

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Eva-Maria Sepp

**Inimese papilloomiviiruse tüüp 18 transientse
replikatsiooni intermediaatide uurimine U2OS
rakuliinis**

Magistritöö

Juhendajad

Jelizaveta Geimanen, MSc

Ene Ustav, PhD

TARTU 2014

SISUKORD

LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Papilloomiviirused.....	7
1.2 Inimese papilloomiviirused	7
1.2.1 Nahka nakatavad inimese papilloomiviirused	9
1.2.2 Limaskesti nakatavad inimese papilloomiviirused	9
1.3 Inimese papilloomiviiruse genoomi ülesehitus	10
1.3.1 Inimese papilloomiviiruse valkude peamised funktsioonid.....	11
1.4 Inimese papilloomiviiruse elutsükkel peremeesrakus	14
1.4.1 Kihistunud lameepiteeli ülesehitus ja arengutsükkel.....	15
1.4.2 Inimese papilloomiviiruse sisenemine peremeesrakku	17
1.4.3 HPV elutsükli varajased etapid keratinotsüütides. Transientne replikatsioon.....	17
1.4.4 HPV genoomi replitseerumine ja säilimine latentse infektsiooni faasis.....	19
1.4.5 HPV infektsioonitsükli hilised sündmused.....	20
1.5 Mudelsüsteemid HPV replikatsiooni uurimiseks.....	22
1.6 DNA kahjustuse vastus ning selle roll HPV genoomi oligomeriseerumisel	23
1.6.1 DNA kahjustuse vastus.....	23
1.6.2 HPV genoomi oligomerisatsioon.....	25
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	27
2.1 Magistritöö eesmärgid	27
2.2 Materjal ja meetodika	28
2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid	28
2.2.2 Superspiraliseerunud vormis HPV genoomide (<i>minicircles</i> ehk pisirõngad) tootmissüsteem	29
2.2.3 HPV <i>minicircle</i> DNA plasmide tootmine.....	30
2.2.4 Rakuliinid ja söötmed.....	30
2.2.5 Transfektsioon elektroporatsiooni meetodil	31
2.2.6 Eukariootsetest rakkudest episomaalse DNA eraldamine Hirt lüüsi meetodil	31
2.2.7 2D geelelektroforees.....	32
2.2.8 Replikatsioonianalüüs <i>Southern blot</i> meetodil	34
2.2.9 Valkude ekspressiooni analüüs <i>Western blot</i> meetodil	34

2. 3 Tulemused ja arutelu.....	36
2.3.1 HPV-18 molekulaarne staatus U2OS rakuliinis	36
2.3.2 <i>Theta</i> replikatsiooni intermediaadid	39
2.3.3 HPV-18 transientse replikatsiooni mehhanismi uurimine	41
2.3.3.1 <i>Theta</i> replikatsioonile omaste intermediaatide tuvastamine	41
2.3.3.2 Homoloogilisele rekombinatsioonile spetsiifiliste intermediaatide tuvastamine	45
2.3.4 HPV replikatsioonivalkude E1 ja E2 mõju replikatsiooni intermediaatidele	50
KOKKUVÕTE	55
RÉSUMÉ	56
KASUTATUD KIRJANDUS.....	57
LISAD.....	67

LÜHENDID

1D – ühedimensionaalne

2D – kahedimensionaalne

ara-BAD – bakteri *Escherichia coli* genoomis olev operon, kus asuvad L-arabinoosi lagundamiseks vajalike valkude geenid

ATM – *ataxia telangiectasia mutated* kinaas (*ataxia telangiectasia mutated kinase*)

ATR – ATM ja Rad50 sõltuv kinaas (*ATM and Rad50 dependent kinase*)

BPV-1 – veise papilloomiviiruse tüüp 1 (*Bovine Papillomavirus type 1*)

CCC vorm – kovalentselt suletud tsirkulaarne vorm (*covalently closed circular*)

CMV – tsütomegaloviirus (*cytomegalovirus*)

Cre – bakteriofaagist P1 pärit järjestusspetsiifiline rekombinaas

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

DSB – DNA kaheahelaline katke (*double-strand break*)

dY – topelt Y-struktuurid (*double Y*)

E2BS – E2 valguga seonduv järjestus (*E2 binding site*)

EV – geneetilise eelsoodumusega nahahaigus (*Epidemodysplasia verruciformis*)

E valgud – varajased valgud (*early*)

G2-faas – rakutsükli faas S- ja M-faasi vahepeal, mil toimub raku kasvamine

HA – hemaglutiniin; gripiviiruse virioni pinnal oleav glükoproteiin, mis on vajalik kinnitumiseks peremeesraku pinnale

HJ – *Holliday* ühendused; X-kujulised struktuurid, mis ühendavad kahte DNA molekuli homoloogilisel rekombinatsioonil (*Holliday junctions*)

HPV – inimese papilloomiviirus (*Human papillomavirus*)

HR – homoloogiline rekombinatsioon (*homologous recombination*)

H-SIL – kõrge astme lamerakuline intraepiteliaalne vähieelne seisund (*high grade squamous intraepithelial lesion*)

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

Lin DNA – lineaarne DNA

L-SIL – madala astme lamerakuline intraepiteliaalne vähieelne seisund (*low grade squamous intraepithelial lesion*)

L valgud – hilised valgud (*late*)

M-faas – rakutsükli faas, mil toimub raku jagunemine

NMSC – mittemelanoomne nahavähk (*non-melanoma skin cancer*)

OC vorm – avatud tsirkulaarne vorm (*open circular*)

ORF – avatud lugemisraam (*open reading frame*)

p53 – rakuline tuumorsupressor valk

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

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

PBS – fosfaatpuhverlahus (*phosphate buffered saline*)

pRB – retinoblastoomi valk

PV – papilloomiviirus (*Papillomavirus*)

RI – replikatsiooni intermediaadid (*replication intermediates*)

RDR – rekombinatsioonist sõltuv DNA replikatsioonisüsteemi (*recombination-dependent replication*)

RPA valk – replikatsioonivalk A; üheaheelalist DNA siduv ja stabiliseeriv valk (*replication protein A*)

S-faasi – rakutsükli faas, mil toimub DNA replikatsioon

SP1 – rakuline transkriptsioonifaktor (*specificity protein 1*)

ssDNA – üheaheelaline DNA (*single-stranded DNA*)

SV40 – Simian viirus 40

TATA järjestus – promooter järjestuses asuv A ja T nukleotiidide rikas ala

TBP – TATA järjestusega seonduv valk (*TATA binding protein*)

U2OS rakuliin – inimese osteosarkoomist algatatud rakuliin

URR – papilloomiviiruse peamine regulatoorne järjestus (*upstream regulatory region*)

SISSEJUHATUS

Inimese papilloomiviirused (HPV-d) on väikse genoomiga DNA viirused, mis nakatavad epiteelkihi keratinotsüüte. Tegemist on populatsioonis laialt levinud viirustega, mis on üldjuhul peremeesorganismiga hästi kohastunud ning tervetel inimestel märkimisväärseid kaebusi ei põhjusta, paljude tüüpide nakkus on asümptomaatiline. Erandiks on nn kõrgeriski HPV tüübid, mis omavad potentsiaali tekitada peremeesorganismis pahaloomulisi kasvajaid. Kõige enam seostatakse HPV-sid naistel emakakaelavähi (98% emakakaelakartsinoomi juhtudest) ja meestel anaalvähi (85% anaalvähi juhtudest) tekke indutseerimisega. Lisaks on täheldatud, et kõrgeriski HPV tüüpide püsiv nakkus on oluline riskifaktor teiste anogenitaal- ning pea-ja kaelapiirkonna pahaloomuliste kasvajate arenguks (Giuliano *et al*, 2008). Seetõttu on HPV-de uurimine on äärmiselt oluline mõistmaks viiruse nakkuse käigus toimuvate protsesside molekulaarseid aluseid, kuna täpsem arusaamine HPV elutsüklit võimaldab luua uusi viirusvastaseid ravimeid. Seni on õnnestunud turule tuua ainult profülaktilisi vaktsiine.

Kuna HPV-de infektsioonitsükkel sõltub keratinotsüütide diferentseerumisprogrammist, on selle uurimine laboritingimustes raskendatud. Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi (TÜTI) papilloomiviiruste uurimisrühmal on õnnestunud välja töötada U2OS rakuliinil põhinev mudelsüsteem, mis on oluliselt lihtsustanud HPV DNA replikatsiooni uurimist. Antud mudelsüsteemi rakendades keskenduti käesoleva magistr töö eksperimentaalses osas kõrgeriski inimese papilloomiviiruse tüüp 18 (HPV-18) esmase lühiaegse ehk transientsel replikatsiooni uurimisele: analüüsitakse HPV-18 molekulaarset staatust, transientsel replikatsioonil tekkivaid intermediaate ning viiruslike replikatsioonivalkude mõju nendele. Magistr töö teoreetilises osas antakse ülevaade HPV-de mitmekesisusest, kirjeldatakse nende genoomi ülesehitust, viiruse poolt kodeeritavaid valke ja keratinotsüütide diferentseerumisest sõltuvat viiruse elutsüklit.

Antud magistr töö on valminud Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis papilloomiviiruste uurimisrühmas. Töö valmimisele kaasaaitamise eest olen eriti tänulik Marit Oravale ning juhendajatele Jelizaveta Geimanenile ja Ene Ustavile. Samuti sooviksin tänada kasulike õpetuste ja nõuannete eest ka kõiki teisi uurimisrühma liikmeid, kellest sooviksin eraldi välja tuua Liisi Henno, Tormi Reinsoni ja Mart Ustav Jr'i.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Papilloomiviirused

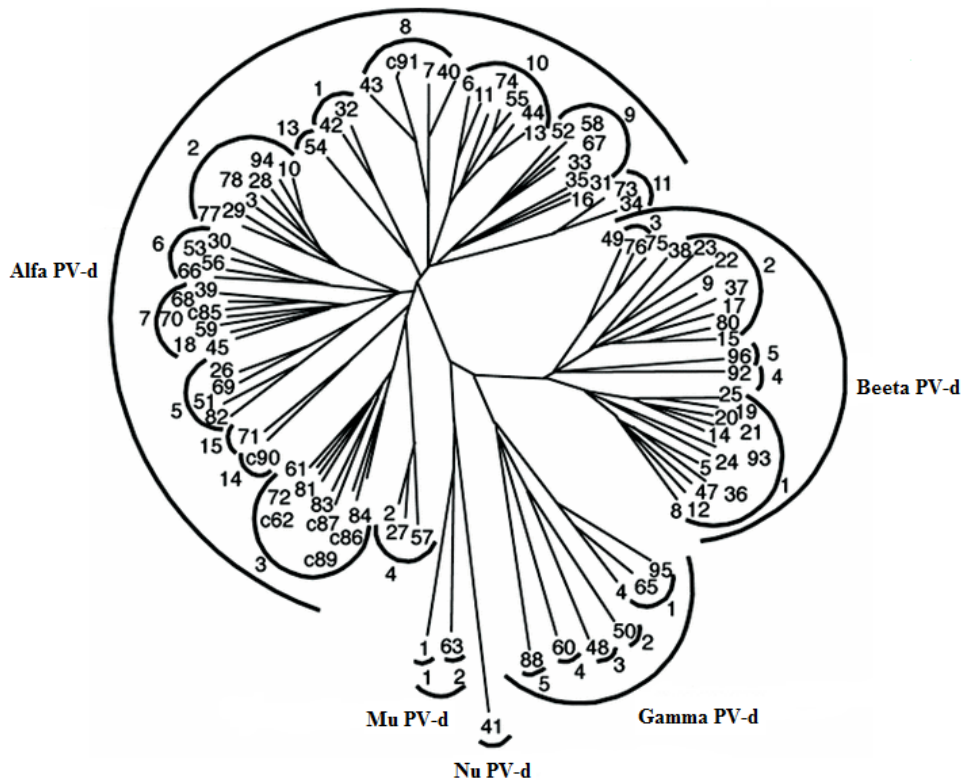
Papilloomiviirused (PV) on looduses laialt levinud onkogeensed DNA viirused, mis nakatavad epiteelkoe keratinotsüüte. Nende ikosaeedriline membraanita virion sisaldab ligikaudu 8 kbp pikkust kaheahelalist tsirkulaarset genoomi, mis koos rakuliste histoonidega moodustab kromatiinile sarnaneva struktuuri (Favre *et al*, 1977). Erinevad papilloomiviiruste tüved on võimelised spetsiifiliselt nakatama enamikke imetajate (k.a inimesed), roomajate või lindude liike (Bernard *et al*, 2010).

Tänaseks on kirjeldatud üle 180 papilloomiviiruse tüüpi, mis kuuluvad 29 erinevasse perekonda, moodustades sugukonna *Papillomaviridae* (Bernard *et al*, 2010). Erinevate papilloomiviiruste tüüpide klassifitseerimisel võetakse aluseks kapsiidivalgu L1 lugemisraami nukleotiidne järjestus, kuna tegemist on viiruse kõige konserveerunuma lugemisraamiga. Kui isoleeritud viiruse L1 lugemisraami järjestus erineb vähemalt 10% võrra senini teadaolevate viirustüüpide omast, on tegu uue tüübiga (Bernard *et al*, 2010).

1.2 Inimese papilloomiviirused

Inimese papilloomiviirused (HPV ehk *human papillomavirus*) on populatsioonis laialt levinud. Inimest nakatavaid papilloomiviiruseid on kokku kirjeldatud rohkem kui 120 erinevat tüüpi, mis on ligikaudu 65% kirjeldatud PV tüüpide koguarvust (Bernard *et al*, 2010).

Fülogeneetiliselt jaotatakse inimese papilloomiviirused 5 erinevasse perekonda, millest kolm on arvukuselt suuremad (alfa, beeta ja gamma HPV-d) ja kaks väiksemad (mu ja nu HPV-d) (joonis 1) (de Villiers *et al*, 2004, Doorbar, 2005).



Joonis 1. Inimese papilloomiviiruste fülogeneetiline puu. Joonisel on kujutatud sugukonda *Papillomaviridae* kuuluvate inimest nakatavate papailloomiviiruste fülogeneetiline puu, mille konstrueerimisel on võetud aluseks lugemisraami L1 järjestuse erinevus. HPV-d jaotatakse 5 erinevasse perekonda: alfa, beeta, gamma, nu ja mu. Antud perekonnad liigitatakse veel omakorda eraldi gruppideks vastavalt nende bioloogilistele erinevustele (nt beeta papilloomiviirused jaotatakse viide erinevasse gruppi) (Doorbar, 2006).

Bioloogiliste erinevuste alusel võib inimese papilloomiviirused liigitada laias laastus kaheks grupiks olenevalt sellest, kas nad on võimelised nakatama limaskestast või epidermise keratinotsüüte. Nahka ja limaskesti infitseerivaid viirustüüpe jaotatakse omakorda kõrge- ja madalariski tüüpideks vastavalt nende potentsiaalile indutseerida peremeesorganismis pahaloomuliste kasvajate teket. Madalariski HPV-d tekitavad healoomulisi epiteliaalseid vohandeid (tüükad, kondüloomid), mille tõenäosus areneda vähkkasvajaks on väike. Seevastu kõrgeriski tüübid on võimelised indutseerima pahaloomuliste kasvajate teket (Lorincz *et al*, 1992). Tulenevalt osade HPV-de onkogeensusest potentsiaalst on nende uurimine teiste sugukonda kuuluvate tüüpidega võrreldes märgatavalt intensiivsem. Kõige enam seostatakse HPV-sid emakakaelavähiga (98% emakakaelakartsinoomi juhtudest on leitud seos HPV infektsiooniga), mis on naissoost isikute seas sageduselt teisel kohal olev vähisurma

põhjustaja maailmas (Zur Hausen, 2002). Eriti tõsine on probleem arengumaades (diagnoositakse ligikaudu 80% emakakaelavähi juhtudest), kus arstiabi on raskesti kättesaadav ning puuduvad efektiivsed diagnoosimis- ja ennetusmeetodid (Moody ja Laimins, 2010). Lisaks sellele seisneb HPV-de kliiniline tähtsus madalariski tüüpide võimes tekitada genitaalpiirkonnas raskesti väljaravitavaid kondüloome.

1.2.1 Nahka nakatavad inimese papilloomiviirused

Nahka nakatavad HPV tüübid on peremeesorganismiga hästi kohastunud ning põhjustavad tervetel inimestel enamasti asümptomaatilisi nakkusi (näiteks HPV-12, -14, -19), aga ka soolatüükaid (nt HPV-2, -4) ja teisi nahapapilloome (nt HPV-1), mis taanduvad mõne aja möödudes immuunsüsteemi toimel (Doorbar, 2005, McLaughlin-Drubin ja Münger, 2009). Epidermist nakatavad beeta, gamma, mu ja nu papilloomiviirused ning mõned üksikud alfa rühma kuuluvad nahapapilloomiviiruste tüübid (näiteks HPV-2 ja -10) (joonis 1) (de Villiers *et al*, 2004, Doorbar, 2005).

Immuunpuudulikel inimestel võivad nn kõrgeriski nahka nakatavad tüübid (HPV-5, -8) indutseerida pahaloomuliste kasvajate teket. Harva esineva geneetilise eelsoodumusega nahahaiguse *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) korral ei ole immuunsüsteem võimeline kõrvaldama HPV nakkust ning nahale moodustuvad tüükalaadsed healoomulised kasvajad, mis aja jooksul võivad progresseeruda pahaloomulisteks. Immuunsupresseeritud inimestel on kõrgeriski HPV nakkus üheks riskifaktoriks mittemelanoomse nahavähi (NMSC ehk *non-melanoma skin cancer*) tekkel (McLaughlin-Drubin ja Münger, 2009).

1.2.2 Limaskesti nakatavad inimese papilloomiviirused

Limaskesta HPV-d levivad peamiselt sugulisel teel ning põhjustavad anogenitaalpiirkonna nakkuseid (Badaracco *et al*, 1998). Järjest enam on täheldatud, et papilloomiviirused omavad rolli ka ülemiste hingamisteede, suuõõne ning teiste pea- ja kaelapiirkonna kasvajate tekkel (Chow *et al*, 2010). Limaskesti nakatavad HPV-d kuuluvad perekonda alfa. Tegemist on enim uuritud papilloomiviiruste perekonnaga, sinna kuulub ligikaudu üks kolmandik senini kirjeldatud HPV tüüpidest (de Villiers *et al*, 2004).

Madalariski tüübid tekitavad limaskestade peamiselt healoomulisi kasvajalisi vohandeid ehk papilloome (anogenitaalpiirkonnas nimetatakse neid kondüloomideks), mis enamikul juhtudel

taanduvad iseenesest ning nende progresseerumist vähkkasvajaks pole tervetel inimestel üldjuhul täheldatud. Populatsioonis enim levinud madalariski tüübid on HPV-6 ja -11, millega on nakatunud ~1% seksuaalselt aktiivsest elanikkonnast. Tüübid 6 ja 11 tekitavad kahe peale ligikaudu 90% anogenitaalpiirkonna kondüloomidest (Brentjens *et al*, 2002).

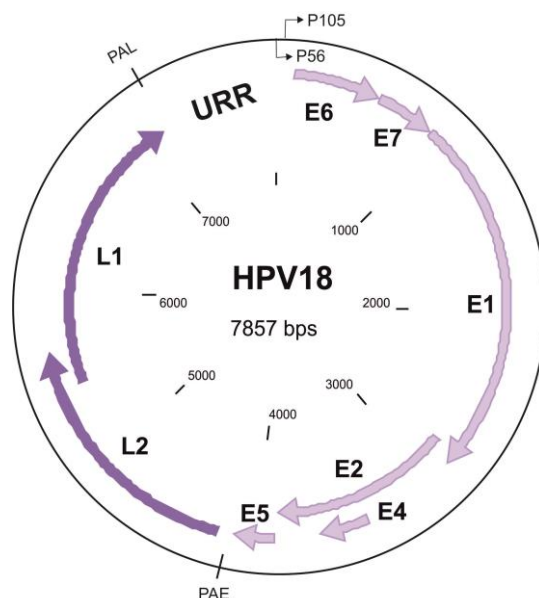
Kõrgesse riskigruppi kuulub 15 onkogeense potentsiaaliga HPV tüüpi (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 ja 82) (Reddout *et al*, 2007). Nimetatud tüüpide produktiivse elutsükliga kaasnevad üldjuhul spontaanselt regresseeruvad kergekujulised emakakaela epiteelkoe muutused, mida klassifitseeritakse kui L-SIL (*low-grade squamous intraepithelial lesions*) ehk madala astme lamerakuline intraepiteliaalne vähieelne seisund. Siiski võib osa düsplaasiatest aja jooksul edasi areneda H-SIL-ks (*high-grade squamous intraepithelial lesions*) ehk kõrge astme lamerakuliseks intraepiteliaalseks vähieelseks seisundiks, mis suure tõenäosusega progresseerub emakakaela kartsinoomiks. Tegemist on aeglase protsessiga (võib kesta isegi aastakümneid), mille jooksul kuhjuvad peremeesraku genoomis vähkkasvaja tekkeni viivad mutatsioonid. Pahaloomulise kasvaja tekke indutseerimine peremeesorganismis on seotud HPV mitteloomupärase infektsioonitsükliga, mille käigus viirus ei suuda teadmata põhjustel läbi viia oma elutsükli viimaseid produktiivseks nakkuseks olulisi etappe (Pett ja Coleman, 2007).

Kõige sagedamini tuvastatakse emakakaela kartsinoomi biopsiatest kõrgeriski tüüpide 16 (50% emakakaelavähi juhtudest) ja 18 DNA-d (20% juhtudest) (Moody ja Laimins, 2010).

1.3 Inimese papilloomiviiruse genoomi ülesehitus

Inimese papilloomiviiruse genoomi ülesehitus on erinevate tüüpide puhul üldjuhul sarnane. HPV genoom on ligikaudu 8000 aluspaari pikkune kaheaahelaline DNA rõngasmolekul, mille avatud lugemisraamid (ORF ehk *open reading frame*) paiknevad ühel DNA ahelal. Viiruse genoomi võib jagada kolmeks piirkonnaks: varajane (E – *early*) ja hiline (L – *late*) kodeeriv ala ning nende vahele jääv ligikaudu 900 nukleotiidi pikkune regulatoorne mittekodeeriv URR (*upstream regulatory region*) piirkond (joonis 2). Varajases piirkonnas asuvad avatud lugemisraame kodeeritakse alates viiruse elutsükli varajastest etappidest kuni viimaste staadiumiteni. Hiliste lugemisraamide ekspressioon leiab aset ainult viiruse infektsioonitsükli lõpus, kui toimub viiruse genoomi pakkimine virionidesse. Valke mittekodeerivas URR piirkonnas paiknevad peamise viirusliku regulaatorvalgu (E2) ja rakuliste

transkriptsioonifaktorite seondumissaidid, replikatsiooni alguskoht (*origin*) ning varajane ja hiline promooter. Osade HPV-de (näiteks HPV-16, -31, -11) korral paikneb hiline promooter E7 lugemisraamis. Samuti on genoomis kaks poliüadenüleerimissaiti PAE ja PAL, kus lõppeb vastavalt varajaste või hiliste transkriptide süntees (Zheng ja Baker, 2006, Doorbar, 2006).



Joonis 2. HPV-18 genoomi skemaatiline ülesehitus. HPV-18 ligikaudu 8000 bp pikkune genoom on jaotatud kolmeks piirkonnaks: varajane (helelillaga tähistatud avatud lugemisraamid E1, E2, E4, E5, E6, E7) ja hiline (tumelillaga märgitud lugemisraamid L1 ja L2) kodeeriv ala ning regulatoorne mittekodeeriv URR piirkond. Mustad nooled tähistavad varast ja hilist promooterit (vastavalt P105 ja P56). Mustade püstkriipsudega on tähistatud varajane (PAE) ja hiline poliüadenüleerimissait (PAL).

