analüüs kattis 58 seriini/treoniini, mis on 53% kõikidest fosforüülitavatest aminohapetest.

Tabel 4. PKA, tsükliinE/CDK2 ja CK2 poolt fosforüülitavad aminohapped HPV18 E1 valgus. Tabelis on välja toodud peptiidid, milles tuvastati fosforüülitud treoniin/seriin MS analüüsis ja vastavat peptiidi fosforüleeriv kinaas. Sulgudes olev number näitab vastava aminohappejäägi fosforüütuse tõenäosust. Viimases veerus on fosforüülitud aminohappe positsioon valgus.

Kinaas	Identifitseeritud peptiid ja S/T fosforüleerituse tõenäosus	S/T positsioon HPV18 E1 valgus
PKA	FAGGS(0.791)T(0.207)ENS(0.002)PLGER	93
PKA	S(0.5)S(0.5)VAALYWYR	321/322

PKA	LDLHEEEEDADTEGNPFGT(1)FKCVAGQNRPL	645
Cdk2/E	FAGGS(0.926)T(0.074)ENSPLGER	93
Cdk2/E	FAGGSTENS(1)PLGER	97
Cdk2/E	LEVDT(1)ELSPR	110
Cdk2/A/B/E	LQEISLNS(1)GQK	120
Cdk2/E	NALDGNPIS(1)IDRK	553
Cdk2/E	FAGGS(0.008)T(0.967)ENS(0.026)PLGER	94
Cdk2/E	LDLHEEEEDADTEGNPFGT(1)FKCVAGQNRPL	645
Cdk2/E	LEVDT(1)ELSPR	107
Cdk2/E	SFLKGT(1)PK	474
CK2	FAGGS(0.06)T(0.94)ENSPLGER	94
CK2	LEVDT(0.999)ELS(0.001)PR	107

2.4 Arutelu

HPV on kõige sagedasem sugulisel teel leviv viirus. Keskmiselt 50% inimestest nakatub elu jooksul mõne HPV tüübiga (Brianti et al., 2017). Enamustel juhtudel on nakkus asümptomaatiline ja inimesele probleeme ei põhjusta. Madala riskiga HPV nakkus võib põhjustada kondüloomide ja papilloomide teket. Kõrge riskiga HPVd võivad põhjustada pahaloomuliste kasvaja teket. Kõige sagedasemalt kasvaja ja kondüloome põhjustavate HPV tüüpide vastu on olemas nakkust ennetav vaktsiin. Senini ei ole ei kõrge riskiga HPV poolt põhjustatud kasvaja ega madala riskiga HPVde poolt põhjustatud papilloomide ja kondüloomide vastu olemas ühtegi spetsiifilist viirusvastast ravimit. Viirusevastase ravimi valmimise suurimaks takistuseks on puudulikud teadmised PV elutsüklist. Antud töö kaugemaks eesmärgiks ongi leida rakulisi märklaudvalke, mille aktiivsuse ja/või taseme reguleerimine inhibeeriks HPV genoomi replikatsiooni ning seega oleks võimalik viirusvastase ravimiarenduse sihtmärk.

HPV replikatsiooniks on vajalikud valgud E1 ja E2. Need mõlemad valgud on ka fosfoproteiinid ehk nende valkude mitmeid funktsioone reguleerivad proteiinkinaasid. E1 valk

on äärmiselt oluline infektsiooni tekkeks ja esialgses viiruse genoomi amplifikatsioonis. E1 valgu ülioluline roll viiruse elutsüklis muudab ta potentsiaalseks ravimi märklauaks.

2.4.2 E1 valgu fosfosaitide määramine ja nende roll viiruse elutsüklis

Käesolevas töös kaardistati E1 valgus olevad fosfosaidid madala riskiga HPV11 ja kõrge riskiga HPV18 näitel. Otsiti konserveerunud fosforüülitud seriinid ja treoniinid, vaadeldi nende funktsiooni HPV elutsüklis ja prooviti leida kinaasid, mis fosforüülivad neid aminohappeid HPV18 E1 valgus. Tuvastati neli fosforüülitud seriini HPV11 ja HPV18 E1 valgu N-terminaalses domeenis, mis asuvad tugevalt konserveerunud piirkonnas. Selles piirkonnas asuvad ka NES, NLS ja tsükliinE sidumismotiiv (RXL) (Bergvall et al., 2013). Fosforüülimise funktsiooni uurimiseks nendes seriinides konstrueeriti HA-märgist sisaldavad mutantse genoomid. HPV11 ja HPV18 E1 valgu kodeerivas alas muudeti nelja seriini (S89, S93, S96 ja S107) kodeerivad koodonid mitte-fosforüülitavaksalaniini ja fosforüleerimist mimikeerivaks glutamiinhapet kodeerivaks. Vastavad HPV11 mutandid olid metsiktüüpi genoomi kontekstis (vaid E1 valgu N-terminusse lisatud 9 aminohappeline HA märgist eristas neid metsiktüübist). HPV18 mutandid olid genoomis, mis lisaks viirusvalkudele ja HA märgisele kodeeris veel nanolutsiferaas (N.luc) marker valku.

