

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

cAMP-sõltuva kinaasi mõju inimese papilloomiviiruse tüüp 5 replikatsioonile

Magistritöö

30 EAP

Elina Lototskaja

Juhendajad: Alla Piirsoo, PhD

Marko Piirsoo, PhD

Tartu 2021

cAMP-sõltuva kinaasi mõju inimese papilloomiviiruse tüüp 5 replikatsioonile

Inimese papilloomiviirused on kaheaheelalise DNA genoomiga viirused, mis nakatavad naha- ja limaskestas basaalkihi keratinotsüüte. Mõned HPV-d võivad põhjustada pahaloomuliste kasvujate teket. HPV elutsükli üksikasjalik uurimine aitaks töötada välja efektiivseid ravi strateegiaid. HPV replikatsioon sõltub viiruse E1 ja E2 valkudest, mille bioloogilist aktiivsust kontrollivad mitmed rakkulised valgud, sealhulgas ka proteiinkinaasid. Käesolev magistritöö raames leiti, et cAMP-sõltuv proteiinkinaas (PKA) reguleerib negatiivselt HPV tüüp 5 replikatsiooni U2OS rakkudes. PKA signaaliraja aktivatsioon erinevate farmakoloogiliste ainete (IBMX, forskoliin) lisamisel põhjustas HPV5 E2 valgu viimist proteasoomsele degradatsioonile.

Märksõnad: inimese papilloomiviirus (HPV), replikatsioon, transkriptsioon, E1, E2, proteiinkinaas A (PKA)

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The impact of cAMP-dependent kinase on the replication of human papillomavirus type-5

Human papillomaviruses (HPV) are double stranded DNA viruses, which infect basal keratinocytes of cutaneous and mucosal epithelia. Some HPVs can cause malignant tumors. Detailed study of HPV lifecycle can help effective treatment development. HPV replication depends on viral E1 and E2 proteins, which biological activity is controlled by various cell proteins including protein kinases. In present study it was discovered that cAMP-dependent protein kinase (PKA) negatively regulates replication of HPV type 5 in U2OS cells. Activation of PKA signalling by different pharmacological agents (IBMX, forskolin) led to proteasomal degradation of the HPV5 E2 protein.

Keywords: human papillomavirus (HPV), replication, transcription, E1, E2, protein kinase A (PKA)

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Papilloomiviirused	8
1.2 Inimese papilloomiviirused.....	8
1.2.1 Beeta HPV-d	10
1.3 HPV elutsükel	10
1.3.1 Sisenemine rakku	11
1.3.2 Transiente replikatsioon.....	12
1.3.3 Latentne periood	12
1.3.4 Vegetatiivne replikatsioon	12
1.3.5 Virionide kokkupakkimine ja väljumine rakust.....	13
1.4 E1 ja E2 valgud kui HPV replikatsiooni “meistrid”	13
1.4.1 E1	13
1.4.2 E2	14
1.5 E1 ja E2 valkude aktiivsust reguleerivad rakulised proteiinkinaasid	15
1.5.1 Proteiinkinaas A.....	16
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	18
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2 Materjalid ja meetodika	19
2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid ja kemikaalid.....	19
2.2.2 Kasutatud rakuliinid ja söötmed	20
2.2.3 Rakkude transfektsioon.....	20
2.2.4 Totaalse DNA eraldamine U2OS rakkudest	21
2.2.5 Nluc aktiivsuse mõõtmine.....	22
2.2.6 Aluselise fosfataasi (AP) aktiivsuse mõõtmine	22
2.2.7 MTS analüüs	22
2.2.8 Southern blot (SB) ja hübriidisatsioon.....	22
2.2.9 Western blot (WB) ja immuunsadestamine	23
2.2.10 In vitro kinaasi katsed	24
2.2.11 Totaalse RNA eraldamine ja cDNA süntees.....	25
2.2.12 Episomaalse DNA eraldamine HIRT lüüsi meetodil	26
2.3 Tulemused.....	27
2.3.1 Uute HPV5 replikatsiooni mõjutavate ühendite testimise tingimuste väljatöötamine	27
2.3.2 Mitmete leitud HPV5 inhibiitorite analüüs PKA signaaliraja kontekstis	30
2.3.3 Endogeense PKA aktiivsuse muutus mõjutab HPV5 replikatsiooni	32
2.3.4 Üleekspresseeritud PKA inhibeerib HPV5 replikatsiooni katalüütilisest aktiivsusest sõltuvalt	33
2.3.5 PKA surub maha HPV5 genoomi replikatsiooni viirusinfektsiooni stabiilse säilimise faasis	36

2.3.6	PKA suunab HPV5 E2 valgu proteasoomsele degradatsioonile.....	37
2.3.7	PKA pärsib HPV5 transkriptsiooni E2 valgust sõltuvalt	40
2.4	Arutelu	42
KOKKUVÕTE		45
Summary		46
KIRJANDUSE LOETELU		48
KASUTATUD VEEBIAADRESSID		57
LISAD.....		58
LISA 1. Töös kasutatud praimerid		58
LIHTLITSENTS		59

KASUTATUD LÜHENDID

AP – aluseline fosfataas (*alkaline phosphatase*)

Brd4 – rakulise kromtiini siduv faktor (*bromodomain-containing protein 4*)

C – katalüütiline (subühik)

cAMP – tsükliline adenosiinmonofosfaat (*cyclic adenosine monophosphate*)

CBS – tsükliini sidumismotiiv (*cyclin binding motif*)

Cdk2 – tsükliini-sõltuv kinaas II (*cyclin-dependent kinase II*)

cDNA – komplementaarne DNA (*complementary DNA*)

CK2 – kaseiinkinaas II (*casein kinase II*)

CX4945 – CK2 inhibiitor

db-cAMP – dibutüüül-cAMP

dsDNA – kaheahelaline DNA (*double-stranded DNA*)

EV – *Epidermodysplasia verruciformis*

FDU – fluor-desoksüüridiin

FGFR3 – fobroblasti kasvufaktori retseptor 3 (*fibroblast growth factor receptor 3*)

GPCR – G-valgu seotud retseptor (*G-protein coupled receptor*)

HPV – inimese papilloomiviirus (*human papillomavirus*)

H89 – N-[2-(metüülamiin)etüül]-5-isohünoliin-sulfonamiid

IBMX – 3-isobutüül-1-metüül-ksanteen

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

K72R – lüsiini aminohappejääk 72. positsioonis asendatud arginiiniga

MAPK – mitogeen aktiveeritud proteiinkinaas (*mitogen activated protein kinase*)

MG-132 – proteasoomi inhibiitor

ND10 – tuuma kehakesed (*nuclear bodies*)

NES – tuuma eksportsignaal (*nuclear export signal*)

NLS – tuuma lokalisatsioonisignaal (*nuclear localization signal*)

PEI – polüetüleenimiin

PKA – cAMP sõltuv proteiinkinaas

PV – papilloomiviirus

R – regulatoorne (subühik)

SB – Southern blot

Tdp1 – türosüül-DNA fosfodiesteraasi inhibiitor

T197A – treoniini aminohappejääk 197. positsioonis asendatudalaniiniga

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

WB – Western blot

wt – metsiktüüp (*wild type*)

SISSEJUHATUS

Inimese papilloomiviirused (HPV – *Human Papillomavirus*) on kaheaheelalise DNA genoomiga viirused, mis nakatavad nii naha- kui ka limaskestast basaalseid keratinotsüüte ja on sõltuvad nende diferentseerumisprogrammist. Tavaliselt püsib viirus organismis latentsena ja infektsioon kulgeb asümptomaatiliselt. Madalariski tüübid võivad põhjustada healoomusliste kasvajate teket – tüükaid, papilloome ja kondüloome. Kõrgeriski tüübid võivad aga viia pahaloomuliste kasvajate tekkeni. HPV-de elutsükli ja selle peremeesrakkudega koostoime uurimine lubaks rakendada omandatud teadmisi HPV infektsiooni teraapia väljatöötamises.

Kuigi suurem osa tänapäeval teadaolevatest HPV tüüpe on avastatud juba aastakümneid tagasi, pole veel seniajani väljatöötatud efektiivseid ravimeid nende vastu. Põhjuseks on see, et HPV elutsükkel on tihedalt seotud epiteelkoe diferentseerumisprogrammiga ning viiruse soodsate tingimuste loomine laboris on äärmiselt keeruline. Seepärast kasutatakse selleks osteosarkoomi rakuliini U2OS, milles on võimalik saavutada keratinotsüütidega väga sarnast geenide ekspressiooni.

HPV replikatsiooni inhibeerimine on üks olulisem strateegia HPV-sõltuvate infektsioonide ravis. Seepärast on tähtis selgitada HPV ja peremeesrakkude omavaheliste interaktsioonide molekulaarset tausta, et vältida rakkude kahjustamist viiruse infektsioonitsükklisse sekkumisel. Proteiinkinaasid on olulised mitmete bioloogiliste protsesside regulaatorid rakkudes. HPV replikatsiooniks kõige hädavajalikud valgud E1 ja E2 on substraatideks suurele hulgal rakulistele kinaasidele, sealhulgas ka cAMP-sõltuva proteiinkinaasidele (PKA). Varasemalt on näidatud, et mitmed kinaasid osalevad erinevate HPV tüüpide replikatsiooni regulatsioonis (Ma *et al.*, 1999; Piirsoo *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2007).

Antud magistritöö esimeses osas kirjeldatakse inimese papilloomiviiruse elutsükli, puudutakse täpsemalt E1 ja E2 valkude ehitust ja funktsioone ning kirjeldatakse erinevate proteiinkinaaside rolli (täpsemalt PKA) peremeesrakkudes ja viiruse elutsükklis. Eksperimentaalne osa jaguneb kaheks: esimeses töötatakse välja HPV tüüp 5 kemikaalide raamatukogu testimise tingimusi. Teises uuritakse PKA mõju HPV tüüp 5 transientsele ja stabiilsele replikatsioonile ja selgitatakse primaarset PKA sihtmärki. Magistritöö koostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi molekulaarse viroloogia uurimisgrupis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Papilloomiviirused

Papilloomiviirused (PV-d ehk *Papillomaviruses*) on laialt levinud viirused, mis nakatavad epiteelkoe keratinotsüüte. PV-de liigi- ja koespetsiifilisus määrab nende võimet nakatada erinevaid selgroogseid loomi: imetajaid, linde, kalu ja roomajaid (Pinidis *et al.*, 2016; Bernard *et al.*, 2010). PV-del on ikosaeedriline membraanita virion, mille sees on umbkaudu 8 kb suurune tsirkulaarne dsDNA. Nende genoom kodeerib kuni 8 geeni ja on pakitud kromatiini rakuliste histoonide abil (Favre *et al.*, 1977).

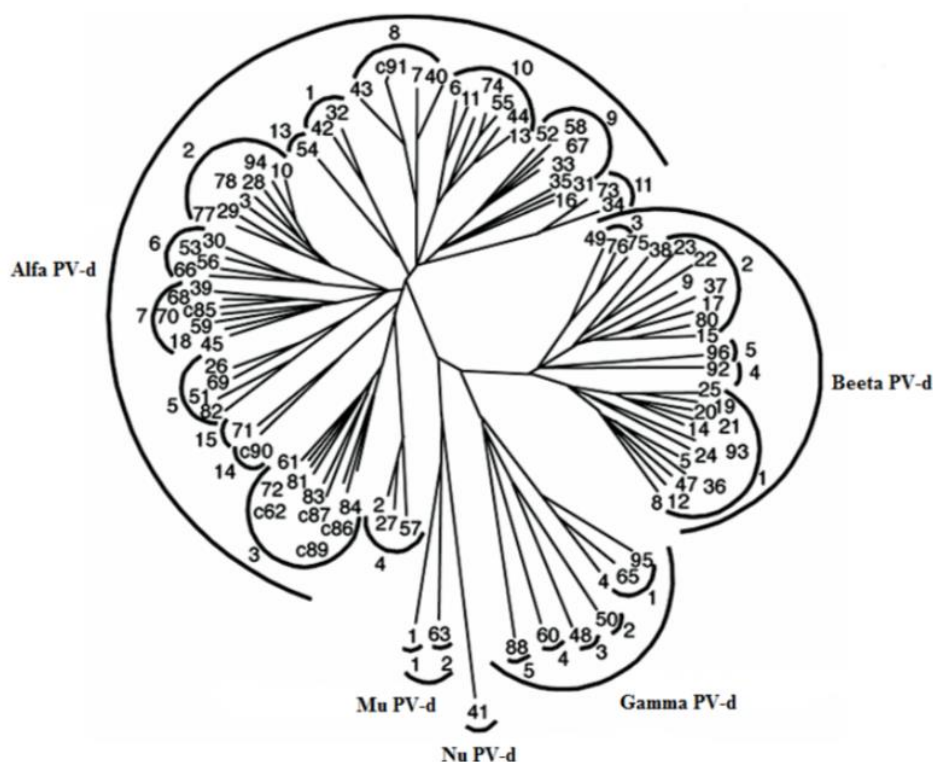
PV-d kuuluvad *Papillomaviridae* sugukonda ja tänaseks on teada üle 400 tüübi, millest umbes 200 on inimest nakatavad papilloomiviirused (<https://pave.niaid.nih.gov/>). PV-de klassifitseerimiseks võetakse aluseks genoomi kõige konserveerunuma lugemisraami nukleotiidne järjestus, milleks on L1 kapsiidi valgu kodeeriv lugemisraam. Kui uue isoleeritud viiruse L1 lugemisraam erineb eelnevalt kirjeldatud L1 lugemisraamidest vähemalt 10%, siis loetakse teda uueks tüübiks (Bernard *et al.*, 2010).

1.2 Inimese papilloomiviirused

Inimese PV-d (HPV-d ehk *Human Papillomaviruses*) on inimeste naha- ja limaskestas basaalkihi keratinotsüüte nakatavad viirused. Fülogeneetiliselt jagatakse HPV-d alfa-, beeta-, gamma-, mu- ja nu perekonda (Syrjänen, 2018) (Joonis 1). HPV tüübid, mis kuuluvad alfa perekonda nakatavad põhiliselt suu- ja suguelundite limaskestas ning väliseid suguelundeid. Kõik ülejäänud nakatavad naha epiteelkudet. Lisaks sellele jagatakse HPV-d patoloogia iseloomu põhjal madala- ja kõrgeriski viirusteks. Madalariski HPV tüübid võivad põhjustada healoomulisi kasvaid ehk tüükaid ja papilloomi. Näiteks HPV6 ja HPV11 põhjustavad healoomulisi tüükaid suguelunditel, HPV1, HPV2 ja HPV4 aga nahal (kätel ja jalgadel) (La Rosa *et al.*, 2013). Kõrgeriski viiruste tüübid, nagu näiteks HPV16, HPV18, HPV31 jne, omavad onkogeenset potentsiaali. Kõige laiemalt levinud HPV poolt tekitatud pahaloomuline kasvaja on emakakaelavähk (99,7% juhtudest seostatakse HPV infektsiooniga) (Walboomers *et al.*, 1999). Samuti põhjustab HPV ka teisi pea-, kaela-, naha- ja anogenitaalpiirkonna kasvaid.

Esmane lähemine HPV nakkuse ennetamiseks hõlmab endas nii riski vähendamist kui ka vaktsiinide kasutamist. Kuna põhiline osa pahaloomuliste kasvajate tekkimisel on seotud viiruse edasikandumisel sugulisel teel, siis on kondoomi kasutamine oluliseks vahendiks nakkuse ära hoidmiseks. See aga ei kaitse nahka nakatavate HPV tüüpide nakkuse eest (Burd, 2003).

Tänapäevaks on olemas kolm profülaktilist HPV vaktsiini: Gardasil®, neljavalentne HPV (4vHPV) vaktsiin, mis on suunatud HPV6, HPV11, HPV16 ja HPV18 vastu; Cervavix®, bivalentne HPV vaktsiin (2vHPV), mis on suunatud HPV16 ja HPV18 vastu; ning Gardasil 9®, üheksavalentne HPV (9vHPV) vaktsiin, mis on suunatud HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV45, HPV51 ja HPV58 vastu (Wang *et al.*, 2020). Kõik kolm vaktsiini on kokkupandud viiruse-sarnastest partiklitest L1 valgu rekombinantse ekspressiooni tulemusena (Buck *et al.*, 2013). Vaktsineerimine HPV vaktsiinidega aitab kaitsta HPV nakkuse eest. Samuti on näidatud, et HPV vaktsineerimisega indutseeritud immuunvastus on palju tugevam võrreldes loomuliku HPV nakkuse tulemusena saavutatud omaga. Negatiivseks küljeks on aga see, et HPV vaktsiin ei saa kaitsta juba olemasoleva nakkuse eest (Wang *et al.*, 2020).



Joonis 1. HPV-de fülogeneetiline puu. Joonisel on näidatud HPV kapsiidivalk L1 järjestuste erinevuse alusel kokkupandud fülogeneetiline puu. HPV-d jagatakse 5 erinevasse perekonda: alfa, beeta, gamma, mu ja nu. Lisaks jagatakse perekonnad erinevatesse gruppidesse vastavalt nende bioloogilisele erinevusele (muudetud joonis Doorbar, 2006).

1.2.1 Beeta HPV-d

Nahka nakatavad HPV-d kuuluvad põhiliselt beeta perekonda ja on populatsioonis laialt levinud (ligikaudu 90% testitud tervetel inimestel on leitud beeta HPV-d) (Bavinck *et al.*, 2010). Beeta HPV-d on leitud pea, käte tagakülje ning tuharate nahalt (Weissenborn *et al.*, 2009). Eelnevalt on näidatud, et juuksefolliikulite tüvirakud on põhiliseks nakkuse reservuaariks, kus nad moodustavad püsiva infektsiooni (Plasmeijer *et al.*, 2009).

Tervetel inimestel põhjustavad beeta HPV-d põhiliselt asümptomaatilisi infektsioone (näiteks HPV14 ja HPV19), kuid on võimelised kutsuma esile nii soolatüükaid (näiteks HPV2 ja HPV4) kui ka nahapapilloome (näiteks HPV1). Suurel osal kaovad nende poolt põhjustatud kasvajak iseenesest tänu omandatud immuunsüsteemi vastusele (Bhatla ja Singhal, 2020).