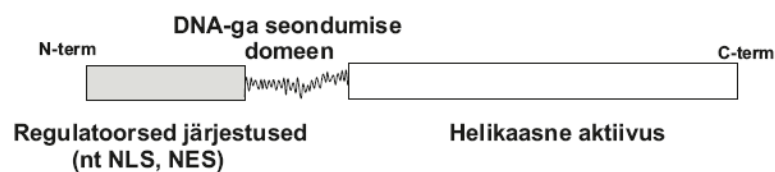
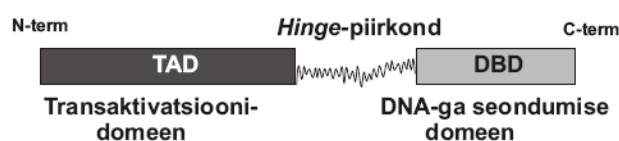
1.3.1 Inimese papilloomiviiruse valkude peamised funktsioonid

Papilloomiviiruste avatud lugemisraame kodeeritakse ainult ühelt DNA ahelalt ning nende transkriptsiooniks kasutab HPV rakulisi valke. HPV pre-mRNAd on bi- või polütsistronsed, mille edasisel alternatiivsel splicingil saadakse hulk erinevaid funktsionaalseid mRNA-sid (Zheng and Baker, 2006). Varajaselt kodeerivalt alalt sünteesitavaid valke (E1, E2, E1[^]E4, E5, E6 ja E7) vajab viirus replikatsiooniks, transkriptsiooniks, genoomi segregatsiooniks ning peremeesraku rakutsükli moduleerimiseks. Hiliselt kodeerivalt alalt sünteesitakse valke L1 ja L2, mis moodustavad viiruse kapsiidi (Longworth ja Laimins, 2004, Weyn *et al*, 2011).

E1 on HPV kõige suurema molekulmassiga valk (ligikaudu 70 kDa). Tegemist on viiruse genoomi replikatsiooniks absoluutselt vajaliku valguga, mis koosneb kolmest funktsionaalsest

domeenist (joonis 3A). N-terminaalses osas paiknevad erinevad regulatoorsed järjestused, näiteks tuuma lokaliseerimise ja ekspordimise signaal (Fradet-Turcotte *et al*, 2010). E1 valguga keskmine regioon sisaldab replikatsiooni alguskohaga seonduva domeeni (Titolo *et al*, 2003). C-terminaalne osa omab 3'–5' helikaasid aktiivsust, mis on vajalik replikatsiooni käigus toimivaks DNA ahelate lahtharutamiseks (Sedman ja Stenlund, 1998, White *et al*, 2011). HPV genoomi replikatsioonil osalevad lisaks viiruslikele valkudele ka mitmed rakulised faktorid, mille värbamises omab olulist rolli E1 valk. On näidatud, et E1 valk on võimeline interakteeruma replikatsioonivalguga A ja DNA polümeraasi α primaasiga (Park *et al*, 1994, Conger *et al*, 1999, Loo ja Melendy). Lisaks on E1 valk võimeline tekitama peremeesraku genoomis kaheaheelalisi katkeid, mille tõttu aktiveeritakse peremeesraku DNA kahjustuse vastus (peatükk 1.6.2) (Fradet-Turcotte *et al*, 2011, Sakakibara *et al*, 2011, Reinson *et al*, 2013).

Täispikk **E2** valk (ligikaudu 50 kDa) koosneb kahest domeenist, mis on omavahel ühendatud linkerjärjestuse ehk *hinge* regiooni abil (joonis 3B). Valgu C-terminaalses osas paikneb viiruse genoomi spetsiifiliste DNA järjestustega seonduva domeeni ning N-terminaalne osa moodustab transaktiivdomeeni (Giri ja Yaniv, 1988). Tegemist on multifunktsionaalse valguga, mis osaleb erinevates HPV elutsükli protsessides. E2 valk omab võtmerolli viiruse varajaste valkude transkriptsiooni reguleerimisel. Transkriptsiooni aktiveerimine või repressioon sõltub täispika E2 valguga seonduvatest URR piirkonnas paiknevatele erinevatele afiinsustele seonduvatele (ACCGN₄CGGT motiividele). Madalamate E2 valguga kontsentratsioonide juures toimib E2 kui transkriptsiooni aktiveerija, kontsentratsiooni suurenedes hakkab E2 valk viiruse transkriptsiooni hoopis represserima (Steger ja Corbach, 1997). E2 valgul on ka oluline osa viiruse DNA replikatsiooni initsiatsioonil, vahendades E1 valguga spetsiifilist seonduvat *origin* piirkonnale (Mohr *et al*, 1990, Sanders ja Stenlund, 2000). Tähtsat rolli omab E2 valk ka HPV genoomi segregatsioonil tütarakkudes. Täispikk E2 valk on rakuliste valkude vahendusel võimeline kinnitama viiruse genoomi mitoosifaasis moodustuvatele kääviniitidele, tagades sedasi HPV DNA segregatsiooni tütarakkudes (Van Tine *et al*, 2004). Lisaks on näidatud, et kõrgeriski HPV tüüpide E2 valk on võimeline aktiveerima peremeesraku programmeeritud rakusurma. On välja pakutud, et E2 vahendatud apoptoosi indutseerimine keratinotüütides on vajalik viiruspartiklite vabanemiseks peremeesrakust (Desaintes *et al*, 1999, Thierry ja Demeret, 2008).

A**B**

Joonis 3. HPV replikatsioonivalkude E1 ja E2 struktuur. Välja on toodud replikatsioonivalkude E1 (joonise A osa) ja E2 (joonise B osa) struktuurne ülesehitus.

E8^ΔE2C valk on E2 valgu lühem vorm, millel puudub transaktivatsiooni domeen. See koosneb E2 valgu C-terminaalsest domeenist, *hinge* regioonist ja E1 valgu lugemisraamis paiknevast E8 ORF-i poolt kodeeritavast järjestusest. Tegemist on repressorvalguga, mis represserib varajase transkriptsiooni ja replikatsiooni toimumist, kuna ainult DNA-ga seondumise domääni omav E8^ΔE2C valk konkureerib täispika E2 valguga URR piirkonnas paiknevate seondumissaitide pärast (Bouvard *et al*, 1994). E8 lugemisraami ekspressiooni väljalülitamine toob kaasa HPV genoomi koopiaarvu tõusu (Lace *et al*, 2008, Kurg *et al*, 2010).

E5, **E6** ja **E7** on viiruslikud onkovalgud, mis on võimelised peremeesrakku immortaliseerima. Võrreldes madalariski HPV-dega on kõrgeriski tüüpide E5, E6 ja E7 suurema onkogeense potentsiaaliga, kuna nende afiinsus rakuliste tuumorsupressorvalkude suhtes on kõrgem (Gage *et al*, 1990).

E7 valgu sihtmärgiks peremeesrakus on retinoblastoomi (pRb) perekonda kuuluvad tuumorsupressorvalgud. pRb valgud on rakus kompleksis E2F transkriptsioonifaktoritega, reguleerides seeläbi rakutsükli sisenemist S-faasi. Kui E7 valk seondub pRb valguga, suunatakse pRb lagundamisele ning transkriptsioonifaktor E2F vabaneb inhibitoorsest kompleksist. Selle tulemusel aktiveeritakse DNA replikatsiooni ja raku jagunemisega seotud geenide ekspressioon, mis on vajalik HPV genoomi paljundamiseks (Munger *et al*, 1989).

Rakud, mis sisenevad plaanimatult S-faasi, suunatakse reeglina raku peamise tuumorsupressorvalgu p53 toimel apoptoosi. Selleks, et vältida nakatunud raku hukkumist, seondub viiruse onkovalk E6 tuumorsupressorvalguga p53, mille tulemusel suunatakse see ubikvitiin-sõltuvasse proteosoomsesse degradatsiooniratta (Scheffner *et al*, 1990). Apoptoosi inhibeerimine võib kaasa tuua mutatsioonide kuhjumise genoomis ning nende parandamata jätmise korral normaalse raku transformatsiooni kasvajakaraks.

E5 valgu roll HPV infektsioonitsükli ei ole tänaseks veel päris selge. Arvatakse, et E5 valk võimendab onkovalkude E6 ja E7 transformeerivaid omadusi (Stoppler *et al*, 1996). Samuti on näidatud, et E5 valk soodustab peremeesraku piiramatut jagunemist, hoides epidermaalse kasvufaktori retseptorit pidevalt aktiivses olekus (Straight *et al*, 1993), takistades peremeesrakus apoptootiliste radade aktiveerimist (Kabsch ja Alonso, 2002) ning viiruslike antigeenide esitlemist HPV-positiivsete rakkude pinnal (Miura *et al*, 2010).

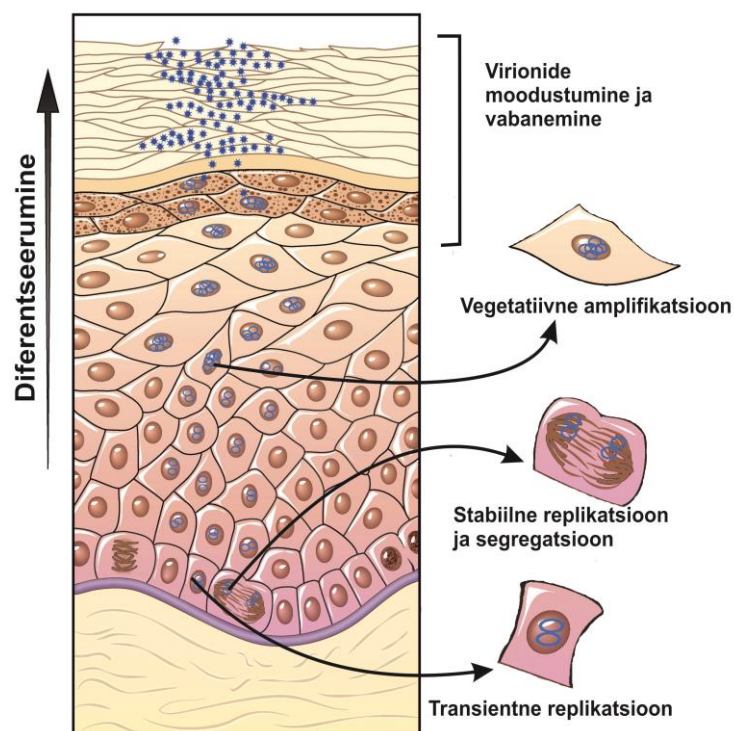
E1^{E4} liitvalku loetakse varajaste valkude hulka, ehkki selle sünteesi tase on kõige kõrgem viiruse loomupärase elutsükli hilistes etappides. HPV-16 ja -18 korral on näidatud, et E1^{E4} liitvalk seondub rakus intermediaarsete filamentide võrgustikuga, indutseerides seeläbi peremeesraku kollabeerumise (Doorbar *et al*, 1991). Lisaks on E1^{E4} valk võimeline kutsuma esile rakutsükli peatumist G2/M-faasis (Knight *et al*, 2004) ning peremeesraku suunamist apoptoosi (Raj *et al*, 2004). Seega on E1^{E4} liitvalgul arvatavasti oluline roll HPV produktiivse infektsioonitsükli käigus moodustunud virionide vabanemisel väliskeskkonda. Infektsioonitsükli algetappides toimub E1^{E4} valgu süntees väga madalal tasemel. Arvatakse, et E1^{E4} valk võib kaudselt osaleda viiruse DNA replikatsioonis ja transkriptsioonis, seondudes E2 valguga ja seeläbi seda stabiliseerides (Nakahara *et al*, 2005).

HPV virion koosneb kahte tüüpi valkudest (kapsiidivalgud L1 ja L2). Kapsiidivalkude süntees toimub viiruse produktiivse infektsioonitsükli viimastes etappides, enne virionide pakkimist ja vabanemist keskkonda. Arvatakse, et L2 omab olulist rolli HPV DNA selektiivsel sisestamisel kapsiidi ning suurendab selle nakatamisvõimet (Zhou *et al*, 1993).

1.4 Inimese papilloomiviiruse elutsükkel peremeesrakus

HPV elu- ehk infektsioonitsükkel on tihedalt seotud nende peremeesrakkude, epiteelkihi keratinotsüütide diferentseerumisprogrammiga. Viiruse elutsükli eristatakse kolme replikatsiooni faasi: transientne ehk esialgne lühiajaline amplifikatsiooniline replikatsioon,

latentse infektsiooni jooksul toimuv stabiilne replikatsioon ning nakkuse lõppfaasis toimuv teistkordne amplifikatsiooniline replikatsioon. Kaks esimest replikatsiooni faasi leiavad aset epiteelkoe basaalkihis, viimane replikatsioonitsükkel algab enne virionide moodustumist terminaalset diferentseerunud keratinotsüütides (joonis 4) (Kadaja *et al*, 2009).

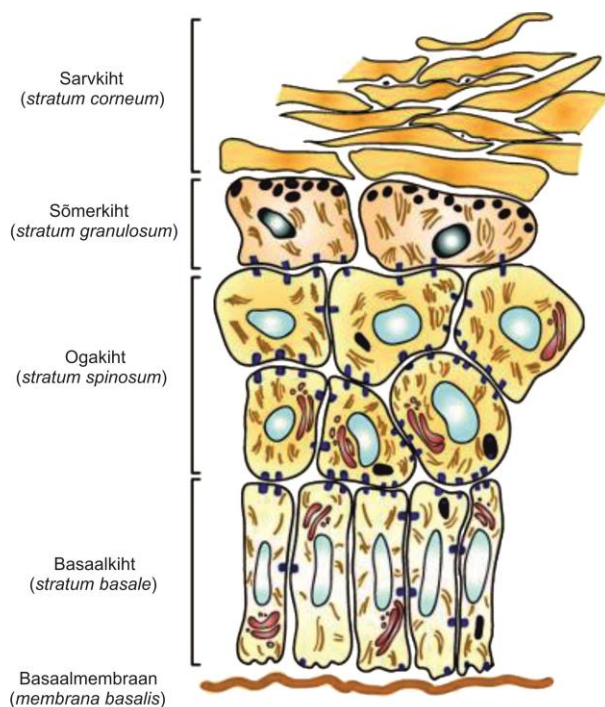


Joonis 4. Inimese papilloomiviiruse elu- ja replikatsioonitsüklid. Joonisel on kujutatud HPV erinevad replikatsioonitsüklid, mis on tihedalt seotud keratinotsüütide diferentseerumisprogrammiga (Sakakibara *et al*, 2013).

1.4.1 Kihistunud lameepiteeli ülesehitus ja arengutsüklid

Nahka katvat epiteelkudet nimetatakse epidermiseks ehk marrasknahaks, mille näol on tegemist peamiselt keratinotsüütidest koosneva mitmekihilise sarvestunud lameepiteeliga (joonis 5). Epiteelkoes leidub ka melanotsüüte, Langerhansi ja Merkli rakke, kuid nende osakaal on keratinotsüütidega võrreldes väike. Epidermis jagatakse üldjoontes neljaks erinevaks kihiks: basaalmembraanil paiknev basaalkiht (*stratum basale*), ogakiht (*stratum spinosum*), granuloos- ehk sõmerkiht (*stratum granulosum*) ning kõige pealmiselt paiknev sarvkiht (*stratum corneum*) (joonis 5). Paksema nahaga kehapiirkondades (näiteks jalatallad, peopesad) on epidermise koosseisus lisaks veel läikekiht (*stratum lucidum*).

Lisaks naha epidermisele nakatab HPV anogenitaal-, pea- ja kaelapiirkonna limaskestade sarvestumata mitmekihilist lameepiteeli. Selle ülesehitus ja arengutsükkel sarnanevad üldjoontes epidermise omaga. Erinevus seisneb epiteelkoe kõige pealmise kihi rakkudes, mis on märgatavalt vähem keratiniseerunud. Lisaks leidub emakakaela katvas epiteelkoes hulgaliselt näärmerakke.



Joonis 5. Epidermise lihtsustatud skemaatiline ehitus. Joonisel on välja toodud erinevad epidermise koosseisu kuuluvad kihid.

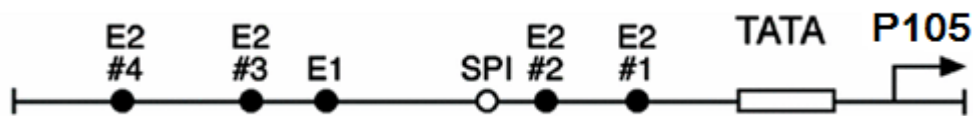
Epiteelkoe pideva uuenemise tagavad basaalkihi rakud. Basaalarakud jagunevad asümmeetriliselt: üks tütarakk jääb basaalkihi koosseisu ning säilitab jagunemisvõime, teine tütarakk lahkub basaalmembraanilt ning alustab liikumist epiteelkoe ülemistesse kihtidesse. Pärast basaalkihist lahkumist kaotab keratinotsüüt jagunemisvõime ning alustab diferentseerumist, millega kaasneb aktiivne lipiidide ja valkude (peamiselt keratiin) süntees. Ülemistes epiteelkoe kihtides leiab aset organellide ja rakutuuma lagunemine. Terminaalselt diferentseerunud keratinotsüüdid on surnud rakud, mille tsütoplasma on tihedalt täidetud keratiini ja lipiididega, mis tagavad sarvkihi kaitse mehhaanilise stressi eest ning muudavad selle vee suhtes läbilaskmatuks. Kui keratinotsüüdid on jõudnud epiteelkoe pinnale, leiab aset nende koorumine väliskkeskonda (Arend *et al*, 1994, Fuchs, 2008).

1.4.2 Inimese papilloomiviiruse sisenemine peremeesrakku

Inimese papilloomiviirus siseneb peremeesorganismi epiteeli vigastuste kaudu. Et peremeesorganismis tekiks püsiv infektsioon, peab HPV hüpoteesi kohaselt nakatama jagunemisvõimelisi basaalkihi keratinotsüüte (Egawa, 2003). Kuidas täpselt toimub HPV virion kinnitumine ning viiruse sisenemine rakku, pole tänaseks veel täpselt teada. On näidatud, et hepariinsulfaadi olemasolu on vajalik viiruse kinnitumiseks rakupinnale (Giroglou *et al*, 2001). Samuti on tuvastatud $\alpha 6$ -integriini perekonna retseptorite olulisus HPV sisenemisel peremeesrakku (Evander *et al*, 1997). Viiruse poolseks antireseptoriks loetakse peamist kapsiidivalgu L1 (Roden *et al*, 1994). Pärast virioni kinnitumist keratinotsüüdi pinnale siseneb HPV rakku endotsütoosi teel (Day *et al*, 2003, Bousarghin *et al*, 2003). Rakus toimub virioni lahtipakkimine ning sellele järgneb HPV genoomi transport rakutuuma, kus see säilib ekstrakromosomaalse episoomina (Doorbar, 2005).

1.4.3 HPV elutsükli varajased etapid keratinotsüütides. Transientne replikatsioon.

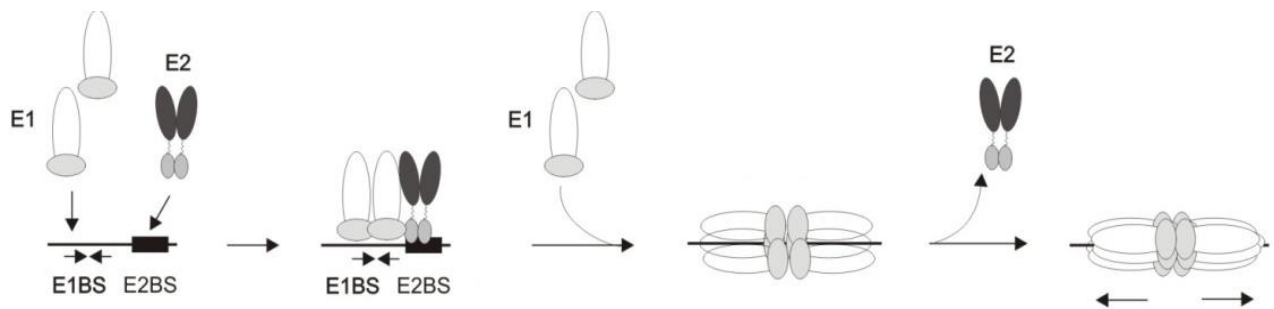
Pärast HPV genoomi transportimist rakutuuma aktiveeritakse varajaste lugemisraamide transkriptsioon. Varajaste viirusvalkude (sh E2 valk) transkriptsioon algatakse rakuliste transkriptsioonifaktorite poolt ning ligikaudu 12 tunni möödudes viiruse sisenemisest on võimalik peremeesrakus detekteerida viiruslikke mRNA-sid (Day *et al*, 2004). Niipea kui E2 valgu tase rakutuumas on tõusnud piisavalt kõrgele, hakkab E2 reguleerima varajaste lugemisraamide transkriptsiooni, seondudes kontsentratsioonist sõltuvalt URR piirkonnas paiknevatele seondumissaitidele. Limaskesti nakatavate HPV-de mittekodeerivas alas paikneb neli E2 valgu seondumissaiti (E2BS ehk E2 binding site), mille loendamist alustatakse kokkuleppeliselt E6 lugemisraami poolt ehk E6 ORF-ile asub kõige lähemal E2BS1 ning kõige kaugemal E2BS4 (joonis 6). Alguses, kui E2 kontsentratsioon on madal, seondub see valgu suhtes kõige suurema afiinsusega ning promooterjärjestusest kõige kaugemal asuvale BS4-le, millega kaasneb varajaste lugemisraamide aktiivsem transkribeerimine (Steger ja Corbach, 1997). Aja jooksul varajaste valkude tase tõuseb ning peremeesraku tuumas luuakse sobiv keskkond HPV genoomi esialgseks lühiajaliseks ehk transientseks replikatsiooniks.



Joonis 6. Kõrgeriski HPV URR piirkonna ülesehitus. Joonisel on kujutatud rakuliste transkriptsioonifaktorite (TATA, SPI), viiruse replikatsioonivalgu E1 (E1) ning regulaatorvalgu E2 seondumiskohad (E2#1-4). Samuti on välja toodud varajase promooterjärjestuse (P105) paiknemine (Doorbar, 2006).

HPV transientse replikatsiooni initsieerimiseks on vajalik viiruslike onkovalkude poolt vahendatud peremeesraku suunamine rakutsükli S-faasi, kuna HPV kasutab oma genoomi replikatsiooniks peremeesraku replikatsiooni masinavärki (Conger *et al*, 1999, Loo ja Melendy, 2004). Lisaks on replikatsiooni initsiatsiooniks vajalik dimeersete E1 ja E2 valkude seondumine URR piirkonnas paiknevale replikatsiooni *origin* järjestusele ning sellele järgnev E1:E2 kompleksi moodustumine (joonis 7) (Ustav ja Stenlund, 1991, Chiang *et al*, 1992). E1 on madala järjestusspetsiifilisusega valk, mis vajab oma seondumissaidiga seondumiseks E2 valgu seondumist BS3-le (Sedman ja Stenlund, 1995). BS3 on E2 valgu suhtes madalama afiinsusega kui BS4, mistõttu toimub E2 valgu seondumine sellele piirkonnale alles E2 valgu kõrgema kontsentratsiooni juures (Steger ja Corbach, 1997). Pärast E1 ja E2 valgu seondumist replikatsiooni *origin*'ile värvatakse kompleksi järgmine dimeerne E1 valk ning E2 valk lahkub kompleksist (Sanders ja Stenlund, 1998). Seejärel leiab aset E1 dimeersete molekulide järjestikune seondumine replikatsiooni alguskohale kuni moodustuvad kaks heksameerset helikaasi, mis tagavad DNA ahelate mõlemasuunalise lahtiharutamise (joonis 7) (Sedman ja Stenlund, 1998). Samuti on E1 valk vajalik peremeesraku replikatsiooniaparaadi valkude suunamiseks viiruse genoomi *origin* piirkonnale (Park *et al*, 1994, Conger *et al*, 1999, Loo ja Melendy).

HPV DNA transientne replikatsioon toimub arvatavasti *theta* mehhanismi abil, mille käigus kaks *origin* piirkonnas moodustunud replikatsioonikahvlit liiguvad vastassuundades, kuni kohtuvad tsirkulaarse molekuli replikatsiooni alguskoha vastaspoolel. Seejärel toimub tekkinud replitseerunud molekuli lahutamine eraldiseisvateks molekulideks. Transientse replikatsiooni paljundab viirus oma genoomi 50-100 koopiani raku kohta (Flores ja Lambert, 1997).



