

Tartu Ülikool
Bioloogia-geograafia teaduskond
Molekulaar- ja rakubioloogia Instituut
Mikrobioloogia ja viroloogia õppetool

Siim Sõber

**Papilloomiviiruse L1 valgul põhinevate viiruslaadsete partiklite
moodustamine *in vitro*.**

Magistritöö

Juhendaja:
Reet Kurg, *Ph. D*

Tartu 2004

Sisukord

Sisukord	1
Kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus.....	4
1. Kirjanduse ülevaade.....	5
1.1 Papilloomiviiruste üldiseloomustus.....	5
1.2 Genoom.....	5
1.3 Kodeeritavad valgud	6
1.4 Hiliste geenide regulatsioon.....	7
1.5 Virioni struktuur.....	8
1.6 L1 valk	9
1.7 L2 valk	10
1.7.1 L2 paiknemine kapsiidis	11
1.7.2 L2 roll genoomi kapsiidi pakkimisel	12
1.7.3 L2 lokalisatsioon tuumas	12
1.8 Viiruslaadsete partiklite valmistamine.....	13
2 Töö eesmärgid.....	16
3 Materjalid ja meetodika	17
3.1 Plasmiidid	17
3.2 Bakteritüved ja söötmed	17
3.3 Bakterite transformatsioon.....	18
3.4 Oligonukleotiidide kineerimine	18
3.5 Plasmiidide kloonimine.....	18
3.5.1 Plasmidi pQE-30-BPVL1 konstrueerimine	18
3.5.2 Plasmiid pET-19b-HPV11L1.....	19
3.6 Valgu ekspresseerimine	19
3.7 Valkude analüüs SDS-PAAG elektrofooresil	19
3.8 Valkude puhastamine.....	20
3.8.1 L1 valgu puhastamine Ni-NTA kolonnil denatureerivates tingimustes	20
3.8.2 HPV11 L1 valgu puhastamine Ni-NTA kolonnil natiivsetes tingimustes....	20
3.8.3 Valkude selektiivne sadestamine NH ₄ SO ₄ abil.....	21
3.8.4 Inklusioonkehade puhastamine.....	21
3.9 L1 valgu renatureerimine Ni-NTA kolonnil	22
3.10 Valkude analüüs sahharoosi gradiendis	22
3.11 <i>Western blot</i>	23
3.12 Coomassie spot test.....	23
3.13 Valkude dialüüs	24
4 Tulemused ja Arutelu.....	25
4.1 BPV L1 valgu puhastamine	25
4.1.1 BPV L1 puhastamine Ni NTA metallafiinsus kromatograafiat kasutades ...	25

4.1.2	BPV L1 renatureerimine kolonnil.....	26
4.1.3	BPV1 L1 puhastamine inklusioonkehadest	28
4.2	HPV11 L1 valgu puhastamine ja VLP-de formeerimine.....	29
4.2.1	HPV11 L1 valgu puhastamine inklusioonkehadest	29
4.2.2	HPV11 L1 valgu renatureerimine lahjendamisega	31
4.2.3	HPV11 L1 valgu renatureerimine dialüüsil	32
4.2.4	HPV11 L1 valgu puhastamine natiivsetes tingimustes.....	33
4.2.5	L1 valgu analüüs sahharoosi gradiendis	35
4.3	Renaturatsiooniprotsessi analüüs	37
4.3.1	Renaturatsiooniprotsessi mõjutavad tegurid	37
4.3.2	Renaturatsiooni kulg	39
	Kokkuvõte.....	41
	Summary	42
	Kasutatud kirjandus	43

Kasutatud lühendid

ATP – adenosiin trifosfaat
BSA – veise seerumi albumiin
BPV – veise papilloomiviirus
bp – aluspaar
C-terminaalne – karboksüterminaalne
CIAP – vasika soole aluseline fosfataas
CRPV – küüliku papilloomiviirus
Cys - tsüsteiin
DNA – desoksüribonukleiinhape
DTT - ditiotreitol
EDTA – etüleendiamiin tetraetaanhape
ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*
dNTP – desoksüribonukleosiid trifosfaat
GST – Glutatioon-S-transferaas
His - histidiin
HPV – inimese papilloomiviirus
IPTG – isopropüül- β -D-tiogalaktopüranosiid
kb – kiloaluspaar
kd – kilodalton
LB sööde – Luria-Bertani sööde
LCR – *long control region*
N-terminaalne – aminoterminalne
Ni-NTA – nikkel-nitriilotriatsetaat
PAAG – polüakrüülamiid geel
PBS – fosfaat puhverdatud soolalahus
PCR – polümeraasi ahelreaktsioon
PML – promüelotsütoitse leukeemia valk
POD – PML onkogeenne domeen
PMSF – fenüülmetüülsulfonüül fluoriid, α - tolueensulfonüül fluoriid
RNA – ribonukleiinhape
rpm – pööret minutis
SDS – naatrium-dodetsüülsulfaat
TBS – Tris puhverdatud soolalahus
Triton X-100 – t-oktüülfenoksüpolüetoksüetanool
tRNA – transport RNA
U - ühik
URR – *upstream regulatory region*
VLP – viiruslaadne partikkel

Sissejuhatus

Papilloomiviirused on väikesed kasvajaid tekitavad viirused, mis nakatavad epiteelkudede basaalkihi rakke. Viiruse elutsükli edasised faasid on tihedalt seotud peremeesrakkude diferentseerumisega. Alles koe pindmistes kihtidesse jõudnud ja terminaalset diferentseerunud epiteelirakkudes leiab aset replikatsiooni vegetatiivne faas, kus toimub viiruse genoomi amplifikatsiooniline paljundamine, kapsiidivalkude süntees ja uute nakatamisvõimeliste virionide moodustumine.

Papilloomiviiruste virionid sisaldavad kaheaheelalist tsirkulaarset genoomi, mis sarnaneb paljuski molekulaarbioloogias laialdaselt kasutatavate plasmiididega. See asjaolu muudab papilloomiviiruse kapsiidi atraktiivseks geeniülekanne vahendiks. Siiani on aga takistuseks osutunud teadmiste vähesus DNA kapsiidi pakkimise kohta ja tehtud katsetes on selle protsessi efektiivsus jäänud madalaks.

Tühjad papilloomiviiruse kapsiidid, mida nimetatakse viiruslaadseteks partilikeks (VLP) on osutunud seni kõige tulemuslikumaks lähenemiseks papilloomiviiruste vastaste vaktsiinide välja töötamisel. Kuna mitmed inimese papilloomiviiruse tüübid on ohtlikud kasvajate tekitajad on nii meedikute kui ka molekulaarbioloogide poolsed jõupingutused viirusnakkuse tõrjumise ja ennetamise tõhustamiseks jätkuvalt intensiivsed.

Käesoleva töö eksperimentaalses osas puhastati veise papilloomiviirus tüüp 1 (BPV1) ja inimese papilloomiviirus tüüp 11 (HPV11) kapsiidivalk L1. Analüüsi ka puhastatud valkude võimet formeeruda viiruslaadseteks partilikeks. Puhastatud HPV11 L1 valk omab võimet moodustada suure molekulmassiga multimeere, mida võib suure tõenäosusega pidada viiruslaadseteks partilikeks. Töö kirjanduslikus osas antakse ülevaade papilloomiviirustest ning keskendutakse papilloomiviiruse kapsiidile ja selle moodustumises osalevate valkude L1 ja L2 struktuurile ja funktsioonidele. Lisaks peatutakse viiruslaadsete partilite rakendustel ja valmistamismeetoditel.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Papilloomiviiruste üldiseloostus

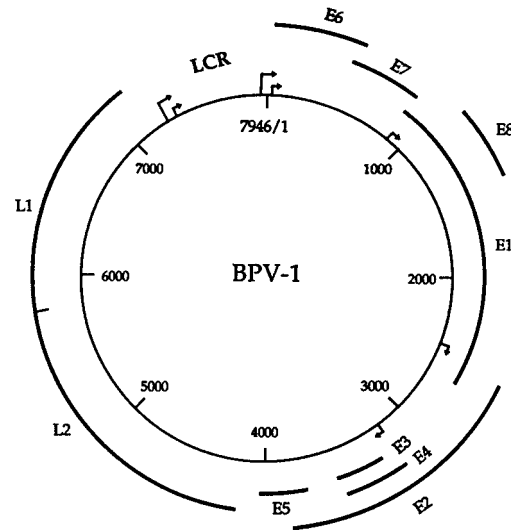
Papilloomiviirused on väikesed kaheaahelise DNA genoomiga *papillomaviridae* sugukonda kuuluvad viirused. Nad omavad umbes 52-55 nm läbimõõduga ümbriseta ikosaeedrilist kapsiidi. Papilloomiviirused nakatavad enamikku imetajatest ja mõningaid linde. Nad replitseeruvad soomusepiteeli rakkude tuumades, põhjustades kasvajate teket, mis on enamasti healoomulised ja lühiajalised ning kaovad koos viiruse eemaldamisega immuunsüsteemi poolt. Hulk papilloomiviiruse tüvesid on aga seotud ka halvaloomuliste kasvajate tekkega, eriti emakakaela vähiga, mis enam kui 90% juhtudest on põhjustatud kõrge riskiga HPVde (HPV16, HPV18) poolt. Peamiseks papilloomiviiruste uurimise mudeliks on ajalooliselt välja kujunenud veise papilloomiviirus tüüp 1, mille replikatsiooniks õnnestus kõige esimesena leida sobiv koekultuuri süsteem.