2.4.2.1 Tuvastatud fosfosaitide mõju replikatsioonile

Esmalt uuriti valmistatud mutantsete genoomide replikatsiooni U2OS rakkudes ja leiti, et E1 valgu N-terminaalses domeenis nelja konserveerunud seriini muutminealaniiniks inhibeerib tugevalt genoomi replikatsioonivõimet. Nende nelja seriini muutmine fosforüülimist mimikeerivaks glutamiinhappeks muutis viiruse genoomi replikatsioonivõime alguses küll natuke väiksemaks, aga hilisemates ajapunktides replitseerus fosfomimeetiline mutantne genoom üsna sarnaselt *wt* genoomile. Lisaks tehti ka kontrollanalüüs, kus koos mutantse genoomiga transfekteeriti rakkudesse E1 valgu ekspresseeriv E1 ekspressioonivektor ning näidati, et selle olemasolul rakkudes olid kõik genoomid replikatsioonivõimelised. Tulemustest võib järeldada, et replikatsiooni erinevused *wt* genoomi ja nelja fosforüülitava seriini asemelalaniini kodeeriva mutantse genoomi vahel tulenesid E1 valgu fosforüülimise tõttu.

Varasemates töodes on uuritud sarnases piirkonnas paiknevate fosforüülitavate aminohapete mõju replikatsioonile kasutades HPV E1 ja E2 valke, mis kodeeriti ekspressioonivektoritelt ja *origini* sisaldavaid replitseeruvaid plasmide (Ma et al. 1999), (Deng et al., 2004), (Fradet-Turcotte et al., 2010). Nendest töödest järeldatakse, et tsükliinA/CDK2 või tsükliinE/CDK2

konsensusjärjestuses paiknevate aminohapete HPV11 E1 valgus S89, S93, S107 fosforüülimine on oluline modifikatsioon HPV11 edukaks replikatsiooniks (Ma et al., 1999), (Deng et al., 2004), aga HPV31 E1 valgus CDK2 konsensusjärjestuses paiknevate aminohapete S92 ja S106 fosforüülimine ei ole oluline HPV31 transientseks replikatsiooniks (Fradet-Turcotte et al., 2010). Käesolevas töös ei uuritud üksikute seriinide olulisust genoomi replikatsiooniks, aga näidati, et kui neli lähestikku paiknevat seriini on muteeritud mittefosforüülitavaksalaniiniks, siis on nii madala riskiga HPV11 kui ka kõrge riskiga HPV18 genoomi replikatsioonivõime palju väiksem kui *wt* genoomil, mis kinnitab selle modifikatsiooni olulisust viiruse transientses replikatsioonis.

2.4.2.2 Tuvastatud fosfosaitide mõju valgu tasemele

Mitmed varasemad tööd näitavad, et HPV11 ja HPV31 E1 valgu tuuma-tsütoplasma transporti reguleerib fosforüülimine (Deng et al., 2004), (Yu et al., 2007), (Fradet-Turcotte et al., 2010). Nendes töödes on näidatud, et HPV11 E1 valgu tuumas püsimiseks on olulised S89, S92 ja S107 ning HPV31 E1 valgu tuumas püsimiseks on olulised S92 ja S106. Seepärast uurisime edasi, kas HPV11 ja HPV18 E1 valgus tuvastatud konserveerunud fosforüülitud seriinid on olulised nende HPVde E1 tuuma-tsütoplasma transpordiks. Selleks transfekteeriti U2OS rakke HPV11 ja HPV18 *wt* ning valmistatud mutantsete genoomidega, fraksioneeriti raku tuuma ja tsütoplasma ekstraktid ning puhastati IP meetodil mõlemast ekstraktist HA-märgist sisaldavad E1 valgud. Tulemused näitasid, et kõik ekstraktid sisaldavad E1 valku nii tuumas kui tsütoplasmas, aga 4SA mutandi ekstraktid sisaldasid E1 valku tuumas märgatavalt vähem kui *wt* ja 4SE mutandi ekstraktid. Varasemad tööd on näidanud, et E1 valgu tuuma impordiks või ekspordiks vajalike fosforüülitud aminohapetes mutatsioone sisaldavad E1 valgud on kompleksis E2 valguga võimelised tuuma sisenema või tuumas püsima (Yu et al., 2007), (Fradet-Turcotte et al., 2010). See mehhanism võib seletada, miks väikeses koguses E1 valku paiknes tuumas nii HPV11-E1HA kui ka HPV18-E1HA-n.luc 4SA mutanse markergenoomiga transfekteeritud rakkudes.

Meie tulemused kinnitasid varasemate tööde tulemusi, mis näitavad, et HPV E1 valgu NES ja NLS signaale aktiveerib fosforüülimine. Esmakordselt näitasid, et ka kõrge riskiga HPV18 genoomi replikatsiooni ja E1 valgu lokalisatsiooni reguleerib NES piirkonnas ja RXL motiivi ees paiknevate aminohapete fosforüülimine. Erinevalt varasematest töödest, näitas käesolev töö endogeense E1 valgu ehk viirusgenoomilt ekspresseeritud E1 valgu tasemel, et N-terminaalne piirkond, kus tuvastati neli konserveerunud fosforüülitud seriini, oli oluline HPV E1 valgu

lokalisatsioonil. Kõik eelpool viidatud tööd olid tehtud kasutades ekspresioonivektoreid ja rakulisi keskkondi, kus HPV genoom eriti hästi ei replitseeru.