Joonis 7. Replikatsiooni initsiatsiooni kompleksi moodustumine HPV *origin* piirkonnas.

Dimeersed E1 ja E2 valk seonduvad koos URR piirkonnas paikneva replikatsiooni alguskohaga, moodustades E1:E2 kompleksi. Pärast seondumist värvatakse veel üks dimeerne E1 valk ning E2 valk lahkeb *origin* järjestuselt. Seejärel toimub E1 valgu järjestikune seondumine *origin*'ile ning assambleerumine topelt heksameerseks helikaasiks, mis on vajalik DNA ahelate mõlemasuunaliseks lahtiharutamiseks (joonis on pärit Kurg, 2011).

E2 taseme jätkuval tõusul seondub valk ka madalama afiinsusega seondumisjärjestustele (BS-1 ja -2). BS1 ja BS2 kattuvad erinevate rakuliste transkriptsioonifaktorite seondumiskohtadega, mistõttu E2 valgu seondumine neile hakkab represserima viiruse genoomilt toimuvat transkriptsiooni. E2 seandumisel BS2-le on takistatud näiteks transkriptsioonifaktori SP1 seondumine. BS1-le seandumise korral on häiritud TATA järjestuse äratundmine valgu TBP (TATA binding protein) poolt (joonis 6). Transkriptsiooni alguskoha lähedal asuva TATA elemendiga seonduv TBP valk tagab rakulise transkriptsioonikompleksi seandumiseks vajaliku DNA ahelate lahtisulatamise. Transkriptsiooni repressiooniga kaasneb replikatsiooniks vajalike viirusvalkude E1 ja E2 taseme langus, mistõttu HPV genoomi esialgne amplifikatsioon on lühiajaline (Steger ja Corbach, 1997, Doorbar 2006).

1.4.4 HPV genoomi replitseerumine ja säilimine latentse infektsiooni faasis

Pärast transientset replikatsiooni, mille käigus pannakse alus nakkuse tekkimisele peremeesorganismis, jäävad sünteesitud viiruse genoomid basaalkihi rakkude tuumas ekstrakromosomaalsete replitseerumisvõimeliste plasmiidide ehk episoomidena püsima. HPV infektsioon basaalkihi keratinotsüütides on pikaajaline ning võib kesta aastaid või isegi aastakümneid, enne kui immuunsüsteem suudab viiruse organismist kõrvaldada.

HPV episoomide koopiaarv mitootiliselt aktiivsetes basaalkudedes püsib konstantsena, kuid millised on genoomi koopiaarvu stabiilse säilimise mehhanismid, pole tänaseks veel täpselt teada. Osad autorid on näidanud, et HPV DNA replikatsioon toimub ainult üks kord rakutsükli S-faasis samaaegselt peremeesraku DNA paljundamisega, ning see on rangelt kontrollitud rakuliste valkude poolt (Egawa *et al*, 2012, Angeletti *et al*, 2002, Kim ja Lambert, 2002, Hoffmann *et al*, 2006). Samas on avaldatud artikleid, kus tõestatakse, et viiruse stabiilse replikatsiooni initsiatsioon ei ole nii rangelt reguleeritud. Sellisel juhul replitseeruvad osad DNA molekulid rakutsükli S-faasi jooksul mitu korda, osad ühe korra ning osad ei replitseeru üldse. Summarselt toimub sellisel juhul siiski genoomi koopiaarvu kahekordistumine ligikaudu üks kord rakutsükli jooksul (Ravnan *et al*, 1992, Piirsoo *et al*, 1996). Mõlema stsenaariumi kohaselt püsib viiruse DNA koopiaarv peremeesrakus stabiilsena.

Lisaks viiruse genoomi replikatsiooni regulatsioonile on koopiaarvu stabiilseks säilimiseks oluline, et peremeesraku jagunemise käigus toimuks HPV episoomide võrdne jaotumine tekkinud tütarakkude vahel. Erinevate PV tüüpide genoomi segregatsioon tütarakkudesse toimub erinevalt. On tõestatud, et veise papilloomiviiruse (BPV-1 ehk *bovine papillomavirus type 1*) DNA enam-vähem võrdsel jaotumisel tütarakkude vahel on oluline roll E2 valgul. E2 seondub viiruse genoomi URR piirkonnas asuvate spetsiifiliste seondumisjärjestuste (Skiadopoulos ja McBride, 1998, Ilves *et al*, 1999) ja rakuliste valkudega (näiteks bromodomään valk Brd4), mis ankuravad BPV genoomid peremeesraku mitootilistele kromosoomidele ning tagavad nende segregatsiooni tütarakkude tuumadesse (You *et al*, 2004). Alfa perekonda kuuluvate HPV-de segregatsioonimehhanism ei ole veel täpselt teada. Limaskesti nakatavate HPV-de E2 valk interakteerub oluliselt nõrgemini Brd4 valguga, viidates sellele, et E2 valk võib omada teisi rakulisi partnereid viiruse genoomi segregatsioonil (Oliveira *et al*, 2006). Lisaks on leitud, et HPV-11, -16 ja -18 E2 valk lokaliseerub rakujagunemise ajal hoopis mitootilistel kääviniiitidel (Van Tine *et al*, 2004).

1.4.5 HPV infektsioonitsükli hilised sündmused

Kui nakatumata epiteelkoe basaalkihi rakk lahkub basaalembraanilt ning hakkab liikuma epiteeli ülemistesse kihtidesse, kaotab ta jagunemisvõime ning alustab diferentseerumist. Papilloomiviirused kasutavad enda genoomi amplifitseerimiseks peremeesraku DNA polümeraasi ja teisi replikatsioonil osalevaid valke, mida sünteesitakse ainult jagunemisvõimelistes rakkudes. Seetõttu on viiruse jaoks äärmiselt oluline, et diferentseerumist alustanud peremeesrakk säilitaks oma mitootilise aktiivsuse. Viiruslike

onkovalkude omadused tagavad diferentseerumist alustanud rakkudes S-faasi sarnaste tingimuste loomise, mis on vajalikud rakujagunemise jätkumiseks (Boyer *et al*, 1996, Scheffner *et al*, 1990). HPV-positiivsetes diferentseerumist alustanud rakkudes muutub aktiivseks viiruse hiline promooter, millelt algatatakse intensiivne varajaste transkriptide süntees (E1, E2, E5, E6, E7, E1^{E4}) (Grassman *et al*, 1996). Replikatsiooniks vajalike viirusvalkude E1 ja E2 ekspressioonitaseme tõusu korral algatatakse viiruse *origin*'ilt HPV genoomi teistkordne ehk vegetatiivne amplifikatsioon, mille lõppedes on viiruse genoomi koopiaarv ligikaudu 1000 raku kohta (Kadaja *et al*, 2009). Lisaks aktiveeritakse terminaalset diferentseerunud keratinotsüütides ka hiliste lugemisraamide (L1, L2) ekspressioon, millele järgneb sünteesitud HPV DNA pakkimine virionidesse. Kuna papilloomiviiruste näol ei ole tegemist lüütiliste viirustega, vabanevad virionid väliskeskkonda koos surnud rakkudega epiteelkoe kõige pindmisest kihist (Kadaja *et al*, 2009). Viiruspartiklite vabanemisel on oluline roll E1^{E4} liitvalgul, mis indutseerib terminaalset diferentseerunud keratinotsüütide intermediaarsete filamentide võrgustiku kollabeerumise (Nakahara *et al*, 2005).

Produktiivse elutsükli lõpus toimuva vegetatiivse replikatsiooni mehhanism pole täpselt teada. On välja pakutud, et see toimub veereva ratta replikatsioonimehhanismi abil (Dasgupta *et al*, 1992, Flores *et al*, 1997). Selle mudeli kohaselt algatatakse ühesuunaline DNA replikatsioon origin piirkonda tehtavast üheaahelalisest katkest, mis tekitab praimerina kasutatava vaba 3' – OH rühma. Uue ahela süntees toimub kuni replikatsioonikahvel jõuab replikatsiooni alguskohani ning protsessi käigus tõrjutakse katkestatud vanem-ahel kompleksist välja. Sünteesiproduktideks on uuest ja vanast ahelast koosnev DNA rõngasmolekul ning „maha veerenud“ vanem-ahel, millele sünteesitakse juurde uus komplementaarne DNA ahel (Khan, 1997).

Viimasel ajal peetakse alternatiivseks vegetatiivse replikatsiooni mehhanismiks rekombinatsioonist sõltuvat DNA replikatsioonisüsteemi (RDR ehk *recombination-dependent replication*). Selle hüpoteesi kohaselt indutseerib HPV rakus DNA kahjustuse vastuse, mille tulemusena aktiveeritakse homoloogiline rekombinatsioon (pikemalt seletatud peatükis 1.6.1), mida viirus kasutab oma genoomi paljundamiseks. Kuigi erinevad autorid on näidanud, et diferentseerunud keratinotsüütides on HPV replikatsioonitsentritesse värvatud DNA kahjustuse vastuse ja homoloogilise rekombinatsiooniga seotud valgud (Moody ja Laimins, 2009, Gillespie *et al*, 2012), vajab see teooria veel tõestamist.

1.5 Mudelsüsteemid HPV replikatsiooni uurimiseks

Kuna HPV elutsükkel on tihedalt seotud keratinotsüütide diferentseerumisprogrammiga, ei toeta enamik kultiveeritavaid eukarüootseid rakuline HPV genoomi transkriptsiooni ja replikatsiooni. Hea mudelsüsteemi puudumine on pärssinud HPV-de uurimist. Kuigi suurema osa HPV tüüpide esmakordsest kirjeldamisest on möödunud rohkem kui 30 aastat, pole tänaseni viiruse keerulise elutsükli tõttu suudetud avastada erinevate replikatsioonifaaside täpseid toimumismehhanisme ning regulatsiooniradasid. Senini on HPV genoomi replikatsioonitsükli uurimiseks kasutatud peamiselt organotüüpseid parvkultuure (kõrgeriski HPV genoomiga transfekteeritud primaarseid inimese keratinotsüüte või emakakaela düsplaasiatest algatatud rakuline kasvatatakse kollageen-fibroblast maatriksil), mis sarnanevad oma ülesehituse ja füsioloogia poolest loomuliku epiteelkoega. Parvkultuurid on osutunud efektiivseks kõrgeriski alfabapilloomiviiruste elutsükli uurimisel, kuid madalariski alfabapilloomiviiruste ja nahapilloomiviiruste replikatsiooni antud mudelsüsteem kahjuks uurida ei võimalda, kuna nende onkovalgud E6 ja E7 pole võimelised parvkultuuri keratinotsüüte immortaliseerima (Thomas *et al*, 2001). Lisaks on parvkultuuridega töötamine kallis, töömahukas ning aeganõudev.

Tartu Ülikool tehnoloogiainstituudi papilloomiviiruste töörühmal on õnnestunud välja töötada uus HPV replikatsiooni toetav mudelsüsteem, mis põhineb U2OS rakuliini transfekteerimisel tsirkulaarsete HPV genoomidega (Geimanen *et al*, 2011). HPV-negatiivne U2OS rakuliini on algatatud inimese sääreлуу osteosarkoomi rakkudest, milles on säilinud metsiktüüpi pRb ja p53 geenid, ning nende rakkude morfoloogia sarnaneb lameepiteeli rakkude omaga (Ponten ja Saksela, 1967). Erinevate HPV tüüpide transkriptomis uuringud U2OS rakuliinis on näidanud, et HPV transkriptomimuster sarnaneb patsientide koeproovidest detekteeritud transkriptidega (Sankovski, *et al*, 2014, Andres Männik, avaldamata andmed; Isok-Paas, avaldamata andmed). Seega võib eeldada, et U2OS mudelsüsteem imiteerib looduses reaalset toimuvaid HPV infektsioonitsükli etappe ning on ideaalne HPV replikatsiooni uurimiseks.

Kuigi U2OS mudelsüsteem ei võimalda uurida HPV kogu elutsükli (näiteks viiruse sisenemist peremeesrakku, kapsiidivalkude sünteesi ja nende assembleerumist virionideks), on see äärmiselt efektiivne töövahend uurimaks viiruse kõiki kolme replikatsioonifaasi (transientne, stabiilne ja vegetatiivne replikatsioon). Monokultuurides on see esmakordne. Lisaks limaskesti nakatavate kõrgeriski HPV-de replikatsioonile toetab U2OS rakuliin ka seni sobiva mudelsüsteemi puudumise tõttu vähem uuritud naha ja madalariski limaskestade HPV-de replikatsiooni (Geimanen *et al*, 2011).

1.6 DNA kahjustuse vastus ning selle roll HPV genoomi oligomeriseerumisel

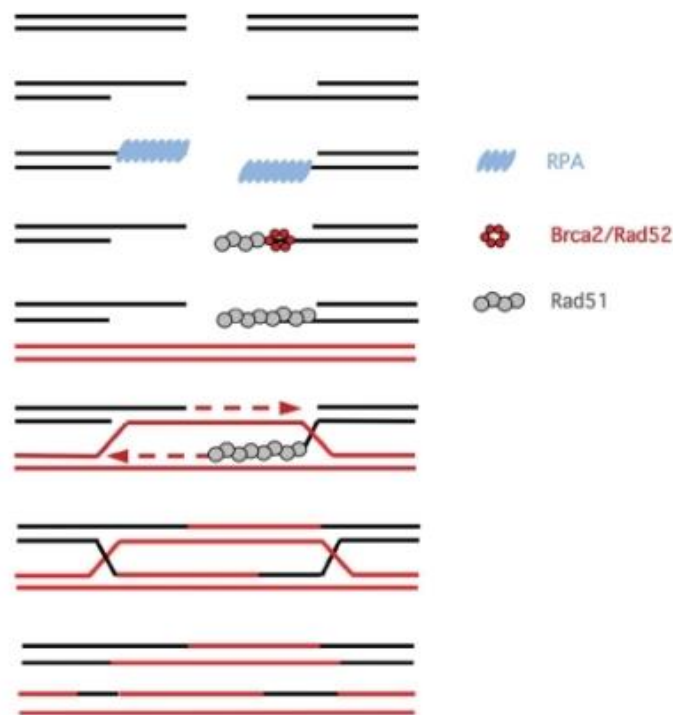
1.6.1 DNA kahjustuse vastus

Inimese rakus tekib päevas kümneid tuhandeid DNA kahjustusi. Peamiselt tekitavad neid erinevad raku elutegevuse käigus tekkivad endogeensed (nt hapnikuradikaalid, replikatiivne stress) või väliskeskkonnast pärit eksogeensed faktorid (nt radioaktiivne ja UV-kiirgus, erinevad keemilised ühendid) (Lindahl ja Barnes, 2000). Põhilisteks DNA struktuuri kahjustusteks on erinevad lämmastikaluste keemilised muutused ning ühe- ja kaheaahelised DNA katked. Igasugune DNA struktuuri kahjustus võib takistada DNA replikatsiooni ja transkriptsiooni toimumist. Selleks, et tagada raku genoomi stabiilsus ning normaalne funktsioneerimine, on eukarüootses rakus välja kujunenud kompleksne signaalvõrgustik, mida nimetatakse DNA kahjustuse vastuseks (DDR ehk *DNA damage response*). DDR-i näol on tegemist signaaliülekande rajaga, kus DNA kahjustuste ja replikatsioonistressi esinemise korral aktiveeritakse kinaaside kaskaadid, mis käivitavad rakutsükli peatumise ja DNA reparatsiooni. Kui DNA kahjustust ei suudeta parandada, suunatakse rakk apoptoosi.

Üheks tähtsamaks reparatsioonisüsteemiks DNA kahjustuste parandamisel peetakse homoloogilist rekombinatsiooni (HR). Tegemist on väga täpse parandamismehhanismiga, kuna DNA kahjustuse kõrvaldamiseks kasutab DNA polümeraas matriitsina vigastatud DNA piirkonnaga homoloogilist järjestust. Homoloogiline rekombinatsioon toimub rakutsükli S ja G2 faasis, vahetult pärast rakulise DNA replikatsiooni või selle käigus, mil homoloogilised kromosoomid paiknevad lähestikku ning replikatsiooni käigus on tekkinud identne tütarkromatiid.

Homoloogilist rekombinatsiooni kasutatakse rakus peamiselt DNA kaheaaheliste katkete parandamiseks. Kaheaahelised katked (DSB ehk *double-strand breaks*) on rakule äärmisel ohtlikud, kuna nende parandamata jätmisel võivad tekkida ulatuslikud kromosoomide segmentide deletsioonid ja translokatsioonid. DSB avastamisel aktiveeritakse ATM signaalirada (ATM ehk *ataxia telangiectasia mutated*), mis on vajalik rekombinatsiooniprotsessi käivitamiseks ja rakutsükli peatamiseks (Shiloh, 2003). Kaheaahelise katke esinemise korral seonduvad kahjustunud DNA piirkonnaga nukleaasid, mis tekitavad 3' üleulatuvad otsad. Seejärel toimub homoloogilise piirkonna otsimine ning 3' üheaaheliste otste invasioon kahjustamata homoloogilise DNA molekuli dupleksisse (moodustub *D-loop* struktuur), mille tulemusel initsieeritakse seal replikatsioonikompleksi

moodustumine. Kuna DNA ahelast puuduva osa sünteesimiseks kasutatakse matriitsina kahjustumata homoloogilist kromosoomi või tütarchromatiidi, taastatakse vigastatud koht täielikult ja ilma mutatsioonideta. Protsessi lõpuks moodustuvad kahe molekuli vahel X-kujulised struktuurid, mida nimetatakse *Holliday* ühendusteks (HJ ehk *Holliday junctions*). HJ-ga ühendatud kahe molekuli lahutamise eraldiseisvateks molekulideks toimub resolvaaside abil (joonis 8) (Li ja Heyer, 2008).



Joonis 8. DNA kaheaahelalise katke parandamine homoloogilise rekombinatsiooni vahendusel.

Kaheaahelalise katke esinemise korral seonduvad kahjustunud DNA piirkonnaga nukleasid, tekitades 3' üleulatuvad otsad, millega seondub RPA valk (RPA ehk *replication protein A*). Seejärel seondub üheaahelalise DNA-ga homoloogilise rekombinatsiooni võtmevalk Rad51, tõrjudes RPA valgu kompleksist välja. Seda protsessi aitab läbi viia valk Brca2 (pärmis Rad52). Rad51 funktsiooniks on kahjustunud DNA piirkonnale homoloogilise ala otsimine ning Rad51-ssDNA filamenti invasiooni vahendamine kahjustumata homoloogilise DNA molekuli dupleksisse (moodustub *D-loop* struktuur), kus initsieeritakse replikatsioonikompleksi moodustumine. DNA dupleksisse invaseerunud Rad51-ssDNA filament toimib kui praimer, mida DNA polümeraas vajab DNA ahelast puuduva osa sünteesimiseks, kasutades matriitsina kahjustumata homoloogset kromosoomi või tütarchromatiidi. Protsessi lõppedes moodustuvad kahe molekuli vahel X-kujulised *Holliday* struktuurid, mille lahutamise toimub resolvaaside abil (Guirouilh-Barbat *et al*, 2010).

DNA replikatsioonil võib replikatsioonikahvlite liikumine olla häiritud DNA kahjustuse või mõne muu liikumist blokeeriva struktuuri tõttu. Kui seiskunud replikatsioonikahvlite liikumist ei suudeta taastada, leiab aset replikatsioonikompleksi kollapseeerumine ning tekivad DNA kaheahelalised katked, mille kõrvaldamiseks aktiveeritakse rakus HR reparatsioonirada, mis taastab lõpuks kahvlite liikumise (Kuzminov, 1995).

1.6.2 HPV genoomi oligomerisatsioon

Emakakaela mõõduka düsplaasiaga patsientide koeproovide analüüsimisel on täheldatud, et HPV genoomid esinevad rakkudes enamjaolt multimeersete episoomidena (Kennedey *et al*, 1987, Cullen *et al*, 1991). Lisaks on näidatud, et emakakaelavähi rakkude DNA-sse integreerunud viiruse genoom on sageli samuti multimeersel kujul (Meissner, 1999). Kuigi HPV-ga nakatunud patsientide emakakaela biopsiate analüüsimisel märgati oligomeersete episomaalsete vormide esinemist juba peaaegu kolmkümmend aastat tagasi, pole siiani suudetud mõista nende täpset tekkemehhanismi ning olulisust viiruse elutsükliks, kuna senini on peamiselt uuritud seoseid viiruse genoomi integratsiooni ja onkogeneesi vahel. Suurte multimeersete vormide esinemisele koeproovides ning nende võimalikule rollile viiruse elutsükliks pole senini piisavalt tähelepanu pööratud.

U2OS rakuliinil põhinevas mudelsüsteemis läbiviidud HPV genoomi replikatsiooni uuringute käigus on samuti ilmnenud HPV DNA kõrgemate vormide esinemine. Erinevad oligomeersete molekulide füüsilise oleku iseloomustamiseks läbiviidud eksperimendid tõestavad, et HPV multimeersed genoomid on episomaalsed konkatemeerid, sisaldades tandeemselt paiknevaid ja nn pea-saba orientatsioonis olevaid 8 kb pikkuseid HPV genome. HPV DNA oligomeriseerumine on viiruse *origin*'ilt algatava E1- ja E2-sõltuva transientse replikatsiooniga kaasnev protsess (nende valkude ekspressioonitaseme muutus mõjutab otseselt viiruse genoomide oligomerisatsiooni efektiivsust) ning nende osakaal muutub aja jooksul valdavaks (Orav *et al*, 2013). U2OS põhistes HPV-positiivsetes stabiilsetes rakuliinides esinevad HPV DNA molekulid samuti peamiselt oligomeersel kujul (Geimanen *et al*, 2011).

Pea-saba konformatsioonis olevate oligomeeride teke on homoloogilisest rekombinatsioonist sõltuv protsess. On näidatud, et oligomeerid võivad moodustuda kahest erinevast HPV molekulist, mis viitab homoloogilise rekombinatsiooni osalusele protsessis (Orav *et al*, 2013). Homoloogilise rekombinatsiooni kaasatust oligomeersete genoomide tekkes kinnitab ka DNA

kahjustuse vastuse (ATR ja ATM signaalirajad) ja homoloogilise rekombinatsiooniga seotud valkude värbamine HPV replikatsioonitsentritesse (Moody ja Laimins, 2009, Gillespie *et al*, 2012, Reinson *et al*, 2013). Lisaks on näidatud, et HPV E1 valgul on potentsiaal tekitada peremeesraku genoomis DNA kaheahelalisi katkeid, mis võivad aktiveerida DDR-i ja homoloogilise rekombinatsiooni masinavärgi (Fradet-Turcotte *et al*, 2011, Sakakibara *et al*, 2011, Reinson *et al*, 2013).

Viiruse genoomi oligomeriseerumise olulisus HPV elutsükklis on täpselt teadmata, kuid üheks potentsiaalseks rolliks on välja pakutud, et multimeersed HPV genoomid on vajalikud stabiilseks säilimiseks peremeesrakus. Stabiilse säilimise faasis ekspresseeritakse viiruse replikatsioonivalke E1 ja E2 madalal tasemel, et nakatunud peremeesrakk jääks immuunsüsteemile võimalikult märkamatuks. Sellistel tingimustel omavad multimeersed genoomid märgatavat eelist monomeersete genoomide ees. On näidatud, et mitmetest HPV genoomi koopiatest koosnevad oligomeersed molekulid sisaldavad ainult ühte aktiivset replikatsiooni alguskohta, mis võimaldab replikatsioonivalkude E1 ja E2 madala taseme juures paljundada ühe replikatsioonikompleksi moodustumise korral mitmeid viiruse genoomi koopiaid (Orav *et al*, 2013, Geimanen *et al*, 2011).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Magistritöö eesmärgid

HPV keerulise elutsükli tõttu on viiruse erinevate replikatsioonifaaside kohta suhteliselt vähe teada. Flores ja Lambert (1997) on välja pakkunud, et HPV esialgne lühiajaline ehk transientne replikatsioon toimub *theta* mehhanismi kaudu, kuid diferentseerunud keratinotsüütides toimub ümberlülitus veereva ratta replikatsioonimehhanismile. Senini pole suudetud seda kindlat tõestada. TÜTI papilloomiviiruste uurimisrühma liikmete poolt välja töötatud U2OS rakuliinil põhinev mudelsüsteem on oluliselt lihtsustanud HPV-de uurimist ning võimaldab jälgida erinevate HPV tüüpide kõiki kolme DNA replikatsioonifaasi (Geimanen *et al*, 2011). Käesoleva magistritöö eksperimentaalses osas kasutati mainitud mudelsüsteemi uurimaks HPV-18 esialgsel transientsel replikatsioonil tekkivaid replikatsiooni intermediaate.