Papilloomiviiruste elutsüklil on tihedalt seotud peremeesorganismi epiteelirakkude diferentseerumisprogrammiga. Viirus tungib haavandite kaudu soomusepiteeli basaalkihi rakkudesse, kus ta säilib latentsena. Rakkude pindmistes kihtidesse jõudmine ja diferentseerumine kutsub esile koordineeritult genoomi replikatsiooni intensiivistumise ja struktuursete valkude ekspressiooni. Replikatsiooni produktiivses faasis toimub ümberlülitus genoomi replikatsioonimehhanismis kahesuunaliselt teeta tüübilt veereva ratta mehhanismile (Flores and Lambert 1997). Virionid moodustuvad rakutuumas, kus toimub ka replikatsioon, ning vabanevad koos surnud rakkudega epiteeli pinnal.

1.2 Genoom

Papilloomiviiruste genoom on umbes 8 kb pikkune kaheaahelane DNA rõngasmolekul (joonis 1) (Bream and Phelps, 1994). Enamasti on papilloomiviirustel 10 geeni, mis kõik paiknevad ühel ahelal. Geenid jaotatakse vastavalt nende asetusele genoomis varasteks (E) ja hilisteks (L). Varased geenid asuvad raku transformatsiooniks vajalikus

genoomipiirkonnas ehk varases piirkonnas, seal paiknevaid geene ekspresseeritakse replikatsiooni kõigis faasides. Hiliseid geene ekspresseeritakse ainult vegetatiivse replikatsiooni käigus. Lisaks on genoomis umbes 1 kb pikkune mittekodeeriv regioon (LCR – *long control region*, URR – *upstream regulatory region*) (joonis 1), kus paiknevad replikatsiooni ja transkriptsiooni reguleerivad *cis*-järjestused) (Bream and Phelps, 1994). Papilloomi viirused omavad



Joonis 1. Veise papilloomiviiruse tüüp 1 genoom (Howley, 1996) .

mitmeid promootoreid ja erinevaid splaissingu kohti, mis muudavad viiruse väikese genoomi transkriptsiooni paindlikumaks. BPV genoomis on 7 promootorit, millest 6 osalevad varaste geenide ekspressioonis ja ainult ühelt promootorilt, milles paiknevad diferentseerumisspetsiifiliste transkriptsioonifaktorite seondumiskohad, ekspresseeritakse hiliseid valke. Polüadenüleerimiskohti on kaks, üks hiliste ja teine varajaste geenide jaoks (Howley 1996).

1.3 Kodeeritavad valgud

Varajases regioonis paikneb 8 avatud lugemisraami, mis kodeerivad viiruse replikatsiooniks, transkriptsiooniks ja transformatsiooniks vajalikke valke. E1 on replikatsioonivalk (Ustav et al. 1991), mis omab helikaasset ja ATPaasset aktiivsust (Seo et al. 1993). Valk E2 on viiruse replikatsiooni ja transkriptsiooni regulaatoriks. Ta omab võimet seonduda dimeeridena järjestusspetsiifiliselt viiruse DNA-i olevatele seondumiskohtadele. DNA-ga seondumine toimub E2 C-terminaalse domeeni kaudu. Lisaks täispikale E2 valgule, mis omab N-terminaalset transaktivatsiooni domeeni, kodeerib BPV ka lühemaid transkriptsiooni represserivaid E2 vorme, E2TR ja E8/E2TR. E2 osaleb viiruse genoomi replikatsioonis võimaldades E1 valgul kooperatiivse DNA-le

seondumise abil efektiivsemalt viiruse replikatsiooni alguspunktile kinnituda (McBride, Romanczuk, and Howley 1991). Lisaks vahendab BPV-1 E2 valk viiruse genoomi seondumist mitootilistele kromosoomidele ja seeläbi tagab viiruse DNA stabiilse säilimise ja segregatsiooni jagunevates rakkudes (Ilves, Kivi, and Ustav 1999, Lehman and Botchan 1998). E3 lugemisraami produkti ei ole teada. E4 on tegelikult hiline valk, kuigi teda kodeeriv geen paikneb varases piirkonnas. E4 ekspresseeritakse vegetatiivses faasis suures koguses ning ta paikneb tsütoplasmas, kus lõhub tsütoskeletti (Doorbar et al. 1991). E5 on membraaniga seotud transformeeriv valk, mis aktiveerib mitmeid rakulisi retseptoreid ja signaaliradasid. E5 peamiseks märklauaks on PDGF β retseptor (Petti and DiMaio 1994). Valgu E6 järjestuses esineb mitmeid Cys-X-X-Cys tsinki siduvaid motiive, mis võimaldavad valk-valk interaktsioone. E6 seob rakulist tuumorsupressorvalku p53, takistab selle seondumist DNAGA ning suunab ta ubikvitiin-sõltuvale lagundamisele (Farthing and Vousden 1994). Ka E7 seob sarnaselt E6ga rakutsükli kontrollivaid valke. Sidudes rakulist tuumorsupressorvalku pRb võimaldab E7 DNA replikatsiooniks vajalike rakuliste faktorite ekspressiooni diferentseerunud rakkudes (Flores et al. 2000). Mõlemad valgud osalevad rakkude transformatsioonis. E8 lugemisraami produkt on leitud ainult E8/E2 repressorvalgu kujul. Hilise regiooni valgud L1 ja L2 kodeerivad kapsiidivalke.

1.4 Hiliste geenide regulatsioon

Hiliste valkude ekspressioon leiab *in vivo* aset ainult diferentseerunud epiteelirakkudes. Seda piirangut põhjustavad mitmed faktorid, mis toimivad erinevatele ekspressioonietappidele. Transkriptsiooni tasemel on geenide ekspressiooni piiravaks teguriks papilloomiviiruse hiline promootor, mida kontrollivad vähemalt osaliselt rakulised diferentseerumisest sõltuvad faktorid. Viiruse hiliste mRNAde tase rakus tõuseb diferentseerumise käigus oluliselt (Barksdale and Baker 1993). Lisaks sisaldavad papilloomiviiruse hilised transkriptid diferentseerumissõltuvaid negatiivseid regulaatorelemente, mis põhjustavad kas mRNAde ebastabiilsust tsütoplasmas või ei võimalda neil diferentseerumata rakkude tuumast väljuda (Koffa et al. 2000). HPV 16 L2 kodeerivas järjestuses on leitud koguni kaks mRNA ekspressiooni vähendavat järjestust (Sokolowski et al. 1998). Geeni 5' otsas asuv nukleotiidjärjestus kiirendab mRNAde

degradatsiooni, 3' otsas asuv järjestus võib aga vähendada valguekspressiooni 10 korda mRNA taset mõjutamata. HPV 1 L2 geeni kodeeriv järjestus seevastu tugevaid ebastabiilsuselemente ei sisalda (Sokolowski et al. 1998). Rangema kontrolli all ongi hiliste geenide ekspressioon kõrge riskiga HPV tüvedes, sest nende jaoks on oluline olla immuunsüsteemi eest võimalikult varjatud. Sellele vaatamata on mõnedel juhtudel leitud hilistele geenidele vastavaid transkripte ka diferentseerumata rakkudes, seetõttu on välja pakutud ka võimalust hiliste geenide kontrolliks translatsiooni tasemel. Hiliste geenide nukleotiidjärjestuse analüüs näitab märkimisväärseid erinevusi hiliste mRNAde koodonkasutuses võrreldes imetajate keskmise koodonkasutusega, samas kui varase piirkonna geenide puhul kasutatakse erinevaid koodoneid imetajatele tüüpilise sagedusega. On võimalik, et nende valkude ekspresseerumist diferentseerumata rakkudes piirab sobivate tRNAde nappus. Diferentseerunud rakkudes aga tRNAde suhteline arvukus muutub või väheneb üldine transkriptsiooniaktiivsus, mis võimaldab ka ebaefektiivse koodonkasutusega geene edukalt transleerida (Zhou et al. 1999).

