

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

**Inimese papilloomiviiruse tüüp 5 replikatsiooniks vajalike
valkude puhastamine ja fosforüleerimise uurimine**

30 EAP

Lisett Liblekas

Juhendajad PhD Alla Piirsoo

PhD Marko Piirsoo

TARTU 2021

INFOLEHT

Inimese papilloomiviiruse tüüp 5 replikatsiooniks vajalike valkude puhastamine ja fosforüleerimise uurimine

Papilloomiviirused on väikesed DNA viirused, mis nakatavad koe- ja liigispetsiifiliselt epiteelkihi keratinotsüüte. Inimese papilloomiviirused jaotatakse vastavalt onkogeensele potentsiaalile kõrge ja madala riskiga viirusteks. Madala riskiga tüübid põhjustavad healoomulisi vohandeid nahal, kõrge riskiga tüüpe seostatakse peamiselt emakakaelavähiga. Viiruse helikaas E1 ja transkriptsioonifaktor E2 on fosfovalgud, millel on oluline roll viiruse elutsükli. Proteiinkinaasid modifitseerivad oma märklaudvalkude aktiivsust, reguleerides mitmeid bioloogilisi protsesse, sealhulgas HPV elutsükli. Käesoleva magistritöö eesmärk oli konstrueerida HPV5 E1 ja E2 valkude ekspressiooniplasmiidid, et analüüsida nende fosforüleerimist proteiinkinaas A (PKA) poolt ning leida põhjus PKA poolt põhjustatud E2 valgu degradatsioonile.

Märksõnad: HPV, E2 valk, PKA, CK2

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Human papillomavirus type 5 replication proteins: study on purification and phosphorylation

Papillomaviruses are an ancient group of viruses with small double-stranded DNA genomes. They are very species-specific and infect only basal keratinocytes of the cutaneous and mucosal epithelium. Human papillomaviruses (HPVs) are divided into high-risk and low risk types, based on their ability to induce cancer. The low-risk HPV types cause common benign warts, the high risk types are associated mainly with cervical cancer. Viral helicase E1 and transcription factor E2 are phosphoproteins, which play a pivotal role in the viral life cycle. Protein kinases modify their target proteins, thereby regulating many cellular processes, including HPV life cycle. The main focus of this master thesis was to generate constructs for HPV E1 and E2 protein expression, analyze the ability of a protein kinase A (PKA) to phosphorylate these viral proteins, and to investigate PKA dependent phosphorylation of HPV5 E2 in more detail.

Märksõnad: HPV, E2 protein, PKA, CK2

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Inimese papilloomiviirused.....	8
1.1.1 Inimese papilloomiviiruste genoomne ülesehitus ja viirusvalkude funktsioonid	10
1.1.2 Inimese papilloomiviiruse elutsüklid.....	14
1.2 Inimese papilloomiviiruse E2 valgu funktsioon ja rakulised interaktorid	18
1.3 Proteiinkinaas A struktuur ja funktsioon rakus.....	18
1.3.1 Proteiinkinaas A mõju inimese papilloomiviiruse replikatsioonile	22
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	24
2.1 Töö eesmärgid.....	24
2.2 Materjal ja meetodika	24
2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid.....	24
2.2.2 Töös konstrueeritud plasmiidid	26
2.2.3 Rakuliinid, bakteritüved ja söötmed	28
2.2.4 Transformatsioon ja plasmidi paljundamine paljundamine bakterites	29
2.2.5 Restriksioonianalüüs	29
2.2.6 U2OS rakkude transfektsioon	30
2.2.7 293-FT rakkude transfektsioon	30
2.2.8 Immuunosadestamine.....	31
2.2.9 Strep-E2 valgu ekspressioon ja puhastamine bakterirakust Strep-Tag meetodiga.....	32
2.2.10 GST-E1HA valgu ekspressioon ja puhastamine bakterirakust	33
2.2.11 Western blot.....	34
2.2.12 Totaalse DNA eraldamine.....	35
2.2.13 Replikatsioonianalüüs <i>Southern blot</i> meetodiga	35
2.2.13.1 Restriksioon	35
2.2.13.2 Gelelektroforees ja DNA ülekande nailonfiltrile.....	36
2.2.13.3 Hübridisatsiooniproovi valmistamine.....	36
2.2.13.4 Hübridisatsioon	36
2.2.14 E2 rakuliste interaktorite määramine	37
2.2.14.1 <i>In vitro</i> fosforülatsiooni reaktsioon	37
2.2.14.2 Massispektromeetria (MS) analüüs ja fosfosaitide määramine.....	37
2.3 Tulemused	38
2.3.1 PKA inhibeerib HPV5 <i>minicircle</i> genoomi replikatsiooni	38
2.3.2 HPV5 E1 ja E2 valkude ekspresseerimine ja puhastamine <i>E.coli</i> -st	39
2.3.3 GST-E1HA ja StrepE2 <i>in vitro</i> fosforüleerime CK2 ja PKA poolt.....	41
2.3.4 HPV5 E2 valgu ekspressioon ja funktsionaalsus U2OS rakkudes.....	42
2.3.5 HPV5 E2 valgu ekspressioon 293-FT rakkudes.....	45
2.3.6 HPV5FlagE2 <i>wt</i> ja <i>c.o. in vitro</i> PKA fosforülatsiooni reaktsioon.....	46

2.3.7 HPV5FlagE2 c.o. valgu PKA fosfosaitide tuvastamine.....	47
2.3.8 MS analüüsil leitud S402 fosfosaidi muteerimise efekt E2 valgule	49
2.3.9 HPV5FE2 rakuliste interaktorite tuvastamine.....	50
2.4 Arutelu.....	52
KOKKUVÕTE	55
KIRJANDUSE LOETELU.....	57
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	66
LISAD.....	67
LISA 1	67
LISA 2	67
LISA 3	68
LIHTLITSENTS.....	69

KASUTATUD LÜHENDID

AKAP – kinaasi ankurdavad valgud (*A-kinase anchoring proteins*)

BPV-1 – veise papilloomiviirus tüüp 1 (*Bovine papillomavirus type 1*)

c.o. – koodon optimeeritud (*codon optimized*)

CK2 – kaseiin kinaas 2 (*Casein kinase II*)

DBD – DNA-d siduv domeen (*DNA binding domain*)

DDR – DNA kahjustuse vastus (*DNA damage response*)

E valgud – varajased valgud (*Early*)

EV – geneetilise eelsoodumusega nahahaigus (*Epidermodysplasia verruciformis*)

E2BS – E2 valgu soendumiskoht (*E2 binding site*)

FBS – veise loote seerum (*fetal bovine serum*)

GST – glutatioon-S-transferaas

HA - hemaglutiniin

HPV – inimese papilloomiviirus (*Human papillomavirus*)

HSPG – hepariinsulfaat proteiinglükaan

IMDM – eukarüootsete rakkude koekultuuri sööde (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*)

IP – immuunosadestamine (*immunoprecipitation*)

L valgud – hilised valgud (*Late*)

LB – lüsogeenne sööde (*lysogeny broth*)

mc – pisirõngas (*minicircle*)

ND – tuumadomeenid (*nuclear domain*)

NES - tuuma eksportsignaal (*nuclear export signal*)

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

origin – nukleotiidjärjestus, millel alustatakse DNA replikatsioon

PAE – papilloomiviiruste varajaste transkriptide poliadenüleerimisjärjestus (*polyadenylation early*)

PAL – papilloomiviiruste hiliste transkriptide poliadenüleerimisjärjestus (*polyadenylation late*)

PBS – fosfaatpuhverlahus (*phosphate buffered saline*)

PEI – polüetüleenimiin

PKA – proteiin kinaas A (*protein kinase A*)

pRb – retinoblastoomi valk

PV – papilloomiviirus (*papillomavirus*)

R – reguleeriv subühik (*regulatory*)

RDR – rekombinatsioonist sõltuv DNA replikatsioon (*recombinant-dependent replication*)

SB – *southern blot*

SV40 – ahviviirus (*Simian virus 40*)

S402A – 402. positsioonis seriin muteeritudalaniiniks

S402D – 402. positsioonis seriin muteeritud asparagiinhappeks

URR – papilloomiviiruse mittekodeeriv reguleeriv järjestus (*upstream regulatory region*)

WB – *western blot*

wt – metsiktüüpi (*wild type*)

SISSEJUHATUS

Papilloomiviirused (PV – *papillomavirus*) on kaheaheelise DNA-ga viirused, mille peremeesorganismideks võivad olla lisaks imetajatele kalad, linnud, aga ka mõned roomajad. Nende ikosaedriline kapsiid ei ole võimeline nakatama retseptori puudumise tõttu epiteeli pindmist kihti, mistõttu on viiruse sisenemiseks vajalik mikrovigastus nahal.

Inimese papilloomiviirused (HPV – *Human papillomavirus*) on kõrge koespetsiifilisusega ja varieeruva onkogeense potentsiaaliga viirused, millega nakatumisel võib latentne infektsioon kesta aastaid. Bioloogilise vähiriski alusel jaotatakse HPV-d madala ja kõrge riskiga viirusteks. Madala riskiga tüübid põhjustavad healoomulisi vohandeid nahal, kõrge riskiga tüüpe seostatakse peamiselt emakakaelavähiga. Tulenevalt mitmete HPV-de onkogeensest potentsiaalist on nende uurimine teiste sugukonda kuuluvate tüüpidega võrreldes palju intensiivsem. Ravi emakakaelavähile puudub, kuid üks tõhusaim ennetamise võimalustest on vaktsineerimine.

Viiruse helikaas E1 ja transkriptsioonifaktor E2 on fosfovalgud, millel on oluline roll viiruse elutsükliks. See koosneb kolmest erinevast faasist, mis on tihedalt seotud epiteelkoe rakkude diferentseerumisega. Proteiinkinaasid modifitseerivad oma märklaudvalkude aktiivsust, reguleerides mitmeid bioloogilisi protsesse, sealhulgas HPV-de elitsükli. Viiruse replikatsiooniks vajalikud E1 ja E2 valgud on fosfovalgud ning nende posttranslatsioonilise fosforüülimine mõjutab viiruse jaoks tähtsaid protsesse. Nii võivad kinaasid mõjutada viiruse replikatsiooni aktiivsust, vahendada või inhibeerida valk-valk interaktsioonide teket, põhjustada valgu proteolüütilist lagundamist ning genoomide võrdset jaotumist tütarakkude vahel. Fakt, et paljud vähiravimid on oma funktsioonilt kinaaside inhibiitorid, kinnitab kinaaside bioloogilist olulisust ning teeb nende inhibiitoritest potentsiaalsed ravimikandidaadid.

Käesoleva magistritöö eesmärk on konstrueerida HPV5 E1 ja E2 replikatsioonivalkude ekspressiooniplasmiidid, et puhastada viiruse E1 ja E2 valgud ning analüüsida nende ekspressiooni ja *in vitro* fosforüleerimist CK2 ja PKA poolt. Seejärel leida E2 järjestuses asuvad PKA poolt fosforüleeritud aminohapped ning analüüsida leitud PKA märklaava muteerimise efekti E2 valgule.

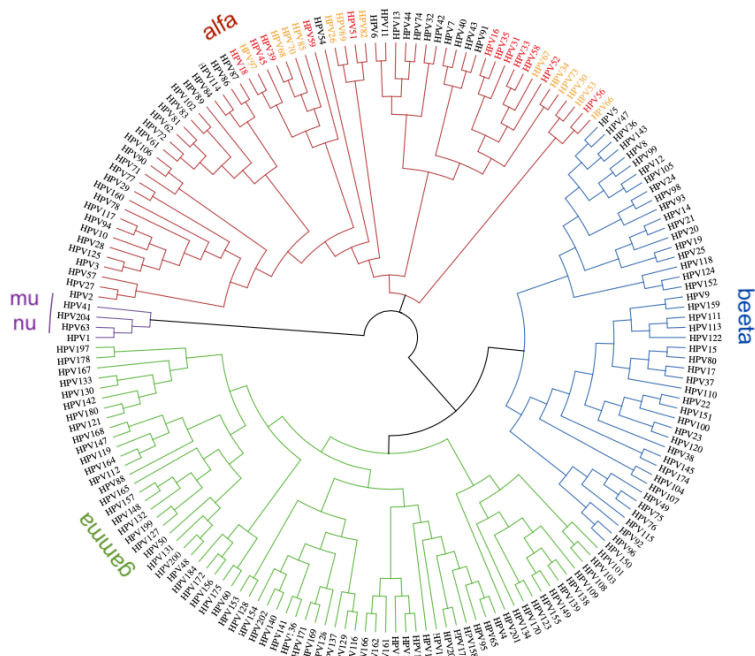
Magistritöö koostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Inimese papilloomiviirused

Papilloomiviirused (PV) on *Papillomaviridae* sugukonda kuuluvad kaheahelalise DNA-ga viirused, mille ligikaudu 8000 aluspaari suuruse rõngakujuline genoom replitseerub peremeesraku tuumas. Nad on kõrge koespetsiifilisusega ja varieeruva onkogeense potentsiaaliga viirused, mis on miljonite aastate jooksul arenenud, et levida väga mitmes erinevates liikides. PV-d nakatavad otsesel kontaktil selgroosete limaskestast ja/või epiteelkude ning nakkus võib kesta asümptomaatiliselt aastaid (Burd ja Dean, 2016).

Inimese papilloomiviiruste (HPV-de) infektsioon on etioloogiline tegur naha healoomuliste kondüloomide tekkel, aga ka peamine pahaloormuliste kasvujate põhjustaja genitaalpiirkonnas (nt emakakaela-, päraku- ja peenisevähk) ning ka pea- ja suupiirkonnas (Hartwig *et al.*, 2017). Praeguseni on teada üle 400 papilloomiviiruse tüübi, millest 218 nakatavad inimest (<https://pave.niaid.nih.gov/>). HPV-de fülogeneetiline jaotus põhineb kapsiidivalgu L1 valgu lugemisraami (ORF) järjestusel, mis on kõige konserveerunud geen viiruse genoomis. Nii on inimese papilloomiviirused jaotatud 5 eri perekonda: alfa, beeta, gamma, mu ja nu, mis erinevad nakatamisvõime ja bioloogilise vähiriski poolest (joonis 1).



Joonis 1. Inimese papilloomiviiruste fülogeneetiline puu. Sugukonda *Papillomaviridae* kuuluvate inimest nakatavate papilloomiviiruste fülogeneetiline puu kapsiidivalgu L1 kodeeriva lugemisraami DNA järjestuste erinevuste põhjal. Alfa papilloomiviirused nakatavad

limaskesti ja/või nahaepiteeli jaotudes madala vähiriskiga (joonisel oranžiga märgitud HPV tüved) aga ka kõrge riskiga viirusteks (joonisel punasega märgitud HPV tüved). Ülejäänud, ainult nahaepiteeli nakatavaid alfa, beeta (joonisel sinine) ja gamma (joonisel roheline) HPV-sid ei seostata enamjaolt vähiga kuid osad beeta papilloomiviirused võivad immuunpuudulikkusega inimestel olla kõrge vähiriskiga. Mu ja nu (joonisel lilla) papilloomiviiruseid ei seostata samuti vähi tekkega vaid healoomuliste vohanditega kätel või jalgadel (Muudetud joonis, A. A. McBride, 2017).

Bioloogilise vähiriski alusel jaotatakse seksuaalsel teel levivad HPV-d kõrge ja madala riskiga viirusteks. Madala onkogeense riskiga HPV-d tekitavad healoomulisi epiteeliaalseid vohandeid, kondüloome või emakakaela kerget düsplaasiat, mille tõenäosus areneda vähkasvajaks on väike. Ligikaudu 80% inimestest nakatub elu jooksul mõne madala riskiga papilloomiviiruse tüvega, mis tekitavad nahale tüükaid või genitaalpiirkonnas kondüloome. HPV tüübid 6 ja 11 põhjustavad umbes 90% suguelundite tüügastest.

Eripärane on, et näiteks beeta papilloomiviiruse perekonda kuuluvad madala riskiga HPV5 ja HPV8 võivad tekitada väga haruldase geneetilise eelsoodumusega nahahaigust (*Epidermodysplasia verruciformis*) põdevatel patsientidel nahavähi. Nahale tekivad tüükalaadsed moodustised, mis võivad muutuda pahaloomulisteks kasvajateks eriti nendes nahapiirkondades, mis pole päikese eest kaitstud (Ramos *et al.*, 2002).

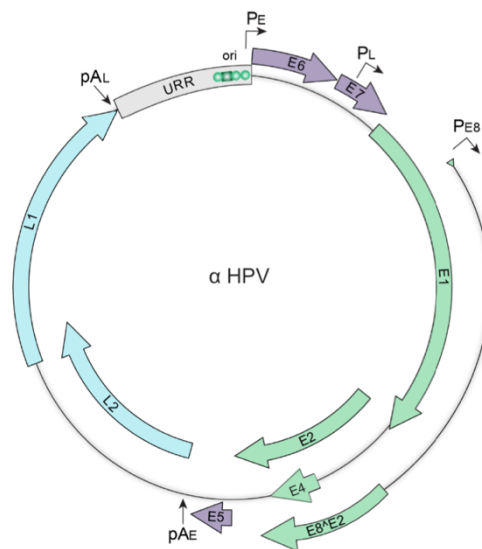
Kõrge riskiga viirused, nagu näiteks HPV tüübid 16, 18, 31, 33, 45 ja 52 on võimelised indutseerima pahaloomuliste kasvajate teket. Eelnimetatud HPV tüved võivad põhjustada lisaks emakakaela raskele düsplaasiale ja invasiivsele vähile häbeme- ja tupevähi, päraku- ja peenisevähi ning suuõõnevähi. Kõrge riskiga HPV tüvesid on teada umbes 20, neist kõrgeima riskiastmega emakakaelavähi tekkeks on HPV16 ja HPV18, millest HPV16 esineb umbes 50-60% ja HPV18 15-18% emakakaelavähi diagnoosiga patsientide koeproovis (Hartwig *et al.*, 2017).

Tulenevalt mitmete HPV-de onkogeensetest potentsiaalidest on nende uurimine teiste sugukonda kuuluvate tüüpidega võrreldes palju intensiivsem. Ravi emakakaelavähile puudub, kuid üks tõhusaim ennetamise võimalustest on vaktsineerimine. Kasutusel olevad vaktsiinid sisaldavad alati HPV16 ja HPV18 tüvesid, millele lisaks on HPV tüübid 6, 11, 31, 33, 45, 52 ja 58. Emakakaelavähk on küll regulaarsete sõeluuringutega hästi ennetatav ning vähieelsed seisundid ravitavad, kuid oluline on alustada vaktsineerimisega enne seksuaalelu algust, seda suuremat kaitset vaktsiin pakub (Wang *et al.*, 2020; World Health Organization, 2017).

1.1.1 Inimese papilloomiviiruste genoomne ülesehitus ja viirusvalkude funktsioonid

Inimese papilloomiviirustel on ikosaeedriline kapsiid diameetriga ~55 nm. Selles on rõngakujuline kovalentselt suletud kaheaahelaline DNA molekul, mille suurus on umbes 8000 aluspaari. Genoom koosneb varajasest (E – *early*) regioonist, kodeerides replikatsiooniks vajalikke valke (E1, E2 ja E4) ja onkovalke (E5, E6 ja E7), hilisest (L – *late*) regioonist, mis kodeerib viiruse kapsiidivalke (L1 ja L2) ning nende vahele jäävast regulaatorsest mittekodeerivast URR (*upstream regulatory region*) piirkonnast (joonis 2).

Varajane osa kodeerib valke, mis on vajalikud viiruse replikatsiooniks, transkriptsiooniks ja peremeesrakus muutuste esile kutsumuseks. Neid ekspresseerib viirus kogu elutsükli jooksul. Seevastu hiliseid valke ekspresseerib viirus ainult produktiivses infektsioonis. Regulaatorses, kuni 1000 aluspaari pikkuses mittekodeerivas alas asuvad viirusgenoomi replikatsiooniks ja transkriptsiooniks vajalikud *cis* elemendid. Näiteks peamise viirusliku regulaatorvalgu E2 ja rakuliste transkriptsioonifaktorite seondumissaidid, replikatsiooni alguskoht (*origin*) ja varajane ning hiline promooter. Papilloomiviiruste genoomi transkriptsioon on unipolaarne ning kõik lugemisraamid asuvad ühes DNA ahelas. Sarnaselt paljudele teistele viirustele on ka papilloomiviiruste valkude transkriptid polütsistronsed, mis tähendab, et iga transkript kodeerib mitut erinevat viirusvalku (A. A. McBride, 2017).



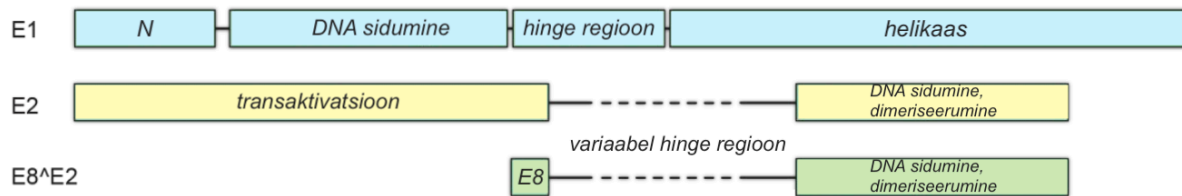
Joonis 2. Kõrge onkogeense riskiga alfa (α) papilloomiviiruse genoomi ülesehitus. Genoom koosneb varajasest regioonist, mis kodeerib replikatsiooniks vajalikke valke E1, E2, E4 ja E8^{E2} (joonisel roheline) ning onkovalkudest E5, E6, E7 (joonisel lilla). Viimastest ülesvoolu jääb URR (*upstream regulatory region*) (joonisel hall), mis sisaldab replikatsiooni

alguspunkti (ori - *origin*), milles on E1 ja E2 seondumiskohad (joonisel rohelised ringid hallil osal). Musta noolega on tähistatud vastavalt varajane (P_E), hiline (P_L) ja E8 (P_{E8}) promooter ning varjane (P_{AE}) ja hiline (P_{AL}) poliadenüleerimissait (Muudetud joonis (Fera *et al.*, 2021).

