

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja tehnoloogiavaldkond

Keemia instituut

Mihkel Ugandi

# **Inimese papilloomiviiruse uudsed inhibiitorid**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad: prof. Mati Karelson, PhD

Mart Toots, PhD

Tartu 2016

# Sisukord

<b>Kasutatud lühendid</b> .....	3
<b>1. Sissejuhatus</b> .....	5
<b>2. Kirjanduse ülevaade</b> .....	6
<b>2.1 Inimese papilloomiviiruse üldiseloomustus</b> .....	6
<b>2.2 HPV genoom ja valgud</b> .....	7
<b>2.3 HPV elutsükkel</b> .....	8
<b>2.4 HPV märklauad ja inhibiitorid</b> .....	10
<b>2.4.1 Valgud E1 ja E2</b> .....	10
<b>2.4.2 Valgud E6 ja E7</b> .....	12
<b>2.4.3 Rakulised sihtmärgid -Tdp1 ja PARP1</b> .....	13
<b>3. Metoodika</b> .....	15
<b>3.1 Virtuaalne sõelumine</b> .....	15
<b>3.1.1 QSAR mudeli loomine</b> .....	15
<b>3.1.2 QSAR mudeli kasutamine</b> .....	17
<b>3.1.3 Molekulaarsildamine</b> .....	18
<b>3.2 Eksperimentaalne osa</b> .....	19
<b>3.2.1 Kasutatud rakud ja nende kasvatustingimused</b> .....	19
<b>3.2.2 Plasmiidid</b> .....	19
<b>3.2.3 Elektroporatsioon</b> .....	19
<b>3.2.4 Potentsiaalsete HPV inhibiitorite analüüs</b> .....	19
<b>3.2.5 Kahe lutsiferaasi (Firefly ja Renilla) luminesentsi intensiivsuse mõõtmine</b> .....	20
<b>3.2.6 Lutsiferaaside mõõtmistulemuste analüüs</b> .....	20
<b>4. Tulemused ja arutelu</b> .....	22
<b>4.1 Esimene ühendite valim</b> .....	22
<b>4.2 Teine ühendite valim</b> .....	26
<b>4.3 Tulemuste analüüs</b> .....	28
<b>5. Kokkuvõte</b> .....	31
<b>6. Summary</b> .....	32
<b>7. Kasutatud kirjandus</b> .....	33
<b>8. Lisad</b> .....	40
<b>9. Infoleht</b> .....	52
<b>10. Litsents</b> .....	53

## **Kasutatud lühendid**

AM1 – *Austin Model 1*

ATP – adensiintrifosfaat

BMLR – parim multilineaarne regressioon (*best multilinear regression*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid

E6AP – E6-ga seonduv valk (*E6 associated protein*)

ELISA – ensüüm-immuunsorbtsiooni analüüs (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

GFP2 – roheliselt fluorestseeruv valk 2 (*green fluorescent protein 2*)

HDAC – histoondeatsetülaas (*histone deacetylase*)

HPV – inimese papilloomiviirus (*human papillomavirus*)

IC50 – kontsentratsioon, mille juures saavutatakse 50% inhibitsioon.

LE – ligandi sildamise efektiivsus (*ligand efficiency*)

MCMM – *Monte Carlo Multiple Minimum*

MLR – multilineaarne regressioon (*multiple linear regression*)

MMFFs – *Merck Molecular Force Fields*

OPLS2005 – *Optimized Potentials for Liquid Simulations 2005*

ORF – avatud lugemisraam (*open reading frame*)

ori – replikatsiooni alguspunkt (*origin of replication*)

p53 – kasvaja supressorvalk p53

PARP1 – polü(ADP-riboos)polümeraas 1 (*poly (ADP-ribose) polymerase 1*)

PRCG – *Powell-Reeves conjugate gradient*

QSAR – kvantitatiivne struktuur-aktiivsus sõltuvus (*Quantitative Structure-Activity Relationship*)

Rb – retinoblastoomi valk (*retinoblastoma protein*)

Tdp1 – türosüül-DNA-fosfodiesteraas 1 (*Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1*)

Top1 – DNA topoisomeraas 1 (*DNA topoisomerase 1*)

U2OS – inimese osteosarkoomi U2OS rakuliin

URR – ülesvoolu paiknev regulatsiooniala (*upstream regulatory region*)

## 1. Sissejuhatus

Hinnanguliselt 15% kõikidest inimestel diagnoositavatest vähihaigustest on viiruste poolt tekitatud. Nendest ligikaudu pooled on põhjustatud inimese papilloomiviiruse (HPV) poolt. Inimese papilloomiviirus on peamiselt sugulisel teel leviv viirus, mis põhjustab erinevaid naha ja limaskestade haigusi, sealhulgas emakakaelavähki [1].

Igal aastal diagnoositakse ligikaudu 500 000 uut HPV poolt põhjustatud emakakaelavähi juhtumit, millest pooled lõppevad surmaga. HPV-nakkuse vältimiseks on välja töötatud kolm saadaval olevat vaktsiini, mis kaitsevad peamiste vähki tekitavate kõrge riski HPV tüüpide eest. Paraku on need vaktsiinid profülaktilised ning ei aita, kui viirus on juba organismi sisenenud. Kuna HPV-ga nakatumisest kulub vähi tekkeni tavaliselt 15-25 aastat, siis hinnatakse, et enne 2030. aastat pole oodata märkimisväärset HPV vastu vaktsineerimise mõju emakakaelavähi diagnooside arvule [2].

Kasutusel olevad HPV infektsioonide ravimeetodid on vaid sümptomeid leevendavad ning ei hävita viirust ennast. Seetõttu on sagedane haigusnähtude taasesinemine. Jätkuvalt pole ravimina saadaval ühtegi HPV-vastast inhibiitorit. Selliste inhibiitorite disaini on raskendanud asjaolu, et HPV-del puuduvad tüüpilised viirustele omased inhibiitori märklauadena kasutatavad ensüümid (proteaasid ja polümeraasid) [3]. Vaatamata sellele on saavutatud mõningast edu HPV replikatsiooni takistamisel, inhibeerides nii viirusest kui ka organismist pärit valke [3, 4].

Käesolevas töös seati eesmärgiks leida uusi HPV-vastaseid inhibiitoreid, kasutades arvutuskeemia meetodeid uute aktiivsete ühendite ennustamiseks. Inhibiitori märklauaks valiti inimese organismis leiduv valk türosüül-DNA-fosfodiesteras 1 (Tdp1), mille vajalikkust HPV replikatsioonis on varasemalt demonstreeritud [4]. Aktiivsete ühendite leidmiseks teostati virtuaalne sõelumine ning kasutati molekulaarsildamise tulemustest saadud informatsiooni. Valitud ühenditega sooritati *in vitro* katsed HPV replikatsiooni inhibeerimise hindamiseks U2OS rakuliinis.

## 2. Kirjanduse ülevaade

### 2.1 Inimese papilloomiviiruse üldisloomustus

Papilloomiviirused on laialt levinud väikesed, kaheahelalise DNA genoomiga viirused. Nende genoom koosneb ligikaudu 8000 nukleotiidi aluspaarist ja sisaldab kaheksat või üheksat avatud lugemisraami (ORF-i) [5]. Praeguseks on erinevaid inimese papilloomiviiruse (HPV) tüüpe leitud üle 200 ning neid hinnatakse olevat vähemalt 400 [6]. Inimese papilloomiviiruseid liigitatakse limaskestast või naha papilloomiviirusteks. Sõltuvalt tendentsist tekitada vähki, jaotatakse need viirused veel omakorda kõrge riski ja madala riski HPV tüüpideks [7]. Enamik HPV tüüpidest kuuluvad madala riski viiruste hulka, mis põhjustavad healoomulisi tüükaid epiteelkudedes [8]. Kõrge riski HPV tüüpide hulka kuuluvaid viiruseid (HPV68, 59, 58, 56, 52, 51, 45, 39, 35, 33, 31, 18 ja 16 [9]) seostatakse erinevate vähkkasvajate, sealhulgas emakakaelavähi tekkega. Koguni 99% selle haiguse juhtudest on HPV poolt põhjustatud [10, 11]. Kõrge riski HPV tüüpidest levinuim on HPV16, mida on leitud ligikaudu 50% emakakaelavähi haiguskoldeist. Kõrge riski viiruste hulka loetakse ka laialdaselt levinud tüüpe HPV5 ja HPV8. Neid seostatakse haruldase geneetilise eelsoodumusega nahahaigusega *epidermodysplasia verruciformis*, mille haiguskoldeid võivad edasi areneda nahavähiks [12].

HPV infektsioon on üsna sagedane ning enamikel juhtudel kaob see immuunsüsteemi toimel iseeneslikult 12-18 kuu jooksul. Ligikaudu 10% kõrge riski HPV nakkuseid muutuvad aja jooksul persistentseks ning nendest võib areneda vähkkasvaja [1]. HPV poolt põhjustatud vähkkasvajate teket seostatakse nõrgestatud immuunsüsteemi ja kaua kestva nakkusega, mille jooksul jõuavad toimuda peremeesraku genoomis mutatsioonid. Lisaks mängivad tõenäoliselt rolli ka muud riskitegurid: suitsetamine ja pikaajaline rasestumisvastaste tablettide kasutamine [12]. 2008. aasta statistika järgi diagnoositi 529 800 uut emakakaelavähi juhtumit aastas ning haiguse poolt põhjustatud surmasid oli 275 100. Selle statistika järgi on emakakaelavähk naiste seas kolmandal kohal kõige sagedamini diagnoositud ning neljandal kohal kõige sagedamini surma põhjustavatest vähkidest [13].

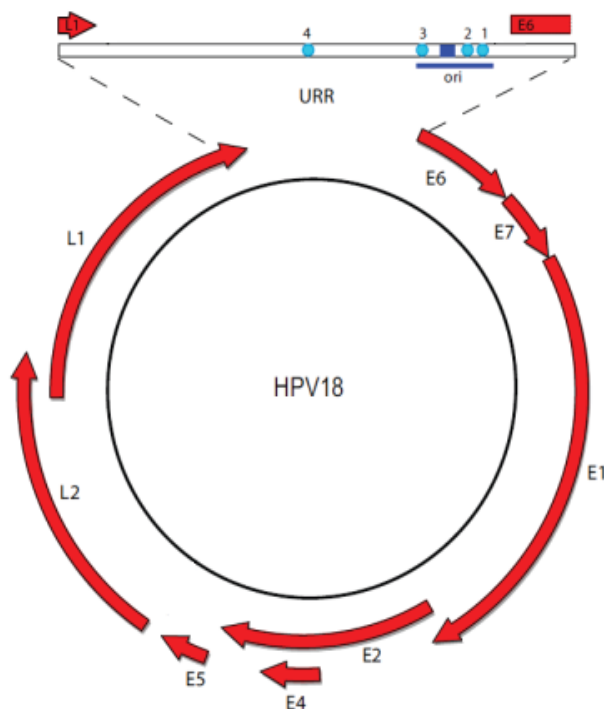
HPV-nakkuse vältimiseks on firmade GlaxoSmithKline ja Merck poolt välja töötatud profülaktilised vaktsiinid Cervarix, Gardasil ja Gardasil 9. Tegemist on viiruseladsetest osakekestest koosnevate vaktsiinidega, mis katavad ära üheksa kõige levinumat HPV tüüpi (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 ja 58). Antud vaktsiinid pakuvad efektiivset kaitset vastavate viirustega nakatumise eest, kuid ei aita juba nakatunud organismi [2]. HPV-ga nakatumise risk on kõige suurem 25-aastaste ja nooremate naiste seas [14]. Mõnedes riikides on HPV-vastased vaktsiinid

kinnitatud ka vanemate kui 26-aastaste naiste jaoks, kuid FDA poolt on kinnitus vaid patsientidele vanuses 9-26. Lisaks on HPV vastu vaksineerimine küllaltki kulukas ning vaktsiinide kättesaadavus arengumaades on piiratud [15].

Praegusel ajal ei ole saadaval ühtegi HPV-vastast ravimit ning viiruse poolt tekitatud haiguskoldest saab vabaneda vaid kirurgilise eemaldamise teel [5]. Kasutatakse ka laser- ja krüoteraapiat, mis on destruktiivsed ning ei taga täielikku viirusest vabanemist. Mittekirurgilistest meetoditest on HPV poolt põhjustatud tüügaste raviks kasutatud imikvimoodi või podofüllüüni sisaldavaid kreeme. Imikvimood toimib immuunvastuse modifikaatorina ning podofüllüün pärsib viiruse levikut, takistades nakatunud rakkude diferentseerumist [16]. Loetletud ravimeetodite puhul on efektiivsus jällegi madal ning haiguse tagasitulek sagedane [17]. Seega on madalmolekulaarsete HPV inhibiitorite arendamine vajalik.

## **2.2 HPV genoom ja valgud**

HPV genoom koosneb tüüpiliselt kaheksast valku kodeerivast ORF-st ning 1kb pikkusest mittekodeerivast alast (URR – *upstream regulatory region*). Viraalseid geene jaotatakse mittestruktuurseteks (E – *early*) ja struktuurseteks (L – *late*), kusjuures struktuurseid ja enamikke mittestruktuurseid geene ekspresseeritakse vastavalt viiruse elutsükli hilisemas ja varasemas osas [18]. Kõik papilloomiviirused omavad replikatsiooniks vajalikke valke E1 ja E2 ning kapsiidseid valke L1 ja L2. Ülejäänud geenidel (tüüpiliselt E4, E5, E6 ja E7) on roll peremeesorganismi rakutsükli mõjutamises, viirusosakeste vabanemises ning mitmetes teistes protsessides. Nendele geenidele on omane suurem erisugusus erinevate HPV tüüpide seas ning mõnel juhul võib mõni neist isegi puududa [5]. E1 on DNA helikaas, mis harutab lahti viiruse DNA kaksikahela, et saaks toimuda HPV genoomi replikatsioon. E2 on vajalik viiruse DNA transkriptsioonis ja replikatsioonil, lisaks on ta oluline ka viiruse genoomi segregatsioonil diferentseeruvate rakkude vahel. Onkovalgud E6 ja E7 suunavad diferentseerumisel jagunemist lõpetavaid rakke paljunema, võimaldades viiruse genoomi replikatsiooni HPV hilistes elutsükli etappides [19]. E4 aitab lõhustada keratiinist moodustunud sarvkesta ning seeläbi soodustab viirusosakeste vabanemist ning teiste rakkude nakatamist [20]. E5 on membraanne valk, mis indutseerib nakatunud basaalse rakkude diferentseerumist ning aitab viirusel varjuda peremeesorganismi immuunsüsteemi eest [21, 22]. Tüüpilise kõrge riski HPV näitena on ära toodud HPV18 genoom joonisel 1.



**Joonis 1.** HPV18 genoom (7857 aluspaari). Avatud lugemisraame (ORF) tähistavad punased nooled. Ära on toodud mittekodeeriv ala (URR), replikatsiooni alguspunkt (ori) ning sidumiskohad valkudele E1 (sinine ruut) ja E2 (helesinised ringid) [23].

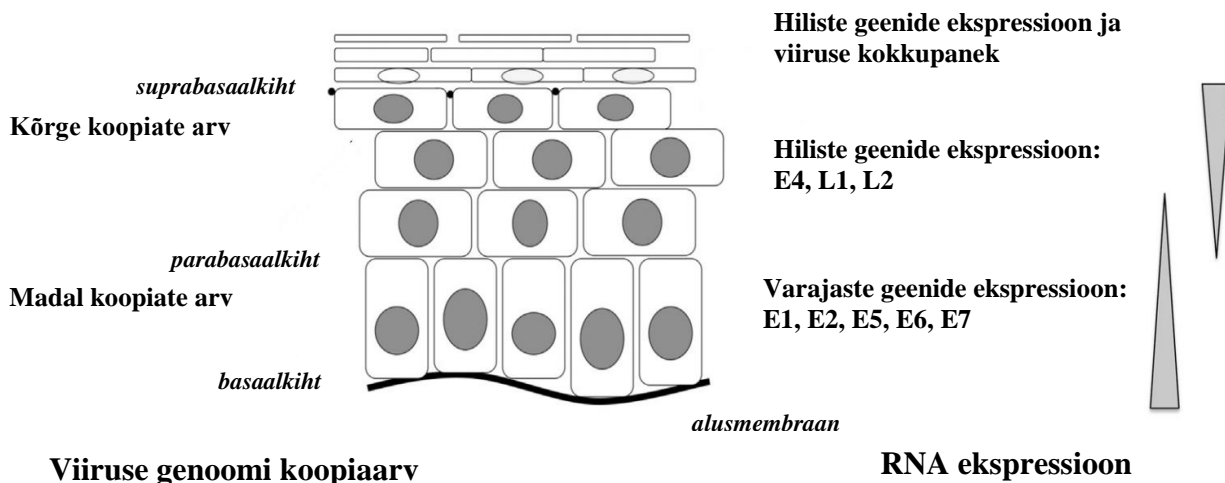
### 2.3 HPV elutsükkel

HPV infektsiooni tekkeks on vajalik viirusosakeste kokkupuude epiteelkoe basaalse rakkudega. Eeldatavasti toimub organismi nakatamine viirusega epiteeli mikrohaavandite kaudu [24]. Laialt on levinud hüpotees, et püsiva haiguskolde tekkeks peavad viirusosakesed nakatama basaalkihi tüvirakke [25]. Erinevalt kõrge riski HPV tüüpidest ei stimuleeri madala riski HPV-d rakkude jagunemist ning seetõttu peetakse tüvirakkude nakatamist vajalikuks. Kõrge riski HPV-de puhul ei olda selles hüpoteesis kindlad [24]. Nakatunud rakkudes on HPV genoomi raku tuuma sisenemiseks vaja aktiivset rakkude diferentseerumist, mida esineb näiteks haavade paranemisel [26].

HPV elutsükkel on tihedalt seotud epiteelkoe rakkude diferentseerumisega. Osad diferentseerunud basaalrakkude tütararakud migreeruvad epiteeli kihtides ülespoole ning sisenevad terminaalsesse diferentseerumisfaasi. Nende pooldumise käigus toimub keratiinide kumuleerumine, mis viib lõpuks tuumamembraani purunemiseni. Selle tulemusena rakud lõpetavad paljunemise [18]. Viirusega nakatunud rakkudes takistatakse väljumist rakutsüklist ning diferentseerumine jätkub ka epiteeli kõrgemates kihtides (vt joonis 2) [27].