1.5 Virioni struktuur

Papilloomiviiruste kapsiid on 52-55 nm läbimõõduga $T=7d$ sümmeetriaga ikosaeder, mis koosneb 72 pentameersest kapsomeerist. Kapsiidi stabiilsuse tagavad olulisel määral kapsomeeridevahelised disulfiidsidemed, BPV assambleerumisel on olulised kaltsiumioonid (Paintsil et al. 1998). Partikkel sisaldab superspiraliseerunud ja histoonidega seotud genoomi. Maksimaalselt mahub kapsiidi 10,2 kb pikkune plasmiid (Zhao et al. 1998). Kapsomeerid jagunevad 60 heksavalentseks ja 12 pentavalentseks vormiks. Virion sisaldab kahte struktuurilist valku. Põhiline kapsiidivalk on L1, sellele lisaks sisaldab partikkel ka L2 valku, mida on oluliselt vähem kui L1 (molaarne suhe ~30:1). Hinnatakse, et L2 molekulide arv virioni kohta jääb vahemikku 12-36.

Valkude L1 ja L2 immunoloogiliste omaduste ja funktsioonide uurimiseks on kasutatud rekombinantseid ekspressioonisüsteeme. Viiruspartiklite moodustumine toimub rakutuumas. Virionid on võimelised seonduma ja nakatama erinevaid rakutüüpe, mis näitab, et viiruspartiklite rakkutungimine ja kapsiidist vabanemine ei ole põhiliseks

viiruse koe ja peremeesspetsiifikat määravaks faktoriks (Muller et al. 1995, Stauffer et al. 1998). Kapsiidist vabanemise mehhanismide kohta kindlad andmed puuduvad, välja on pakutud disulfiidsidemete redutseerimist (Li et al. 1998), kaltsiumioonide eemaldamist (Paintsil et al. 1998) ja proteolüütilist lagundamist (Li et al. 1997). Tõenäoliselt on vajalik mingi kombinatsioon neist faktoritest ning erinevatel viiruse tüvedel võib see olla erinev.

1.6 L1 valk

L1 on kapsiidi põhiline komponent, enamik, kui mitte kõik kapsomeerid koosnevad viiest L1 molekulist. Valgu molekulmass on ligikaudu 55 kd ja pikkus umbes 500 aminohapet. Ta vastutab põhiliste struktuursete funktsioonide nagu virioni assambleerumise, stabiilsuse ja kapsiidist vabanemise eest. Ta on oluline ka partiklite seondumisel rakkudele ja rakkudesse sisenemisel. Erinevate papilloomiviiruse tüvede vahel on L1 kõrgelt konserveerunud. L1 valk on võimeline iseseisvalt assambleeruma viiruslaadseteks partikliteks ja omab ka DNA sidumisvõimet (C-terminaalsed 11 positiivse laenguga aminohapet) (Li et al. 1997, Mallon, Wojciechowicz, and Defendi 1987), sellele vaatamata on nakatamisvõimeliste, DNAd sisaldavate virionide moodustumiseks *in-vivo* vajalik ka L2 valk.

Kindlaks on tehtud L1 valgu, pentameeri ja väikese 12 pentameerist koosneva T=1 VLP kristallstruktuur (resolutsiooniga 3,5 Å) (Chen et al. 2000), mis näitab papilloomiviiruse kapsiidi suhtelist sarnasust polüoomiviiruse kapsiidiga. L1 on valdavalt β -lehelise struktuuriga, ainult kapsomeeride vaheliste kontaktide eest vastutavad lühikesed α -helikaalsed domeenid. Valgu 31 C-terminaalset aminohapet ulatuvad partikli sisse ja on järjestuselt erinevate papillomiviiruse tüüpide vahel kõige vähem konserveerunud. See piirkond sisaldab ohtralt aluselisi aminohappeid, samuti seriini- ja treoniinijääke (Chen et al. 2000) ja tõenäoliselt interakteerub DNAGA (Mallon, Wojciechowicz, and Defendi 1987). BPV-1 kapsiidide moodustumiseks see valgu piirkond vajalik ei ole (Paintsil et al. 1996). L1 pentameeri struktuur viitab L2 valgu paiknemisele pentameeri keskel, kus asub kapsomeeri läbiv auk. Lisaks on pentameeri sisse jäävad aminohappe jäägid erinevatel tüvedel äärmiselt konserveerunud (Chen et al. 2000).

(joonis 2). Võiks oletada, et selle ala konserveerumist põhjustab tema funktsionaalne tähtsus, kahjuks aga antud regiooni funktsiooni kohta teadmised puuduvad.

Puuduvad andmed L2 glükosüleerimise kohta, küll aga fosforüleeritakse bakuloviiruse abil ekspresseeritud valku putukarakkudes. L2 lokaliseerub rakkude tuumades, tuumalokalisatsiooni signaalidena funktsioneerivad valgu mõlemas otsas asuvad lühikesed positiivse laenguga aminohappejärjestused, lisaks asub vahemikus 286-306 tuumalokalisatsiooniks tarvilik järjestus (Sun et al. 1995) (joonis 2).

1.7.1 L2 paiknemine kapsiidis

L2 asukoha kohta ikosaeedris siiani kindlad andmed puuduvad, krüoelektronmikroskoopiliste rekonstruktsioonide põhjal on pakutud, et L2 võiks paikneda viievalentsetel telgedel asuvate kapsomeeride keskel. L1 pentameeridega seondumiseks on vajalikud kaks iseseisvat L1 interaktsiooni domeeni (joonis 2), millede abil L2 seondub L1 valguga enne viiruspartiklite formeerumist (Okun et al. 2001). On teada, et osa L2 N-terminusest ulatub virioni pinnale (Liu et al. 1997, Roden et al. 1994) (joonis 2). L2 suurendab partiklite moodustumise efektiivsust umbes 4 kordselt putuka (Kirnbauer et al. 1993) ja 100 kordselt imetaja rakkudes. Erinevalt L1 ei moodusta L2 disulfiidsidemeid (Doorbar and Gallimore 1987). Pikka aega arvati, et virioni rakkudele seondumise ja rakku tungimise eest vastutab ainult L1 valk, aga kuna ka L2 valgu vastased antikehad omavad neutraliseerivat efekti, hakati pidama tõenäoliseks ka L2 osalemist rakupinna retseptorite äratundmises ja rakkudele kinnitumises. Praeguseks on näidatud, et HPV 16 L2 kapsiidist välja ulatuv osa on võimeline seonduma erinevatele rakkudele ja neisse sisenema (Kawana et al. 2001) (joonis 2). Samuti on L2 sisaldavad virionid tunduvalt nakatamisvõimelisemad (Unckell, Streeck, and Sapp 1997). Kuna L2 valk on erinevatel papilloomiviiruse tüvedel väga erinev, siis tõenäoliselt määrab ta ka vähemalt osaliselt viiruse peremees- ja rakutropismi. Näiteks HPV 11 rakkudele seondumise domeeni BPV-1 L2 valgus ei ole.

1.7.2 L2 roll genoomi kapsiidi pakkimisel

On näidatud, et L2 on vajalik viiruse genoomi sisaldavate viiruspartiklite efektiivseks moodustumiseks (Zhao et al. 1998). Koeproovidest puhastatud DNAd mittesisaldavates virionides leidub L2 valku kas vähe või üldse mitte (Doorbar and Gallimore 1987). L1 üksi on küll võimeline moodustama VLPsid ja mingil määral ka DNAd pakkima (Unckell, Streeck, and Sapp 1997), aga koos kaheaheelalise DNA sidumisvõimet omava L2 valguga (Mallon, Wojciechowicz, and Defendi 1987) tekivad nakatamisvõimelised virionid (Stauffer et al. 1998) üle 50 korra efektiivsemalt (Zhao et al. 1998). Pikka aega arvati, et L2 võib DNAd siduda ainult järjestusest sõltumatult (Stauffer et al. 1998), sest eeldati, et võimalik pakkimissignaal asub sarnaselt teiste papovaviirustega genoomi mittekodeerivas alas, samas oli teada, et papilloomiviiruse virionid rakulist DNAd praktiliselt ei sisalda ja katsed mitmete papilloomiviiruse järjestusi mittesisaldavate plasmiidide pakkimisega näitasid, et L2 ei mõjuta DNA pakkimise efektiivsust (Muller et al. 1995, Unckell, Streeck, and Sapp 1997). Nüüd on aga leitud veise papilloomiviiruse genoomis võimalik DNA pakkimist soodustav signaal (nt 1506-1625) (Zhao et al. 1999), mis asub E1 avatud lugemisraami sees ja suurendab L2 vahendatud DNA pakkimise efektiivsust keskmiselt 5-10 korda (Zhao et al. 1998).