Papilloomiviiruste E1 on ainus ensümaatilise aktiivsusega viirusvalk. E1 monomeerid moodustavad ATP-st sõltuva heksameerse DNA helikaasi, mis on koos E2 valguga vajalik viirusgenoomi replikatsiooniks (Fouts *et al.*, 1999). E1 koosneb kolmest funktsionaalsest domeenist. Karboksüterminaalne domeen omab ATP-st sõltuvat helikaasset aktiivsust ning on oluline oligomeriseerumisel. Sellest ülesvoolu jääv ~160 aminohappeline järjestus omab DNA-d siduvat domeeni (tuntud ka kui DBD – *DNA binding domain*) ning aminoterminusel on ~50 aminohappeline osa, millel on tuumast väljumise- (NEZ – *nuclear export signal*) ja lokaliseerimisignaali (NLS – *nuclear localization signal*) (Castro-Muñoz *et al.*, 2019). On näidatud, et HPV E1 valguga tuuma-tsütoplasma transport on reguleeritud just NLS ja NES järjestuse fosforüleerimise kaudu. Bidirektsionaalse replikatsioonimudeli korral on E1 valguga replikatsiooni origini ära tundmiseks vaja E2 valku, mis seostub ise läheduses olevatele E2 seondumisjärjestustele (tuntud ka kui E2BS – *E2 binding site*) (Bergvall *et al.*, 2013). E1 valguga struktuur on skemaatiliselt esitatud joonisel 3.

E2 valgud seonduvad spetsiifiliselt viiruse genoomile, mis vastavalt järjestusele aktiveerivad või represserivad transkriptsiooni, seega on E2 valgud peamised papilloomiviiruse transkriptsiooni regulaatorid (Cripe *et al.*, 1987). Kõikide papilloomiviiruste E2 valgud on järjestusspetsiifilised DNA-ga seonduvad valgud, mille 12 aluspaariline seondumisjärjestus asub enamjaolt genoomi URR piirkonnas. Täispikk E2 koosneb kahest konserveerunud domeenist: N-terminaalsest transaktivatsiooni domeenist ja sellega seotud karboksüterminaalsest DNA seondumise domeenist. Kahe konserveerunud domeeni vahele jääb varieeruva aminohappelise järjestuse ja pikkusega *hinge* regioon (Giri ja Yaniv, 1988). E2 geenilt kodeeritakse valke viiruse infektsioonitsükli varajases ja keskmises faasis ning lugemisraamilt on võimalik alternatiivse splaissinguga saada erineva funktsiooniga geeniprodukte. Madalamate E2 valguga kontsentratsioonide juures toimib E2 kui transkriptsiooni aktivaator, kontsentratsiooni suurenedes hakkab E2 valk viiruse transkriptsiooni hoopis represserima (Steger ja Corbach, 1997). Kõik E2 valguga lühemad produktid, näiteks E8~E2, on tugevad viiruse transkriptsiooni ja replikatsiooni repressorid. Lisaks on E2 vajalik HPV genoomi segregatsioonil tütarakkudesse, kinnitades viiruse genoomid mitoosifaasis

moodustavatele kääviniitidele (Straub *et al.*, 2014). E2 ja E8^{E2} valkude struktuur on skemaatiliselt esitatud joonisel 3.



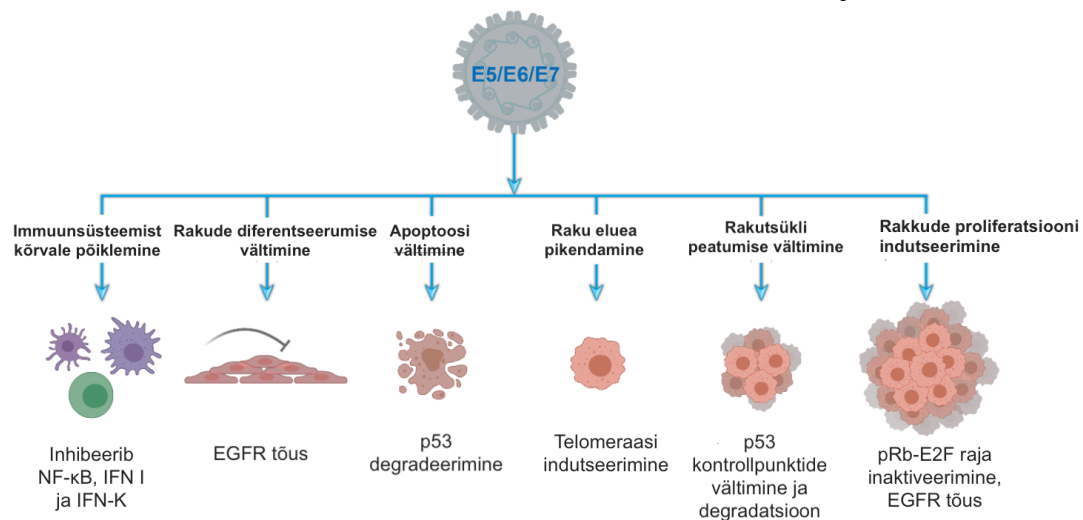
Joonis 3. Papilloomiviiruse E1, E2 ja E8^{E2} valkude funktsionaalsed domeenid. Joonisel on täispika E1 valgu neli funktsionaalset domeeni (joonisel helesinine). E1 koosneb maksimaalselt 650 aminohapest, mis moodustavad N terminaalse domeeni (joonisel tähistatud - N), DNA sidumise domeeni ja C-terminaalse domeeni. Aminoterminaalne domeen on vajalik viiruse replikatsiooniks ning polümeraasi seondamiseks replikatsiooni originile. Karboksüterminaalne domeen on ensümaatiliselt aktiivne ning on vajalik E1 valgu kahekordse heksameetri moodustumiseks, ATP-ga seondumiseks ja DNA ahelate eraldamiseks. Lisaks on selles domeenis konserveerunud struktuuritu aminohapete järjestus, mis arvatakse olevat oluline E1 heksameeri moodustumisel ja struktuuri säilitamisel DNA ahelate lahti harutamise ajal. E2 lugemisraamilt on võimalik saada täispikk valk (joonisel kollane) ja alternatiivse splaissinguga lühem produkt E8^{E2} (joonisel roheline), mis reguleerib viiruse transkriptsiooni ja regulatsiooni, et viiruse elutsükli latentse faasis säiliks madal koopiaarv viiruse episoomide. Suures kontsentratsioonis takistab E8^{E2} täispika E2 valgu seondumist E2 seondumisjärjestustele ja represseerib E2 funktsioone (Muudetud joonis Fera *et al.*, 2021).

E4 on liitvalk, mis transleeritakse splaissitud E1^{E4} mRNA-lt (Yajid *et al.*, 2017). On näidatud, et selle valgu kontsentratsioon on kõige kõrgem viiruse elutsükli hilistes etappides. Seda kinnitavad kliinilised leiud nii HPV-ga nakatunud koebiopsiatest aga ka nahatüügastest (Breitburd *et al.*, 1987). E4 olulisim funktsioon on seonduda raku keratiini filamentidega. Nii soodustatakse nakatunud raku epiteeli ülemistes kihtides keratiini võrgustiku ümberkorralduse, mis omakorda soodustab virionide vabanemist. Lisaks on näidatud, et E4 on võimeline esile kutsuma rakutsükli peatumist G2/M faasis ning peremeesraku suunamist apoptoosi (Davy ja Doorbar, 2007).

E5 valku ei kodeeri kõik papilloomiviirused. See on lühike transmembraanne onkovalk, mis hoiab epidermaalse kasvufaktori retseptorit pidevalt aktiivses olekus, soodustades peremeesraku piiramatut jagunemist. Nii takistatakse peremeesrakus apoptootiliste radade aktiveerimist ning viiruslike antigeeni esitlemist HPV positiivsete rakkude pinnal (Straight *et al.*, 1993).

E6 on samuti onkovalk mille peamine sihtmärk rakus on tuumorsupressorvalk p53. Kõrge riski viiruste E6 valgul on võime indutseerida p53 degradatsiooni moodustades trimeerse kompleksi raku ubikvitiinligaasiga E6AP. Madala riskiga viiruste E6 on samuti võimeline p53-ga seonduma, kuid väikesema afiinsusega, mis ei põhjusta valgude degradeerimist. Sellega kaob regulatsioon rakutsükli regulaatoritelt, DNA parandusmehhanismidelt ja apoptoosi kodeerivate geenide regulaatoritelt (Slebos *et al.*, 1995).

E7 on sarnaselt E5 ja E6 valkudele onkovalk, mille sihtmärk on peremeesrakus pRB (*retinoblastoma protein*) perekonna tuumorsupressorvalgud. Viimastel on väga oluline roll DNA replikatsioonil ja reparatsioonil aga ka apoptoosi ja rakkude diferentseerumise ära hoidmisel. Kõrge riskiga HPV E7 suudab pRB valkudega seondudes lagundada pRB E2F kompleksi, mille tõttu vabanevad E2F transkriptsioonifaktorid, mis indutseerivad rakutsükli S-faasi toimumiseks vajalike geenide ekspressiooni (Münger ja Howley, 2002). Papilloomiviiruste onkovalkude märklauad on skemaatiliselt näidatud joonisel 4.



Joonis 4. Inimese papilloomiviiruse onkovalkude E5, E6 ja E7 funktsioonid peremeesrakus. E5, E6 ja E7 modifitseerivad rakusisest keskkonda, et toetada esialgset viiruse säilimist basaalses keratinotsüütides ning hiljem, juba terminaalselt diferentseerunud mitte

jagunemisvõimelistes keratinotsüütides, vegetatiivset amplifikatsiooni. Lisaks takistavad immuunsüsteemi aktiveerimist inhibeerides NF-kB (*Nuclear Factor kappa B*). Epidermaalse kasvufaktori retseptori (EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*) indutseerimine rakkude pinnal soodustab rakkude kontrollimatut jagunemist, millele aitab kaasa viiruse poolt suunatud p53 degradatsioon. E6 valk suudab aktiveerida inimese telomeraasi pöördtranskriptaasi (hTERT – *human Telomerase Reverse Transcriptase*), mis stabiliseerib telomeraasi otsi, vältides telomeeride lühenemist ja sellega raku eluea vähenemist.

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

1.1.2 Inimese papilloomiviiruse elutsükkel

Naha epiteeli alumise kihi moodustavad basaalmembraani külge kinnitunud jagunemisvõimelised tüvirakud, mis jagunevad asümmeetriliselt uueks tüvirakuks ja tütarrakuks. Tüvirakk säilitab jagunemisvõime, tütarakk lahkub basaalmembraanilt ja alustab liikumist epiteelkoe pindmistes kihtidesse, kaotab jagunemisvõime ja alustab diferentseerumist. Diferentseerumise käigus väljuvad tütarrakud rakutsüklist, muudavad geeniekspressiooni kuni lõpuks irduvad surnud keratinotsüüdid epiteelkihist.

HPV-de infektsioonitsükkel sõltub otseselt peremeesrakkude diferentseerumisastmest ning eristada saab kolme elutsükli etappi, mille käigus muutub muuhulgas viirusgenoomide koopiate arv (joonis 6).

1. Nakatamise faas

Inimese papilloomiviiruse virionid ei suuda iseseisvalt epidermise lameepiteelile seostuda ja seda nakatada. Peremeesrakku sisenemiseks puudub retseptor mistõttu on esmalt vajalikud mikrovigastused nahas, mille kaudu viirusel on võimalik nakatada basaalkihi keratinotsüüte.

Haava või mikrovigastuse paranemisest tingitud rakkude jagunemine on vajalik viiruse tuuma sisenemiseks.

Esmane viiruse L1 kapsiidivalgu seondumine basaalsete rakkude pinnal oleva hepariinsulfaat proteiinglükaaniga (HSPG) kutsub esile kapsiidi konformatsioonilised muutused. Sellega väheneb retseptori afiinsus ja viirus kantakse üle sekundaarsele retseptorile. Viiruspartikli konformatsiooniliste muutuste tagajärjel saab L2 kapsiidivalgu aminoterminus kättesaadavaks furiini proteaasidele, mis on vajalikud HPV infektsiooniks (Richards *et al.*, 2006). Viiruspartikkel siseneb rakku klaritiin-kalveoliin sõltuva endotsütoosiga, läbides endosoomis järjekordse konformatsioonilise muutuse, mistõttu kapsiidivalk L1 dissotseerub genoomi ja L2 kompleksist ning suunatakse lüsoosoomidesse (Bienowska-Haba *et al.*, 2012). Järele jäänud L2 valk seondub rakus düneiiniga, mis transpordib viiruse genoomi mööda mikrotoubuleid rakutuuma. Viiruse genoomi sisenemiseks rakutuuma on vajalik mitoos ja tuumaümbrise lagunemine.

Kapsiidivalk L2 on võimeline ümber paigutama tuumas olevaid valke, et hõlbustada viiruse varajast transkriptsiooni, kuna esmane transkriptsioon viiruse genoomilt on kontrollitud rakuliste faktorite poolt. See protsess on jäänud salapäraseks, aga samas on andmeid, et sfäärilised ND10 kehakesed, mille ümber viirusgenoomi ja L2 kompleks hoitakse, limiteerivad papilloomiviiruse infektsiooni efektiivsust (Everett, 2006).

Viiruse esialgne amplifikatsioon indutseerib peremeesrakus DNA kahjustuse vastuse (DDR – DNA *damage response*). Varjane faas initsieeritakse veel diferentseerumata basaalsetes keratinotsüütides varajaselt promootorilt (P_E) ja lõpetatakse varajasel polüadenüleerimissaidil (pA_E). Nakatunud rakkudes hoiab viirus esialgse amplifikatsiooni ajal madalat koopiaarvu ja replitseerub rakutsükliga sünkroonselt ekstrakromosomaalsete elementidena. Kui nakatunud rakud jagunevad ning eemalduvad basaalmembraanist suprabasaalsesse kihti, toimub diferentseerumine.

2. Stabiilne faas ehk latentne infektsioon

PV nakkuse stabiilne faas ehk latentne infektsioon algatatakse (supra)basaalsetes rakukihtides varajaselt promootoril P_E ning lõpetatakse samuti varajasel polüadenüleerimisjärjestusel. Selle

tulemusel on viiruse E1 ja E2 valkude hulk piisavalt tõusnud, et initsieerida DNA replikatsiooni.

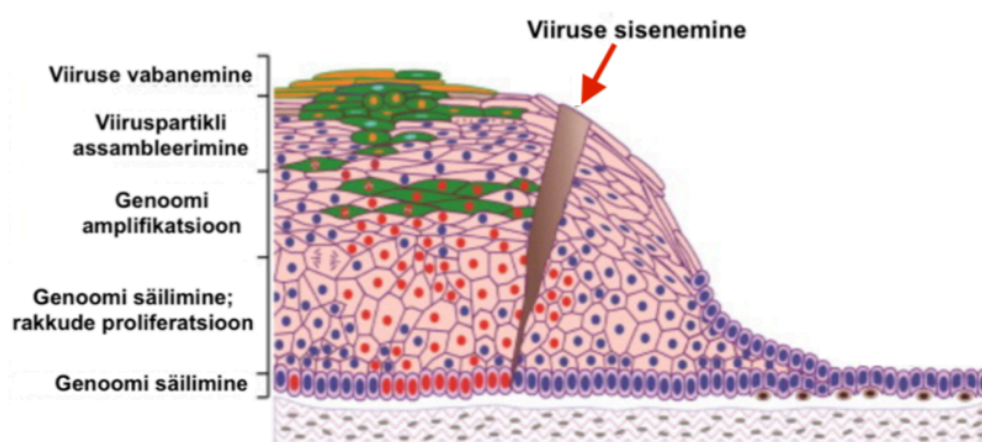
Sündmused, mis reguleerivad viirusinfektsiooni üleminekut latentssesse faasi on seni teadmata. Välja on pakutud kaks võimalikku varianti kuidas viirus stabiilses faasis oma genoomi replitseerib. Esimene on, et viiruse DNA replitseerub kord rakutsükli jooksul, sünkroonselt raku DNA-ga. See tähendab, et viiruse replikatsiooni initsiatsioon on täielikult kontrollitud peremeesraku replikatsioonifaktorite poolt (Hoffmann *et al.*, 2006). Teised autorid väidavad, et viirus replitseerub juhuslikult ja initsiatsioon viiruse replikatsiooni *originilt* ei ole rangelt kontrollitud. Seetõttu osa molekule replitseerub rohkem kui ühel korral rakutsükli S-faasis, samas osad ühe korra ja mõned ei replitseeru üldse (Pirsoo *et al.*, 1996; Ravan *et al.*, 1992). Selline replikatsioonimehhanismide vahetamine võib olla seotud E1 kontsentratsiooniga. Näiteks HPV16 replikatsiooni initsiatsioon keratinotsüütide W12 rakuliinis on kõrge E1 kontsentratsiooni puhul rangelt 1 kord rakutsüklis (Hoffmann *et al.*, 2006).

3. Produktiivne infektsioon ja virionide vabanemine

Viiruse viimases infektsioonifaasis ekspresseeritakse efektiivseks nakatumiseks vajalikke L1 ja L2 kapsiidivalke, mille transkriptsioon algatatakse hiliselt promootorilt (P_L) ja lõpetatakse vastavalt hilisel polüadenüleerimisjärjestusel (pA_L). Selleks on vaja E1 ja E2 valkude kõrget kontsentratsiooni. Kui viirusega nakatunud rakud jõuavad basaalkihist epiteeli ülemistesse kihtidesse, inhibeeritakse E1 ja E2 geenide ekspressioon varajaselt promootorilt ning indutseeritakse E2 sõltumatu hiline promootor (Graham, 2017).

Hilise promootori aktiveerimisel osaleb E7 ning see on aktiivne vaid diferentseerunud epiteeli rakkudes. Arvatakse, et produktiivse infektsiooni toimumiseks replitseerub viirus rekombinatsioonist sõltuva mehhanismi abil (RDR – *recombination dependent replication*), mille tulemusel aktiveeritakse homoloogiline rekombinatsioon. Homoloogiline rekombinatsioon viiakse läbi peale DNA sünteesi hilises S- või varajas G2- rakutsükli faasis ja selle abil parandatakse raku kaheaheelalisi DNA katkeid. Rekombinatsioonist sõltuv replikatsioon on ühesuunaline ega vaja *origini* ja selle abil on võimalik sünteesida suurtes kogustes pikki konkatemeerseid DNA molekule. Lisaks tekitavad viiruse ekspresseeritud onkovalgud rakulise DNA kahjustuse, mis tagab suures hulgas rakulisi faktoreid, et alustada teist amplifikatsiooni (Moody ja Laimins, 2009).

Infektsioon lõppeb terminaalset diferentseerunud keratinotsüütides, kus toimub L1 ja L2 kattevalkude süntees, viirusgenoomide pakkimine kapsiidi ja uute nakatamisvõimeliste viiruspartiklite väljumine rakust koos surnud rakkudega epiteeli kõige pindmistest kihtidest. Huvitav on, et surnud keratinotsüütides kaob mitokondriaalne oksüdatiivne fosforüleerimine, mis muudab keskkonna enne viiruse väljumist redutseerivast oksüdeerivaks. Nii tekib viiruse L1 kapsiidivalgude vahele palju disulfiidsildu, mis muudab tekkinud viiruspartiklid stabiilsemaks (Buck *et al.*, 2013).



Joonis 6. Papilloomiviiruste infektsioonitsükkel ehk elutsükkel. Mitmekihilises lameepiteelis on HPV nakkuseks oluline mikrovigastuse olemasolu, et viirus pääseks basaalmembraani keratinotsüütideni (tähistatud joonisel punase noolega). Peale rakku sisenemist säilib viirus nakatatud rakkudes episoomina (50-100 koopiat raku kohta). Madalamates ja keskmistes epiteelikihtides olevad rakud jagunevad viiruse E6 ja E7 onkovalkude tõttu (joonisel punase tuumaga rakud). Keskmistest kihtides olevad rakud on enamasti S- või G2- rakutsükli faasis, mis nõuab viiruse E4 valku, ning toimub viiruse genoomi amplifikatsioon (joonisel rohelised rakud, punaselt värvitud tuum näitab viiruse replikatsiooni toimumist). Ülemistes epiteelikihtides lahkuvad rakud rakutsüklist ning E4 valgu kaasabil sünteesitakse L1 ja L2 kapsiidivalgud, et toimuks viiruse genoomi pakkimine viiruspartiklisse (joonisel oranžid rakud) (Muudetud joonis Doorbar *et al.*, 2012).

1.2 Inimese papilloomiviiruse E2 valgu funktsioon ja rakulised interaktorid

Papilloomiviiruste E2 on koos E1 valguga ainsad viiruse poolt kodeeritud replikatsiooni initsiatsioonil osalevad valgud. Muidu on HPV replikatsioon sõltuv peremeesraku faktoritest, mida sünteesitakse vaid rakutsükli S-faasis. Nii on E2 valgu peamine ülesanne kaasata rakulisi faktoreid seondudes viiruse genoomis spetsiifilistele järjestustele, mis sõltuvalt E2 hulgast, aktiveerivad või inhibeerivad transkriptsiooni. Selline seondumine pidurdab steeriliselt rakuliste faktorite, näiteks Sp1 ja TBP, seondumist lähedaolevatele promooterjärjestustele (Bernard *et al.*, 1989; May *et al.*, 1994). Samuti on näidatud, et transkriptsiooni repressioon on tingitud raku kromatiiniga manipuleerimisest (Nishimura *et al.*, 2000). Huvitav on, et E2 liiga kõrge kontsentratsioon on inhibeeriva mõjuga nii HPV-ga nakatunud kui ka nakatumata rakkudes.

E2 geenilt kodeeritud lühemad valgud repressivad E2 funktsiooni, seondudes võistlevalt samadele seondumisjärjestustele. Samuti võivad lühemad valgud seonduda E2 valgu endaga, mis põhjustab selle dimeriseerumist (Barsoum *et al.*, 1992)

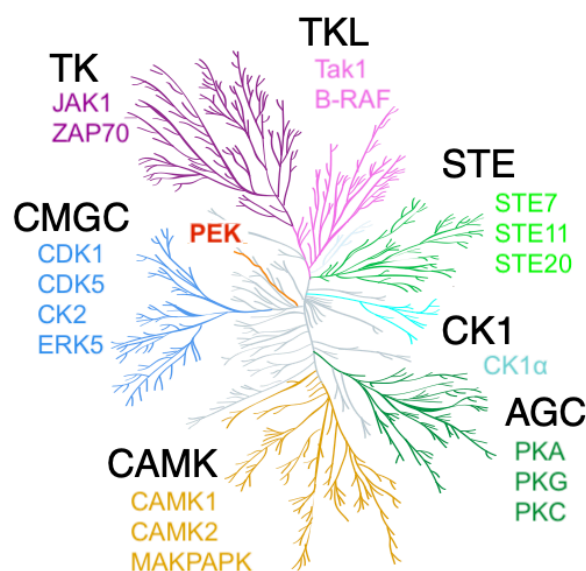
Lisaks replikatsiooni regulatsioonile on viiruse koopiaarvu stabiilseks säilimiseks oluline, et peremeesraku jagunemise käigus toimuks ka HPV episoomide võrde jaotumine tekkinud tütarakkude vahel. Näiteks veise papilloomiviiruse BPV-1 (BPV – *bovine papillomavirus*) E2 seondub URR piirkonnas spetsiifilistele seondumisjärjestustele, lisaks rakulise valguga Brd4, millega on viiruse genoomid ankurdatud peremeesraku mitootilistele kromosoomidele (You *et al.*, 2004). Lisaks stabiliseerib ja kaitseb Brd4 seondumine E2 N-terminaalse domeeniga seda E3 ubikvitiinligaasi *cullin 3* eest (Zheng *et al.*, 2009). Huvitav on, et alfa HPV-de E2 valgud võrreldes beeta HPV-de E2-ga, interakteerub Brd4-ga nõrgemini (McPhillips *et al.*, 2006). Alfa HPV-de puhul arvatakse, et rakulised interaktorid võivad olla MKIp2, ChIR1 ja TopBP1 (Donaldson *et al.*, 2007; Parish *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007).