Basaalsete rakkude infektsioonile järgneb esialgne amplifikatsiooni faas, mille käigus viiruse genoomi koopiate arvu suurendatakse kuni 200-ni ühe raku kohta. Viiruse replikatsiooni juhivad selles faasis viraalsed valgud E1 ja E2. Valk E2 omab mitut seostumispirkonda viiruse

nukleotiidi ahelas ning tema abil seotakse viiruse valk E1 replikatsiooni alguspunkti. Pärast E1 valgu seostumist viiruse genoomiga replikatsiooni alguspunktis, E2 dissotsieerub E1, E2 ja viraalse DNA kompleksist. E1 valgu interaktsioon mitmete rakuliste valkudega (Topoisomeraas I, DNA polümeraas alfa) võimaldab käivitada esialgse amplifikatsiooni. Esialgsele amplifikatsioonile järgneb latentne säilumine basaalkihtides, mille käigus HPV genoomi koopiaarv on konstantne [3, 24].



**Joonis 2.** HPV infektsiooni kulg epidermises. Kõigepealt nakatab viirus basaalkihi keratinotsüüte. Esialgu säilib viiruse genoomi koopiate arv madalal tasemel. Pärast rakkude diferentseerumist liiguvad tütararakud ülespoole. Jõudnud parabasaalkihti, suunavad viiruse onkovaalgu raku uuesti S-faasi ning toimub viiruse DNA koopiaarvu suurendamine. Kõige kõrgemates kihtides sünteesitakse kapsiidseid valke ning moodustatakse uued viirusosakesed [28].

Epiteelis kõrgemale migreerunud rakkudes lülitub sisse diferentseerumisprotsess, mis omakorda põhjustab HPV genoomi replikatsiooni järgmise etapi – vegetatiivse amplifikatsiooni käivitumise. Vegetatiivse amplifikatsiooni käigus suureneb viiruse genoomi koopiate hulk paarisajast mitme tuhandeni. Vegetatiivse amplifikatsiooni toimumiseks suunavad valgud E6 ja E7 peremeesraku uuesti S-faasi, mille käigus toimub DNA replikatsioon [29].

Viirusosakeste valmimine ja keratinotsüütidest vabanemine toimub epiteeli kõige kõrgemas osas. HPV osakeste kokkupanekuks kasutatakse kapsiidseid valke L1 ja L2, millest põhiosa moodustab L1 [30]. Arvatakse, et epiteeli ülemistes kihtides mängib viirusosakeste rakust vabanemises ja teiste rakkude nakatamises rolli valk E4, mis põhjustab keratiinvõrgustiku lagunemist [31].

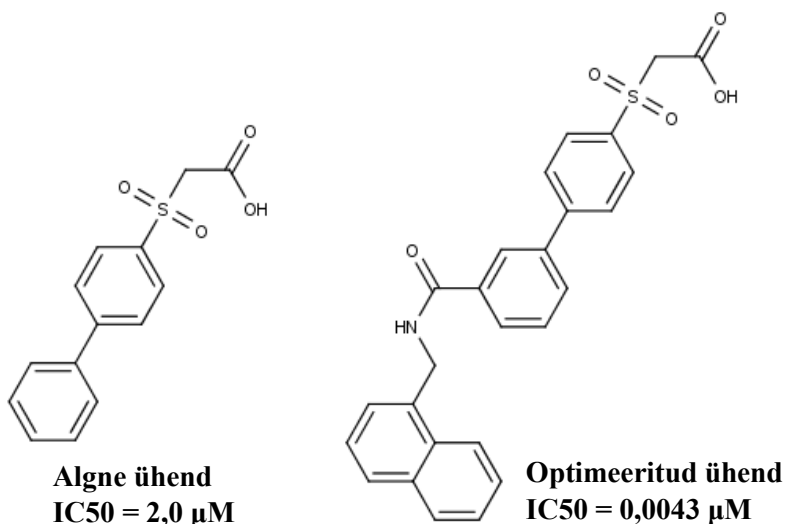
## 2.4 HPV märklauad ja inhibiitorid.

Papilloomiviiruse inhibiitorite ratsionaalseks disainimiseks on vaja leida sobiv märklauad. Alljärgnevalt vaadeldakse olulisemaid võimalikke märklaua nii HPV kui ka inimese enda valkude seas.

### 2.4.1 Valgud E1 ja E2.

HPV genoomi replikatsiooniks on vajalikud valgud E1 ja E2. Valk E2 seostub viiruse DNA-ga ning suunab helikaasi E1 samuti viiruse DNA replikatsiooni alguspunkti. Seeläbi aitab E2 moodustada kahest E1 heksameerist koosnevat kompleksi, mis on vajalik, et saaks toimuda viraalse DNA lahtiharutamine [32]. Kuivõrd valgud E1 ja E2 on erinevate HPV tüüpide seas üsna hästi konserveerunud, on nad lootust andvateks sihtmärkideks, et ravida erinevate HPV-de poolt põhjustatud haigusi [3].

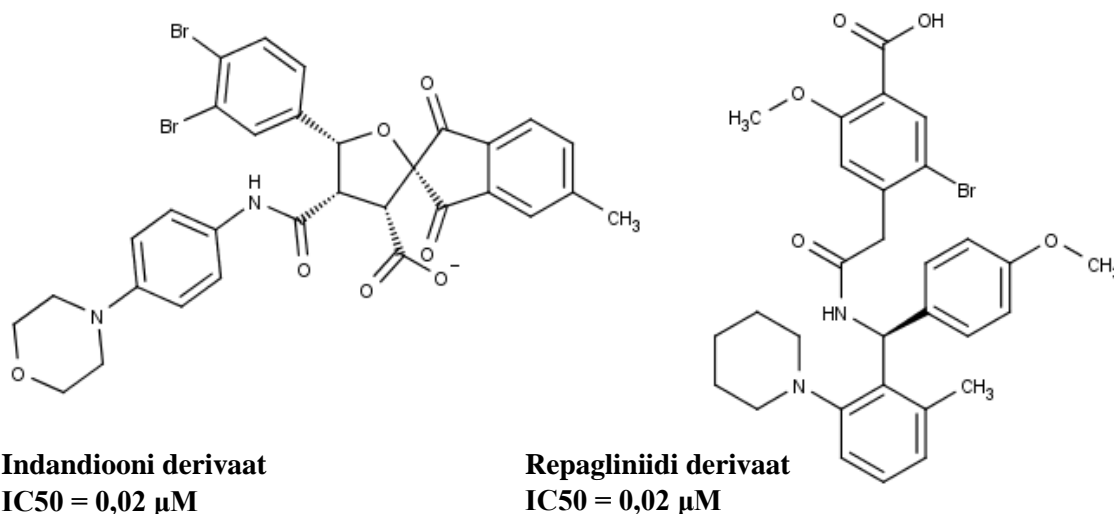
E1 saab viiruse DNA lahtiharutamiseks vajaliku energia ATP hüdrolüüsist. Lisaks soodustab ATP E1-heksameeride moodustumist ning nõrgestab E1 ja E2 vahelist interaktsiooni [33]. Seega võimaldaks E1 poolt katalüüsitava ATP hüdrolüüsi ning tema ATP-ga seostumise takistamine inhibeerida viiruse DNA replikatsiooni. Enam kui 500 000 erineva ühendi sõeluuring on tulemuseks andnud madalmolekulaarsed inhibiitorid, mis pärivad HPV6-st pärit E1 ATPaasset aktiivsust [34]. Parima aktiivsusega molekulide seas olid bifenüülsulfoonhappe analoogid. Saadud inhibiitorite edasiarendamine viis välja veelgi suurema potentsiga molekulideni (vt joonis 3).



**Joonis 3.** HPV6 E1 ATP-aasset aktiivsust tõkestavate inhibiitorite struktuurid ja IC<sub>50</sub> väärtused [34]

Paraku ei olnud need ühendid aktiivsed rakukatsetes. Seda võis põhjustada suurem rakusisene ATP kontsentratsioon võrreldes *in vitro* katsetega või negatiivselt laetud karboksülaatrühma tõttu raskendatud rakumembraani läbimine [34].

On näidatud, et HPV replikatsiooniks on vajalik E1-E2 kompleksi teke, mis seostub viiruse DNA-ga [35]. See teadmine avab mitmed võimalused uute HPV replikatsiooni vastaste inhibiitorite arendamiseks. Need inhibiitorid võiksid takistada E1 ja E2 vahelist interaktsiooni või nende seostumist viiruse DNA-ga. 140 000 ühendi sõeluuringu abil leiti esimesed HPV11 E1, E2 ja viraalse DNA vahelise kompleksi teket pärssivad ühendid [36]. Nende indandiooni fragmenti sisaldavate ühendite edasi arendamine viis välja esimeste *in vivo* aktiivsusega HPV replikatsiooni inhibiitoriteni (vt joonis 4). Katseliselt on näidatud, et nende molekulide seostumine toimub valgu E2 transaktivatsiooni domeeni külge ning seeläbi takistatakse E1 ja E2 vahelist valk-valk interaktsiooni [37]. Hilisemas sõeluuringus leiti täiendavalt uued E1-E2 interaktsiooni inhibiitorid. Need repagliniidi derivaadid seostusid samuti E2 transaktivatsiooni domeeniga ning näitasid nanomolaarses piirkonnas IC<sub>50</sub> väärtustega inhibeerimisvõimet HPV6 ja HPV11 E2 vastu [3] (vt joonis 4).



**Joonis 4.** Valkude E1 ja E2 vahelist interaktsiooni takistavate inhibiitorite struktuurid ja IC<sub>50</sub> väärtused [3, 37].

E1 ja E2 vaheline interaktsioon on küllaltki konserveerunud nii nahka kui ka limaskesti nakatavate HPV tüüpide seas ning võiks olla üheks sihtmärgiks tulevastele HPV-vastastele ravimitele. Samas tuleb märkida, et HPV DNA integreerumisel peremeesraku genoomiga nende valkude geenide ekspresseerimine kaob. Sellest tulenevalt sobivad E1 ja E2 vastased inhibiitorid haiguste raviks, kus viiruse genoom säilib episoomina ning DNA integratsiooni

pole toimunud [3]. Kuna valku E2 peetakse ka onkovalkude E6 ja E7 repressoriks, siis seostatakse vähi teket HPV genoomi integreerumisest tuleneva E2 represseriva funktsiooni kadumisega [38].

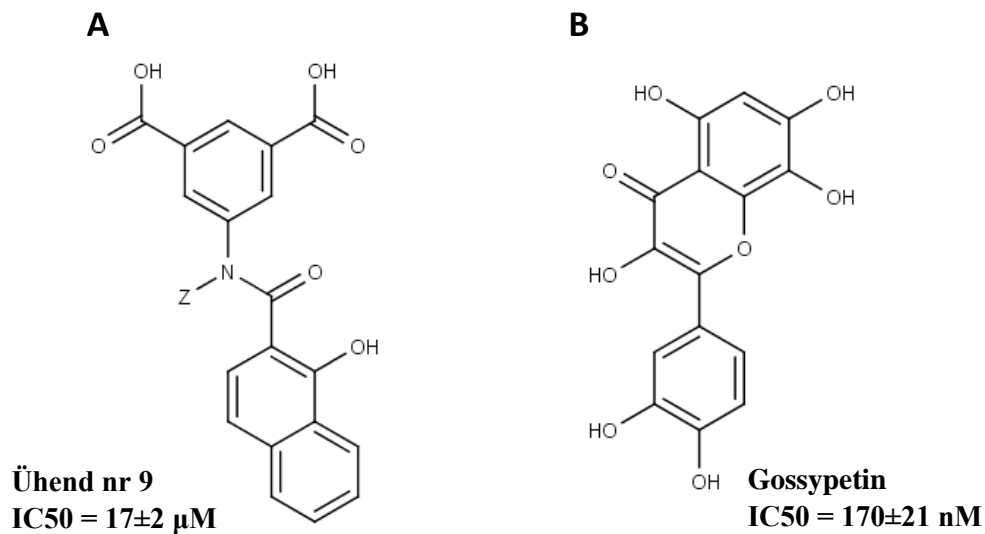
#### **2.4.2 Valgud E6 ja E7.**

HPV valgud E6 ja E7 on viirusega nakatunud rakkudes kartsinogeneesi algatajateks. Valk E6 seostub koos E6AP-ga kasvaja supressorvalguga p53 ning suunab selle ubikvitiini vahendatud lagundamisele [39]. E7 seostub retinoblastoomi (Rb) valkude hulka kuuluvate kasvaja supressorvalkudega ning seeläbi takistab Rb/E2F komplekside teket. Need kompleksid omakorda suruvad maha geene, mille ekspresseerimine on vajalik rakutsükli kontrollimiseks ja rakkude diferentseerumiseks [40]. On näidatud, et valkudel E6 ja E7 on mõnevõrra erinevad rollid HPV poolt põhjustatud vähi rakkude elus püsimises ja paljunemises. Samas piisab nendest valkudest vaid ühele vastava geeni represserimisest, et käivituks rakkude vananemine või apoptoos. Seega on valgud E6 ja E7 potentsiaalseteks märklaudadeks, et ravida HPV poolt põhjustatud pahaloomulisi kasvajaid [41].

Valgu E6 seostumist p53-ga on näidatud nii madala riski kui ka kõrge riski HPV-de puhul, kuid p53 degradatsiooni kutsub esile vaid kõrge riski viiruse E6. Lisaks on p53 degradatsiooniks vajalik valgu E6AP olemasolu. E6AP seostub E6-ga moodustades liigaasina käituvat kompleksi [42]. Selleks, et HPV-ga nakatunud rakkudes p53 lagundamine ära hoida, on uuritud võimalusi, et takistada E6-E6AP kompleksi teket. Uute E6 inhibiitorite leidmiseks konstrueeriti Baleja jt töös farmakofoorne mudel, tuginedes teadaolevate E6 külge seostuvate peptiidide 3D struktuuridele [43]. Kasutades loodud mudelit, viisid nad läbi virtuaalse sõelumise NCI ja Sigma-Aldrichi andmebaasides, vastavalt 240 000 ja 97 000 ühendiga. Täiendavate filtrite rakendamine ühendite sobivuse hindamiseks kahandas valitavate ühendite arvu 73-ni ning neid uuriti edasi *in vitro* katsetes. Aktiivseteks osutusid 10 ühendit (näited on toodud joonisel 5), millele teostati edasised selektiivsuse ja inhibeerimisvõime kontsentratsioonist sõltuvuse uuringud. Leitud ühendite IC50 väärtused olid vahemikus 11 kuni 29  $\mu\text{M}$  [43].

Hilisemas töös kasutasid Malecka jt [44] ELISA baasil toimivat analüüsimeetodit, et teostada sõeluuring 88 000 molekulile uute E6-E6AP interaktsiooni inhibiitorite leidmiseks. 30-st aktiivsust omavast molekulist 7 inhibeerisid p53 degradatsiooni HPV genoomiga integreeritud rakkudes. Leitud aktiivsete ühendite seas oli ka flavonoidide aineklassi kuuluvaid ühendeid (vt joonis 5), mis täiendavad eelnevaid uurimustöid E6-E6AP interaktsiooni takistavate flavonoidide osas [44]. Näidati uute madalmolekulaarsete ühendite võimet inhibeerida E6 ja

E6AP omavahelist seostumist ning E6 inhibiitorite edasi arendamiseks pakuti välja uusi lähtestruktuure [45].



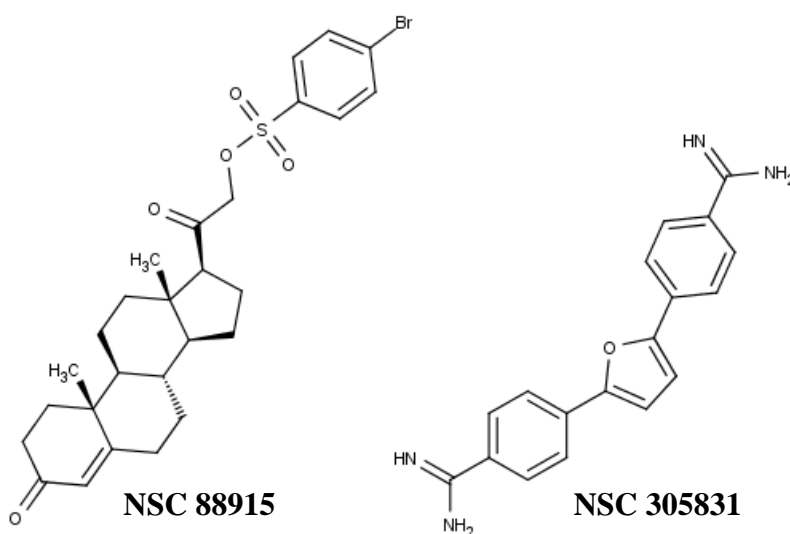
**Joonis 5.** HPV valgu E6 inhibiitorid ja nende toimet *in vitro* katsetes iseloomustav IC<sub>50</sub> väärtus. (A) Ühend 9 (Sigma-Aldrichi kood r278319), Z tähendab oktatetsüülrühma. Toodud on ka E6-ga seostumist iseloomustav IC<sub>50</sub> väärtus [43]. (B) Gossypetin [45].

### 2.4.3 Rakulised sihtmärgid -Tdp1 ja PARP1.

HPV elutsükli ja tema poolt põhjustatud haiguste kulgemises osalevad lisaks viraalsetele valkudele ka mitmed rakulise päritoluga valgud. Nende valkude mõjutamisega saaks kontrollida HPV-nakkust ning ravida HPV poolt põhjustatud haigusi [17]. Näiteks on emakakaelavähi rakkudes katsetatud proteasoomi inhibiitoreid. On näidatud, et proteasoomi inhibiitor MG132 tõstis emakakaelavähi rakkudes apoptoosi reguleeriva p53 valgu taset [46, 47]. Lisaks on suu kaudu manustatava HIV-vastase ravimi *lopinavir* (proteaasi inhibiitor) puhul näidatud kontsentratsioonist sõltuvat p53 taseme tõusmist ning apoptoosi esilekutsumist emakakaelavähi rakkudes [48].