1.7.3 L2 lokalisatsioon tuumas

L2 indutseerib E2 ja L1 valkude kolokalisatsiooni kindlatesse tuumasisestesse struktuuridesse, mis on identifitseeritud kui promüelotsütoide leukeemia valgu onkogeensed domeenid (POD) (Day et al. 1998) (nimetatakse ka Kr-kehad, ND 10, NB). PODid on tuumasisesed kromatiinivahelised kehakesed, mida on leitud kõigist imetajarakkudest. Algselt leiti nad tänu nende seotusele akuutse promüelotsütoide leukeemiaga. Igas tuumas on umbes 5-20 PODi, nende suurus jääb vahemikku 0,1-1 µm. Põhilised rakulised valgud, millest PODid koosnevad, on PML (tuumorsupressor, transkriptsiooni regulaator (Wang et al. 1998a)) ja SP100. PODid on dünaamilised struktuurid, nad kaovad mitoosi käigus ja moodustuvad taas kiiresti G₁ faasis (Seeler and Dejean 1999). Nende funktsioon rakus on suurel määral teadmata, erinevate valkude interaktsioonide põhjal PODidega on viidatud nende osalemisele transkriptsiooni

regulatsioonis, DNA replikatsioonis, rakutsükli kontrollis ja apoptoosis (Quignon et al. 1998, Wang et al. 1998b). Lisaks on leitud, et paljude DNA viiruste nagu SV40, herpes simplex viirus, adenoviirus ja Epstein-Barri viirus replikatsioon on seotud PODidega (Maul 1998). Põhjused, miks erinevad viirused sellesse tuumakompartimenti koonduvad, on teadmata. On välja pakutud, et PODid võivad olla rakuliseks kaitsemehhanismiks, seda teooriat toetab ka asjaolu, et adenoviirused ja herpes simplex viirus 1 kodeerivad PODe lagundavaid valke, samuti lokaliseeruvad neis põhiliselt interferooni poolt reguleeritavad rakulised valgud.

Üksi ekspresseeritud L2 valk lokaliseerub PODides, samas kui L1 ja E2 paiknevad tuumas hajusalt. Kui L1 või E2 ekspresseeritakse aga koos L2 valguga, lokaliseeruvad ka nemad PODides (Day et al. 1998). See interaktsioon ei sõltu DNAST. Kuna kõik kolm valku omavad DNA sidumisvõimet, oletati, et kolokaliseerumine võib toimuda kaudselt DNA kaudu. L2 ja E2 koekspressiooni katsed ilma papilloomiviiruse DNA juuresolekuta on aga näidanud, et DNA kolokalisatsiooniks vajalik ei ole. Kolokalisatsiooni põhjustavad otsesed valk-valk interaktsioonid. L2 seondub kahte kohta E2 valgul ja vähendab E2 transkriptsiooni aktivatsiooni võimet, E2 viiruse DNA replikatsiooni soodustav mõju aga säilib (Heino, Zhou, and Lambert 2000). See on kooskõlas varem avastatud asjaoluga, et E2 transkriptsiooni aktivatsiooni võime ei ole viiruse elutsükli hilistes etappides vajalik (Stubenrauch, Colbert, and Laimins 1998).

E2 järjestusspetsiifiline seondumine papilloomiviiruse DNAGA võib soodustada DNA pakkimist ja virionide moodustumist DNA ja kapsiidivalkude lokaalse kontsentratsiooni tõstmise teel. PODid võivad olla virionide moodustumise asukohaks rakutuumas (Day et al. 1998). E2 valk soodustab ka õige pikkusega (8 kb) DNA eelistatud pakkimist virionidesse (Zhao et al. 2000).

1.8 Viiruslaadsete partiklite valmistamine

Valgu L1 üksi või koos L2ga ekspresseerimisel erinevates ekspressioonisüsteemides (bakuloviirus, vaktsiiniaviirus, *Semlinki Forest* viirus ja ka bakteriaalsed ja pärmi ekspressioonisüsteemid (Hofmann et al. 1995, Nepper, Hofmann, and Jansen 1996, Rossi et al. 2000, Sasagawa et al. 1995)) moodustuvad viiruslaadsed partiklid (VLP). VLPde

moodustumist on kirjeldatud isegi transgeensetes taimedes (Biemelt et al. 2003). Tekkivad VLP-d kujutavad endast DNAd mittesisaldavaid viiruse kapsiide ja on visuaalselt ning immunoloogilistelt omadustelt sarnased natiivsete virionidega.

Imetajarakkudes võimaldavad kapsiidivalkude sünteesi vaktsiinia- (Carter et al. 1993) ja *Semlinki Forest* (Day et al. 1998, Heino, Dillner, and Schwartz 1995) viirustel põhinevad ekspressioonisüsteemid. Eukarüootsetes mudelsüsteemidest on kasutatavad ka bakuloviirusel põhinevad ekspressioonivektorid putkarakkudes (Kirnbauer et al. 1993) ja pärmisüsteemid (Hofmann et al. 1995, Sasagawa et al. 1995). Viimasel ajal on populaarseks meetodiks humaniseeritud järjestustega kapsiidivalgu geenide kasutamine. Imetajarakkudele sobivaks muudetud koodonkasutusega L1 ja L2 geenid ekspresseeruvad erinevalt metsiktüüpi järjestusega geenidest ka transfekteeritud Cos-1 ja teistes levinud rakuliinides (Zhou et al. 1999).

Kõigis eukarüootsetes süsteemides on võimalik saada nii ainult L1 valgust kui ka L1 ja L2 valkudest koosnevaid VLPsid. Lisaks on tekkivad VLPd võimelised pakkima sobiva pikkusega (alla 10 kb) tsirkulaarseid DNA molekule ja moodustama nakatamisvõimelisi pseudovirione (Muller et al. 1995, Rossi et al. 2000, Touze and Coursaget 1998).

Atraktiivseks võimaluseks on bakteriaalselt ekspresseeritud kapsiidivalkude kasutamine, mis assambleeruvad samuti sobivates tingimustes viiruslaadseteks partikliteks (Zhang et al. 1998). *E. coli*s ekspresseeritud L1 valku on võimalik puhastada denatureerivates tingimustes (Zhang et al. 1998), mõningatel juhtudel on õnnestunud L1 valku ekspresseerida ka lahustuval kujul, ning puhastada natiivsetes tingimustes (Chen et al. 2000, Li et al. 1997). Viimasel juhul ei ole VLPde saamiseks renaturatsioonietapp vajalik. Kapsomeerid moodustuvad sellisel juhul juba bakteri sees, kuid nende ühinemine VLP-deks saab toimuda alles puhastamise käigus. Suudetud on genereerida ka bakteriaalselt ekspresseeritud L2 valku sisaldavaid VLP-sid kasutades L2 järjestuse fuseerimist GST *tagiga* ja L1 ning L2 geenide koekspressiooni bakteris (Finnen et al. 2003). Bakteriaalse süsteemi kasutamise eelisteks on lihtsus, odavus ja kõrge saagis.

Viiruslaadsed partiklid on huvipakkuvad kolmel põhjusel. Esiteks on leitud, et VLPd tekitavad looduslikele viirustele sarnase immuunvastuse nii loomades kui ka inimestes. See asjaolu võimaldab neid kasutada papilloomiviiruse vastaseks vaksineerimiseks. Välja töötamisel on terve rea papilloomiviiruste vastased VLP-del põhinevad vaktsiinid (Roden et al. 2004) nii veterinaarseks kasutamiseks kui ka inimestele. Enamik pingutusi on mõistagi suunatud kõrge riskigrupi onkogeensete viirustüüpide nagu HPV 16 ja HPV 18 vastaste vaktsiinide valmistamisele.