Antud magistritöö eesmärkideks on:

- analüüsida HPV-18 genoomide molekulaarset staatust U2OS rakuliinis;
- uurida HPV-18 transientse replikatsiooni tingimustes tekkivaid replikatsiooni intermediaate;
- hinnata viiruslike replikatsioonivalkude E1 ja E2 mõju HPV-18 transientse replikatsiooni intermediaatidele.

HPV-18 DNA molekulaarse staatuse kirjeldamiseks ja transientse replikatsiooni intermediaatide analüüsimiseks U2OS rakkudes kasutati kahedimensionaalset (2D) geelelektforeesi ning saadud tulemused visualiseeriti *Southern blot* meetodil. Eksperimentides analüüsiti U2OS rakkudest Hirt lüüsi meetodil eraldatud ekstrakromosomaalset DNA-d nii lõikamata kui ka lõigatud kujul.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid

- pMC.BESPX

Ligikaudu 4 kbp pikkune plasmiid, mis sisaldab *minicircle*'te ehk nn pisirõngaste tootmiseks vajalikke järjestusi: bakteriofaag Φ C31 integraasi äratundmisjärjestused attB ja attP, 32 restriksiooniensüümi Sce-I lõikekohta, multikloneerimissaiti, bakteriaalset replikatsiooni alguskohta ColE1, kanamütsiini resistentsusgeeni. Plasmiid pMC.BESPX vektor on pärit Mark A. Kay laborist, kus töötati välja *minicircle*'ite tootmissüsteem.

pMC.BESPX vektori kaart on välja toodud lisa 1.

- pMC.BESPXHPV18

Ligikaudu 12 kbp pikkune HPV-18 *minicircle*'te ehk nn pisirõngaste tootmiseks kasutatav algplasmiid, mis koosneb pMC.BESPX vektorist ja HPV-18 genoomist, mis on kloneeritud pMC.BESPX vektori attP ja attB järjestuste vahel paiknevasse multikloneerimissaiti. pMC.BESPXHPV18 algplasmiid on pärit labori kolleksioonist.

- HPV-18 *minicircle* DNA plasmiid

Ca 7,9 kbp suurune kovalentselt suletud superspiraliseerunud HPV genoom, mis sarnaneb looduses esinevatega. Erinevuseks, võrreldes metsiktüüpi HPV-18 genoomiga, on URR piirkonnas paiknev lühike 36 bp pikkune lisajärjestus (algplasmiidist pMC.BESPX pärit multikloneerimissait ja rekombinatsiooniprotsessi tagajärjel tekkinud attR järjestus).

- HPV-18 E8⁺E2⁻ *minicircle* DNA plasmiid

HPV-18 E8⁺E2⁻ *minicircle* DNA plasmiid erineb metsiktüüpi HV-18 *minicircle* plasmiidist selle poolest, et E8 lugemisraami start koodon on muteeritud (ATG–ACG) positsioonis 1324.

- HPV-18 E1 ekspressioonivektor (pM18-14)

E1 ekspressioonivektor koosneb pQM-NTag/Ai+ vektorist (Icosagen), kuhu on kloneeritud järjestikku paiknevad E6, E7 ja E1 lugemisraamid. E6 ja E7 ORF-id on startkoodon mutatsiooniga inaktiveeritud, E1 lugemisraami algusesse on viidud gripiviiruse

hemaglutiniini (HA) epitoobi märgis (ehk 12CA5 tag). pQM-NTag/Ai+ vektor sisaldab Simian viirus 40-e (SV40) replikatsiooni alguskohta, polü-A järjestust, ampitsilliini resistentsusgeeni, tsütomegaloviiruse (CMV ehk *cytomegalovirus*) promooterit. E1 ekspressioonivektor pM18-14 on pärit labori kolleksioonist.

pM18-14 vektori kaart on välja toodud lisas 2.

- HPV-18 E2 ekspressioonivektor (pQMN18E2)

E2 lugemisraami järjestus koos E2 tag'iga on kloonitud eukarüootse ekspressioonivektori pQM-NTag/Ai+ multikloneerimissaiti. E2 ekspressioonivektor pQMN18E2 on pärit labori kolleksioonist.

pQMN18E2 vektori kaart on välja toodud lisas 3.

2.2.2 Superspiraliseerunud vormis HPV genoomide (*minicircles* ehk pisirõngad) tootmissüsteem

Keerulise elutsükli tõttu ei ole HPV võimeline replitseeruma enamikes eukarüootsetes rakuliinides ning seetõttu on infektsiooniliste viiruspartiklite saamine laboritingimustes keeruline ja kulukas. Sellest tingituna paljundatakse meie uurimisrühmas HPV genoomid bakterirakkudes. HPV DNA replikatsiooni uurimiseks viiakse viiruse genoomid U2OS rakkudesse elektroporatsiooni meetodil. Kuna bakteriaalset järjestust sisaldavate HPV genoomide replikatsioon on eukarüootsetes rakuliinides ebaefektiivne ning samuti ei sarnaneks kasutatav viiruse genoom looduses esinevatega, kasutatakse meie uurimisrühmas M. Kay (Kay *et al*, 2010) labori poolt välja töötatud *minicircle* plasmiidide tootmissüsteemi. Kirjeldatud *minicircle* tootmissüsteem põhineb järjestusspetsiifilisel rekombinatsioonimehhanismil, mille käigus bakteriofaagi Φ C31 integraas viib läbi rekombinatsiooni attB ja attP järjestuse vahel. Selleks kloonitakse HPV DNA järjestus algplasmiidis pMC.BESPX olevate attB ja attP rekombinatsioonisaitide vahele. Lisaks sisaldab pMC.BESPX vektor ka 32 endonukleaasi Sce-I lõikekohta, mis tagavad pärast rekombinatsiooni toimumist algplasmidi lagundamise. Pisirõngaste tootmiseks kasutatakse *Escherichia coli* tüve ZYCY10P3S2T rakke, mille genoomi on lisatud järjestusspetsiifilise rekombinatsiooni Φ C31 ja restriksiooniensüümi Sce-I kodeerivad järjestused. Vastavad järjestused on viidud indutseeritavate arabinoosi BAD (ara-BAD) promooterite kontrolli alla.

L-arabinoosi lisamisel bakterikultuurile leiab aset integraasi Φ C31 vahendatud kohtspetsiifiline rekombinatsioon, mille käigus vabanetakse bakteriaalset järjestust sisaldavast vektoriaalsest osast ning moodustuvad kovalentselt suletud superspiraliseerunud HPV DNA plasmiidid, mida iseloomustab hea rakku sisenemise võime ning nad sarnanevad looduses esinevate metsiktüüpi HPV genoomidega. Protsessi kõrvalprodukt ehk algne pMC.BESPX vektor lagundatakse restriksiooniensüümi Sce-I poolt. Vältimaks pMC.BESPX-HPV konstrukti lagundamist enne rekombinatsiooni toimumist, toimub pisirõngaste tootmisprotsess 32°C juures, mis on optimaalne temperatuur bakteriofaagi Φ C31 integraasi rekombinaaseks aktiivsuseks, kuid mitte Sce-I endonukleaaseks aktiivsuseks (Kay *et al*, 2010).

2.2.3 HPV *minicircle* DNA plasmide tootmine

Escherichia coli tüve ZYCY10P3S2T kompetentseid rakke transformeeriti pMC.BESPXHPV konstruktidega. Esimese päeva õhtul pandi bakterikoloonia kasvama 10 ml LB söötmesse (kanamütsiini lõppkontsentratsioon 50 µg/ml) 37°C ja 220 rpm juurde. Järgmise päeva hommikul inokuleeriti 100 ml TB söödet (kanamütsiini lõppkontsentratsioon 50 µg/ml) (Invitrogen) 5 ml starterkultuuriga. Seejärel kasvatati bakterikultuuri 37°C 220 rpm juures seni, kuni bakterisuspensiooni optiline tihedus (OD) 600 nm juures jõudis 4 ühikuni. Seejärel kontrolliti bakterikultuuri pH-d (optimaalne pH 6,5) ning lisati pisirõngaste induktsiooni lahus, mis sisaldas 100 ml LB söödet, 4 ml 1 N NaOH (4% 1N NaOH) ning 100 µl 20% L-arabinoosi (0,02% L-arabinoos). Pisirõngaste produktsioon toimus 32°C 250 rpm juures 5-6 tundi. Pärast seda tsentrifuugiti (4°C 5000 g juures 15 minutit, SORVALL® RC-5B PLUS) bakterimass põhja ning bakterirakkudest eraldati plasmiidne DNA (*NucleoBond PC 500 EF kit*). Seejärel eraldati HPV-18 *minicircle* DNA plasmiidid rekombineerumata algplasmiidist ning puhastati agarosgeelist (*UltraClean 15 DNA Purification Kit*), et U2OS rakke transfekteerida ainult HPV-18 plasmiidse DNA-ga.

2.2.4 Rakuliinid ja söötmed

Töös kasutati kirjanduse ülevaates kirjeldatud HPV-negatiivset sääreлуу osteosarkoomist algatatud U2OS rakuliini (peatükk 1.5). Rakke kasvatati 100 mm läbimõõduga koekultuuritassidel IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) (GibcoBRL) söötmes,

mis sisaldas 10% vasika loote seerumit (Sebak), streptomütsiini (100 ng/ml) ja penitsilliini (100 IU/ml). Rakke inkubeeriti 37°C ja 5% CO₂ sisalduse juures.

2.2.5 Transfektsioon elektroporatsiooni meetodil

U2OS rakkude transfekkeerimiseks HPV-18 *minicircle* DNA plasmiididega rakendati elektroporatsiooni meetodit. Ühe transfektsiooni jaoks kasutati 100 mm läbimõõduga koekultuuritassi jagu rakke, mis olid saavutanud ligikaudu 90%-lise konfluentsuse. Koekultuuritassidel aspireeriti sööde, rakke pesti 2 ml 1xPBS lahusega (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄), lisati 2ml 0,25% trüpsiinilahust ning oodati kuni rakud koekultuuritassi küljest lahti tulid. Seejärel koguti rakud 50 ml tsentrifuugi tuubi, kuhu oli eelnevalt lisatud vähemalt 5 ml söödet, ning tsentrifuugiti 300 g 20°C juures 5 minutit (*Eppendorf Centrifuge 5810 R*). Seejärel aspireeriti rakkudelt sööde ning suspendeeriti need transfektsiooniks vajalikus söötmehulgas (ühe transfektsiooni kohta 250 µl). Seejärel pipeteeriti elektroporatsiooni küvettidesse 250 µl rakususpensiooni koos HPV genoomide (2 µg HPV-18 metsiktüüpi ja 1 µg HPV-18 E8⁺E2⁻ DNA) ja 50 µg lõhe spermi kandja DNA-ga. Transfekkeerimiseks kasutati *Gene Pulser XCell* (Bio-Rad Instruments) elektroporaatorit. U2OS rakkude puhul rakendati 220 V pinget ning mahutavus oli 975 µF. Pärast elektroporatsiooni suspendeeriti rakud värskes söötmes, kanti 4 ml värsket söödet sisaldavasse 15 ml tsentrifuugi tuubi ning tsentrifuugiti 300 g 20°C juures 5 minutit. Seejärel aspireeriti rakkudelt sööde, rakusade suspendeeriti värskes söötmes (ühe tassi kohta kasutati 1 ml söödet) ning kanti 100 mm läbimõõduga koekultuuritassidele. Üks poratsioon jagati kahe koekultuuritassi vahel.

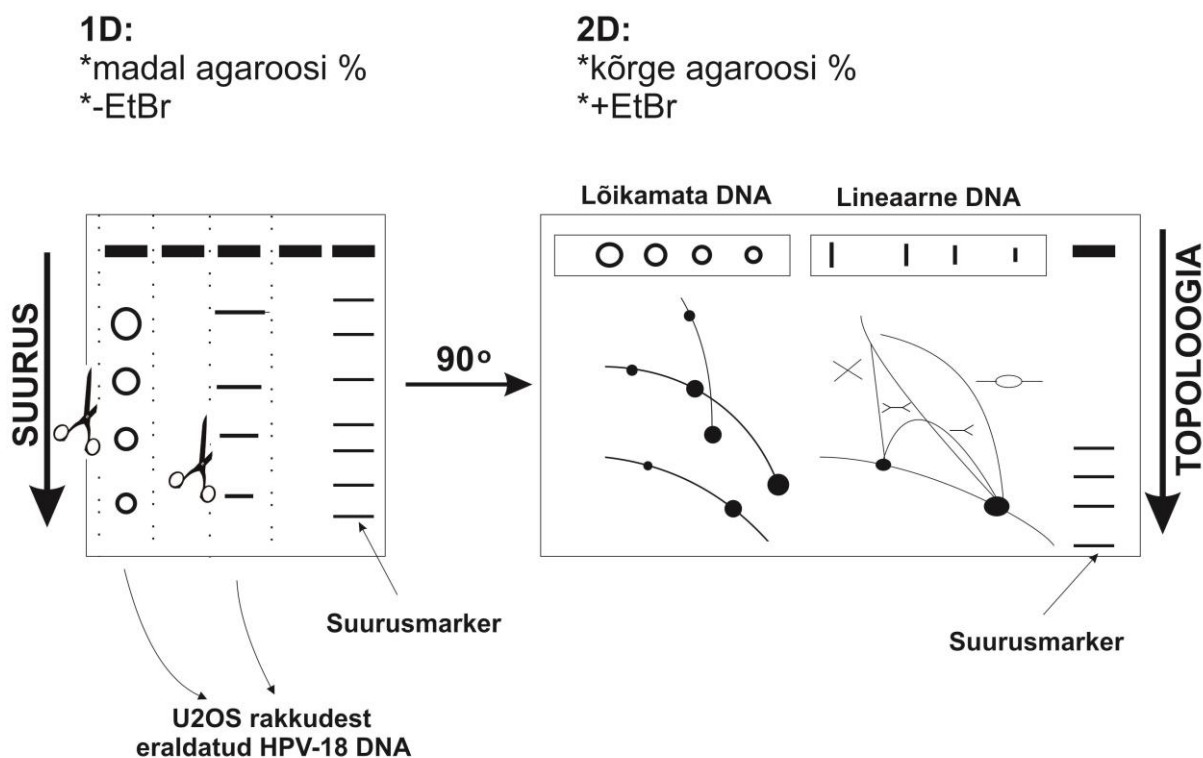
2.2.6 Eukarüootsetest rakkudest episomaalse DNA eraldamine Hirt lüüsi meetodil

3 või 5 päeva möödudes transfektsioonist eemaldati tassidelt sööde ning rakke pesti kaks korda 1xPBS lahusega, mille jäägid aspireeriti. Rakkude lüüsimiseks lisati 800 µl Hirt lüüsilahust (0,5% SDS, 50 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA) ning inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril aeg-ajalt tase kallutades. Seejärel lisati tilkhaaval 200 µl 5 M NaCl lahust ning segati tase kallutades. Lüsmaat koguti spaatliga mikrotsentrifuugi tuubidesse ning hoiti ligikaudu 18 tundi 4°C juures. Seejärel tsentrifuugiti (*MicroCL 21R Thermo Scientific*) 30 minutit 21 100 g 4°C juures. Madalmolekulaarset DNA-d sisaldav supernatant tõsteti uude

tuubi ning DNA sadestati 600 µl isopropanooliga -20°C juures. 30 minuti möödudes tsentrifuugiti 10 minutit 16 000 g 4°C juures. Sade lahustati 200 µl Sol IV-s (20 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,2% SDS), kuhu oli lisatud proteinaas K lõppkontsentratsioonini 0,1 µg/µl ning inkubeeriti 60 minutit 37°C juures. Nukleiinhapete eraldamiseks valkude jääkidest lisati proovidele võrdne maht fenool-kloroformi segu (1:1), segati vorteksil ja proove tsentrifuugiti 2 minutit 16 000 g juures. Peale fenoolitöötlust tõsteti ülemine vesifaasi uude mikrotsentrifuugi tuubi, kus nukleiinhapped sadestati kahekordse mahu 96% etanooliga -20°C juures vähemalt 30 minutit ning seejärel tsentrifuugiti 10 minutit 21 100 g 4°C juures. DNA sadet pesti 70% etanooliga, tsentrifuugides 3 minutit 21 100 g juures. Seejärel eemaldati supernatant ning DNA sade kuivatati toatemperatuuril. Sade resuspendeeriti 10 µl TE-s, mis sisaldas 20 µg/ml RNAas A-d. Proove inkubeeriti 1 tund 37°C juures.

2.2.7 2D geelelektroforees

2D geelelektroforeesi käigus toimub järjestikku kaks erinevate tingimustega geelelektroforeesi, mis võimaldavad lahutada molekule nii nende molekulmassi kui ka topoloogia ehk kuju järgi (joonis 9). Meetodit kasutatakse peamiselt DNA replikatsiooni intermediaatide analüüsimiseks. Kahedimensionaalse elektroforeesi esimeses etapis toimub DNA frAGMENTIDE LAHUTAMINE peamiselt molekulmassi järgi, molekulide kuju mõjutab nende liikumist minimaalselt. Seejärel lõigatakse DNA fragmente sisaldav riba geelist, keeratakse 90 kraadi ning selle ümber valatakse uus agarosgeel. Teise dimensiooni tingimused tagavad DNA molekulide lahutamise peamiselt topoloogia järgi (Schvartzman *et al*, 2012).



Joonis 9. 2D geelektroforeesi läbiviimise põhimõte. 2D geelektroforeesi esimese dimensiooni jooksul toimub molekulide lahutamine peamiselt suuruse järgi (ilma etiidiumbromiidita (EtBr) madala kontsentratsiooniga agarosgeel, madal voltaaž). Enne teist dimensiooni lõigatakse analüüsitav DNA geelist, keeratakse 90 kraadi ning ümbritsetakse kõrge agarooosi kontsentratsiooniga geeliga. Teine dimensioon toimub etiidiumbromiidi juuresolekul suhteliselt kõrge voltaaži juures. Selliste tingimuste juures toimub DNA molekulide lahutamine peamiselt topoloogia järgi.

Ühe analüüsi jaoks kasutati kolme 100 mm läbimõõduga koekultuuri tassi jagu U2OS rakkudest eraldatud madalmolekulaarset DNA-d. Analüüsitavate DNA proovide lineariseerimiseks kasutati erinevaid restriksiooniensüüme (Eam1104I, Eam1105I, BglII, PstI, XmaII; *Thermo Scientific*) ning tekkinud fragmendid lahutati kõigepealt madala kontsentratsiooniga etiidiumbromiidita agarosgeelis (0,4%) 0,5xTBE puhvril 48 tunni jooksul, rakendades pinget 0,4 V/cm. Seejärel lõigati proovi sisaldav riba geelist välja, keerati 90° ning selle ümber valati etiidiumbromiidi (lõppkontsentratsiooniga 0,3 µg/ml) sisaldav 1% agarosgeel. Etiidiumbromiid interkaleerub DNA lämmastikaluste vahele ning toob rohkem esile molekuli kuju. Teine dimensioon toimus 0,5xTBE puhvril, mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,3 µg/ml, ligikaudu 6 tundi 4°C juures, rakendades pinget 5,5 V/cm.

2.2.8 Replikatsioonianalüüs *Southern blot* meetodil

Pärast DNA fragmentide lahutamist 2D geelelektroforeesi meetodil loksutati agarosgeeli Sol A lahuses (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) 30 minuti jooksul, mil toimub agarosgeelis oleva DNA denatureerumine. Seejärel agarosgeel loputati destilleeritud veega ning neutraliseeriti Sol B lahuses (1 M Tris pG 7,4, 1,5 M NaCl) 30 minuti jooksul. DNA kanti agarosgeelist nailonmembraanile (*Nylon Transfer membrane*) (Naxo) kapillaarse ülekande meetodil 10xSSC puhvril (1,5 M NaCl, 150 mM Na₃C₆H₅O₇) 6-18 tunni jooksul. Seejärel toimus DNA ristseoseline sidumine filtrile UV Stratalinker 1800 aparaadiga (Stratagene). Vältimaks hübriidisatsiooniproovi ebaspetsiifilist seondumist, inkubeeriti filtrit prehübriidisastiooni lahuses (20x SSC 30%, 50x Den 10%, 10% SDS 5%, denatureeritud lõhe spermi kandja DNA 200 µg/ml) 65°C juures vähemalt 45 minutit. Hübriidisatsiooniproovina kasutati spetsiifilist HPV DNA järjestust (HPV-18 täispikk genoom, ORI järjestus – nt 7048-12, TERM järjestus – nt 2681-4235), mille märgistamiseks α-32P-dCTP (Hartmann Analytics) isotoobiga kasutati *DecaLabel TM DNA Labeling Kit*-i (Thermo Scientific). Hübriidisatsioon toimus 65°C juures üleöö. Seejärel pesti filtrit kaks korda 5 minutit pesulahusega I (10xSSC, 0,1% SDS), üks kord 15 minutit pesulahusega II (5xSSC, 0,1% SDS) ning kaks korda 10 minutit pesulahusega III (0,5xSSC, 0,1% SDS). Hübriidisatsioonisignaali detekteerimiseks eksponeeriti filtrit röntgenfilmile (Fuji).

2.2.9 Valkude ekspressiooni analüüs *Western blot* meetodil

Et analüüsitavad proovid sisaldaksid ligikaudselt võrdset kogust totaalset valku, loeti enne valgualanalüüsi rakud. Selleks eemaldati 100 mm läbimõõduga koekultuuritassidelt sööde ning rakke pesti kaks korda 1xPBS lahusega. Seejärel lisati koekultuuritassile 1 ml PBS-EDTA lahust ning inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril. Rakud suspendeeriti lahusesse ja tõsteti 1,5 ml tuubi, millest 10 µl eraldati rakkude lugemiseks (Countess® Automated Cell Counter, Invitrogen), ülejäänud rakud tsentrifugeeriti (*MicroCL 21R Thermo Scientific*) 900 g juures 2 minuti jooksul põhja. Rakud suspendeeriti 45 µl 1xPBS lahuses ja lüüsi 45 µl 2x *Laemmli* puhvril (100 mM Tris-HCl pH 6,8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% broomfenoolsinine, 20% glütserool). Lüsate inkubeeriti 100°C juures 10 minutit ning tsentrifugeeriti 16 000 g 10 minutit. Supernatandis olevad valgud lahutati geelelektroforeesil 10% SDS-poliakrüülamiidgeelis 1xSDS jooksupuhvril (125 mM Tris, 0,96 M glütsiin, 0,5% SDS). Valgud kanti geelist üle 0,45 µm poori läbimõõduga PVDF filtrile Immobilon™ (Millipore)

SemiDry puhvrts (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0,037% SDS, 20% etanool) poolkuivas ülekande aparaadis (BIO-RAD Trans-blot SD) pingel 15V 25 minuti jooksul. Seejärel blokeeriti filtrit 1 tunni jooksul 5% w/v lõssipulbri ja 0,1% Tween20 PBS-lahuses. Järgnevalt inkubeeriti filtrit 1 tund 2% w/v lõssipulbri ja 0,1% Tween20 PBS-lahuses spetsiifiliste antikehadega järgnevate valkude detekteerimiseks: HPV-18 E1 – peroksüdaasiga konjugeeritud gripiviiruse hemaglutiniini (HA) epitoobi (ehk 12CA5 tag) vastane roti monoklonaalne antikeha 3F10-HRP (lahjendus 1:1000) (Roche); HPV-18 E2 – E2 vastane hiire monoklonaalne antikeha 2E7.1 (lahjendus 1:2500) (Mihkel Allik). Seejärel pesti filtrit pesulahuses (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20) 15 minuti jooksul, vahetades lahust 5 korda. E2 valgu analüüsi korral inkubeeriti filtrit peroksüdaasiga konjugeeritud hiire IgG-vastase antikehaga (lahjendus 1:10 000) (LabAs) 2% w/v lõssipulbri ja 0,1% Tween20 PBS-lahuses 1 tunni jooksul. Filtrit pesti 5x3 minutit pesulahuses (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20). Signaali detekteerimiseks kasutati TMB lahust (TMB Solution I, Biopanda Diagnostics) või *ECLTM Kit*-i (Amersham Pharmacia Biotech) ning filtrit eksponeeriti röntgenfilmile (Fuji).