1.3 Proteiinkinaas A struktuur ja funktsioon rakus

Proteiinkinaasid (PK) on evolutsiooniliselt konserveerunud, organismides laialt levinud fosforüleerivad valgud, millel on domineeriv regulatoorne roll enamikus raku funktsioonides ja signaaliradades – sealhulgas metabolismis, geeni ekspressioonis, raku jagunemises ja diferentseerumises ning programmeeritud rakusurmas. Samuti osalevad nad immuun- ja närvisüsteemi funktsioneerimises.

Valkude fosforüleerimise kui regulatoorse mehhanismi avastasid 1958. aastal Krebs ja Fischer näidates esmakordselt, et kovalentselt seotud fosforüülrühm aktiveerib ensüümi (Krebs *et al.*, 1959). Eukarüootide proteiinkinaasid katalüüsivad fosfaatrühma ülekannet ATP-lt seriini, treoniini või türosiini aminohappejäägi hüdroksüülrühmale. PKA fosforüleerib eelistatult substraate, millel esineb konsensusjärjestus Arg-X-Ser/Thr või Arg-Arg/Lys-X-Ser/Thr-Leu/Ile, kus X tähistab ükskõik mis aminohappejääki. PKA kuulub AGC kinaaside perekonda, mis on saanud oma nime sinna kuuluvate kinaaside PKA, PKG ja PKC järgi.

Huvitav on, et kinaase kodeerivad geenid moodustavad ligikaudu 2% genoomist, mis hõlmab üle 500 eraldiseisva geeni inimgenoomis. PK-d jagunevad alamperekondadesse vastavalt nende omavahelisele homoloogiale (joonis 7). Lisaks on kuni 30% kõigist inimorganismi valkudest modifitseeritavad kinaaside poolt ning kõrvalekalded normaalsest fosforüülimisest, aga ka PK-de aktiivsusest, mõjutab raku funktsioone ja võib põhjustada haiguseid. PK-de signaalihäiretega seostatakse üle 400 haiguse, sealhulgas Alzheimeri tõve, vähkkasvajaid aga ka diabeeti. Fakt, et paljud vähiravimid on oma funktsioonilt kinaaside inhibiitorid, kinnitab kinaaside bioloogilist olulisust ning teeb nende inhibiitoritest potentsiaalsed ravimikandidaadid (Manning *et al.*, 2002).



Joonis 7. Eukarüootide suurimad proteiinkinaaside perekonnad ja nende tuntumad esindajad. Joonisel on esindatud eukarüootide proteiinkinaaside 7 perekonda ning nende

alamperekonnad. Uurimistöös kasutatud PKA (joonisel tumeroheline) on seriin/treoniin kinaas, mis on AGC perekonna prototüüp. CAMK (joonisel kollane) on Ca^{2+} /kalmoduliin sõltuv kinaas mille aktiveerib rakusisene kaltsiumiooni ja kalmoduliini tõus. Türosiin kinaasid (TK – joonisel lilla) fosforüleerivad eranditult vaid türosiinijääke ja on teadaolevalt kinaaside perekonnas kõige noorem grupp. Türosiin kinaasi sarnane (TKL – joonisel roosa) kinaasid on levinuimad taimede seas ja türosiin kinaaside perekonnaga sarnanemise tõttu on nimi nendest tuletatud. Seriin/treoniin kinaaside perekond (STE – joonise heleroheline) koosneb kolmest alamperekonnast (STE7, STE11, STE20), mis järjestikku aktiveerivad üksteist, et seejärel aktiveerida MAPK liikmeid. Kaseiin kinaas 1 (CK1 – joonisel helesinine) perekonna liikmete omavaheline sarnasus on teadaolevalt suurim, neid ekspresseeritakse vastusena rakustressi signaalidele. CMGC perekonna liikmed (CDK1 - joonisel sinine) on rakutsükli reguleerijad. PEK kinaaside perekond (joonisel punasega) aktiveerub rakulise stressi, näiteks dsRNA olemasolul (Muudetud joonis Pincus *et al.*, 2018).

Esimene kristalliseeritud kinaas oli proteiinkinaas A (*protein kinase A* – PKA), mis tänu konserveerunud katalüütilisele subühikule, on andnud aluse eukarüootsete proteiinkinaaside klassifitseerimisele ja võimaldanud mõista suure hulga kinaaside funktsioone (Knighton *et al.*, 1991). PKA on 3',5'-tsükliilisest adenosiinmonofosfaadist (cAMP) sõltuv seriin- või treoniinkinaas, mida tuntakse ka kui cAMP-sõltuva proteiinkinaasina (Hallows *et al.*, 2009). Esimene PKA puhastati küüliku skeletilihastest juba 1968. aastal (Walsh *et al.*, 1968) ning selle struktuuri ja funktsiooni on uuritud nii pärmis (Tamaki, 2007), äädikakärbses (Noveen *et al.*, 1996) kui imetajas (Skålhegg ja Tasken, 2000).

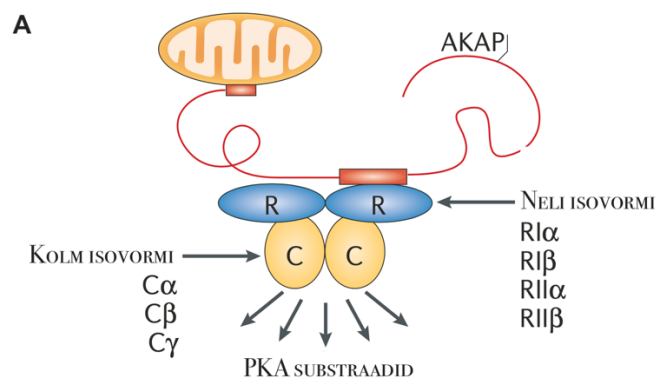
Rakuvälised signaalid nagu hormoonid või neurotransmitterid, võivad tõsta rakusisese cAMP taset, mis vastutab otseselt PKA aktivatsiooni eest. Olenevalt raku tüübist ja staatusest võib kõrge cAMP tase aktiveerida või ka inhibeerida raku proliferatsiooni ja rakutsükli.

Imetajate rakkudes hoitakse PKA valdavalt inaktiivses kompleksis, mis koosneb kahest katalüütilisest CI ja CII (*catalytic* – C) ning kahest reguleerivast RI ja RII (*regulatory* – R) subühikust, millest viimased omavad kahte cAMP-d siduvat domeeni. Reguleeriva subühiku isovormide RI α ja RI β homoloogsus on 85%, kuid huvitaval kombel pole kumbki funktsionaalselt vajalik. Samas on näidatud, et RI α geeni inaktiveerimine on hiire lootele letaalne. Veel on huvitav, et võrreldes RI α isovormiga, millel spetsiifiline

ekspressioonimuster puudub ja mis välise stiimuli puudumisel difundeerub tsütoplasmasse, ekspresseerub RI β spetsiifiliselt neuronites ja on lokaliseerunud mitokondris. Peamine erinevus RI ja RII subühikute vahel on RII subühiku inhibitoorses järjestuses olev seriinijääk, mis võimaldab selle fosforüleerimist katalüütilise subühiku poolt. RII subühikul seevastu on seriin asendatudalaniini või glütsiiniga, mis toimivad kui fosfomimeetikumid, mis tähendab et neid ei fosforüleerita PKA poolt ning kinaas jääb inaktiivseks (Cadd ja McKnight, 1989; Clegg et al., 1988; Ilouz et al., 2012).

PKA katalüütilised subühikud on võrreldes reguleerivate subühikutega konserveerunud. Konstantne regioon koosneb väiksemast N-terminaalsest ja suuremast C-terminaalsest osast, mida ühendab hüpervariaabel segment ehk linker. N- ja C terminaalised osad moodustavad katalüütilise tasku, mis võimaldab seonduda kahel Mg²⁺ või Mn²⁺ ja ATP erinevatel osadel läbi fosfaatrühma, ribosijäägi, või tekitades adeniini seondumistasku ning hüdrofoobse avause (Elkins ja Knapp, 2012).

Et reguleerivad subühikud ei seonduks katalüütilistega, muutub nende konformatsioon peale kahe cAMP seondumise kompaktsemaks. See eemaldab katalüütiliste subühikute inhibitsiooni, avatud konformatsioon muutub suletuks, mis aktiveerib kinaasi ja võimaldab signaalmolekulide fosforüleerimist. Katalüütilise reaktsiooni lõppedes vabastatakse substraat ja katalüütilised subühikud eralduvad teineteisest, moodustades uuesti avatud kompleksi (Reikhardt ja Shabanov, 2020). PKA struktuuri illustreerib joonis nr 8.



Joonis 8. PKA holoensüümi struktuur. PKA holoensüüm koosneb kahest katalüütilisest (joonisel tähistatud C, kollane) ja kahest reguleerivast (joonisel tähistatud R, sinine) subühikust. Eükarüootsetes rakkudes kodeeritakse nelja reguleeriva subühiku isovormi RI α , RI β , RII α ja RII β ja kolme katalüütilise subühiku isovormi C α , C β ja C γ . AKAP valgud (A-

kinase anchoring proteins), mis seonduvad tetrameerse PKA reguleeriva subühikuga (joonisel R, sinine), sunates seeläbi PKA rakulistesse kompartmentidesse, mille läheduses on kõrgem substraadi (cAMP) kontsentratsioon. Joonisel on kujutatud AKAP seondumist reguleeriva subühikuga, mis on ankurdatud mitokondri külge (Muudetud joonis Taylor *et al.*, 2012).

PKA aktiveerimiseks on olulised AKAP valgud (*A-kinase anchoring proteins*), mis seonduvad tetrameerse PKA reguleeriva subühikuga (Carr *et al.*, 1991; Newlon *et al.*, 1999). Kuna fosforüleerimine võib olenevalt valgust olla nii aktiveeriva aga ka inhibeeriva toimega, mida kontrollivad kinaaside ja fosfataaside vastastikused reaktsioonid, võimaldab eri komponentide lähedal asetsemine ruumiliselt ja ajaliselt kontrollida substraadi fosforüleerimist või defosforüleerimist. Nii on võimalik PKA paigutada erinevate rakuliste organellide, näiteks tsütoskeleti, ER-i aga ka ioonkanalite lähedusse, kaasates teisi signalisatsiooniks vajalikke ensüüme (Langeberg ja Scott, 2005).

Näiteks AKAP220 sihtmärgid on PKA, PP1 (*protein phosphatase 1*) ja glükogeeni süntaasi kinaas 3β (GSK3 β). Nii moodustub kompleks, kus GSK3 β aktiivsus väheneb PKA fosforüleerimise tõttu (Tanji *et al.*, 2002). AKAP95 seondub samuti PKA reguleeriva subühikuga, ankurdades kompleksi mitootilistele kromosoomidele. Kuna on teada, et papilloomiviiruse genoomi seondumine kromosoomidega toimub E2 valgu vahendusel, on väga tõenäoline, et AKAP95 kompleks fosforüleerib kromosoomide vahetus läheduses E2 valku, et tõsta enamikel juhtudel valgu aktiivsust (Collas *et al.*, 1999)(Landsverk *et al.*, 2001). Praegu on teada vähemalt 20 erinevat AKAP-d, mis on seotud raku tsentrosoomi, mitokondri, Golgi või plasmamembraaniga, viies omavahel kokku kinaasid, fosfataasid, fosfodiesterasid, retseptorid ja/või ioonkanalid (Wong *et al.*, 2001). Nii on AKAP-d võimelised komplekselt moduleerima signaalide kaskaadi, mis hõlmab nii rakutsükli, valkude liikumist membraanis aga ka ioonkanalite funktsioneerimist.

1.3.1 Proteiinkinaas A mõju inimese papilloomiviiruse replikatsioonile

Papilloomiviiruste E2 valgu funktsioone ja omadusi moduleerivad mitmed rakusisesed kinaasid läbi posttranslatsiooniliste modifikatsioonide. On näidatud, et enamiku papilloomiviiruste E2 valgu hinge regioonis asub palju proliini, seriini, treoniini, glütsiini ja arginiini jääke. Hinge regioon ei ole küll vajalik E2 funktsioonideks, transkriptsiooniks ja replikatsiooniks, kuid iga PV perekonna sees on konserveerunud hinge järjestused, mis vastutavad rakusisese lokaliseerumise, kromatiiniga seondumise aga ka E2 valgu stabiilsuse

eest. Tihtipeale on eelnimetatud funktsioonid reguleeritud posttranslatsiooniliste modifikatsioonidega, eriti fosforüleerimisega. Näiteks BPV1 E2 hinge regiooni DNA seondumise domeeni kõrval asub konformatsioonilise muutuse eest vastutav osa, mille konformatsioon sõltub fosforüleerimisest (Garcia-Alai *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 1989; Penrose *et al.*, 2004). Huvitaval kombel põhjustab selle regiooni fosforüleerimine CK2 poolt E2 valgu proteolüütilise lagundamise (McBride ja Howley, 1991; Penrose ja McBride, 2000). Kuna E2 valgu kontsentratsioon on peamine regulaator viiruse replikatsiooni ja transkriptsiooni toimumisel, siis liiga kõrgetel E2 kontsentratsioonidel basaalkihi rakkudes, suunab viirus selle proteolüütilisele lagundamisele, et säiliks viiruse madal koopiaarv. Huvitav on, et BPV1 E2 valgus 301. seriinjäägi – S301 muutmine mittefosforüleeritavaksalaniiniks põhjustab valgu poolestusaja pikenemist ja vähendab valgu suunamist proteolüütilisele lagundamisele. See on tõenäoliselt konserveerunud modifikatsioon mitmetes papilloomiviirustes, et reguleerida viiruse koopiaarvu rakus (Penrose *et al.*, 2004).

On näidatud, et HPV8 E2 aminohappest jäägid R250 ja S253 on hädavajalikud, et viiruse genoomid ankurdata peremeesraku mitotoilistele kromosoomidele. Nende vahele jääb väga levinud kinaasne motiiv RXXS, mis on kõrgelt konserveerunud kõigi beeta papilloomiviiruste seas. Huvitav on, et RXXS motiivis esinev S253 on fosforüleeritud PKA poolt, mis lisaks E2 valgu stabiliseerimisele reguleerib ka seondumist peremeesraku kromatiiniga. Nii on fosforüleeritud S253 tase kõrgeim enne rakutsükli S faasi, mis püsib kuni mitoosi lõppemiseni, mille järgselt interfaasi sisenevates rakkudes E2 valk defosforüleeritakse ja degradeeritakse. Erinevalt HPV8-st on HPV16 E2 valk stabiilsem just defosforüleeritud kujul, võimendades seeläbi viiruse transkriptsiooni (Sekhar ja McBride, 2012).

Veel on teada, et PKA fosforüülib BPV E1 valgu 109. seriinjääki - S109. Selle seriini muutmine mitte fosforüleeritavaksalaniiniks suurendab replikatsiooni aktiivsust, kuid asendades seriini fosforüleerimist mimikeerivaks asparagiinhappeks, väheneb replikatsiooni aktiivsus võrreldes *wt* BPV-ga. See näitab, et PKA suudab reguleerida papilloomiviiruste replikatsiooni aktiivsust.

On leitud, et PKA reguleerib spetsiifiliselt kõrge riskiga HPV tüvede onkovalke. Nimelt ekspresseerivad kõik kõrge riskina klassifitseeritud HPV tüved E6 valku, mille C-terminaalses otsas on klass I PDZ seondumismotiiv RXXT/S (PBM– PDZ *binding motif*), mis seondub teiste PDZ domeeni sisaldavate rakuliste valkudega (Gardioli *et al.*, 1999). Üheks näiteks on raku polaarsuse reguleerijad *Dlg* ja *Scribble*, millest esimene degradeeritakse HPV18 E6 ja teine HPV16 E6 valgu poolt (Thomas *et al.*, 2005). See näitab, et E6 valgu seondumisel PDZ domeeni sisaldava valguga võivad tagajärjed olla väga erinevad. Lisaks, sõltuvalt HPV tüübist,

võib E6 valku fosforüleerida PKA või AKT (tuntud ka kui PKB - *Protein kinase B*), häirides E6 seondumist PDZ seondumismotiiviga substraatidega ja vähendades seeläbi viiruse produktiivse infektsiooni tõenäosust (Boon ja Banks, 2013).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärk on konstrueerida HPV5-GSTE1HA märgisega valku kodeeriv plasmiid, koodon optimeeritud ja koodon optimeerimata HPV5 E2 valku kodeerivad plasmiidid ja leida neis paiknevad *in vivo* fosforüleeritud aminohapped. Lisaks uurida HPV5 E1 ja E2 interaktsiooni. Selleks püstitati järgmised eesmärgid:

1. Uurida PKA mõju HPV5 *minicircle* replikatsioonile U2OS rakuliinis
2. Analüüsida bakterist puhastatud HPV5-GSTE1HA ja HPV5StrepE2 valkude *in vitro* fosforüleerimist CK2 ja PKA poolt
3. Uurida HPV5FlagE2 *wt* ja HPV5FlagE2 *c.o.* funktsionaalsust HPV E2⁻ genoomi replikatsioonianalüüsis
4. Võrrelda HPV5FlagE2 *wt* ja HPV5FlagE2 *c.o.* ekspressiooni U2OS ja 293-FT rakuliinis
5. MS analüüsi abil tuvastada HPV5FlagE2 potentsiaalsed fosfosaidid ja rakulised interaktorid

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid

pET11a on 5677 aluspaarist koosnev plasmiid, mida kasutati vektorina pETHPV5Strep-E2 kloneerimiseks. Sisaldab T7 promootorit ja pUC replikatsiooni origini ning võimaldab efektiivset valguekspressiooni *E.colis*. Sisaldab ampitsilliini resistentsusgeeni. Plasmiid saadi Prof. Mart Loogi laborist (Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituut).

pGEXTEV on 4975 bp suurune bakteriaalne ekspressioonivektor. pGEXTEV plasmiid sisaldab N-terminaaset GST (Glutatioon-S-transferaas) afiinsusmärgist ja lac operoni, mis

koosneb *lac* operaatorist, *tac* promootorist ning *lacZ* reportergeeni kodeerivast järjestusest. *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. Plasmiidilt kodeeritav GST on ~26 kDa suurune valk, mis konjugeerub redutseeritud glutatiooniga. See võimaldab GST märgist sisaldavat valku siduda glutatiooniga kaetud sefarooskerakestega ja eraldada huvipakkuv valk teistest rakus olevatest valkudest. Plasmiid saadi Prof. Mart Loogi laborist (Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituut).

HPV5 minicircle on 7756 aluspaari suurune HPV5 genoomi sisaldav plasmiid.

HPV5E1HA-Nluc on on HPV5 genoomi sisaldav plasmiid, kus E1 lugemisraami peale 15 nukleotiidi on kloneeritud HA-märgist kodeeriv järjestus ning peale E1 stop koodonit on E2 lugemisraami kloneeritud Nluc ja iseoptsessitava FMDV-2A peptiidi järjestused, millele järgneb täispikk E2 lugemisraam.

HPV5E2⁻ minicircle on plasmiid mis sisaldab E2 ekspressioonipuuduliku HPV5 genoomi. Genoomis on muteerunud E2 startkoodon ATG.

pQMNTaqH5E2c.o. on HPV5 koodon optimeeritud E2 valgu järjestust sisaldav ekspressioonivektor. pQM-NTag/Ai⁺ vektor sisaldab SV40 (*Simian virus 40*) replikatsiooni alguskohta, polü-A järjestust, ampitsilliini resistentsusgeeni ja tsütomegaloviiruse (CMV) promootorit.

pCMV-Flag-4 on 6271 aluspaari suurune ekspressiooniplasmiid (Sigma-Aldrich), milles sisaldub SV40 (*Simian virus 40*) promootor, tsütomegaloviiruse (CMV) promootor ja Flag-märgist kodeerivat järjestust.

pCMVHPV5FlagE2 on Flag-märgisega HPV5 E2 valku kodeeriv ekspressiooniplasmiid, mis on kloneeritud pCMV-Flag-4 vektorisse.

pCMVHPV5Flag-E2(S402A/D) mutandid – HPV5 E2 valku kodeerivad plasmiidid, kus E2 valgu 402. seriini jääk on asendatud kas mitte fosforülitavaksalaniiniks (A) või fosforüülimist mimikeerivaks asparagiinhappeks (D)

pCMVHPV5-Flag-E8^{E2} on pCMV-Flag-4 vektorisse kloneeritud HPV5 E8^{E2} kodeeriv järjestus.

pCMV-PKA-Flag ekspresioonivektor sisaldab inimese PKA katalüütilise subühiku alfa kodeerivat järjestust, mis on kloneeritud pCMV-Flag-4 vektorisse (Sigma-Aldrich) HindIII ja KpnI restriksioonisaitide vahele.

pEGFP-C1 vektor kodeerib roheliselt fluoreseeruvat valku (EGFP – *enhanced green fluorescent protein* (Clontech), SV40 *origin* järjestust ja kanamütsiini resistentsusgeeni.

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

pJET1.2/blunt vector on 2974 aluspaari suurune plasmiid (ThermoFischer) mis sisaldab IPTG poolt indutseeritavat T7 promootorit, pMB1 replikatsiooni alguspunkti ning ampitsilliini resistentsusgeeni. Plasmidi kasutati saadud PCR produktide kloneerimiseks ning kloneeritud järjestuste sekveneerimiseks.

Kõik ülalmainitud plasmiidid on Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi viroloogia labori kogust.