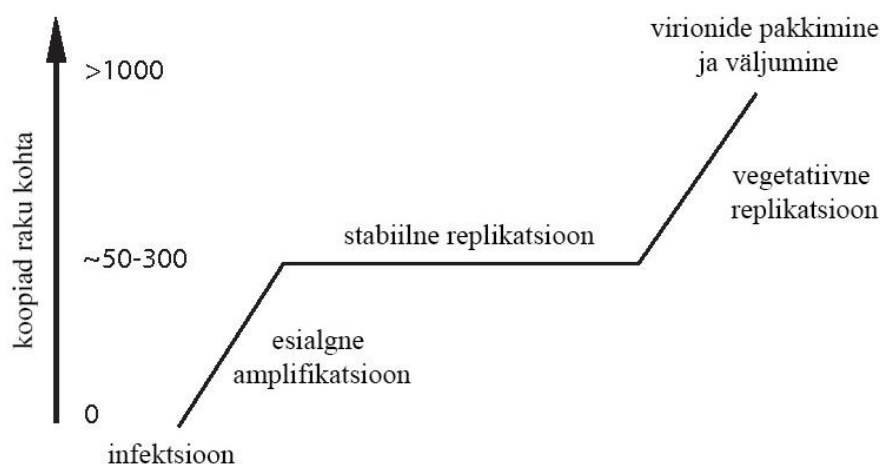
Immuunpuudulikel inimestel võivad nahka nakatavad kõrgeriski tüübid (HPV5 ja HPV8) põhjustada pahaloomuliste kasvajate teket. Nad mõlemad kuuluvad beeta perekonna gruppi 1 ja on isoleeritud retsessiivse geneetilise häire *Epidermodysplasia verruciformis*-st (EV) põdevatelt inimestelt. Nende patsientide immuunsüsteem ei ole võimeline tulema toime healoomuliste kasvajate kõrvaldamisega, mis aja möödumisel võivad minna üle pahaloomulisteks (Orth, 2006). HPV5 püsib eluaeg organismis ning nakatanutel on alati risk saada pahaloomulist vähki eriti nahal, mis on eksponeeritud pikaajaliselt päikesekiirgusele (Kalinska-Bienias *et al.*, 2016).

1.3 HPV elutsükkel

HPV-d nakatavad mitmekihilist lameepiteeli, mis sisaldab erinevates diferentseerumise staadiumites olevaid keratinotsüüte. Viiruse elutsükklis võib eristada kolme replikatsiooni faasi: transientne ehk esialgne kiire amplifikatsioon, latentse perioodi jooksul toimuv stabiilne replikatsioon ning nakkuse lõppfaasis toimuv vegetatiivne replikatsioon (Joonis 2) (Fisher, 2015). Transientne ja stabiilne replikatsioon leiab aset epiteelkoe basaalkihis, vegetatiivne amplifikatsioon viiakse läbi enne virionide kokkupakkimist diferentseerunud keratinotsüütides (Kadaja *et al.*, 2009).

Keratinotsüütide nakatamiseks on HPV-l vaja naha- või limaskestast mikrohaavandeid, et viirus saaks siseneda mitmekihilise epiteeli jagunevatesse rakkudesse. Infitseeritud basaalses rakkudes säiluvad viiruse genoomid madala koopiarvuga (Doorbar *et al.*, 2012). E1 ja E2 valkude ekspressiooni järel toimub nende seondumine viiruse replikatsiooni alguspunktile,

lubades rakulistel replikatsioonifaktoritel viia läbi viiruse episomaalse genoomi amplifitseerimine (Lazarczyk *et al.*, 2009). Kuni viimase replikatsiooni faasini säilitatakse viiruste stabiilse koopia arvu raku kohta ning seejärel suurendatakse umbes 1000-ni ja alustatakse virionide kokkupakkimist. Virionid väljuvad koos surnud rakkudega pinna pealt naha koorumise tulemusena.



Joonis 2. HPV elutsüklis toimuvad erinevad replikatsiooni faasid (muudetud joonis Fisher, 2015).

1.3.1 Sisenemine rakku

Viirus siseneb rakku epiteeli mikrohaavandite läbi ja kapsiidivalk L1 kinnitub rakumembraanil paiknevatele hepariinsulfaat proteoglükaanidele (Day ja Schelhaas, 2014). Pärast kinnitumist läbib viiruse kapsiidivalk L2 konformatsioonilised muutused. Tänu struktuursetele muutustele on viirus võimeline seonduma sekundaarse retseptoriga ja sisenema rakku endotsütoosiga. Rakku sisenemisel, lagundatakse L1 valk lüsoosoomide poolt, L2 moodustab aga kompleksi viiruse DNA-ga, suundudes edasi Golgi kompleksisse (Aksoy *et al.*, 2017). Viiruse DNA sisenemiseks tuuma on vajalik raku mitoosis toimuv tuumamembraani lagunemine. Tuuma sisenemisel seotakse L2-DNA kompleks ND10 tuuma domeenidega, mille abil läheneb viiruse genoom peremehe raku kromosoomile. Interfaasis kromosoomide dekontendseerumise käigus vabastatakse ND10 ja L2 valgu viiruse genoomist. Seejärel saab toimuda HPV replikatsioon ja transkriptsioon (McBride, 2017).

1.3.2 Transiente replikatsioon

Esialgse replikatsiooni käigus amplifitseeritakse väike arv viiruse episome, mis säilivad peremeesrakkudes ekstrakromosomaalsete replikatsioonivõimeliste plasmiididena. Selle faasi käigus saavutatakse umbes 50-300 koopiat raku kohta (Nguyen *et al.*, 2014; Doorbar *et al.*, 2012). Viiruse genoomi esimeste transkriptide E1 ja E2 ekspressiooniks ning E1- ja E2-sõltuvalt HPV genoomi koopiarvu suurendamiseks kasutatakse raku enda replikatsiooni masinavärki (Kadaja *et al.*, 2009). Viiruse genoomi replikatsioon indutseerib peremeesrakkudes DNA kahjustuse vastuse, mis soodustab HPV genoomi edasist replikatsiooni (McBride, 2017).

1.3.3 Latentne periood

Transientse replikatsiooni jooksul saavutatakse basaalkihi rakkudes väike viiruse DNA koopiarv, mis säilib episoomidena. Sellele järgneb replikatsiooni järgmine faas – latentne periood ehk stabiilne säilumisfaas, mille jooksul toimub HPV DNA replikatsioon koos peremeesraku replikatsiooniga. Rakutsükli S-faasi käigus kahekordistatakse viirusgenoomide arvu ja seejärel jagatakse tütarrakkude tuumadesse. E2 valk vastutab siin viirusgenoomide võrdse jaotumise eest, kinnitades genoomid peremeesraku kromosoomidele (McBride, 2008). Kirjeldatud protsess toimub tänu E2-s paiknevale DNA-d siduvalle transaktivatsiooni domeenile, mis ühineb peremeesraku kromatiiniga. Latentse perioodi jooksul võivad viiruse genoomid paikneda basaalkihi rakkudes aastaid kuni neid ei kõrvaldata peremehe immuunsüsteemi abil.

1.3.4 Vegetatiivne replikatsioon

Epiteelirakkude eraldumisel basaalmembraanilt, kaotatakse jagunemisvõime ja algab rakkude diferentseerumine. Diferentseerumisega kaasneb ka raku mitootilise aktiivsuse peatamine. Selleks, et viirus saaks jätkata enda genoomi replikatsiooni, on tal onkovalk E7, mis loob diferentseerumist alustanud rakkudes S-faasi sarnast keskkonda rakujagunemise jätkamiseks (Bodily *et al.*, 2013). Rakkude liikumisel suprabasaalsesse epiteelkihti, lülitub E1 ja E2 valgu transkriptsioon E2 valgu poolt reguleeritud varajaselt promootorilt viiruse hilisele promootorile. See toob endaga kaasa E1 ja E2 valkude taseme kasvu (Klumpp ja Laiminis, 1999) ja läbi selle tõuseb koopiate arv raku kohta 1000-ni. Selles faasis alustatakse ka L1 ja L2 kapsiidivalgude sünteesi (Kadaja *et al.*, 2009).

1.3.5 Virionide kokkupakkimine ja väljumine rakust

Sünteesitud L1 ja L2 valgud omavad tuumalokalisatsiooni signaale ja tänu sellele toimub virionide pakkimine ainult tuuma sees (Darshan *et al.*, 2004). Kapsiidi kokkupakkimise järel, sünteesitakse L1 valkude vahel disulfiidsildu, mis aitavad virionidel minna lõplikku küpsemiseni. Küpsemine aitab kapsiididel stabiliseeruda ja kaitseb rakuliste proteaaside eest (Buck *et al.*, 2005b). Kuna papilloomiviirus ei oma lüütilist omadust, siis väljuvad virionid koos surnud rakkudega naha koorumise käigus.

1.4 E1 ja E2 valgud kui HPV replikatsiooni “meistrid”

HPV-d vajavad DNA replikatsiooni ja transkriptsiooni läbiviimiseks funktsionaalseid varajase regiooni (E) valke E1 ja E2. Seoses sellega on nad ka kõige laialdasemalt uuritud papilloomiviiruste valgud. E1 on saitspetsiifiline DNA-d siduv valk, mis seondub DNA replikatsiooni alguspunktile (*origin*; *ori*), avab DNA dupleksi ja käitub kui helikaas. E2 on aga DNA-ga seonduv transkriptsioonifaktor ning osaleb replikatsiooni initsieerimises koos E1 valguga (Schuck *et al.*, 2013).

1.4.1 E1

E1 valk on umbes 70 kDa suurune ja koosneb kuni 650 aminohappest. E1 on ATP sõltuv DNA helikaas, mis on absoluutselt vajalik viiruse episoomide replikatsiooni ja amplifikatsiooni jaoks nakatunud rakkude tuumas. E1 osaleb *ori* äratundmises, kaheahelalise DNA eraldamises ning rakuliste replikatsioonifaktoritega (DNA polümeraas α primaas, topoisomeraas I ja replikatsioonivalk A) seondumises. Varasemalt on näidatud, et esialgse replikatsiooni jooksul on E1 äärmiselt oluline ning kui saavutatakse stabiilne viirusgenoomide koopiaarv basaalkihi keratinotsüütides siis muutub edasine replikatsioon E1-sõltumatuks (Egawa *et al.*, 2015; Kim ja Lambert, 2002).

E1 jagatakse kolmeks funktsionaalseks segmendiks: N-terminaalne regulatoorne osa, DNA-d siduv domeen ja C-terminaalne ensümaatiline domeen. N-terminaalne osa sisaldab tuuma lokalisatsioonisignaali (NLS – *nuclear localization signal*), Crm1-sõltuva tuuma eksportsignaali (NES – *nuclear export signal*), tsükliini sidumismotiivi (CBS – *cyclin binding motif*) ning Cdk2 fosforüleerimise saite, mis aitavad E1 valgul akumulereuda raku tuumas.

Kogu N-terminaalne domeen osaleb E1 valgu liikumises tuuma-tsütoplasma vahel (Morin *et al.*, 2011). Valgu transport tuuma toimub läbi mitme α -importiinidega seondumise (Bian *et al.*, 2007). E1 akumulatsioon tuumas põhjustab aga rakutsükli peatamist S-faasis (Fradet-Turcotte *et al.*, 2010). Keskmise domeeni tunneb ära spetsiifilise ori järjestuse viiruse genoomis ja seondub DNA-ga (Chen ja Stenlund, 2001). C-terminaalne domeen osaleb E1 valgu oligomeriseerumises kaksik-heksameeriks, ATP sidumises ning kaheahelalise DNA lahtipakkimises (Enemark ja Joshua-Tor, 2006). Lisaks sellele paikneb C-terminuse otsas lühike regioon, mis aitab stabiliseerida E1 heksameeri DNA harutamise käigus (Whelan *et al.*, 2012).

1.4.2 E2

E2 on umbes 50 kDa suurune regulatoorne valk, mis koosneb N-terminaalsest transaktivatsiooni domeenist, C-terminaalsest DNA sidumise domeenist ning nende vahel paiknevast linkerjärjestusest (*Hinge*) (Giri ja Yaniv, 1988). E2 geeni produktid erinevad oma suuruse poolest tänu ekspressioonile erinevatelt promootoritelt ja alternatiivsele RNA splicingule. Need geeni produktid (E8^{E2}, E8^{E2C}, E1^{E2}, E1M^{E2} ja E9^{E2}) töötavad kui viiruse transkriptsiooni ja replikatsiooni repressorid (McBride, 2013).

E2 valgud on põhilised HPV transkriptsioonilised regulaatorid. Viirusgenoomile spetsiifiline seondumine E2 täispika valgu poolt põhjustab transkriptsiooni aktivatsiooni või repressiooni. E2 madala kontsentratsiooni juures aktiveeritakse viiruse transkriptsioon, samal ajal kõrgete kontsentratsioonide juures vastupidi toimub mahasurumine (Steger ja Corbach, 1997). Mitmete seondumissaitidele ja kromatiinile kinnitumine E2 valgu poolt kindlustab viiruse DNA säilimist episoomidena ja aitab jagada HPV genoomi võrdselt tütarakkude vahel mitoosi ajal (Ilves *et al.*, 1999).

E2 osaleb replikatsiooni initsieerimises läbi E1 helikaasi suunamise replikatsiooni ori-le. E1 valgu DNA-le kinnitumine ja kaksik-heksameeri moodustumine põhjustab E2 lahkumist. See lubab viiruse DNA replikatsioonil alata. Mõlemad, nii E1 oligomeriseerumine kui ka E2 lahkumine E1-E2 kompleksist, toimuvad tänu ATP seondumisele (Sanders ja Stenlund, 1998).

Alternatiivse splicingu tulemusena saadud E8^{E2} valk mängib olulist rolli viiruse elutsükli regulatsioonis ning aitab säilitada madalat koopiarvu (Ammermann *et al.*, 2008). E8^{E2} on võimeline seostuma E2 valguga, moodustades E8^{E2}/E2 kompleksi. Kompleks seondub E2

sidumissaidile regulatoorses alas ja takistab E1 valgu kinnitumist ori-le, mis põhjustab viiruse replikatsiooni inhibeerimise (Straub *et al.*, 2015).

1.5 E1 ja E2 valkude aktiivsust reguleerivad rakulised proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid on ensüümid, mis modifitseerivad teisi rakulisi valke kandes ATP-st fosfaatrühma valgu substraadile. Suurem osa proteiinkinaasides (~99%) fosforüleerivad kas seriini ja/või treoniini (Ser/Thr) ning türosiini (Tyr). Mõnedel juhtudel ka kõik kolm aminohapet. Fosfaatrühma ülekandmine toob kaasa valgu (substraadi) funktsionaalsete omaduste muutuse, põhjustades ensümaatilise aktiivsuse muutust, rakusiseses translokatsiooni või suunates selle interakteeruma teiste rakuliste molekulidega. Katalüütiline domeen sisaldab ATP-d siduvat vagu, kus ATP liitumisel seda hüdrolyüsitakse. Lisaks sellele on proteiinkinaasidel ka teisi domeene, mis osalevad katalüütilise aktiivsuse regulatsioonis ja vastutavad rakusiseses paiknemise eest (Pollard *et al.*, 2017).

Mõlemad, nii E1 kui ka E2 on fosfovalgud, mis fosforüleeritakse peremehe proteiini kinaaside poolt. Näiteks kaseiinkinaas II (CK2) on Ser/Thr proteiinkinaas, mis osaleb rakutsükli regulatsioonis, raku jagunemises, rakuskeleti reorganiseerimises, apoptoosis ja ellujäämises (Kramerov ja Ljubimov, 2012). E1 N-terminaalne domeen ja E2 valgu *Hinge* piirkond omavad fosforüleerimise saite, mis fosforüleeritakse CK2 poolt. HPV11, HPV31 ja BPV1 (*Bovine papillomavirus*) tüüpide E1 valgu ja BPV1 E2 valgu fosforüleerimine põhjustab valkude võimetust kinnituma DNA-le replikatsiooni initsieerimiseks. Seepärast loetakse CK2 viirusliku replikatsiooni negatiivseks regulaatoriks (Schuck *et al.*, 2013). CK2 võib olla ka positiivseks regulaatoriks. Näiteks Brd4 (rakulise kromatiini siduv faktor) on oluline HPV elutsükli toimuvate protsesside läbiviimisel: replikatsiooni algatamisel, viirusgenoomi transkriptsioonis, segregatsioonis ja säilitamises raku jagunemise ajal. Brd4 fosforüleerimine CK2 poolt põhjustab faktori seondumist E2 valguga, mis omakorda aitab viia läbi eelnimetatud viiruse elutsükli protsesse (Iftner *et al.*, 2017). Lisaks sellele on näidatud, et CK2 katalüütilise ühiku inhibeerimine põhjustab HPV5, HPV11 ja HPV18 tüüpide esialgse replikatsiooni mahasurumise, mis kinnitab et aktiivne CK2 on oluline mitmete HPV tüüpide edukaks elutsükliks (Piirsoo *et al.*, 2019).

Tsükliinisõltuvad kinaasid (CDK) täidavad kesket rolli rakutsükli regulatsioonis. CDK aktiveerimiseks on vajalik tsükliinidega kompleksi moodustamine (Swaffer *et al.*, 2016). Varasemalt on näidatud, et CDK fosforüleerib papilloomiviiruse E1 valgu N-terminaalses

domeenis. NES fosforüleerimine tsükliin/CDK poolt põhjustab selle inaktiveerimise, mis lubab E1 valgul jääda raku tuuma ja viia läbi viiruse DNA replikatsiooni (Deng *et al.*, 2004).

Fibroblasti kasvufaktori retseptor 3 (FGFR3) kuulub transmembraansete türosiinkinaasi retseptorite perekonda ning osaleb raku kasvu, diferentseerumist ja migratsiooni mõjutavate signaalide edastamises (Johnson ja Williams, 1993). FGFR3 on leitud HPV E2 valgu koosseisus varajastel replikatsiooni etappidel. E2 fosforüleerimine põhjustab viirusliku DNA replikatsiooni inhibeerimise, mis seletab ka viiruskoopiate madalat arvu. Raku diferentseerumisel FGFR3 tase langeb ja E2 saab viiruse genoomi amplifitseerida suuremates kogustes (Xie *et al.*, 2017).