Teatakse, et HPV-st pärit onkovalk E7 seostub histoondetsetülaasiga (HDAC). Sellest tulenevalt kaob HDAC võime seostuda transkriptsioonifaktori E2F promooteriga, mis toob endaga kaasa E2F taseme tõusu ja rakkude vohamise [49]. Vaatamata sellele on näidatud, et mõned HDAC inhibiitorid (Valproate ja trichostatin A) kaitsevad p53 valku E6-ga seostumise ja lagundamise eest proteasoomis ning kutsuvad esile emakakaelavähi rakkude apoptoosi [50].

Edwardsi jt poolt avaldatud uurimustöö on andnud põhjust oletada, et HPV replikatsiooniks on vajalikud türosüül-DNA-fosfodiesterasid Tdp1 ja Tdp2 – nad näitasid, et vastavate geenide väljalülitamine mõjutab HPV episoomide taset [51]. Tdp1 ja Tdp2 puhul on tegemist DNA kahjustusi parandavate ensüümidega, mis hüdrolüüsivad topoisomeraasi (TopI või TopII) ning DNA vahelist fosfodiestersidet [52]. On näidatud, et Top1-põhjustatud DNA kahjustuste parandamisel mängib lisaks Tdp1-le olulist rolli ka valk PARP1, mis seostub Tdp1-ga ning aktiveerib ja stabiliseerib seda [53]. Valgud Tdp1 ja PARP1 on välja pakutud vähivastaste ravimite sihtmärkideks ning PARP1 puhul on inhibiitorid juba kliinilistes katsetustes [54, 55]. Hiljuti teostatud uurimustöös rakendati NCI Diversity Set IV ainete kogumile kiirsõelumismeetodit, et leida uusi HPV-vastaseid inhibiitoreid [4]. Leiti 5 ühendit, mis inhibeerisid HPV18 replikatsiooni madal-mikromolaarse inhibiitori kontsentratsiooni juures. Leitud aktiivsetest ühenditest kaks (NSC 88915 ja NSC 305831, vt joonis 6) on teadaolevad Tdp1 inhibiitorid [4, 56, 57]. Lisaks näidati mainitud töös, et HPV18 replikatsiooniks on tõepoolest vajalikud valgud Tdp1 ja PARP1 [4].



**Joonis 6.** Teadaolevate Tdp1 inhibiitorite NSC 88915 ja NSC 305831 struktuurid [56, 57].

### **3. Metoodika**

#### **3.1 Virtuaalne sõelumine**

Käesolevas töös otsiti HPV replikatsiooni takistamiseks uudseid Tdp1 inhibiitoreid. Selleks kasutati virtuaalset sõelumist, mille eeliseks on ressursi kokkuhoid võrreldes eksperimentaalse ühendite sõelumisega. Virtuaalse sõelumise eesmärgiks on teatud ühendite kogumi seast välja valida soovitava bioloogilise aktiivsusega kandidaadid, mida eksperimentaalselt edasi uurida. Virtuaalset sõelumist võib läbi viia kas ligandi- või struktuuripõhiselt. Ligandipõhisel lähenemisel kasutatakse ühendite struktuuride ja nende bioloogiliste aktiivsuste vahelist matemaatilist sõltuvust, et hinnata uute molekulide aktiivsust. Struktuuripõhisel lähenemisel lähtutakse teadaolevast bioloogilise sihtmärgi kristallstruktuurist. Uuritav ühend sobitatakse süsteemi vabaenergia miinimumi leidmise teel sihtmärgi oletatavasse sidumistaskusse ning esitatakse vastav seostumise iseloomustava suuruse väärtus. Mõlemal juhul on eesmärgiks anda kvantitatiivne või kvalitatiivne hinnang ennustatava ühendi bioloogilisele aktiivsusele [58].

##### **3.1.1 QSAR mudeli loomine**

Kirjanduses on olemas palju Tdp1 ja tema substraadi kristallstruktuur, kuid seni puudub kristallstruktuur Tdp1 ja mõne tema inhibiitori kompleksist [59, 60]. Samas leidub kirjanduses andmeid teadaolevate Tdp1 inhibiitorite bioloogilistest aktiivsustest. Seetõttu valiti sobilik hulk mõõdetud Tdp1-vastase aktiivsusega ühendeid ning otsustati esmalt kasutada kvantitatiivsetel struktuur-aktiivsus sõltuvustel (QSAR) põhinevat lähenemist. Lähtuti Sirivolu jt [61] töös avaldatud andmetest, mis vastasid kõige paremini QSAR andmetöötlusel esitatavatele nõuetele. Vastavad andmed laeti alla ChEMBL andmebaasist [62].

Enne arvutusmudeli loomist teostati andmetega eeltöötlus: Tdp1 inhibeerimise IC<sub>50</sub> (ühikutes µM) väärtused asendati vastavate logaritmiliste väärtustega, happelisi rühmi sisaldavad molekulid asendati organismi pH (7,4) juures valdavalt esinevate anioonsete vormidega ning eemaldati mitu korda esinevad ühendid. Selle tulemusel jäi arvutusmudeli treeningandmete hulka 29 ühendit (vt tabel 1L lisades). Esmaste 3D struktuuride loomiseks kasutati ChemAxoni tarkvara Standardizer [63]. Seejärel sooritati molekulide energia miinimumile vastava konformatsiooni otsing, kasutades Maestro tarkvarapaketti kuuluvat programmi MacroModel 10.9. Konformatsiooniotsingu parameetrid olid järgmised: jõuväli – MMFFs [64], solvent – vesi, gradiendi minimiseerimismeetod – PRCG, konformatsiooniotsingu meetod – MCMM, sammude arv – 10000 [65].

Andmete statistiliseks tötluseks kasutati multilineaarset regressiooni (vt valem 1), kus luuakse lineaarne seos rohkem kui ühe sõltumatu muutuja ning ühe sõltuva muutuja vahel [66]. Antud töös on sõltuvaks muutujaks logaritmi 50% inhibeerimise kontsentratsioonist (logIC50) ning sõltumatuteks muutujateks teoreetiliselt arvatud molekulaarsed deskriptorid. Multilineaarse regressiooni võrrandi saab esitada kujul

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n \quad (1)$$

kus  $y$  on sõltuv muutuja,  $x_i$  on sõltumatu muutuja ning  $b_i$  on regressioonikordaja.

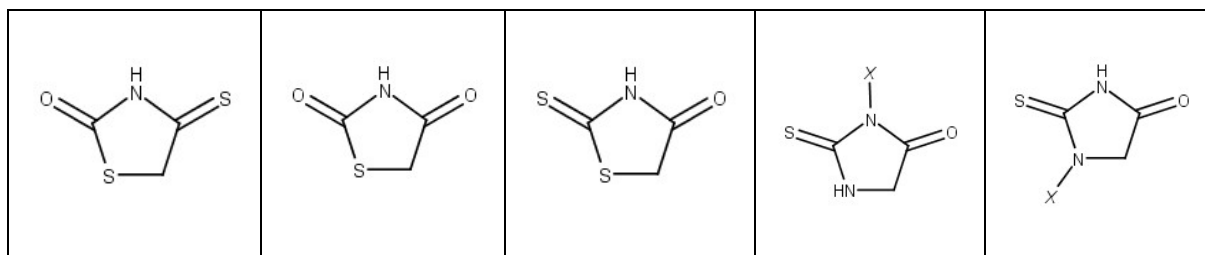
Deskriptorite arvutamiseks ning multilineaarse regressioonimudeli loomiseks kasutati programmi CODESSA PRO [67]. Konformatsiooniotsingu läbinud molekulidele arvutati deskriptorid kasutades poolempiirilist arvutusmeetodit AM1 parametrisatsiooniga [68]. Seejärel leiti vastavad multilineaarse regressiooni võrrandid, kasutades parima multilineaarse regressiooni (BMLR) algoritmi [67]. BMLR algoritm koosneb järgmistest toimingutest:

- 1) Leitakse deskriptorite paarid, mille korrelatsioonikoeffitsiendi ruut ( $R^2$ ) on väiksem etteantud väärtusest (0,1).
- 2) Saadud deskriptorite paaridega luuakse kaheparameetrilised multilineaarse regressiooni võrrandid. Valitakse välja etteantud hulk võrrandeid, millel on kõrgem  $R^2$  väärtus.
- 3) Väljavalitud võrrandite deskriptoritele lisatakse juurde mittekollineaarne deskriptor, millel on väike korrelatsioon võrrandis olevate deskriptoritega, st vastav  $R^2$  on väiksem etteantud väärtusest (0,6).
- 4) Deskriptorite lisamist jätkatakse seni, kuni saadud võrrandite Fisheri kriteerium [67] on madalam kui parima kaheparameetrilise võrrandi oma.

### 3.1.2 QSAR mudeli kasutamine

Saadud multilineaarset regressioonimudelit rakendati andmebaasidest leitud ühendite Tdp1 inhibeerimise logIC50 väärtuse ennustamiseks. Valiti välja 5 erinevat struktuurifragmenti, lähtudes sarnasusest multilineaarse mudeli treenimiseks kasutatud ühenditega (vt tabel 1) [61]. Kasutades neid struktuurifragmente teostati andmebaasides ZINC [69] ja MolPort [70] päringud. Andmebaasidest saadud ühendite logIC50 väärtuse ennustamiseks tuli arvutada multilineaarsesse regressioonivõrrandise kuuluvad deskriptorid. Selleks teostati andmebaasidest saadud molekulidega samad protseduurid, mis QSAR mudeli loomiseks kasutatud molekulidega. Deskriptorid arvutati programmi CODESSA PRO abil. Edasine andmete analüüs ning logIC50 arvutamine teostati MS Excelis. Andmete analüüsi käigus valiti välja ühendid, millele arvutatud logIC50 oli väiksem kui 0.

**Tabel 1.** Andmebaaside otsingute jaoks kasutatud lähtestruktuurid. X tähistab suvalist asendusrühma.



Ühendite valimi edasiseks kahandamiseks otsustati rakendada tabelis 2 esitatud füüsikaliskemilisi kriteeriumeid:

**Tabel 2.** Virtuaalses sõelumises kasutatud füüsikaliskemilised kriteeriumid. Vastavate suuruste arvutamiseks kasutati ChemAxoni tarkvara Instant JChem [63].

Molekulaarmass alla 500.
Arvutatud jaotuskoeffitsiendi logaritmi clogP [71] vahemikus -0,4 kuni 5,6.
Topoloogiline polaarne molekuli pindala [72] väiksem kui 120.
Roteeruvate sidemete arv väiksem kui 10.
H-sideme doonorite arv kuni 3.
H-sideme aktseptorite arv kuni 6.

### 3.1.3 Molekulaarsildamine

Ühendite hulga järgnevaks kahandamiseks ja sobivate ühendite valimiseks otsustati viimase sammuna kasutada molekulaarsildamise meetodit. Valgu Tdp1 kristallstruktuur saadi Protein Databank'i [73] andmebaasist (PDB kood: 1NOP). Saadud kristallstruktuurist eemaldati üleliigsed molekulid: vesi, DNA, substraati jäljendav peptiid ning vanadaatioonid. Vajaliku griidikasti loomiseks ja molekulaarsildamiseks kasutati Maestro tarkvarapaketti kuuluvat programmi Glide 6.8 [74]. See programm kasutab molekulaarsildamiseks kahte griidikasti – välimine ja sisemine, mõlemad on tsentreeritud samas ruumipunktis. Välimine kast ümbritseb kõiki ligandi aatomeid, sisemises kastis võib konformatsiooniotsingu käigus liikuda ligandi tsenter [74].

Molekulaarsildamiseks vajalik griidikast tsentreeriti kristallstruktuuris oleva substraadi ümber eeldades, et inhibiitorid seostuvad võrreldes substraadiga samas piirkonnas. Griidikasti tsentri koordinaadid olid  $x = 9,831245$ ,  $y = 42,158223$ ,  $z = 2,782605$ . Nii välimine kui ka sisemine kast olid kuubikujulised. Välimise kasti küljepikkus oli  $30,029798 \text{ \AA}$ , sisemise kasti küljepikkus –  $10,0 \text{ \AA}$ . Griidi loomiseks kasutati OPLS\_2005 jõuvälja [75].

Molekulaarsildamine teostati füüsikalise-keemiliste kriteeriumite abil kahandatud ühendite valimiga ning ühe võrdlusühendiga, mille Tdp1 inhibeerimise IC50 väärtus oli teada [61]. Ligandide seostumise ennustamiseks kasutati suurema täpsusega Glide ExtraPrecision (XP) funktsiooni (vt valem 2), millega arvutati seostumisenergia [76]

$$XP\text{GlideScore} = E_{coul} + E_{vdW} + E_{bind} + E_{penalty} \quad (2)$$

kus  $E_{coul}$  – elektrostaatilist interaktsiooni arvestav liige,  $E_{vdW}$  – van der Waalsi interaktsiooni arvestav liige,  $E_{bind}$  – liige, mis hõlmab endas ligandi seostumist soodustavaid interaktsioone ja  $E_{penalty}$  – liige, mis hõlmab endas ligandi seostumist takistavaid interaktsioone [76].

Arvutatud seostumisenergiate väärtusi võrreldi võrdlusühendiga ning valiti ühendid, mille seostumise vabaenergia oli madalam. Järelejäänud ühendite seast valiti eksperimentaalseks analüüsiks sobivad ained, mis olid kommertsiaalselt saadaval MolPort või ZINC andmebaasides. Ühendite valikul lähtuti molekulaarsildamise vabaenergiast ning sildamise efektiivsusest, püüdes kaasata võimalikult erinevaid aineklasse esindavaid ühendeid.

## **3.2 Eksperimentaalne osa**

### **3.2.1 Kasutatud rakud ja nende kasvatustingimused**

Töös kasutati U2OS rakuliini #10.15, mis ekspresseerib Firefly lutsiferaasi ja fluorestseeruva valgu GFP2 reportergeene, mille abil saab hinnata rakkude kasvu ning elulemust. U2OS #10.15 rakke kasvatati IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium, L-glutamiin, 25m M HEPES; Naxo) söötmes, kuhu oli lisatud 10% veise loote seerumit (FBS, GE Healthcare) ning 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini lahust (Naxo). Rakke kasvatati inkubaatoris 37 °C ja 5,6% CO<sub>2</sub> juures.

### **3.2.2 Plasmiidid**

Töös kasutati HPV18 genoomi, mis sisaldas Renilla lutsiferaasi ning suu-ja sõrataudi viiruse (FMDV) 2A peptiidi kodeerivaid järjestusi. Renilla lutsiferaasi ekspressiooni kontrollivad viiruse promooterid ja selle taseme muutus korreleerub viiruse genoomi koopiaarvu muutusega võimaldades seeläbi hinnata keemiliste ühendite mõju HPV genoomi replikatsioonile [4].

### **3.2.3 Elektroporatsioon**

Elektroporatsiooni meetod seisneb vastavate plasmiidide rakkudesse sisseviimisel välise elektrivälja toimel. U2OS #10.15 rakud transfekteeriti HPV18-ga elektroporatsiooni meetodil, kasutades Bio-Radi Gene Pulser II-e. Transfekteerimiseks kasutati eelpool mainitud HPV18 plasmidi. Tansfektsioonisegusse (ühe transfektsiooni jaoks) lisati 2 µg HPV18 DNA-d ning 50 µg *salmon sperm* kandja DNA-d. Ühe transfektsiooni kohta kasutati 70 – 90% konfluentsusega 100 mm plaati. Rakud eemaldati plaadilt trüpsiini abil ja koguti tsentrifuugides (5 minutit, 1500 rpm). Seejärel suspendeeriti rakud söötme hulgas 250 µl ühe transfektsiooni kohta. Rakususpensioon ning transfektsioonisegu pipeteeriti elektroporatsiooni 4 mm küvetti ning transfekteeriti tingimustel 220 V, 975 µF. Pärast transfektsiooni viidi rakud 2 ml söötmesse, koguti kokku tsentrifuugides (5 minutit, 1500 rpm) ning lõpuks suspendeeriti 1 ml söötmes ühe transfektsiooni kohta.

### **3.2.4 Potentsiaalsete HPV inhibiitorite analüüs**

Uuritavate ühendite HPV-vastase aktiivsuse uurimiseks valmistati lahjendusseeriad kuue kaevuga koekultuuriplaatidele. Kõikidesse kaevudesse kanti 150 µl HPV18-ga transfekteeritud rakkude suspensiooni. Uuritavad ühendid lahustati dimetüülsulfoksiidis (DMSO) ning kanti koekultuuriplaatidele nii, et lahjendusseerias olid lõppkontsentratsioonid vahemikus 0,625 kuni 50 µM. Lõppruumala kaevus oli 2 ml. Kontrolliks lisati lahustina kasutatud DMSO-d. 72 tunni

pikkuse esimese kasvuperioodi järel vahetati välja sööde ning lisati samades kogustes uuritavaid ühendeid ja DMSO-d. Pärast järgnevat 48 tunni pikkust kasvuperioodi teostati luminescentsi mõõtmised.

### 3.2.5 Kahe lutsiferaasi (Firefly ja Renilla) luminescentsi intensiivsuse mõõtmine

Luminescentsi mõõdeti kasutades Promega analüüsikomplekti ning dual-luciferase protokoll (Dual-Luciferase® Reporter Assay System; Cat#E1910) [77]. Meetod põhineb kahel lutsiferaasil, Firefly ja Renilla, mis katalüüsivad biokeemilist reaktsiooni, mille käigus eraldub valgus (vt joonis 7). Luminescentsi mõõtmiste jaoks eemaldati rakkudest sööde, pesti DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline; Naxo) lahusega ning lisati 250 µl lüüsi puhvrit 1X PLB (Passive lysis buffer; Promega). Lüüs kestis ligikaudu 15 minutit.