2.2.2 Töös konstrueeritud plasmiidid

pETHPV5StrepE2 on pET11a ekspresioonivektor mille BamHI ja NdeI restriksioonisaitidesse on kloneeritud T7 promootori ette HPV5 Strep märgisega E2 valku kodeeriv järjestus. HPV5StrepE2 valgu järjestus kloneeriti PCR abil kasutades mallina HPV5 *wt minicircle* genoomi ja praimeritena: 5'-CCA TAT GAT GTG GAG CCA TCC GCA GTT TGA AAA AGA GAA TCT CAG CGA GCG TTT C-3' ja 5'-GGG GAT CCT TAA AGA CTG TCC AGG TTG CCA TAG GCC3'. PCR reaktsiooni komponendid on välja toodud tabelis 1. PCR programm on esitatud tabelis 2. Produktid analüüsiti 0,8% TAE agarosgeelil

etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,2 µl/ml, pingel 100 V. PCR produktid lõigati UV lambi all geelist välja ja puhastati *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit*-iga (Zymo Research) vastavalt tootjapoolsetele juhistele. Geelist puhastatud DNA elueeriti 30 µl vees ning sadestati. Selleks lisati proovidele 75 µl 95% EtOH ja 3 µl 5 M NaCl, proove segati, hoiti -20 °C 30 minutit ja tsentrifugeeriti 13 000 rpm, 15 minutit 4 °C juures. Seejärel pesti sadet külma 75% EtOH-ga, tsentrifugeeriti uuesti 13 000 rpm, 5 minutit, 4 °C ning kuivanud sade lahustati 15 µl MQ-s. Puhastatud HPVStrepE2 järjestust sisaldavad produktid ligeeriti pJET/*blunt* 1.2 kloneerimisvektorisse (3 osa inserti: 1 osa vektorit) ja transformeeriti *heat-shock* meetodiga DH5α kompetentsetesse bakteritesse. Plasmidi õigsust kontrolliti restriksioonanalüüsil samade ensüümidega (BamHI ja NdeI) ning õiged kloonid kloneeriti teises etapis pET11a vektorisse. Ekspressiooniplasmidi kaart on välja toodud lisa 1.

Tabel 1. PCR-i reaktsiooni komponendid ühe reaktsiooni kohta

Reaktsiooni komponent	Ruumala (µl)
5x <i>Phusion</i> HF puhver	10
10 mM dNTP	1
10 µM <i>Forward</i> ja <i>reverse</i> praimerite segu	5
50 ng template	1
<i>Phusion</i> DNA polümeraas	0,5
MQ	32,5

Tabel 2. *Phusion* polümeraasi PCR-i programm

Reaktsioon	Temperatuur (°C)	Aeg	Tsüklite arv
<i>Phusion</i> polümeraasi aktiveerimine	98	30 sek	1
DNA denaturatsioon	98	15 sek	} 30
Praimerite seondumine DNA-le	60	20 sek	
DNA süntees	72	90 sek	
Poolikute PCR-i produktide täissüntees	72	10 min	

pCMVHPV5FlagE2 c.o. on pCMV-Flag-4 vektorisse kloneeritud HPV5 koodon optimeeritud E2 valku kodeeriv järjestus. Koodon optimeeritud E2 järjestus amplifitseeriti

pQMNTaqH5E2c.o. plasmiidilt PCR-iga kasutades järgmisi praimereid: 5' – AAG CTT GAG AAC CTC AGC GAG AGG TT – 3' ja 5' – GGT ACC TCA GAG GGA GTC CAG GTT GC – 3'. Reaktsiooni komponendid on esitatud tabelis 1 ja PCR-i programm on esitatud tabelis 2. Produktid analüüsiti 0,8% TAE agarosgeelil etiidumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,2 µl/ml pingel 100 V. Saadud PCR produktid puhastati agarosgeelist, ligeeriti pJET1.2 vektorisse (3 osa inserti: 1 osa pJET1.2) ja sekveneeriti pJET praimeritega. Seejärel kloneeriti koodon optimeeritud HPV5 E2 valgu järjestus pCMF-Flag-4 vektorisse HindIII ja KpnI restriksioonisaitide vahele. Ekspressiooniplasmiidi kaart on toodud lisas 2.

pGEXHPV5E1-HA on ekspressioonivektor, mille pGEXTEV-is sisalduva T7 promootori ette on kloneeritud HPV HA märgisega E1 valku kodeeriv ekspressiooniplasmiid. HPV5 E1 valgujärjestus amplifitseeriti HPV5E1HANluc plasmiidilt PCR-iga, kasutades praimeritena: 5' – G GA GAT CTA TGA CCG ACC CTA ATT ACC – 3' ja 5' – GGG GAT CCA TGA CCG ACC CTA ATT ACC – 3'. Reaktsiooni komponendid on esitatud tabelis 1 ja PCR-i programm on esitatud tabelis 2. Produktid analüüsiti 0,8% TAE agarosgeelil etiidumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,2 µl/ml pingel 100 V. Saadud PCR produktid puhastati agarosgeelist, ligeeriti pJET1.2 vektorisse (3 osa inserti: 1 osa pJET1.2) ja sekveneeriti pJET praimeritega. Seejärel kloneeriti HPV5 HA-märgisega E1 valgu järjestus pGEXTEV vektorisse BamHI ja SallI restriksioonisaitide vahele. Ekspressiooniplasmiidi kaart on toodud lisas 3.

Kõik magistritöö raames konstrueeritud plasmiidid kontrolliti restriksioonanalüüsi ja sekveneerimisega. Sekveneerimisel kasutati pJET vektori praimereid.

2.2.3 Rakuliinid, bakteritüved ja söötmed

Replikatsiooni uurimiseks kasutati mudelsüsteemina **U2OS rakuliini**, millel on sarnane morfoloogia epiteeli rakkudega. U2OS rakud pärinevad inimese sääreлуу osteosarkoomi rakkudest ning meie uurimisrühmas on näidatud, et need rakud sobivad HPV replikatsiooni uurimiseks (Geimanen *et al.*, 2011). Rakke kasvatati 100 mm diameetriga koekultuuri tassidel IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Pan Biotech) söötmes, kuhu lisati 10% FCS (veise loote seerum - *fetal calf serum*) ning 1% penitsilliin-streptomütsiini (Sigma-Aldrich).

HPV5Flag-E2 valgu ekspressiooniks kasutati **293-FT rakuliini**, mis on inimese geneetiliselt muundatud inimese embrüonaalsed neerurakud. Need rakud ekspresseerivad SV40 suur T-

antigeeni, mis võimaldab rakkudesse viidud plasmiidilt toota suuremal hulgal valku. Rakke kasvatati 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassidel 4,5 g/L glükoosisaldusega DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Pan Biotech) söötmes, millesse lisati 10% FCS ning 1% penitsilliin-streptomütsiini (Sigma-Aldrich).

Eksperimentides kasutatud rakud kasvasid inkubaatoris 37 °C juures 5% CO₂ sisaldusel.

DH5α kompetentsed bakterirakud on *E.coli* rakud, mida kasutatakse rutiinselt plasmiidse DNA paljundamiseks. Baktiereid kasvatati LB söötmes.

BL21DE3RP kompetentsed bakterirakud on samuti *E.coli* rakud, mida kasutatakse valgu ekspressiooniks. Rakud ei sisalda proteaase Lon ja OmpT, mistõttu lagunevad nendes rakkudes ekspresseeritud valgud teistega võrreldes vähem. Baktiereid kasvatati LB söötmes.

2.2.4 Transformatsioon ja plasmidi paljundamine paljundamine bakterites

Transformeerimiseks lisati jääl sulatatud kompetentsetele rakkudele 10-100 ng DNA-d ja inkubeeriti 10 minutit jääl. Seejärel tõsteti 45 sekundiks 42 °C juurde ja jahutati jääl. Lisati 500 µl LB-d söödet ja inkubeeriti 1 h 37 °C juures. Rakke tsentrifuugiti lauafuugiga 5 minutit 3000 rpm, resuspendeeriti 200 µl söötmes ning plaaditi LB agariga tassidele, mis sisaldas ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml või kanamütsiini lõppkontsentratsiooniga 50 µg/ml. Baktiereid kasvatati 37 °C juures üleöö.

Tekkinud kolooniatest plasmidi paljundamiseks tõsteti koloonia 100 ml LB vedelsöötmesse, kuhu lisati ampitsilliini (100 µg/ml) või kanamütsiini (50 µg/ml). Baktiereid kasvatati loksutil 37 °C juures, 220 rpm 12-16 tundi. Hommikul tsentrifuugiti bakterimass põhja 10000 rpm, 5 minutit, ja plasmiidne DNA eraldati *FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit*-iga või *NucleoBondR Xtra MidiEF kit*-ga vastavalt tootjapoolsele protokollile.

2.2.5 Restriktsioonianalüüs

DNA-de restriktsioonanalüüsid teostati 37 °C juures vähemalt tunni aja jooksul, kasutades Thermo Scientific Fast Digest ensüüme ja 10x reaktsioonipuhvrit (FastDigest Buffer, Thermo Fisher Scientific). Restriktsioonisegu kanti 0,8% TAE agarosgeelile, mis sisaldas etiidumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,2 µl/ml. Geelelektroforees viidi läbi foreesivannis 1X TAE puhvris pingel 100 V vähemalt 1 tunni jooksul.

2.2.6 U2OS rakkude transfektsioon

U2OS rakke transfekteriti elektroporatsiooni meetodiga, milleks kasutati *Gene Pulser XCell* (Bio-Rad Instruments) elektroporaatorit. Transfekteritavate DNA-de ruumalad viidi võrdseks vastava koguse TE-ga. Üheks transfektsiooniks kasutati 100 mm läbimõõduga koekultuuri rakke, mis olid saavutanud ligikaudu 90%-lise konfluentsuse. Kaks päeva ette kasvatatud rakkudel aspireeriti sööde, pesti 1 kord 5 ml 1xPBS (PBS - *phosphate buffered saline*) ning lisati 1 ml trüpsiini. Seejärel oodati kuni rakud koekultuuritassidelt lahti hakkasid tulema, aegajalt mikroskoobist kontrollides. Rakud koguti 20 ml IMDM täissöötmesse, tsentrifugeeriti 1000 rpm 5 minutit (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Rakusademelt aspireeriti sööde ja resuspendeeriti täissöötmes. Üheks transfektsiooniks võeti 250 µl raku suspensiooni. U2OS rakkudesse transfekteriti järgmised plasmiidid: HPV5 E2 ja E8^{E2} kodeerivad konstruktid üleekspressiooni katses – 3,5 µg, HPV5 E2 kodeerivad konstruktid *Southern blot* katseks – 0,1 µg, HPV5 genoomid – 2 µg, PKA katalüütilise subühiku kodeeriv plasmiid või tühi vektor – 0,3 µg. Kõikidele lisati 50 µg lõhe spermi kandja DNA-d (*carrier*) ning kanti elektroporatsiooni küvettidesse. Rakke poreeriti pingel 220 V, mahtuvusega 975 µF. Kohe peale elektroporatsiooni kanti rakud värsket söödett sisaldavasse 15 mL tuubi, tsentrifugeeriti 1000 rpm 5 minutit ja aspireeriti sööde. Rakusade resuspendeeriti värskes söötmes ja kanti koekultuuri plaatidele vastavalt vajadusele. Iga 24 tunni tagant vahetati söödett ning rakkudel lasti inkubaatoris kasvada kuni 3 päeva.

2.2.7 293-FT rakkude transfektsioon

293-FT rakke kasvatati ette 48 tundi enne transfektsiooni 100 mm koekultuuritassil kuniks kõikidel tassidel olid rakud saavutanud ligikaudu 90% konfluentsuse. Et transfekterida pCMVHPV5FlagE2 plasmidi, kasutati positiivse kontrollina transfektsiooni efektiivuse hindamiseks GFP-d ekspresseerivat plasmidi pEGFP-1 ning valmistati kaks erinevat transfektsioonisegu, mis sisaldasid ühe 100 mm tassi kohta:

Kontroll transfektsioon – segu I:

1. 200 µl DMEM
2. 10 µl GFP plasmiid (3 µg)
3. 8.8 µl pcDNA (5 µg)
4. 40 µl PEI (1 mg/ml)

HPV5FlagE2 transfektsioon – segu II:

1. 200 µl DMEM
2. 15 µl HPV5Flag-E2 (5 µg)
3. 6 µl pcDNA (3 µg)
4. 40 µl PEI (1 mg/ml)

Transfektsioonireagent PEI (polüetüleenimiin) moodustab negatiivselt laetud DNA ümber positiivse laenguga mitsellid, mis suudavad seonduda negatiivselt laetud raku pinnale. Selle tulemusel võetakse DNA:PEI kompleks endotsütoosiga rakkudesse ning DNA vabaneb tsütoplasmasse (Sonawane *et al.*, 2003). Ette kasvatatud rakkudel aspireeriti sööde ning lisati 7 ml puhast DMEM söödet, mis ei sisaldanud seerumit ega antibiootikume. Seejärel tilgutati transfektsioonilahused ühtlaselt üle kogu tassi ja liigutati õrnalt, et moodustatud PEI:DNA mitsellid jaotuksid ühtlaselt. Koekultuuritassid asetati inkubaatoritesse ning hoiti 37 °C juures 3 tundi. Seejärel lisati rakkudele ühe 100 mm tassi kohta 14 ml DMEM täissöödet.

Järgmisel päeval vaadeldi pEGFP-C1 plasmiidiga transfekteeritud 293FT rakke 100 kordsel suurendusel Nikon Eclipse TS100 fluorestsentsmikroskoobiga, et kontrollida transfektsiooni efektiivsust. Rakkudel vahetati sööde ning selleks, et alla suruda rakkudes oleva endogeense PKA aktiivsust, lisati pCMVHPV5FlagE2 plasmiidiga transfekteeritud rakkudele 10 µl PKA inhibiitorit H89 lõppkontsentratsioonis 2 µg/ml. 48 tundi peale transfektsiooni pesti rakke 1xPBS-iga ning teostati IP nagu on kirjeldatud ptk 2.2.8.

2.2.8 Immuunosadestamine

Selleks, et uurida HPV5 E2 valgu fosforüülimist ja tuvastada E2 interaktoreid, immuunosadestati Flag märgist sisaldava E2 valk vastava plasmiidiga transfekteeritud 293-FT rakkudest. Allpool on toodud puhvrite ja ensüümide kogused ühe 10 cm tassi kohta.

48 tundi peale transfektsiooni pesti rakud 1x PBS-iga ning lisati 1 ml RIPA lüüsipuhvrit (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA; 0,01% TritonX-100; 0,1% SDS), milles oli lisaks 100 µl 10x PIC (*protease inhibitor cocktail* – proteaasi inhibiitorid) ja 1 µl 10 mM H89, et inhibeerida rakkudes endogeense PKA aktiivsust. Koekultuuritasse inkubeeriti 10 minutit jääl ning lüsaat koguti 50 ml tuubi. Selleks, et lüsaati homogeniseerida, tõmmati seda mõned korrad läbi süstla, kasutades 22 G läbimõõduga nõela, ja lisati 5 µl 10 mM H89 ning 6 ml Sigma lüüsipuhvrit (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100). Lüsaate inkubeeriti 10 minutit 4 °C juures rootoril pööreldes (*end-over-end*) ja tsentrifugiti 10000 rpm 10 minutit (*Eppendorf Centrifuge 5810R*, A-4-81 rootor). Supernatant kanti uude tuubi. Immuunosadestamiseks kasutati Anti-Flag M2 kerakesi (Sigma-Aldrich). Need on agarooši külge seotud hiire monoklonaalsed antikehad, mis seonduvad Ca²⁺ sõltuvalt rekombinantse valgu Flag järjestusega. Kerakeste ettevalmistamiseks pesti 20 µl anti-Flag M2

kerakesi kaks korda 1 ml PBS-iga ja üks kord 1 ml Sigma lüüsi puhvriga, resuspendeeriti 50 µl Sigma lüüsi puhvril ning lisati proovidele. Proovid jäeti üleöö 4 °C juures rootorile pöörlema. Järgmisel hommikul tsentrifugeeriti tuube 4 °C juures 4000 rpm, 4 minutit ja eemaldati supernatant. Et eemaldada tuubi põhjas olevate kerakeste küljest ebaspetsiifiliselt seondunud valke, pesti kerakesi 3 korda 10 minutit 5 ml Sigma lüüsi puhvriga, tsentrifugeerides vahepeal 4000 rpm 3 minutit. Seejärel eemaldati kerakestelt supernatant, lisati 1 ml Sigma lüüsi puhvrit, tõsteti proovid 1.5 ml tuubidesse ja fuugiti 7000 rpm 2 minutit. Viimaks suspendeeriti kerakesed 100 µl-is PBS-is ning säilitati -80 °C juures.

2.2.9 Strep-E2 valgu ekspressioon ja puhastamine bakterirakust Strep-Tag meetodiga
HPV5E2 N-terminaalsesse domeeni klooniti Strep-tag järjestus (1 kDa), mis koosneb streptavidiini poolt äratuntavast oktapeptiidist (aminohappeline järjestus – WSHPQFEK), mis võimaldab rekombinantsete valkude puhastamist afiinsuskromatograafia abil. Kolonnis olevate agaroskerakeste peal on modifitseeritud streptavidiini derivaat (Strep-Tactin), mis võimaldab efektiivset ja spetsiifilist valgu puhastamist ning kolonnide mitmekordset kasutamist.

HPV5Strep-E2 valgu ekspresseerimiseks transformeeriti pETHPV5StrepE2 plasmiid kompetentsetesse BL21DE3RP bakterirakkudesse *heat-shock* meetodil. Transformatsiooni protokoll on kirjeldatud pkt 2.2.4. Baktereid kasvatati üleöö 37 °C juures ampitsilliini sisaldaval LB tassil. Tassilt võeti üks bakterikoloonia ning tõsteti esmalt 3 ml LB söötmesse, mis sisaldas ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml ja jäeti üleöö loksutisse kasvama 37 °C juures, 220rpm. Järgmisel hommikul võeti üleöö kasvanud kultuurist 500 µl rakususpensiooni, mis tõsteti 50 ml LB vedelsöötmesse ning kasvatati samadel tingimustel loksutis 2-4 tundi. Seejärel jagati kultuur 10 ml kaupa 2 liitritesse kolbidesse, mis sisaldasid 400 ml vedelsöödet (LB ja ampitsilliin lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml) ning kasvatati 37°C juures, 200 rpm kuni OD 0,5-ni. Kultuurist võeti 2 ml indutseerimata proov mida tsentrifugeeriti 3 minutit pööratel 12 000 rpm ning rakusade külmutati -20 °C. Ülejäänud kultuuris indutseeriti rekombinantse valgu ekspressioon lisades IPTG lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM ja inkubeeriti üleöö loksutis 18°C juures, 200 rpm.

Üleöö kasvanud indutseeritud bakterid tsentrifugeeriti 5500rpm, 10 minutit, 4 °C (Sorvall, SLA-1500 rootor). Sademele lisati lüüsi puhver (100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 1mg/ml lüsotsüüm) ning suspendeeriti hoolikalt. Lüsatsi inkubeeriti 30 minutit 4 °C juures pöörlemisega (*end-over-end*). Seejärel sonikeeriti proovid sonikaatoriga 55%

võimsusel 4x20 sekundit. Tsentrifugeeriti 13000 rpm, 15 minutit, 4 °C (RC-5 tsentrifuug, SS-34 rootor). Kolonni ettevalmistamiseks pipeteeriti 1 ml Strep-Tactin sefaroos segu aeglaselt mööda kolonni ääri ning tasakaalustati 5 ml puhver W-ga (100 mM Tris/HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA). Tsentrifugeeritud lüsaat tõsteti kolonnile ja vedelikul lasti kolonnist läbi joosta. Ebaspetsiifiliste valkude eemaldamiseks pesti kolonni 2,5 ml puhver W-ga. Kolonni agaroskerakestele Strep-Tactin-iga seondunud Strep-E2 elueeriti 1.6 ml puhver E-ga (100mM Tris/HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) kuhu lisati 10 mM destiobiotiini. Destiobiotiin konkureerib spetsiifiliselt Strep-Tactin biotiini seondumiskohaga, mis vähendab ebaspetsiifiliste valkude elueerimise tõenäosust. Eluaadid koguti 200 µl kaupa 8 fraktsioonis ning külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80 °C juures. Eluaate analüüsiti 8% SDS-polüakrüülamiid geelil *western blot* meetodiga (ptk 2.2.11).

2.2.10 GST-E1HA valgu ekspressioon ja puhastamine bakterirakust HPV5E1-HA valgu ekspresseerimiseks transformeeriti pGEXHPV5E1-HA plasmiid kompetentsetesse BL21DE3RP bakterirakkudesse *heat-shock* meetodil. Transformatsiooni protokoll on ja plasmidi eraldamine on kirjeldatud ptk 2.2.4.

Baktereid kasvatati üleöö 37 °C juures ampitsilliini sisaldaval LB tassil. Tassilt võeti üks bakterikoloonia ning tõsteti esmalt 3 ml LB söötmesse, mis sisaldas ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml ja jäeti üleöö loksutisse kasvama 37 °C juures, 220rpm. Järgmisel hommikul võeti üleöö kasvanud kultuurist 500 µl rakususpensiooni, mis tõsteti 50 ml LB vedelsöötmesse ning kasvatati samadel tingimustel loksutis 2-4 tundi. Seejärel tõsteti 20 ml bakterikultuuri 1 l LB vedelsöötmesse (ampitsilliini lõppkontsentratsioon 100 µg/ml). Baktereid kasvatati 37 °C juures, 220rpm loksutil ~3 tundi, kuni OD 0,5-ni. Rakkudele lisati IPTG lõppkontsentratsiooniga 0,5mM ja inkubeeriti üleöö 16 °C juures, 220rpm.

Bakteris ekspresseeritud HPV5E1HA valgu puhastamiseks tsentrifugeeriti üleöö kasvanud baktereid 6000 rpm, 10 minutit. Bakterimass lüüsi 40 ml GST lüüsipuhvril (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 300 mM NaCl; 1% Triton X-100; 5% glütserool; 2 mM DTT; 1 mg/ml lüsotsüüm; 10x PIC). Proove lüüsi 30 minutit 4 °C juures *end-over-end* pöörlemisega. Seejärel sonikeeriti proove 55% võimsusega, 4x20 sekundit ja tsentrifugeeriti (RC-5 tsentrifuug, SS-34 rootor) 40 minutit, 15000 rpm, 4 °C juures. Tsentrifugeerimise ajal valmistati ette GST-sefarooskerakesed (Thermo-Fisher). Selleks pesti 400 µl GST-sefarooskeraksi 4x 1ml GST lüüsipuhvriga ja

resuspendeeriti 1 ml lüüsi puhvr. Tsentrifugeeritud rakulüsaat ja GST-sefarooskerakesed segati kokku ning inkubeeriti 4 tundi, 4 °C juures pööreldes, mis seejärel kanti 5 ml kolonnile ning vedelikul lasti kolonnist läbi joosta. Kolonni pesti 4x4ml GST puhver B-ga (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 600 mM NaCl; 1% Triton X-100; 5% glütserool; 1 mM DTT) ning 4 ml GST puhver C-ga (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0,1% NP-40; 5% glütserool; 1 mM DTT). Kolonnis sefarooskerakestele GST-ga seondunud E1HA valk elueeriti 800 µl GST puhver E-ga (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 25 mM L-glutatioon; NaOH pH 7.5; 0,1% NP-40; 5% glütserool; 1 mM DTT) nelja fraktsioonina. Puhastatud E1HA külmutati vedelas lammastikus ja säilitati -80 °C juures. Analüüsiti 8% SDS-poliakrüülamiid geelil *western blot* meetodiga (ptk 2.2.11).