Mitogeen aktiveeritud proteiin kinaasid (MAPK) osalevad rakusiseste sündmuste signaalide ülekandmisel (Pearson *et al.*, 2001). HPV11 E1 valgu tuuma lokaliseerimise signaalide fosforüleerimine viib E1 tuuma, kus HPV replikatsioon saab toimuda. Arvatakse, et see mehhanism on oluline HPV püsivaks replikatsiooniks nakatunud rakkudes (Yu *et al.*, 2007).

1.5.1 Proteiinkinaas A

Proteiinkinaas A (PKA) on cAMP-sõltuv Ser/Thr aminohappejääki fosforüleeriv proteiinkinaas. PKA holoensüüm on tetrameer, mille koosseisus on kaks reguleerivat (R) ja kaks katalüütilist subühikut (C) (Fimia ja Sassone-Corsi, 2001). Imetajatel on 4 tüüpi R subühikuid: RI α , RI β , RII α ja RII β ning erinevate subühikute järgi klassifitseeritakse neid PKA I ja PKA II gruppidesse (Taskén *et al.*, 1993).

cAMP on sekundaarne signaalmolekul, mida leidub rakkudes suurtes kogustes. cAMP on võimeline reguleerima erinevaid rakkudes toimuvaid bioloogilisi protsesse: rakkude metabolismi, ionikanalite aktivatsiooni, geeni ekspressiooni, rakkude kasvu, diferentseerumist ning apoptoosi (Chin *et al.*, 2002). cAMP genereerimine reguleeritakse G-valkude sõltuvalt. Rakuväliste ligandide liitumine G-valgu seotud retseptorile (GPCR – *G-protein coupled receptor*) põhjustab G α subühiku eraldumist G β ja G γ subühikutest. Seejärel põhjustab G α subühik adenülaat tsüklaaside aktivatsiooni, mis omakorda suunavad ATP molekuli cAMP-ks (Zhang *et al.*, 2020).

PKA aktiveeritakse siis, kui neli cAMP molekuli seondub PKA R subühikule (2 cAMP iga subühiku kohta). cAMP seondumine põhjustab PKA konformatsioonilise muutuse ja kutsub esile C subühikute dissotsieerumist, jättes R subühikud cAMP-ga seotuks. Kaks C monomeeri

muutuvad katalüütiliselt aktiivseks ATP molekuli sidumisel (London *et al.*, 2020). PKA aktiivsus on reguleeritud cAMP tasemega tsütosoolis ja isegi väikesed cAMP kontsentratsiooni muutused võivad põhjustada PKA taseme muutust. cAMP hüdrolüüsimine fosfodiesteraaside poolt põhjustab cAMP taseme langust ja seeläbi mõjutatakse PKA aktiivsust negatiivselt (Omori *et al.*, 2007). Vesinikkarbonaad ja kaltsiumioonid mõjutavad cAMP aga vastupidi, põhjustades rakkudes cAMP-i tootmist (Litvin *et al.*, 2003). Lisaks reguleeritakse PKA aktivatsiooni ka mitmete teiste fosforüleerimise protsesside käigus, nagu näiteks autofosforüleerimine või fosforüleerimine teiste regulatoorsete kinaaside poolt (Byrne *et al.*, 2016).

Varasemalt on näidatud, et PKA fosforüleerib HPV8 E2 valgu S253 positsioonis, mis on konserveerunud ainult beeta PV-s. Uuritav fosforüleerimine on oluline E2 stabiliseerimises, valgu kinnitumises mitotootilistele kromosoomidele ja kromosoomide võrdses jaotumises tütarakkude vahel (Sekhar ja McBride, 2012). Seepärast võib eeldada, et PKA aktiivsus on oluline viirusgenoomi replikatsiooni regulatsioonis säilumisaasta jooksul.

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud magistritöö eesmärgiks on optimiseerida uute kemikaalide raamatukogu testimise tingimusi ning analüüsida cAMP-sõltuva proteiinkinaasi (PKA) mõju HPV5 replikatsioonile U2OS rakkudes.

Enne tööle asumist püstitati järgmised ülesanded:

- HPV5Nluc genoomi transfekteeritava koguse ja inkubatsiooni aja optimiseerimine skriininguks;
- Skriiningus kasutatava lutsiferaasi mõõtmise tingimuste optimiseerimine;
- Uurida, kuidas aktiveeritakse PKA-sõltuva signaalirada skriiningu käigus leitud HPV5 inhibiitorite juuresolekul;
- Kontrollida cAMP taset ja PKA katalüütiliste aktiivsust mõjutavate farmakoloogiliste ainete sisenemist U2OS rakkudesse;
- Vaadata, kuidas testitud farmakoloogilised ained mõjutavad HPV5 transientset ja stabiilset replikatsiooni U2OS rakkudes;
- Analüüsida HPV5 replikatsiooni efektiivsust PKA konstruktide üle-ekspressseerimisel U2OS rakkudes;
- Uurida PKA aktiveerivate farmakoloogiliste ainete mõju E1 ja E2 HPV5 valkudele;
- PKA vahendatud HPV5 replikatsiooni muutustega seotud võimalike mehhanismide uurimine.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid ja kemikaalid

Kõik selles töös kasutatud plasmiidid on saadud molekulaarviroloogia labori varudest.

pFLAG-CMV-4 vektor

FLAG epitoobi (DYKDDDDK) sisaldav plasmiid (6271 bp) (*Sigma-Aldrich*).

pFLAG-PKAwt

PKA katalüütilise subühiku α kodeeriv järjestus (NCBI andmebaasi number NM_002730.4) amplifitseeriti RT-PCR-ga kasutades *Phusion HighFidelity DNA Polymerase kit-i* (*Thermo Fisher Scientific*) ning U2OS rakkudest saadud matriits-cDNA. Saadud järjestus kloneeriti pFLAG-CMV-4 vektorisse (*Sigma-Aldrich*) HindIII ja NotI restriksioonisaitide vahele.

pFLAG-PKA(T197A)

Plasmiid kodeerib proteiin kinaas A katalüütilist subühikut α kus 197. positsioonis olev treoniini aminohappejääk on muudetudalaniiniks.

pFLAG-PKA(K72R)

Plasmiid kodeerib proteiin kinaas A katalüütilist subühikut α kus 72. positsioonis olev lüsiini aminohappejääk on muudetud arginiiniks.

HPV5Nluc algplasmiid

HPV5-Nluc algplasmiid sisaldab pMC.BESPX vektorisse kloneeritud HPV5 wt genoomi järjestust, kuhu lisaks on sisseviidud koodon-optimizeeritud Nluc ja ise protsessitav FMDV-2A (*Foot-and-mouth disease virus*) peptiidi kodeerivad järjestused E2 avatud lugemisraami (pärast 59. nukleotiidi) vahetult pärast E1 Stop-koodonit. Nluc ja FMDV-2A peptiidi järjestusele järgneb täispikk E2 avatud lugemisraam (Piirsoo *et al.*, 2019).

HPV5-E1HA-Nluc-E2FLAG algplasmiid

Plasmiid on loodud HPV5-Nluc algplasmidi alusel, kuhu on sisseviidud HA-märgist kodeeriv järjestus kohe pärast 15. nukleotiidi E1 avatud lugemisraamis. Nluc ja FMDV-2A piirkond

paikneb samas kohas nagu HPV5-Nluc puhul ning FLAG-märgist kodeeriv järjestus on viidud E2 avatud lugemisraami kohe pärast esimest ATG koodonit ja 2A järjestust.

HPV5E1⁻ mc

Plasmiid kodeerib HPV5 metsiktüve genoomi ja sisaldab punktmutatsiooni *E1* geeni esimeses AUG koodonis ja seeläbi ei ole võimeline ekspresseerima *E1*.

HPV5E2⁻ mc

Plasmiid kodeerib HPV5 metsiktüve genoomi ja sisaldab punktmutatsiooni *E2* geeni esimeses AUG koodonis ja seeläbi ei ole võimeline ekspresseerima *E2*.

Kõik töös kasutatud HPV genoomid pisirõngaste kujul olid saadud algplasmiididest järjestusspetsiifilise rekombinatsiooni teel bakteritüves ZYCY10P3S2T nagu varem kirjeldatud (Kay 2010, Orav 2015).

CX4945, Tdp1, FDU, IBMX, Forskolin, db-cAMP, H89 ja MG-132 (*Santa Cruz Biotechnologies*) olid lahustatud dimetüülsulfoksiidis (DMSO) (*Sigma-Aldrich*).

2.2.2 Kasutatud rakuliinid ja söötmed

Töös kasutati inimese osteosarkoomi U2OS rakke, mis kasvatati IMDM söötmes (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) (*Biowest*), kuhu lisati 10% veise loote seerumit (*fetal calf serum* – FCS) ja 1% penitsilliin-streptomüstiini (PEST) (*Sigma-Aldrich*). Inimese embrüonaalsetest neerurakkudest saadud rakuliin 293FT kasvatati DMEM söötmes (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (*Pan Biotech*), mis sisaldas 10% FCS ja 1% PEST.

Rakud kasvatati inkubaatoris 37 °C juures ja 5% CO₂ sisalduse juures.

2.2.3 Rakkude transfektsioon

Kõik töös kasutatud genoomid transfekteeriti U2OS rakkudesse, kasutades elektroporatsiooni meetodit. Igale transfektsioonile võeti umbes 10⁶ rakke. 24 tundi enne transfektsiooni jagati 10 cm tassil olevad konfluentsed rakud kahele uuele tassile. Järgmisel päeval aspireeriti tassilt sööde ja pesti PBS lahusega (2,7 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 4,3 mM Na₂HPO₄). Seejärel lisati 0.25% Trypsin-EDTA lahust (*Sigma-Aldrich*) rakkude

lahtilöömiseks ja viidi rakud värske söötmega tuubi. Rakud fuugiti 1000 rpm ja 20 °C juures 5 min *Eppendorf Centrifuge 5810R* tsentrifuugis (*Thermo Fisher Scientific*) ning seejärel eemaldati supernatant. Järgmisena lisati rakkudele 250 µl värsket söödet iga poratsiooni kohta ja resuspendeeriti. Igale proovile lisati 50 µg lõhe spermi DNAd. Järgmised HPV genoomi või PKA kodeerivate konstruktide kogused kasutati umbes 10⁶ rakkude kohta: 1000 ng HPV5 wt, HPV5-Nluc ja HPV5-E1HA-Nluc-E2FLAG, 250 ng PKA wt, 1000 ng PKA (T197A) ning 1500 ng PKA (K72R). Rakususpensioon DNA-ga viidi üle elektroporatsiooni küvettidesse ja transfektsioon viidi läbi 220 V ja 975 µF juures *Gene Pulser XCell* elektroporaatoriga (*Bio-Rad Laboratories*). Kohe pärast transfektsiooni, viidi rakud vastavatesse tuubidesse, kuhu lisati eelnevalt värske sööde ja seejärel jagati rakud ettenähtud plaatidele.

297FT rakkude transfekkeerimiseks kasutati polüetüleenimiini (PEI) (Inbio). Rakke plaaditi 10 cm suurustele rakukultuuri tassidele 48 tundi enne transfektsiooni. Transfektsiooniks kasutati erinev kogus PKA konstrukte: pFLAG-PKAwt (3000 ng) + tühi vektor (5000 ng), pFLAG-PKA(T197A) (8000 ng) ning pFLAG-PKA(K72R) (16000 ng kahele tassile jaotatud). PEI algkontsentratsiooniga 80 mg/ml lahjendati 1 mg/ml-ni puhtas vees. DNA lahjendati 200 µl ilma lisanditeta DMEM söötmes. Seejärel lisati igale proovile 20 µl 1x PEI ning inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. Rakud pesti 5 ml DMEM-ga, lisati 7 ml ilma lisanditeta DMEM söödet ning tilgutati DNA/PEI segu tassile laiali. Rakke hoiti inkubaatoris 2 h. Seejärel lisati rakkudele 14 ml täissöödet ja inkubeeriti veel 48 tundi.

2.2.4 Totaalse DNA eraldamine U2OS rakkudest

U2OS rakke pesti PBS-ga ja lüüsiiti 500 µl Sol IV (20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1 g/l mM EDTA, 0.2% SDS) lahuses. Lüsandid homogeniseeriti kasutades insuliini süstalt koos 24G nõelaga, lisati Proteinaas K (lõppkontsentratsiooniga 200 µg/ml) ja inkubeeriti 56 °C juures üleöö. Seejärel lisati lüsadile 500 µl fenool-kloroformi segu (1:1), segati vortex-il ja tsentrifuugiti 13000 rpm juures 3 min. DNA-d sisaldav ülemine faas viidi üle uute tuubi ja lisati 900 µl 96% etanooli. Segati uuesti vortex-il ning tsentrifugeeriti 15000 rpm ja 4 °C juures 15 min. Eemaldati supernatant ja saadud sade resuspendeeriti 100 µl TE-s (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0), mis sisaldas 40 ng RNAas A. Proovid inkubeeriti 37 °C juures 1 tund.

DNA sadestati uuesti, lisades 10 µl 5 M NaCl ja 250 µl 96% etanooli, segati vortex-il ning tsentrifugeeriti 15000 rpm ja 4 °C juures 15 min. Pärast supernatandi eemaldamist, lisati 100

µl 75% etanooli ja tsentrifugeeriti 15000 rpm 4 °C juures 7 min. Supernatant eemaldati ja lahustati sade 30 µl nukleasivabas vees. Nukleiinhapete kontsentratsioone mõõdeti Nanodrop-100 spektrofotomeetriga (Thermo Fisher Scientific) 260 nm juures.

2.2.5 Nluc aktiivsuse mõõtmine

Nluc aktiivsuse mõõtmiseks kasvatati U2OS rakud 96 kaevuga plaatidel. U2OS rakud pesti PBS-ga ja lüüsi 40 µl ühekordses passiivses lüüsipuhvris (*Promega*) umbes 10 min toatemperatuuril. Lüsaaadid tõsteti uuele 96 kaevuga valgele plaadile kahes replikaadis Nluc aktiivsuse mõõtmiseks (Nluc signaalide normaliseerimiseks). Nluc aktiivsus mõõdeti kasutades *Nano-Glo Luciferase Assay System kit-i* (*Promega*) ja 20 µl furimasiin substraadi lahjendatud puhvriga 1:300. Kemiluminestsentsi mõõdeti *GloMax 96 Microplate Luminometer-it* (*Promega*) kasutades. Iga proovi Nluc aktiivsus normaliseeriti aluselise fosfataasi aktiivsusega.

2.2.6 Aluselise fosfataasi (AP) aktiivsuse mõõtmine

U2OS rakud 96 kaevuga plaatidel pesti PBS-ga ja lüüsi ühekordses passiivses lüüsipuhvris. Lüsaaadid tõsteti uuele 96 kaevuga valgele plaadile kahes replikaadis. AP mõõtmiseks kanti igale proovile 20 µl CSPD kemiluminestsentset substraati (*Tropix*) ja inkubeeriti toatemperatuuril 10 min. Seejärel mõõdeti kemiluminestsentsi.

2.2.7 MTS analüüs

Rakud kasvatati 96 kaevuga plaatidel, lisati 0,5% MTS lahus otse 100 µl söötmesse ja inkubeeriti rakke 37°C. Seejärel mõõdeti neelduvust 550 nm juures.

2.2.8 Southern blot (SB) ja hübriidisatsioon

HPV replikatsiooni analüüsiti kasutades 5 µg U2OS rakkudest eraldatud totaalset DNAd. DNA töödeldi 1 µl DpnI restriksiooniensüümiga selleks, et lõigata lahti bakteriaalselt metüleeritud palindroomset järjestust (5'-Gm6A⁺TC-3') ja 1,5 µl SacI ensüümiga HPV5 genoomide linealiseerimiseks (*Thermo Fisher Scientific*). Reaktsioone segati kokku 30 µl-s, kuhu lisati 3 µl 10x *FastDigest* rohelist puhvrit. Proovid inkubeeriti 37 °C üleöö. Saadud DNA fragmendid lahutati 0,8% agarosgeelil, mis sisaldas 0,3 µg/ml etiidiumbromiidi.

Pärast geeli jooksutamist, loputati seda A lahuses (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) 40 min toatemperatuuril, pesti destilleeritud veega ja neutraliseeriti B lahuses (1M Tris pH 8.0, 1.5M NaCl) 30 min toatemperatuuril. DNA kanti geelilt nailon membraanile (*GVS Life Sciences*), kasutades kapillaarse ülekande meetodit 10x SSC lahuses (1.5M NaCl, 150 mM Na₃C₆H₅O₇) üleöö.

Ülekande lõppemisel viidi läbi DNA ristsidumine membraanile, kasutades UV valgust (*Stratalinker*). Mittespetsiifilise sidumise vältimiseks, membraan inkubeeriti prehübridisatsiooni lahuses (30% 20x SSC, 10% 50x *Denhardt*-i lahus, 5% 10%-st SDS, ja 200 g/ml denatureeritud lõhe spermi DNA)

Hübridisatsiooniproovide sünteesiks kasutati mallina 150 ng linealiseeritud ja geelist väljapuhastatud HPV5 pisirõnga DNA-d ning *DecaLabel TM DNA Labeling kit*-i (*Thermo Fisher Scientific*). DNA mallile lisati 10 µl dekanukleotiidseid praimereid, inkubeeriti 100 °C juures 10 min ja jahutati jääl. Seejärel lisati 3 µl mixC (dATP, dGTP ja dTTP segu), 4 µl α-³²P-dCTP isotoopi (*Hartman Analytics*) ja 1 µl *Klenow* fragmenti, millel puudub 5'-3' eksonukleasne aktiivsus. Proove inkubeeriti 37 °C juures 15 min ja lisati 4 µl 10 mM dNTP segu. Reaktsioonid inkubeeriti 37 °C juures 15 min ja seejärel denatureeriti 100 °C juures 10 min.