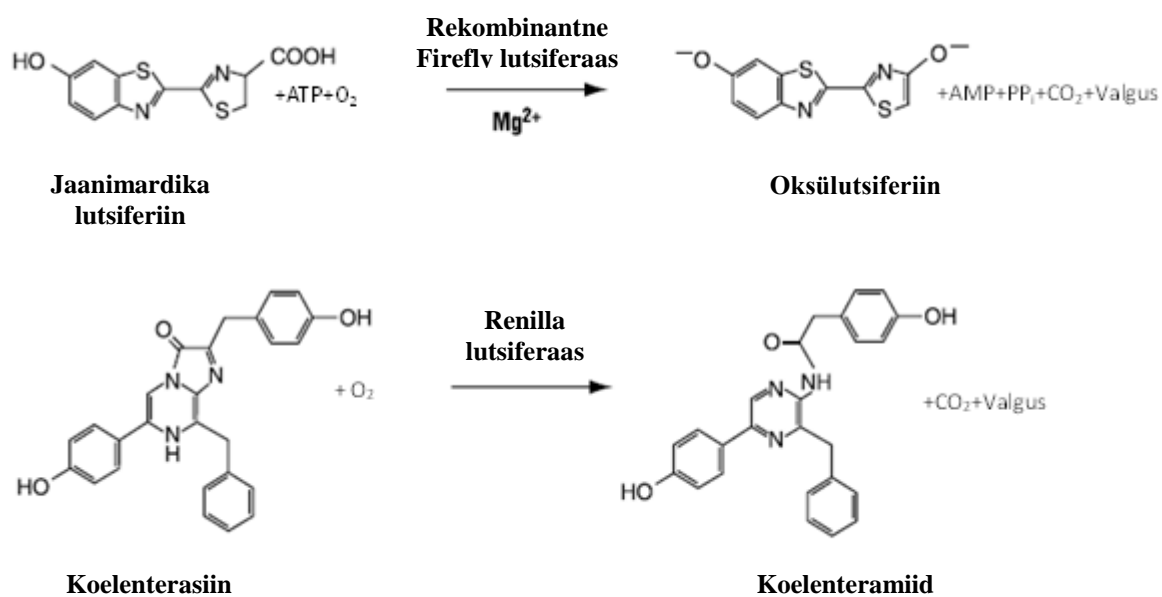
Esmalt mõõdeti Firefly luminescentsi intensiivsust, selleks lisati 20 µl lüsaati Eppendorfi tuubi, kus oli 50 µl Firefly substraadi lahust (LAR II). Pärast Firefly luminescentsi mõõtmist lisati tuubi 50 µl Stop and Glo reagenti, mis sisaldab Renilla lutsiferaasi substraati ning kustutab Firefly luminescentsi [77]. Mõõdetud luminescentsi intensiivsuse integreerimise teel saadi luminescentsisignaali. Luminescentsi mõõtmistel oli integreerimisaeg 1 s.

### 3.2.6 Lutsiferaaside mõõtmistulemuste analüüs

Renilla ja Firefly luminescentsisignaalide suhted jagati omavahel. Saadud suhted normeeriti kontrollpunkti Renilla/Firefly luminescentsisignaalide suhtega, saades lõplik inhibeerimist iseloomustav suurus

$$Y = \frac{R/F}{R_K/F_K} \quad (3)$$

kus Y on HPV18 suhtelist replikatsiooni iseloomustav suurus. R ja F tähistavad vastavalt Renilla ja Firefly lutsiferaasidele luminescentsisignaale.  $R_K$  ja  $F_K$  on kontrollpunkti Renilla ja Firefly luminescentsisignaalid. Andmete analüüs ning graafikud teostati MS Excelis.



**Joonis 7.** Firefly ja Renilla lutsiferaaside poolt katalüüsitavad biokeemilised reaktsioonid, mille käigus eraldub valgus. Firefly lutsiferaas katalüüsib jaanimardika lutsiferiini oksüdeerimist oksülutsiferiiniks ning Renilla lutsiferaas katalüüsib koelenterasiini oksüdeerimist koelenteramiidiks. Mõlemad lutsiferaasid toimivad aktiivsete ensüümidena ilma post-translatoorseid modifikatsioone vajamata [77].

## 4. Tulemused ja arutelu

Töö käigus uuriti kahte ühendite valimisse kuuluvate ühendite HPV-vastast aktiivsust. Esimene valim saadi andmebaasidest struktuurifragmente kasutades otsitud ühendite virtuaalse sõelumise teel. Teine valim saadi andmebaasidest, valides erinevaid aineklasse katvaid madalmolekulaarseid ühendeid.

### 4.1 Esimene ühendite valim

Virtuaalseks sõelumiseks loodi esmalt multilineaarne arvutusmodel teadaolevate Tdp1 inhibeerimise IC50 väärtustega ühendite põhjal. BMLR algoritmi kasutades saadi 3-parameetriline multilineaarne regressiooni võrrand (vt valem 1, lk 16), mille korrelatsioonikoefitsiendi ruut oli  $R^2 = 0,83$ . Leitud deskriptorid on toodud tabelis 3.

**Tabel 3.** Saadud multilineaarne mudeli deskriptorite kordajate ning vabaliikme väärtused ja deskriptorite kirjeldused.

	Regressioonikordajad	Kirjeldus
Vabaliige	$-4,46 \pm 0,93$	
Deskriptor 1	$0,165 \pm 0,022$	WNSA3 – kaalutud PNSA ( $PNSA3 \cdot TMSA/1000$ )
Deskriptor 2	$9,37 \pm 1,26$	Keskmine vesiniku aatomi valents
Deskriptor 3	$0,0396 \pm 0,0076$	RNCS – suhteline negatiivne laetud pindala ( $SAMNEG \cdot RNCG$ )

Järgnevalt on toodud leitud deskriptorite matemaatilised definitsioonid ning selgitused [67]:

**Deskriptor 1.**  $WNSA3 = \frac{PNSA3}{TMSA}$ .  $PNSA3 = \sum_{A \in \{\delta_A < 0\}} \delta_A \cdot S_A$  kus  $\delta_A$  on aatomi osalaeng ning  $S_A$  on solvendi poolt ligipääsetav negatiivselt laetud aatomi pindala.  $TMSA$  on molekuli kogupindala. Deskriptor 1 kirjeldab globaalset laengujaotust molekulis – mida negatiivsem on deskriptori väärtus, seda rohkem on molekulil negatiivselt laetud suhtelist pindala. Antud deskriptor on seostatav ensüümi- ja ligandivaheliste elektrostaatiliste vastasmõjude ning vesiniksidemetega.

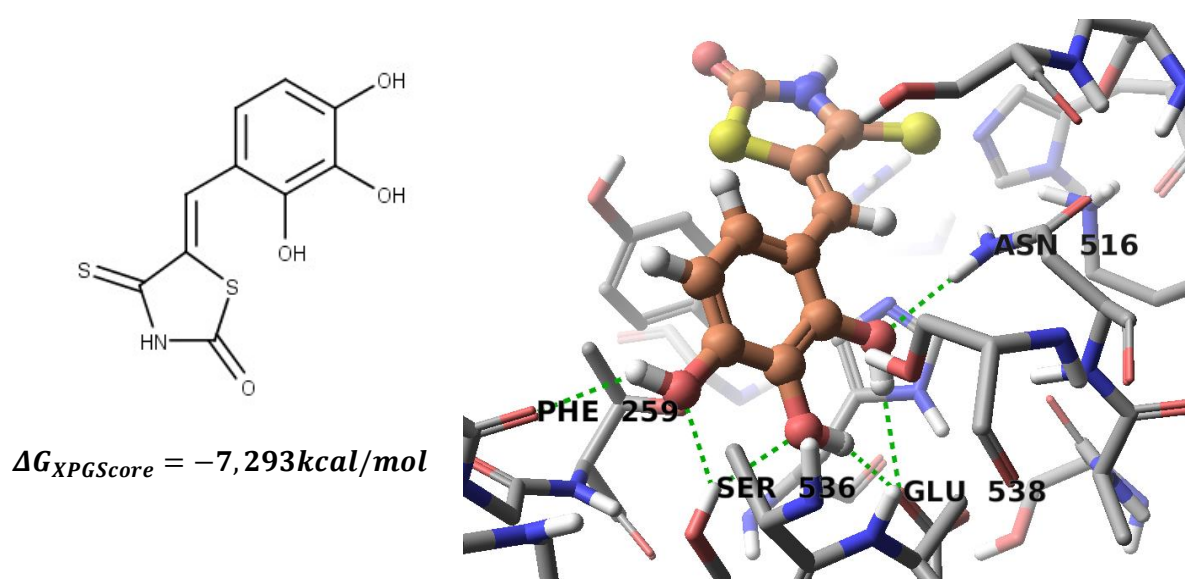
**Deskriptor 2.** Arvutatud vesinikuaatomite valentside keskvärtus. Deskriptor 2 on seostatav võimaliku vesiniksideme doonori esinemisega inhibiitori molekulis.

**Deskriptor 3.**  $RNCS = SAMNEG \times RNCG$ .  $RNCG = \frac{\delta_{max}^-}{\sum_{A \in \{\delta_A < 0\}} \delta_A}$  kus  $\delta_{max}^-$  on kõige negatiivsem aatomi osalaeng molekulis ning  $\delta_A$  on aatomi negatiivne osalaeng.  $SAMNEG$  on kõige negatiivsemat osalaengut omava aatomi pindala. Deskriptor 3 kirjeldab lokaalset laengujaotust molekulis – mida suurem on deskriptori väärtus, seda rohkem on laeng molekulis kontsentreeritud. Antud deskriptor on seostatav elektrostaatiliste interaktsioonide ning vesiniksidemetega ensüümi ja ligandi vahel.

Esimeste testitavate ühendite valimiseks rakendati virtuaalset sõelumist, mis koosnes järgnevatest etappidest:

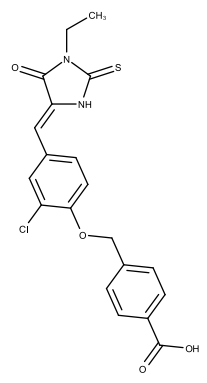
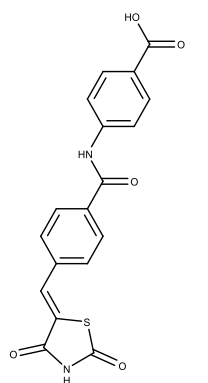
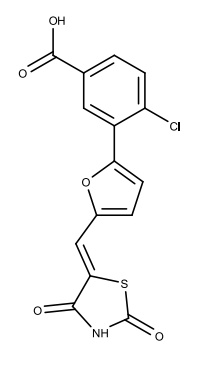
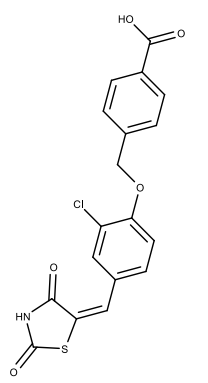
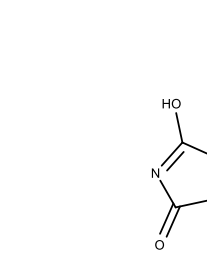
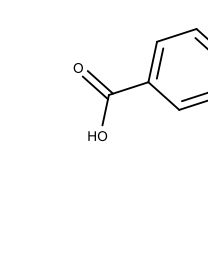
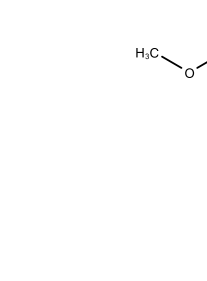
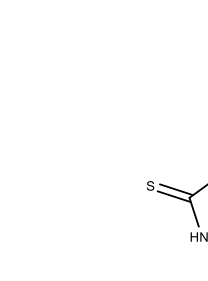
- Ühendite logIC<sub>50</sub> väärtuste hindamiseks kasutati loodud multilineaarset regressioonimudelit. Andmebaasidest valitud 11316-st ühendist jäeti alles ühendid, mille ennustatud logIC<sub>50</sub> (µM skaalal) väärtus oli väiksem kui 0.
- Allesjäänud 766 ühendi seast jäeti välja ühendid, mis ei vastanud füüsikalise-keemilistele kriteeriumitele (vt tabel 2, lk 17), saadi 508 ühendit.
- Teostati molekulaarsildamine Tdp1 substraadi sidumistaskusse ning arvutati seostumise vabaenergiad. Valiti välja molekulid, mille seostumisenergia oli madalam kui võrdlusemolekulil (vt joonis 8).
- Ülaltoodud protseduuride lõpptulemusena jäi alles 59 ühendit (vt tabelid 2L ja 3L lisades), millest valiti välja sobivad ühendid edasiseks eksperimentaalseks analüüsiks.

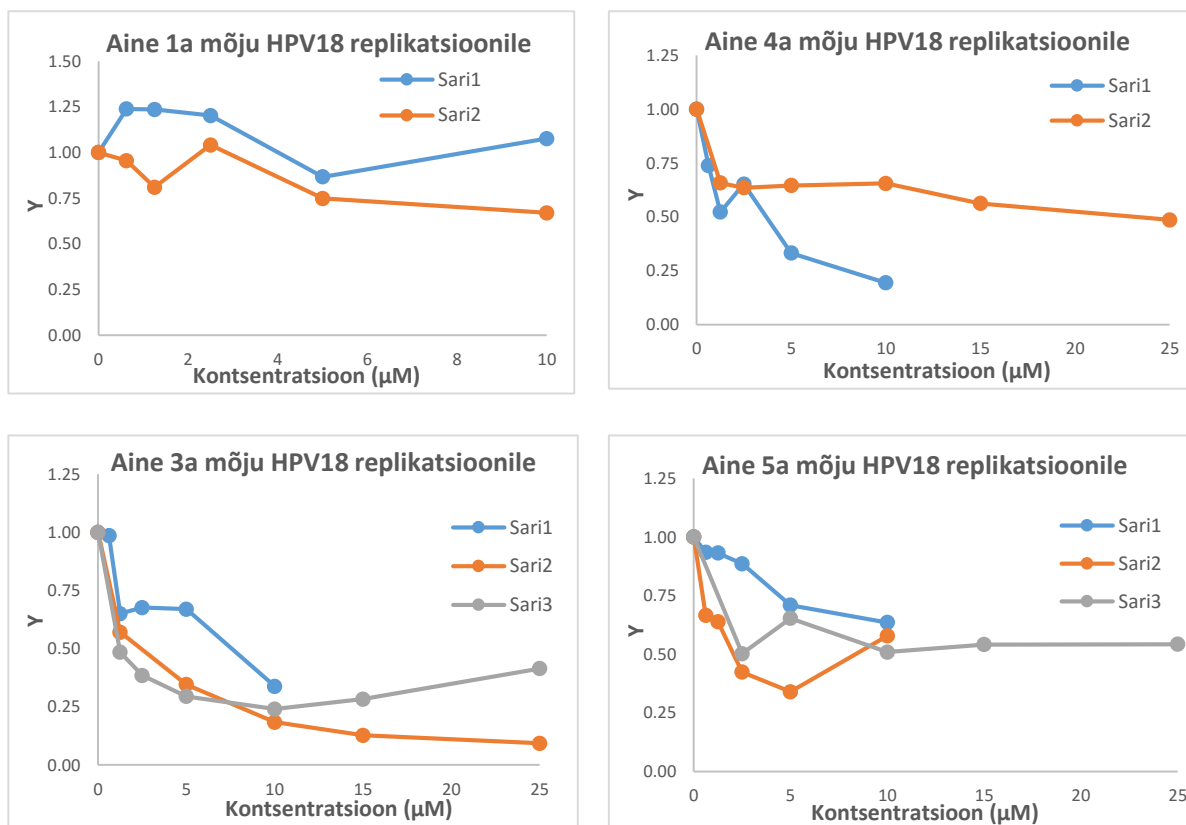
Katseteks osteti 8 saadaval olevat ühendit (vt tabel 4). Neist 4 olid virtuaalse sõelumise läbinud molekulid. Kaks ühendit valiti negatiivseks kontrolliks ühendite seast, mis virtuaalset sõelumist ei läbinud. Positiivse kontrollina valiti kaks ühendit, mis sisaldavad Tdp1 inhibiitorites olevat struktuurifragmenti [61]. Joonisel 9 on toodud ühendite 1a, 3a, 4a ja 5a inhibeerimisgraafikud. Positiivses kontrollis olevale ühendile 4a ning ühendi 3a Z-isomeerile on mõõdetud IC<sub>50</sub> väärtus Tdp1 suhtes [61]. Katsetes mõõdetud luminesentssignaalid on toodud lisades tabelis 4L.



**Joonis 8.** Võrdlusemolekuli 2D struktuur [61] ning tema ennustatud konformatsioon valgus Tdp1 sidumistaskus. Rohelised punktiirjooned tähistavad vesiniksidemeid. Toodud on ka arvutatud seostumise vabaenergia (*XPGScore*).

**Tabel 4.** Esimesse ühendite valimisse kuuluvate ühendite struktuurid. Toodud on ühendite Tdp1 inhibeerimise logIC50 väärtused (logIC50 – ennustatud), arvatatuna tabelis 3 toodud QSAR mudeli järgi ning molekulaarsildamise seostumisenergiad ( $\Delta G_{XPGScore}$ ).

Struktuur	logIC50 – ennustatud	$\Delta G_{XPGScore}$ (kcal/mol)	Struktuur	logIC50 – ennustatud	$\Delta G_{XPGScore}$ (kcal/mol)
<p><b>1a</b></p> 	-0,19	-9,01	<p><b>7a</b></p> 	-0,58	-10,00
<p><b>6a</b></p> 	-0,61	-8,36	<p><b>8a</b></p> 	-0,59	-7,72
Negatiivne kontroll					
<p><b>2a</b></p> 			<p><b>5a</b></p> 		
Positiivne kontroll					
<p><b>3a</b></p> 			<p><b>4a</b></p> 		



**Joonis 9.** Ühendite 1a, 3a, 4a ja 5a HPV18 replikatsiooni inhibeerimiskatsete tulemused. y-teljel on inhibeerimist iseloomustav suurus  $Y$  (vt valem 3 lk 20), x-teljel on inhibiitori kontsentratsioon. Erinevad sarjad kirjeldavad erinevatele transfektsioonidele vastavate inhibeerimiskatsete tulemusi.