Teiseks aspektiks on geeniülekandevektorite välja töötamine. On leitud, et papilloomiviirused võivad tungida paljudesse erinevatesse rakutüüpidesse (Muller et al. 1995, Stauffer et al. 1998). Nende omapäraks on võime viia rakkudesse tsirkulaarset kaheahelalist DNA-d, mis on sobilik episomaalselt säiluvate vektorite ülekandeks.

Lisaks sellele on VLP-sid kasutatud papilloomiviiruste virionide omaduste ning moodustumise uurimiseks. VLP-sid kasutades on leitud viiruse genoomist DNA pakkimist soodustavaid järjestusi (Zhao et al. 1999). Samuti on nede abil uuritud viiruste rakkudele kinnitumist, otsitud retseptorid (Evander et al. 1997, McMillan et al. 1999, Giroglou et al. 2001) ja püstitatud hüpoteese DNA vabanemise kohata virionist nakatunud rakus (Li et al. 1998, Painsil et al. 1998, Li et al. 1997).

2 Töö eesmärgid

Töö põhieesmärgiks oli viiruslaadsete partiklite *in vitro* moodustamine bakteriaalselt ekspresseeritud papilloomiviiruse peamisest kapsiidivalgust L1. Töö teostamine jagati järgmisteks etappideks:

- 1) Puhastada bakteriaalselt ekspresseeritud papilloomiviiruse L1 valk.
- 2) Saavutada olukord kus puhastatud valk oleks natiivses olekus (vajadusel renatureerida valk).
- 3) Kontrollida saadud valgu võimet moodustada viiruslaadseid partikleid (VLP).

3 Materjalid ja meetodika

3.1 Plasmiidid

PCRil kasutati DNA matriitsina pML-BPVneo plasmidi, mis sisaldab BPV-1 genoomi, mis on *Bam*HI restriksioonisaidi kohalt lineariseeritud ja kloonitud pML2 (Lusky and Botchan 1981) vektorisse, täiendavalt sisaldab plasmiid *neo*^R geeni (Berg et al. 1986). Ekspressioonivektoriteks olid T7 promootorit ja n-terminaalset 10x His *tagi* sisaldav plasmiid pET-19b, milles on ampitsilliini resistentsusgeen ja pQE-30 (*Qiagen*). pQE vektor sisaldab T5 promootorit, N-terminaalset His *tagi* ja ampitsilliini resistentsusmarkerit.

Kasutati ekspressioonivektoreid, pET-19b-HPV11L1 ja pQE-30-BPVL1.

3.2 Bakteritüved ja söötmed

Kloneerimiseks kasutati *Escherichia coli* tüvesid DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96thi-1 relA1*) ja XL1 blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac*⁻ F' [*proAB*⁺ *lacI*^f *lacZ* Δ M15 Tn10 (*tet*^f)]).

Valku ekspresseeriti *E. coli* tüves BL21(DE3) CodonPlus RIL (*Stratagene*) (B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^f *gal* λ (DE3) *endA* Hte [*argU ileY leuW* Cam^r]), milles on *lac* promootori alt ekspresseeritav T7 RNA polümeraasi geen ja arginiini, isoleutsiini ja leutsiini tRNAsid kodeerivad geenid (koodonid AGA, AGG, CUA). Sarnane rakutüvi BL21(DE3) CodonPlus RP (*Stratagene*) (B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^f *gal* λ (DE3) *endA* Hte [*argU proL* Cam^r]) erineb eelmisest selle poolest, et ta sisaldab arginiini ja proliini tRNA (koodonid AGA, AGG, CCC) geene. L1 valgu ekspresseerimiseks kasutati ka XL1 blue ja M15[pREP4] (*Quiagen*) *E. coli* tüvesid. Natiivsetes tingimustes puhastamiseks ekspresseeriti valku *E. coli* BL21 (DE3) pLysS [F⁻ *ompT hsdS*_B [r_B⁻ m_B⁻] *gal dcm* (Cm^R); Novagen] rakkudes. Baktereid kasvatati LB söötmes [trüptoon 10 g/l, pärmiekstrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l] 37 °C või 17 °C juures. Söötmesse lisati ampitsilliini lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml.

3.3 Bakterite transformatsioon

-80 °C juures säilitatud kompetentsed *E. coli* rakud sulatati jääl ning neile lisati 100 ng plasmiidi. Rakke hoiti 10 minutit jääl, seejärel tehti kuumaehmatus (42 °C, 1,5 minutit). Rakke hoiti 2 minutit jääl. Lisati 1 ml LB söödet ja inkubeeriti 45 minutit kuni 1 tund 37 °C. Rakud plaaditi selektiivsele tassile ja kasvatati üleöö 37 °C.

3.4 Oligonukleotiidide kineerimine

Kineerimiseks võeti 20 pmol oligot. Reaktsioonisegusse lisati 2 µl 10x reaktsioonipuhvrit A [500 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM MgCl₂, 50mM DTT, 1mM spermidiin ja 1mM EDTA] (*Fermentas*), 20 pmol ATPd ja 10 U. T4 polünukleotiid kinaasi (*Fermentas*). Reaktsioonil lasti toimuda 30 minutit temperatuuril 37 °C. Seejärel kinaas inaktiveeriti temperatuuril 70 °C 10 minuti jooksul. Reaktsioonisegu ruumala viidi TE [10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0)] lisamisega 50 mikrolitri. DNA sadestamiseks lisati 1/5 ruumala küllastatud ammooniumatsetaadi lahust, 10 ruumala 96% etanooli, 10 mM lõppkontsentratsiooniga MgCl₂ ja 2 µl dekstraani. Segu inkubeeriti 20 minutit temperatuuril -20 °C. Seejärel tsentrifugeeriti mikrotsentrifugis 10 minutit 16000 x g ja sadet pesti 96% etanooliga. DNA lahustati 10 µl deioniseeritud vees.

3.5 Plasmiidide kloneerimine

3.5.1 Plasmiidi pQE-30-BPVL1 konstrueerimine

N-terminaalse His tagiga seotud BPV-1 L1 valku ekspresseeriva plasmiidi tegemiseks lõigati pQE-30 plasmiidi *Bam*HI ensüümiga. Saadud lineaarset kleepuvate otstega plasmiidi töödeldi *Klen*owi fragmendi (*Fermentas*) ja aluselise fosfataasiga (CIAP) (*Fermentas*). *Klen*owi fragmendi ja CIAPi kasutati vastavalt valmistaja juhendile. Saadud tõmpide otstega ja defosforüleeritud vektorisse ligeeriti kineeritud oligote (BPVL11 ja BPVL1S2) abil PCRga pML-BPVneo plasmiidilt amplifitseeritud L1 geen.

3.5.2 Plasmiid pET-19b-HPV11L1

Plasmiid on kloneeritud Mihkel Alliku poolt. HPV11 genoomist amplifitseeriti L1 geeni järjestus *XhoI* restriksioonisaiti sisaldavaid primereid kasutades. Saadud PCR produkt kloneeriti tõmbilt pUC-19 plasmiidi kust L1 järjestus lõigati välja *XhoI* restriiktaasiga. Saadud fragment kloneeriti pET-19b vektori *XhoI* lõikekohta.

3.6 Valgu ekspresseerimine

Ekspressioonikonstrukti pET-19b-HPVL1 sisaldavad BL21(DE3) CodonPlus RIL või CodonPlus RP rakud kasvatati ampitsilliini sisaldavas LB söötmes optilise tiheduseni 0,5-0,6 ja ekspressioon indutseeriti 1 mM lõppkontsentratsiooniga IPTG (isopropüül- β -D-tiogalaktopüranosiid) lisamisega 4 tunni jooksul temperatuuril 37 °C. Seejärel koguti rakud kokku tsentrifuugimisega 3000 x g 5 minuti jooksul ja külmutati temperatuuril –20 °C.

Natiivseks puhastamiseks indutseeriti pET-19b-HPVL1 plasmiidiga transformeeritud BL21(DE3) pLysS rakud LB söötmes optilisel tihedusel 0,5-0,6 1mM IPTG-ga 4 tunni jooksul temperatuuril 17 °C.