2.3 Tulemused ja arutelu

Papilloomiviiruste keratinotsüütide diferentseerumisprogrammist sõltuv keeruline elutsükel on oluliselt pärssinud HPV-de uurimist. Senini on puudunud laboritingimustes lihtsasti rakendatav viiruse infektsioonitsükli imiteeriv mudelsüsteem, mis võimaldaks uurida väiksema töö- ja ajakuluga HPV erinevaid replikatsioonifaase. Sellest tulenevalt pole täit selgust HPV erinevate replikatsioonitsükli täpsetest toimumismehhanismidest ning nende reguleerijatest radadest.

TÜTI papilloomiviiruste uurimisrühmas välja töötatud U2OS rakuliinil põhinev mudelsüsteem on oluliselt lihtsustanud HPV replikatsiooni uurimist. Meetod seisneb HPV monomeersete genoomide sisestamisel U2OS rakkudesse elektroporatsiooni meetodil. HPV genoomide paljundamiseks kasutatakse pisirõngaste (*minicircle*) tootmise meetodit (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.2 ja 2.2.3). Pisirõngaste kujul bakterirakust puhastatud HPV episoomid on superspiraliseerunud vormis ning seega sarnanevad looduses esinevatega. Varasemalt on meie uurimisrühma liikmete poolt tõestatud, et U2OS rakuliin on võimeline toetama nahapapilloomiviiruste (HPV-5 ja -8) ning limaskesti nakatavate madalariski (HPV-6b ja -11) ja kõrgeriski tüüpide (HPV-18 ja -16) genoomi replitseerumist ekstrakromosomaalse plasmidi ehk episoomina (Geimanen *et al*, 2011).

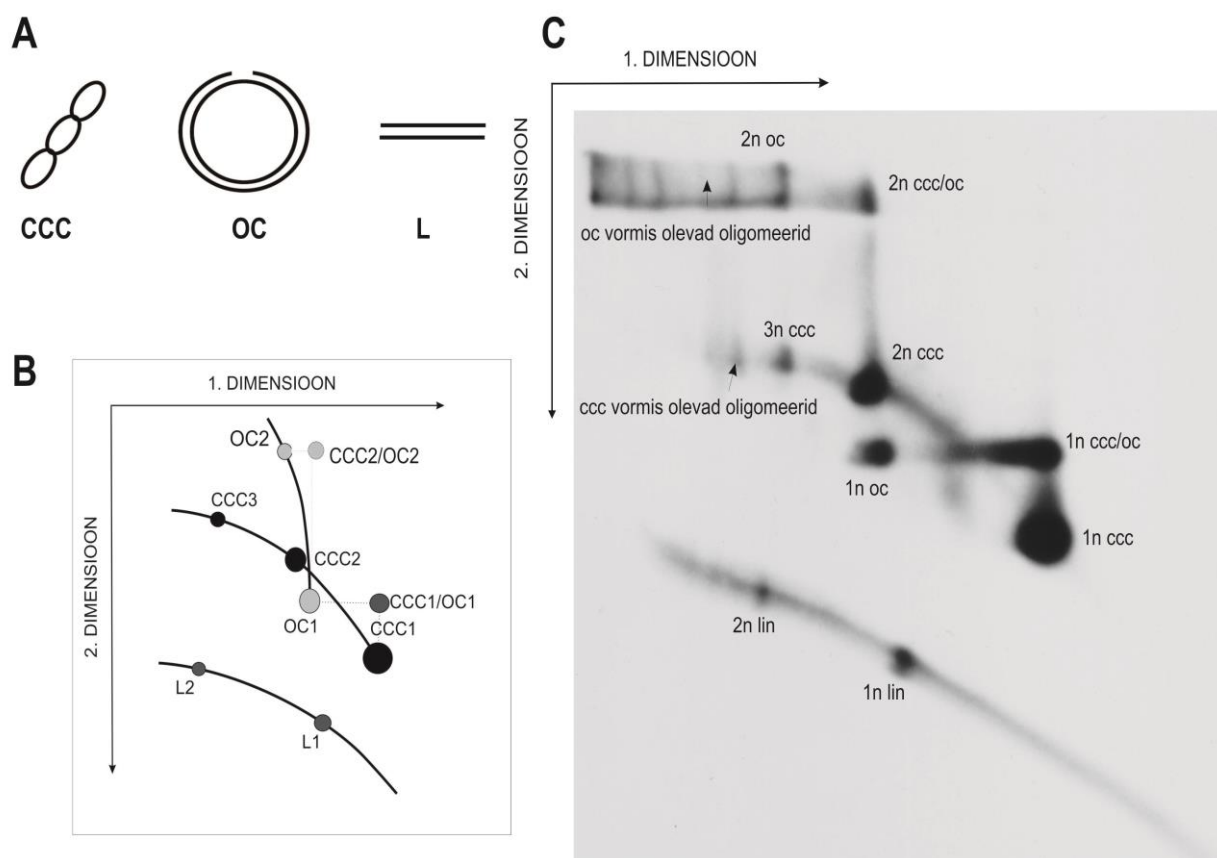
Antud magistritöös keskendutakse kõrgeriski HPV-18 esialgse lühiajalise ehk transientse replikatsiooni intermediaatide (RI ehk *replication intermediates*) uurimisele, kasutades DNA fragmentide lahutamiseks kahedimensionaalset (2D) neutraalne-neutraalne geelelektroforeesi (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.7, joonis 9) ja spetsiifilise signaali detekteerimiseks *Southern blot* meetodit (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.8).

2.3.1 HPV-18 molekulaarne staatus U2OS rakuliinis

Episomaalselt replitseeruvad tsirkulaarsed DNA molekulid võivad esineda erinevates konformatsioonides ja konfiguratsioonides (näiteks erinevas vormis olevad monomeerid, multimeerid). Samuti võib toimuda nende integratsioon peremeesraku genoomi, nagu seda on sageli täheldatud emakakaelavähi biopsiate analüüsimisel (Cullen *et al*, 1991, Kalantari *et al*, 2001). 1D geelelektroforees on küll piisav, et lahutada erineva konformatsiooniga monomeerseid molekule, kuid see ei ole sobiv meetod lahutamaks suuremaid erineva

topoloogiaga DNA molekule. Seetõttu kasutati HPV-18 molekulaarse staatuse täpsemaks iseloomustamiseks U2OS rakkudes 2D geelektroforeesi meetodit.

Selleks transfekteeriti U2OS rakke elektroporatsiooni meetodil HPV-18 metsiktüüpi genoomide ja kandja DNA-ga (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.5). Viie päeva möödudes transfektsioonist eraldati U2OS rakkudest Hirt lüüsi meetodil ekstrakromosomaalne DNA (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.6), mida töödeldi restriksiooniensüümiga DpnI. Kuna vastav endonukleas lõikab ainult bakteriaalse metülatsioonimustriga DNA-d (s.t rakkudesse transfekteeritud DNA-d), võimaldab see analüüsida ainult rakkudes juurdesünteesitud HPV-18 DNA-d. Tulemuste visualiseerimiseks rakendati *Southern blot* meetodit, kasutades spetsiifilise hübridisatsiooniproovina ligikaudu 8000 bp pikkust lineaarset HPV-18 genoomi (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.8).



Joonis 10. HPV-18 molekulaarse staatuse iseloomustamine U2OS rakkudes.

(A) Joonisel on näidatud, millises konformatsioonis võivad olla U2OS rakkudest eraldatud HPV-18 DNA molekulid. Skeem on tehtud Orav *et al* (2013) põhjal. CCC (*c*oalently *c*losed *c*ircular)) ehk superspiraliseerunud molekulid, DNA ahela katkega OC (*o*pen *c*ircular) ehk avatud tsirkulaarsed molekulid ja lineaarsed molekulid (L). (B) Skemaatiliselt on välja toodud ekstrakromosomaalsete HPV DNA molekulide liikumine 2D analüüsil. Erinevas konformatsioonis olevate molekulide

tähistused on selgitatud joonise A osas. Numbriga on märgitud molekuli suurus (1-monomeer, 2-dimeer, 3-trimeer). CCC/OC vahevormi korral võib olla tegu nii replikatsiooni intermediaadiga, geelelektroforeesi teise dimensiooni ajal lagunenu CCC molekulidega kui ka CCC molekulide konformatsiooniliste erinevustega. (C) Episomaalse HPV-18 DNA liikumine agarosgeelis 2D geelelektroforeesi korral. U2OS rakke transfekteeriti 2 µg HPV-18 metsiktüüpi genoomide ja kandja DNA-ga elektroporatsiooni meetodil. Madalmolekulaarne DNA eraldati Hirt lüüsi meetodil viie päeva möödudes transfektsioonist. DNA fragmentide lahutamiseks kasutati neutraalset-neutraalset 2D geelelektroforeesi ning tulemused visualiseeriti *Southern blot* meetodil, kasutades hübridisatsiooniproovina HPV-18 genoomi.

Analüüsi käigus ilmnis, et U2OS rakkudest eraldatud HPV-18 DNA esineb episomaalsel kujul nii monomeeride kui ka multimeeridena. Oligomeersete molekulide suurust on võimalik tuvastada kuni trimeersete molekulideni (joonis 10 C, 3n ccc), kuna suuremad molekulid lahutuvad antud tingimuste juures halvasti. Kirjanduse põhjal võib arvata, et HPV genoomi multimeriseerumine on looduses reaalselt toimuv protsess. Orav *et al* (2013) tõestavad oma artiklis, et HPV DNA oligomeriseerumine ei toimu ainult U2OS rakkudes: näidatakse oligomeeride esinemist ka teistes rakuliinides ning patsientide emakakaela biopsiates. Oligomeersete HPV genoomide esinemist patsientide koeproovides on täheldatud ka varasemates artiklites (Kennedy *et al*, 1987, Cullen *et al*, 1991).

Jooniselt 10C on näha, et monomeersed ja oligomeersed molekulid esinevad nii superspiraliseerunud (CCC ehk *covalently closed circular*), lineaarses kui ka avatud tsirkulaarses (OC ehk *open circular*) konformatsioonis. Antud joonise lineaarsete molekulide kaarel on näha monomeeride ja dimeeride molekulmassile vastavaid diskreetseid signaale, mis pole valdavad. Vastavad vormid tekivad arvatavasti DNA eraldamise käigus tsirkulaarse DNA molekuli ahelate katkemise tõttu, mitte pole tegu integreerunud HPV DNA-ga. OC vormis olevad molekulid võivad samuti tekkida DNA eraldamise ajal või on tegemist replikatsiooni intermediaatidega. Neutraalne-neutraalne 2D geelelektroforeesi teise dimensiooni jooksul, mil DNA molekulide lahutamine toimub topoloogia järgi, liiguvad agarosgeelis kõige aeglasemalt OC vormis olevad molekulid ning kõige kiiremini lineaarsed molekulid. Superspiraliseerunud molekulid liiguvad OC ja lineaarsete molekulide vahepeal.

HPV-18 lõikamata DNA 2D geelelektroforeesi analüüsi põhjal võib järeldada, et HPV-18 DNA esineb U2OS rakkudes ekstrakromosomaalsel kujul peamiselt tsirkulaarsete oligomeeridena.

2.3.2 *Theta* replikatsiooni intermediaadid

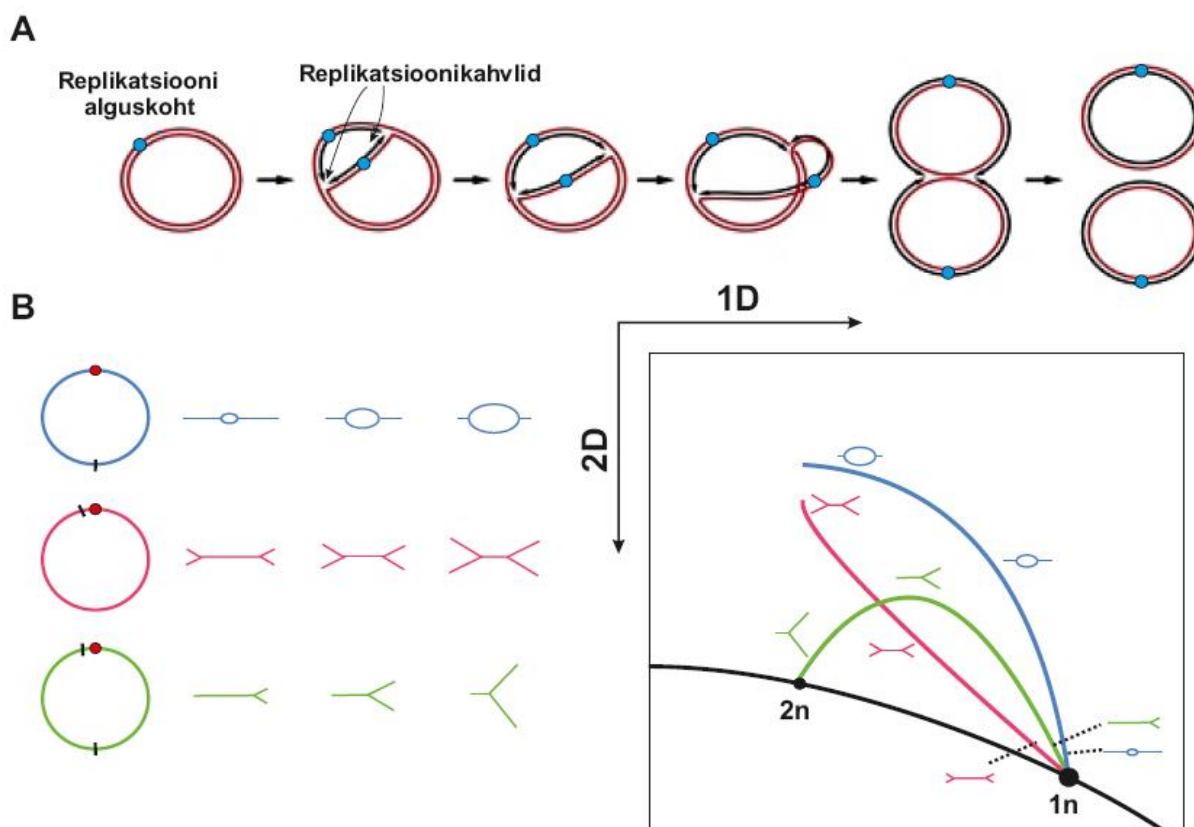
Flores ja Lambert (1997) on näidanud, et HPV transientne replikatsioon võib toimuda *theta* mehhanismi järgi. Selle mudeli kohaselt toimub DNA replikatsioon kahesuunaliselt. Replikatsiooni alguskohas moodustuvad kaks replikatsioonikahvlit, mis hakkavad liikuma vastassuundades *origin* piirkonnast eemale, kuni kohtuvad replikatsiooni alguskohast vastaspoolel. Sellele järgneb molekulide lahutamine eraldiseisvateks DNA molekulideks (joonis 11 A).

Erinevate replikatsioonimehhanismidega kaasneb iseloomulike intermediaatide teke, mille identifitseerimine on võimalik unikaalse liikumismustri järgi agarosgeelis. Kuna HPV genoom on rõngasmolekul, tuleb replikatsiooni käigus tekkivate intermediaatide tuvastamiseks DNA molekulid kõigepealt lineariseerida ning seejärel üksteisest lahutada, kasutades 2D geelelektroforeesi meetodit.

Olenevalt restriksiooniensüümi lõikekohast iseloomustavad *theta* replikatsiooni kindlat tüüpi intermediaadid: nn mulli-, topelt Y- (dY ehk *double Y*) ja Y-struktuurid. Mullistruktuuri on 2D geelelektroforeesil võimalik detekteerida, kui endonukleaasi lõikekoht paikneb replikatsiooni alguskohast piisavalt kaugel, et analüüsitud fragment sisaldaks teineteisest eemale liikuvaid replikatsioonikahvleid. Teineteisest üha kaugenevate replikatsioonikahvlitega molekulid moodustavad 2D analüüsil nn mullikaare, millel asuvad erineva replikatsioonimulli suurusega molekulid. Kaare alguses (1n molekuli lähedal) paiknevad agarosgeelis kiiremini liikuvad väikse replikatsioonimulliga molekulid (s.t replikatsioonikahvlid ei ole *origin*'st kaugele liikunud) ning kaare lõpus peaaegu tsirkulaarse kujuga dimeeri suurused molekulid, mis oma kõrge molekulmassi ja keerulise topoloogia tõttu liiguvad agarosgeelis aeglaselt (joonis 11B, sinised struktuurid) (Brewer ja Fangman, 1987).

Kui restriksiooni lõikekoht asub replikatsiooni alguskoha lähedal, lõigatakse mullistruktuurid katki ning tekivad mõlemast otsast hargnenud nn topelt Y-struktuurid, mis tähistavad üksteisele lähenevaid replikatsioonikahvelid. Nii nagu mullistruktuuriga molekulid, moodustavad ka erineva struktuuriga dY molekulid replitseeruvate molekulide kaare. Kui replikatsioonikahvlid on alles *origin* piirkonna lähedal, paiknevad dY-struktuurid 1n lineaarse molekuli lähedal. Kui replikatsioonikahvlid on jõudnud enam-vähem *origin*'i vastaspoolele, on tegu peaaegu dimeerse DNA molekuliga, mille ahelad on eriti hargnenud ning seetõttu liigub selline molekul agarosgeelis aeglaselt (joonis 11B, roosad struktuurid) (Brewer ja Fangman, 1987).

Ainult ühest otsast hargnenud Y-struktuurid, mis on peamiselt iseloomulikud ühesuunalisele replikatsioonile, saavad *theta* replikatsiooni korral esineda vaid siis, kui replikatsioonikahvlid liiguvad ebasümmeetriliselt (s.t üks replikatsioonikahvel liigub kiiremini kui teine) või endonukleaasi lõikekohad ei paikne *origin* piirkonna suhtes sümmeetriliselt. Sellisel juhul üks replikatsioonikahvlitest on liikunud restriksioonisaidist kaugemale, teine mitte. Samuti võib Y-struktuur tekkida dY-struktuuri katki lõikamisel. Y-struktuuriga molekulid, mille ahela ots on vähe või vastupidi palju hargnenud, sarnanevad oma topoloogia poolest lineaarsete molekulidega ning liiguvad seetõttu 2D analüüsil vastavalt $1n$ või $2n$ molekulide sarnaselt. Y-struktuuride kaare tipus paiknevad oma topoloogia tõttu kõige aeglasemalt liikuvad molekulid, millel on võrdselt nii hargnenud kui ka lineaarset ahela osa (joonis 11B, rohelised struktuurid) (Brewer ja Fangman, 1987).



Joonis 11. *Theta* replikatsiooni intermediaadid. (A) Joonisel on kujutatud, kuidas *origin*'ist alguse saanud replikatsioonikahvlid liiguvad vastassuunas ning kohtuvad replikatsiooni alguskohast vastaspoolel. Protsessi lõpus toimub kahe molekuli lahutamine eraldiseisvateks molekulideks (Snustad ja Simmons, 2012). (B) *Theta* replikatsiooni intermediaatide skemaatiline liikumine 2D analüüsil. Sinisega on märgitud mulli-, rohelisega Y- ja roosaga topelt Y-struktuurid. $1n$ tähistab lineaarseid mittereplitseeruvaid ning $2n$ peaaegu täielikult replitseerunud molekule. Lisaks on skeemi kõrval näitena välja toodud juhuslike restriksioonisüümide lõikesaidid, et vastavad struktuurid saaksid tekkida.

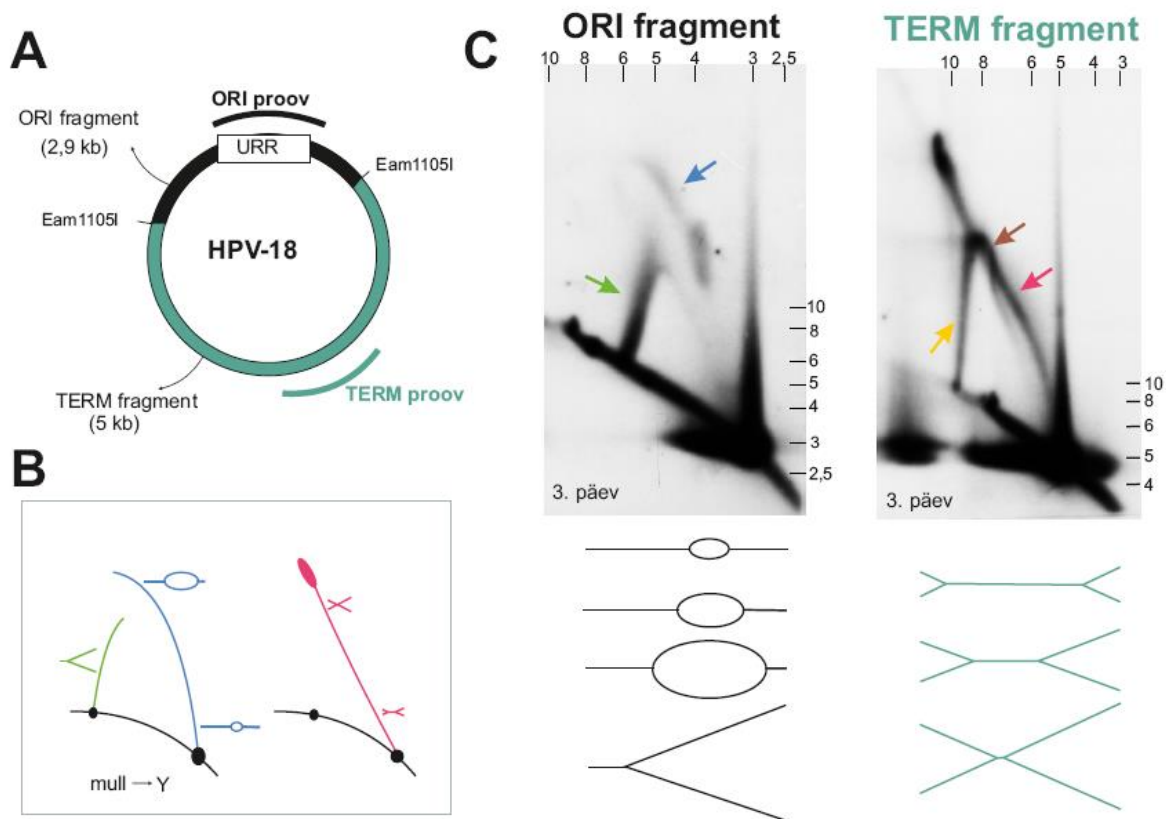
2.3.3 HPV-18 transientse replikatsiooni mehhanismi uurimine

Et paremini mõista, kuidas toimub HPV-18 transientne replikatsioon ja oligomeeride moodustumine U2OS rakuliinis, analüüsiti viiruse replikatsiooni intermediaate 2D geelelektroforeesi meetodit kasutades. Varasemalt on meie laboris tõestatud, et E8 lugemisraami start koodonit inaktiveeriva mutatsiooniga HPV-18 (HPV-18 E8⁻) genoom (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.1) replitseerub U2OS rakkudes metsiktüüpi HPV-18-ga võrreldes märgatavalt efektiivsemalt (Kurg *et al*, 2010, Orav *et al*, 2013). Mutantne genoom ei ole suuteline sünteesima viiruse transkriptsiooni ja replikatsiooni represserivat E8^{E2} valku (peatükk 1.3.1). Kuna HPV-18 metsiktüüpi ja HPV-18 E8⁻ genoomi replikatsiooni- ja oligomerisatsiooni mustrid on sarnased (Orav *et al*, 2013), on mõttekam järgnevates eksperimentides analüüsida HPV-18 E8⁻ replikatsiooni intermediaate.