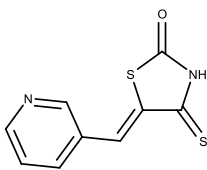
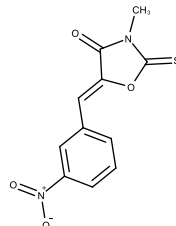
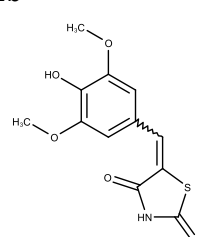
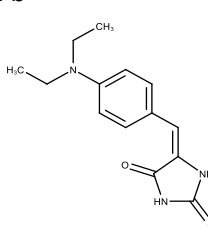
Esimese ühendite valimi puhul on näha, et kõige tugevamalt inhibeerib HPV replikatsiooni positiivseks kontrolliks valitud aine 3a. Aine 1a HPV replikatsioonile erilist mõju ei avalda. Aine 4a inhibeerib samuti HPV replikatsiooni, kuid sarjas 2 nõrgemini kui sarjas 1. Aine 5a puhul võib täheldada HPV replikatsiooni langust inhibiitori kontsentratsiooni kasvades, kuid alates teatud kontsentratsioonist jääb  $Y$  muutumatuks. Erinevate kordusmõõtmiste vahel ei ole üldjuhul hea kokkulangevus.

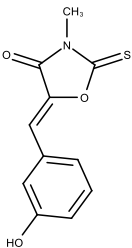
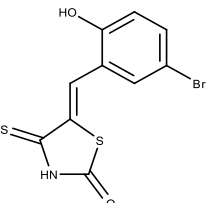
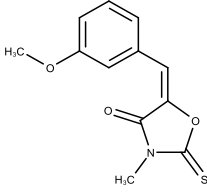
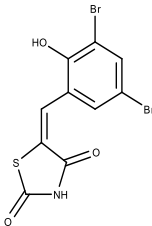
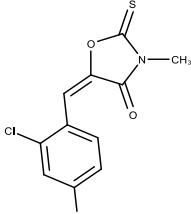
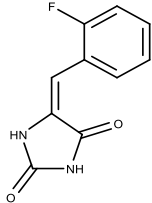
## 4.2 Teine ühendite valim

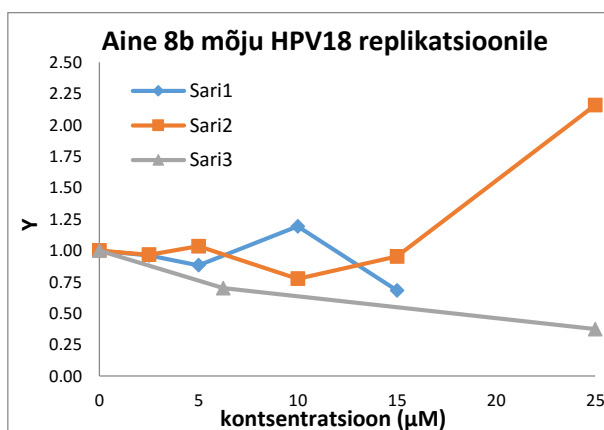
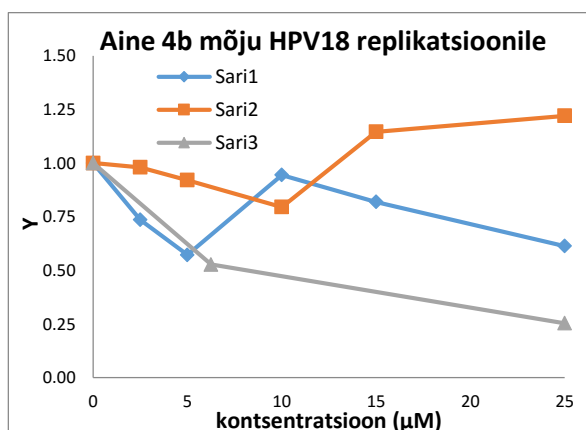
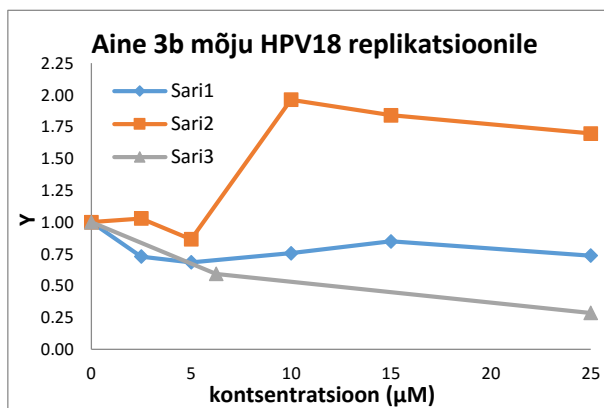
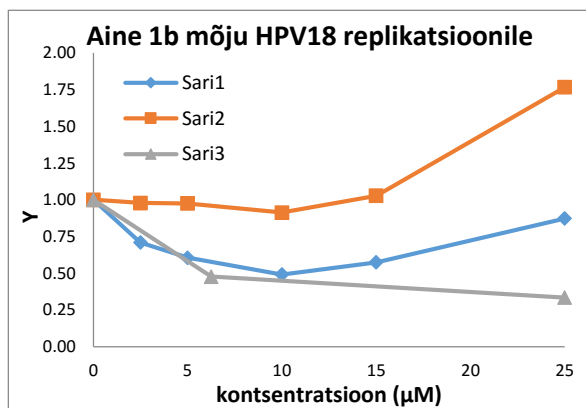
Teise ühendite valimi puhul lähtuti molekulaarsildamise tulemustest. Kasutati Zakharenko jt [78] töös kasutatud Tdp1 kristallstruktuuri (PDB kood: 1MU7) ning griidikasti koordinaate ( $x = 8,312$ ,  $y = 12,66$ ,  $z = 35,452$ ). Molekulaarsildamiseks valiti erinevaid aineklasse esindavad madala molekulmassiga ühendid. Aineklasside hulka kuulusid asendatud oksasolidiinid, tiasolidiinid, imidasolidiinid ja oksalidiinid (vt tabelid 5L ja 6L lisades). Molekulide seast valiti välja kümme kommertsiaalselt saadaval olevat ühendit parima sildamise seostumisenergia ning sildamise efektiivsuse (seostumise vabaenergia jagatud raskete aatomite arvuga) põhjal, hõlmates erinevaid ühendite klasse. Valitud ühendid on toodud tabelis 5.

Valitud kümne ühendiga sooritati inhibeerimiskatsed inhibiitori kontsentratsioonide 6,25 ja 25  $\mu\text{M}$  juures, mõõtmiste tulemused on toodud lisades tabelis 7L. Lähtudes saadud tulemustest, valiti välja aktiivsemad ühendid 1b, 3b, 4b ning 8b. Nende ühenditega otsustati sooritada korduskatsed, varieerides inhibiitorite kontsentratsioone, HPV replikatsiooni inhibeerimise IC50 väärtuse leidmise eesmärgil. Saadud inhibeerimiskõverad on toodud joonisel 10.

**Tabel 5.** Eksperimentaalseks analüüsiks valitud ühendite koodid, struktuurid, seostumisenergiad ( $\Delta G_{XPGScore}$ ) ning sildamise efektiivsused (LE).

Struktuur	$\Delta G_{XPGScore}$ (kcal/mol)	LE	Struktuur	$\Delta G_{XPGScore}$ (kcal/mol)	LE
<b>1b</b> 	-4,629	-0,331	<b>6b</b> 	-3,872	-0,215
<b>2b</b> 	-5,106	-0,269	<b>7b</b> 	-6,163	-0,324

<b>3b</b> 	-4,718	-0,295	<b>8b</b> 	-5,216	-0,326
<b>4b</b> 	-4,699	-0,276	<b>9b</b> 	-5,253	-0,309
<b>5b</b> 	-4,565	-0,269	<b>10b</b> 	-6,147	-0,41



**Joonis 10.** Ühendite 1b, 3b, 4b ja 8b HPV18 inhibeerimiskõverad. Erinevat värvi jooned tähistavad korduskatseid. Hallil joonel olevad punktid tähistavad tabelis 7L saadud tulemusi, mille alusel ühendid valiti. Erinevad sarjad kirjeldavad erinevatele transfektsioonidele vastavate inhibeerimiskatsete tulemusi.

Teise ühendite valimi puhul on näha, et erinevate katsete tulemused on vastuolulised. Sarja 3 puhul käituvad ühendid 1b, 3b, 4b ning 8b HPV replikatsiooni inhibiitoritena. Sarja 2 puhul on olukord vastupidine – kõrgema inhibiitori kontsentratsiooni puhul küündib Y väärtus märkimisväärselt üle ühe.

### 4.3 Tulemuste analüüs

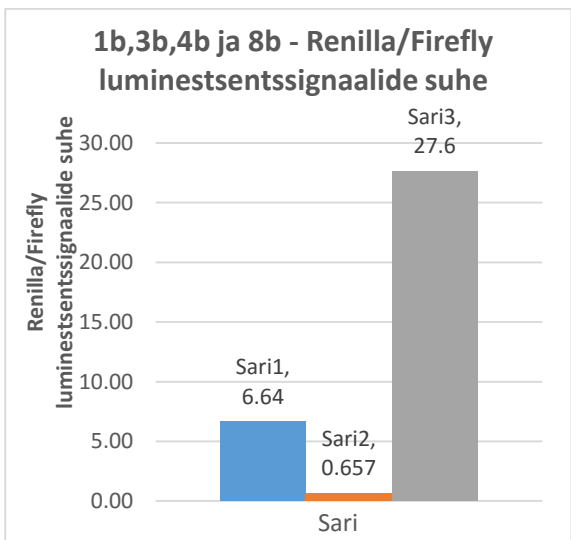
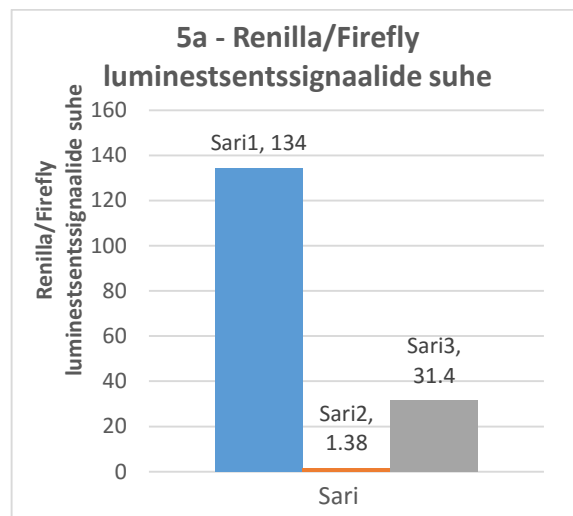
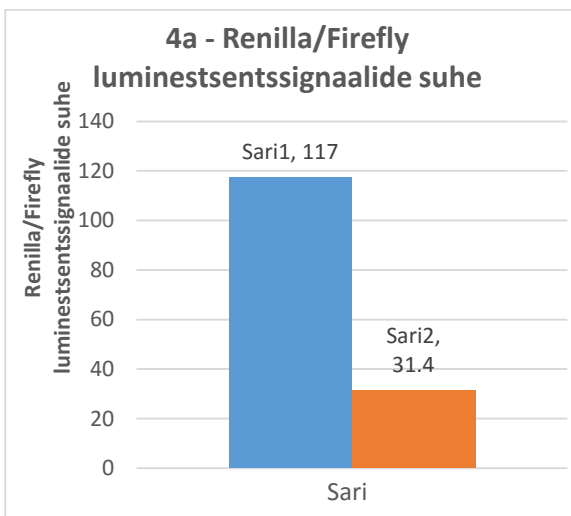
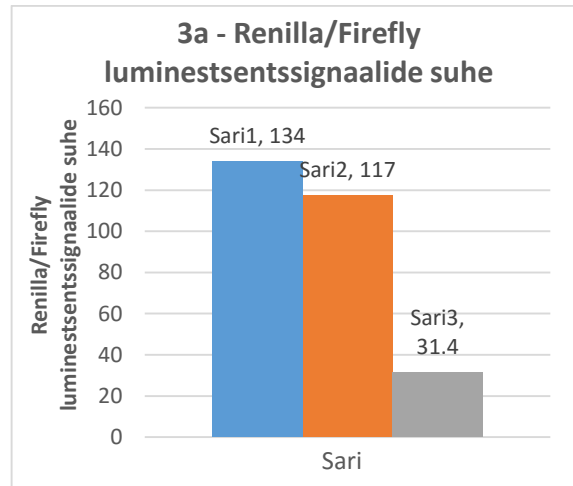
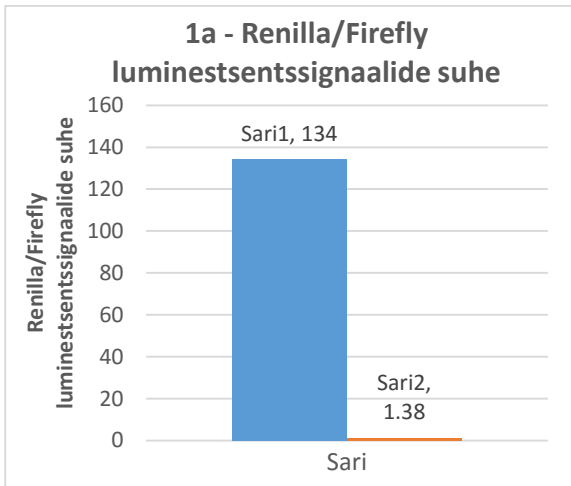
Nii esimese kui ka teise valimi puhul on näha, et HPV18 replikatsiooni inhibeerimise korduskatsete kokkulangevus ei ole üldjuhul hea. Katsetest saadud andmeid analüüsidest võib täheldada, et erinevate korduskatsete puhul on Renilla lutsiferaasi luminesentssignaalid kontroll-katsepunktides märkimisväärselt erinevad (vt tabel 4L lisades). Samas Firefly luminesentssignaalid erinevad korduskatsetes tunduvalt vähem. Firefly ja Renilla luminesentssignaalid kirjeldavad vastavalt U2OS rakkude ning HPV18 geneetilise materjali hulka vastavas proovis. Seega saab järeldada, et viiruse hulk on erinevate katsete puhul tugevalt varieeruv ja rakkude hulk vähem varieeruv.

Viiruse hulka rakkudes mõjutab transfektsiooni käigus rakku sisenevate plasmiidide hulk ning viiruse replikatsiooni intensiivsus rakkude kasvatamise perioodil. Transfektsiooniks kasutatakse rakkude suspensiooni vastavas söötmes ning tulenevalt sellest, et tegu on heterogeense süsteemiga, võib transfektsiooni efektiivsus erinevate katsete puhul suuremal või vähesemal määral erineda. Kuna Renilla lutsiferaasi luminesentssignaal on antud korduskatsete puhul väga tugevalt varieeruv, analüüsimise järgnevalt selle signaali seost uuritud ühendite inhibeerimisgraafikutel toodud tulemustega.

Rakkude ebaühtlase külvamise tõttu on erinevates katsepunktidest mõnevõrra erinev hulk rakke ja neis sisalduvat HPV18 DNA-d. Rakkude erineva hulga arvesse võtmiseks uuriti Renilla ja Firefly luminesentssignaalide suhet, mis näitab viiruse DNA kogust võrreldes U2OS rakkude DNA-ga. Jooniselt 11 on näha, et erinevatele transfektsioonidele vastavate korduskatsete Renilla/Firefly luminesentssignaalide suhted on väga erinevad.

Esmalt analüüsiti esimese ühendite valimi tulemusi (ühendid 1a, 3a, 4a ja 5a – vt joonised 9 ja 11). Ühend 1a ei käitu inhibiitorina sarjas 1 ega sarjas 2. Positiivse kontrolli ühendid 3a ja 4a inhibeerivad viiruse replikatsiooni sarjas 1, kus Renilla/Firefly luminesentssignaalide suhe on kõrge, viies HPV18 replikatsiooni iseloomustava suuruse  $Y$  madalale tasemele. Sarjades 2 ja 3 käitub ühend 3a samuti inhibiitorina, kuid sarja 3 puhul vähesemal määral – sarjas 3 on ka Renilla/Firefly luminesentssignaalide suhe tunduvalt madalam. Ühend 4a on sarjas 1 tugevam inhibiitor kui sarjas 2, samuti on sarja 1 puhul Renilla/Firefly luminesentssignaalide suhe tunduvalt kõrgem. Ühendi 5 puhul on näha, et sarjas 3 jääb  $Y$  väärtus muutumatuks  $\sim 0,5$  juures.

Ühendite valimi II puhul võib täheldada seost ainete inhibeeriva võime ( $Y$ ) ning kontrollpunkti Renilla/Firefly luminesentssignaalide suhete vahel (ühendid 1b, 3b, 4b ja 8b – vaata joonised 10 ja 11). Sarja 3 puhul käituvad ühendid 1b, 3b, 4b ja 8b inhibiitoritena, viies inhibiitori kontsentratsiooni  $25 \mu\text{M}$  juures  $Y$  väärtuse kuni  $0,25$ -ni. Sarja 2 puhul need ühendid inhibiitoritena ei käitu. Sarja 1 puhul ilmnevad inhibeerivad omadused väga vähesel määral. Lisaks on sarja 3 puhul Renilla/Firefly luminesentssignaalide suhe saadud tulemuste seas kõige kõrgem ning sarja 2 puhul vastavalt kõige madalam. Sarja 1 puhul on see suhe vahepealses piirkonnas. Need tulemused viitavad seosele viiruse DNA hulga ning HPV18 replikatsiooni kirjeldava suuruse  $Y$  vahel.



**Joonis 11.** Graafikutel on erinevatele transfektsioonidele vastavate korduskatsete kontrollpunktide Renilla ja Firefly lutsiferaaside luminescentssignaali suhete keskvaartused. Erinevad sarjad vastavad joonistel 9 ja 10 olevatele inhibeerimiskõveratele.