PQE-30-BPVL1 plasmiidilt ekspresseeriti valku *E. coli* XL1 blue või M15[pREP4] tüves. Rakud kasvatati LB söötmes optilise tiheduseni 0,5 – 0,6 ja indutseeriti 1 mM IPTGga 3 tunni jooksul temperatuuril 18 °C. Rakud koguti kokku tsentrifuugimisega 3000 x g 5 minuti jooksul ja külmutati –20 °C temperatuuril.

3.7 Valkude analüüs SDS-PAAG elektroforeesil

Elektroforeesiks lahustati valgud *laemml*i puhvril [50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1 % broomfenool sinine, 10% glütserool] ja kuumutati 100 °C 10 minutit. Seejärel kanti proovid 10% SDS-polüakrüülamiid geelile ja valgud lahutati elektriväljas. Valgud visualiseeriti geelil *Coomassie brilliant blue R250*ga värvimise teel.

3.8 Valkude puhastamine

3.8.1 L1 valgu puhastamine Ni-NTA kolonnil denatureerivates tingimustes

50 ml rakukultuurist külmutatud rakumass sulatati jääl ja suspendeeriti 1 ml TBS (pH 8,5) lahuses. Lisati lüsotsüümi 1 mg/ml ja inkubeeriti 30 minutit jääl. Seejärel sonikeeriti rakususpensiooni 7 korda 10 sekundit 10 sekundiste vahedega jääl kasutades *Cole-Palmer Instrument Co. Ultrasonic Homogenizer* sonikaatorit. Saadud lüsaati tsentrifugeeriti 20 minutit mikrotsentrifugeerimis 16000 x g. Sade lahustati seondumispuhvril ja tsentrifugeeriti uuesti 20 minutit mikrotsentrifugeerimis 16000 x g. Supernatant viidi uude mikrotsentrifugeerimise tuubi ja lisati 100 µl 50% Ni-NTA maatriksi suspensiooni (*Qiagen*). Lüsaati loksutati koos maatriksiga 1 tund toatemperatuuril. Seejärel kanti lüsaat 1 ml pipetiotsikust valmistatud kolonnile ja kolonni tsentrifugeeriti mikrotsentrifugeerimis 2000 rpm 2 minutit. Läbijooks analüüsiti SDS-PAAG elektroforeesil. Maatriksit pesti 2 korda 500 µl pesupuhvriga [100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8M urea, 10 mM imidasool lahuse pH 8,0]. Pesufraktsioonid säilitati. Valk elueeriti 4 korda 50 µl elueerimispuhvril [100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, lahuse pH 8,0]. Elueeriti astmelist imidasooli gradienti kasutades. Eluatsioonidel kasutatud imidasooli kontsentratsioonid olid vastavalt 100, 200, 300, ja 400 mM Vabanemata valgud elueeriti 50 µl *laemml* puhvril.

3.8.2 HPV11 L1 valgu puhastamine Ni-NTA kolonnil natiivsetes tingimustes

200 ml 17 °C temperatuuril LB söötmes indutseeritud, kokku kogutud, PBS puhvril pestud ja külmutatud rakud sulatati ja suspendeeriti 10 ml lüüsi puhvril [50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 500 mM NaCl, 10 mM imidasool]. Lisati lüsotsüüm 0,2 mg/ml ja 0,1 mM PMSF. Rakke inkubeeriti 30' jääl. Rakususpensiooni sonikeeriti 7 korda 10 sekundit 10 sekundiste vahedega jääl kasutades *Cole-Palmer Instrument Co. Ultrasonic Homogenizer* sonikaatorit. Lüsaati tsentrifugeeriti 20000 x g 20 minutit, et vabaneda lüüsumata rakkudest ja rakukestest. Lüsaadile lisati 100 µl 50% Ni-NTA agaroozi suspensiooni ja valkudel

lasti seonduda 1 tunni jookul temperatuuril 4 °C. Lüsaat koos nikli maatriksiga kanti kolonnile. Kolonni pesti 1 x 500 µl 20 mM imidasooli sisaldava pesupuhvriga [400 mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄ pH 8,0], 1 x 500 µl 50 mM imidasooli sisaldava pesupuhvriga ja 1 x 100 µl 100 mM imidasooli sisaldava pesupuhvriga. Valgud elueeriti 50 µl kaupa. 1 x 250 mM imidasooli sisaldavas pesupuhvris ja 3 x 500 mM imidasooli sisaldavas pesupuhvris.

3.8.3 Valkude selektiivne sadestamine NH₄SO₄ abil.

Natiivselt Ni-NTA kolonnil puhastatud valgulahusele lisati küllastatud NH₄SO₄ lahust nii, et lõppkontsentratsiooniks jäi 10 % küllastavast kontsentratsioonist. NH₄SO₄ lisati tilgutades ja lahust pidevalt vortexil segades. Valgulahust inkubeeriti 10' ja tsentrifugeeriti 16000 x g 10 minutit. Supernatant viidi uude tuubi ja sade lahustati 50 mM NaH₂PO₄ ja 400 mM NaCl lahuses mille pH oli 8,0. Supernatandile lisati juurde NH₄SO₄, et saada 20% küllastatusest lõppkontsentratsiooniga lahus ja korrati protseduuri. Võeti 10, 20, 30, 40 ja 50% küllastatuseni viidud NH₄SO₄ juures sadenevate valkude fraktsioonid. Lisaks analüüsiti ka 50% NH₄SO₄ juuresolekul mitte sadenevate valkude fraktsioon. Kõik etapid viidi läbi jääl.

3.8.4 Inklusioonkehade puhastamine

Indutseeritud, kokku kogutud ja külmutatud rakud suspendeeriti lüüsipuhvris B [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 100mM NaCl] lisati 0.25mM PMSF ja 250 µg/ml lüsotsüüm. Rakususpensiooni inkubeeriti 20 minutit jääl. Lisati 0,1% Na-desoksükolaat ja inkubeeriti uuesti 20 minutit jääl. Sonikeeriti 7 korda 10 sekundit 10 sekundiste vahedega jääl kasutades *Cole-Palmer Instrument Co. Ultrasonic Homogenizer* sonikaatorit. Lüsaati tsentrifugeeriti 10000 g 10 minutit 4 °C. Sadet pesti ekstraktatsioonipuhvris B [50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM EDTA, 0,1M NaCl, 0,5%v/v Triton-X 100], inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril ja tsentrifugeeriti 10000 g 10 minutit. Pesu ja tsentrifugeerimist korrati 5 korda. Inklusioonkehi pesti seejärel 1 ml kaupa järjest kasvate urea kontsentratsioonidega lahustes. Kasutati puhvreid, mis sisaldasid 50 mM Tris pH 8,0, 400 mM NaCl ja vastavalt 1M, 2M, 3M, 4M, 5M, 6M, 7M ja 8M

konsentratsiooniga ureat. Lõpuks lahustati inklusioonkehad 50 mM Tris pH 8,0 400 mM NaCl ja 6M guanidiini sisaldavas puhvril.

3.9 L1 valgu renatureerimine Ni-NTA kolonnil

Uurest vabanemuseks ja valkude elueerimiseks kasutati järgmisi puhvreid:

P1 – 50 mM Tris pH 5,5, 10% glütseool, 4M urea, 300 mM NaCl;

P2 – 50 mM Tris pH 5,5, 15% glütserool, 2M urea, 300 mM NaCl;

P3 – 50 mM Tris pH 5,5, 30% glütserool, 1M urea, 300 mM NaCl;

P4 – 50mM Tris pH 5,5, 30% glütserool, 300 mM NaCl.

Vabanemaks kõrgest glütserooli kontsentratsioonist (30%) kasutati puhvrit P5 – 50 mM Tris pH 5,5, 10% glütserool, 300 mM NaCl, 10 mM imidasool.

Elueerimiseks kasutati puhvrit P6 – 50 mM Tris pH 5,5, 10% glütserool, 300 mM NaCl, 400 mM imidasool.

Valgud seondati Ni-NTA maatriksile ja pesti nii nagu kirjeldatud alajaotuses 3.8.1. Ülejäänud protseduur viidi läbi jääl. Kolonni pesti 500 µl puhvriga P1. Protseduuri korrati puhvritega P2-.P5. Valgud elueeriti 3 korda 75 µl puhvriga P6. Kolonnil sadenenud valgud elueeriti 100 µl *laemml*i puhvriga. Paralleelses katses oli kõigile puhvritele lisatud 15 mM β-merkaptotanol.