2.2.11 Western blot

Selleks, et kontrollida IP efektiivsust, analüüsida PKA mõju E2 valkudele, kontrollida bakterist puhastatud E1 ja E2 valgu ekspressioonitaset või võrrelda koodon optimeeritud E2 ekspressiooni metsiktüüpi E2-ga, kasutati *Western blot (WB)* meetodit, mis võimaldab valkude detekteerimist kasutades spetsiifilisi antikehi.

Enne geelile kandmist inkubeeriti rakulüsaati või puhastatud valke 2x Laemmli puhvr (100 mM Tris-HCl pH 6.8; 4% SDS; 0,2% broomfenool sinine; 20% glütserool; 200 mM DTT) 100 °C juures 5 minutit ning tsentrifugeeriti 13000 rpm 5 minutit. Proovid jahutati ning kanti 8% SDS-poliakrüülamiid geelile. Valgud lahutati geelelektroforeesil 1xSDS jooksupuhvr (25 mM Tris; 192 mM glütsiin; 0,1% SDS) ~60 minuti jooksul, voolutugevusel 22 mA ühe geeli kohta. PVDF membraani (GVS) aktiveerimiseks hoiti seda 1 minut metanoolis ning loputati MQ ja ülekandepuhvriga (25 mM Tris; 190mM glütsiin; 7% etanool). Valkude kandmiseks geelilt membraanile, seati üles *wet transfer* ülekanne. Geeli alla pandi švamm ja kaks *Whatman* filterpaberit, geeli peale pandi PVDF membraan, 2 *Whatman* filterpaberit ja švamm. Ülekanne teostati foreesivannis 110 minuti jooksul 1 liitris külmas ülekandepuhvr voolutugevusel 360 mA. Peale ülekannet blokeeriti membraan ebaspetsiifilise antikeha seostumise vältimiseks 1 tunni jooksul blokeerimislahuses (5% piimapulber; 0,1% Tween PBS-is). Flag märgisega E2 valgu spetsiifiliseks detekteerimiseks valmistati antikeha lahus (2,5% piimapulber; 0,05% Tween PBS-is), mis sisaldas hiire monoklonaalset antikeha ANTI-FLAG-M2-HRP (*Sigma-Aldrich*) lahjenduses 1:3000. Membraani loksutati antikeha lahusega üleöö 4 °C juures. Järgmisel päeval pesti membraani 3x10 minutit PBS-0,1% Tween pesulahusega. Signaali detekteerimiseks kasutati *SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate* või

Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fischer Scientific) kiti vastavalt tootja protokollidele ning eksponeeriti röntgenfilmile (AGFA).

2.2.12 Totaalse DNA eraldamine

Valmistatud pCMVHPV5FlagE2 plasmiidide poolt kodeeritud E2 valkude aktiivsuse uurimiseks transfekteeriti U2OS rakkudesse iseseisvalt mittereplitseeruv HPV5-E2⁻ genoom koos E2 kodeerivate plasmiididega või negatiivse kontrollina tühja pCMV-Flag-4 vektoriga. Replikatsiooni hindamiseks eraldati totaalne DNA ning kasutati *Southern blot* meetodit. Totaalne DNA eraldati transfekteeritud U2OS rakkudest eri ajapunktidel (48 h, 72 h, 96 h). Esmalt eemaldati rakkudelt sööde ja pesti 2 korda PBS-iga ning 60 mm diameetriga tassidele lisati 400 µl proteinaas K lüüsipuhvrit (20mM Tris-Cl pH8.0; 100mM NaCl; 10mM EDTA; 0,2% SDS), ja proteinaas K-d lõppkontsentratsiooniga 0,2 mg/ml. Rakke lüüsi 10 minutit toatemperatuuril aeg-ajalt tase kallutades. Rakulüsaat koguti 1,5 ml tuubi, tõmmati 3 korda läbi süstla ning inkubeeriti 56 °C juures 12-18 tundi. Järgmisel päeval lisati proovidele võrdne ruumala fenool-kloroform segu (1:1), segati vortexil ja tsentrifugeeriti 13 000 rpm 5 minutit (*Heraeus Biofuge pico, Microlitre*, rootor 24 x 1.5/2.0 ml). Ülemine DNA-d sisaldav vesifaas tõsteti uude tuubi, lisati 2,5 mahtu 95% etanooli, segati vortexil ning tsentrifugeeriti 4 °C 14 000 rpm 15 minutit. Järgmisena eemaldati supernatant ja sade resuspendeeriti 100 µl TE-s (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA), mis sisaldas RNAasi lõppkontsentratsiooniga 20 µg/ml. Proove inkubeeriti 1 tund 37 °C termostaadis. DNA sadestamiseks lisati lahusele 1/10 ruumala 5 M NaCl ja 2,5 ruumala 96% etanooli. Segati vortexil, inkubeeriti 20 minutit -20 °C juures ja tsentrifugeeriti 10 minutit 14000 rpm 4 °C juures. Supernatant aspireeriti ja lisati 100 µl külma 75% etanooli, tsentrifugeeriti uuesti 4 °C fuugis, 10 minutit 14 000 rpm ning sade kuivatati ja suspendeeriti 40 µl MQ-s. Mõõdeti DNA kontsentratsioonid ja säilitati -20 °C juures.

2.2.13 Replikatsioonianalüüs *Southern blot* meetodiga

2.2.13.1 Restriksioon

Southern blot (SB) analüüsiks võeti 4 µg totaalset DNA-d, lõigati restriktasididega 30 µl-is 37 °C juures üleöö. Restriksioonides kasutati Thermo Fischer Scientific *Fast Digest* ensüüme ja 10x reaktsioonipuhvrit. U2OS rakuliini transfekteeritud HPV5 ja HPV5E2⁻ *minicircle* plasmiidid lõigati lineariseeriva SacI ensüümiga ja DpnI ensüümiga, mis lõikab transfektsiooniga sisse viidud bakteriaalse metülatsioonimustriga DNA väiksemateks tükkideks.

2.2.13.2 Geelelektroforees ja DNA ülekanne nailonfiltrile

Lõigatud DNA kanti 0,8% TAE agarosgeelile, mis sisaldas etiidumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,2 µg/ml. Geelelektroforeesi teostati madalal voltaažil (2-3 V/cm) 5 tunni jooksul kuni üleöö.

Pärast DNA fragmentide lahutamist loksutati geeli 45 minutit denaturatsioonilahuses SOL A (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl). Geel loputati destilleeritud veega ja loksutati 30 minutit neutraliseerivas lahuses SOL B (1 M Tris pH 7.4; 1,5 M NaCl). Ülekandeks valati vanni piisaval hulgal 10xSSC puhvrit (1,5 M NaCl; 150 mM Na-tsitraat) ning DNA kanti geelist nailonmembraanile (*GVS*) kapillaarse ülekande meetodil 4-12 tunni jooksul. Järgmisel päeval kuivatati nailonfilter ning kasutades UV Stratalinker 1800 aparati ristseoti DNA filtrile.

2.2.13.3 Hübridisatsiooniproovi valmistamine

Hübridisatsiooniproovides kasutati mallina (*template*) 150 ng HPV5 täispikka genoomi, reaktsioonisegusse lisati 10 µl dekanukleotiidide primereid ning lisati vett 30 µl-ni. Proove denatureeriti 10 minutit 100 °C juures ja jahutati jääl. Seejärel lisati 3 µl mix-C (ei sisalda dCTP), 1 µl Klenow ensüümi ja 3 µl α-P³²-dCTP märgitud isotoopi, inkubeeriti 37 °C 15 minutit. Seejärel lisati 2 µl dNTP mix'i, inkubeeriti 37 °C 15 minutit ning proovid tõsteti 100 °C juurde 10 minutiks, jahutati jääl ja kanti eelsoojendatud prehübridisatsioonilahusesse.

2.2.13.4 Hübridisatsioon

Selleks, et vältida hübridisatsiooniproovi ebaspetsiifilist seondumist, inkubeeriti filtrit keerlevas torus prehübridisatsioonilahuses (6x SSC; 5x Denhard reagent (Thermo Scientific); 0,5% SDS; denatureeritud lõhe spermi kandja DNA 200 µg/ml) vähemalt 1 tund 65 °C hübridisatsiooniahjus. Peale seda lisati lahusesse radioaktiivselt märgistatud HPV5 täispika järjestusega proov. Hübridisatsioon kestis ~20 tundi.

Järgmisel päeval pesti filtrit kolme eelsoojendatud lahusega: kaks korda 10 minutit pesulahusega I (3xSSC; 0,1% SDS), seejärel kaks korda 15 minutit pesulahusega II (1xSSC; 0,1% SDS) ja viimasena kaks korda 25 minutit pesulahusega III (0,1xSSC; 0,1% SDS). Filter kuivatati ja eksponeeriti röntgenfilmile või Typhoon *fosfoimager* ekraanile ja ilmutati, et detekteerida hübridisatsioonisignaale.

2.2.14 E2 rakuliste interaktoore määramine

2.2.14.1 *In vitro* fosforülatsiooni reaktsioon

Et uurida GST-E1HA, StrepE2 või koodon optimeeritud HPV5FlagE2 ja metsiktüüpi HPV5FlagE2 valgu fosforüleerimist, viidi läbi fosforülatsiooni reaktsioonid, mis sisaldasid: 17 µl E1HA, 17 µl StrepE2, 17 µl *c.o* FlagE2 või wt FlagE2 agaroskerakestega immunkomplekse ning vastavalt kinaasidele järgnevaid reaktsioonisegusid:

- CK2 reaktsioonisegu – 2 µl 1x PK puhvrit (New England Biolabs); 0,5 µl 20mM ATP, 1 µl CK2 (0,5 µg).
- PKA reaktsioonisegu – 2 µl 10x PKA puhvrit (400 mM Tris-HCl pH 7.5; 200 mM MgCl₂; 500 µM DTT), 0.5 µl 20mM ATP ja 1 µl bakteriaalselt puhastatud PKA ensüümi (1/10 lahjendus) (saadud prof. M. Loogi laborist). Kontrollreaktsioonis kasutati PKA asemel 1 µl MQ.

Selleks, et eristada FlagE2 fosforüleerimist ebaspetsiifiliste fosforüleerimisproduktide hulgast, tehti paralleelselt kontrollreaktsioonid asendades FlagE2 valgu immunkompleksid 293FT rakkudest immunosadestatud GFP immunkompleksiga nii PKA lisamisel aga ka ilma. Positiivse kontrollina kasutati PKA mudelsubstraati Nth1 valku 0,2 µg reaktsiooni kohta (saadud prof. M. Loogi laborist). Kõikidele proovidele lisati 0,2 µl gamma-P³²-ATP ning reaktsioonid toimusid toatemperatuuril 30 minutit.

Reaktsioonid lõpetati 2x Laemmli puhvri lisamisega. Proove inkubeeriti 5 minutit 100 °C juures, jahutati ning kanti 8% SDS-polüakrüülamiid geelile. Valgud lahutati geelelektroforeesiga voolutugevusel 22 mA geeli kohta, 60 minuti jooksul. Geeli värviti 1 h *Coomassie* sinisega (0,5 g *Coomassie brilliant blue*; 90 ml MQ; 90 ml metanool; 20 ml etaanhape), mis seondub positiivse laenguga aminohapete aminorühmaga (lüsiini, histidiini ja arginiiniga), muutes need geelis nähtavaks. Taustsignaalide vähendamiseks loksutati geeli üleöö loputuslahusega (90 ml MQ; 90 ml metanool; 20 ml etaanhape) ja kuivatati järgmisel päeval *Gel Vacuum Dryer Heto Dry GD-2* (HETO) masinaga 45 minutit 75 °C juures. Eksponeeriti filmile või ekraanile, et analüüsida *Phospho imager* masinaga.

2.2.14.2 Massispektrometria (MS) analüüs ja fosfosaitide määramine

MS analüüsiks segati kokku reaktsioonid samal põhimõttel nagu ülal ptk 2.2.14.1 kirjeldatud, kuid lisamata jäeti gamma-P³²-ATP-d ning täpsemate tulemuste saamiseks suurendati reaktsioonide mahtu ja kasutatavate komponentide hulka 2 korda. Selleks, et teada saada millised valgud jäävad kerakeste külge ning võivad anda ebaspetsiifilisi

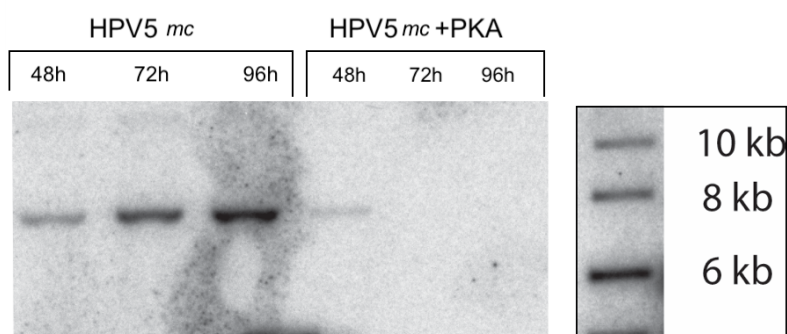
fosforüleerimisprodukte, tehti paralleelsed reaktsioonid GFP-d kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud 293-FT rakkudest immuunsadestatud kerakestega. Kontrollreaktsioonides kasutati PKA asemel 2 µl MQ. Reaktsioonid toimusid toatemperatuuril 30 minutit.

Et MS analüüsi tulemused oleksid võimalikult täpsed ja sisaldaksid võimalikult vähe ebaspetsiifilisi valke, fuugiti proove reaktsiooni lõppedes 4000 rpm 4 minutit ning supernatant tõsteti teise tuubi ja külmutati -20 °C. Sademele, mis sisaldas lisaks kinaasi reaktsioonikomponentidele kerakeste küljes olevat Flag-E2 valku, lisati 100 µl glütsiini (0.2M pH 3.5) ja inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril, aegajalt õrnalt segades. Lahus kanti kolonnile (*Micro Bio-Spin Chromatography Columns*, BioRad) ja fuugiti maksimaalsetel pööretel 30 sekundit. Tuubi jäänud 1. eluaat pipeteeriti uude tuubi ning kolonnile lisati veelkord 100 µl glütsiini ning fuugiti sarnaselt eelmisega. Eluaadid segati kokku ning saadeti TÜTI proteoomika tuumiklaborisse massispektromeetria analüüsi.

2.3 Tulemused

2.3.1 PKA inhibeerib HPV5 *minicircle* genoomi replikatsiooni

Meie uurimisrühmas tehtud varasematest katsetest on teada, et PKA aktiveerib α papilloomiviiruste perekonda kuuluva HPV18 replikatsiooni. Samas on kirjanduses näidatud, et β papilloomiviiruste perekonda kuuluva HPV5 puhul on mõju hoopis vastupidine, replikatsiooni inhibeeriv (Lototskaja *et al.*, 2021). Selle kontrollimiseks transfekteeriti PKA-d kodeeriv ekspressiooniplasmiid koos HPV5 *minicircle* genoomiga U2OS rakkudesse. 48 h, 72 h ja 96 h möödudes eraldati rakkudest totaalne DNA ning analüüsiti *Southern blot* meetodiga. PKA mõju HPV5 *minicircle* genoomi replikatsioonile on esitatud joonisel 9.



Joonis 9. PKA mõju HPV5 *minicircle* replikatsioonile *SB* analüüsiga. U2OS rakkudesse transfekteeriti 300 ng HPV5 *minicircle* (joonisel *mc*) plasmiid koos 300 ng pCMV-Flag-4 tühja vektori (joonisel tähistatud HPV5) või pCMV-PKA-Flag ekspressioonivektoriga (joonisel

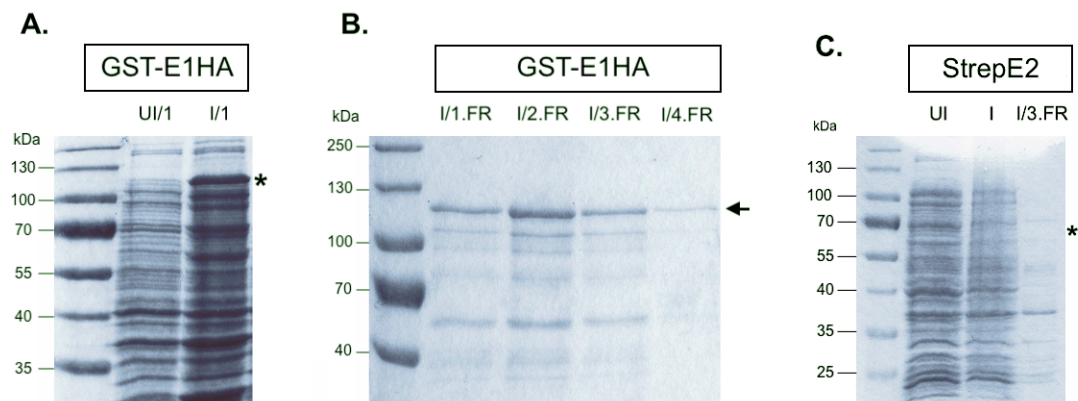
HPV5+PKA).Totaalne transfekteeritud rakkudest eraldatud DNA (4 µg) lõigati HPV5 lineariseeriva SacI ensüümiga ja DpnI-ga, lahutati 0,8% TAE agarosgeelil, kanti üle nailonfiltrile ning hübridiseeriti kasutades α^{32} märgitud HPV5 täispikka genoomi, mille suurus on ligikaudu 8 kb. Jooniselt on näha, et HPV5 replikatsioon on ajas kasvav, kuid PKA juuresolekul ei ole võimalik replikatsioonisignaale detekteerida.

Joonis 10 kinnitab, et HPV5 replikatsioon on U2OS rakuliinis ajas tõusev, kuid PKA juuresolekul pole HPV5 replikatsioonisignaali 48 h peale transfektsiooni enam detekteeritav. See tähendab, et PKA aktiivsus omab negatiivset mõju HPV5 esialgsele, transientssele replikatsioonile.

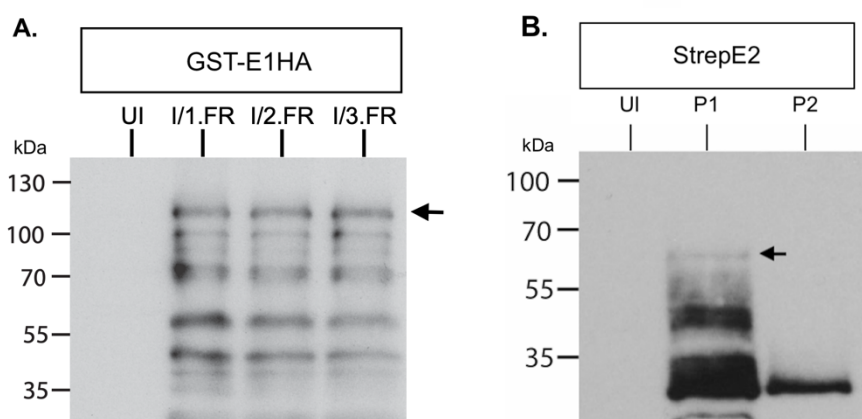
2.3.2 HPV5 E1 ja E2 valkude ekspresseerimine ja puhastamine *E.coli*-st

Et uurida täpsemalt PKA sõltuvat HPV5 replikatsiooni inhibeerimise põhjust, otsustati edasi uurida viiruse replikatsiooniks vajalike HPV5 E1 ja E2 valkude fosforüleerimist. Selleks konstrueeriti GST-E1HA-märgisega valku kodeeriv ekspresiooniplasmiid pGEXHPV5GST-E1HA ja StrepE2 valku kodeeriv pETHPV5StrepE2 ekspresiooniplasmiid. Konstrueeritud plasmiidid võimaldavad ekspresseerida ja puhastada vastavad liitvalgud (GST-HA-E1 ja StrepE2) kasutades *E.coli* tüve BL21DE3RP.

Paraku ekspresseerusid mõlemad valgud bakteris väga halvasti, mistõttu ei olnud StrepE2 ekspressioon *Coomassie* värvinguga üldse tuvastatav ning GST-HA-E1 ekspressioon oli vähene (joonis 10). Sarnane tulemus oli eelnevalt saadud HPV18 GST-E1 valgu ekspressioonil ja puhastamisel, kus samuti ei suudetud *Coomassie* värvinguga tuvastada liitvalgu ekspressiooni (Annika Laanemets isiklik kommunikatsioon). Valkude puhastamiseks kasutatud aafiinsuskromatograafia meetodiga suudeti *Coomassie* värvingutega tuvastada HPV5 GST-E1HA valk (joonis 10 paneelid A, B), kuid HPV5StrepE2 valku ei suudetud tuvastada (joonis 10 C). Seega jäi ainsaks edasiseks detekteerimisvõimaluseks *Coomassie* värvingust tundlikum *western blot* (WB) meetod. Puhastatud valgud tuvastati WB analüüsil kasutades HA-märgise vastast antikeha (GST-HA-E1) ja E2 valgu vastast antikeha (Strep-E2) (joonis 11).



Joonis 10. Bakterist puhastatud HPV5 GSTE1-HA ja StrepE2 valkude detekteerimine Coomassie värvinguga. Kõikidel paneelidel on vasakule poole märgitud molekulamassid kDa. **A:** Bakterist puhastatud GST-E1HA valgu induktsiooni efektiivsuse kontroll. Joonisel on indutseerimata (UI/1) ja IPTG-ga indutseeritud proov (I/1). Eeldatav GST-E1 valgu suurus on märgitud tärniga. **B:** Afiinsuskromatograafiaga puhastatud GST-E1HA nelja erineva fraktsiooni kontroll (joonisel I/1.FR, I/2.FR, I/3.FR, I/4.FR). Noolega on näidatud täispikk GST-E1HA. **C:** Bakterist puhastatud StrepE2 indutseerimata (UI), indutseeritud (I) proov ning afiinsuskromatograafiaga puhastatud StrepE2 3. fraktsiooni proov (I/3. FR). StrepE2 eeldatav suurus on märgitud tärniga.