Järgnevate eksperimentide põhimõte on sarnane: U2OS rakke transfekteriti HPV-18 E8⁻ genoomide ja kandja DNA-ga elektroporatsiooni meetodil. Kui transfektsioonist oli möödunud vastavalt kolm või viis päeva, eraldati rakkudest Hirt lüüsi meetodil ekstrakrosomaalne DNA. Replikatsiooni intermediaatide analüüsimiseks lineariseeriti eraldatud HPV-18 E8⁻ DNA, kasutades endonukleaase Eam1105I, Eam1104I, PstI, XmaI või BglI.

2.3.3.1 *Theta* replikatsioonile omaste intermediaatide tuvastamine

Et jõuda selgusele, kas HPV-18 transientne replikatsioon toimub *theta* mudeli kaudu, analüüsiti kolmandal päeval pärast transfektsiooni eraldatud HPV-18 E8⁻ DNA-d. Restriktsioonianalüüsil kasutati endonukleaasi Eam1105I, mis lõikab HPV-18 E8⁻ genoomi kaheks: tekivad 5 kbp (TERM) ja 2,9 kbp (ORI) pikkused fragmendid, mille valikuliseks detekteerimiseks kasutati hübriidisatsiooniproovina vastavalt URR (ORI proov) või E2 lugemisraami (TERM proov) järjestust (joonis 12A) (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.8).



Joonis 12. Endonukleaasi Eam1105I restriksioonil tekkinud RI-de analüüs. (A) Joonisel on kujutatud HPV-18 genoomi, millel on märgitud restriktiooni Eam1105I lõikesaidid, restriksiooni tagajärjel tekkivad fragmendid ning hübriidisatsiooniproovina kasutatavad järjestused. (B) Skeemil on lihtsustatult kujutatud *theta* replikatsioonile omaste struktuuride liikumine agarosgeelis. (C) Erinevat värvi nooled tähistavad järgmist: sinine – mullistruktuur, roheline – Y-struktuur, roosa – dY-struktuur, kollane ja pruun – *theta* replikatsioonile mitteomased struktuurid. Piltide äärtes on välja toodud DNA suurusmarkerid (10 tähistab 10 000 bp suurust fragmenti jne). U2OS rakkudesse sisestati elektroporatsiooni meetodil 1 µg HPV-18 E8⁻ DNA koos kandja DNA-ga. Kolmandal päeval pärast transfektsiooni eraldati Hirt lüüsi meetodil rakkudest episomaalne DNA, mille lineariseerimiseks kasutati endonukleaasi Eam1105I. Eam1105I lõikuse tagajärjel tekivad 5 kbp (TERM fragment) ja 2,9 kbp (ORI fragment, sisaldab replikatsiooni *origin*'i) suurused fragmendid, millelt lähtuvate repliatsiooni intermediaatide lahutamiseks kasutati 2D geelelektroforeesi meetodit. Tulemused visualiseeriti *Southern blot* meetodil. Hübridisatsiooniproovina kasutati E2 lugemisraami (TERM proov) või URR piirkonna (ORI proov) järjestust. ORI ja TERM fragmendi piltide all on välja toodud replitseeruvate molekulide lineariseermisel Eam1105I-ga tekkivad struktuurid.

Kuigi endonukleaasi Eam1105I lõikesaidid ei asu URR piirkonnast eriti kaugel, peaks kahe-suunalise replikatsiooni toimumise korral HPV replikatsiooni alguskohta sisaldava nn ORI fragmendi (2,9 kbp) analüüsil näha olema mullistruktuurid. Lisaks peaks replikatsioonikahvlite edasiliikumisel esinema nn TERM fragmendis (5 kbp) teineteisele

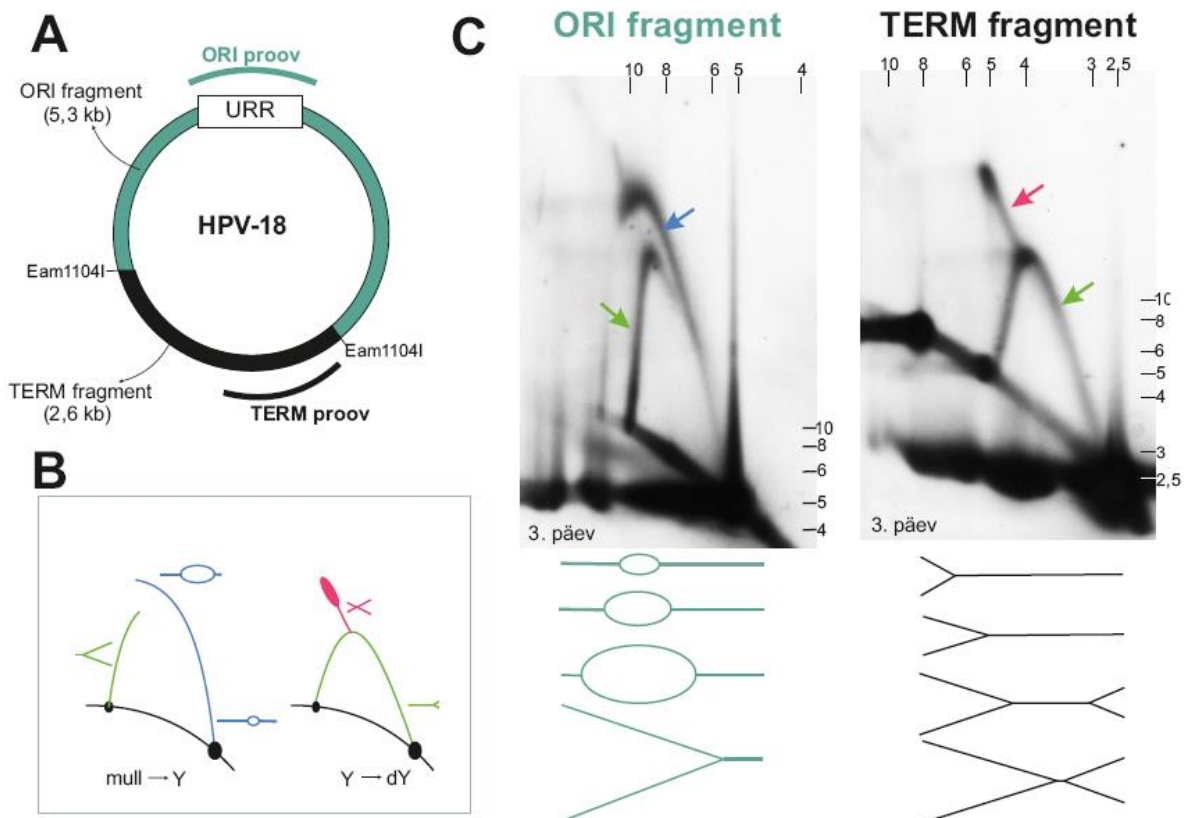
lähenevad replikatsioonikahvlid ehk dY struktuurid, sest TERM fragment sisaldab replikatsiooni alguskoha vastas asuvat piirkonda, kus peaks *theta* replikatsiooni toimumise korral aset leidma vastassuundades liikuvate replikatsioonikahvlite kokkujooksmine.

Nagu ilmneb jooniselt 12C, esinevad HPV-18 E8⁻ replikatsiooni intermediaatide seas mõlemad *theta* replikatsioonile iseloomulikud struktuurid. ORI fragmendi analüüsil on võimalik tuvastada replikatsioonimulli olemasolu (sinine nool). TERM fragmendi korral on näha, et toimub replikatsioonikahvlite lähenemine (dY, roosa nool). dY kaare tipus liiguvad intermediaadid, mis molekulmassi järgi esindavad dimeerseid ehk peaaegu lõpetatud replikatsiooniga, kuid monomeerideks lahutamata molekule, annavad analüüsil tugeva signaali, mis võib tähendada, et rakus toimub nende intermediaatide kuhjumine. Lisaks on ORI fragmendi puhul näha ka Y-struktuuriga molekule (roheline nool), mis tekivad Eam1105I restriksioonisaitide ebasümmeetrilise paiknemise tõttu replikatsiooni algukoha suhtes. Kui üks replikatsioonikahvlitest jõuab enne lõikesaidini kui teine lõigatakse replikatsioonimull ühelt poolt katki ning tekivad Y-struktuurid. Samuti esineb TERM fragmendi pildil *theta* replikatsioonile mitteomaseid struktuure (pruun ja kollane nool), kuid millega täpselt tegu, pole hetkel teada.

Eam1105I restriksioonianalüüsi põhjal võib järeldada, et HPV-18 transientne replikatsioon U2OS rakkudes toimub vähemalt osaliselt *theta* mehhanismi kaudu, kuna joonisel 12C esinevad kahesuunalisele replikatsioonile iseloomulikud struktuurid: mulli- ja dY-struktuurid.

Et kinnitada *theta* replikatsiooni toimumist ning selgitada täpsemalt, kus toimub replikatsioonikahvlite termineerumine, viidi läbi endonukleaasi Eam1104I lõikusel tekkinud fragmentide 2D analüüs. Katsetingimused olid samad, mis Eam1105I fragmentide analüüsil.

Nagu endonukleaas Eam1105I, lõikab ka Eam1104I HPV-18 E8⁻ genoomi kaheks fragmendiks, kuid replikatsiooni algukohast kaugemalt (lõikesaidid asuvad E1 ja L1 lugemisraami lõpus), nii et URR piirkonda sisaldav fragment on seekord 5,3 kbp (ORI fragment) ja *origin*'i vastas olev fragment 2,6 kbp suurune (TERM fragment) (joonis 13A).



Joonis 13. Endonukleaasi Eam1104I restriksioonil tekkinud RI-de analüüs. (A) HPV-18 genoomil on näidatud Eam1104I lõikekohad, tekkivate DNA fragmentide suurused ning hübridisatsiooniproovina kasutatavad järjestused. (B) Skeemil on näidatud *theta* replikatsioonile omaste intermediaatide liikumine agarosgeelis sõltuvalt nende kujust. (C) Erinevat värvi nooled tähistavad järgmist: sinine – mullistruktuur, roosa – dY-struktuur, roheline – Y-struktuur. Piltide äärtes on välja toodud DNA suurusmarkerid (10 tähistab 10 000 bp suurust jne) (Naxo). U2OS rakkudesse sisestati elektroporatsiooni meetodil 1 µg HPV-18 E8⁺E2⁻ DNA-d koos kandja DNA-ga. Kolme päeva möödudes transfektsioonist eraldati rakkudest madalmolekulaarne DNA Hirt lüüsi meetodil. HPV-18 E8⁻ DNA lineariseeriti, kasutades endonukleaasi Eam1104I. Restriksiooni tagajärjel tekivad kaks eri suurusega fragmenti (2,6 ja 5,3 kbp suurused), mille analüüsimiseks kasutati 2D geelelektroforeesi ja *Southern blot* meetodit. Hübridisatsiooniproovina kasutati E2 lugemisraami (TERM proov) või URR piirkonna (ORI proov) järjestust. ORI ja TERM fragmendi piltide all on välja toodud replitseeruvate molekulide lineariseermisel endonukleasiga Eam1104I tekkivad struktuurid.

Eam1104I restriksioonianalüüsi käigus ilmnisid samuti *theta* replikatsioonile iseloomulikud struktuurid. ORI fragmendi analüüsil on näha mullistruktuuride esinemist (joonis 13C, sinine nool) ning restriksionisaitide ebasümmeetrilise paiknemise tõttu mullistruktuuri üleminekut Y-struktuurideks (joonis 13C, roheline nool). TERM fragmendis on võimalik tuvastada dY-struktuure (joonis 13C, roosa nool), mis viitab sellele, et antud fragmendis toimub

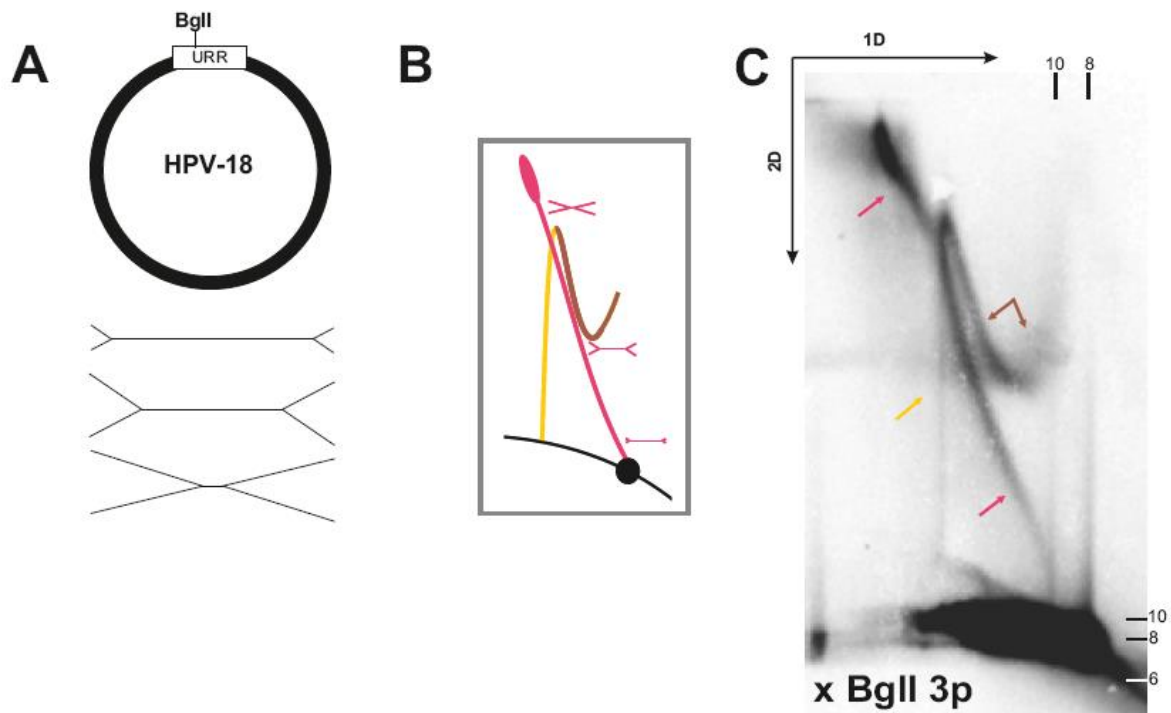
replikatsioonikahvlite kokkusaamine. Lisaks esinevad fragmendi analüüsil ka Y-struktuurid (joonis 13C, roheline nool), mille olemasolu on seletatav Eam1104I lõikekohtade ebasümmeetrilise paiknemisega replikatsioonikahvlite kokkujooksmise piirkonna suhtes.

Antud katsetulemuste põhjal võib väita, et HPV-18 transientne replikatsioon toimub *theta* mudeli kaudu, mille kohaselt initsieeritakse *origin* piirkonnas kaks vastassuundades liikuvat replikatsioonikahvlit (joonis 12C ja 13C, ORI fragment, sinine nool) ning need kohtuvad replikatsiooni alguskoha vastas asuvas 2,6 kbp pikkuses Eam1104I restriksioonil tekkinud DNA fragmendis (joonis 13C, TERM fragment). Täpsema termineerumiskoha väljaselgitamiseks tuleks kasutada restriksiooniensüüme, mis lõikavad 2,6 kbp pikkusest fragmendist välja veel väiksema DNA lõigu.

2.3.3.2 Homoloogilisele rekombinatsioonile spetsiifiliste intermediaatide tuvastamine

Kuna Eam1105I lõikuse korral esinesid lisaks *theta* replikatsioonimehhanismi intermediaatidele ka sellele replikatsioonimehhanismile mitteomaseid struktuure (joonis 12C, kollane ja pruun nool), analüüsiti edasiste eksperimentide käigus lineaarset täispikka HPV-18 E8⁻ genoomi. Selleks kasutati restriksiooniensüüme, millel on ainult üks lõikekoht HPV-18 E8⁻ genoomis (PsyI, XmaJI või BglI). Järgnevad eksperimendid viidi läbi samade katsetingimuste juures, mis eelmisedki (Eam1105I, Eam1104I).

Kõigepealt analüüsiti endonukleaasi BglI lõikamise tagajärjel tekkinud replikatsiooni intermediaate. BglI restriksioonisaht asub replikatsiooni alguskoha lähedal (joonis 14A), mistõttu lõigatakse *origin*'ilt initsieeritud replikatsioonimullid peaaegu kohe katki. Hübridisatsiooniproovina kasutati HPV-18 täispikka genoomi.

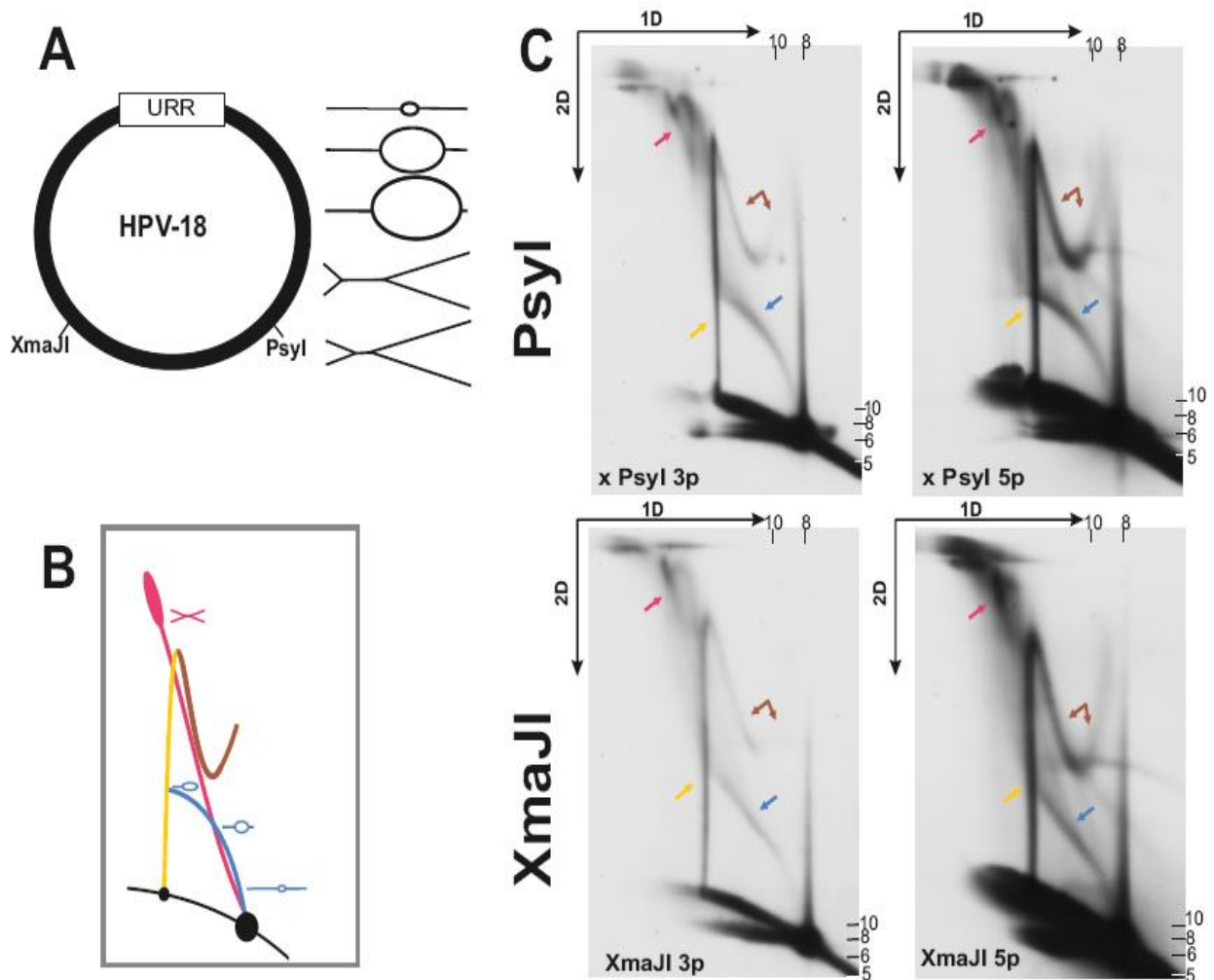


Joonis 14. BglII endonukleasiga lineariseeritud HPV-18 genoomilt lähtuvate RI-de analüüs. (A) Joonisel on näidatud BglII lõikekoht HPV-18 genoomis ning restriktiooni tagajärjel tekkivad struktuurid. (B) Skemaatilisel kujutatud erineva struktuuriga molekulide liikumine agarosgeelis 2D analüüsil. (C) Roosad nooled tähistavad dY-struktuure, kollane nool tähistab homoloogilisele rekombinatsioonile omaseid X-kujulisi ehk HJ-struktuure ning pruunid nooled teadmata struktuure. Pildi kõrval on välja toodud DNA suurusmarkerid (10 tähistab 10 000 kb pikkust fragmenti jne) (Naxo). U2OS rakke transfekteeeriti 1 µg HPV-18 E8⁻ genoomide ja kandja DNA-ga. Kolmandal päeval pärast transfektsiooni eraldati Hirt lüüsi meetodil ekstrakromosomaalne DNA, mille lineariseerimiseks kasutati restriktiooniensüümi BglII. Replikatsiooniintermediaatide analüüsimiseks kasutati 2D geelelektroforeesi ja *Southern blot* meetodit. HPV-18 DNA detekteerimiseks kasutati hübriidatsiooniproovina HPV-18 täispikka genoomi.

BglII restriktioonianalüüsi käigus ilmneseid samuti kahesuunalisele replikatsioonile iseloomulikud dY-struktuurid ning nendest lähtuvad intermediaadid (joonis 14C, roosad nooled), mis ühe hüpoteesi kohaselt võivad tähistada kokkujooksnud replikatsioonikahvelid. Teiste signaalidega võrreldes on nn kokkujooksnud replikatsioonikahvelid esindav signaal märgatavalt tugevam, mis viitab selle intermediaadi akumulatsioonile HPV replikatsiooni käigus. Nendele lisaks esinevad joonisel 14C *theta* replikatsioonimehhanismile mitteomased struktuurid (kollane nool ja ühenduses olevad pruunid nooled). Kirjanduse põhjal võib väita, et 2n lineaarsetest molekulidest lähtuval sirgel (joonis 14C, kollane nool) paiknevad X-kujulised struktuurid, mida tavaliselt seostatakse homoloogilise rekombinatsiooniga (Schvartzman *et al*, 2012). HR-i seotust HPV DNA replikatsiooniga on näidanud ka mitmed autorid. Orav *et al* (2013) tõestasid, et U2OS rakkudes toimuv HPV genoomi

oligomeriseerumine on HR-st sõltuv protsess. Samuti on täheldatud homoloogilises rekombinatsiooniprotsessis osalevate valkude lokaliseerumist HPV replikatsioonitsentrites (Moody ja Laimins, 2009, Gillespie *et al*, 2012). Seega on tõenäoline, et antud signaal esindab *Holliday* ühenduste abil seotud ehk X-kujulisi rekombinantseid HPV DNA molekule, mille liikumine agarosgeelis oleneb molekulide vahelise ühenduskoha ehk neljasuunalise DNA ühenduse paiknemisest (joonis 14B, kollased struktuurid). X-sirgega ühenduses oleval kaarel paiknevate molekulide struktuur (joonis 14C, ühenduses olevad pruunid nooled) on teadmata, kuid võimalik, et tegu on samuti homoloogilise rekombinatsiooniga seotud intermediaatidega, kuna nendest lähtuvad HJ-ga ühendatud molekulid. Kuna antud kaarel paiknevate molekulide molekulmass kasvab, on ilmselt tegemist replitseeruvate molekulidega. Kirjandusest pole nende kohta infot leitud.