3.10 Valkude analüüs sahharoosi gradiendis

Moodustati lineaarne 10-55% sahharoosi gradient 50 mM Tris-HCl, 400mM NaCl puhvril, mis sisaldas veel analüüsitava lahusega võrdse kontsentratsiooniga denaturanti. Gradiendi ruumala oli 5ml. Sellele kanti 200 µl valgulahust ning tseentrifuugiti Sorvall ultratseentrifuugis SW-55 rootoriga 40000 rpm 4-6 tundi temperatuuril 5 °C. Pärast tseentrifuugimist jagati gradient põhjast alustades ~300 µl fraktsioonideks ja tuubi põhi pesti 100 *laemml*i puhvriga. Fraktsioonid analüüsiti 10% SDS PAAG elektrofooresil.

3.11 *Western blot*

L1 valgu kontrollimiseks kasutati *western blot* meetodit. Selleks kanti 1 µl eelnevalt puhastatud L1 valgu lahust SDS-poliüakrüülamiid geelile ja valgud lahutati elektroforeetiliselt. Geelilt kanti valgud üle nitrotselluloos filtrile (*MFS*, poorisuurus 0,45 µm) 14 V pinge juures 15 minuti jooksul poolkuiva ülekande aparaadiga (Bio-Rad Instruments) SD puhvril [39 mM glütsiin, 48 mM Tris alus, 0.037 % SDS, 20 % etanool]. Filtri mittespetsiifilised valgu seondumiskohad blokeeriti inkubeerides filtrit üleöö 3% lõssipulbrit sisaldavas TBS puhvril. Seejärel inkubeeriti filtrit 1 tund TBS puhvril, mis sisaldas 1% lõssipulbrit ja 2000 x lahjendatud L1 vastast primaarset antikeha (Chemicon). ja lisati 5000 x lahjendus hiire IgG vastast aluselise fosfataasiga konjugeeritud sekundaarset antikeha (*LabAS Ltd.*) 0,5 % lõssipulbrit sisaldavas TBS puhvril. Sekundaarsel antikehal lasti seonduda 1 tunni jooksul ja pesti filtrit uuesti 4 x 15 minutit 0,05 % Tween 20 sisaldavas TBS puhvril. Lisati 10 ml aluselise fosfataasi puhvrit kuhu oli lisatud 66 µl NBT ja 33 µl BCIP. Filtriti inkubeeriti kuni valgutriipude nähtavaks muutumiseni ja reaktsioon peatati loputades filtrit 20 mM EDTAd sisaldavas PBS puhvril.

Täiendava tundlikkuse saamiseks kasutati sekundaarse antikehana peroksüdaasiga konjugeeritud hiire IgG vastast antikeha (*LabAS Ltd.*) lahjendusega 1:10000 ja signaal detekteeriti kasutades ECLTM *Western Blotting Detection Kit* reagente (*Amersham Pharmacia Biotech*).

3.12 *Coomassie spot test*

Valgulahust tilgutati Whatman 3MM paberist lõigatud ribale ja kuivatati. Riba värviti *Coomassie Brilliant Blue*ga 5 minutit ja pesti veega, et eemaldada valkudega seondumata värv (*Harlow and Lane, 1988*).

3.13 Valkude dialüüs

Dialüüsimine viidi läbi temperatuuril 4 °C pidevalt magnetsegajal segades. Kasutati SPECTRA/POR 4000 Da poorisuurusega dialüüsikotte (Spectrum). Dialüüsipuhvri ruumala oli 300 ml. Ja iga dialüüsietapp vältas 4 tundi. Iga etapi järel eemaldati sadenenud materjal tsentrifuugides lahust 16000 x g 10 minutit 4 °C.

4 Tulemused ja Arutelu

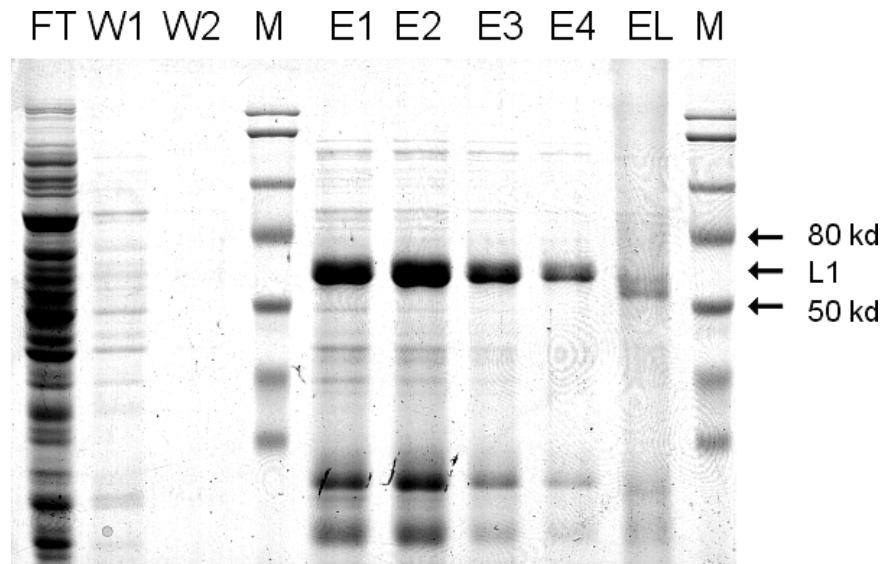
Püstitatud tööeesmärkide täitmiseks strateegia valikul lähtuti eelnevast teadmisest, et papilloomiviiruse L1 valk on halvasti lahustuv ning tema puhastamine denatureerivates tingimustes on oluliselt lihtsam. Selle tõttu valiti esmaseks lähenemiseks valgu puhastamine 8M ureas denatureeritult ja otsustati kasutada puhastamisele järgnevat renaturatsioonietappi. Töös kasutati veise papilloomiviirus tüüp 1 ja inimese papilloomiviirus tüüp 11 L1 valke. Viirusetüüpide valikul otsustati veise papilloomiviiruse kasuks kuna ta on ajalooliselt kujunenud papilloomiviiruse uurimise põhiliseks mudelsüsteemiks. Inimese papilloomiviirus tüüp 11 oli üks esimesi papilloomiviiruse tüüpe, mille puhul näidati VLP-de moodustumist eukarüootses süsteemis (Rose et al. 1993) ja ka bakteriaalsest L1 valgust saadi VLP-d esimesena just HPV11 L1-te kasutades (Li et al. 1997). Teda peetakse ka sobilikuks geeniülekanne vektorite välja töötamisel kuna ta kuulub madala riskigrupi papilloomiviiruste hulka.

4.1 BPV L1 valgu puhastamine

4.1.1 BPV L1 puhastamine Ni NTA metallafiinsus kromatograafiat kasutades

PQE-30-BPVL1 plasmiidiga transformeeritud ja IPTG-ga indutseeritud BL21(DE3) CodonPlus RP rakkudest puhastati BPV L1 valk denatureerivates tingimustes Ni-NTA kolonnil materjalides ja meetodikas kirjeldatud viisil (joonis 3). Kõigist kontamineerivatest valkudest antud puhastamisskeemiga vabaneda ei õnnestunud, samuti on näha täispikast L1 valgust lühemaid polüpeptiide, milledest peamine (~20 kd suurusel liikuv valk) on tõenäoliselt kas L1 valgu laguprodukt või enneaegse translatsiooni katkemise tagajärjel tekkinud trankeeritud vorm (joonis 3. rajad E1-E4). Ka teiste papillomiviiruse tüüpide L1 valkude puhastamisel jäid saadud valgulahuste puhtusastmed küllalt väikesteks. Samas on siiski võimalik neid preparaate analüüsida ning kasutada kuna hilisemal sahharoosi gradiendis tsentrifuugimisel jäävad kontamineerivad valgud

praktiliselt täielikult gradiendi pinnale sest nad ei moodusta suure molekulmassiga komplekse.