Membraanide hübridisatsioon radioaktiivselt märgistatud prooviga viidi läbi prehübridisatsiooni lahuses 67 °C juures üleöö. Järgmisel päeval membraane pesti eelkuumutatud pesulahustega 67 °C juures. Pesulahusega I (10x SSC, 0.1% SDS) pesu korrati kaks korda (iga kord 5 min), pesulahusega II (5x SSC, 0.1% SDS) pesti 30 min ning pesulahusega III (0.5x SSC, 0.1% SDS) 20 min. Membraanid eksponeeriti röntgenfilmile (*Agfa*) -70 °C juures umbes 10 tundi ja seejärel ilmutati.

2.2.9 Western blot (WB) ja immuunsadestamine

U2OS rakud lüüsi 500 µl-s RIPA puhvris (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS and 0.1% Triton X-100), kuhu oli eelnevalt lisatud proteaasi inhibiitorite segu (*Sigma-Aldrich*). Lüüsis toimus 10 min jääl.

293FT rakkude lüüsimiseks lisati 5 ml Sigma Lüüsipuhvrit (50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, PIC) ja inkubeeriti jääl 15 min. Seejärel tõsteti lüsaadid tuubi ja tsentrifugeeriti 4 °C ja 15000 rpm juures 5 min. Supernatant viidi üle uude tuubi.

FLAG-märgitud PKA katalüütilised subühikud ja E2 valgud immuunsadestati kasutades anti-FLAG-M2 Affinity geeli (*Sigma-Aldrich*), mis oli eelnevalt pestud 2 korda PBS-ga ja 1 kord Sigma Lüüsipuhvriga. Reaktsioonid inkubeeriti 4 °C ja aeglase roteerimise juures üleöö. Immuunsadestatud kompleksid pesti 3 korda 2 ml Sigma Lüüsipuhvris 10 min ja resuspendeeriti 100 µl-s PBS-s.

Järgmisena võeti 15 µg U2OS rakkudest eraldatud totaalseid valke ja 10 µl immuunsadestatud valke 293FT rakkudest ja lisati juurde vastav kogus 3x Laemmli Sample puhvrit (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glütserool, 100 µM DDT, 0,004% broom-fenool sinine). Proove denatureeriti 100 °C juures 5 min.

Valke lahutati SDS-polüakrüülamiid geelelektroforeesil ja kanti üle PVDF membraanile (*Millipore*). Membraani blokeeriti PBS lahuses, mis sisaldas 0,1 % Tween 20 (PBS-T) ja 5% rasvavaba piimapulbit, loksutil 30 min toatemperatuuril. Seejärel inkubeeriti membraani primaarse antikehaga 4 °C juures üleöö. Järgmisel päeval pesti membraanid 3 korda PBS-T-ga 15 min ja vajadusel inkubeeriti sekundaarse antikehaga 1 tund toatemperatuuril, millele samuti järgnes 3. kordne pesu PBS-T-ga 15 min. Membraane eksponeeriti röntgenfilmile nagu kirjeldatud .. Kasutatud antikehad ja lahjendused: monoklonaalne ANTI-FLAG M2-HRP (*Sigma-Aldrich*, 1:3000), GAPDH (*Sigma-Aldrich*, 1:5000), CREB1 06-863 (*Merck Millipore*, 1:1000), phospho-CREB (Ser133) clone 87G3 (*Cell Signaling Technology*, 1:5000) ja kitse anti-hiir või anti-küülik IgG, konjugeeritud HRP-ga (*Invitrogen*, 1:15000).

2.2.10 *In vitro* kinaasi katsed

Analüüsi jaoks valmistati ette 10x PKA kinaasi analüüsi puhver (KAB) nukleaasivabas vees, mis sisaldas 400 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM MgCl₂, 500 µM DTT. Lisaks valmistati 1x KAB koos jääkülma 200 µM ATP-ga (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 50 µM DTT, 200 µM ATP). Kõik reaktsioonid viidi läbi jääl ja 40 µl-s. 10 µl immuunsadestatud PKA^{wt}, PKA(T197A) ja PKA(K72R)-le lisati 1 µl Nth1 valku, 4 µl 10x KAB ja 25 µl vett ning segati korralikult läbi.

Igast proovist tõsteti 10 µl uute tuubi, et jooksutada eraldi SDS-PAGE geel ja värvida *coomassie*-ga (0,5 g Coomassie sinine, 90 ml mQ, 90 ml metanool, 20 ml etaanhape) Nth1 valgu visualiseerimiseks. Geeli värviti umbes 1 tund ja seejärel pesti 2h loputuslahusega (90 ml mQ, 90 ml metanool, 20 ml etaanhape).

Seejärel lisati 1 µl γ^{32} -ATP 40 µl-le 1xKAB lahusele koos jääkülma ATP-ga, segati läbi ja tõsteti 10 µl segust igale varasemalt valmistatud reaktsioonidele. Inkubeeriti 30 °C juures 30 min. Reaktsioone peatati 2x Laemmli puhvri lisamisega ja inkubeeriti 100 °C juures 5 min. Seejärel fuugiti 13000 rpm juures 1 min. Proovid jooksutati 12% polüakrüülamiid geelil. Seejärel kanti geel filterpaberile ja kuivatati kasutades *Gel Vacuum Dryer Heto Dry GD-2 (HETO)* 70 °C juures 45 min. Filterpaber eksponeeriti röntgenfilmile.

2.2.11 Totaalse RNA eraldamine ja cDNA süntees

Totaalne RNA eraldati U2OS rakkudest kasutades *Quick RNA MiniPrep Kit*-i (*Zymo Research*). Rakke lüüsi RNA lüüsipuhvris. Proovidest DNA eemaldamiseks kasutati DNA siduvat kolonni. Seejärel pesti RNA pesu puhvriga ja elueeriti DNAasi/RNaasi vabas vees. Umbes 10 µg totaalset RNA-d töödeldi 8 U Turbo DNAas-ga (*Thermo Fisher Scientific*) 37 °C juures 3 tundi. DNAas-i inaktiveerimiseks lisati 15 µl EDTA ja inkubeeriti 75 °C juures 10 min. Totaalne RNA sadestati 7.5 M LiCl juuresolekul ja tsentrifuugiti 4 °C ja 15000 rpm juures 15 min. Proove pesti jääkülma 75% etanooliga ja tsentrifuugiti 4 °C ja 15000 rpm juures 5 min. Supernatanti eemaldati ja sade resuspendeeriti 15 µl-s nukleasivabas vees.

Komplementaarse DNA (cDNA) sünteesiti kasutades *RevertAid First Strand cDNA* sünteesi kit-i (*Thermo Fisher Scientific*), oligo(dT) ja 1 µg DNAsiga töödeldutud ja ümbersadestatud totaalset RNA-t. Vastav kogus totaalset RNA-d segati kokku 1 µg oligo(dT)-ga, inkubeeriti 65 °C juures 5 min ja jahutati jääl. cDNA sünteesiti 45 °C juures 1 tund lõppmahus 20 µl, kuhu eelnevalt lisati 4 µl 5xReaktsiooni puhvrit, 20 U RiboLock RNase inhibiitorit, 2 µl 10 mM dNTP segu ja 200 U RevertAid M-MuLV revertaasi. Sünteesi peatamiseks proove inkubeeriti 70 °C juures 5 min.

HPV5 *E1*, *E2*, *E1*^{*E4*} ja *E8*^{*E2*} transkriptide ekspressioonitaset analüüsiti kasutades kvantitatiivse PCR meetodit (qPCR) ja kahte sõltumatut praimerite paari iga geeni kohta. *E6* ja *E7* transkriptide ekspressiooni analüüsiti kasutades ühte praimerite paari. qPCR viidi läbi 10 µl-s, mis sisaldas 0,25 µl cDNA-d, 1 µl vastavat praimerite segu ja 2 µl 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR (*Solis Biodyne*) 96 kaevuga MicroAmp plaatidel (*Thermo Fisher Scientific*). Iga reaktsioon teostati 3. replikaadis QuantStudio Real-Time PCR System (*Thermo Fisher Scientific*) masinaga. qPCR viidi läbi järgmise programmiga: denatureerimine 95 °C juures 12 min, amplifikatsiooni 40 tsükleid (denatureerimine 95 °C 15 s, praimerite liitumine 60 °C 15 s, fragmentide süntees 72 °C 15 s).

2.2.12 Episomaalse DNA eraldamine HIRT lüüsi meetodil

Transfektsioonist 2 päeva möödudes eemaldati tassidelt sööde ja rakud pesti 2 korda PBS lahusega. Lisati 800 µl HIRT lüüsilahust (0,5% SDS, 50 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA) ja inkubeeriti 15 minutit toatemperatuuril, aeg-ajalt tase liigutades. Järgmisena lisati tilgutades 200 µl 5 M NaCl ja segati tase kallutades. Saadud lüsaat koguti spaatliga tuubidesse ja inkubeeriti 4 °C juures umbes 16 tundi. Järgmisel päeval proove tsentrifuugiti 4 °C ja 13000 rpm juures 15 min. Supernatandis olev madalmolekulaarne DNA tõsteti uude tuubi, sadestati 600 µl isopropanoolis -20 °C juures 30 min. Inkubeerimise lõppemisel proove tsentrifuugiti 4 °C ja 13000 rpm juures 15 min, supernatant eemaldati. Sade lahustati 200 µl Sol IV lahuses (20 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,2% SDS), kuhu oli eelnevalt lisatud proteinaas K lõppkontsentratsiooniga 0,1 µg/µl, ja inkubeeriti 56 °C juures 30 min. Selleks, et saada lahti valkude jääkidest, lisati proovidele 200 µl fenool-kloroformi segu (1:1) ja segati korralikult vortex-il. Seejärel tsentrifuugiti 13000 rpm juures 3 min ning tõsteti ülemine faas uude tuubi. DNA-d sadestati 500 µl 96% etanooliga ja tsentrifuugiti 4 °C ja 13000 rpm juures 20 min. Pärast supernatanti eemaldamist, lasti sademel kuivada ja lahustati 20 µl TE-s, mis sisaldas 20 µg/ml RNAas A-d. Proove inkubeeriti 37°C juures 1 tund ja seejärel mõõdeti DNA kontsentratsioonid nagu kirjeldatud eespool.

2.3 Tulemused

2.3.1 Uute HPV5 replikatsiooni mõjutavate ühendite testimise tingimuste väljatöötamine

Meie uurimisrühmas on 2017. aastal väljatöötatud ja läbiviidud kemikaalide raamatukogu testimine väljaselgitamiseks uusi HPV18 genoomi replikatsiooni inhibiitoreid. Selles töös reportergeenidena oli kasutatud Renilla lutsiferaas (Rluc) ning Rluc aktiivsuse normaliseerimiseks kasutati jaanimardika lutsiferaasi (firefly – Fluc) aktiivsust (Toots *et al.*, 2017). Rluc-i madal aktiivsus ja selle kodeeriva järjestuse pikkus (Rluc suurendab HPV18 genoomi 936 nt võrra) takistab selle kasutamist ravimikandidaadide skriiningutes, mis viiakse läbi võimalikult väheste hulga rakkude ja söötmega. Fluc aktiivsuse sõltuvus ATP-st ei võimalda selle kasutamist normaliseerimiseks juhtumites, kus kemikaalid muudavad ATP sisaldust rakkudes. Seoses sellega otsustati järgmises kemikaalide raamatukogu testimises kasutada uut reportergeeni – Nluc, ning teistsugust normaliseerimismeetodit. Nluc-il on Rluc-i ees hulga eeliseid, nagu väiksem suurus, kõrgem stabiilsus ning umbes 100 korda suurem aktiivsus. HPV5Nluc genoomi replikatsiooni uurimine näitas lineaarsest seost Nluc aktiivsuse ja viiruse genoomi koopiaarvu vahel (Piirsoo *et al.*, 2019). Seega osutus HPV5Nluc genoom sobivaks töövahendiks tuvastamaks viirusgenoomi replikatsiooni taseme muutust kemikaalidega töötlemisel. ATP-st sõltuva Fluc aktiivsuse asemel otsustati kasutada MTS testi rakkude elulemuse analüüsiks ja Nluc aktiivsuse normaliseerimiseks. Antud töös kasutati uut kemikaalide raamatukogu NCI Diversity set V (eelnevalt varem testitud NCI Diversity set IV), mis sisaldas rohkem uusi kemikaale.

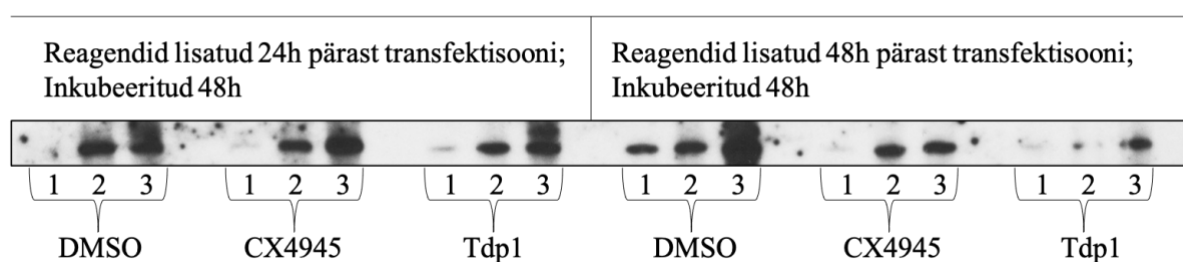
Enne skriiningu alustamist teostati mitmed katsed leidmaks optimaalsed tingimused võimalikult kiireks, täpseks ja materjali kokkuhoidvaks testi läbiviimiseks. Katsetes kasutati CX4945 reagenti, mis on ATP sidumissaidiga konkureeriv CK2 proteiinkinaasi inhibiitor (Maslyk *et al.*, 2017), HPV replikatsiooni efektiivsust negatiivselt mõjutavat türosüül-DNA fosfodiesteri (Tdp1) inhibiitorit ning fluor-desoksüüridiini (FDU), mis inhibeerib igasugust DNA replikatsiooni.

2.3.1.1 Transfekteeritava genoomi koguse ja inkubatsiooni aja optimeerimine

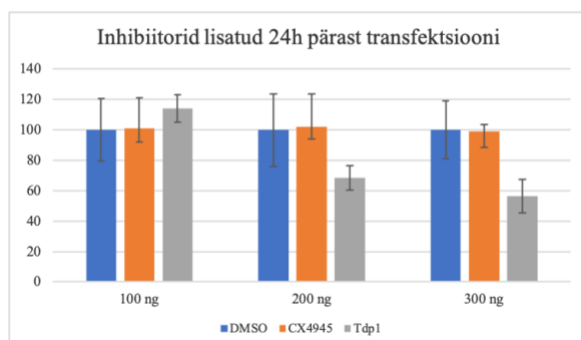
Selleks, et leida minimaalne analüüsitav kogus vajalikku DNA-d, transfekteeriti 10^6 U2OS rakkudesse 100, 200 ja 300 ng HPV5Nluc genoomi. Katse teostati kahes korduses. Üks osa rakke kasvatati 24 tundi ja seejärel lisati DMSO, CX4945 ja Tdp1 inhibiitor 48 tunniks. Teine osa kasvatati 48 tundi ja inkubeeriti reagentidega samuti 48 tundi. Seejärel rakud lüüsi, teostati SB ning mõõdeti Nluc aktiivsust, normaliseerides aluselise fosfataasi aktiivsusega (Joonis 3).

A

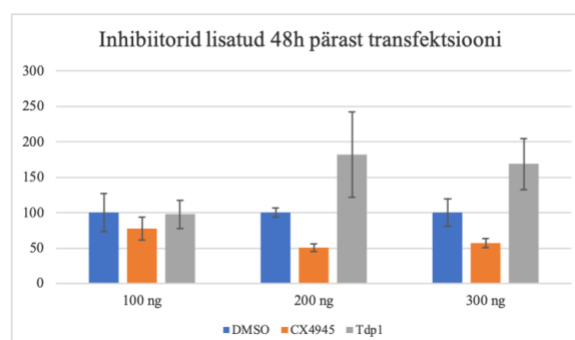
HPV5Nluc mc



B



C



Joonis 3. Erinevate HPV5Nluc genoomi hulkade (100 ng, 200 ng ja 300 ng) replikatsiooni efektiivsus inhibiitorite juuresolekul. Katse teostati kahes korduses: esimese puhul lisati inhibiitorid 24 h pärast transfektiooni ning teise puhul 48 h möödudes. Mõlemad replikaadid inkubeeriti reagentidega 48 h. **A:** U2OS rakkudest eraldati totaalne DNA 72 h pärast transfektiooni, töödeldi DpnI ensüümiga, linealiseeriti HPV5Nluc genoom SacI ensüümiga ning teostati SB analüüs. Joonisel tähistavad 1, 2 ja 3 transfekteeritud HPV5Nluc genoomi koguseid 100 ng, 200 ng ja 300 ng. **B ja C:** Nluc aktiivsust mõõdeti viies korduses ja normaliseeriti aluselise fosfataasi aktiivsuse järgi. Mõlema paneeli puhul võeti keskmine DMSO kontroll kui 100 ning arvutati selle järgi kõik ülejäänud keskmised väärtused (+/- SD, n=5).

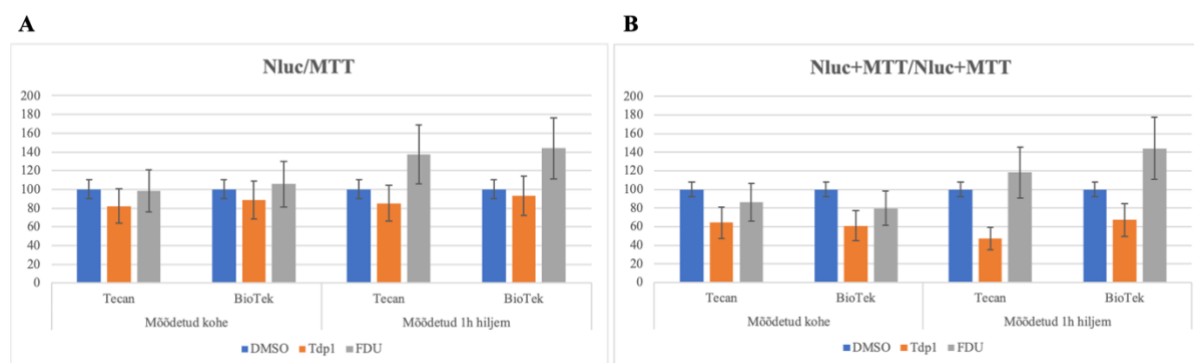
SB tulemustest järeldati, et kõige optimaalsem transfekteeritav HPV5Nluc genoomi kogus on 200 ng kuna 100 ng juures on reagentidega töödeldud genoomi kogus raskesti eristatav ning 300 ng juures on seda juba liiga palju (Joonis 3A). Nluc aktiivsuse tulemustest on näha, et reagentide lisamine 24 h pärast transfektiooni ei avalda veel olulist mõju Nluc aktiivsusele

(Joonis 3B). Seepärast otsustati valida välja reagentide lisamine 48 h pärast transfektsiooni, kus Nluc aktiivsused on juba selgesti mõjutatud lisatud reagentide poolt (Joonis 3C).