Et teha kindlaks, kas homoloogilise rekombinatsiooniprotsessi intermediaatide topoloogia on sõltuv restriksiooniensüümi lõikekohast, kasutati HPV-18 genoomi lineariseerimiseks endonukleaase *PsyI* või *XmaJI*, mille lõikesaidid asuvad URR piirkonnast eemal (vastavalt E1 lugemisraami lõpus või L2 lugemisraami alguses). Lisaks analüüsiti kolmandal ja viiendal päeval pärast transfektsiooni eraldatud madalmolekulaarset DNA, et välja selgitada, kas erinevate intermediaatide teke on ajast sõltuv. Hübridisatsiooniproovina kasutati HPV-18 täispikka genoomi.



Joonis 15. Restriktiooniensüümide Psyl ja XmaJI-ga lineariseeritud HPV-18 genoomilt lähtuvate RI-de analüüs. (A) Joonisel on näidatud Psyl ja XmaJI restriktioonisaidid HPV-18 genoomis. Samuti on kõrval välja toodud tekkivad replikatsiooni intermediaadid. (B) Skemaatiline kujutus replikatsiooni intermediaatide liikumisest agaroseel 2D analüüsil. (C) Joonisel olevad erinevat värvi nooled tähistavad järgmist: sinine – mullistruktuur, kollane – X-kujulised molekulid, roosa – dY struktuurid, pruunid nooled – teadmata struktuurid. Piltide kõrval on välja toodud lineaarse DNA suurusmarkerid (10 tähistab 10 000 bp pikkust DNA fragmenti jne) (Naxo). U2OS rakke transfekeeriti 1 µg HPV-18 E8⁻ genoomide ja kandja DNA-ga. Kolme ja viie päeva (joonisel vastavalt 3p või 5p) pärast eraldati rakkudest episomaalne DNA Hirt lüüsi meetodil. Seejärel lineariseerit HPV-18 DNA kas Psyl või XmaJI restriktiooniensüümi kasutades ning analüüsiti 2D geelelektroforeesi ja *Southern blot* meetodil. Hübridisatsiooniproovina kasutati HPV-18 täispikka genoomi.

Nii Psyl kui ka XmaJI restriktioonanalüüsi korral esinevad mullistruktuurid (joonis 15C, sinised nooled), kuna antud endonukleaside lõikekohad asuvad URR piirkonnast eemal. Kui üks replikatsioonikahvlitest on jõudnud restriktioonisaidist kaugemale liikuda, tekivad teineteisele lähenevaid replikatsioonikahvleid tähistavad struktuurid, mis lõpuks kohtuvad

(joonis 15C, roosad nooled). Arvatavate kokkujooksunud replikatsioonikahvleid esindavate struktuuride signaal on antud analüüsil tunduvalt nõrgem kui BglI endonukleasiga lõigatud HPV-18 E8⁻ genoomide korral ning lisaks on signaali kuju märgatavalt erinev. Kuna nii PsiI kui ka XmaJI restriksioonisaunid asuvad arvatava replikatsioonikahvlite kokkujooksmise piirkonna suhtes tunduvalt lähemal kui endonukleas BglI lõikekoht, võib see olla signaali kuju muutumise üheks põhjuseks. Samuti on võimalik, et antud analüüsil ilmnevad struktuurid ei esinda monomeersete genoomide replikatsioonikahvlite kokkusaamist, vaid hoopis oligomeersete HPV DNA molekulide replitseerumisel termineeruvaid replikatsioonikahvleid. U2OS mudelsüsteemi kirjeldavas artiklis on näidatud, et nn pea-saba orientatsioonis olevate oligomeersete HPV genoomide replikatsioonil on aktiivne vaid üks replikatsiooni *origin* piirkond (Geinamen *et al*, 2011). Selisel juhul toimub dimeerse HPV molekuli replikatsioonikahvlite kokkujooksmine aktiivse *origin*'i vastas olevas inaktiveeritud *origin*'iga URR piirkonnas. Kui kirjeldatud dimeerset molekuli PsiI või XmaJI restriksiooniensüümiga lõigata, tekivad sarnased molekulid nagu monomeerse genoomi puhul BglI endonukleasi kasutades.

Samuti on näha jooniselt 15C X-kujuga molekule (kollased nooled) ning seni tuvastamata struktuure (ühenduses olevad pruunid nooled), mis võivad olla homoloogilise rekombinatsiooniprotsessi intermediaadid, millest tekivad lõpuks HJ-ga ühendatud molekulid. Nimetatud intermediaatide kaar erinevate endonukleasidega lõikamisel ei muutu, mis tähendab, et ükskõik millisest positsioonist HPV-18 E8⁻ täispikka genoomi lineariseerida, nende intermediaatide topoloogia säilib. Kuigi ajas toimub üldine replikatsioonisignaali tugevnemine, siis vähemalt selle katse käigus erinevate intermediaatide osakaal aja jooksul ei muutu (joonis 15C).

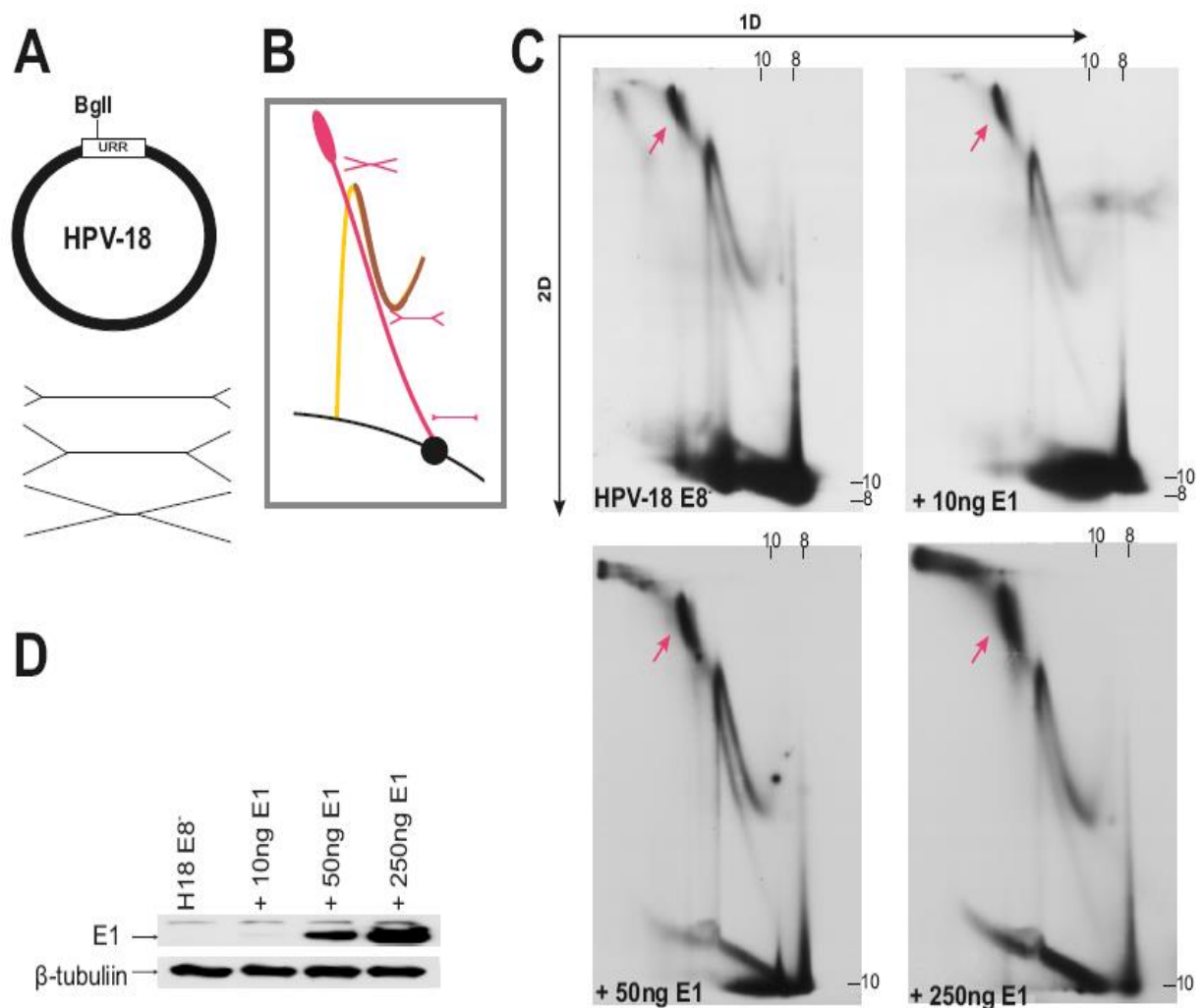
Uurides erinevatelt HPV-18 E8⁻ genoomi fragmentidelt lähtuvaid replikatsiooni intermediaate, võib järeldada, et viiruse genoomi paljundamises osaleb mitu erinevat replikatsioonimehhanismi. Juba 1997. aastal kirjeldatud *theta* replikatsiooni kõrval osaleb protsessis ka seni teadmata, kuid tõenäoliselt rekombinatsiooniga seotud replikatsioonimehhanism. Ühe hüpoteesi kohaselt on homoloogilise rekombinatsiooni sihtmärgiks *theta* replikatsiooni peaaegu täielikult replitseerunud, kuid lahutamata intermediaadid (joonis 15C, roosad nooled), mis peremeesrakus arvatavasti akumulatsioonid. Kui replikatsioonikahvlid on kokku jooksnud ning nende edasiliikumine on seetõttu takistatud, võib toimuda nende kollabeerumine, mis viib DNA kaheahelaliste katkete tekke ning DNA kahjustuse vastase indutseerimiseni. Et tekkinud DNA kahjustus kõrvaldada, aktiveeritakse rakus homoloogiline rekombinatsioon (peatükk 1.6.1). On võimalik, et

kaheaheelaliste DNA katke parandamise käigus kaasatakse HR masinavärk ka viiruse genoomi replikatsiooni. Kirjeldatud protsessi üheks tulemuseks oleks ka oligomeersete DNA molekulide tekkimine. Antud juhul on tegemist siiski ainult hüpoteesiga, mille paikapidavust tuleb veel tõestada.

2.3.4 HPV replikatsioonivalkude E1 ja E2 mõju replikatsiooni intermediaatidele

HPV kasutab oma genoomi paljundamiseks peremeesraku replikatsiooni masinavärki. Viirusvalkudest on transientseks replikatsiooniks vajalikud ainult E1 ja E2 (peatükk 1.3.1 ja 1.4.3). Arvestades nende kahe valgu keskset tähtsust HPV replikatsioonil, uuriti viiruse E1 ja E2 valgu mõju U2OS rakkudes esinevatele replikatsiooni intermediaatidele, tiitrides HPV-18 E8⁻ genoomile juurde E1 (joonis 17) või E2 valku (joonis 18) ekspresseerivaid vektorid (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.1).

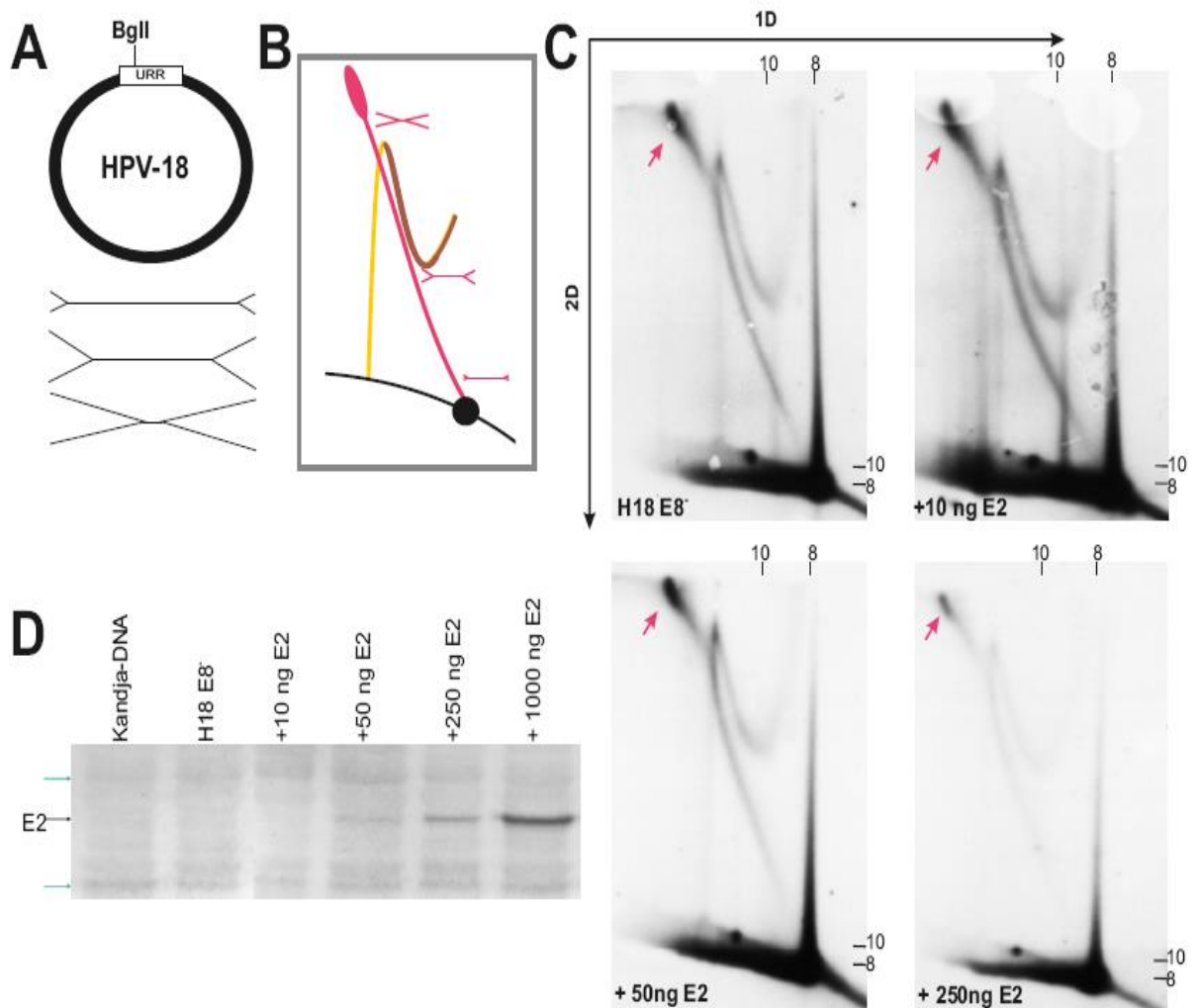
Selleks transfekteeriti U2OS rakke 1 µg HPV-18 E8⁻ genoomi, kandja DNA ning erinevate E1 või E2 ekspressioonivektorite kogustega (10, 50 või 250 ng). Kolmandal päeval pärast transfektsiooni eraldati Hirt lüüsi meetodil madalmolekulaarne DNA, mille lineariseerimiseks kasutati restriksiooniensüümi BglI. Tekkinud fragmendid lahutati 2D geelektroforeesil ning analüüsiti *Southern blot* meetodil. Hübridisatsiooniproovina kasutati URR piirkonna järjestust, et detekteerida ainult täispika HPV-18 E8⁻ genoomi replikatsiooni intermediaate (E1 ja E2 ekspressioonivektorites URR järjestus puudub). Samuti analüüsiti ekspressioonivektoritelt sünteesitud E1 või E2 valgu taset *Western blot* meetodil, kasutades E1 korral peroksüdaasiga (HRP ehk *horseradish peroxidase*) konjugeeritud antikeha (3F10) ning E2 valgu puhul E2 vastast hiire monoklonaalset antikeha (E27.1) (Materjal ja meetodika, peatükk 2.2.9).



Joonis 16. E1 valgu mõju HPV replikatsiooni intermediaatidele. (A) Joonisel on näidatud BglI lõikekoht ning restriktiooni tagajärjel tekkivad struktuurid. (B) Skemaatilisel kujutatud erinevate struktuuridega molekulide liikumine agarosgeelis 2D analüüsil. (C) Roosa nool tähistab kokkujooksnud replikatsioonikahvleid. Piltide kõrval on välja toodud lineaarse DNA suurusmarkerid (10 tähistab 10 000 bp pikkust DNA fragmenti jne) (Naxo). Piltide all vasakus nurgas on välja toodud transfekteritud E1 ekspressioonivektorite kogus. U2OS rakke transfekteriti 1 µg HPV-18 E8 genoomide, kandja DNA ning E1 ekspressioonivektoriga (kolm erinevat kontsentratsiooni: 10, 50, 250 ng) elektroporatsiooni meetodil. Kolmandal päeval pärast tranfektsiooni eraldati rakkudest ekstrakrosomaalne DNA ning lineariseeriti BglI ensüümi kasutades. Tekkinud intermediaatide analüüsimiseks kasutati 2D geelelektroforeesi meetodit ning tulemused visualiseeriti *Southern blot* meetodil, kasutades hübriidsatsiooniproovina URR piirkonna järjestust. (D) E1 konstruktidelt ekspresseeritud E1 valgu taseme detekteerimiseks kasutati *Western blot* meetodit. E1 tähistab ekspressioonivektoritelt sünteesitud E1 valgu asukohta pildil, β-tubuliini signaali abil on võimalik veenduda, et analüüsitud proovid sisaldasid ligikaudselt võrdset kogust totaalset valku. E1 ekspressioonivektoritesse on viidud gripiviiruse hemagglutiniini (HA) epitoobi märgis (*tag*), mille abil on võimalik detekteerida ainult vektoritelt sünteesitud E1 valgu taset, kasutades HA-*tag*'i vastast antikeha (3F10-HRP).

Joonis 16D tõestab, et U2OS rakkudes sisestatud E1 ekspressioonivektorilt toimus E1 valgu süntees sõltuvalt transfekteeritud vektori kogusest. E1 valgu mõju HPV replikatsiooniintermediaatidele oli aga piiratud. E1 valgu kontsentratsiooni suurenedes ei olnud enamike intermediaatide puhul võimalik tuvastada nende signaali intensiivsuse tõusu ega langust. Ainsaks erandiks on peaaegu lõpuni replitseerunud, kuid lahutamata *theta* replikatsiooni intermediaadid, mille signaal muutub kõrgemate E1 ekspressioonivektori kontsentratsioonide juures tugevamaks (joonis 16C, roosad nooled). Samuti on märgata kõrgemate E1 valgu tasemete juures (50, 250 ng) kõrgel liikuvate lõikamata struktuuride signaali tugevnemist. Tegemist võib olla nn sibulakoore-tüüpi replikatsiooni intermediaatidega, mis tekivad E1 valgu kõrgel tasemel, kui toimub uue replikatsioonitsükli initsieerimine *origin* piirkonnast enne, kui sellele eelnev replikatsioon on lõpetatud. Tegemist ei ole papilloomiviiruste loomupärasele infektsioonitsükli omase replikatsioonimehhanismiga (Männik *et al*, 2002, Kadaja *et al*, 2007). Kirjeldatud replikatsiooni käigus tekivad mitut replikatsioonimulli sisaldavad struktuurid, mida restriksiooniensüümid ei suuda efektiivselt lõigata.

Samuti analüüsiti HPV E2 replikatsioonivalgu mõju viiruse genoomilt lähtuvatele replikatsiooni intermediaatidele. Katse põhimõte sarnaneb eelmise eksperimendiga.



Joonis 17. E2 valgu mõju HPV replikatsiooni intermediaatidele. (A) Joonisel on näidatud BglII lõikekoht ning restriksiooni tagajärjel tekkivad struktuurid. (B) Skemaatiliselt on kujutatud replikatsiooni intermediaatide liikumine agaroseelil 2D analüüsil. (C) Roosa nool tähistab kokkujooksnud replikatsioonikahvleid. Piltide kõrval on välja toodud lineaarse DNA suurusmarkerid (10 tähistab 10 000 bp pikkust DNA fragmenti jne) (Naxo). Piltide all vasakus nurgas on välja toodud transfekeeritud E2 ekspressioonivektorite kogus. U2OS rakke transfekeeriti 1 μ g HPV-18 E8⁻ genoomide, kandja DNA ning E2 ekspressioonivektoritega (kolm erinevat kontsentratsiooni: 10, 50, 250 ng) elektroporatsiooni meetodil. Kolmandal päeval pärast tranfektsiooni eraldati rakkudest ekstrakromosomaalne DNA, mis lineariseeriti BglII ensüümi kasutades. Tekkinud intermediaatide analüüsimiseks kasutati 2D geelelektroforeesi meetodit ning tulemused visualiseeriti *Southern blot* meetodil, kasutades hübridisatsiooniproovina URR piirkonna järjestust. (D) E2 konstruktidelt ekspresseeritud E2 valgu taseme detekteerimiseks kasutati *Western blot* meetodit. E2 tähistab ekspressioonivektoritelt sünteesitud E2 valgu asukohta pildil, rohelised nooled tähistavad antikeha (2E7.1) ebaspetsiifilist seondumist, mille põhjal võib järeldada, et analüüsitud proovid sisaldavad ligikaudu võrdset kogus totaalset valku.

Jooniselt 17D on näha, et E2 ekspresioonivektorilt sünteesitud E2 tase tõuseb sõltuvalt U2OS rakkudesse viidud vektori kogusest. Sarnaselt E1 ekspresioonivektori juurde lisamise korral HPV-18 E8⁻ genoomidele mõjutas E2 valgu kõrgem kontsentratsioon peremeesrakus spetsiifiliselt ainult *theta* replikatsioonil kokkujooksnud replikatsioonikahvleid sisaldavat intermediaati (joonis 18C, 10 ng, roosad nooled). Kõrgematel kontsentratsioonidel toimib E2 kui üldine HPV replikatsiooni inhibiitor. See võib olla põhjustatud sellest, et E2 valgu taseme tõustes toimib see kui viiruse varajaste lugemisraamide transkriptsiooni repressor (peatükk 1.4.3) (Steger ja Corbach, 1997), mille tõttu varajasi valke (s.h E6, E7, E1) sünteesitakse väga madalal tasemel või üldse mitte. Samuti on näidatud, et E2 valk on võimeline indutseerima peremeesraku minemist apoptoosi (Desaintes *et al*, 1999, Thierry ja Demeret, 2008).

Läbiviidud eksperimentide tulemuste põhjal võib järeldada, et E1 või E2 valgutaseme tõus omab märgatavat mõju ainult *theta* replikatsiooni peaaegu täielikult replitseeritud, kuid lahutamata tüärmolekule sisaldavale intermediaadile. See tulemus ühtlasi kinnitab antud intermediaadi olemust. HPV *theta* replikatsiooniga mitteseotud intermediaatide hulka E1 ja E2 valgu suurenenud tase ei muuda. Juhul kui tegu on tõesti homoloogilise rekombinatsiooniga seotud replikatsiooni intermediaatidega, on antud tulemus ootuspärane, kuna HR puhul on tegemist ainult rakuliste valkude poolt läbiviidava protsessiga. Samas ei välista sooritatud katsed täielikult E1 või E2 valgu osalemist homoloogilise rekombinatsiooni masinavärgi toomisel viiruse genoomile analoogselt E1 valgu osalemisel DNA replikatsioonikompleksi värbamisel *theta*-tüüpi replikatsiooni korral.

KOKKUVÕTE

Antud magistritöö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse HPV-de mitmekesisust looduses, keratinotsüütide diferentseerumisest sõltuvat viiruse elutsükli ja selle käigus aset leidvaid replikatsioonifaase. Samuti antakse lühike ülevaade homoloogilisest rekombinatsioonist sõltuva HPV genoomi oligomerisatsiooniprotsessist ning meie uurimisrühma poolt HPV DNA replikatsiooni uurimiseks kasutatavast U2OS rakuliinil põhinevast mudelsüsteemist.