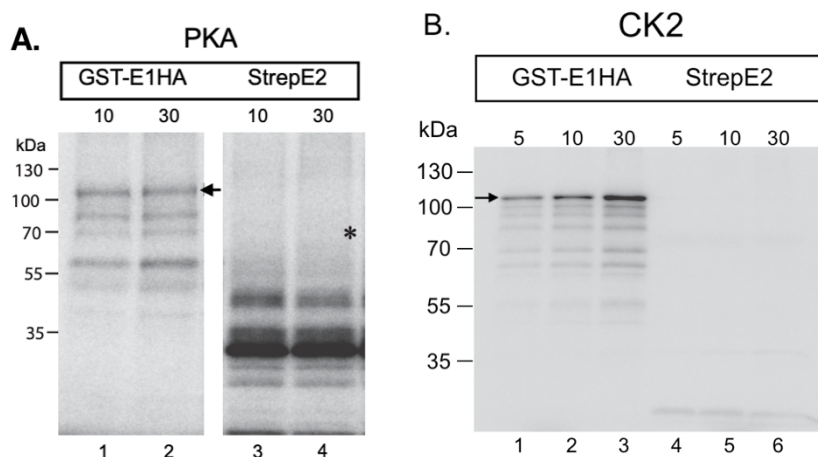
Joonis 11. Bakterist puhastatud HPV5 GST-E1HA ja StrepE2 valkude detekteerimine WB analüüsiga. **A:** GST-E1HA valgu indutseerimata proovis (UI) puuduvad E1 signaalid. Indutseeritud ja afiinsuskromatograafia abil puhastatud kolmes fraktsioonis (I/1.FR, I/2.FR, I/3.FR) on täispikk GST-E1HA märgitud noolega. E1 detekteeriti HA-HRP antikehaga

(1:2000). **B:** StrepE2 valgu indutseerimata proovis (UI) puuduvad E2 signaalid. Indutseeritud ja afiinsuskromatograafiaga kahe sõltumatu puhastuse proovides on esimese puhastuse (P1) proovis täispikk StrepE2 on näidatud musta noolega, mis teisel puhastusel (P2) puudub. StrepE2 detekteerimiseks kasutati primaarset E2 vastast antikeha (1:1000) ja sekundaarset GAR (*Goat-Anti-Rabbit*) antikehaga (LabAs) lahjenduses 1:15000.

Eelnevatest tulemustest saab järeldada, et bakteris ekspresseeritud ja afiinsuskromatograafia abil puhastatud GST-E1HA fraktsioonides on täispikk E1 detekteeritav (joonis 11 A). StrepE2 kahe erineva puhastuse puhul on ühel juhul täispikk valk vähesel määral detekteeritav ning puudub teisel sõltumatul puhastusel (joonis 11 B). Sarnaselt StrepE2-ga lagundatakse GST-E1HA valk bakteris ning täispika valgu ekspressioonitase on küll detekteeritav, kuid siiski madal. Kokkuvõtvalt võib öelda, et GST-E1HA ja StrepE2 *WB* analüüsist nähtub, et lisaks madalale ekspressioonitasemele sisaldasid mõlemad puhastatud valgud ka ohtralt laguprodukte (joonis 11).

2.3.3 GST-E1HA ja StrepE2 *in vitro* fosforüleerime CK2 ja PKA poolt

Hoolimata sellest, et HPV5 replikatsioonivalgude puhastamine bakterist oli oodatust ebaefektiivsem, õnnestus siiski *WB* analüüsiga tuvastada vähesel hulgal täispikka GST-E1HA ja StrepE2 valku (joonis 11). Seega otsustati uurida, kas eelnimetatud valke fosforüleeritakse PKA poolt *in vitro* kinaasi reaktsioonis. Lisaks kasutati CK2 kinaasi, mis omab positiivset mõju HPV5 replikatsioonile (Pirsoo *et al.*, 2019). Kinaaside reaktsioonid on kirjeldatud ptk 2.2.14.1.



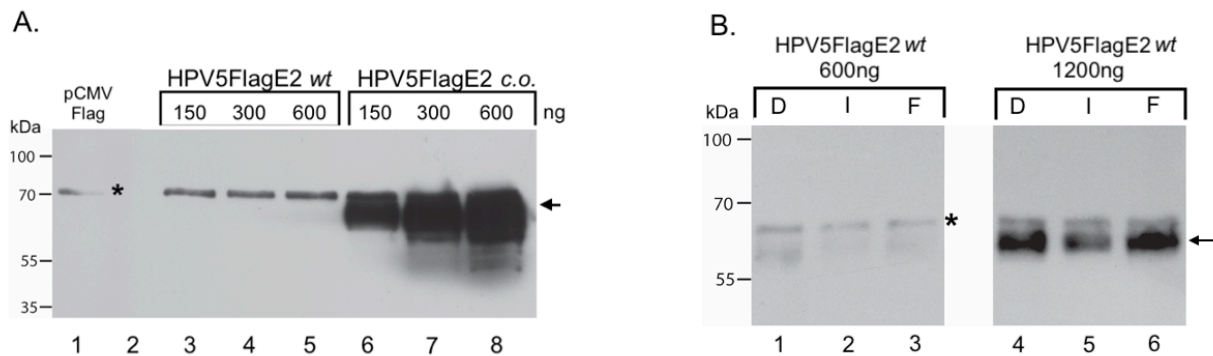
Joonis 12. Bakterist puhastatud GSTE1-HA ja StrepE2 valkude fosforüleerimine PKA ja CK2 poolt. A: GST-E1HA (rajad 1 – 2) ja StrepE2 (rajad 3 – 4) PKA *in vitro* fosforüleerimine 10 ja 30 minuti jooksul. Joonisel on noolega tähistatud PKA poolt fosforüleeritud täispikk GST-E1HA valk. Tärniga on tähistatud eeldatava täispika StrepE2 fosforüleerimissignaalid, mis pole detekteeritavad. **B:** CK2 *in vitro* fosforüleerimiskatse GST-E1HA ja StrepE2 valkudega. Noolega on tähistatud CK2 poolt fosforüleeritud täispikk GST-E1HA, mille signaalid tõusevad ajas (rajad 1 – 3 millele vastab kinaasi reaktsiooni kestvus vastavalt 5 min, 10 min, 30 min). Tärniga tähistatud täispika StrepE2 fosforüleerimissignaalid pole detekteeritavad.

GSTE1-HA ja StrepE2 valkude *in vitro* fosforüleerimiskatsed näitasid, et bakterist puhastatud E1 valgu hulk on piisav, et detekteerida täispika GST-E1HA fosforüleerimist CK2 poolt. Täispikast valgust allpool on näha CK2 poolt fosforüleeritud GST-E1HA laguprodukte (joonis 12 B). Huvitaval kombel ei ole CK2 fosforüleerimise signaalid StrepE2 valgu puhul detekteeritavad (joonis 12 paneel B). Kirjanduses on näidatud, et BPV-1 E2 omab hinge regioonis CK2 konsensusjärjestust ning selle fosforüleerimine põhjustab valgu proteolüütilist lagunemist (Schuck *et al.*, 2013). Nii GST-E1HA kui ka StrepE2 on PKA poolt fosforüleeritud, kuid täispika valgu fosforüleerimissignaal on detekteeritav vaid E1 puhul. Täispikk E2 puudub tõenäoliselt ebaefektiivse puhastuse tõttu, mistõttu on näha vaid laguproduktide fosforüleermist (jooniste 11 ja 12 A paneelide võrdlus).

2.3.4 HPV5 E2 valgu ekspressioon ja funktsionaalsus U2OS rakkudes

Eelnevatest katsetest selgub, et HPV5 StrepE2 valku ei olnud võimalik bakterist edukalt puhastada. Kuid selleks, et siiski uurida E2 seost PKA vahendatud HPV5 replikatsiooni inhibitsioonile, liiguti efektiivsemaks valgu ekspressiooniks bakterist eukarüootsetesse U2OS ja 293-FT rakuliini. Selle jaoks kasutati pCMVHPV5FlagE2 ekspressioonikonstrukti ja lisaks konstrueeriti E2 valgu ekspressiooni tõstmiseks koodon optimeeritud FlagE2 järjestusega plasmiid pCMVHPV5FlagE2 *c.o.* Konstrukti kloneerimisskeem on kirjeldatud ptk 2.2.2. FlagE2 *wt* ja *c.o.* valgud puhastati immuunosadestamise meetodiga ptk 2.2.8.

Selleks, et teada saada, kas antud konstruktid ekspresseeruvad ja on funktsionaalsed imetajarakkudes, kasutasime U2OS rakuliini mis toetab erinevate HPV tüüpide replikatsiooni (Geimanen *et al.*, 2011).

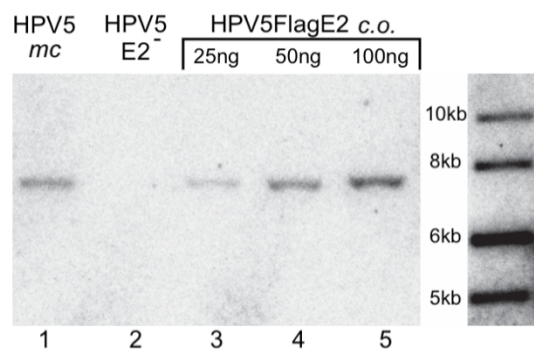


Joonis 13. HPV5FlagE2 wt ja HPV5FlagE2 c.o. valkude ekspressioonianalüüs U2OS rakkudes WB meetodiga. A: HPV5FlagE2 wt ja HPV5FlagE2 c.o. valkude ekspressioon U2OS rakkudes. Rakkudesse transfekeeriti negatiivse kontrollina 600 ng pCMV-Flag-4 vektorit ning HPV5FlagE2 wt ja c.o. konstrukte kolmes erinevas koguses (150 ng, 300 ng, 600 ng). Noolega on näidatud ekspresseeruv FlagE2. **B:** PKA aktivaatorite mõju HPV5FlagE2 ekspressioonile U2OS rakkudes. U2OS rakkudesse transfekeeriti 600 ng ja 1200 ng HPV5FlagE2 wt ekspressiooniplasmiidi. 24 tundi peale transfektsiooni lisati rakkudele endogeense PKA taseme tõstmiseks IBMX (0,5 μ M) joonisel tähistatud – I ja Forskolin (20 μ M), joonisel tähistatud – F. Positiivse kontrollina lisati 2 μ l DMSO, joonisel tähistatud – D. Noolega on näidatud E2 valk. Rakud lüüsi otse koekultuuritassidel 80 μ l lüüsilahusega (SDS+DTT), kuumutati 10 minutit 100 °C juures ning jahutati jääl. Geelile kanti 18 μ l lüsaati ning analüüsiti WB meetodiga. Signaalide detekteerimiseks kasutati antikeha ANTI-FLAG-M2-HRP (*Sigma-Aldrich*) lahjenduses 1:3000. Mõlemal paneelil on tärniga näidatud ANTI-FLAG-HRP antikeha ebaspetsiifilise seondumine.

Jooniselt 13 selgub, et FlagE2 c.o. ekspresseerub U2OS rakuliinis paremini kui FlagE2 wt. Selleks, et uurida PKA mõju E2 valgule transfekeeriti FlagE2 wt valku kodeeriv ekspressiooniplasmiid pCMVHPV5FlagE2 wt U2OS rakkudesse. Rakkudele lisati PKA aktivaatoreid IBMX ja Forskolin, mis läbi tõusnud cAMP taseme aktiveerivad rakusisese PKA. Jooniselt 13 B selgub, et E2 wt lagundatakse PKA aktivaatorite mõjul. Antud katses ei

kasutatud koodon optimeeritud FlagE2 ekspressiooniplasmiidi, sest liiga kõrge ekspressiooni taseme korral ei pruugi madalmolekulaarsed ühendid hästi toimida, mistõttu ei ole PKA aktivaatorite mõju E2 degradatsioonile hästi detekteeritav.

Et kontrollida, kas koodon optimeeritud FlagE2 on U2OS rakuliinis lisaks kõrgele ekspressioonitasemele ka funktsionaalne ja suudab toetada HPV5 replikatsiooni, transfekteeriti pCMVHPV5FlagE2 *c.o* plasmiid koos HPV5E2⁻ genoomiga, mis ei ole võimeline ilma E2 ekspressiooniplasmiidita replitseeruma, U2OS rakkudesse. HPV5FlagE2 *c.o.* valgu füsioloogilise aktiivsuse analüüs on näidatud joonisel 14.



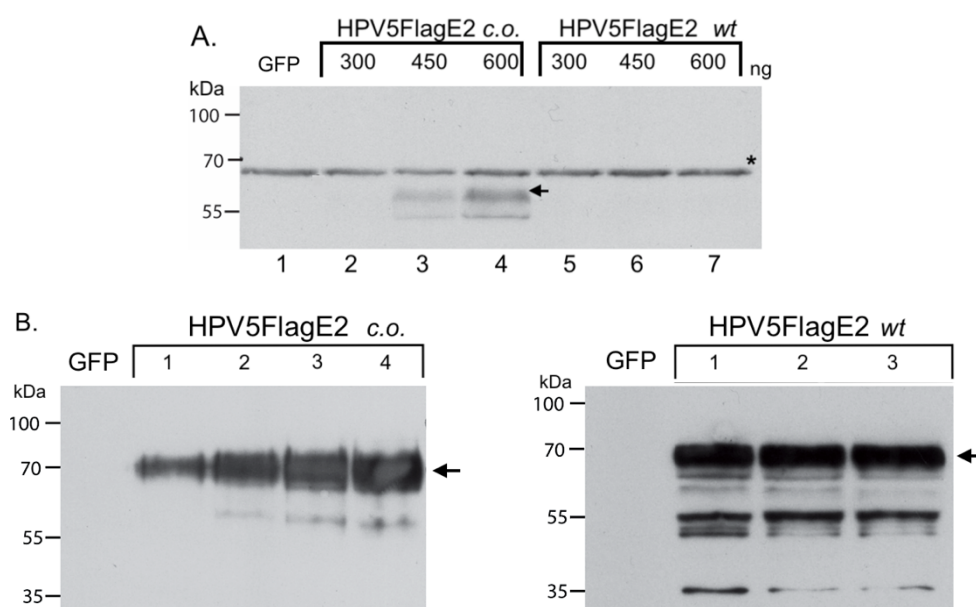
Joonis 14: HPV5FlagE2 *c.o.* valgu funktsionaalsuse kontroll U2OS rakuliinis *SB* meetodiga. Rakkudesse transfekteeriti 300 ng HPV5 *minicircle* ja 300 ng HPV5E2⁻ genoomi. HPV5E2⁻ genoomile kotransfekteeriti HPV5FlagE2 *c.o* ekspressiooniplasmiidi kolmes erinevas koguses (25 ng, 50 ng, 100 ng). 96 h peale transfektsiooni eraldati rakkudest totaalne DNA ning analüüsiti *Southern blot* meetodiga. FlagE2 *c.o.* konstrukti kotransfektsioon E2 defektse HPV5E2⁻ genoomiga taastab viimase replikatsioonivõime.

HPV5E2⁻ genoomi replikatsioon ei ole 96 h peale transfektsiooni detekteeritav. Küll aga on HPV5E2⁻ genoomiga koos transfekteeritud HPV5FlagE2 *c.o.* replikatsioonisignaalid kontsentratsioonist sõltuvad. Antud tulemustest koos ekspressioonitaseme analüüsiga U2OS rakkudes saab järeldada, et konstrueeritud HPV5FlagE2 *c.o.* ekspresseerub U2OS rakuliinis väga kõrgel tasemel ning omab füsioloogilist aktiivust initsieerides iseseisvalt mitte replikatsioonivõimelise HPV5E2⁻ genoomi replikatsiooni.

2.3.5 HPV5 E2 valgu ekspressioon 293-FT rakkudes

HPV5FlagE2 *wt* ja HPV5FlagE2 *c.o.* valkude ekspressioonianalüüsis U2OS rakkudes selgus, et FlagE2 *wt* valgu hulk rakulüsaadis ei olnud piisav WB meetodiga detekteerimiseks (joonis 13 paneel A).

Kuna 293-FT rakke peetakse imetajarakkude parimaks ekspressioonisüsteemiks, transfecteeriti nii HPV5FlagE2 *wt* kui ka HPV5FlagE2 *c.o.* kodeerivad ekspressiooniplasmiidid 293-FT rakkudesse ning E2 valkude ekspressiooni analüüsiti WB meetodiga (joonis 15 A). Selgus, et sarnaselt U2OS rakkudele oli ka 293-FT rakkudes otse lüsaadist võimalik detekteerida ainult koodon optimeeritud E2 valku, mistõttu puhastati valgud IP meetodiga ning immuunosadestatud valkude detekteerimiseks kasutati WB analüüsi (joonis 15 B).



Joonis 15. HPV5FlagE2 *wt* ja *c.o.* valkude detekteerimine 293-FT rakkudes WB meetodiga. **A:** 293-FT rakkudesse transfecteeriti HPV5FlagE2 *c.o.* ja *wt* ekspressiooniplasmiidid, rakud lüüsi ja teostati WB anti-FLAG-HRP antikehaga lahjenduses 1:3000. Noolega on näidatud rakkudes ekspresseeruv E2. Negatiivse kontrollina kasutati lüsaati GFP-d kodeeriva plasmiidiga transfecteeritud rakkudest. Tärniga on tähistatud anti-Flag-HRP antikeha ebaspetsifilised signaalid **B:** Vasakpoolsel joonisel kanti geelile immuunosadestatud FlagE2 *c.o.* valku vastavalt 1 µl (joonisel nr 1), 5 µl (joonisel nr 2), 10 µl (joonisel nr 3), 15 µl (joonisel nr 4). Noolega on näidatud E2 valk. Parempoolsel joonisel kanti geelile immuunosadestatud FlagE2 *wt* vastavalt 3 µl (joonisel nr 1), 6 µl (joonisel nr 2) ja 10

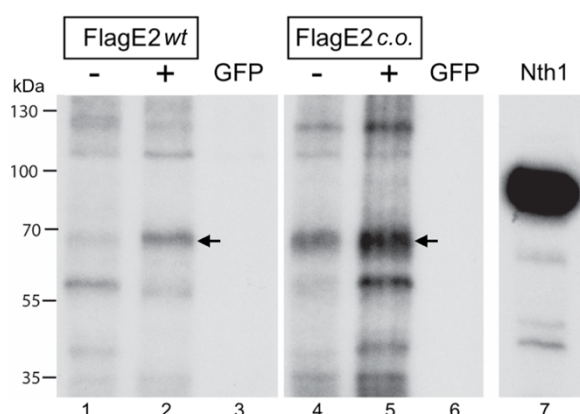
µl (joonisel nr 3). Negatiivse kontrollina kasutati kahel geelil 15 µl GFP-kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud rakudest immuunsadestatud kerakesi.

Eelnevad katsed kinnitavad, et eukarüootsetes 293-FT rakkudes on immuunosadestatud HPV5FlagE2 metsiktüüpi kui ka koodon optimeeritud täispikk valk detekteeritav. Lisaks ekspresseerub koodon optimeeritud valk tugevamalt ja laguneb võrreldes metsiktüüpi valguga vähem (Joonis 15 B). Eelnev joonis kinnitab, et IP puhastusmeetod töötab võrreldes bakteriaalse puhastusega efektiivsemalt.

2.3.6 HPV5FlagE2 wt ja c.o. *in vitro* PKA fosforülatsiooni reaktsioon

Selles töös tehtud PKA fosforüleerimise katsed HPV5 StrepE2 valguga näitasid, et E2 on PKA substraat, olulgi, et valgu ebaefektiivse puhastuse tõttu polnud täispika E2 fosforüleerimist võimalik detekteerida (joonis 12 A). Selleks, et kontrollida kas ja millise efektiivsusega fosforüleerib PKA immuunosadestatud FlagE2 wt ja FlagE2 c.o. valke, viidi läbi *in vitro* kinaasi reaktsioon (kirjeldatud ptk 2.2.14.1), mille tulemus on joonisel 16.

Kuna immuunosadestamisega võivad kaasa tulla rakusisesed kinaasid, mis on võimelised E2 valku fosforüülida, teostati kontrollreaktsioon ilma PKA-ta. Paralleelselt tehti reaktsioon ka MS analüüsiks, kuid lisamata jäeti gamma-P³²-ATP ning täpsemate tulemuste saamiseks suurendati reaktsioonide mahtu ja kasutatavate komponentide hulka 2 korda.



Joonis 16. HPV5FlagE2 wt ja c.o. valkude *in vitro* fosforüleerimine PKA poolt. Joonisel on IP meetodiga puhastatud HPV5Flag E2 wt ja c.o. kontrollreaktsioonid ilma PKA-ta (rajad 1 ja 4, joonisel tähistatud – märgiga) ja kinaasi reaktsioon PKA-ga (rajad 2 ja 5, joonisel

tähistatud + märgiga). Positiivse kontrollina kasutati PKA mudelsubtraati Nth1 valku 0,2 µg reaktsiooni kohta. Kõikidele proovidele lisati 0,2 µl gamma-P³²-ATP ning reaktsioonid toimusid toatemperatuuril 30 minutit. Reaktsioonid lõpetati 2x Laemmli puhvri lisamisega. Proove inkubeeriti 5 minutit 100 °C juures, jahutati ning kanti 8% SDS-poliüakrüülamiid geelile. Geel kuivatati ning eksponeeriti ekraanile, et analüüsida *Phospho imager* masinaga. Joonisel on noolega näidatud täispikk PKA poolt fosforüleeritud FlagE2. GFP tähistab FlagE2 konstruktide immuunsadestamise käigus kasutatud negatiivset kontrolli.

Joonis 16 näitab, et IP meetodiga puhastatud FlagE2 koodon optimeeritud ja metsiktüüpi valkudel on PKA fosforüleerimise tagajärjel detekteeritav täispikk E2 valk. See on oluline erinevus võrreldes bakterist puhastatud E2 valgu PKA reaktsiooniga, kus detekteeritavad olid vaid E2 laguproduktide fosforüleerimissignaalid (joonis 12 A).

Võttes arvesse IP meetodiga puhastatud HPV5FlagE2 koodon optimeeritud ja metsiktüüpi valkude analüüse on teada, et koodon optimeeritud valk ekspresseerub tugevamalt, mistõttu on ka detekteeritavad fosforüleerimissignaalid tugevamad.