## 5. Kokkuvõte

Inimese papilloomiviirused (HPV-d) on laialt levinud DNA-viirused, mis põhjustavad mitmeid naha ja limaskestade haigusi, varieerudes soolatüügastest kuni vähini. Vaatamata HPV suurele levikule ning tema poolt põhjustatud haigustega kaasnevale koormale ühiskonnas, puudub jätkuvalt efektiivne HPV-vastane ravimeetod. Selektiivsed madalmolekulaarsed HPV-vastased inhibiitorid omavad suurt potentsiaali HPV-nakkuste ravis ning seeläbi viiruse poolt põhjustatud surmajuhtumite ennetamises.

Käesolevas töös anti ülevaade inimese papilloomiviiruse poolt põhjustatud haigustest ning nende ravivõimalustest. Sealjuures käsitleti erinevate viraalsete valkude rolli HPV elutsükli ning anti ülevaade senistest saavutustest nendele valkudele suunatud inhibiitorite arendamisel. Lähemalt tutvustati võimalusi takistada HPV replikatsiooni, kasutades inhibiitori sihtmärkidena inimese organismist pärit valke.

Käesoleva töö eesmärgiks oli leida uusi HPV-vastaseid inhibiitoreid, kasutades arvutuskeemia modelleerimisvõimalusi. Inhibiitori sihtmärkiks valiti inimese organismist pärit valk Tdp1, mis on HPV replikatsiooniks vajalik, kuid ei ole ilmingimata vajalik inimese enda rakkude diferentseerumiseks. Ühendite inhibeerimisvõime ennustamiseks kasutati nii molekulaarsildamist kui ka kvantitatiivseid struktuur-aktiivsus sõltuvusi. Parimate ennustatud aktiivsustega ühenditega teostati HPV18 replikatsiooni inhibeerimiskatsed rakuliini U2OS koekultuuris. Mõõtmistulemuste analüüsi tulemusel leiti seos viiruse hulga ning antud töös defineeritud ühendi inhibeerimisvõimet kirjeldava suuruse  $Y$  vahel. Suurema viiruse hulga juures mõjusid mõned testitud ühenditest, sealhulgas ka varasemalt teadaolev Tdp1 inhibiitor, HPV replikatsiooni inhibiitoritena. Seevastu madala viiruse hulga juures ei täheldatud suuruse  $Y$  langemist inhibiitori kontsentratsiooni kasvades. Selle efekti põhjuste väljaselgitamine nõuab kasutatud HPV replikatsiooni inhibiitorite aktiivsuse määramise meetodika detailsemat uurimist.

## 6. Summary

### Novel inhibitors against human papillomavirus

Mihkel Ugandi

Human papillomaviruses (HPVs) are widely spread DNA viruses that have been related to many diseases varying from warts to cancer. Despite being linked to a vast amount of cancer-related deaths, there is still no existing effective therapy against HPV. Selective small-molecule inhibitors targeted against HPV replication could be very useful in combating the various diseases caused by the virus.

In this work, a review was given on HPV-related diseases and their current treatment methods. The role of different viral HPV proteins and recent advances in developments of inhibitors for targeting those proteins were discussed. The possibility of targeting human proteins for inhibition of HPV replication was also mentioned.

The aim of this thesis was to find new inhibitors against HPV replication using computational chemistry methods. The human enzyme Tdp1 was chosen as a target for the inhibitors. Tdp1 has been shown to be necessary for the replication of HPV, but it is not essential for the differentiation of normal human cells. Molecular docking and quantitative structure-activity relationships were used to predict the inhibitory potency of the chosen compounds. The compounds with best predicted antiviral activity were purchased and analyzed in HPV18 replication inhibition assay. The measurement results indicate a presence of a relationship between the concentration of the virus and the inhibitory potency  $Y$ . At higher virus concentrations, several tested compounds showed inhibitory activity against HPV replication. However, at lower concentrations of the virus, a selective reduction of HPV replication could not be observed. The causes for this result will be subject to further work.

## 7. Kasutatud kirjandus

1. Bodily, J.; Laimins, L. A. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol.* **2011**, 19, 33-39.
2. Lowy, D. R. HPV vaccination to prevent cervical cancer and other HPV-associated disease: from basic science to effective interventions. *J. Clin. Invest.* **2016**, 126, 5-11.
3. D'Abramo, C. M.; Archambault, J. Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein - protein interactions. *Open Virol J.* **2011**, 5, 80-95.
4. Toots, M. Novel Means to Target Human Papillomavirus Infection. Tartu Ülikool.
5. Doorbar, J.; Egawa, N.; Griffin, H.; Kranjec, C.; Murakami, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.* **2015**, 25 Suppl 1, 2-23.
6. Bzhalava, D.; Eklund, C.; Dillner, J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* **2015**, 476, 341-344.
7. Munger, K.; Baldwin, A.; Edwards, K. M.; Hayakawa, H.; Nguyen, C. L.; Owens, M.; Grace, M.; Huh, K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.* **2004**, 78, 11451-11460.
8. Lacey, C. J. Therapy for genital human papillomavirus-related disease. *J. Clin. Virol.* **2005**, 32 Suppl 1, S82-90.
9. Erickson, B. K.; Alvarez, R. D.; Huh, W. K. Human papillomavirus: what every provider should know. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2013**, 208, 169-175.
10. Burd, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, 16, 1-17.
11. Walboomers, J. M. M.; Jacobs, M. V.; Manos, M. M.; Bosch, F. X.; Kummer, J. A.; Shah, K. V.; Snijders, P. J. F.; Peto, J.; Meijer, C. J. L. M.; Munoz, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **1999**, 189, 12-19.
12. McLaughlin-Drubin, M. E.; Munger, K. Viruses associated with human cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1782, 127-150.
13. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *CA: Cancer J. Clin.* **2011**, 61, 69-90.
14. Smith, J. S.; Melendy, A.; Rana, R. K.; Pimenta, J. M. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. *J. Adolesc. Health* **2008**, 43, S5-25, S25 e1-41.
15. Herrero, R.; Gonzalez, P.; Markowitz, L. E. Present status of human papillomavirus vaccine development and implementation. *The Lancet. Oncology* **2015**, 16, e206-216.

16. Scheinfeld, N.; Lehman, D. S. An evidence-based review of medical and surgical treatments of genital warts. *Dermatol. Online J.* **2006**, *12*, 5.
17. Stern, P. L.; van der Burg, S. H.; Hampson, I. N.; Broker, T. R.; Fiander, A.; Lacey, C. J.; Kitchener, H. C.; Einstein, M. H. Therapy of human papillomavirus-related disease. *Vaccine* **2012**, *30* Suppl 5, F71-82.
18. Heber, C. M.; Laimins, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med. Virol.* **2006**, *16*, 83-97.
19. McBride, A. A. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv. Virus Res.* **2008**, *72*, 155-205.
20. Bryan, J. T.; Brown, D. R. Association of the human papillomavirus type 11 E1()E4 protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology* **2000**, *277*, 262-269.
21. DiMaio, D.; Mattoon, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene* **2001**, *20*, 7866-7873.
22. Ashrafi, G. H.; Brown, D. R.; Fife, K. H.; Campo, M. S. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Res.* **2006**, *120*, 208-211.
23. McBride, A. A.; Jang, M. K. Current understanding of the role of the Brd4 protein in the papillomavirus lifecycle. *Viruses* **2013**, *5*, 1374-1394.
24. Doorbar, J.; Quint, W.; Banks, L.; Bravo, I. G.; Stoler, M.; Broker, T. R.; Stanley, M. A. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* **2012**, *30* Suppl 5, F55-70.
25. Schmitt, A.; Rochat, A.; Zeltner, R.; Borenstein, L.; Barrandon, Y.; Wettstein, F. O.; Iftner, T. The primary target cells of the high-risk cottontail rabbit papillomavirus colocalize with hair follicle stem cells. *J. Virol.* **1996**, *70*, 1912-1922.
26. Pyeon, D.; Pearce, S. M.; Lank, S. M.; Ahlquist, P.; Lambert, P. F. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000318.
27. Stubenrauch, F.; Laimins, L. A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin. Cancer Biol.* **1999**, *9*, 379-386.
28. Vande Pol, S. B.; Klingelutz, A. J. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology* **2013**, *445*, 115-137.
29. Bodily, J.; Laimins, L. A. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol.* **2011**, *19*, 33-39.
30. Buck, C. B.; Thompson, C. D.; Pang, Y. Y.; Lowy, D. R.; Schiller, J. T. Maturation of papillomavirus capsids. *J. Virol.* **2005**, *79*, 2839-2846.

31. Wang, Q.; Griffin, H.; Southern, S.; Jackson, D.; Martin, A.; McIntosh, P.; Davy, C.; Masterson, P. J.; Walker, P. A.; Laskey, P.; Omary, M. B.; Doorbar, J. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *J. Virol.* **2004**, 78, 821-833.
32. Fouts, E. T.; Yu, X.; Egelman, E. H.; Botchan, M. R. Biochemical and electron microscopic image analysis of the hexameric E1 helicase. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 4447-4458.
33. White, P. W.; Pelletier, A.; Brault, K.; Titolo, S.; Welchner, E.; Thauvette, L.; Fazekas, M.; Cordingley, M. G.; Archambault, J. 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.* **2001**, 276, 22426-22438.
34. Faucher, A. M.; White, P. W.; Brochu, C.; Grand-Maitre, C.; Rancourt, J.; Fazal, G. Discovery of small-molecule inhibitors of the ATPase activity of human papillomavirus E1 helicase. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 18-21.
35. Berg, M.; Stenlund, A. Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *J. Virol.* **1997**, 71, 3853-3863.
36. Yoakim, C.; Ogilvie, W. W.; Goudreau, N.; Naud, J.; Hache, B.; O'Meara, J. A.; Cordingley, M. G.; Archambault, J.; White, P. W. Discovery of the first series of inhibitors of human papillomavirus type 11: inhibition of the assembly of the E1-E2-Origin DNA complex. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 2539-2541.
37. White, P. W.; Titolo, S.; Brault, K.; Thauvette, L.; Pelletier, A.; Welchner, E.; Bourgon, L.; Doyon, L.; Ogilvie, W. W.; Yoakim, C.; Cordingley, M. G.; Archambault, J. Inhibition of human papillomavirus DNA replication by small molecule antagonists of the E1-E2 protein interaction. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 26765-26772.
38. Romanczuk, H.; Howley, P. M. Disruption of Either the E1-Regulatory or the E2-Regulatory Gene of Human Papillomavirus Type-16 Increases Viral Immortalization Capacity. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 3159-3163.
39. Mantovani, F.; Banks, L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **2001**, 20, 7874-7887.
40. Munger, K.; Basile, J. R.; Duensing, S.; Eichten, A.; Gonzalez, S. L.; Grace, M.; Zacny, V. L. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* **2001**, 20, 7888-7898.
41. DeFilippis, R. A.; Goodwin, E. C.; Wu, L.; DiMaio, D. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J. Virol.* **2003**, 77, 1551-1563.

42. Li, X. Q.; Coffino, P. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J. Virol.* **1996**, *70*, 4509-4516.
43. Baleja, J. D.; Cherry, J. J.; Liu, Z.; Gao, H.; Nicklaus, M. C.; Voigt, J. H.; Chen, J. J.; Androphy, E. J. Identification of inhibitors to papillomavirus type 16 E6 protein based on three-dimensional structures of interacting proteins. *Antiviral Res.* **2006**, *72*, 49-59.
44. Cherry, J. J.; Rietz, A.; Malinkevich, A.; Liu, Y. Q.; Xie, M.; Bartolowits, M.; Davisson, V. J.; Baleja, J. D.; Androphy, E. J. Structure Based Identification and Characterization of Flavonoids That Disrupt Human Papillomavirus-16 E6 Function. *PloS one* **2013**, *8*.
45. Malecka, K. A.; Fera, D.; Schultz, D. C.; Hodawadekar, S.; Reichman, M.; Donover, P. S.; Murphy, M. E.; Marmorstein, R. Identification and characterization of small molecule human papillomavirus E6 inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1603-1612.
46. Hougardy, B. M.; Maduro, J. H.; van der Zee, A. G.; de Groot, D. J.; van den Heuvel, F. A.; de Vries, E. G.; de Jong, S. Proteasome inhibitor MG132 sensitizes HPV-positive human cervical cancer cells to rhTRAIL-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 1892-1900.
47. Pajonk, F.; Grumann, T.; McBride, W. H. The proteasome inhibitor MG-132 protects hypoxic SiHa cervical carcinoma cells after cyclic hypoxia/reoxygenation from ionizing radiation. *Neoplasia* **2006**, *8*, 1037-1041.
48. Batman, G.; Oliver, A. W.; Zehbe, I.; Richard, C.; Hampson, L.; Hampson, I. N. Lopinavir up-regulates expression of the antiviral protein ribonuclease L in human papillomavirus-positive cervical carcinoma cells. *Antivir. Ther.* **2011**, *16*, 515-525.
49. Brehm, A.; Nielsen, S. J.; Miska, E. A.; McCance, D. J.; Reid, J. L.; Bannister, A. J.; Kouzarides, T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* **1999**, *18*, 2449-2458.
50. de la Cruz-Hernandez, E.; Perez-Cardenas, E.; Contreras-Paredes, A.; Cantu, D.; Mohar, A.; Lizano, M.; Duenas-Gonzalez, A. The effects of DNA methylation and histone deacetylase inhibitors on human papillomavirus early gene expression in cervical cancer, an in vitro and clinical study. *Virol. J* **2007**, *4*, 18.
51. Edwards, T. G.; Vidmar, T. J.; Koeller, K.; Bashkin, J. K.; Fisher, C. DNA damage repair genes controlling human papillomavirus (HPV) episome levels under conditions of stability and extreme instability. *PloS one* **2013**, *8*, e75406.
52. Pommier, Y.; Huang, S. Y.; Gao, R.; Das, B. B.; Murai, J.; Marchand, C. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2). *DNA Repair (Amst.)* **2014**, *19*, 114-129.

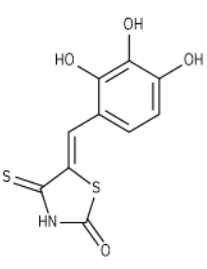
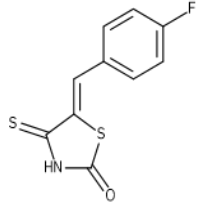
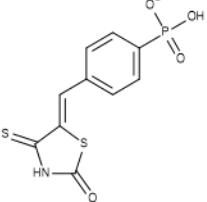
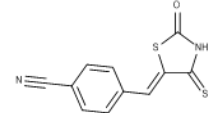
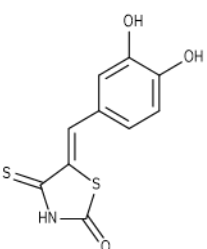
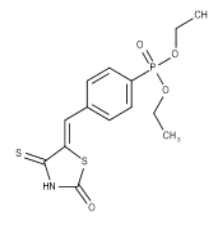
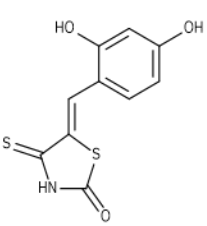
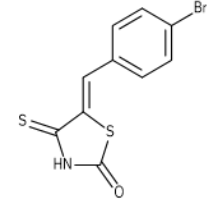
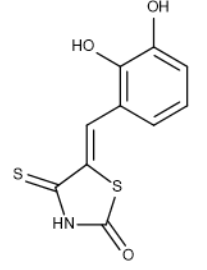
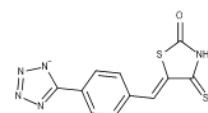
53. Das, B. B.; Huang, S. Y.; Murai, J.; Rehman, I.; Ame, J. C.; Sengupta, S.; Das, S. K.; Majumdar, P.; Zhang, H.; Biard, D.; Majumder, H. K.; Schreiber, V.; Pommier, Y. PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 4435-4449.
54. Alagoz, M.; Wells, O. S.; El-Khamisy, S. F. TDP1 deficiency sensitizes human cells to base damage via distinct topoisomerase I and PARP mechanisms with potential applications for cancer therapy. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 3089-3103.
55. Coleman, R. L.; Sill, M. W.; Bell-McGuinn, K.; Aghajanian, C.; Gray, H. J.; Tewari, K. S.; Rubin, S. C.; Rutherford, T. J.; Chan, J. K.; Chen, A.; Swisher, E. M. A phase II evaluation of the potent, highly selective PARP inhibitor veliparib in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer in patients who carry a germline BRCA1 or BRCA2 mutation - An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.* **2015**, *137*, 386-391.
56. Dexheimer, T. S.; Gediya, L. K.; Stephen, A. G.; Weidlich, I.; Antony, S.; Marchand, C.; Interthal, H.; Nicklaus, M.; Fisher, R. J.; Njar, V. C.; Pommier, Y. 4-Pregnen-21-ol-3,20-dione-21-(4-bromobenzenesulfonate) (NSC 88915) and Related Novel Steroid Derivatives as Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase (Tdp1) Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7122-7131.
57. Antony, S.; Marchand, C.; Stephen, A. G.; Thibaut, L.; Agama, K. K.; Fisher, R. J.; Pommier, Y. Novel high-throughput electrochemiluminescent assay for identification of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase (Tdp1) inhibitors and characterization of furamidine (NSC 305831) as an inhibitor of Tdp1. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4474-4484.
58. Lavecchia, A.; Di Giovanni, C. Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2839-2860.
59. Davies, D. R.; Interthal, H.; Champoux, J. J.; Hol, W. G. Crystal structure of a transition state mimic for Tdp1 assembled from vanadate, DNA, and a topoisomerase I-derived peptide. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 139-147.
60. Weidlich, I. E.; Dexheimer, T.; Marchand, C.; Antony, S.; Pommier, Y.; Nicklaus, M. C. Inhibitors of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase (hTdp1) developed by virtual screening using ligand-based pharmacophores. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 182-189.
61. Sirivolu, V. R.; Vernekar, S. K. V.; Marchand, C.; Naumova, A.; Chergui, A.; Renaud, A.; Stephen, A. G.; Chen, F.; Sham, Y. Y.; Pommier, Y.; Wang, Z. Q. 5-Arylideneethiothiazolidinones as Inhibitors of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase I. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8671-8684.