2.3.1.2 Lutsiferaasi mõõtmise tingimuste optimeerimine

Kuna testitav raamatukogu sisaldab väga palju kemikaale ja igat kemikaali tuleks katsetada vähemalt kolmes korduses, muutub Nluc aktiivsuse ja selle normaliseerimiseks kasutatav aluselise fosfataasi mõõtmine väga tülikaks (söötme aspireerimine, lüüsitud rakkude uuele plaadile tõstmine jne). Seepärast otsustati mõõta Nluc aktiivsust otse söötmetest, milles rakud olid inkubeeritud. Rakkude elulemuse ja Nluc aktiivsuse normaliseerimiseks kasutati MTS analüüsi. Lisaks sellele otsustati võrrelda kahte erineva rakuplaatide lugejaid firmadelt Tecan ja BioTek.

Selleks transfekeeriti U2OS rakke 200 ng HPV5Nluc genoomiga, inkubeeriti rakke 48 h ja lisati DMSO, Tdp1 inhibiitor ja FDU. Rakke inkubeeriti reagentidega veel 48 h. Katse teostati kahes korduses, kus esimesele osale lisati otse inkubeerimise söötmesse Nluc substraat ja MTS lahust eraldi ning teises osas lisati Nluc substraat ja MTS lahust ühte kaevu. Teostati kokku neli mõõtmist: Nluc aktiivsused ja rakkude elulemus mõõdeti kahe erineva spektrofotomeetriga (Tecan ja BioTek) kohe pärast substraatide lisamist ning 1 h hiljem (Joonis 4).



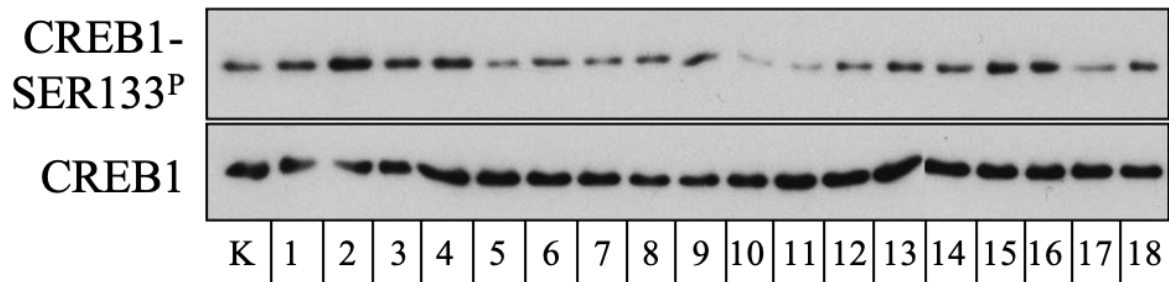
Joonis 4. HPV5Nluc genoomi Nluc aktiivsuste mõõtmise tulemused. U2OS rakud transfekeeriti HPV5Nluc genoomiga, inkubeeriti 48 h, lisati DMSO (kontroll), Tdp1 ja FDU reagentid ning inkubeeriti veel 48 h. Mõlema paneeli (A ja B) puhul teostati 4 mõõtmist, kus kasutati kahte erinevat rakuplaatide lugejat, erinevat substraatide lisamise põhimõtet ning erinevat Nluc ja MTS substraatidega inkubeerimise aega. **A:** Nluc substraat ja MTS lahust lisati kahele erinevale plaadile ja mõõdeti iseseisvalt. Seejärel normaliseeriti lutsiferaasi aktiivsus saadud MTS tulemustega. Katse teostati neljas korduses. Graafikul on DMSO võetud kui 100 ning ülejäänud väärtused selle järgi ümberarvutatud (+/-SD, n=4). **B:** Nluc substraat ja MTS lahust lisati seguna ühele plaadile ja mõõdeti ühelt

plaadilt nii Nluc kui ka MTS aktiivsused. DMSO võetud kui 100, ülejäänud väärtused arvutati selle järgi (+/-SD, n=4).

Saadud tulemustest on näha, et ei ole olulist erinevust, millise tootja luminomeetrit kasutada, kuigi BioTek on natuke tundlikum. Kuna skriiningu läbi viimisel tuleks suurele arvule 96-kaevuga plaatidele lisada Nluc substraati ja MTS lahust, siis tekib võimalus signaalide kadumisele aja möödudes. Läbiviidud katsest on näha, et isegi 1 tunni möödudes väga suurt signaalide kadu ei toimu. Lisaks sellele on võimalik kokku hoida 96-kaevuga plaate ja aega, pipeteerides Nluc/MTS segu otse rakkude inkubeerimise söötmesse kuna B paneelil saadud Nluc aktiivsused ei näita suurt erinevust A paneelist.

2.3.2 Mitmete leitud HPV5 inhibiitorite analüüs PKA signaaliraja kontekstis

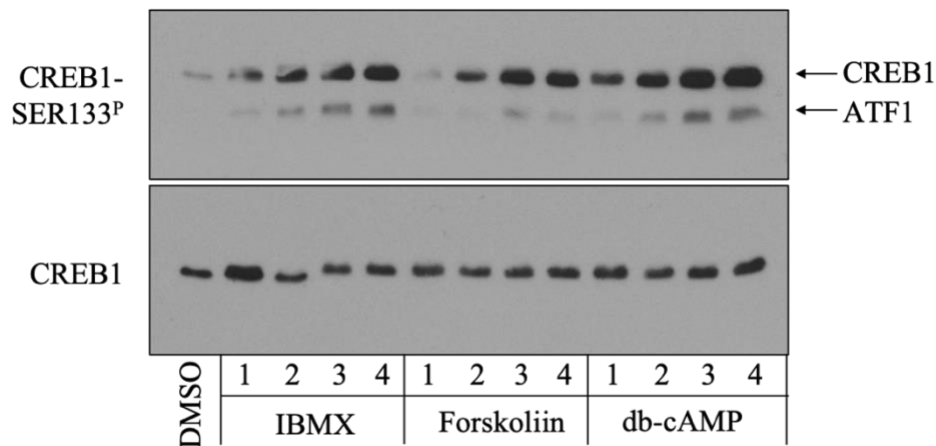
Skriiningu tulemusena leiti mitmed kemikaalid, mis kas aktiveerisid või inhibeerisid HPV5Nluc genoomi replikatsiooni U2OS rakkudes. Üheks võimalikuks inhibitsiooni mehhanismiks on proteiinkinaasidest sõltuv viiruse replikatsioonis osalevate valkude E1 ja E2 regulatsioon. Eelnevalt on näidatud, et erinevate HPV-de E1 ja E2 valgud on fosforüleeritud proteiinid, mille aktiivsus, rakusisene paiknemine ja stabiilsus reguleeritakse erinevate proteiinkinaaside poolt (Zanardi *et al.*, 1997). Üks proteiinkinaasidest, mis osaleb HPV5-ga väga sarnase beetapapilloomiviiruse HPV8 E2 valgu regulatsioonis on cAMP-sõltuv proteiinkinaas (PKA) (Sekhar ja McBride., 2012). Seega, uuriti PKA-sõltuva signaaliraja aktivatsiooni leitud HPV5Nluc replikatsiooni inhibiitorite juuresolekul. Katalüütiliselt aktiivse PKA üheks märklaudvalgus on CREB1, mille tase rakkudes saab analüüsida immunoblottiga, kasutades totaalse ja fosforüülitud CREB1-vastased antikehi. Analüüsiks valiti välja 18 HPV5Nluc replikatsiooni inhibiitorit ja töödeldi nendega HPV5Nluc genoomiga transfekteeritud U2OS rakud. Kemikaalidel lasti mõjuda 30 min ning seejärel analüüsiti lüsaatidest totaalse ja fosforüleeritud CREB1 valgu taset immunoblotti abil (Joonis 5).



Joonis 5. Fosforüleeritud CREB1 valgu tase tõuseb mitme erineva HPV5Nluc replikatsiooni inhibiitorijuuresolekul. U2OS rakke transfekeeriti HPV5Nluc genoomiga, inkubeeriti 3 päeva ning lisati skriiningu käigus leitud HPV5Nluc genoomi aktiveerivaid või inhibeerivaid kemikaale. Rakud reagentide juuresolekul inkubeeriti 30 min. Negatiivse kontrollina (K) kasutati DMSO. Rakud lüüsi ja teostati WB analüüs kasutades CREB fosfo-seriini 133 ja totaalse CREB1 vastaseid antikehi. Ülemisel paneelil on näidatud erinevate kemikaalide poolt põhjustatud mõju CREB1 133 seriini fosforüleerimisele. Alumisel paneelil on rakus sisalduv CREB1 kogus.

Saadud tulemustest on näha, et võrreldes kemikaalide lahusti DMSO-ga, mida kasutati negatiivse kontrollina, varieerus fosforüleeritud CREB1 tase rakkudes. Katset korrati 2 korda. Mõlema katse puhul tõusis HPV5Nluc replikatsiooni inhibiitorite 1-4, 13, 15 ja 16 juuresolekul fosforüleeritud CREB1 tase rakkudes, mille põhjuseks võib olla PKA aktivatsioon. PKA aktivatsioon on seotud cAMP taseme tõusuga rakkudes, mille tulemusena vabastatakse ka rohkem PKA katalüütilisi subühikuid, mis omakorda fosforüülivad CREB1 valku tuumas. Kuna uuritavad kemikaalid inhibeerivad HPV5Nluc replikatsiooni ja aktiveerivad PKA taset, oleme pakkunud, et PKA võib osaleda HPV5 negatiivses regulatsioonis läbi E1 ja/või E2 valkude inhibitsiooni.

cAMP tootmist rakkudes suurendatakse vesinikkarbonaadi ja kaltsiumioonide juuresolekul, aktiveerides adenülaat tsüklaase. Samas, fosfodiesterasid osalevad cAMP degradatsioonis (Litvin *et al.*, 2003; Omori *et al.*, 2007). Kuna PKA aktiivsus sõltub cAMP tasemest rakus, uuriti lähemalt teadaolevaid cAMP taset ja PKA katalüütilist aktiivsust mõjutavate farmakoloogiliste ainete mõju HPV5 replikatsioonile U2OS rakkudes. Nendeks valiti välja cAMP-i analoog dibutüül-cAMP (db-cAMP), fosfodiesterasid inhibiitori 3-isobutüül-1-metüül-ksanteen IBMX ja adenülaat tsüklaasid aktiveerija forskoliin. Kõigi kolmega sooritati CREB1 fosforüleerimise katse, kuid seekord inkubeeriti U2OS rakke regulaatoritega 10 min, 30 min, 1 tund ja 2 tundi ning analüüsiti totaalne ja fosforüleeritud CREB1 tase rakulüsaatidest kasutades immunoblotti (Joonis 6).



Joonis 6. U2OS rakkude töötlemine PKA aktivaatoritega. Rakke inkubeeriti reagentidega 2 tundi (1), 1 tund (2), 30 min (3) ja 10 min (4). Totaalset ja fosforüleeritud CREB1 taset analüüsiti vastavate antikehade ja immunobloti abil. Negatiivse kontrollina kasutati DMSO. Ülemisel paneelil on näidatud fosforüülitud CREB1 (ülemine bänd) ja ATF1 (alumine bänd). Alumisel paneelil on näidatud totaalse CREB1 kogus rakkudes.

Totaalse CREB1 tase jäi kõikides ajapunktides stabiilseks, kuid fosforüleeritud CREB1 tase tõusis PKA aktivaatorite juuresolekul. Sarnaselt CREB1-ga, tõusis ka fosforüleeritud ATF1 transkriptsiooni faktori tase, mida saab detekteerida sama antikehaga. Samas, fosforüülitud valkude tase oli kõrgeim 10 ja 30 min peale PKA aktivaatorite lisamist ning seejärel hakkas langema, mis omakorda viitab CREB1 ja ATF1 kiirele defosforüleerimisele.

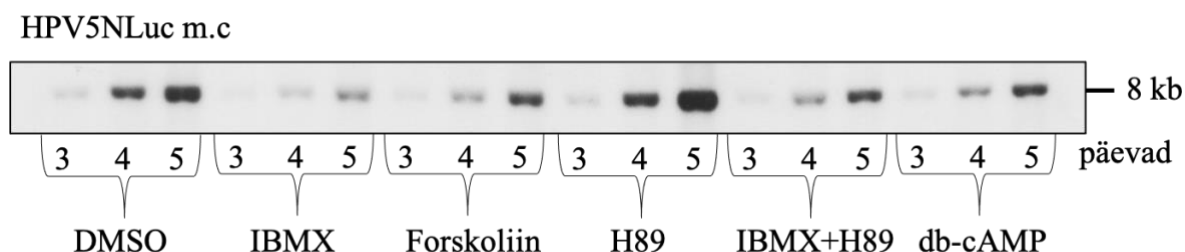
Katse tulemusest järeldati, et valitud keemilised ained sisenevad U2OS rakkudesse väga kiiresti ning omavad bioloogilist aktiivsust kuna fosforüleeritud CREB1 ja ATF1 tasemed tõusevad juba 10 min peale töötlemise algust. Valitud aineid kasutati edaspidistes katsetes.

2.3.3 Endogeense PKA aktiivsuse muutus mõjutab HPV5 replikatsiooni

Nagu enne mainitud, võib reguleerida PKA aktiivsust teatud toimeainetega, mis kas mõjutavad ensüümi aktiivsust või muudavad PKA aktivatsiooni signaalirajas osalevate komponentide funktsiooni. Lisaks IBMX-le, forskoliinile ja db-cAMP-le, otsustasime kasutada ka PKA inhibiitorit H89, mis konkureerib PKA katalüütilises subühikus ATP-ga ja läbi selle takistab PKA-l viia läbi fosforüleerimise reaktsiooni. Kuna kasutatud farmakoloogilised ained näitasid kiiret sisenemist U2OS rakkudesse ja sealset füsioloogilist aktiivsust, vaatasime, kuidas nad mõjutavad HPV5Nluc genoomi replikatsiooni.

U2OS rakke transfecteeriti HPV5Nluc genoomiga ning lisati järgmisel päeval IBMX, forskoliin, H89, IBMX koos H89-ga ning db-cAMP. DMSO kasutati negatiivse kontrollina.

Rakke inkubeeriti toimeainetega 2, 3 ja 4 päeva. Seejärel eraldati totaalne DNA, töödeldi HPV5 genoomi linealiseeriva SacI restriksiooni ensüümiga ja DpnI ensüümiga, et lõigata bakteriaalse metülatsioonimustriga DNA-d. DNA-d analüüsiti SB meetodil, korrates katset kaks korda. Agaroosgeelilt membraanile ülekantud DNA-d hübridiseeriti radioaktiivse HPV5 prooviga ning ilmutati röntgenfilmile (Joonis 7).



Joonis 7. HPV5Nluc genoomi replikatsiooni efektiivsus PKA katalüütilist aktiivsust mõjutavate reagentidega töötlemisel. U2OS rakke transfecteeriti HPV5Nluc genoomiga. Järgmisel päeval lisati rakkudele DMSO (negatiivne kontroll), 500 μ M IBMX, 20 μ M forskoliin, 1 μ M H89, 500 μ M ja 1 μ M IBMX ja H89 vastavalt ning 1 μ M db-cAMP. Sööde kemikaalidega vahetati iga päev. Alates kolmandast päevast võeti iga päev osa rakke analüüsiks ja kokku inkubeeriti rakud 3, 4 või 5 päeva. Eraldati totaalne DNA, töödeldi DpnI ensüümiga, linealiseeriti HPV5-Nluc genoom SacI ensüümiga ning teostati SB analüüs.

IBMX inhibeeris HPV5 replikatsiooni kõige suurema efektiivsusega. Forskoliin ja db-cAMP surusid replikatsiooni taset sarnaselt alla, kuid võrreldes IBMX-ga väiksemal määral. PKA inhibiitori H89 lisamisel oli märgata HPV5Nluc replikatsiooni tõusu võrreldes negatiivse kontrolliga. IBMX ja H89 seguga töötlemisel HPV5Nluc replikatsiooni signaalid aga ei taastunud negatiivse kontrolli tasemeni, kuid olid ikkagi kõrgemad replikatsiooni signaalidest detekteeritud ainult IBMX-ga töödeldutud rakkudes.

Tulemusi kokkuvõttes võib öelda, et PKA aktivaatoreid võib pidada töövahenditeks HPV5 replikatsiooni inhibeerimiseks.