2.4.3 E1 valgus tuvastatud fosfosaiite fosforüülivate kinaaside leidmine

Selleks, et leida kinaasi(e), mis fosforüülisid nelja uuritud seriini, konstrueeriti plasmidid, mis ekspresseeriks bakteris HPV18 E1 valku. Valk ekspresseeriti *E.coli* tüves BL21DE3RP ja puhastati bakterirakust kasutades GST-sefaroosi. Varasematele kirjanduse andmetele tuginedes, leiti et PVde replikatsiooni ja valgus lokaliseerimise võivad mõjutada CK2, PKA, PKC, ER1, JNK1, CDK2 (Schuck et al., 2013), (Piirsoo et al., 2019), (Zanardi et al., 1997), (Bian et al., 2007), (Yu et al., 2007), (Fradet-Turcotte et al., 2010), (Ma et al., 1999), (Deng et al., 2004). Meil oli võimalus kasutada järgnevat kinaasi: CK2, PKA, tsükliinA/CDK2, tsükliinB/CDK2, tsükliinE/CDK2. Kinaasi katse abil leiti, et bakterist puhastatud HPV18 GST-E1HA valku fosforüülivad PKA, tsükliinE/CDK2 ja CK2. Enamus varasemad tulemused PVde E1 valku fosforüülivate kinaaside kohta pärinevad kinaasi konsensusjärjestuste otsimisel valgust ja seejärel konsensusjärjestuse järgi fosforüülitava aminohappe muutmiselalaniiniks või fosforüleerimist mimikeerivaks aminohappeks, millele järgnes fenotüübi analüüs. Sellised katsed aga ei näita, kas vastav kinaas ka tegelikult on võimeline seda saiti fosforüleerima. Eelnevalt on MS analüüsiga tuvastatud fosfosaidid vaid BPV1 E1 valgus, kus leiti järgmised fosforüülitud aminohapped: S48, S90, S94, S95, S100, T102, S109, T126, S305 ja S584 (Lentz et al., 2006). Meie laboris varasemalt tehtud LC-ESI-MS/MS eksperimendi tulemuste analüüsimisel tuvastasime *in vivo* fosforüülitud aminohapped HPV11 E1 valgus positsioonides T57, S60, S89, S93, S104, S107, S626 ja HPV18 E1 valgus positsioonides S93, T94, S97, S110, S120. Selleks et realselt leida, millised kinaasid mis aminohappeid fosforüülivad, segati kokku kinaasi reaktsiooni bakterist puhastatud HPV18 E1 valguga ja teostati MS analüüs.

Tulemustest selgus, et HPV18 E1 valgus fosforüülisid üheksat aminohappet tsükliinE/CDK2 (S93, S97, S110, S120, S553, T94, T645, T107, T474). PKA fosforüülis kolme (S93, S321/S322, T645) ja CK2 kahte (T94 ja T107). Nendest aminohapetest S93, T94, S97, S110 ja S120 tuvastati ka HPV18 E1 valgus *in vivo* fosforüülitud aminohapete leidmisel. Tuvastatud tsükliinE/CDK2 aminohapetest T474 paikneb tüüpilises tsükliinE/CDK2 konsensusjärjestuses, milleks on S/T-P-K-K. S97 ja S110 järgneb proliin, mis on omane CDK2 poolt fosforüülitud aminohapetele. S120 ja T645 sisaldavad fosfosaidi lähedal lüsiini, mis meenutab natuke CDK2 konsensusjärjestust. Tuvastatud PKA poolt fosforüleeritud aminohapetest S322 paikneb

tüüpilises PKA konsensusjärjestuses, milleks on R-x-S/T-hüdrofoobne aminohape (Y/V/F/I/L). Mõlemad CK2 poolt tuvastatud aminohapped T94 ja T107 paiknevad CK2 konsensusjärjestust meenutavas järjestuses, milleks on S/T-x-x-D/E (või fosforüülitud seriin). Enamus MS eksperimendis tuvastatud fosforüleeritud aminohappeid ei paiknenud vastava kinaasi tüüpilises konsensusjärjestuses, mis võis tähendada, et mitmed kinaasid fosforüülivad HPV18 E1 valgus ebatüüpilisi konsensusaite.

Probleemiks oli MS eksperimentide väike katvus (45-70%), mistõttu tõenäoliselt ei tuvastatud kõiki fosfosaite ei esimeses katses, kus taheti tuvastada *in vivo* fosfosaite ega ka hilisemates MS eksperimentides, kus taheti leida, millised kinaasid fosforüülivad milliseid aminohappeid. Sellel põhjusel ei saa öelda, kas kõik leitud PKA, tsükliinE/CDK2 ja CK2 fosfosaidid esinevad E1 valgus *in vivo*. Osasid aminohappeid nagu S93, T94, T107 ja T645 fosforüülisid mitu kinaasi. Nt S93 ja T645 fosforüülisid nii tsükliinE/CDK2 kui ka PKA. T94 ja T107 fosforüülivad nii CK2 kui ka tsükliinE/CDK2. See võib tähendada, et ka ülejäänud aminohappeid saavad fosforüülida mõned teised rakus paiknevad proteiinkinaasid, mille osalust E1 valgu fosforüülimisel selles töös ei uuritud.

KOKKUVÕTE

PVd on väikesed ja üsna levinud dsDNA viirused, mis nakavad naha-ja limaskestade epiteelkoe keratinotsüüte. Viiruse elutsükkel eristatakse kolme etappi: esialgne amplifikatsioon, stabiilne säilimisfaas ja vegetatiivne amplifikatsioon. Viiruse replikatsiooniks on vajalikud valgud E1 ja E2. Need valgud on ka fosfoproteiinid ehk nende aktiivsus, stabiilsus ja funktsioon on tihti seotud fosforüülimisega. Selles töös uuriti E1 valgu posttranslatsioonilise fosforüülimise mõju HPV replikatsioonile, valgu tasemele ja paiknemisele HPV11 ja HPV18 näitel. Lisaks puhastati bakterist HPV18GST-E1HA valk ja leiti CK2, PKA ja tsükliinE/CDK2 fosfosaidid HPV18 E1 valgus. Kokkuvõtlikult jõuti järgmistele järeldustele:

- HPV11 E1 valgu on *in vivo* fosforüülitud T57, S60, S89, S93, S96, S104, S107 ja S626;
- HPV18 E1 valgu on *in vivo* fosforüülitud S93, T94, S97, S110 ja S120;
- HPV11 ja HPV18 E1 valgu N-terminaalses osas olevad fosforüülitud seriinid paiknevad tsükliinE sidumismotiivi RXL ees ja see piirkond on kõrgelt konserveerunud paljudes PVdes;
- Konserveerunud nelja N-terminaalses domeenis paikneva seriini (HPV11 - S89, S93, S96, S107 ning HPV18 - S93, S97, S110, S120) muutminealaniiniks vähendas märgatavalt nii HPV11 kui ka HPV18 genoomi replikatsioonivõimet;
- Nende seriinide asemelalaniini kodeerivate HPV11 ja HPV18 E1 valgu analüüsist selgus, et mutantne E1HA valk paiknes pigem tsütoplasmas. Samas, fosforüleerimist mimikeerivaks muudetud mutantsed genoomid ja wt genoomi korral paiknes HPV11 ja HPV18 E1HA valk nii tuumas kui tsütoplasmas;
- Bakterist puhastatud HPV18GST-E1HA valku fosforüülisid PKA, tsükliinE/CDK2 ja CK2;
- PKA fosfosaidid HPV 18 E1 valgus asusid positsioonides S93, S321/322 ja T645;
- TsükliinE/CDK2 võib HPV18 E1 valgus fosforüleerida järgnevaid aminohappeid: S93, T94, S97, T107, S110, S120, T474, S553, T645;
- CK2 fosfosaidid HPV 18 E1 valgus asusid positsioonides T94 ja T107.

The role of protein kinases in the regulation of HPV E1 protein functions

(SUMMARY)

Annika Laanemets

Human papillomaviruses are small double-stranded DNA viruses that infect keratinocytes. Some HPV types called high-risk HPVs have been linked to the development of cervical, penile, vulvar, skin, anal, head and neck cancers. Low-risk papillomaviruses can cause common and genital warts. HPV life cycle is tightly linked to epithelial differentiation. HPV replication occurs in three stages called initial amplification, stable maintenance and vegetative amplification. Viral proteins E1 and E2 are essential for replication and transcription. Both of them are phosphoproteins; therefore, protein kinases strongly influence HPV life cycle.

This master's thesis focused on mapping phosphosites in the HPV11 and HPV18 E1 proteins, analysing their function in virus life cycle and finding kinases which can phosphorylate these amino acids. We found eight *in vivo* phosphosites in the HPV11 E1 protein T57, S60, S89, S93, S96, S104, S107, S626 and five *in vivo* phosphosites in the HPV18 E1 protein S93, T94, S97, S110, S120. At least four of these phosphorylated amino acids were located in highly conserved region near nuclear localisation and nuclear export signals. Mutated HPV11 and HPV18 genomes were made to understand phosphorylation function of these conserved amino acids. HPV11 4SA and 4SE mutant genomes coded alanin or glutamatic acid instead of S89, S93, S96 and S107. HPV18 4SA and 4SE mutant genomes coded alanin or glutamatic acid instead of S93, S97, S110 and S120. All genomes contained HA-tag coding sequence in the E1 open reading frame. U2OS cells were transfected with wt and mutated HPV11 and HPV18 genomes to analyze their replication and E1 protein location. Our results showed that the replication activity of the HPV11 and HPV18 4SA mutants was much weaker than that of wt and 4SE mutants. HPV11 and HPV18 wt and 4SE mutants E1 proteins were localised both in the cytoplasm and nucleus but 4SA mutants E1 proteins were mainly in the cytoplasm. We also cloned HPV18 E1 protein expressing sequence into pGEXTEV plasmid. We expressed the protein in bacteria and used GST-sepharose to purify HPV18 GST-E1 protein. Kinase assays and MS analyses were performed to identify kinases which could phosphorylate the HPV18 E1 protein. Our results showed that PKA can phosphorylate the following amino acids in HPV18 E1: S93, S321/S322, S645. CyclinE/CDK2 phosphosites were S93, T94, S97, T107, S110, S120, T474, S553, T645. CyclinE/CDK2 was responsible for phosphorylating four conserved serines in the HPV18 E1 protein, which mutating to alanine led to almost loss of replication activity. CK2 can phosphorylate T94 and T107 in the HPV18 E1 protein.