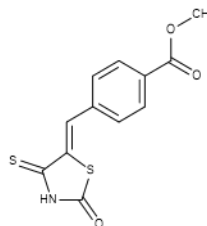
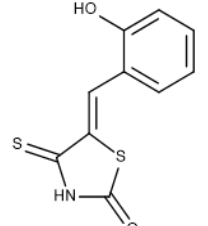
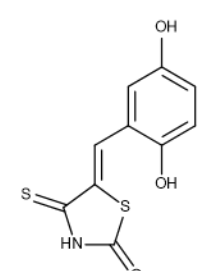
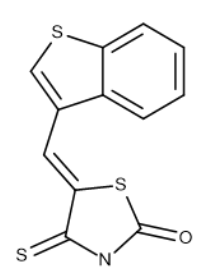
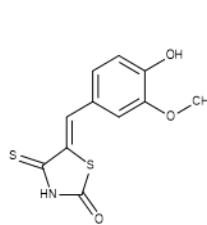
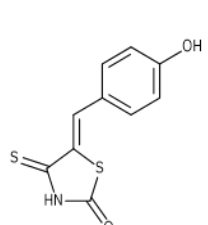
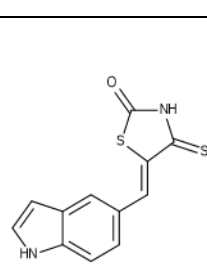
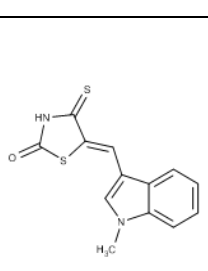
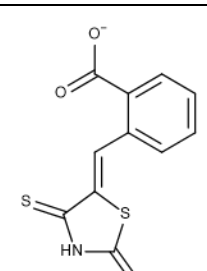
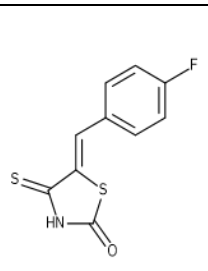
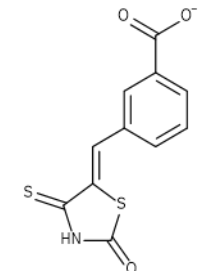
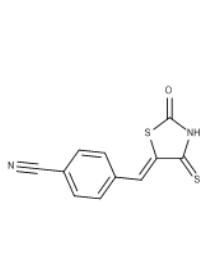
62. Bento, A. P.; Gaulton, A.; Hersey, A.; Bellis, L. J.; Chambers, J.; Davies, M.; Kruger, F. A.; Light, Y.; Mak, L.; McGlinchey, S.; Nowotka, M.; Papadatos, G.; Santos, R.; Overington, J. P. The ChEMBL bioactivity database: an update. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42, 1083-1090.
63. JChem 15.11.23.0, 2015, ChemAxon. [www.chemaxon.com/](http://www.chemaxon.com/).
64. Halgren, T. A. Merck molecular force field .1. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, 490-519.
65. Schrödinger Release 2015-3: MacroModel, version 10.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
66. Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2nd ed.; 2001.
67. CODESSA PRO. <http://www.codessa-pro.com/> (Viimati alla laetud 21.05.2016).
68. Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. The Development and Use of Quantum-Mechanical Molecular-Models .76. Am1 - a New General-Purpose Quantum-Mechanical Molecular-Model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3902-3909.
69. Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 1757-1768.
70. MolPort, Lacplesa iela 41, Riga, LV-1011, Latvia. [www.molport.com/shop/index](http://www.molport.com/shop/index).
71. Viswanadhan, V. N.; Ghose, A. K.; Revankar, G. R.; Robins, R. K. Atomic Physicochemical Parameters for 3 Dimensional Structure Directed Quantitative Structure - Activity Relationships .4. Additional Parameters for Hydrophobic and Dispersive Interactions and Their Application for an Automated Superposition of Certain Naturally-Occurring Nucleoside Antibiotics. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1989**, 29, 163-172.
72. Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3714-7.
73. Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (Viimati alla laetud 3.04.2016.).
74. Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-3: Glide, version 6.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
75. Banks, J. L.; Beard, H. S.; Cao, Y.; Cho, A. E.; Damm, W.; Farid, R.; Felts, A. K.; Halgren, T. A.; Mainz, D. T.; Maple, J. R.; Murphy, R.; Philipp, D. M.; Repasky, M. P.; Zhang, L. Y.; Berne, B. J.; Friesner, R. A.; Gallicchio, E.; Levy, R. M. Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *Journal of computational chemistry* **2005**, 26, 1752-1780.

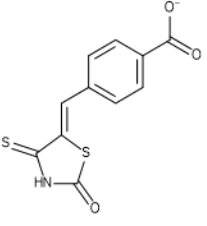
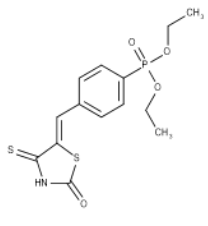
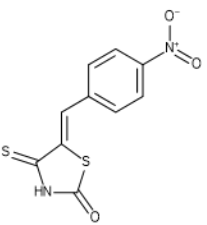
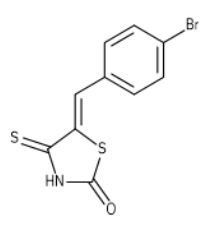
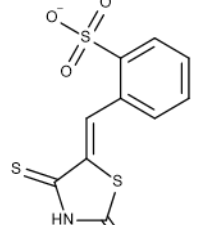
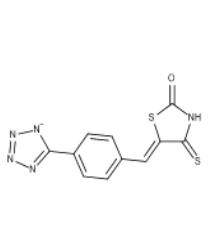
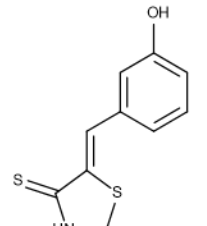
76. Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6177-6196.
77. Promega Corporation. *Dual-Luciferase Reporter Assay System* protokoll. [www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol/](http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol/) (Viimati alla laetud 29.04.2016).
78. Zakharenko, A.; Khomenko, T.; Zhukova, S.; Koval, O.; Zakharova, O.; Anarbaev, R.; Lebedeva, N.; Korchagina, D.; Komarova, N.; Vasiliev, V.; Reynisson, J.; Volcho, K.; Salakhutdinov, N.; Lavrik, O. Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 2044-2052.

## 8. Lisad

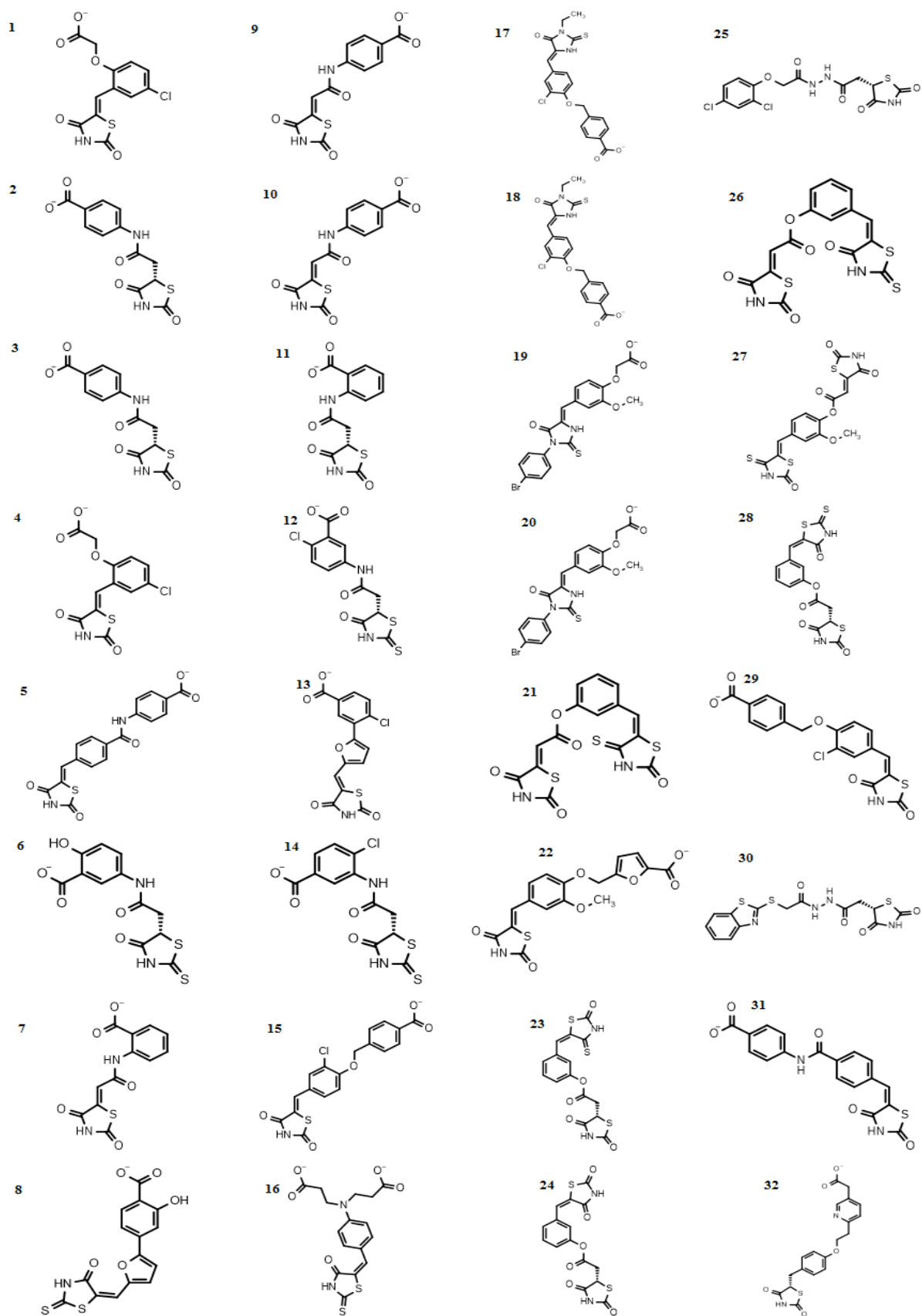
**Tabel 1L.** Multilineaarse regressioonimudeli treenimiseks kasutatud ühendid. Toodud on ka eksperimentaalsed ning regressioonivõrrandit kasutades arvutatud Tdp1 inhibeerimisele vastavad logIC50 väärtused.

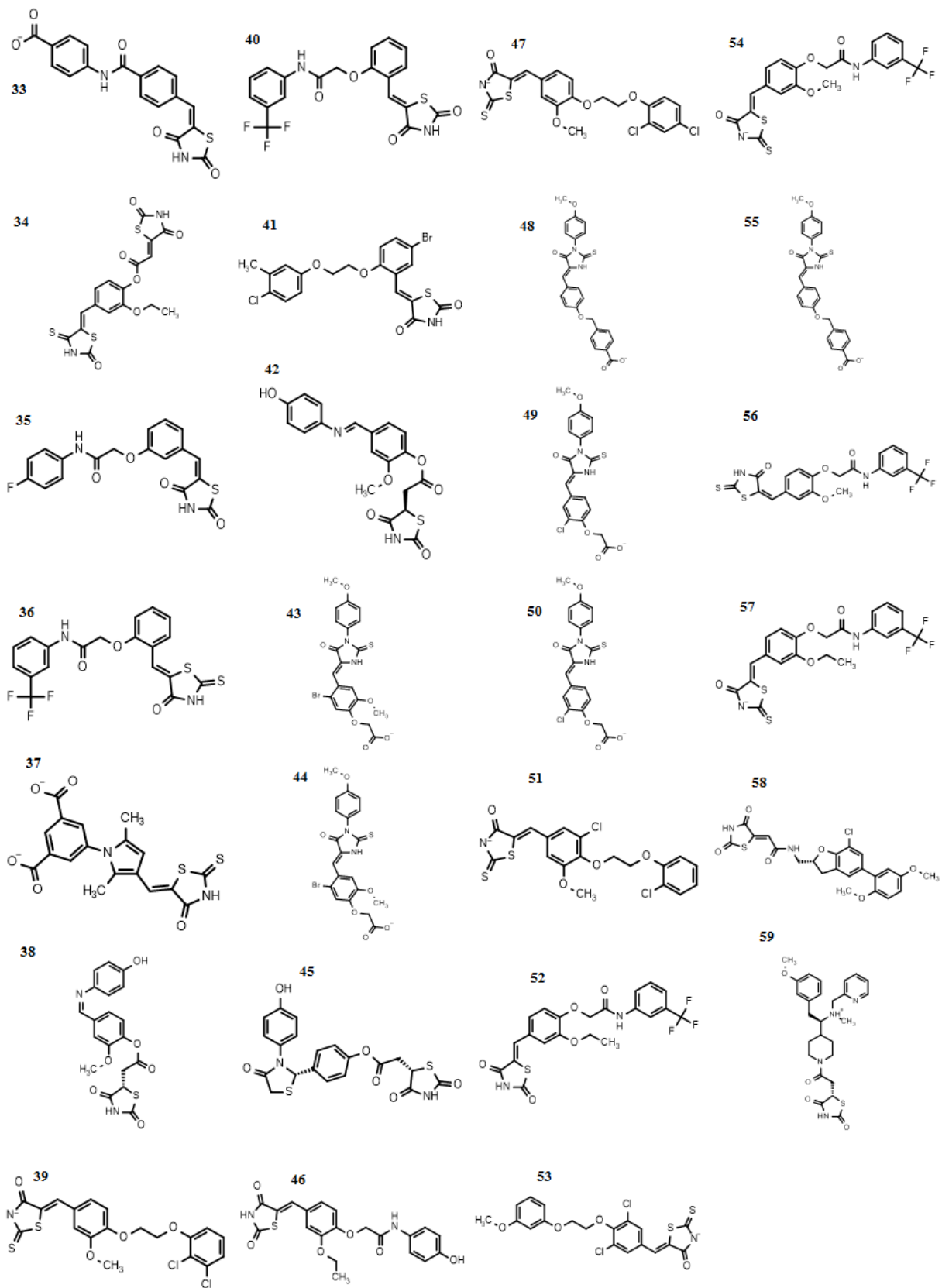
Nr	Struktuur	logIC50 eksp.	logIC50 teor.	Nr	Struktuur	logIC50 eksp.	logIC50 teor.
1		-0.060	0.048	16		1.431	1.536
2		0.342	0.594	17		1.447	1.602
3		0.415	0.565	18		1.462	1.549
4		0.613	0.605	19		1.477	1.474
5		0.763	0.660	20		1.505	1.619

6		0.826	1.321	21		1.531	1.315
7		0.851	0.745	22		1.531	1.730
8		1.041	1.212	23		1.591	1.359
9		1.079	1.165	24		1.602	1.616
10		1.176	1.210	25		1.643	1.729
11		1.176	1.061	26		1.663	1.732

12		1.204	1.076	27		1.681	1.223
13		1.279	1.119	28		1.708	1.375
14		1.301	1.214	29		1.875	1.751
15		1.415	1.366				

**Tabel 2L.** Virtuaalse sõelumise tulemusel saadud esimese ühendite valimi struktuurid. Ennustatud logIC50 väärtused ja molekulaarsildamise tulemused on tabelis 3L.





**Tabel 3L.** Tabelis 2L esitatud ühendite MolPorti ja ZINC andmebaaside koodid (Ühendi ID), ennustatud logIC50 väärtused, arvutatud seostumise vabaenergiad ( $\Delta G_{XPScore}$ ) ning molekulaarsildamise efektiivsused (LE).