Magistritöö eksperimentaalses osas keskendutakse HPV-18 genoomi molekulaarse staatuse kirjeldamisele U2OS rakkudes ja transientse replikatsiooni käigus tekkivate intermediaatide analüüsimisele 2D geelelektroforeesi meetodit kasutades. Transientse replikatsiooni intermediaatide analüüsil kasutatakse HPV-18 E8⁻ DNA-d, mida iseloomustab märgatavalt efektiivsem replitseerumisvõime metsiktüüpi HPV-18-ga võrreldes. Läbiviidud eksperimentide käigus jõuti järgmiste järeldusteni:

- HPV-18 DNA esineb U2OS rakkudes peamiselt ekstrakromosomaalsete tsirkulaarsete oligomeeridena;
- HPV-18 E8⁻ transientse replikatsiooni käigus tekivad *theta* replikatsioonile omased intermediaadid (olenevalt analüüsitavast fragmendist esinevad nulli- ja dY-struktuurid);
- replikatsiooni *origin* järjestuselt initsieeritakse kaks vastassuundades liikuvat replikatsioonikahvlit, mis kohtuvad replikatsiooni alguskoha vastas asuvas 2,6 kbp suuruses Eam1104I restriksioonil tekkinud DNA fragmendis;
- lisaks ilmnevad transientse replikatsiooni käigus *theta* replikatsioonile mitteomased struktuurid, mis on arvatavasti homoloogilise rekombinatsiooniprotsessi intermediaadid;
- viiruslike replikatsioonivalkude E1 või E2 taseme tõus mõjutab *theta* replikatsioonile omaseid struktuure, *theta* replikatsiooniga mitteseotud intermediaatide hulka E1 või E2 valgu suurenenud tase ei muuda.

Analysis of the transient replication intermediates of Human papillomavirus type 18 in the U2OS cell line

Eva-Maria Sepp

RÉSUMÉ

Human papillomaviruses (HPVs) are small DNA viruses that infect the epithelial keratinocytes. Papillomavirus infections are very common in the general population and usually clear on their own in immunocompetent individuals without causing any severe disease. Some HPV types, however, which are referred to as high-risk types, have been recognized as the causative agents of head and neck, and anogenital cancers. Cervical carcinoma is the second most common cancer among women worldwide. Hence, it is important to understand the molecular mechanisms of HPV DNA replication and signalling pathways leading to malignant progression in order to develop new antiviral drugs.

The life cycle of HPVs is associated with the differentiation of their host cells keratinocytes. There are three modes of replication in the HPV life cycle. Upon entry, the viral genome is amplified up to ~50-100 copies per cell during the initial transient replication phase. In the second, maintenance phase, the viral genome copy number is maintained at a constant level, replicating approximately once per cell cycle. The final vegetative amplification occurs in the terminally differentiated keratinocytes, where HPV amplifies its genome up to ~1000 copies per cell and produces virions. Mimicking all the three stages of human papillomavirus life cycle under laboratory conditions is extremely difficult.

The papillomavirus research group at Tartu University Institute of Technology has developed a cellular model system based on the U2OS cell line to study HPV replication. This Master's thesis concentrates on the analysis of transient replication of the HPV-18 genome in the U2OS cell line. The results obtained during this study indicate that HPV-18 genomes primarily exist as circular, oligomeric, episomal molecules in the U2OS cell line. Also, we have detected that two different types of replication intermediates arise during the transient amplificational replication of the human papillomavirus genomes. The intermediates are characteristic to theta replication and a yet unknown secondary replication mechanism. We do have reason to believe that the second replication mechanism might involve homologous recombination.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Angeletti, P. C., Kim, K., Fernandes, F. J., Lambert, P. F. (2002) Stable replication of papillomavirus genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol* 76(7):3350-8.
- Arend, Ü., Kärner, J., Kübar, H., Pöldvere, K. 1994. *Üldhistoloogia*, lk 93-95. Valgus, Tallinn.
- Badaracco, G., A. Venuti, A. Di Lonardo, G. Scambia, S. Mozzetti, P. Benedetti Panici, S. Mancuso, and M. L. Marcante. (1998) Concurrent HPV infection in oral and genital mucosa. *J Oral Pathol Med* 27: 130-134.
- Bernard, H-U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H., *et al.* (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401: 70–79.
- Bousarghin, L., Touzé, A., Sizaret, P-Y., Coursaget, P. (2003) Human Papillomavirus Types 16, 31, and 58 Use Different Endocytosis Pathways To Enter Cells. *J Virol* 77 (6): 3846-3850.
- Bouvard V., Storey A., Pim D., Banks L. (1994) Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *Embo J* 13: 5451-9.
- Boyer, S. N., Wazer, D. E., Band, V. (1996) E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56(20): 4620–4624.
- Brentjens, M. H., Yeung-Yue, K. A., Lee, P. C., Tyring, S. K. (2002) Human papillomavirus: a review. *Dermatologic clinics* 20: 315-331.
- Brewer, B. J, Fangman, W. L. (1987) The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* 51:463-471.
- Broker, T. R., Jin, G., Croom-Rivers, A., Bragg, S. M., Richardson, M., Chow, L. T., Vermund S. H., Alvarez, R. D., Pappas, P. G., Squires, K. E., Hoesley C. J. (2001) Viral latency — the papillomavirus model. *Dev Biol* 106: 443–451.
- Chiang, C. M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T. F., Broker, T. R., Chow, L. T. (1992) Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13): 5799–5803.

- Conger, K. L., Liu, J. S., Kuo, S. R., Chow, L. T., Wang, T. S. (1999) Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 274(5):2696-705.
- Cullen, A. P., Reid, R., Campion, M. and Lörincz, A. T. (1991) Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *Journal of Virology* 65(2): 606-612.
- Dasgupta, S., Zabielski, J., Simonsson, M., Burnett, S. (1992) Rolling-circle replication of a high-copy BPV-1 plasmid. *J Mol Biol* 228: 1–6.
- Day, P. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T. (2003) Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 307(1): 1-11.
- Day, P. M., Baker, C. C., Lowy, D. R., Schiller, J. T. (2004) Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14252–14257.
- Desaintes, C., Goyat, S., Garbay, S., Yaniv, M., Thierry, F. (1999) Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene* 18: 4538–4546.
- de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.-U., zur Hausen, H. (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17-27.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., Crawford, L. (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352: 824-827.
- Doorbar, J. (2005) The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32S: S7–S15.
- Doorbar, J. (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* 110: 525-541.
- Egawa, K. (2003) Do human papillomaviruses target epidermal stem cells? *Dermatology* 207: 251–254.
- Egawa, N., Nakahara, T., Ohno, S., Narisawa-Saito, M., Yugawa, T., Fujita, M., Yamato, K., Natori, Y., Kiyono, T. (2012) The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol* 86(6): 3276-83.

- Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K., McMillan, N. A. (1997) Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 71(3): 2449-2456.
- Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O., Orth, G. (1977) Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J Virol* 21(3): 1205-1209.
- Flores, E. R., Lambert, P. F. (1997) Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *Journal of Virology* 71(10): 7167-7179.
- Fradet-Turcotte, A., Moody, M., Laimins, L. A., Archambault, J. (2010) Nuclear Export of Human Papillomavirus Type 31 E1 Is Regulated by Cdk2 Phosphorylation and Required for Viral Genome Maintenance. *J Virol* 84(22): 11747–11760.
- Fradet-Turcotte, A., Bergeron-Labrecque, F., Moody, C. A., Lehoux, M., Laimins, L. A., Archambault, J. (2011) Nuclear accumulation of the papillomavirus E1 helicase blocks S-phase progression and triggers an ATM-dependent DNA damage response. *Journal of virology* 85: 8996-9012.
- Forslund, O. (2007) Genetic diversity of cutaneous human papillomaviruses. *J Gen Virol* 88(10): 2662-2669.
- Fuchs, E. (2008) Skin stem cells: rising to the surface. *The Journal of Cell Biology* 180(2): 273-284.
- Gage, J. R., Meyers, C. *et al.* (1990) The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol* 64(2): 723-30.
- Geimanen, J., Isok-Paas, H., Pipitch, R., Salk, K., Laos, T., Orav, M., Reinson, T., Ustav, M. Jr., Ustav, M., Ustav, E. (2011) Development of a cellular assay system to study the genome replication of high- and low-risk mucosal and cutaneous human papillomaviruses. *J Virol* 85: 3315–3329.
- Gillespie, A. K., Kavi, P. M., Laimins, L. A., Moody, C. A. (2012) Human Papillomaviruses Recruit Cellular DNA Repair and Homologous Recombination Factors to Viral Replication Centers. *J Virol* 86(17): 9520-9526.

- Giri, I., Yaniv, M. (1988) Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J* 7: 2823-2829.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E., Sapp, M. (2001) Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75: 1565–1570.
- Giuliano, A. R., Tortolero-Luna, G., Ferrer, E., Burchell, A. N. *et al.* (2008) Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions. *Vaccine* 26S: K17-K28.
- Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K. U., Iftner, T. (1996) Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *Journal of Virology* 70 (4): 2339–2349.
- Guirouilh-Barbat, J., Wilhelm, T., Lopez, B. S. (2010) AKT1/BRCA1 in the control of homologous recombination and genetic stability: the missing link between hereditary and sporadic breast cancers. *Oncotarget* 1(8): 691-699.
- Hoffmann, R., Hirt, B., Bechtold, V., Beard, P., Raj, K. (2006) Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. *Journal of Virology* 80(9): 4431-4439.
- Ilves, I., Kivi, S., Ustav, M. (1999) Long-Term Episomal Maintenance of Bovine Papillomavirus Type 1 Plasmids Is Determined by Attachment to Host Chromosomes, Which Is Mediated by the Viral E2 Protein and Its Binding Sites. *J Virol* 73(5): 4404-4412.
- Kabsch, K., Alonso, A. (2002) The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol* 76: 12162–12172.
- Kadaja, M., Sumerina, A., Verst, T., Ojarand, M., Ustav, E., Ustav, M. (2007) Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *EMBO J.* 2007 26(8):2180-91.
- Kadaja, M., Silla, T., Ustav, E., Ustav, M. (2009) Papillomavirus DNA replication – From initiation to genomic instability. *Virology* 384(2): 360-386.
- Kennedy, I. M., Simpson, S., Joan C. M., Macnab, J. C. M., Clements, J. B. (1987) Human Papillomavirus Type 16 DNA from a Vulvar Carcinoma *in situ* is Present as Head-to-Tail Dimeric Episomes with a Deletion in the Non-coding Region. *J. gen. Virol.* 68: 451-462.

- Khan, S. A. (1997) Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 61(4): 442–455.
- Kim, K., Lambert, P. F. (2002) E1 Protein of Bovine Papillomavirus 1 Is Not Required for the Maintenance of Viral Plasmid DNA Replication. *Virology* 293(1): 10-14.
- Knight, G. L., Grainger, J. R., Gallimore, P. H., Roberts, S. (2004) Cooperation between different forms of the human papillomavirus type 1 E4 protein to block cell cycle progression and cellular DNA synthesis. *J Virol* 78: 13920-13933.
- Kurg, R., Uusen, P., Vosa, L., and Ustav, M. (2010) Human papillomavirus E2 protein with single activation domain initiates HPV18 genome replication, but is not sufficient for longterm maintenance of virus genome. *Virology* 408: 159-166.
- Kurg, R. (2011) The role of E2 proteins in Papillomavirus DNA replication, In: *DNA Replication*, (edited by Seligmann, H.), pp. 613-638.
- Kuzminov, A. (1995) Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 16(3): 373-384.
- Lace, M. J., Anson, J. R., Thomas, G. S., Turek, L. P., Haugen, T. H. (2008) The E8^{E2} Gene Product of Human Papillomavirus Type 16 Represses Early Transcription and Replication but Is Dispensable for Viral Plasmid Persistence in Keratinocytes. *J Virol* 82(21): 10841-10853.
- Li, X., Heyer, W. D. (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 8(1):99-113.
- Lindahl, T., Barnes, D. E. (2000) Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65: 127–134.
- Longworth, M. S., Laimins, L. A. (2004) Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 362-372.
- Loo, Y. M., Melendy, T. (2004) Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* 78: 1605-1615.
- Lorincz, A. T., Reid, R., Jenson, A. B., Greenberg, M. D., Lancaster, W., Kurman, R. J. (1992) Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79(3): 328-337.
- McBride, A. A. (2013) The Papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445: 57-79.

- McLaughlin-Drubin, M. E. and Münger, K. (2009) Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Research* 413: 195-208.
- Meissner, J. D. (1999) Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *Journal of General Virology* 80: 1725-1733.
- Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P., Botchan, M.R. (1990) Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250: 1694–1699.
- Moody, C. A., Laimins, L. A. (2009) Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS Pathog* 5(10): e1000605.
- Moody, C. A., Laimins, L. A. (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10: 550–560.
- Muir, S., Kawana, K., Schust, D. J., Fujii, T., Yokoyama, T., Iwasawa, Y., Nagamatsu, T., Adachi, K., Tomio, A. *et al.* (2010) CD1d, sentinel molecule bringing innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *Journal of Virology* 84(22): 11614-11623.
- Munger, K., Werness, B. A. *et al.* (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *Embo J* 8(13): 4099-105.
- Männik, A., Rünkorg, K., Jaanson, N., Ustav, M and Ustav, E. (2002) Induction of the bovine papillomavirus origin “Onion skin” - type DNA replication at high E1 protein concentrations in vivo. *Journal of Virology* 76(11): 5835-5845.
- Nakahara, T., Peh, W. L., Doorbar, J., Lee, D., Lambert, P. F. (2005) Human papillomavirus type 16 E1^{E4} contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *Journal of Virology* 79(20): 13150-13165.
- Oliveira, J. G., Colf, L. A., McBride, A. A. (2006) Variations in the association of papillomavirus E2 proteins with mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(4): 1047–1052.

- Orav, M., Henno, L., Isok-Paas, H., Geimanen, J., Ustav, M., Ustav, E. (2013) Recombination-Dependent Oligomerization of Human Papillomavirus Genomes upon Transient DNA Replication. *J Virol* 87(22): 12051–12068.
- Park, P., Copeland, W., Yang, L., Wang, T., Botchan, M. R., Mohr, I. J. (1994) The cellular DNA polymerase α -primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8700-8704.
- Pett, M. and Coleman, N. (2007) Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 212: 356-367.
- Piirsoo, M., Ustav, E., Mandel, T., Stenlund, A., Ustav, M. (1996) Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J* 15(1): 1–11.
- Ponten, J. ja Saksela, E. (1967) Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *Int J Cancer* 2(5): 434-447.
- Raj K., Berguerand, S., Southern, S., Doorbar, J., Beard, P. (2004) E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. *J Virol* 78(13): 7199-207.
- Reddout, N., Christensen, T., Bunnell, A., Jensen, D., Johnson, D., et al. (2007) High risk HPV types 18 and 16 are potent modulators of oral squamous cell carcinoma phenotypes in vitro. *Infectious Agents and Cancer* 2: 21.
- Ravnan, J. B., Gilbert, D. M., Ten Hagen, K. G., Cohen, S. N. (1992) Random-choice replication of extrachromosomal bovine papillomavirus (BPV) molecules in heterogeneous, clonally derived BPV-infected cell lines. *J Virol* 66(12): 6946–6952.
- Reinson, T., Toots, M., Kadaja, M., Pipitch, R., Allik, M., Ustav, E., Ustav, M. (2013) Engagement of the ATR-Dependent DNA Damage Response at the Human Papillomavirus 18 Replication Centers during the Initial Amplification. *J Virol* 87: 951-964.
- Roden, R., Kirnbauer, R., Jenson, A. B., Lowy, D., Schiller, J. (1994) Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *Journal of Virology* 68(11): 7260-7266.
- Romanczuk, H., Thierry, F., Howley, P. M. (1990) Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol* 64: 2849–2859.

- Sakakibara, N., Mitra, R., McBride, A. A. (2011) The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci. *Journal of virology* 85:8981-8995.
- Sakakibara, N., Chen, D., McBride, A. A. (2013) Papillomaviruses Use Recombination-Dependent Replication to Vegetatively Amplify Their Genomes in Differentiated Cells. *PLoS Pathog* 9(7): e1003321.
- Sanders, C. M., Stenlund, A. (1998) Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *EMBO* 17(23): 7044–7055.
- Sanders, C. M., Stenlund, A. (2000) Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *J Biol. Chem* 275: 3522–3534.
- Sankovski, E., Männik, A., Geimanen, J., Ustav, E., Ustav, M. (2014) Mapping of Betapapillomavirus Human Papillomavirus 5 Transcription and Characterization of Viral-Genome Replication Function. *J Virol* 88(2): 961-973.
- Scheffner, M., Werness, B. A. *et al.* (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63(6): 1129-36.
- Schwartzman, J. B., Martinez-Robles, M. L., Lopez, V., Hernandez, P., Krimer, D. B. 2012 2D gels and their third-dimension potential. *Methods* 57: 170-178.
- Sedman, J. and A. Stenlund. (1995) Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro. *Embo J* 14(24): 6218-28.
- Sedman, J., Stenlund, A. (1998) The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *Journal of Virology* 72(8): 6893-6897.
- Shiloh, Y. (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer* 3: 155-168.
- Skiadopoulos, M. H., McBride, A. A. (1998) Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J Virol* 72(3):2079-88.
- Snustad, D. P., Simmons M. J. (2012) *Principle of Genetics* 6th ed., p. 227. John Wiley & Sons, Inc., USA, Hoboken.

- 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.
- Stoppler, M. C., Straight, S. W., Tsao, G., Schlegel, R., McCance, D. J. (1996) The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology* 223: 251–254.
- 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. *J Virol* 67(8): 4521–4532.
- Zheng, Z.-M. and Baker, C. C. (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 11: 2286-2302.
- Zhou, J., Stenzel, D. J., Sun, X. Y., Frazer, I. H. (1993) Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles in vitro. *The Journal of general virology* 74(4) 763-768.
- zur Hausen, H. (1977) Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol.* 78: 1-30.
- zur Hausen, H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2(5): 342-350.
- Thierry, F., Demeret, C. (2008) Direct activation of caspase 8 by the proapoptotic E2 protein of HPV18 independent of adaptor proteins. *Cell Death Differ* 15: 1356–1363.
- Thomas, J. T., Oh, S. T., Terhune, S. S., Laimins L. A. (2001) Cellular Changes Induced by Low-Risk Human Papillomavirus Type 11 in Keratinocytes That Stably Maintain Viral Episomes. *Journal of Virology* 75(16): 7564-7571.
- Titolo, S., Welchner, E., White, P. W., Archambault, J.(2003) Characterization of the DNA-Binding Properties of the Origin-Binding Domain of Simian Virus 40 Large T Antigen by Fluorescence Anisotropy. *J Virol* 77(9): 5512–5518.
- Ustav, M., Stenlund, A. (1991) Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO* 10(2): 449–457.
- Van Tine, B. A., Dao, L. D., Wu, S. Y., Sonbuchner, T. M., Lin, B. Y., Zou, N., Chiang, C. M., Broker, T. R., Chow, L. T. (2004) Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein

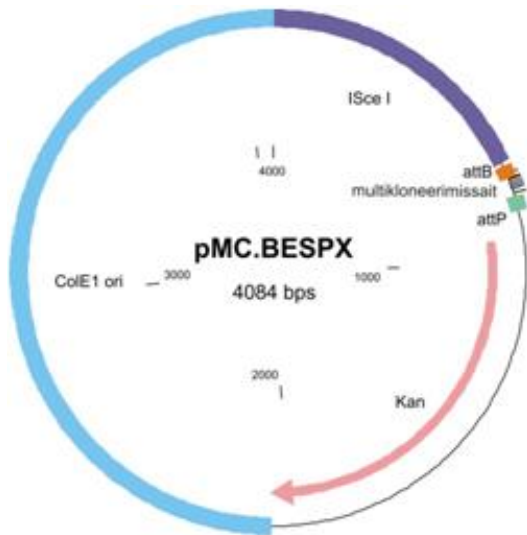
associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(12): 4030-5.

Weyn, C., Vanderwinden, J. M., Rasschaert, J., Englert Y., Fontaine, V. (2011) Regulation of human papillomavirus type 16 early gene expression in trophoblastic and cervical cells. *Virology* 412: 146–155.

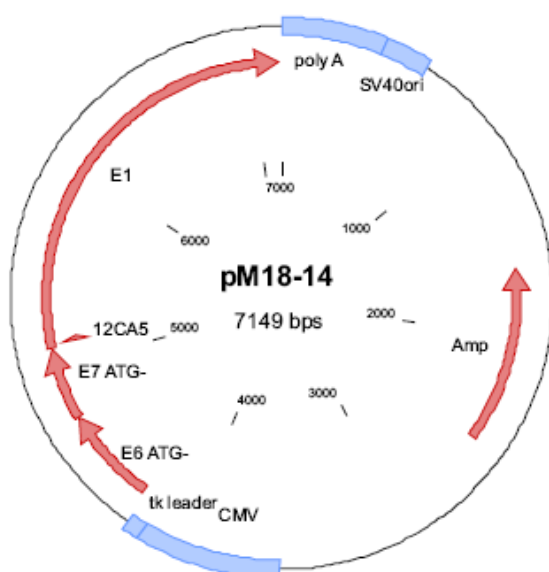
White, P. W., Pelletier, A., Brault, K., Titolo, S., Welchner, E., Thauvette, L., Fazekas, M., Cordingley, M. G., Archambault, J. (2011) Characterization of recombinant HPV6 and 11 E1 helicases: effect of ATP on the interaction of E1 with E2 and mapping of a minimal helicase domain. *J Biol Chem* 276(25): 22426-38.

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(3): 349-360.

LISAD

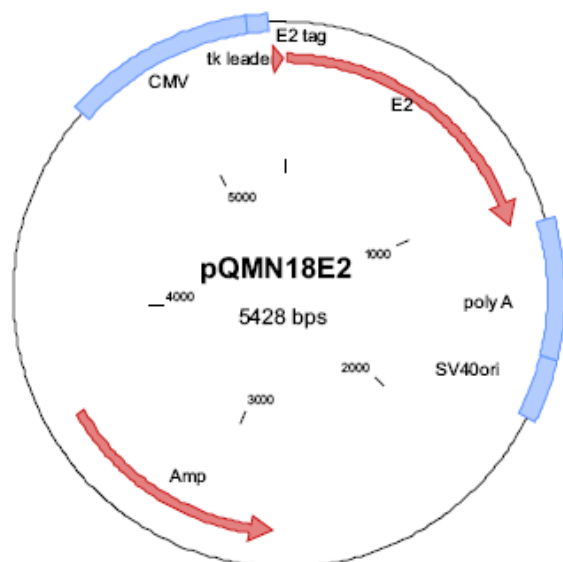


Lisa 1. *Minicircle* genoomide ehk pisirõngaste tootmiseks vajalikke järjestusi sisaldav pMC.BESPX vektor. Joonisel on märgitud bakteriaalse replikatsiooni alguskoht (ColE1 ori), kanamütsiini resistentsusgeen (Kan), endonukleaasi Sce-I restriktioonisaidid (ISceI), bakteriofaag Φ C31 integraasi äratundmisjärjestused attB ja attP ning multikloneerimisjärjestus.



Lisa 2. E1 ekspresioonivektor pM18-14. Plasmidi kaardil on märgitud HPV-18 E1 lugemisraam, start koodoni mutatsiooniga E6 ja E7 ORF-d (vastavalt E6 ATG ja E7 ATG), gripiviiruse

hemaglutiniini (HA) epitoobi märgis (12CA5), 5' mittetransleeritav järjestus (tk leader), tsütomegaloviiruse promooter (CMV), polü-A järjestus (poly A), ampitsiliini resistentsusgeen (Amp) ja Simian viirus 40-e replikatsioon alguskoht (SV40).



Lisa 3. E2 ekspressioonivektor pQMN18E2. Plasmidi kaardil on välja toodud tsütomegaloviiruse promooter (CMV), 5' mittetransleeritav järjestus (tk leader), HPV-18 E2 lugemisraam (E2), mille ees on E2 märgis (E2 tag), polü-A järjestus (poly A), Simian viirus 40-e replikatsioon alguskoht (SV40) ja ampitsiliini resistentsusgeen (Amp).

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Eva-Maria Sepp (29.04.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
**„Inimese papilloomiviiruse tüüp 18 DNA transientse replikatsiooni intermediaatide
analüüs U2OS rakuliinis“**,

mille juhendajad on Ene Ustav, PhD ja Jelizaveta Geimanen, MSc,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **26.05.2017** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014