KASUTATUD KIRJANDUS

Kirjanduse loetelu

- Amin, A.A., Titolo, S., Pelletier, A., Fink, D., Cordingley, M.G., and Archambault, J. (2000). Identification of Domains of the HPV11 E1 Protein Required for DNA Replication in Vitro. *Virology* 272: 137–150.
- Baxter, M.K., McPhillips, M.G., Ozato, K., and McBride, A.A. (2005). The Mitotic Chromosome Binding Activity of the Papillomavirus E2 Protein Correlates with Interaction with the Cellular Chromosomal Protein, Brd4. *J Virol* 79: 4806–4818.
- Berg, M., and Stenlund, A. (1997). Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *J Virol* 71: 3853–3863.
- Bergvall, M., Melendy, T., and Archambault, J. (2013). THE E1 PROTEINS. *Virology* 445:.
- Bernard, H.-U. (1994). Coevolution of papillomaviruses with human populations. *Trends in Microbiology* 2: 140–143.
- Bian, X.-L., Rosas-Acosta, G., Wu, Y.-C., and Wilson, V.G. (2007). Nuclear Import of Bovine Papillomavirus Type 1 E1 Protein Is Mediated by Multiple Alpha Importins and Is Negatively Regulated by Phosphorylation near a Nuclear Localization Signal. *J Virol* 81: 2899–2908.
- Blitz, I.L., and Laimins, L.A. (1991). The 68-kilodalton E1 protein of bovine papillomavirus is a DNA binding phosphoprotein which associates with the E2 transcriptional activator in vitro. *J Virol* 65: 649–656.
- Bodily, J.M., Wrobel, G.A., Hennigan, C., and Rodriguez, C.M. (2013). Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by E7 and the cell cycle. *Virology* 443: 11–19.
- Bousarghin, L., Touzé, A., Sizaret, P.-Y., and Coursaget, P. (2003). Human Papillomavirus Types 16, 31, and 58 Use Different Endocytosis Pathways To Enter Cells. *J Virol* 77: 3846–3850.
- Brianti, P., De Flammoneis, E., and Mercuri, S.R. (2017). Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol.* 40: 80–85.
- Chen, G., and Stenlund, A. (2001). The E1 Initiator Recognizes Multiple Overlapping Sites in the Papillomavirus Origin of DNA Replication. *Journal of Virology* 75: 292–302.
- Day, P.M., Baker, C.C., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (2004). Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14252–14257.
- Deng, W., Lin, B.Y., Jin, G., Wheeler, C.G., Ma, T., Harper, J.W., et al. (2004). Cyclin/CDK Regulates the Nucleocytoplasmic Localization of the Human Papillomavirus E1 DNA Helicase. *J Virol* 78: 13954–13965.
- DiGiuseppe, S., Luszczek, W., Keiffer, T.R., Bienkowska-Haba, M., Guion, L.G.M., and Sapp, M.J. (2016). Incoming human papillomavirus type 16 genome resides in a vesicular compartment throughout mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 6289–6294.
- DiMaio, D., and Mattoon, D. (2001). Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* 20: 7866–7873.
- Doorbar, J. (2013). Latent papillomavirus infections and their regulation. *Current Opinion in Virology* 3: 416–421.

- Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., and Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243: 934–937.
- Egawa, N., Nakahara, T., Ohno, S., Narisawa-Saito, M., Yugawa, T., Fujita, M., et al. (2012). The E1 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Is Dispensable for Maintenance Replication of the Viral Genome. *J Virol* 86: 3276–3283.
- Enemark, E.J., and Joshua-Tor, L. (2006). Mechanism of Dna Translocation in a Replicative Hexameric Helicase. *Nature* 442: 270–275.
- Fradet-Turcotte, A., Bergeron-Labrecque, F., Moody, C.A., Lehoux, M., Laimins, L.A., and Archambault, J. (2011). Nuclear Accumulation of the Papillomavirus E1 Helicase Blocks S-Phase Progression and Triggers an ATM-Dependent DNA Damage Response ∇ . *J Virol* 85: 8996–9012.
- Fradet-Turcotte, A., Moody, C., Laimins, L.A., and Archambault, J. (2010). Nuclear Export of Human Papillomavirus Type 31 E1 Is Regulated by Cdk2 Phosphorylation and Required for Viral Genome Maintenance. *J Virol* 84: 11747–11760.
- Funk, J.O., Waga, S., Harry, J.B., Espling, E., Stillman, B., and Galloway, D.A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* 11: 2090–2100.
- Geimanen, J., Isok-Paas, H., Pipitch, R., Salk, K., Laos, T., Orav, M., et al. (2011). Development of a Cellular Assay System To Study the Genome Replication of High- and Low-Risk Mucosal and Cutaneous Human Papillomaviruses. *Journal of Virology* 85: 3315–3329.
- Gillespie, K.A., Mehta, K.P., Laimins, L.A., and Moody, C.A. (2012). Human Papillomaviruses Recruit Cellular DNA Repair and Homologous Recombination Factors to Viral Replication Centers. *J Virol* 86: 9520–9526.
- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R.E., and Sapp, M. (2001). Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *J Virol* 75: 1565–1570.
- Gravitt, P.E. (2012). Evidence and Impact of Human Papillomavirus Latency. *Open Virol J* 6: 198–203.
- Harari, A., Chen, Z., and Burk, R.D. (2014). HPV Genomics: Past, Present and Future. *Curr Probl Dermatol* 45: 1–18.
- Hasan, U.A., Zannetti, C., Parroche, P., Goutagny, N., Malfroy, M., Roblot, G., et al. (2013). The Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med* 210: 1369–1387.
- Huh, K.-W., DeMasi, J., Ogawa, H., Nakatani, Y., Howley, P.M., and Münger, K. (2005). Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11492–11497.
- 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. *J Virol* 73: 4404–4412.
- Isok-Paas, H., Männik, A., Ustav, E., and Ustav, M. (2015). The transcription map of HPV11 in U2OS cells adequately reflects the initial and stable replication phases of the viral genome. *Virol J* 12: 59.
- Jeon, S., Allen-Hoffmann, B.L., and Lambert, P.F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 69: 2989–2997.