2.3.7 HPV5FlagE2 c.o. valgu PKA fosfosaitide tuvastamine

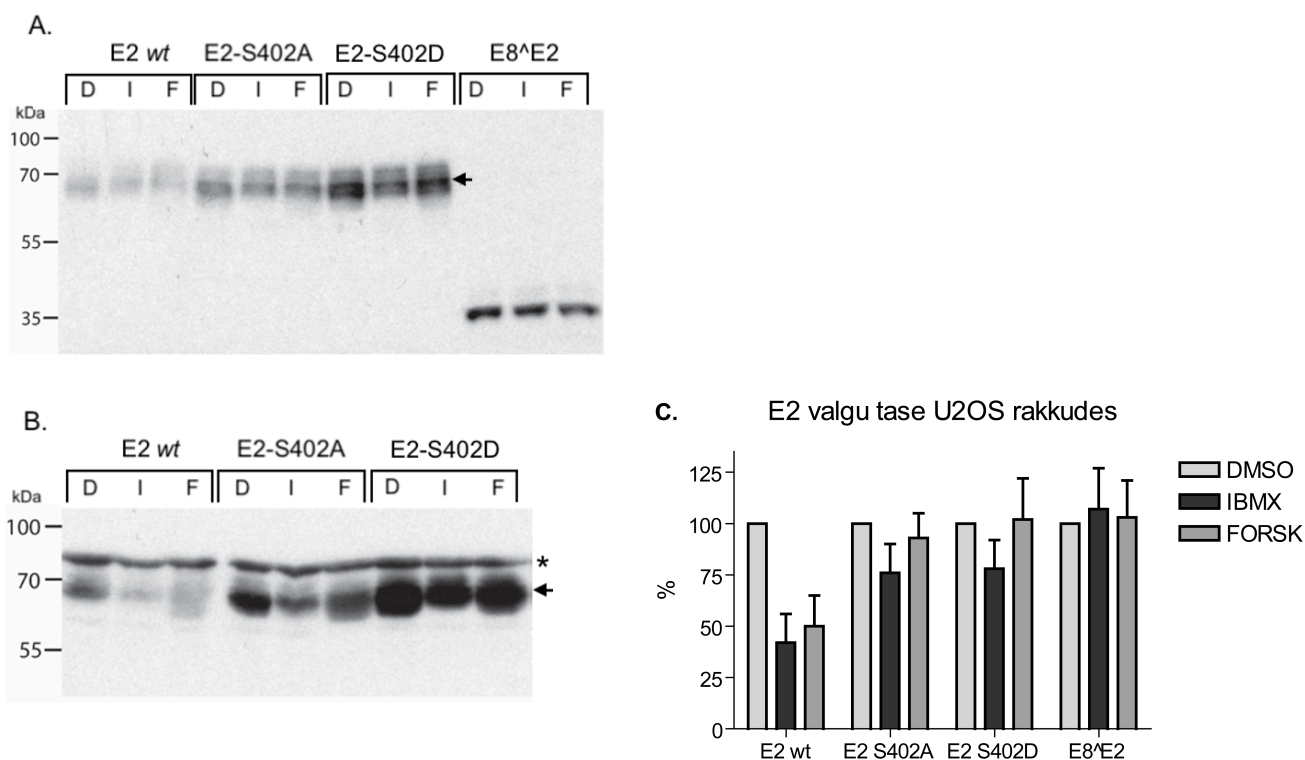
Eelnevad katsed näitasid, et PKA fosforüleerib HPV5 E2 valku. Et teada saada PKA poolt fosforüleeritud E2 valgus olevad aminohapete jäägid, teostati *in vitro* kinaasi reaktsioonid ilma radioaktiivse ATP-ta (ptk 2.2.14.2). Selleks, et eristada E2 fosforüleerimist ebaspetsiifiliste fosforüleerimisproduktide hulgast, tehti paralleelselt kontrollreaktsioonid asendades E2 valgu immunkompleksid 293-FT rakkudest immuunsadestatud GFP immunkompleksiga. Reaktsioonid toimusid 30 minutit toatemperatuuril. Proovid saadeti MS analüüsiks TÜTI proteoomika tuumiklaborisse.

HPV5FlagE2 valk koosneb 522 aminohapest, millest 122 on fosforüleeritavad seriini või treoniini aminohapetejäägid. MS tulemuste põhjal oli analüüsi katvus 79% ning kokku analüüsiti 412 aminohapet, millest 42 olid seriinid või treoniinid (joonis 17). Leitud fosfosaitide tulemused on toodud kokkuvõtvalt tabelis 3.

2.3.8 MS analüüsil leitud S402 fosfosaidi muteerimise efekt E2 valgule

Et teada saada, kas PKA märklaud on S402, mille fosforüleerimine põhjustab E2 degradatsiooni, asendati 402. positsioonil asetsev seriin mitte-fosforülitavaksalaniiniks (A) või fosfomimeetikuna funktsioneerivaks asparagiinhappeks (D). See tähendab, et PKA ei suuda selles positsioonis asetsevat muteeritud aminohapped fosforüleerida. HPV5FlagE2 S402A ja S402D plasmiidide konstrueerimise kirjeldus on esitatud ptk 2.2.1.

Uurimaks S402 fosfosaidi muteerimise mõju E2 valgule, transfekteeriti HPV5 E2 *wt*, S402A ja S402D kodeerivad plasmiidid U2OS rakkudesse ning 48 tunni möödudes lisati rakkudele kemikaale IBMX (0,5 mM) ja Forskolin (10 µM), mis tõstavad rakkudes cAMP taset. Tõusnud cAMP tase aktiveerib rakusisese PKA. Samasugune katse tehti paralleelselt Flag-E8^ΔE2 kodeeriva konstruktiga, sest E8^ΔE2 on E2 lugemisraamilt alternatiivse splaissinguga saadav valk, mis sisaldab samuti S402. HPV5FlagE2 S402A ja S402D punktmutatsioonide mõju E2 valgule on näidatud joonisel 18.



Joonis 18. HPV5FlagE2 S402A ja S402D punktmutatsioonide mõju E2 degradatsioonile U2OS rakkudes WB meetodiga. Joonisel on U2OS rakkudesse transfekteeritud HPV5 E2 *wt*, E2-S402A, E2-S402D ja E8^ΔE2 valkude ekspressioon, mida töödeldi rakusisest PKA-d aktiveerivate kemikaalidega: IBMX (joonisel tähistatud I) ja Forskolin (joonisel tähistatud F) 4 tunni jooksul. Positiivse kontrollina lisati rakkudele 3 µl DMSO (joonisel tähistatud D). Noolega on tähistatud E2 valk. **A:** E2 signaalid detekteeriti ANTI-FLAG-HRP antikehaga

(1:3000). **B:** E2 signaalid detekteeriti anti-E2 vastase antikehaga (1:2000), mille ebaspetsiifilise seondumise signaal on märgitud tärniga. **C:** HPV5 E2 *wt*, S402A, S402D ja E8^{E2} signaalide kvantiseerimise tulemused U2OS. DMSO-ga töödeldud rakkude signaalid võeti võrdseks 100%-ga ning IBMX ja Forskolini-ga töödeldud signaalid arvutati vastavalt. Andmed on esitatud kolme korduse normaliseeritud keskmiste väärtustena +/- SD (n=3).

Eelnevalt jooniselt E2 S402 mutantide analüüsist selgub, et punktmutatsioonid takistavad E2 degradeerimist PKA aktivaatorite mõjul. Forskolini töötuse vastu on mutantidel kõige tugevam, peaaegu täielik resistentsus. IBMX mõju vastu on resistentsus väiksem, kuid tulemuste kvantiseerimine näitas, et mutantsete valkude degradeerimine võrreldes metsiktüüpi E2 tasemega vähenes siiski umbes poole võrra.

S402 aminohape jääki sisaldav E8^{E2} on samuti PKA poolt *in vitro* fosforüleeritud (publitseerimata tulemused), kuid erinevalt täispikast *wt* E2 valgust, ei ole E8^{E2} kõrge PKA aktiivsuse tõttu degradeeritud. See tähendab, et E2 degradeerimine on N-terminaalsest osast sõltuv protsess, sest võrreldes täispika E2-ga puudub E8^{E2} valgul N-terminaalne domeen. MS analüüsiga tuvastati küll suurem osa E2 valgus olevatest aminohapetest, kuid täispikka E2 valku ning hinge regioonis asuvaid fosfopeptiide ei olnud võimalik analüüsida (joonis 17). Seletus IBMX põhjustatud veidi tugevamale degradatsioonile võib peituda just hinge regioonis, kus võivad asuda PKA fosfosaidid.

2.3.9 HPV5FE2 rakuliste interaktorite tuvastamine

Valkude omavahelised interaktsioonid on hädavajalikud raku elutegevuseks ja bioloogilisteks protsessideks kõigis elusorganismides. Üksteisega interakteeruvate valkude avastamine võimaldab paremini mõista nende juhitud signaaliradu.

HPV5 E2 valguga seonduvate rakuliste valkude leidmiseks teostati immuunosadestamine HPV5Flag E2 *c.o.* konstruktiga transfekteeritud 293-FT rakkudest. Negatiivse kontrollina teostati immuunosadestamine GFP-d ekspresseeriva plasmiidiga transfekteeritud rakkudest. Poolele immuunosadestatud kompleksidest teostati *in vitro* PKA kinaasi reaktsioon. Kõik reaktsioonid analüüsiti TÛTI proteoomika tuumiklaboris.

MS analüüsi tulemusel leitud HPV5FlagE2 *c.o.* 293-FT rakulised interaktorid on toodud tabelis 4. Positiivseks loeti sellised interaktorid, kus HPV5FlagE2 *c.o.* proovides leiti vastavale

valgule vähemalt 6 erinevat trüptilist peptiidid ning uuritavates proovides leitud peptiidide arv võrreldes negatiivse kontrolli (GFP immuunopretsipitaat) peptiidide suhtarv oli vähemalt 3/1.

Tabel 4. MS analüüsil tuvastatud E2 interaktorid 293-FT rakkudes. Rakutuumas paiknevad valgud on märgitud tärniga.

Geeni nimi	Tuvastatud E2 interaktorid 293-FT rakkudes	Peptiidide arv		
		E2	E2 + PKA	GFP
PRKACA*	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha *	5	18	0
CIQBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial	15	14	5
BRD4*	Bromodomain-containing protein 4 *	25	39	6
USP7*	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 *	8	33	0
CK2A1 *	Casein kinase II subunit alpha	5	12	1
RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	6	10	2
RPS6	40S ribosomal protein S6	9	10	2
SRRM2	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	21	30	4
CLPX	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX-like	8	14	0
CSNK2B	Casein kinase II subunit beta	2	8	1
PRKDC*	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit *	11	31	1
LRRC59*	Leucine-rich repeat-containing protein 59 *	5	8	0
TOP2A*	DNA topoisomerase 2-alpha *	11	26	4
UBTF*	Nucleolar transcription factor 1 *	9	13	0
PNN	Pinin	7	18	1
MYO1E	Unconventional myosin-Ic	19	14	6
ATAD3A	Isoform 2 of ATPase family AAA domain-containing protein 3A	6	12	2
CHD4*	DNA helicase (Fragment) *	2	18	1
BRD2*	Bromodomain-containing protein 2 *	6	12	0
KTN1	Isoform 2 of Kinectin	2	14	0
EIF3D	Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	2	6	0
GNAI1	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha	2	5	0
DDX46*	RNA helicase *	3	5	0
POLDIP2*	Polymerase delta-interacting protein 2 *	3	3	0

Mitmed MS analüüsist leitud valgud on juba varasemalt kirjeldatud E2 interaktoritena (tabelis märgitud kollasega), kuid õnnestus leida ka seni kirjeldamata HPV5 E2 interaktoreid. Kuna E2 paikneb peamiselt peremeesraku tuumas, ei saa peamiselt tsütoplasmas leiduvate

interaktorite seondumist E2-ga esmasel analüüsil võtta kui funktsionaalselt olulist. Samas on võimalik, et selliste interaktoritega seondub E2 valk mitoosi käigus, kui tuumamembraan on lagunenu. Huvitavad tuumas paiknevad interaktorid on näiteks guaniini siduva valguga α subühik (GNAI1), polümeraas δ seonduv valk 2 (POLDIP2) ja DNA helikaasi fragment.

2.4 Arutelu

Töö peamiseks eesmärgiks oli teada saada millise mehhanismiga inhibeerib PKA HPV5 genoomi replikatsiooni. Kuna viiruse replikatsiooniks on vajalikud E1 ja E2 fosfovalgud, eeldati, et PKA mõjutab viiruse replikatsiooni just neid fosforüleerides. Selle uurimiseks konstrueeriti antud töö käigus E1 ja E2 valke kodeerivad plasmidid, et leida neis paiknevad PKA poolt fosforüleeritud aminohapped.

Mitmed järjestikused ekspressioonikatsed kinnitasid, et Strep-märgisega E2 valguga ekspressioon bakteris ei olnud meie kätes piisavalt efektiivne. Selleks, et vähendada E1 ja E2 valkude proteolüütilist degradeerimist bakteris, valiti valkude ekspresseerimiseks BL21DE3RP kompetentne *E.coli* tüvi, mis ei sisalda proteaase. E1 valguga puhul oli võrreldes E2 valguga degradatsioon küll väiksem, kuid E2 valguga puudus mõjuv efekt. Strep-E2 elueerimist ei muutnud efektiivsemaks ka biotiini asendamine selle analoogi destiobiotiiniga, mis võimaldab valguga jaoks puhastust natiivsematest tingimustes. Samuti ei tuvastatud Strep-E2 sekveneerimisel punktmutatsioone, mis tekitaksid valguga enneaegse stoppkoodoni ning põhjustaksid lühemate produktide ekspressiooni. Lisaks võib olla, et valguga puhastamise efektiivsus ei olnud ühe Strep-märgise lisamisega piisav, kuid oleks võinud olla suurem kahe- või kolmekordse Strep-märgise lisamisega, mis tugevdaks piisavalt valguga seondumist kolonnile samas võimaldades efektiivsemat eluatsiooni. Tihti pole valkude puhastamiseks sobivate tingimuste leidmine *a priori* võimalik, mistõttu on läbi eksperimentaalsete katsete vaja leida sobivaimad tingimused vastavalt valgule. Kuna antud töö eesmärk ei olnud E2 valguga jaoks sobivate ekspresioonitingimuste leidmine vaid selle mõju uurimine PKA vahendatud HPV5 replikatsiooni inhibitsioonile, liiguti valguga puhastusega bakterist eukarüootsetesse 293-FT rakkudesse.

In vitro CK2 fosforüleerimiskatsed võimaldasid detekteerida täispikka fosforüleeritud E1 valku. Huvitaval kombel ei olnud CK2 fosforüleerimise signaalid StrepE2 valgu puhul detekteeritavad. Kirjanduses on näidatud, et BPV-1 E2 omab hinge regioonis CK2 konsensusjärjestust ning selle fosforüleerimine põhjustab valgu proteolüütilist lagunemist. Kuna eelnimetatud fosforüleerimissait asus varieerva järjestusega hinge regioonis, ei ole konserveerunud see teiste HPV-de seas.

In vitro PKA fosforüleerimiskatsed näitasid, et bakterist puhastatud GST-E1 HA valgul on detekteeritav lisaks laguproduktidele ka täispikk fosforüleeritud valk. StrepE2 valgul oli näha vaid laguproduktide fosforüleerimissignaale. Immuunosadestamisega puhastatud koodon optimeeritud ja metsiktüüpi FlagE2 valkudel on PKA fosforüleerimise tagajärjel detekteeritav täispikk E2 valk, mis on põhjustatud efektiivsemast valguekspressionist 293-FT rakkudes.

MS analüüsiga tuvastatud PKA poolt fosforüleeritud märklaud E2 valgus on 402. postitsioonil asetsev seriin – S402. Mutandide katsed S402A ja S402D-ga kinnitasid, et seriini muutmine mitte-fosforüleeritavaksalaniiniks(A) või fosfomimeetikumina funktsioneerivaks asparagiinhappeks(D), takistavad E2 degradeerimist PKA aktivaatorite mõjul. Lisaks leiti, et E2 lugemisraamilt alternatiivse splaiissinguga saadavat lühemat valku E8^{E2} ei degradeerita PKA sõltuvalt. See tähendab, et E2 degradeerimine on N-terminaalsest osast sõltuv protsess, sest võrreldes täispika E2-ga puudub E8^{E2} valgul N-terminaalne domeen. Kuna antud MS analüüsist jäi välja E2 hinge regioon, võib IBMX-st sõltuv tugevam S402A ja S402D degradeerimine olla seletatud potentsiaalsete PKA fosfosaitidega hinge regioonis. Teine seletus võib olla, et IBMX võib ebaspetsiifiliselt inhibeerida rakus olevad fosfodiesterase. Selle tulemusel suureneb lisaks cAMP ja PKA aktiivsusele ka cGMP ja PKG aktiivsus. PKG on sarnaselt PKA-ga AGC perekonda kuuluv seriin/treoniin kinaas, mis võib omakorda osaleda E2 regulatsioonis ja indutseerida E2 degradatsiooni fosforüleerides teisi aminohappeid.

MS analüüsiga tuvastati mitmeid juba varasemalt kirjeldatud E2-ga interakteeruvaid valke, kuid õnnestus leida ka seni kirjeldamata HPV5 E2 interaktoreid. Huvi pakkuv tuumas paiknev interaktor on näiteks polümeraas δ seonduv valk 2 (POLDIP2). HPV genoomi replikatsiooniks on vajalikud peremeesraku poolsed valgud, sealhulgas polümeraas δ . Varasemalt on teada, et viiruse E2 valk osaleb vaid replikatsiooni initsiatsiooni kompleksis, peale mida dissotseerub. Polümeraas δ osaleb aga replikatsiooni elongatsiooni kompleksis, mis võiks tähendada, et lisaks senistele teadmistele, võib E2 osaleda replikatsiooni elongatsioonis, seondudes polümeraas δ seonduv valk 2 -ga

Veel leidsime E2 valguga interakteeruva helikaasi fragmendi. Varasemalt on teada, et E2 interakteerub viiruse E1 valguga, millel on helikaasne aktiivsus. See võib tähendada, et E2 valgul on olemas pind, mis on võimeline interakteeruma lisaks E1-le ka teiste, rakuliste helikaasete valkudega.

Veel üks huvitav MS analüüsist selgunud E2 interaktor on guaniini siduva valgu α subühik (GNAI1). Antud valk ei paigutu küll spetsiifiliselt tuumas, kuid ei ole välistatud, et E2 seondub antud valguga mitoosi käigus, kui tuumamembraan on lagunenu. Selle valgu α subühik omab guaniini seondumiskohta, mille olemasolul on valk aktiivses olekus ning võimeline inhibeerima adenülültsüklaasi (ADCY2), mistõttu ei katalüüsi adenülültsüklaas ATP-st sekundaarset virgatsainet cAMP-d. Teadaolevalt aktiveerib PKA just cAMP, mis tähendab, et GNAI1 võib osaleda peremeesraku viirusvastases kaitses

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli teada saada, miks mõjutab PKA β papilloomiviiruste perekonda kuuluva HPV 5 replikatsiooni α papilloomiviiruste perekonda kuuluva HPV18-st erinevalt. Kuna viiruse replikatsiooniks on vajalikud E1 ja E2 fosfovalgud, eeldati, et PKA mõjutab viiruse replikatsiooni just nende fosforüleerimisega. Selle uurimiseks konstrueeriti antud töö käigus E1 ja E2 valke kodeerivad plasmiid, et leida neis paiknevad *in vivo* fosforüleeritud aminohapped.

Kuna bakteris oli viirusvalkude ekspressioon väga madal, otsustati kasutada teadaolevalt parimat eukarüootset ekspressioonisüsteemi, 293-FT rakuliini. Selleks konstrueeriti koodon optimeeritud pCMVHPV5FlagE2 c.o. ekspressiooniplasmiid, mis ekspresseerib Flag-märgisega viiruse replikatsiooni initsiaatorvalku E2. Ekspressiooni- ja replikatsioonianalüüsist selgus, et koodon optimeeritud FlagE2 ekspresseerub U2OS rakuliinis väga kõrgel tasemel ning omab füsioloogilist aktiivust, initsieerides iseseisvalt mitte replikatsioonivõimelise HPV5E2⁻ genoomi replikatsiooni. Seda, et IP puhastus eukarüootsetes 293-FT rakkudes töötab E2 valgu puhastuseks paremini, näitasid ekspressioonikatsed 293-FT rakkudes, kus nii HPV5FlagE2 metsiktüüpi kui ka koodon optimeeritud täispikk valk olid WB meetodiga detekteeritavad. Lisaks ekspresseerub koodon optimeeritud FlagE2 valk tugevamalt metsiktüüpi valgust ning laguneb võrreldes metsiktüüpi FlagE2 valguga vähem.

In vitro fosforüleerimiskatsed näitasid, et PKA fosforüleerib E2 valku ning põhjustab selle degradeerimist. Massispektromeetria kolmest eraldiseisvast analüüsist selgus, et HPV5 E2 valgus on PKA poolt fosforüleeritud märklaud S402 ning et selle muteerimine mitte fosforüülitavaksalaniiniks (S402A) või fosforüülimist mimikeerivaks asparagiinhappeks (S402D) vähendab selgelt PKA poolt põhjustatud E2 degradatsiooni. E2 valgu interaktoorte massispektromeetria analüüs kinnitas, et PKA fosfosait E2 valgus on S402.

MS analüüsiga tuvastati mitmeid juba varasemalt kirjeldatud E2 interakteeruvaid valke, kuid õnnestus leida ka seni kirjeldamata HPV5 E2 interaktoreid nagu näiteks polümeraas δ seonduv valk 2 (POLDIP2) aga ka guaniini siduva valgu α subühik (GNAI1), mille edasine uurimine võib muuta seniseid teadmisi viiruse E2 valgust.

Human papillomavirus type 5 replication proteins: study on purification and phosphorylation

Lisett Liblekas

Summary

Papillomaviruses (HPVs) are an ancient group of viruses with small ~8000 bp double stranded DNA genomes. They are very species-specific and infect only basal keratinocytes of the cutaneous and mucosal epithelium. Human papillomaviruses (HPVs) are dividend into high-risk and low-risk types, based on their ability to induce cancer. Two main genera, mucasotropic α and cutaneotropic β HPVs, both include high carcinogenic species. The absence of antiviral drugs has driven investigations into the details of the molecular mechanisms of the HPV life cycle, which is tightly linked to epithelial differentiation. After infection, the viral genome is maintained in the host cells as nuclear extrachromosomal element that requires two viral proteins E1 and E2. E2 together with viral helicase E1 are phosphoproteins and are found to be substrates for many cellular kinases. Therefore, different life cycles of PV can be modulated by protein kinases, including cAMP-dependent protein kinase A (PKA). Based on previous studies, it has been showed that ubiquitously expressed PKA differentially regulates the replication of α HPV18 and β HPV5. PKA stimulates the replication of high-risk, cervical cancer-associated HPV18, but inhibits the replication of skin cancer-related β HPV5 in U2OS and 293-FT cell line. The main purpose of this work was to study whether this pehnmomenon is based on viral replication proteins. For protein purification and kinase assays we created an expression plasmids for HPV5 E1 and E2 proteins. *In vitro* kinase assays showed, that CK2 and PKA phosphorylate E1 protein, but due to non efficient protein production in bacteria, E2 phosphorylation could not be detected. To futher study the E2 phosphorylation a codon optimized (c.o.) E2 expression plasmid was constructed for mammalian expression system. Expression and replication studies in U2OS and 293-FT cell line confirmed the c.o. E2 efficiency which was phosphorylated by PKA. Interestingly, endogenous PKA activators IBMX and Forskolin caused E2 degradation. Kinase assays and MS analyses showed that PKA targeted phosphosite in E2 is S402 which leads to rapid proteasomal degradation. S402 mutation to alanine or aspartic acid inhibited PKA degradation which confirms that PKA-mediated inhibition of HPV5 replication occurs mainly due to the degradation of the viral transcription and repliciaon protein E2. In addition, new E2 interactors were identified, which can be further analysed.