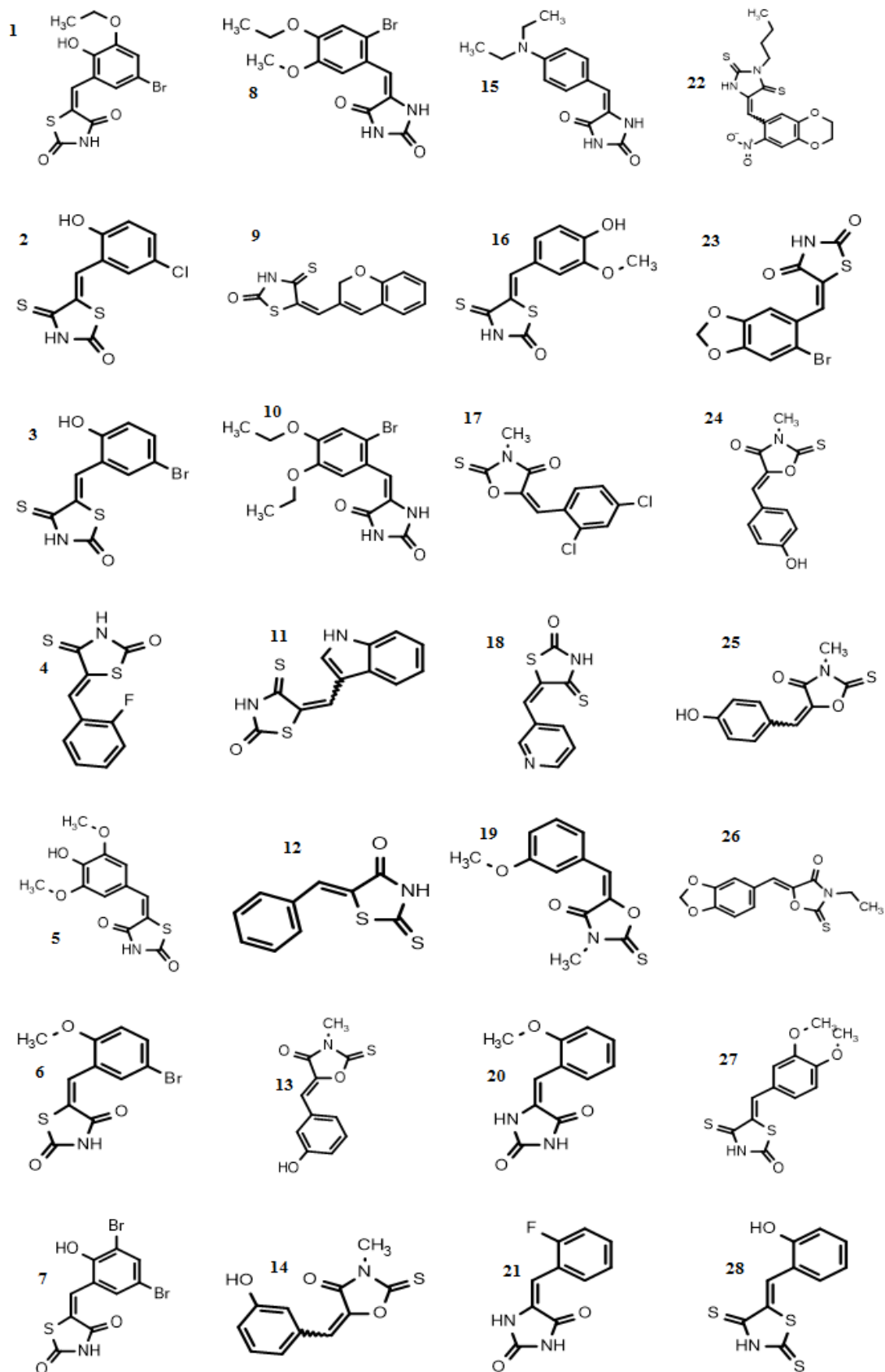
Nr	Ühendi ID	logIC50 teor.	$\Delta G_{XPScore}$ (kcal/mol)	LE	Nr	Ühendi ID	logIC50 teor.	$\Delta G_{XPScore}$ (kcal/mol)	LE
1	ZINC13914518	-0.099	-8.39	-0.420	31	ZINC04291612	-0.432	-7.67	-0.295
2	MolPort-000-436-696	-0.065	-7.75	-0.387	32	ZINC03784710	-0.280	-7.95	-0.294
3	ZINC19902414	-0.051	-7.75	-0.387	33	MolPort-019-856-662	-0.380	-7.64	-0.294
4	MolPort-001-662-513	-0.099	-7.73	-0.386	34	ZINC14904645	-0.242	-8.14	-0.291
5	MolPort-003-073-481	-0.578	-10.00	-0.385	35	ZINC15056298	-0.277	-7.41	-0.285
6	ZINC34926895	-0.395	-7.94	-0.378	36	ZINC15056124	-0.769	-8.19	-0.282
7	MolPort-000-304-928	-0.105	-7.52	-0.376	37	MolPort-002-333-115	-0.341	-7.63	-0.282
8	ZINC05816354	-0.089	-8.54	-0.371	38	MolPort-000-436-831	-0.440	-7.76	-0.277
9	ZINC33326940	-0.059	-7.39	-0.370	39	ZINC09763153	-0.200	-7.72	-0.276
10	MolPort-000-304-929	-0.040	-7.39	-0.370	40	ZINC15056445	-1.108	-7.97	-0.275
11	ZINC16905453	-0.032	-7.35	-0.368	41	MolPort-002-196-284	-0.165	-7.39	-0.274
12	ZINC34926869	-0.523	-7.67	-0.365	42	MolPort-002-353-54611043	-0.429	-7.56	-0.270
13	MolPort-002-952-680	-0.608	-8.36	-0.364	43	ZINC08399613	-0.420	-8.08	-0.269
14	ZINC34926871	-0.338	-7.37	-0.351	44	MolPort-019-753-961	-0.420	-8.08	-0.269
15	ZINC13426680	-0.600	-9.09	-0.350	45	ZINC28294999	-0.835	-8.03	-0.268
16	ZINC01652386	-0.450	-8.70	-0.348	46	ZINC15056418	-0.214	-7.74	-0.267
17	MolPort-002-235-435	-0.187	-9.01	-0.322	47	ZINC13940984	-0.145	-7.48	-0.267
18	ZINC01161754	-0.178	-9.01	-0.322	48	ZINC09295803	-0.181	-8.79	-0.266
19	MolPort-002-209-490	-0.305	-8.98	-0.321	49	ZINC08399624	-0.358	-7.36	-0.263
20	ZINC02831819	-0.210	-8.98	-0.321	50	MolPort-019-789-258	-0.358	-7.36	-0.263
21	ZINC14904657	-0.502	-8.02	-0.321	51	ZINC15800254	-0.028	-7.35	-0.262
22	ZINC33541579	-0.175	-8.32	-0.320	52	ZINC09434947	-0.028	-7.32	-0.262
23	ZINC14904648	-0.548	-7.86	-0.314	53	ZINC15056401	-0.834	-8.17	-0.255
24	ZINC14904650	-0.725	-7.84	-0.314	54	ZINC14359116	-0.829	-7.72	-0.249
25	ZINC15056982	-1.258	-7.50	-0.313	55	MolPort-002-937-833	-0.181	-8.17	-0.247
26	ZINC14904660	-0.411	-7.79	-0.312	56	MolPort-039-092-523	-0.550	-7.40	-0.239
27	ZINC14904622	-0.490	-8.29	-0.307	57	ZINC09664832	-0.592	-7.42	-0.232
28	ZINC14904654	-0.487	-7.49	-0.299	58	ZINC14968710	-0.017	-7.34	-0.229
29	MolPort-002-958-918	-0.586	-7.72	-0.297	59	ZINC12152017	-0.004	-7.32	-0.209
30	ZINC02200184	-0.066	-7.40	-0.296					

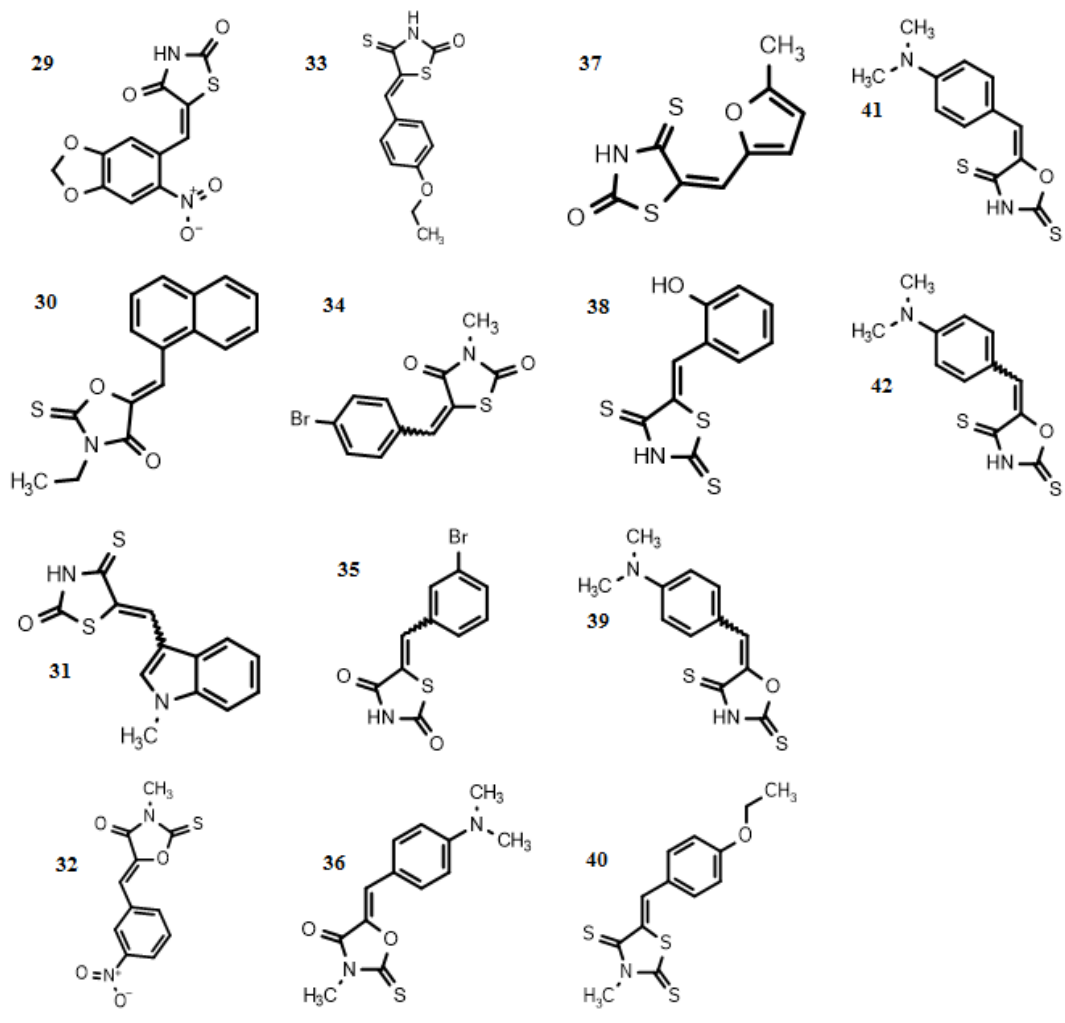
**Tabel 4L.** Ainete 1a-8a HPV replikatsiooni inhibeerimiskatsete tulemused. Toodud on Firefly ja Renilla lutsiferaaside luminesentssignaalide väärtused, ühikutes RLU (*relative light units*), erinevate inhibiitori kontsentratsioonide juures ja kontrollpunktides.

Aine kood	Konts (µM)	Firefly luminesentssignaal (RLU)				Renilla luminesentssignaal (RLU)					
1a	10	1237149		1029524		178453808		952 824			
	5	1138964		983481		132246240		1017973			
	2.5	1061374		954791		171104112		1375046			
	1.25	1194990		827467		197943872		927135			
	0.625	1181935		944595		196183616		1248282			
2a	10		1077314				129423104				
	5		1160676				123181952				
	2.5		1091200				133235160				
	1.25		966728				106298328				
	0.625		1183227				132100128				
3a	25		1418509		210437		15521185		2727137		
	15		1336928		518824		20049798		4591682		
	10	1852855	1486788		1220860	83981008	32135786		9175248		
	5	1610877	1196763		1223584	144673616	48582060		11275917		
	2.5	1394084			1137399	126369232			13687951		
	1.25	1405858	970270		1005509	122559344	65102016		15246605		
	0.625	1402830				185256048					
4a	25				645316	850710			9804112	14350382	
	15				946170	877748			16641539	16578260	
	10		1630363		1011342	913883		37195028	20731284	18391892	
	5		1341579		1021130	952369		52380924	20623452	20098196	
	2.5		1138073		841142	925908		87264656	16706673	19425820	
	1.25		1173433		985620	922357		71987096	20269396	22792364	
	0.625		1327590					115111208			
5a	25				1370547	1424347			23248140	23840996	
	15				1370995	1399781			23188894	19110044	
	10	2173324		1527844	1426920	1494077	184986880		1220754	22718270	20964752
	5	1778144		1514771	1289834	1347904	168968928		711829	26333032	23352230
	2.5	1586799		1201942	1320883	1334724	188331760		704560	20744544	23780878
	1.25	1557309		1046562			194454928		923906		
	0.625	1375397		1050872			172284144		967697		
6a	10		1288709					133502088			
	5		1074916					99024008			
	2.5		1090597					121645616			
	1.25		1099874					120505608			
	0.625		1047165					113531920			
7a	10	1282289		1037092			252470080		845375		
	5	1254384		886148			203084675		553340		
	2.5	1192133		866729			181112736		946878		
	1.25	1086411		957561			124647616		978412		

	0.625	1007226		979684			110456224		962143		
8a	10		1270943					141202608			
	5		1091473					109095984			
	2.5		1041604					109861568			
	1.25		1064228					99713344			
	0.625		1054110					109263000			
Kontroll		1266602	1172047	923688	905149		174879968	148016384	1277180	30444040	
		1188399	1172168		899298		154408384	127421080		28962058	

**Tabel 5L.** Teise ühendite valimi ühendite struktuurid. Ühendite molekulaarsildamise tulemused on tabelis 6L.





**Tabel 6L.** Tabelis 5L esitatud ühendite MolPorti, ZINC ja Vitas-M Laboratory andmebaaside koodid (Ühendi ID), arvutatud seostumise vabaenergiad ( $\Delta G_{XPScore}$ ) ning molekulaarsildamise efektiivsused (LE).

Nr	Ühendi ID	$\Delta G_{XPScore}$ (kcal/mol)	LE	Nr	Ühendi ID	$\Delta G_{XPScore}$ (kcal/mol)	LE
1	MolPort-002-163-053	-5.861	-0.308	22	MolPort-020-092-597	-4.055	-0.162
2	STL336904	-5.172	-0.323	23	MolPort-002-147-823	-4.691	-0.261
3	STK961895	-5.216	-0.326	24	MolPort-001-900-617	-4.109	-0.257
4	STK994582	-4.631	-0.309	25	MolPort-019-733-423	-4.109	-0.257
5	MolPort-001-894-784	-5.106	-0.269	26	MolPort-002-248-070	-0.865	-0.046
6	MolPort-002-810-314	-4.87	-0.286	27	MolPort-000-436-743	-4.55	-0.253
7	MolPort-001-919-511	-5.253	-0.309	28	MolPort-000-875-799	-3.957	-0.264
8	MolPort-002-221-699	-6.909	-0.345	29	MolPort-001-919-532	-5.784	-0.289
9	STL022725	-5.162	-0.287	30	MolPort-002-248-165	-4.219	-0.211
10	MolPort-002-222-819	-4.897	-0.233	31	MolPort-019-756-961	-4.43	-0.246
11	MolPort-027-853-854	-4.519	-0.266	32	MolPort-002-802-411	-3.872	-0.215
12	MolPort-000-420-057	-4.746	-0.339	33	STK994584	-4.456	-0.262
13	MolPort-001-942-485	-4.718	-0.295	34	MolPort-019-731-759	-4.435	-0.277
14	MolPort-019-735-071	-4.718	-0.295	35	MolPort-027-892-119	-4.305	-0.287
15	MolPort-002-937-564	-6.163	-0.324	36	STK396542	-4.171	-0.232
16	MolPort-000-875-793	-4.717	-0.277	37	STK994585	-4.918	-0.351
17	MolPort-002-111-297	-4.565	-0.269	38	MolPort-000-875-796	-3.892	-0.243
18	MolPort-004-493-371	-4.629	-0.331	39	MolPort-000-875-795	-4.143	-0.296
19	MolPort-001-942-488	-4.699	-0.276	40	MolPort-005-714-095	-4.066	-0.226
20	MolPort-007-564-700	-6.092	-0.381	41	MolPort-002-605-924	-4.353	-0.256
21	MolPort-002-198-012	-6.147	-0.41	42	MolPort-019-729-432	-4.353	-0.256

**Tabel 7L.** Valim II hulgast valitud ühendite 1b-10b HPV18 inhibeerimiskatsete tulemused. Toodud on Renilla ja Firefly lutsiferaaside luminesentssignaalide väärtused, ühikutes RLU (*relative light units*), erinevate inhibiitori kontsentratsioonide juures ja inhibeerimist kirjeldava suuruse *Y väärtus*. K tähistab kontrollpunkti.

Aine kood	Kontsentratsioon ( $\mu\text{M}$ )	Firefly luminesentssignaal (RLU)	Renilla luminesentssignaal (RLU)	Y
1b	25	737099	6774989	0.333593
	6.25	845169	11094869	0.476445
2b	25	365009	14127604	1.40475
	6.25	815524	20756186	0.92373
3b	25	756390	5950240	0.285511
	6.25	916679	14980708	0.593129
4b	25	549277	3826666	0.25285
	6.25	859407	12466599	0.526482
5b	25	623264	4428201	0.257863
	6.25	1051782	21179552	0.730845
6b	25	645196	6119141	0.344218
	6.25	720532	14029015	0.706656
7b	25	239103	5274389	0.800611
	6.25	773535	16860730	0.791099
8b	25	773854	7966069	0.373611
	6.25	1030521	19872374	0.699886
9b	25	1139003	27052672	0.862024
	6.25	1227011	42534800	1.258143
10b	25	1361598	25738800	0.686078
	6.25	1360146	29487132	0.786831
K		1237099	33783496	0.991139
K		1236562	36692560	1.076952
K		1436351	39730592	1.003919
K		1134831	29016196	0.92799

## 9. Infoleht

### Uudsed inimese papilloomiviiruse inhibiitorid

Inimese papilloomiviirused (HPV-d) on laialt levinud DNA-viirused, mida on seostatud erinevate haigustega, sealhulgas emakakaelavähiga. Käesoleva töö eesmärgiks oli leida uusi HPV replikatsiooni takistavaid inhibiitoreid, kasutades arvutuskeemia meetodeid ühendite HPV-vastase aktiivsuse ennustamisel. Inhibiitorite märklauaks valiti rakuline valk türosüül-DNA-fosfodiesteras 1 (Tdp1), mida on seostatud HPV replikatsiooniga. Molekulaarsildamise ja virtuaalse sõelumise abil valitud ühendite HPV-vastast aktiivsust uuriti rakupõhises *in vitro* katsesüsteemis. Mõõtmistulemuste analüüsil leiti seos ühendite inhibeerimisvõime ning viiruse hulga vahel. Testitud ühendite seas oli mitmeid inhibiitoreid, mis takistasid HPV replikatsiooni suurema viiruse hulga juures. Samas täheldati, et madalama HPV sisalduse juures need ühendid märkimisväärset inhibeerivat toimet ei omanud. Selle efekti detailsem uurimine on järgmiseks sammuks uute HPV-vastaste ühendite otsingul.

**Märksõnad:** inimese papilloomiviirus, emakakaelavähk, molekulaarsildamine, virtuaalne sõelumine.

### Novel inhibitors against human papillomavirus

Human papillomaviruses (HPVs) are widely spread DNA viruses that have been associated with various diseases, including cervical cancer. The aim of this thesis was to find novel inhibitors against HPV replication, using computational chemistry methods in order to predict the antiviral activity of chosen compounds. The target for the inhibitors was human enzyme tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 1 (Tdp1), which has been linked to replication of HPV. Compounds selected using virtual screening and molecular docking were tested for antiviral activity in *in vitro* cell-based assay. The results of the measurements revealed that several of the tested compounds possess inhibitory activity of HPV replication at higher concentrations of the virus. However, at lower concentrations of the virus, the inhibition of HPV replication by those compounds was not observed. The causes for this result will be subject to continuous work in the future.

**Keywords:** human papillomavirus, cervical cancer, molecular docking, virtual screening.

## 10. Litsents

### Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mihkel Ugandi

(sünnikuupäev 30.05.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Inimese papilloomiviiruse uudsed inhibiitorid“, mille juhendajaks on Mati Karelson
  - 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 **30.06.2019** 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, **26.05.2016.**