- Jia, R., Liu, X., Tao, M., Kruhlak, M., Guo, M., Meyers, C., et al. (2009). Control of the Papillomavirus Early-to-Late Switch by Differentially Expressed SRp20. *Journal of Virology* 83: 167–180.
- Johansson, C., and Schwartz, S. (2013). Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nature Reviews Microbiology* 11: 239–251.
- Jones, D.L., Alani, R.M., and Münger, K. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* 11: 2101–2111.
- Kadaja, M., Silla, T., Ustav, E., and Ustav, M. (2009). Papillomavirus DNA replication — From initiation to genomic instability. *Virology* 384: 360–368.
- Kadaja, M., Sumerina, A., Verst, T., Ojarand, M., Ustav, E., and Ustav, M. (2007). Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *EMBO J* 26: 2180–2191.
- Kim, K., and Lambert, P.F. (2002). E1 Protein of Bovine Papillomavirus 1 Is Not Required for the Maintenance of Viral Plasmid DNA Replication. *Virology* 293: 10–14.
- Klumpp, D.J., and Laimins, L.A. (1999). Differentiation-Induced Changes in Promoter Usage for Transcripts Encoding the Human Papillomavirus Type 31 Replication Protein E1. *Virology* 257: 239–246.
- Lentz, M.R. (2002). A carboxyl-terminal serine of the bovine papillomavirus E1 protein is phosphorylated in vivo and in vitro. *Virus Research* 83: 213–219.
- Lentz, M.R., Stevens, S.M., Raynes, J., and Elkhoury, N. (2006). A phosphorylation map of the bovine papillomavirus E1 helicase. *Virol J* 3: 13.
- Ma, T., Zou, N., Lin, B.Y., Chow, L.T., and Harper, J.W. (1999). Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 382–387.
- McBride, A.A. (2013). The Papillomavirus E2 Proteins. *Virology* 445: 57–79.
- Melendy, T., Sedman, J., and Stenlund, A. (1995). Cellular factors required for papillomavirus DNA replication. *J Virol* 69: 7857–7867.
- Moody, C.A., and Laimins, L.A. (2009). Human Papillomaviruses Activate the ATM DNA Damage Pathway for Viral Genome Amplification upon Differentiation. *PLoS Pathog* 5:.
- Morin, G., Fradet-Turcotte, A., Di Lello, P., Bergeron-Labrecque, F., Omichinski, J.G., and Archambault, J. (2011). A Conserved Amphipathic Helix in the N-Terminal Regulatory Region of the Papillomavirus E1 Helicase Is Required for Efficient Viral DNA Replication ∇ . *J Virol* 85: 5287–5300.
- Nakahara, T., Peh, W.L., Doorbar, J., Lee, D., and Lambert, P.F. (2005). Human Papillomavirus Type 16 E1 Δ E4 Contributes to Multiple Facets of the Papillomavirus Life Cycle. *J Virol* 79: 13150–13165.
- Oh, S.T., Longworth, M.S., and Laimins, L.A. (2004). Roles of the E6 and E7 Proteins in the Life Cycle of Low-Risk Human Papillomavirus Type 11. *J Virol* 78: 2620–2626.
- Oliveira, J.G., Colf, L.A., and McBride, A.A. (2006). Variations in the association of papillomavirus E2 proteins with mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1047–1052.

- Orav, M., Geimanen, J., Sepp, E.-M., Henno, L., Ustav, E., and Ustav, M. (2015). Initial amplification of the HPV18 genome proceeds via two distinct replication mechanisms. *Sci Rep* 5:.
- Pacini, L., Savini, C., Ghittoni, R., Saidj, D., Lamartine, J., Hasan, U.A., et al. (2015). Downregulation of Toll-Like Receptor 9 Expression by Beta Human Papillomavirus 38 and Implications for Cell Cycle Control. *J Virol* 89: 11396–11405.
- Parish, J.L., Bean, A.M., Park, R.B., and Androphy, E.J. (2006). ChlR1 Is Required for Loading Papillomavirus E2 onto Mitotic Chromosomes and Viral Genome Maintenance. *Molecular Cell* 24: 867–876.
- Penrose, K.J., Garcia-Alai, M., Prat-Gay, G. de, and McBride, A.A. (2004). Casein Kinase II Phosphorylation-induced Conformational Switch Triggers Degradation of the Papillomavirus E2 Protein. *J. Biol. Chem.* 279: 22430–22439.
- Penrose, K.J., and McBride, A.A. (2000). Proteasome-Mediated Degradation of the Papillomavirus E2-TA Protein Is Regulated by Phosphorylation and Can Modulate Viral Genome Copy Number. *J Virol* 74: 6031–6038.
- Perea, S.E., Massimi, P., and Banks, L. (2000). Human papillomavirus type 16 E7 impairs the activation of the interferon regulatory factor-1. *International Journal of Molecular Medicine* 5: 661–667.
- Piirsoo, A., Piirsoo, M., Kala, M., Sankovski, E., Lototskaja, E., Levin, V., et al. (2019). Activity of CK2 α protein kinase is required for efficient replication of some HPV types. *PLOS Pathogens* 15: e1007788.
- Richards, R.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T., and Day, P.M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1522–1527.
- Sakakibara, N., Chen, D., and McBride, A.A. (2013). Papillomaviruses Use Recombination-Dependent Replication to Vegetatively Amplify Their Genomes in Differentiated Cells. *PLOS Pathogens* 9: e1003321.
- Sankovski, E., Männik, A., Geimanen, J., Ustav, E., and Ustav, M. (2014). Mapping of Betapapillomavirus Human Papillomavirus 5 Transcription and Characterization of Viral-Genome Replication Function. *J Virol* 88: 961–973.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129–1136.
- Schuck, S., Ruse, C., and Stenlund, A. (2013). CK2 Phosphorylation Inactivates DNA Binding by the Papillomavirus E1 and E2 Proteins. *J Virol* 87: 7668–7679.
- Sekhar, V., and McBride, A.A. (2012). Phosphorylation Regulates Binding of the Human Papillomavirus Type 8 E2 Protein to Host Chromosomes. *J Virol* 86: 10047–10058.
- Selinka, H.-C., Giroglou, T., Nowak, T., Christensen, N.D., and Sapp, M. (2003). Further Evidence that Papillomavirus Capsids Exist in Two Distinct Conformations. *J Virol* 77: 12961–12967.
- Shadan, F.F., and Villarreal, L.P. (1995). The evolution of small DNA viruses of eukaryotes: Past and present considerations. *Virus Genes* 11: 239–257.
- Stenlund, A. (2003). Initiation of DNA replication: lessons from viral initiator proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 777–785.