KIRJANDUSE LOETELU

- Barsoum, J., Parkash, S., Han, P., & Androphy, E. (1992). Mechanism of action of the papillomavirus E2 repressor: Repression in the absence of DNA binding. *Journal of Virology*, *66*, 3941–3945.
- Bergvall, M., Melendy, T., & Archambault, J. (2013). The E1 proteins. *Virology*, *445*(1–2), 35–56. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.020>
- Bernard, B. A., Bailly, C., Lenoir, M.-C., Darmon, M., Thierry, F., & Yaniv, M. (1989). The Human Papillomavirus Type 18 (HPV18) E2 Gene Product Is a Repressor of the HPV18 Regulatory Region in Human Keratinocytes. *Journal of Virology*, *63*(10), 4317–4324.
- Bienowska-Haba, M., Williams, C., Kim, S. M., Garcea, R. L., & Sapp, M. (2012). Cyclophilins Facilitate Dissociation of the Human Papillomavirus Type 16 Capsid Protein L1 from the L2/DNA Complex following Virus Entry. *Journal of Virology*, *86*(18), 9875–9887.
- Boon, S. S., & Banks, L. (2013). High-Risk Human Papillomavirus E6 Oncoproteins Interact with 14-3-3 σ in a PDZ Binding Motif-Dependent Manner. *Journal of Virology*, *87*, 1586–1595. <https://doi.org/doi:10.1128/JVI.02074-12>
- Breitburd, F., Croissant, O., & Orth, G. (1987). Expression of human papillomavirus type-1 E4 gene products in warts. *Cancer Cell*, *5*, 22–115.
- Buck, C. B., Day, P. M., & Trus, B. L. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, *445*(1), 169–174.
- Burd, E. M., & Dean, C. L. (2016). Human Papillomavirus. *Microbiology Spectrum*, *4*(4), 1–17.
- Cadd, G., & McKnight, S. (1989). Distinct Patterns of CAMP-Dependent Protein Kinase Gene Expression in Mouse Brain. *Neuron*, *3*(1), 71–79.

- Carr, D. W., Stofko-Hahn, R. E., Fraser, I. D. C., Bishop, S. M., Acott, T. S., Brennan, R. G., & Scott, J. D. (1991). Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. *Journal of Biological Chemistry*, *266*, 14188–14192.
- Castro-Muños, L. J., Manzo-Merino, J., Muños-Bello, Olmedo-Nieva, L., Cedro-Tanda, A., Alfaro-Ruiz, L. A., Hidalgo-Miranda, A., Madrid-Marina, V., & Lizano, M. (2019). The Human Papillomavirus (HPV) E1 protein regulates the expression of cellular gene involved in immune response. *Scientific Reports*, *9*, 1–13.
- Clegg, C. H., Cadd, G. G., & McKnight, G. S. (1988). Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(11), 3703–3707.
<https://doi.org/10.1073/pnas.85.11.3703>
- Collas, P., Le Guellec, K., & Tasken, K. (1999). The a-Kinase–Anchoring Protein Akap95 Is a Multivalent Protein with a Key Role in Chromatin Condensation at Mitosis. *Journal of Cell Biology*, *147*(6), 1167–1180.
- Cripe, T. P., Haugen, T. H., Turk, J. P., Tabatabai, F., Schmid, P. G., Dürst, M., Gissmann, L., Roman, A., & Turek, L. P. (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: Implications for cervical carcinogenesis. *The EMBO Journal*, *6*(12), 3745–3753.
- Davy, C., & Doorbar, J. (2007). G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology*, *368*(2), 219–226.
- Donaldson, M. M., Boner, W., & Morgan, I. M. (2007). TopBP1 regulates human papillomavirus type 16 E2 interaction with chromatin. *Journal of Virology*, *81*, 4438–4342.

- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, *30*, 55–70.
- Elkins, J. M., & Knapp, S. (2012). The Structure of the Full-Length Tetrameric PKA Regulatory RII β Complex Reveals the Mechanism of Allosteric PKA Activation. *Science Signaling*, *5*(224), 21–22.
- Everett, R. D. (2006). Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response. *Cellular Microbiology*, *8*(3), 365–374.
- Fera, A. N. D., Warburton, A., Coursey, T. L., Khurana, S., & McBride, A. A. (2021). Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses*, *13*(321), 1–16.
- Fouts, E. T., Yu, X., Egelman, E. H., & Botchan, M. R. (1999). Biochemical and Electron Microscopic Image Analysis of the Hexameric E1 Helicase*. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(7), 4447–4458.
- Garcia-Alai, M., Gallo, M., Salame, M., Wetzler, D., McBride, A. A., Paci, M., Cicero, D., & de Prat Gay, G. (2006). Molecular basis for phosphorylation-dependent, PEST-mediated protein turnover. *Structure*, *14*, 309–319.
- Gardiol, D., Kühne, C., Glaunsinger, B., Lee, S. S., Javier, R., & Banks, L. (1999). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, *18*(40), 5487–5496.
- Geimanen, J., Isok-Paas, H., Pipitch, R., Salk, K., Laos, T., Orav, M., Reinson, T., Ustav, M., Ustav, M. J., & Ustav, E. (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*(7), 3312–3329.
- <https://doi.org/10.1128/JVI.01985-10>

- Giri, I., & Yaniv, M. (1988). Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *The EMBO Journal*, 7(9), 2823–2829.
- Graham, S. V. (2017). Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation. *Viruses*, 9(245), 1–18.
- Hallows, K. R., Alzamora, R., Li, H., Gong, F., Smolak, C., Neumann, D., & Pastor-Soler, N. M. (2009). AMP-activated protein kinase inhibits alkaline pH- and PKA-induced apical vacuolar H⁺ -ATPase accumulation in epididymal clear cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296, 672–681.
- Hartwig, S., St Guily, J. L., Dominiak-Felden, G., Alemany, L., & de Sanjosé, S. (2017). Estimation of the overall burden of cancers, precancerous lesions, and genital warts attributable to 9-valent HPV vaccine types in women and men in Europe. *Infectious Agents and Cancer*, 12(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0129-6>
- Hoffmann, R., Hirt, B., Bechtold, V., Beard, P., & Raj, K. (2006). Different Modes of Human Papillomavirus DNA Replication during Maintenance. *Journal of Virology*, 80(9), 4431–4439.
- Ilouz, R., Bubis, J., Wu, J., Yim, Y. Y., Deal, M. S., Kornev, A. P., Ma, Y., Blumenthal, D. K., & Taylor, S. S. (2012). Localization and quaternary structure of the PKA RI β holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31), 12443–12448.
- Knighton, D., Zheng, J., Eyck, L. T., Ashford, V., Xuong, N., Taylor, S., & Sowadski, J. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*, 253(5018), 407–414. <https://doi.org/10.1126/science.1862342>

- Krebs, E. G., Graves, D. J., & Fischer, E. H. (1959). Factors Affecting the Activity of Muscle Phosphorylase b Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 234(11), 2867–2873.
- Landsverk, H. B., Carlson, C. R., Steen, R. L., Vossebein, L., Herberg, F. W., Tasken, K., & Collas, P. (2001). Regulation of anchoring of the RIIalpha regulatory subunit of PKA to AKAP95 by threonine phosphorylation of RIIalpha: Implications for chromosome dynamics at mitosis. *Journal of Cell Science*, 114, 3255–3264.
- Langeberg, L. K., & Scott, J. D. (2005). A-kinase-anchoring proteins. *Journal of Cell Science*, 118, 3217–3220.
- Lototskaja, E., Sahharov, O., Piirsoo, M., Kala, M., Ustav, M., & Piirsoo, A. (2021). Cyclic AMP-dependent protein kinase exhibits antagonistic effects on the replication efficiency of different HPV types. *Journal of Virology*.
- Manning, G., Whyte, D. B., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298, 1912–1934. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1075762>
- May, M., Grassmann, K., Pfister, H., & Fuchs, P. G. (1994). Transcriptional Silencer of the Human Papillomavirus Type 8 Late Promoter Interacts Alternatively with the Viral trans Activator E2 or with a Cellular Factor. *Journal of Virology*, 68, 3612–3619.
- McBride, A. A. (2017). Oncogenic human papillomaviruses. *Philosophical Transactions B*, 372, 20160273.
- McBride, A., Bolen, J., & Howley, P. (1989). Phosphorylation sites of the E2 transcriptional regulatory proteins of bovine papillomavirus type 1. *Journal of Virology*, 63(12), 5076–5085.
- McBride, A., & Howley, P. (1991). Bovine papillomavirus with a mutation in the E2 serine 301 phosphorylation site replicates at a high copy number. *Journal of Virology*, 65(12), 6529–6534.

- McPhillips, M. G., Oliveira, J. G., Spindler, J. E., Mitra, A. A., & McBride, A. A. (2006). Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *Journal of Virology*, *80*, 9530–9543.
- Moody, C. A., & Laimins, L. . A. (2009). Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *Plos Pathogens*, *5*(10).
- Münger, K., & Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Research*, *89*, 213–228.
- Newlon, M. G., Roy, M., Morikis, D., Hausken, Z. E., Coghlan, V., Scott, J. D., & Jennings, P. A. (1999). The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR. *Nature Structural Biology*, *6*, 222–227.
- Nishimura, A., Ono, T., Ishimoto, A., Dowhanick, J. J., Frizzell, M. A., Howley, P. M., & Sakai, H. (2000). Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *Journal of Virology*, *74*(8), 3752–3760.
- Noveen, A., Jiang, T.-X., & Chuong, C.-M. (1996). CAMP, an Activator of Protein Kinase A, Suppresses the Expression of Sonic Hedgehog. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *219*(1), 180–185. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0202>
- Parish, J. L., Bean, A. M., Park, R. B., & Androphy, E. J. (2006). ChIR1 is required for loading papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Molecular Cell*, *24*, 867–876.
- Penrose, K., Garcia-Alai, M., Prat-Gay, G., & McBride, A. A. (2004). CK2 phosphorylation-induced conformational switch triggers degradation of the papillomavirus E2 protein. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 22430–22439.

- Penrose, K., & McBride, A. A. (2000). Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *Journal of Virology*, *74*, 6031–6038.
- Piirsoo, A., Piirsoo, M., Kala, M., Sankovski, E., Lototskaja, E., Levin, V., Salvi, M., & Ustav, M. (2019). Activity of CK2 α protein kinase is required for efficient replication of some HPV types. *Plos Pathogens*, *15*(5).
- Pincus, D., Pandey, J. P., Feder, Z. A., Creixell, P., Resnekov, O., & Reynolds, K. A. (2018). Engineering allosteric regulation in protein kinases. *Science Signaling*, *11*(555), 1–11.
- Pouyanfard, S., & Müller, M. (2017). Human papillomavirus first and second generation vaccines—current status and future directions. *Biological Chemistry*, *398*(8), 871–889.
- Ramoz, N., Rueda, L.-A., Bouadjar, B., Montoya, L.-S., Orth, G., & Favre, M. (2002). Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nature Genetics*, *32*, 579–581.
- Reikhardt, B. A., & Shabanov, P. D. (2020). Catalytic Subunit of PKA as a Prototype of the Eukaryotic Protein Kinase Family. *BioChemistry*, *85*, 409–424.
- Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(5), 1522–1527.
- Schuck, S., Ruse, C., & Stenlund, A. (2013). CK2 Phosphorylation Inactivates DNA Binding by the Papillomavirus E1 and E2 Proteins. *Journal of Virology*, *87*(13), 7668–7679.
- Sekhar, V., & McBride, A. A. (2012). Phosphorylation Regulates Binding of the Human Papillomavirus Type 8 E2 Protein to Host Chromosomes. *Journal of Virology*, *86*(18).

- Skålhegg, B. S., & Tasken, K. (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Frontiers in Bioscience*, 5, 678–693. <https://doi.org/10.2741/skalhegg>
- Slebos, R. J., Kesis, T. D., Chen, A. W., Han, S. M., Hedrick, L., & Cho, K. R. (1995). Functional consequences of directed mutations in human papillomavirus E6 proteins: Abrogation of p53- mediated cell cycle arrest correlates with p53 binding and degradation in vitro. *Virology*, 208, 11.120.
- Sonawane, N., Szoka, F., & Verkman, A. Jr. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44826–44831.
- Steger, G., & Corbach, S. (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *Journal of Virology*, 71(1), 50–58.
- Straight, S. W., Hinkle, P. M., Jewers, R. J., & McCance, D. J. (1993). The E5 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16 Transforms Fibroblasts and Effects the Downregulation of the Epidermal Growth Factor Receptor in Keratinocytes. *Journal of Virology*, 78(8), 4521–4532.
- Straub, E., Dreer, M., Fertey, J., Iftner, T., & Stubenrauch, F. (2014). The Viral E8^{E2C} Repressor Limits Productive Replication of Human Papillomavirus 16. *Journal of Virology*, 88, 937–947.
- Tamaki, H. (2007). Glucose-stimulated cAMP-protein kinase a pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(4), 245–250.
- Tanji, C., Yamamoto, H., Yorioka, N., Kohno, N., Kikuchi, K., & Kikuchi, A. (2002). A-kinase anchoring protein AKAP220 binds to glycogen synthase kinase-3beta (GSK-

- 3beta) and mediates protein kinase A-dependent inhibition of GSK-3beta. *Journal of Biological Chemistry*, 227(40), 36955–36961.
- Taylor, S. S., Ilouz, R., Zhang, P., & Kornev, A. P. (2012). Assembly of allosteric macromolecular switches: Lessons from PKA. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 646–658.
- Thomas, M., Massimi, P., Navarro, C., Borg, J. P., & Banks, L. (2005). The hScrib/Dlg apico-basal control complex is differentially targeted by HPV-16 and HPV-18 E6 proteins. *Oncogene*, 24, 6222–6230.
- Walsh, D. A., Perkins, J. P., & Krebs, E. G. (1968). An Adenosine 3',5'—Monophosphate-dependent Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle*. *The Journal of Biological Chemistry*, 243, 3763–3774.
- Wang, J. W., & Roden, R. B. S. (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, 445(1), 175–186.
- Wang, R., Pan, W., Jin, L., Huang, W., Li, Y., Wu, D., Gao, C., Ma, D., & Liao, S. (2020). Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer Letters*, 471, 88–102.
- Wong, K., Ren, X. R., Huang, Y. Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S. M., Mei, L., Wu, J. Y., Xiong, W. C., & Rao, Y. (2001). Signal transduction in neuronal migration: Roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell*, 107(2), 209–211.
- World Health Organization. (2017). Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017-. *Vaccine*, 35(43), 5731–5946.
- Yajid, A. I., Zakariah, M. A., Zin, A. A. M., & Othman, N. H. (2017). Potential Role of E4 Protein in Human Papillomavirus Screening: A Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18, 315–319.

- You, J., Croyle, J. L., Nishimura, A., Ozato, K., & 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., & 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. *Journal of Virology*, *81*(10), 5066–5078.
- Zheng, G., Schweiger, G., Martinez-Noel, L., Zheng, J. A., Smith, J. W., Harper, P. M., & Howley, P. M. (2009). Brd4 regulation of papillomavirus protein E2 stability. *Journal of Virology*, *83*, 8683–8692.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<https://pave.niaid.nih.gov> (viimati vaadatud 1.06.2021)

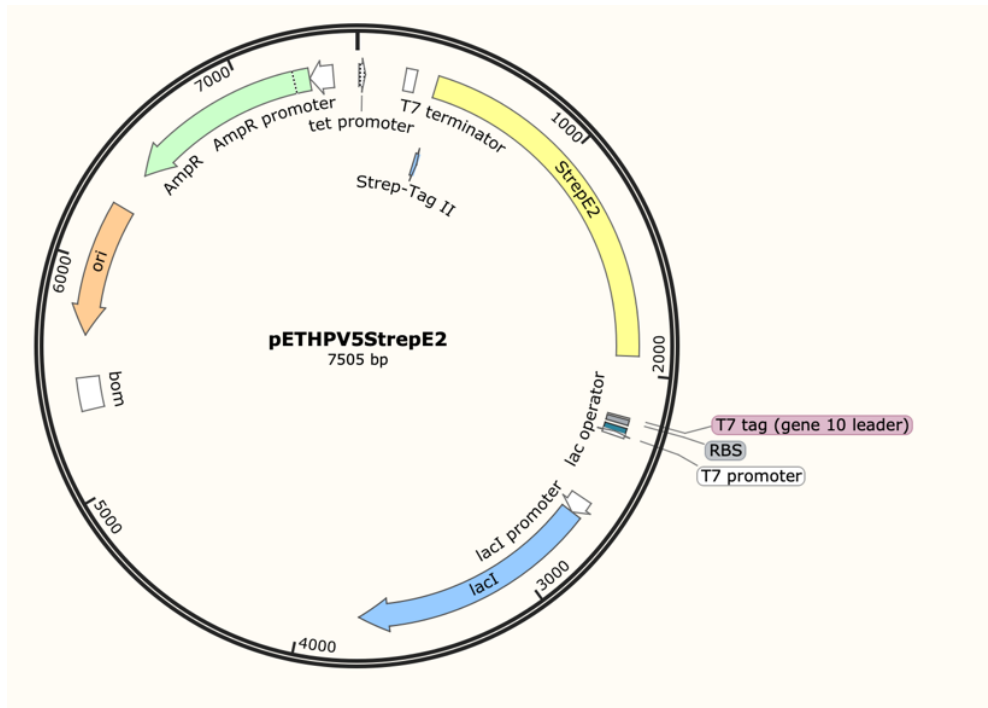
<https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protein-kinases/agc-protein-kinase-group>
(viimati vaadatud 1.06.21)

<https://www.genome.jp/pathway/hsa05165> (viimati vaadatud 1.06.2021)

<https://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP4674> (viimati vaadatud 1.06.2021)

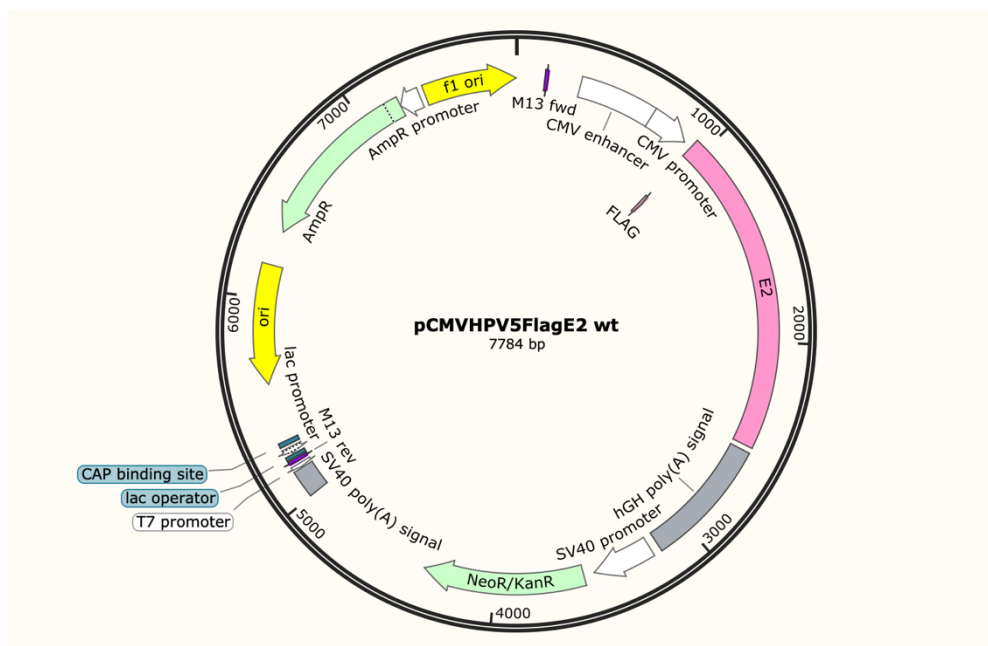
LISAD

LISA 1



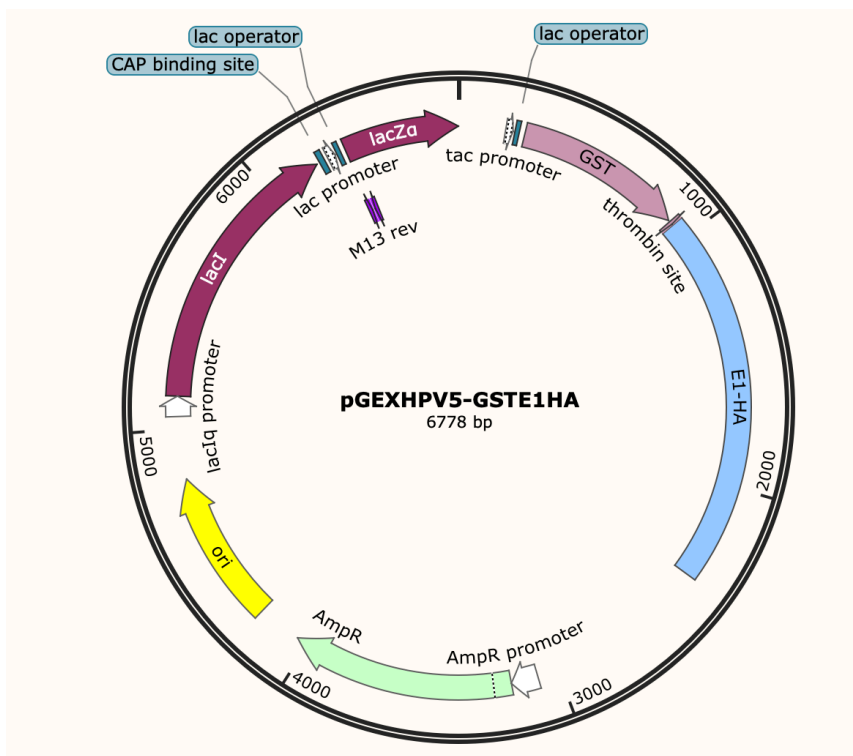
Joonis 19. Konstrueeritud pETHPV5StrepE2 ekspressiooniplasmiid.

LISA 2



Joonis 20. Konstrueeritud pCMVHPV5FlagE2 wt ekspressiooniplasmiid.

LISA 3



Joonis 21. Konstrueeritud pGEXHPV5-GSTE1HA ekspressiooniplasmiid.

LIHTLITSENTS

Mina, Lisett Liblekas

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose **Inimese papilloomiviiruse tüüp 5 replikatsiooniks vajalike valkude puhastamine ja fosforüleerimise uurimine**, mille juhendajad on Marko Piirsoo ja Alla 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, alates **10.06.2022** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Lisett Liblekas

01.06.2021