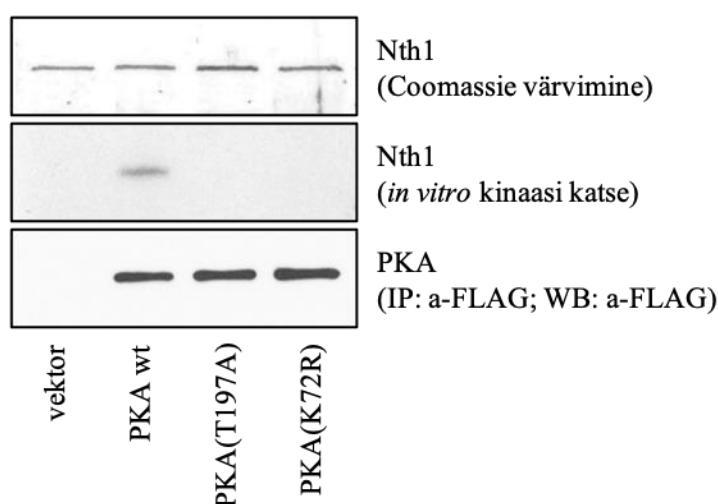
2.3.4 Üleekspresseeritud PKA inhibeerib HPV5 replikatsiooni katalüütilisest aktiivsusest sõltuvalt

PKA üle-ekspressiooni mõju uurimiseks HPV5 replikatsioonile, kasutati meie laboris eelnevalt genereeritud N-terminaalselt FLAG-märgistatud metsiktüüpi (wt) PKA katalüütilise subühiku α (PKAwt) ning selle katalüütiliselt puudulikke mutante PKA(T197A) ja PKA(K72R). Varasemalt on näidatud, et treoniin 197 asendaminealaniiniga põhjustab PKA katalüütilise

aktiivsuse langust. Võimalikuks põhjuseks on treoniini jäägil paiknev hüdroksüülrühm, mis stabiliseerib aktiivsaiti ja aitab toimuda fosfaatrühma ülekande reaktsioonil. 72. positsioonis paikneva lüsiini asendamine arginiiniga põhjustab aga ATP siduvat domeeni kitsenemist ja läbi selle ka kinaasi aktiivsuse langust (Cheng *et al.*, 2006; Iyer *et al.*, 2005).

Eelnimetatud PKA konstruktide kasutamiseks tulevast katsetes kontrolliti esialgu nendelt ekspresseeruvate valkude ensümaatilist aktiivsust U2OS rakkudes. Selleks teostati *in vitro* kinaasne reaktsioon γ^{32} -ATP ja PKA substraati Nth1 juuresolekul, et vaadata, kuidas PKAwt ja selle mutandid on võimelised viia läbi fosforüleerimise reaktsiooni.

U2OS rakud transfecteeriti PKAwt, PKA(T197A), PKA(K72R) konstruktidega ja tühja vektoriga kontrolliks ning inkubeeriti 48 h. Seejärel immuunosadestati FLAG märgisega valke ja analüüsiti *in vitro* kinaasireaktsioonis Nth1 valgu juuresolekul ning immunoblotis (Joonis 8).



Joonis 8. PKAwt ja selle mutantide PKA(T197A) ja PKA(K72R) ensümaatilise aktiivsuse kontroll. U2OS rakud transfecteeriti 2500 ng PKAwt, 8000 ng PKA(T197A), 16000 ng PKA(K72R) plasmiididega ja 8000 ng tühja vektoriga, mida kasutati negatiivseks kontrolliks. Rakulüsaatidest teostati FLAG märgisega valkude immuunosadestamine ja immunoblot FLAG-vastast antikeha kasutades. Fosforüleerimise aktiivsust vaadati kinaasireaktsioonil Nth1 valgu ja γ^{32} -ATP juuresolekul. Kogu Nth1 valgu koguse määramiseks teostati Coomassie värvimine.

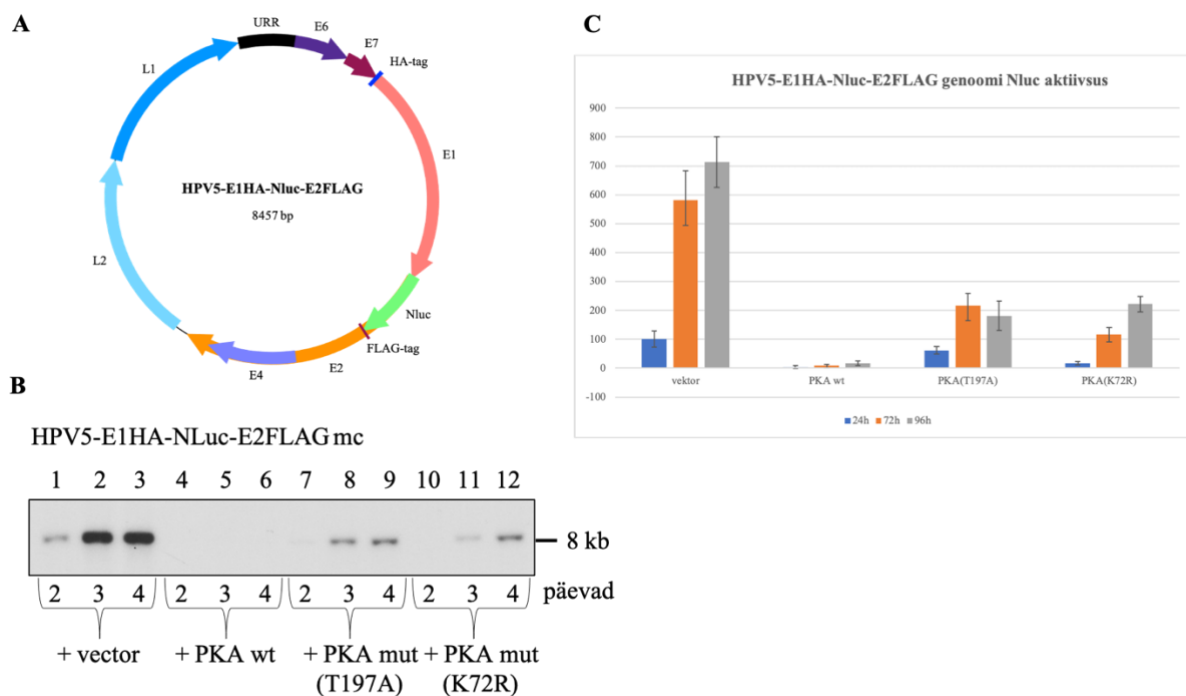
Tulemused näitasid, et ensümaatilist aktiivsust omas ainult PKA wt, kuigi Nth1 kogus oli kõikides proovides sarnane ning üleekspresseeritud PKA mutantide tase rakkudes oli sarnane PKA metsiktüübi tasemega. PKA mutandid ei olnud võimelised fosforüleerima Nth1 valku.

Seos erinevate HPV-de replikatsiooni ja proteiinkinaaside vahel on näidatud juba varem. Näiteks HPV18 ja HPV11 E1 valgu stabiliseerimises osaleb katalüütiliselt aktiivne CK2 α subühik. CDK, MAPK ja FGFR3 kinaasid on aga näidanud olulist rolli erinevate HPV tüüpide E1 ja E2 valkude tuuma lokaliseerumises, mis mõjutab genoomi replikatsiooni (Deng *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 1999; Piirsoo *et al.*, 2019; Sekhar ja McBride., 2012). Võttes arvesse, et HPV5 E1 ja E2 valgud omavad oletatavaid PKA fosforüleerimise saite, oleme pakkunud, et PKA mõjutab HPV genoomi replikatsiooni katalüütilisest aktiivsusest sõltuvalt.

Selleks, et testida pakutud hüpoteesi, kasutati meie laboris loodud HPV5-E1HA-Nluc-E2FLAG genoomi, kuhu peale Nluc kodeerivat järjestust olid sisestatud HPV5 E1 ja E2 valkude tuvastamiseks HA ja FLAG märgised vastavalt E1 ja E2 avatud lugemisraamidesse (Joonis 9A). Selleks, et määrata PKA^{wt} ja selle katalüütiliste mutantide (T197A ja K72R) mõju HPV5-E1HA-Nluc-E2FLAG genoomi replikatsioonile, otsustati viia läbi SB analüüs ning mõõta Nluc aktiivsust.

HPV5 replikatsiooni efektiivsuse analüüsiks transfecteeriti U2OS rakud HPV5-E1HA-Nluc-E2FLAG genoomiga koos pFLAG-PKA konstruktidega ning pFLAG-CMV-4 tühja vektoriga negatiivseks kontrolliks. Rakke inkubeeriti 2, 3 ja 4 päeva. Seejärel analüüsiti proove SB-ga, eelnevalt töödeldes 3,5 μ g totaalselt DNA-d SacI ja DpnI restriksiooni ensüümidega. Katse korraldi 2 korda (Joonis 9).

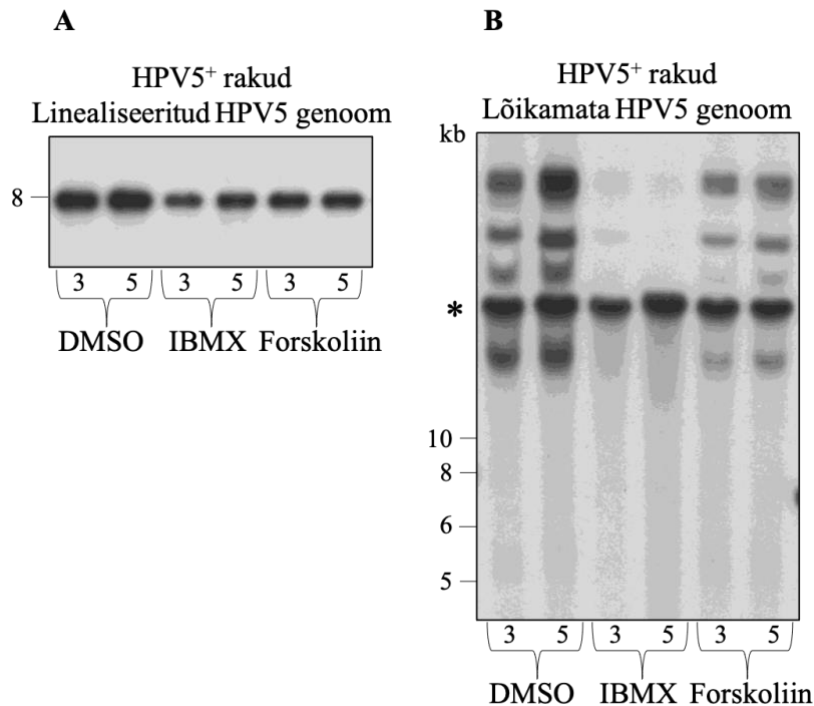
Saadud 8 kb bändid näitavad replitseeritud HPV5-E1HA-Nluc-E2FLAG genoomi. PKA^{wt} ülekspresseerimine näitas tugevat replikatsiooni signaalide mahasurumist (peaaegu 100%). Samal ajal inhibeerisid PKA mutantid T197A ja K72R HPV5 genoomi replikatsiooni väiksemal määral. Sarnased tulemused olid saadud lutsiferaasi katses. PKA^{wt} inhibeeris HPV5-E1HA-Nluc-E2FLAG genoomi pealt ekspresseeritud Nluc aktiivsust peaaegu 100% ning PKA mutantide T197A ja K72R juuresolekul oli Nluc aktiivsus umbes 50% ja 75% väiksem, kui kontrollis. Saadud tulemused näitavad, et PKA surub maha HPV5 replikatsiooni katalüütilisest aktiivsusest sõltuvalt.



Joonis 9. HPV5 replikatsiooni efektiivsuse sõltuvus PKA aktiivsusest U2OS rakkudes. 1200 ng HPV5-E1HA-NLuc-E2FLAG genoomi kotransfekteeriti 1500 ng pFLAG-CMV-4 vektoriga, 240 ng pFLAG-PKAwt, 1000 ng pFLAG-PKA(T197A) või 1500 ng pFLAG-PKA(K72R) konstruktiga. **A:** HPV5-E1HA-NLuc-E2FLAG genoomi kaart (URR – *upstream regulatory region*). **B:** Totaalne DNA eraldati 2, 3 ja 4 päeval, töödeldi DpnI ja HPV5-E1HA-NLuc-E2FLAG linealiseeriva SacI restriktiooni ensüümidega ning analüüsiti SB meetodil. **C:** NLuc aktiivsust mõõdeti kuues korduses ja normaliseeriti aluselise fosfataasi aktiivsuse vastu. Negatiivse kontrolli normaliseeritud NLuc aktiivsus esimesest ajapunktist võeti kui 100 ja ülejäänud väärtused arvutati selle suhtes (graafikul on näidatud keskmine väärtus $\pm$ SD, $n=6$).

2.3.5 PKA surub maha HPV5 genoomi replikatsiooni viirusinfektsiooni stabiilse säilimise faasis

HPV säilumisaasi uurimiseks kasutatakse meie laborirühmas tekitatud U2OS rakkudel põhinevaid stabiilseid HPV-positiivseid liine. Stabiilsetes liinides säilivad HPV genoomid mitmekoopiliste episoomidena põhiliselt erinevate suurustega oligomeeride vormis ning replitseeruvad sünkroonselt rakulise DNA-ga (Geimanen *et al.*, 2011). Selleks, et teha kindlaks, kas PKA aktiivsuse tõstmine mõjutab HPV5 genoomi replikatsiooni säilumisaasi ajal, kasutati HPV5⁺ rakke (kirjeldatud kui HPV5⁺ Kloon 15 Geimanen *et al.*, 2011, Sankovski 2014). PKA aktivaatoreid IBMX ja forskoliin inkubeeriti rakkudega 3 ja 5 päeva. Seejärel eraldati madalmolekulaarne DNA HIRT meetodiga ja analüüsiti SB-ga (Joonis 10).



Joonis 10. Stabiilses rakuliinis on HPV5 genoomi replikatsioon mõjutatud PKA katalüütilise aktiivsuse poolt. A: HPV5⁺ rakud inkubeeriti DMSO (kontroll), IBMX ja forskoliiniga 3 ja 5 päeva. Madalmolekulaarne DNA eraldati HIRT meetodiga ja töödeldi SacI restriктаasiga HPV5 genoomi lineariseerimiseks. Teostati SB. **B:** HPV5⁺ rakud inkubeeriti DMSO, IBMX ja forskoliiniga, eraldati madalmolekulaarne DNA ning töödeldi NheI restriктаasiga, HPV5 genoomi mittelõikava ensüümiga. Analüüsiiti SB-ga.

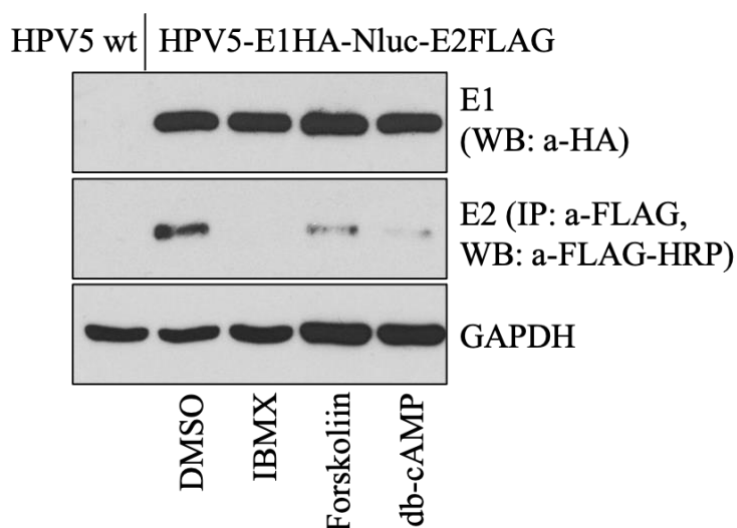
Mõlemad PKA aktivaatorid põhjustasid negatiivse efekti HPV5 genoomi stabiilsele replikatsioonile (Joonis 10A). IBMX näitas tugevamat mõju, mis korreleerub transientse replikatsiooni katse tulemusega (Joonis 7). Negatiivset efekti on märgata nii 3 päeva kui ka 5 päeva jooksul töödeldud rakkudes, kus nad on rohkem konfluentsed. Lõikamata HPV5 DNA SB analüüs näitab mustri erinevatest oligomeersetest vormidest. HPV5⁺ rakkude töötlemine IBMX ja forskoliiniga põhjustas kõikide HPV5 replikonide inhibeerimist, väljaarvatud kõige levinud oligomeerset vormi (tähistatud tärniga). Sarnast tulemust on saadud HPV18⁺ rakkudes, milles E1 valgu taset oli vähendatud (Piirsoo *et al.*, 2020). Seepärast saab pakkuda, et PKA vähendatud HPV5 genoomi inhibitsioonis osalevad E1 ja/või E2 valgud.

2.3.6 PKA suunab HPV5 E2 valgu proteasoomsele degradatsioonile

Kuna PKA aktivatsioon kutsus esile tugeva negatiivse efekti HPV5 replikatsioonile, siis järgmiseks sammuks oli uurida PKA aktiveerivate reagentide mõju viirusvalkudele E1 ja E2.

Katse läbiviimiseks transfecteeriti U2OS rakke HPV5 wt (negatiivseks kontrolliks) ja HPV5-E1HA-Nluc-E2FLAG genoomidega, kasvatati rakke 4 päeva ja seejärel inkubeeriti rakke IBMX, forskoliin ja db-cAMP reagentidega 6 tundi. E1 valku detekteeriti otse rakkude lüsaadist immunoblottiga, kasutades HA antikeha ning E2 valgu detekteerimise jaoks teostati immuunosadestamine ning seejärel WB-i FLAG antikehaga. Kõikidest rakulüsaatidest määrati ka koduhoidva valgu GAPDH tase valkude koguse kontrolliks (Joonis 11).

Immunoblot analüüs näitas, et HPV5 E1 ja E2 valgud liikusid vastavalt umbes 90 ja 65 kDa juures. Kõrgendatud PKA katalüüline aktiivsus põhjustas E2 valgu taseme vähenemist, kuid ei mõjutanud E1 valgu taset. Kõige tugevamat mõju E2 valgu tasemele oli näha IBMX-i juuresolekul. db-cAMP põhjustas aga väiksemat negatiivset mõju E2 valgu kogusele ning forskoliini lisamine avaldas kõige nõrgema mõju E2 valgule. Saadud tulemused korreleeruvad HPV5 replikatsiooni katsete tulemustega (Joonis 7), kus kõige tugevam HPV5 replikatsiooni signaali langus oli detekteeritud IBMX juuresolekul.