- Straub, E., Dreer, M., Fertey, J., Iftner, T., and Stubenrauch, F. (2014). The Viral E8^ΔE2C Repressor Limits Productive Replication of Human Papillomavirus 16. *Journal of Virology* 88: 937–947.
- Straub, E., Fertey, J., Dreer, M., Iftner, T., and Stubenrauch, F. (2015). Characterization of the Human Papillomavirus 16 E8 Promoter. *Journal of Virology* 89: 7304–7313.
- Thomas, J.T., Hubert, W.G., Ruesch, M.N., and Laimins, L.A. (1999). Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8449–8454.
- Titolo, S., Brault, K., Majewski, J., White, P.W., and Archambault, J. (2003). Characterization of the Minimal DNA Binding Domain of the Human Papillomavirus E1 Helicase: Fluorescence Anisotropy Studies and Characterization of a Dimerization-Defective Mutant Protein. *J Virol* 77: 5178–5191.
- Ustav, M., Ustav, E., Szymanski, P., and Stenlund, A. (1991). Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J* 10: 4321–4329.
- Van Doorslaer, K. (2013). Evolution of the Papillomaviridae. *Virology* 445: 11–20.
- Van Tine, B.A., Dao, L.D., Wu, S.-Y., Sonbuchner, T.M., Lin, B.Y., Zou, N., et al. (2004). Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4030–4035.
- Villiers, E.-M. de, Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.-U., and Hausen, H. zur (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17–27.
- Whelan, F., Stead, J.A., Shkumatov, A.V., Svergun, D.I., Sanders, C.M., and Antson, A.A. (2012). A flexible brace maintains the assembly of a hexameric replicative helicase during DNA unwinding. *Nucleic Acids Res* 40: 2271–2283.
- You, J., Croyle, J.L., Nishimura, A., Ozato, K., and Howley, P.M. (2004). Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 117: 349–360.
- Yu, J.-H., Lin, B.Y., Deng, W., Broker, T.R., and Chow, L.T. (2007). Mitogen-Activated Protein Kinases Activate the Nuclear Localization Sequence of Human Papillomavirus Type 11 E1 DNA Helicase To Promote Efficient Nuclear Import. *J Virol* 81: 5066–5078.
- Zanardi, T.A., Stanley, C.M., Saville, B.M., Spacek, S.M., and Lentz, M.R. (1997). Modulation of Bovine Papillomavirus DNA Replication by Phosphorylation of the Viral E1 Protein. *Virology* 228: 1–10.
- Zhou, C., Tuong, Z.K., and Frazer, I.H. (2019). Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. *Front Oncol* 9:.
- Zobel, T., Iftner, T., and Stubenrauch, F. (2003). The Papillomavirus E8^ΔE2C Protein Represses DNA Replication from Extrachromosomal Origins. *Mol Cell Biol* 23: 8352–8362.

Kasutatud veebiaadressid

Clustal Omega. Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI. Kasutatud 05.05.2020

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

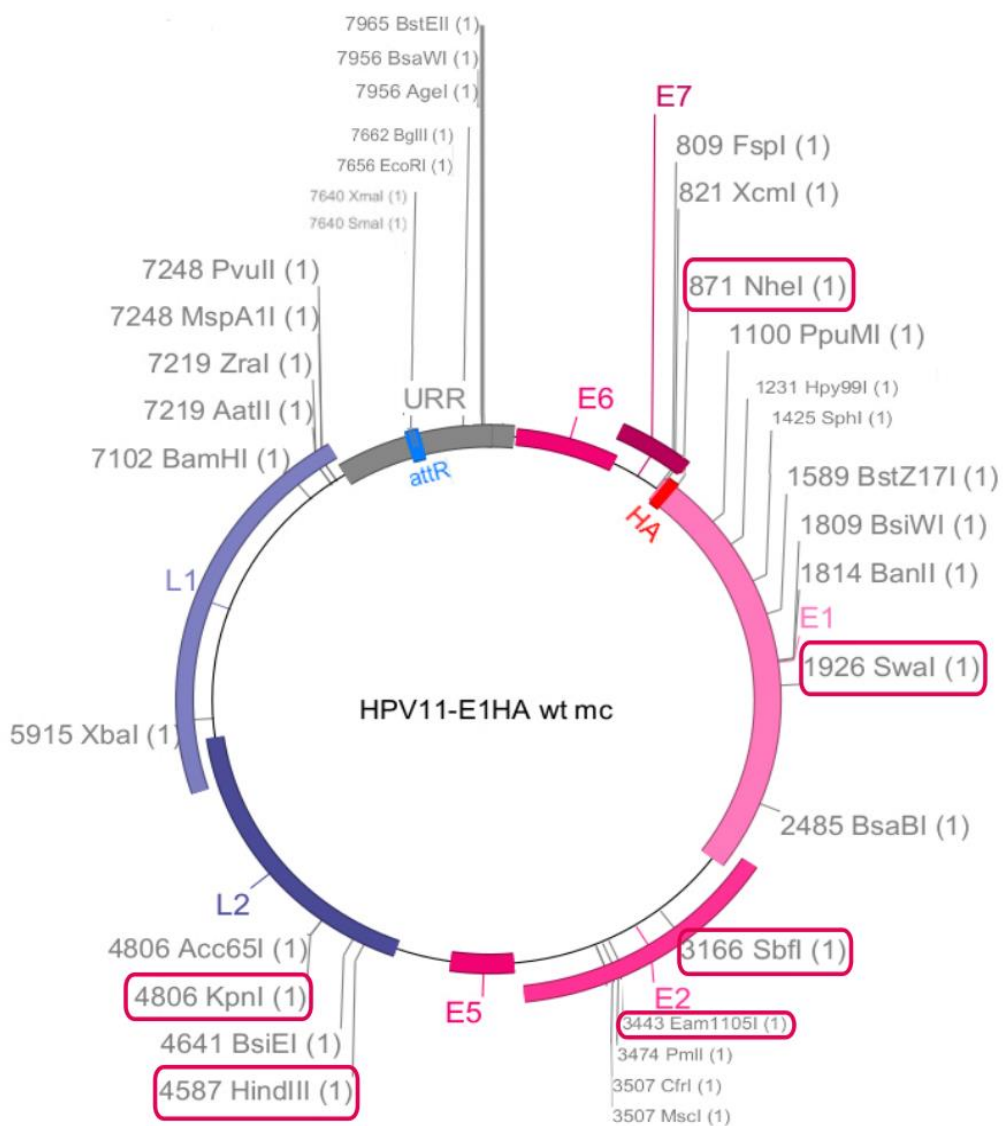
„HPV and Cancer“. National Cancer Institute. Kasutatud 10.03.2020.

<https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents/hpv-and-cancer>

The PapillomaVirus Episteme (PaVE). Kasutatud 10.04.2020.

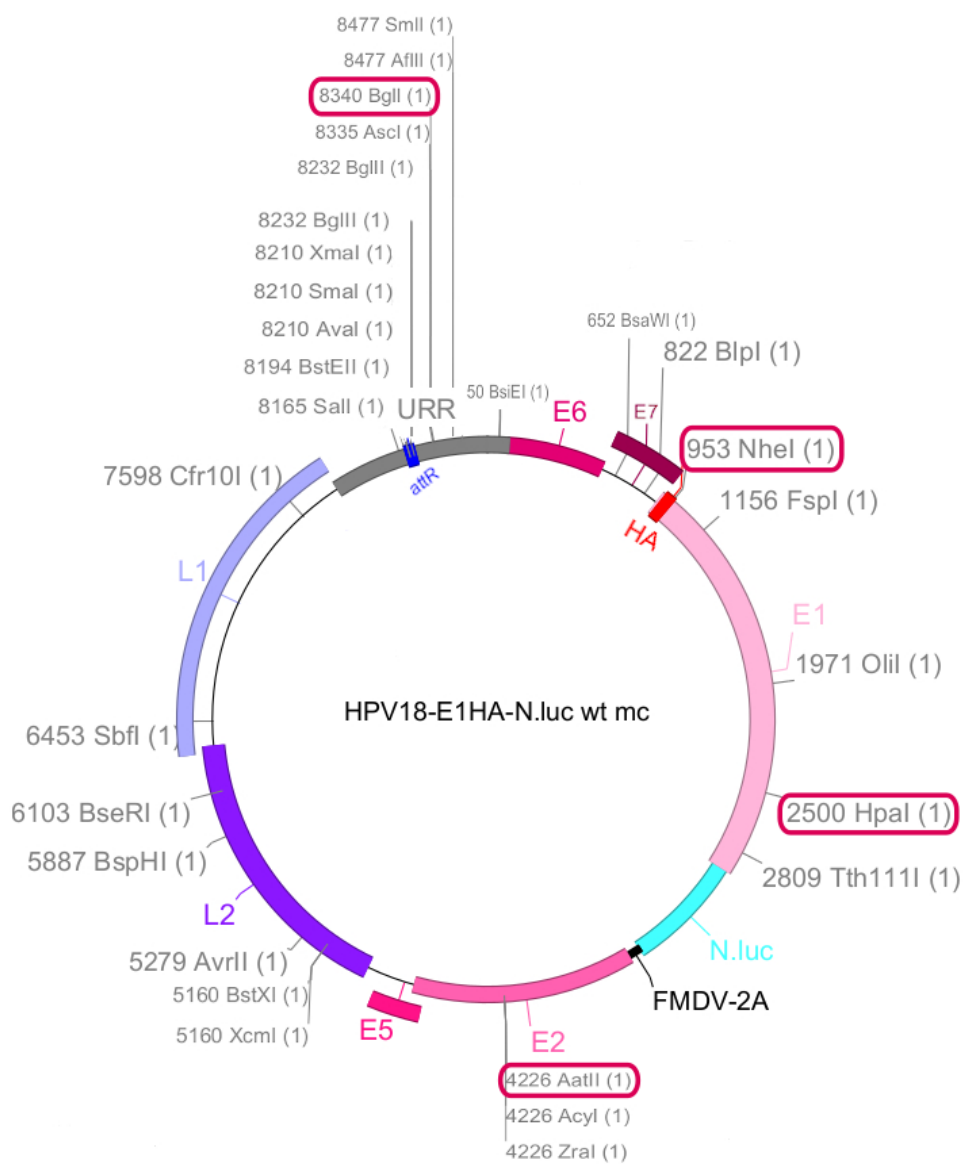
<https://pave.niaid.nih.gov/>

LISA 1



Joonis 17. HPV11-E1HA *wt mc* restriksioonikaart. Punase kastiga on ümbritsetud ensüümid, mida töös kasutati.

LISA 2



Joonis 18. HPV18-E1HA-N.luc *wt mc* restriksioonikaart. Punase kastiga on ümbritsetud ensüümid, mida töös kasutati.

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Annika Laanemets,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose Proteiinkinaaside roll HPV E1 valgu funktsioonide regulatsioonil, mille juhendajad on Alla Piirsoo ja Marko Piirsoo, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Annika Laanemets

11.06.2020