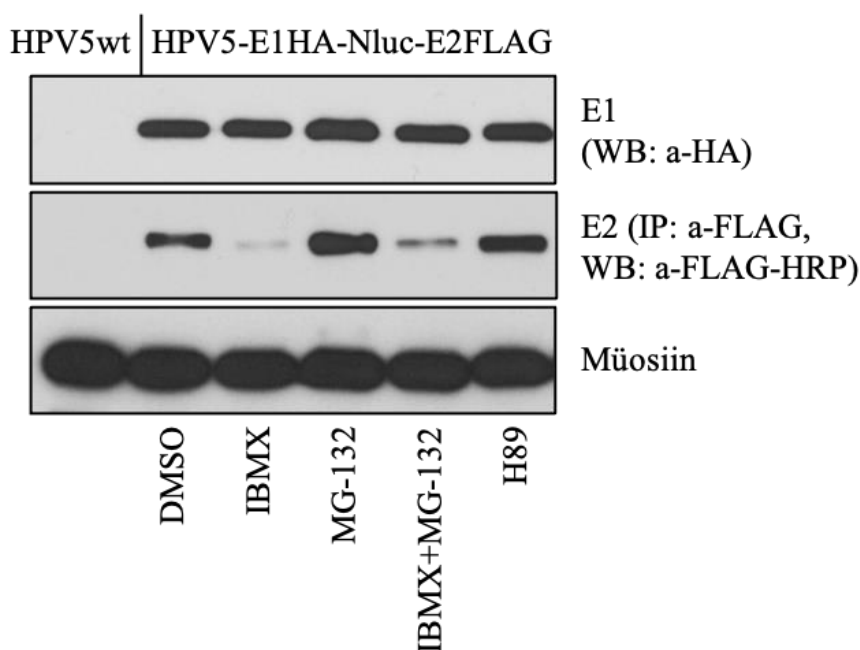
Joonis 11. PKA aktivatsioon viib HPV5 E2 valgu degradatsioonile. U2OS rakke transfecteeriti HPV5 wt ja HPV5-E1HA-Nluc-E2FLAG genoomidega ja inkubeeriti 4 päeva. Seejärel töödeldi DMSO (negatiivne kontroll), IBMX, forskoliin ja db-cAMP reagentidega 6 tunni jooksul. HA-märgistatud E1 valk tuvastati otse rakkude lüsaadist anti-HA-HRP antikehaga. FLAG-märgistatud E2 valgule teostati immuunosadestamine a-FLAG-M2 antikehaga ja siis detekteeriti a-FLAG-HRP antikehaga. Koduhoidva valku GAPDH kasutati kontrolliks.

HPV5 E2 valgu koguse vähenemine võib olla seotud kas kiire transkriptsiooni blokeerimisega või E2 valgu degradeerimisega. Võimaliku põhjuse leidmiseks otsustati blokeerida valkude proteasoomne degradeerimise rada, kasutades farmakoloogilist proteasoomi inhibiitorit MG-132.

Selleks transfecteeriti U2OS rakud HPV5-E1HA-Nluc-E2FLAG genoomiga. HPV5 wt kasutati negatiivseks kontrolliks. Rakke inkubeeriti IBMX, MG-132 ning IBMX ja MG-132 seguga. Lisaks kasutati ka PKA inhibiitor H89. Seejärel tuvastati E1 valku otse rakkude lüsaadist HA antikehaga. E2 valgu taseme kindlaks tegemiseks sooritati immuunosadestamine FLAG-vastava antikehaga ja visualiseeriti immunobloti abil. Müosiini kasutati laadimiskontrollina.

Joonisel 12 on näidatud saadud tulemus. E1 valgu kogus jäi kõikides proovides ühesuguseks. Detekteeritud E2 valgu signaal IBMX-i lisamisel oli raskelt märgatav, kuid proteasoomi inhibiitori juures oli valgu tase mõnevõrra tagasi taastunud. Rakkude töötlemine MG-132-ga näitas E2 valgu suurenenud ekspressiooni võrreldes DMSO kontrolliga. PKA inhibiitori juuresolekul on replikatsiooni signaalid võrreldes kontrolliga peaaegu samal tasemel.

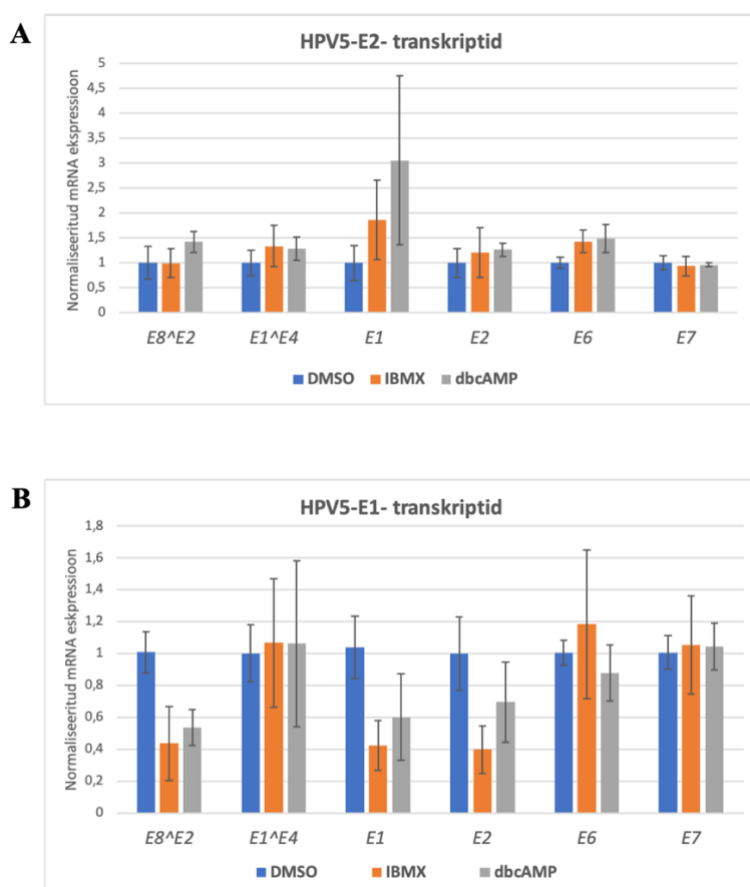
Teostatud katse kinnitab hüpoteesi, et E2 valku degradeeridakse proteasoomide poolt, kui PKA on aktiveeritud.



Joonis 12. PKA aktivatsioon viib E2 valgu proteasoomsele degradeerimisele. U2OS rakud transfecteeriti 1 µg HPV5-E1HA-Nluc-E2FLAG genoomiga ja 1µg HPV5 wt genoomiga negatiivseks kontrolliks. Järgmisel päeval lisati 10 µM MG-132, 0.5 mM IBMX ja 1 µM H89. Reagente inkubeeriti 6 tundi. Rakkude lüsaadist detekteeriti E1 valk HA-vastava antikehaga. E2 valku immuunosadestati ja tuvastati FLAG-vastava antikehaga. Müosiin on laadimiskontrolliks.

2.3.7 PKA pärsib HPV5 transkriptsiooni E2 valgust sõltuvalt

E2 valgu sõltumatute PKA mõjude välistamiseks HPV5 replikatsioonile, kasutati HPV5E1⁻ ja HPV5E2⁻ replikatsiooni puudulikke genome. Kasutatud genomides ei ekspresseeru vastavalt E1 ja E2 valgud tänu sisse viidud punktmutatsioonile esimeses AUG koodonis. Genome transfecteeriti U2OS rakkudes. Rakke inkubeeriti 72 tundi ning seejärel lisati IBMX ja db-cAMP reagente ja inkubeeriti 8 tundi. Järgmisena analüüsiti *E8^ΔE2*, *E1^ΔE4*, *E1*, *E2*, *E6* ja *E7* transkripte qPCR-ga, kasutades praimerite segu (Lisa 1: Töös kasutatud praimerid) (Joonis 13).



Joonis 13. HPV5 E1 ja E2 puudulikke genomide pealt sünteesitud transkriptid PKA inhibeerivate reagentide juuresolekul. U2OS rakke transfecteeriti HPV5E2⁻ ja HPV5E1⁻ replikatsioonipuudulikke genomidega, inkubeeriti 3 päeva ja lisati IBMX ja db-cAMP reagentid 8 tunniks. DMSO kasutati negatiivseks kontrolliks. *E8^ΔE2*, *E1^ΔE4*, *E1*, *E2*, *E6* ja *E7* mRNA ekspressiooni tasemed analüüsiti qPCR-ga kolmes korduses. Saadud tulemused normaliseeriti *GAPDH* ekspressiooni taseme vastu. Transkriptide tasemed DMSO-ga töödeldud proovides on võetud 1-ks ning ülejäänud väärtused arvutati selle suhtes. Graafikul on näidatud keskmised väärtused (+/- SD).

HPV5E1⁻ genoomi transkriptide analüüsist selgus, et *E8^ΔE2*, *E1* ja *E2* transkriptide tase langes PKA aktivaatoritega töödeldud rakudes märkimisväärselt võrreldes DMSO-ga töödeldud negatiivse kontrolliga. Ülejäänud transkriptide ekspressioon jäi umbes võrdseks DMSO- ja PKA aktivaatoritega töödeldud rakudes. HPV5E2⁻ genoomilt ekspresseeruvate *E8^ΔE2*, *E1^ΔE4*, *E2*, *E6* ja *E7* transkriptide tase jäi aga muutumatuna PKA aktiveerivate reagentide juuresolekul, kuid *E1* mRNA tase oli kõrgem IBMX- ja db-cAMP-ga töödeldud rakudes.

Saadud tulemused näitavad, et E2-sõltumatu viiruse transkriptsioon ei ole mõjutatud kõrgendatud PKA aktiivsusest.

2.4 Arutelu

HPV levib nii sugulisel teel kui ka naha kontaktide kaudu ja põhjustab umbes 600000 emakakaela, tupe, peenise, päraku ja orofarüingealse vähi juhtumit aastas (Martel *et al.*, 2017). Lisaks sellele põhjustab HPV ka healoomulisi kasvajaid nagu tüükad ja papilloomid. Enamusel juhtudel on nakatumine asümptomaatiline. Pahaloomuliste kasvajate teket põhjustavate HPV tüüpide (eriti HPV16 ja HPV18) vastu on väljatöötatud profülaktilised vaktsiinid, mis aitavad ära hoida viirusega nakkumist. Probleemiks on aga see, et vaktsiinid ei aita välja ravida juba olemasolevat infektsiooni.

Uute ravimite tuvastamine erinevate sihtmärkide suhtes algab tavaliselt tuhandeid ühendeid sisaldavate raamatukogude skriininguga. Meie uurimisrühmas viidi 2017. aastal läbi suure kemikaalide raamatukogu testimine, selgitamaks uusi HPV18 genoomi replikatsiooni inhibiitoreid. Selleks kasutati HPV18 genoomi ja Rluc reportergeeni sisaldavat konstrukti ning normaliseerimiseks kasutati Fluc aktiivsust (Toots *et al.*, 2017). Uue raamatukogu testimises otsustati kasutada reportergeenina Nluc, mis omab võrreldes Rluc-ga väiksemat suurust, kõrgemat stabiilsust ja aktiivsust. Normaliseerimismeetodiks valiti MTS analüüs, mis lubab määrata rakkude elulemust otse rakkude inkubeerimissöötmetest. Analüüsitavaks HPV tüübiks valiti HPV5, mis on onkogeenne beeta perekonda kuuluv tüüp ja võib põhjustada immuunpuudulikel inimestel pahaloomulisi kasvajaid. Selle magistritöö raames tehti ettevalmistuskatsed, mis aitasid määrata skriiningu optimaalsed tingimused, et hoida kokku aega, materjali ja korrigeerida täpsust. Skriining teostati ning selle tulemusena leiti mitmed HPV5 replikatsiooni inhibeerivaid kemikaale.

HPV replikatsiooni toimumises on äärmiselt olulised E1 ja E2 valgud. Varasemalt on näidatud, et E1 ja E2 võivad olla märklaud valkudeks erinevatele rakulistele proteiinkinaasidele, mis E1 ja/või E2 fosforüleerimise kaudu mõjutavad nende bioloogilist aktiivsust ning viiruse replikatsiooni nii positiivselt kui ka negatiivselt (Piirsoo *et al.*, 2019; Sekhar ja McBride, 2012; Xie *et al.*, 2017).

Antud töös on täpsemalt uuritud PKA mõju HPV5 genoomi replikatsioonile. PKA valiti uuritavaks kinaasiks tänu mitmele põhjusele. Näiteks ekspresseeritakse PKA-d keratinotsüütides, mis on HPV looduslikeks peremeesrakkudeks ning cAMP, mis on PKA regulaatoriks, mõjutab naha keratinotsüütide proliferatsiooni ja diferentseerumist. Lisaks

sellele, bioinformaatiline analüüs on näidanud, et erinevate HPV tüüpide E1 ja E2 valgud omavad oletatavaid PKA konsensussaiete R-R/X-S/T (Kennelly ja Krebs, 1991). Seepärast oletasime, et PKA võib mõjutada viiruse E1 ja/või E2 valke ning osaleda replikatsiooni regulatsioonis. PKA ja HPV valkude omavahelise interaktsiooni uurimine aitaks aru saada viiruse elutsükli regulatsioonist peremehe rakkudes ja annaks rohkem aimu uute ravimite väljatöötamiseks HPV infektsiooni vastu.

Kuna HPV elutsükkel sõltub peremehe keratinotsüütide diferentseerumisprogrammist, siis selle uurimine laboritingimustes on olnud äärmiselt keeruline. Seepärast on meie uurimisrühmas väljatöötatud U2OS rakuliinil põhinev mudelsüsteem viiruse replikatsiooni uurimiseks. U2OS rakuliin toetab paljude HPV-tüüpide replikatsiooni. (Geimanen *et al.*, 2011).

Teostatud töö tulemuseks leiti, et HPV5 genoomi replikatsioon U2OS rakkudes on PKA sõltuv. HPV5 replikatsiooni signaalid olid tugevalt maha surutud PKA wt üle-ekspressioonil või endogeense PKA aktiivsuse vähendamisel PKA aktivaatoritega (IBMX ja forskoliin). PKA aktivaatorite abil saadud efektide kõrvalekaldeid saab seletada nende võimalike sihtmärgiväliste mõjudega. IBMX, kui fosfodiesterasidide inhibiitor, võib aktiveerida cGMP-sõltuvat kinaasi signaaliraja (Stroop ja Beavo, 1991). Forskoliin omakorda, kui membraaniga seotud adenülaasi tsüklaaside aktiveerija ei aktiveeri tsütosoolseid adenülaas tsüklaase (Tresguerres *et al.*, 2011). Samuti näidati, et PKA aktiivsuse inhibiitori H89 juuresolekul HPV5 replikatsiooni tase tõusis. Seega, PKA aktiivsuse aktivaatoreid ja inhibiitoreid võib pidada potentsiaalseteks HPV5 genoomi replikatsiooni regulaatoriteks.

Seoses sellega, et HPV replikatsiooniks absoluutselt vajalikud valgud on E1 ja E2, vaatasime, kuidas mõjutab nende taset PKA aktivatsioon. Katsetest selgus, et kõrgendatud PKA aktivatsioon viib HPV5 E2 valku proteasoomsele degradatsioonile. Kusjuures PKA aktivatsioon ei avaldanud negatiivset mõju HPV5 E1 valgule. Varasemalt on näidatud, et mitmete erinevate alfa HPV tüüpide E2 valk viiakse degradatsiooni ubikvitiin-proteasoomse rajaga läbi aminoterminaalse transaktivatsiooni domeeni (Bellanger *et al.*, 2001; Gagnon *et al.*, 2009).

HPV5 E2 valgu proteasoomsele degradeerimisele viimist tänu PKA-sõltuva fosforüleerimisele on võimalik seletada kahe mehhanismiga. Esiteks, ubikvitiin ligaas (E3) võib tunda ära E2

valgul PKA poolt fosforüleeritud kohta ja seonduda sellega (Chen *et al.*, 1995). Teiseks, fosforüülimine võib viia E2 valgu konformatsioonilistele muutustele, mis lubab ubikvintiinil kergemini seonduda ja seeläbi edastada valk proteasoomidele (Johnson ja Barford, 1993). Saadud tulemuste alusel ei ole kahjuks võimalik täpselt öelda, mis mehhanismi läbi toimub E2 valgu proteasoomne degradeerimine.

Saadud tulemused on olulised beeta HPV elutsükli kulgemise paremaks arusaamiseks. Antud töö raames oleme leidnud olulise HPV5 replikatsiooni regulaatori cAMP-sõltuva proteiinkinaasi näol. Selle projekti pikaajaline eesmärk on saada sügavam ülevaade PKA ja teiste peremeesraku faktorite ning HPV omavaheliste interaktsioonide kohta ja seeläbi anda oma panus uute efektiivsete ravi strateegiate väljatöötamises HPV-nakkuse vastu.

KOKKUVÕTE

Käesolev töö keskendus HPV5 replikatsiooni muutuste uurimisele cAMP-sõltuva proteiinkinaasi A aktivatsioonil U2OS rakuliinis. Lisaks sellele optimeeriti HPV5Nluc genoomi uue kemikaalide raamatukogu testimist. Lõpus tehti järgmised järeldused:

- Skriiningut läbiviimiseks kasutati 200 ng HPV5Nluc genoomi, kasvatati rakud 48 h ja inkubeeriti reagentidega veel 48 h. Lutsiferaasi normaliseerimiseks kasutati MTS lahust, mida pipeteeriti otse söötmesse;
- PKA üle-ekspressioonil või selle aktiivsuse võimendamisel PKA aktivaatoritega (IBMX, forskoliin ja db-cAMP) oli HPV5 replikatsioon tugevalt maha surutud;
- PKA inhibiitori H89 lisamisel toimus HPV5 replikatsiooni taseme tõus;
- HPV5 stabiilse replikatsiooni uurimisel selgus, et PKA aktivatsioon põhjustab samuti negatiivset efekti;
- PKA aktivatsioon viib E2 valku proteasoomsele degradatsioonile.

The impact of cAMP-dependent kinase on the replication of human papillomavirus type-5

Elina Lototskaja
Summary

Human Papillomaviruses (HPVs) are double stranded DNA viruses that infect both mucosal and epithelial basal keratinocytes. HPV lifecycle strongly depends on epithelial differentiation program. Usually, the virus resides in the body in the latent state, and infection is asymptomatic. However, low-risk types can cause benign tumours – warts, papillomas, and condylomas. High-risk HPV types, on the other hand, may lead to malignant tumours. Research of the HPVs, their lifecycle and interactions with host cells may help in development of new therapeutic approaches for HPV-related diseases.

Inhibition of HPV replication is the most important strategy in treatment of infections caused by HPVs. Therefore, it is important to determine molecular background of the HPV and host cell bilateral interactions in order to avoid cell damage during intervention in the infection cycle. Protein kinases are important regulators of many biological processes. E1 and E2 proteins which are crucial regulators of the HPV replication are substrates for a large number of cellular kinases including cAMP-dependent protein kinase (PKA). The main goal of the present thesis is to study how PKA activation affects HPV5 replication in U2OS cells. HPV5 belongs to high-risk beta family causing malign skin tumours in immune deficient persons.

In the first part of the thesis, HPV life cycle is described, with emphasis on the E1 and E2 protein structure and functions. Also, various protein kinase roles (specifically PKA) in host cell and virus life cycle are described. Experimental part consists of two parts: the first one describes the development of optimal experimental conditions suitable for testing the Diversity Set V chemical library in search for the new inhibitors of the HPV5 replication. In the second part, effect of PKA on HPV5 transient and stable replication is studied, and PKA primary viral target is determined. It was discovered that HPV5 replication was negatively affected by the increased PKA activity in U2OS cells. In presence of endogenous PKA activators (IBMX and forskolin) or in response to the overexpressed PKA catalytic subunit, HPV5 replication was strongly inhibited. It was also found that PKA activation led the E2 protein to rapid proteasomal degradation. Unfortunately, it is not possible to ascertain how exactly PKA-dependent phosphorylation induces the degradation of E2. This work was performed in molecular virology laboratory in Institute of Technology, University of Tartu.

TÄNUSÕNAD

Soovin avaldada tänu minu juhendajatele Alla Piirsoole ja Marko Piirsoole nende abi, nõu, toetuse, julgustamise ja kannatuse eest. Nemad on õpetanud mulle uusi meetodeid ja motiveerinud kogu uurimuse vältel.

Samuti soovin tänada Regina Pipitšit ja Annika Laanemetsa nende abi ja tuge eest laboritöö teostamises.

KIRJANDUSE LOETELU

Ammermann, I., Bruckner, M., Matthes, F., Iftner, T. ja Stubenrauch, F. (2008). Inhibition of Transcription and DNA Replication by the Papillomavirus E8/E2C Protein Is Mediated by Interaction with Corepressor Molecules. *Journal Of Virology*, **82**(11), pp. 5127-5136.

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

Bavinck, J., Neale, R., Abeni, D., Euvrard, S., Green, A., Harwood, C., de Koning, M., Naldi, L., Nindl, I., Pawlita, M., Pfister, H., Proby, C., Quint, W., ter Schegget, J., Waterboer, T., Weissenborn, S. ja Feltkamp, M. (2010). Multicenter Study of the Association between Betapapillomavirus Infection and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*, **70**(23), pp.9777-9786.

Bellanger, S., Demeret, C., Goyat, S. ja Thierry, F. (2001). Stability of the Human Papillomavirus Type 18 E2 Protein Is Regulated by a Proteasome Degradation Pathway through Its Amino-Terminal Transactivation Domain. *Journal of Virology*, **75**(16), pp.7244-7251.

Bernard, H., Burk, R., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. ja de Villiers, E., (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, **401**(1), pp.70-79.

Bhatla, N ja Singhal, S. (2020) Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology **65**, pp.98-108

Bian, X., Rosas-Acosta, G., Wu, Y. ja Wilson, V. (2006). Nuclear Import of Bovine Papillomavirus Type 1 E1 Protein Is Mediated by Multiple Alpha Importins and Is Negatively Regulated by Phosphorylation near a Nuclear Localization Signal. *Journal Of Virology*, **81**(6), 2899-2908.

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

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

Buck, C., Day, P. ja Trus, B. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, **445**(1-2), pp.169-174.

Burd, E. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, **16**(1), pp.1-17.

Byrne, D.P., Vonderach, M., Ferries, S., Brownridge, P.J., Eysers, C.E. ja Eysers, P.A. (2016). cAMP-dependent protein kinase (PKA) complexes probed by complementary differential scanning fluorimetry and ion mobility–mass spectrometry. *Biochem. J.* **473**, pp. 3159–3175.

Chen, G ja Stenlund, A. (2001). The E1 Initiator Recognizes Multiple Overlapping Sites in the Papillomavirus Origin of DNA Replication. *Journal Of Virology*, **75**(1), pp. 292-302.

Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. ja Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & Development*, **9**(13), pp.1586-1597.

Cheng, Y., Zhang, Y. ja McCammon, J. (2006). How does activation loop phosphorylation modulate catalytic activity in the cAMP-dependent protein kinase: A theoretical study. *Protein Science*, **15**(4), pp.672-683.

Chin, K., Yang, W., Ravatn, R., Kita, T., Reitman, E., vettori, D., Cvijic, M., Shin, M. ja Iacono, L. (2002). Reinventing the Wheel of Cyclic AMP. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **968**(1), pp.49-64.

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

Day, P ja Schelhaas, M. (2014). Concepts of papillomavirus entry into host cells. *Current Opinion In Virology*, **4**, pp. 24-31.

Deng, W., Lin, B.Y., Jin, G., Wheeler, C.G., Ma, T., Harper, J.W., Broker, T.R. ja Chow, L.T. (2004). Cyclin/CDK Regulates the Nucleocytoplasmic Localization of the Human Papillomavirus E1 DNA Helicase. *J. Virol.* **78**, pp. 13954–13965.

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

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

Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H. ja Doorbar, J. (2015). Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*, **7**(7), pp. 3863-3890.

Enemark, E ja Joshua-Tor, L. (2006). Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase. *Nature*, **442**(7100), pp. 270-275.

Favre, M., Breitburd, F., Croissant, O. ja Orth, G., (1977). Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *Journal of Virology*, **21**(3), pp.1205-1209.

Fimia, G ja Sassone-Corsi, P. (2001). Cyclic AMP signalling. *Journal Of Cell Science*, **114**(11), pp. 1971-1972.

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

Fradet-Turcotte, A., Moody, M., Laimins, L. A. ja Archambault, J. (2010) Nuclear Export of Human Papillomavirus Type 31 E1 Is Regulated by Cdk2 Phosphorylation and Required for Viral Genome Maintenance. *J Virol*, **84**(22), pp. 11747–11760.

Gagnon, D., Joubert, S., Sénéchal, H., Fradet-Turcotte, A., Torre, S. ja Archambault, J. (2009). Proteasomal Degradation of the Papillomavirus E2 Protein Is Inhibited by Overexpression of Bromodomain-Containing Protein 4. *Journal of Virology*, **83**(9), pp.4127-4139.

Geimanen, J., Isok-Paas, H., Pipitch, R., Salk, K., Laos, T., Orav, M., Reinson, T., Ustav, M., Ustav, M. ja Ustav, E. (2011). Development of a Cellular Assay System To Study the Genome Replication of High- and Low-Risk Mucosal and Cutaneous Human Papillomaviruses. *J. Virol.* **85**, pp. 3315–3329.

Giri, I ja Yaniv, M. (1988). Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *The EMBO Journal*, **7**(9), pp. 2823-2829.

Iftner, T., Haedicke-Jarboui, J., Wu, S.-Y. ja Chiang, C.-M. (2017). Involvement of Brd4 in different steps of the papillomavirus life cycle. *Virus Res.* **231**, pp. 76–82.

Ilves, I., Kivi, S. ja Ustav, M. (1999). Long-Term Episomal Maintenance of Bovine Papillomavirus Type 1 Plasmids Is Determined by Attachment to Host Chromosomes, Which Is Mediated by the Viral E2 Protein and Its Binding Sites. *Journal Of Virology*, **73**(5), pp. 4404-4412.

Iyer, G., Garrod, S., Woods, V. ja Taylor, S. (2005). Catalytic Independent Functions of a Protein Kinase as Revealed by a Kinase-dead Mutant: Study of the Lys72His Mutant of cAMP-dependent Kinase. *Journal of Molecular Biology*, **351**(5), pp.1110-1122.

Johnson, DE ja Williams, LT. (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res.* **60**, pp. 1-41.

Johnson, L. ja Barford, D. (1993). The Effects of Phosphorylation on the Structure and Function of Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **22**(1), pp.199-232.

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

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

Kay, M., He, C. ja Chen, Z. (2010). A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nature Biotechnology*, **28**(12), pp.1287-1289.

Kennelly, P.J. ja Krebs, E.G. (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, pp. 15555–15558.

Kim, K. ja Lambert, P. (2002). E1 Protein of Bovine Papillomavirus 1 Is Not Required for the Maintenance of Viral Plasmid DNA Replication. *Virology*, **293**(1), pp. 10-14.

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

Kramerov, A. ja Ljubimov, A. (2012). Focus on Molecules: Protein kinase CK2. *Experimental Eye Research*, **101**, pp. 111-112.

La Rosa, G., Fratini, M., Accardi, L., D'Oro, G., Della Libera, S., Muscillo, M. ja Di Bonito, P. (2013). Mucosal and Cutaneous Human Papillomaviruses Detected in Raw Sewages. *PLoS ONE*, **8**(1), pp. 52391.

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

Litvin, T., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J. ja Levin, L., 2003. Kinetic Properties of “Soluble” Adenylyl Cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(18), pp.15922-15926.

London, E., Bloyd, M. ja Stratakis, C. (2020). PKA functions in metabolism and resistance to obesity: lessons from mouse and human studies. *Journal of Endocrinology*, **246**(3), pp. R51-R64.

Ma, T., Zou, N., Lin, B.Y., Chow, L.T., ja Harper, J.W. (1999). Interaction between cyclindependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, pp. 382–387.

Martel, C., Plummer, M., Vignat, J. ja Franceschi, S. (2017). Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *International Journal of Cancer*, **141**(4), pp.664-670.

Masłyk, M., Janeczko, M., Martyna, A. ja Kubiński, K. (2017). CX-4945: the protein kinase CK2 inhibitor and anti-cancer drug shows anti-fungal activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **435**(1-2), pp.193-196.

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

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

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

Morin, G., Fradet-Turcotte, A., Di Lello, P., Bergeron-Labrecque, F., Omichinski, J. ja Archambault, J. (2011). A Conserved Amphipathic Helix in the N-Terminal Regulatory Region of the Papillomavirus E1 Helicase Is Required for Efficient Viral DNA Replication. *Journal Of Virology*, **85**(11), pp. 5287-5300.

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

Omori, K. ja Kotera, J. (2007). Overview of PDEs and Their Regulation. *Circulation Research*, **100**(3), pp.309-327.

Orav, M., Geimanen, J., Sepp, E., Henno, L., Ustav, E. ja Ustav, M. (2015). Initial amplification of the HPV18 genome proceeds via two distinct replication mechanisms. *Scientific Reports*, **5**(1).

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

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. ja Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**, pp. 153–183.

Piirsoo, A., Piirsoo, M., Kala, M., Sankovski, E., Lototskaja, E., Levin, V., Salvi, M. ja Ustav, M., 2019. Activity of CK2 α protein kinase is required for efficient replication of some HPV types. *PLOS Pathogens*, **15**(5), p.e 1007788.

Piirsoo, A., Kala, M., Sankovski, E., Ustav, M. and Piirsoo, M. (2020). Uncovering the Role of the E1 Protein in Different Stages of Human Papillomavirus 18 Genome Replication. *Journal of Virology*, **94**(20).

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

Plasmeijer EI., Struijk L., Bouwes Bavinck JN. ja Feltkamp MC. Epidemiology of cutaneous human papillomavirus infections. *Cancer Treat Res.* (2009) **146**, pp. 143–57.

Pollard, T.D., Earnshaw, W.C., Lippincott-Schwartz, J. ja Johnson, G.T. (2017). Protein Hardware for Signaling. In *Cell Biology* (Third Edition), Elsevier, pp. 425–442.

Sanders, C. ja Stenlund, A. (1998). Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *The EMBO Journal*, **17**(23), pp. 7044-7055.

Sankovski, E., Mannik, A., Geimanen, J., Ustav, E. ja Ustav, M. (2014). Mapping of Betapapillomavirus Human Papillomavirus 5 Transcription and Characterization of Viral-Genome Replication Function. *Journal of Virology*, **88**(2), pp .961-973.

Schuck, S., Ruse, C. ja Stenlund, A. (2013). CK2 Phosphorylation Inactivates DNA Binding by the Papillomavirus E1 and E2 Proteins. *J. Virol.* **87**, pp. 7668–7679.

Sekhar, V. ja McBride, A. (2012). Phosphorylation Regulates Binding of the Human Papillomavirus Type 8 E2 Protein to Host Chromosomes. *Journal of Virology*, **86**(18), pp. 10047-10058.

Steger, G. ja Corbach, S. (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *Journal Of Virology*, **71**(1), pp. 50-58.

Straub, E., Fertey, J., Dreer, M., Iftner, T. ja Stubenrauch, F. (2015). Characterization of the Human Papillomavirus 16 E8 Promoter. *Journal Of Virology*, **89**(14), pp. 7304-7313.

Stroop, S. ja Beavo, J. (1991). Structure and function studies of the cGMP-stimulated phosphodiesterase. *Journal of Biological Chemistry*, **266**(35), pp. 23802-23809.

Swaffer, M., Jones, A., Flynn, H., Snijders, A. ja Nurse, P. (2016). CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle. *Cell*, **167**(7), pp. 1750-1761.e16.

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

Taskén, K., Skålhegg, B., Solberg, R., Andersson, K., Taylor, S. ja Lea, T. et al. (1993). Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. *Journal Of Biological Chemistry*, **268**(28), pp. 21276-21283.

Toots, M., Ustav, M., Männik, A., Mumm, K., Tämm, K., Tamm, T., Ustav, E. ja Ustav, M. (2017). Identification of several high-risk HPV inhibitors and drug targets with a novel high-throughput screening assay. *PLOS Pathogens*, **13**(2), p.e 1006168.

Tresguerres, M., Levin, L. ja Buck, J. (2011). Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney International*, **79**(12), pp. 1277-1288.

Walboomers, J., Jacobs, M., Manos, M., Bosch, F., Kummer, J., Shah, K., Snijders, P., Peto, J., Meijer, C. ja Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*, **189**(1), pp. 12-19.

Wang, R., Pan, W., Jin, L., Huang, W., Li, Y., Wu, D., Gao, C., Ma, D. ja Liao, S. (2020). Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer Letters*, **471**, pp. 88-102.

Weissenborn SJ., De Koning MN., Wieland U., Quint WG. ja Pfister HJ. (2009). Intrafamilial transmission and family-specific spectra of cutaneous betapapillomaviruses. *J Virol.*, **83**(2), pp. 811–6.

Whelan, F., Stead, J., Shkumatov, A., Svergun, D., Sanders, C. ja Antson, A. (2011). A flexible brace maintains the assembly of a hexameric replicative helicase during DNA unwinding. *Nucleic Acids Research*, **40**(5), pp. 2271-2283.

Xie, F., DeSmet, M., Kanginakudru, S., Jose, L., Culleton, S.P., Gilson, T., Li, C. ja Androphy, E.J. (2017). Kinase Activity of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Regulates Activity of the Papillomavirus E2 Protein. *J. Virol.* **91**.

Yu, J.-H., Lin, B.Y., Deng, W., Broker, T.R. ja Chow, L.T. (2007). Mitogen-Activated Protein Kinases Activate the Nuclear Localization Sequence of Human Papillomavirus Type 11 E1 DNA Helicase To Promote Efficient Nuclear Import. *J. Virol.* **81**, pp. 5066–5078.

Zanardi, T., Stanley, C., Saville, B., Spacek, S. ja Lentz, M., 1997. Modulation of Bovine Papillomavirus DNA Replication by Phosphorylation of the Viral E1 Protein. *Virology*, **228**(1), pp. 1-10.

Zhang, H., Kong, Q., Wang, J., Jiang, Y. ja Hua, H. (2020). Complex roles of cAMP–PKA–CREB signaling in cancer. *Experimental Hematology & Oncology*, **9**(1).

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

The PapillomaVirus Episteme (PaVE). (Kasutatud 10.05.2021)

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

Scalable Vector Graphics (*Savvy*). (Kasutatud 23.05.2021)

<http://www.bioinformatics.org/savvy/>

LISAD

LISA 1. Töös kasutatud praimerid

Nr	Geen	Praimer	Järjestus 5'-3'
1	HPV5 E8 ^Δ E2	Fw 1	TGAAGCTGAAGATGTTACTC
		Rv1	GATGTGGTGAGCTGTCTGGAC
2	HPV5 E8 ^Δ E2	Fw 2	GATGTTACTCCTGAGGTGGAG
		Rv 2	CTCTGGTTTTCGGTTTGTGTG
3	HPV5 E1 ^Δ E4	Fw 1	CTGCAAACATGACGGATCC
		Rv 1	GATGTGGTGAGCTGTCTGGAC
4	HPV5 E1 ^Δ E4	Fw 2	GACGGATCCTAATTCTAAAG
		Rv 2	CTCTGGTTTTCGGTTTGTGTG
5	HPV5 E1	Fw 1	CAGTATGCAAGGCTTGCTCC
		Rv 1	CTGACCAGTGCCCTTCCCCTTC
6	HPV5 E1	Fw 2	GCTGCAACCCCTTTCAGAGTG
		Rv 2	CCCCATGCACATTAATGTTAG
7	HPV5 E2	Fw 1	GCTTGAGTCACTACAGACATC
		Rv 1	GGCATTATCTGGATCATTGTC
8	HPV5 E2	Fw 2	GTATACAATGTGGACCTATGTG
		Rv 2	CTTCCCATTCTCCAGTTGTAC
9	HPV5 E6	Fw	GTATGCTGTGGCGCCACTG
		Rv	GAAGGCCTCTGCCACAGCAATC
10	HPV5 E7	Fw	CTGGAGCTCAGTGAGGTGCAG
		Rv	CTCACAGTTCCTGCAACCGCAC

LIHTLITSENTS

Mina, Elina Lototskaja (sünnikuupäev: 13.09.1996),

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

PEALKIRI

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

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

Elina Lototskaja

Tartus, 31.05.2021