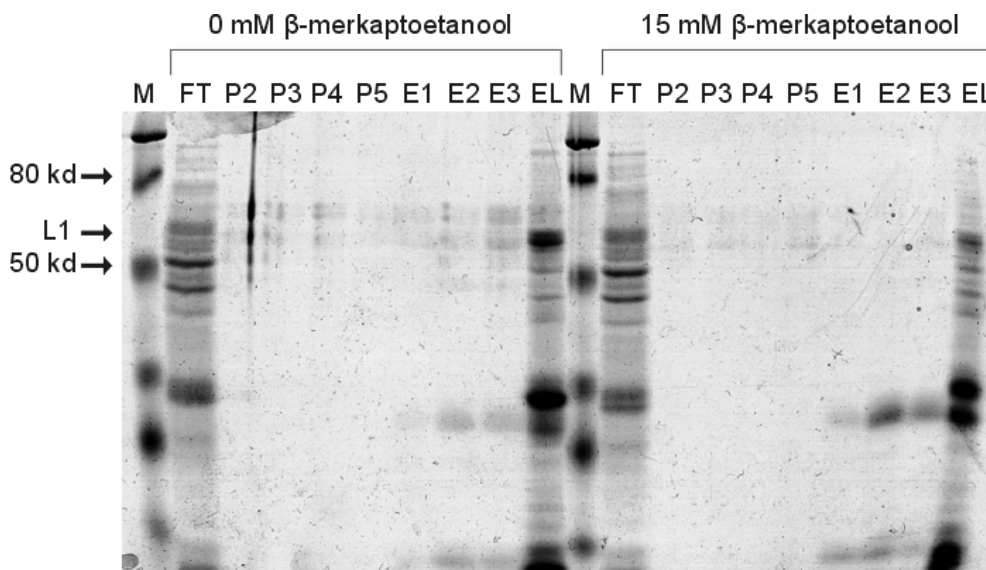


Joonis 3. BPV1 L1 valgu puhastamine Ni-NTA afiinsuskromatograafia abil denatureerivates tingimustes. 10% SDS- PAAG elektroforees (Geel värviti *Coomassie Brilliant Blue*-ga). Rada FT – läbijooks, rajad W1 ja W2 – esimene ja teine pesu 10 mM imidasooli sisaldava puhvriga. Rada E1- Elueerimine 100 mM imidasooliga puhvril. Rada E2 – Elueerimine 200 mM imidasooli sisaldava puhvriga. Rada E3 – Eluatsioon 300 mM imidasooliga E4 – Elueerimine 400 mM imidasooliga puhvril. EL – Elueerimine *laemml*i puhvril. M – Marker *Prestained protein ladder (Fermentas)*

4.1.2 BPV L1 renatureerimine kolonnil

Kuna viiruslaadsete partilkite moodustumiseks on vajalik natiivses konformatsioonis valk, üritati järgnevalt viia L1 natiivsele kujule. Valgu renatureerimisel on atraktiivseks võimaluseks renatureerimine kolonnil. Antud meetodi puhul fikseeritakse denatureeritud valk mingile kandjale ning denaturant pestakse seejärel kolonnilt välja. Seejärel vabastatakse renatureerunud valk maatriksilt. Selle meetodi põhiliseks eeliseks VLPde valmistamisel on asjaolu, et renatureerunud valgumolekulid ei saa kohe omavahel vabalt interakteeruda ja kapsiide moodustada. See võimaldaks enne kapsiidi moodustumist

lisada ka minoorset kapsiidivalgu L2 ja DNAd. Kirjeldatud meetodi rakendamiseks puhastati BPV L1 uuesti eelpool kirjeldatud viisil, kuid ei elueeritud Ni-NTA maatriksilt. Maatriksiga seondunud valgu pesti seejärel 4M, 2M ja 1M ureat sisaldavas pesupuhvril ja lõpuks ilma ureata puhvril. Valgu stabiliseerimiseks ja sadenemise vältimiseks oli puhvritesse lisatud ka glütserooli (kuni 30%) Viimases etapis enne elueerimist alandati glütserooli kontsentratsioon 10 protsendini. Paralleelses katses lisati kõigisse puhvritesse β -merkaptopetanooli (15 mM), et vältida disulfiidsildade moodustumist L1 molekulide vahel. Elueerimine toimus imidasooli abil (joonis 4.). Protseduur viidi läbi madala pH tingimustes (pH 5,5) kuna L1 on aluseline valk, mille pI on 8,75 ja peaks lahustuma paremini madalal pH-l. Ka kirjanduses leidub andmeid, mille kohaselt pH 5,5 on L1-le optimaalne (Finnen et al. 2003). Natiivset L1 valgu *Coomassie brilliant blue*-ga värvitud



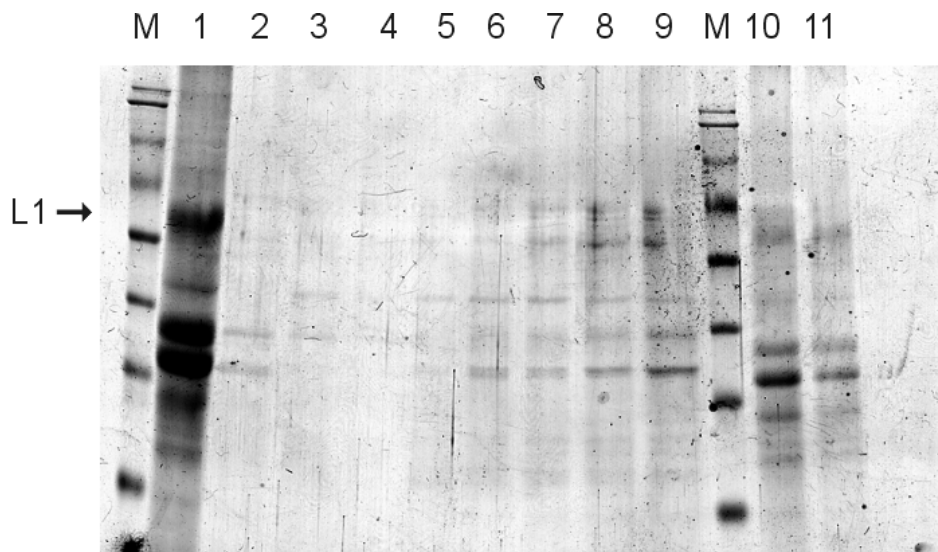
Joonis 4. BPV1 L1 valgu renatureerimine kolonnil 15 mM β -merkaptopetanooli juuresolekul (paremal) ja ilma (vasakul). 10% SDS – PAAG elektroforees (Geel värviti *Coomassie Brilliant Blue*-ga).

M – *Protein molecular weight marker (Fermentas)* FT – läbijooks, P2-P5 – ureast vabanemise puhvrid 2-5. E1-E3 – elueerimised 400 mM imidasooli sisaldavas puhvril. EL – elueerimine 2% SDS sisaldavas puhvril.

geelil detekteeritavates kogustes elueerida ei õnnestunud. *Laemml*i puhvriga elueeritud fraktsioonides (joonis 4. rajad EL) on näha L1 valk. Võib oletada, et kolonnil toimub denaturandi eemaldamisel L1 valgu sadenemine. Seda, millises konkreetsetes renaturatsiooni etapis valk välja sadenes ei ole võimalik kindlalt öelda. Oletada aga võib, et kriitiliseks punktiks on 2M uurea asendamine 1M uureaga, sest selles etapis hakkas pesulahus kolonnist märgatavalt aeglasemalt läbi voolama. Saadud tulemused näitavad, et antud meetodit ei ole L1 valgu renatureerimiseks võimalik kasutada. β -merkaptotetanooli lisamine mingit efekti ei omanud. See on kooskõlas kirjanduses avaldatud andmetega, mille kohaselt diulfidsildade roll HPV kapsiidide stabiilsuse tagamisel on märgatavalt suurem kui BPV puhul (Li et al. 1998).

4.1.3 BPV1 L1 puhastamine inklusioonkehadest

Kuna kolonnil renatureerimine tulemusi ei andnud otsustati puhastada L1 valku suuremas koguses, mis võimaldaks üritada valgu renatureerimist dialüüsamise teel ja lubaks riskida suuremate kadudega valgu renatureerimisprotsessis. Puhastamiseks kasutati ära L1 valgu raskesti lahustuvat iseloomu, nimelt akumulereub L1 valk bakteris ekspresseerimise korral eelistatult lahustumatutesse inklusioonkehadesse. Seetõttu puhastati valk inklusioonkehadest. Sel meetodil on võimalik saada suuri koguseid valku võrdlemisi puhtalt väikeste kulutustega. Kuna L1 osutus äärmiselt halvasti lahustuvaks oli võimalik pesta inklusioonkehi ka kõrgete uurea kontsentratsioonidega pesupuhvrites (joonis 5 – rajad 2-9). Probleemiks osutus hoopis inklusioonkehade hilisem lahustamine. Inklusioonkehad ei lahustunud isegi 6M guanidiini sisaldavas puhvris (joonis 5 – rada 10). Selle tõttu veise papilloomiviiruse L1 puhastamiseks antud meetod ei sobinud.



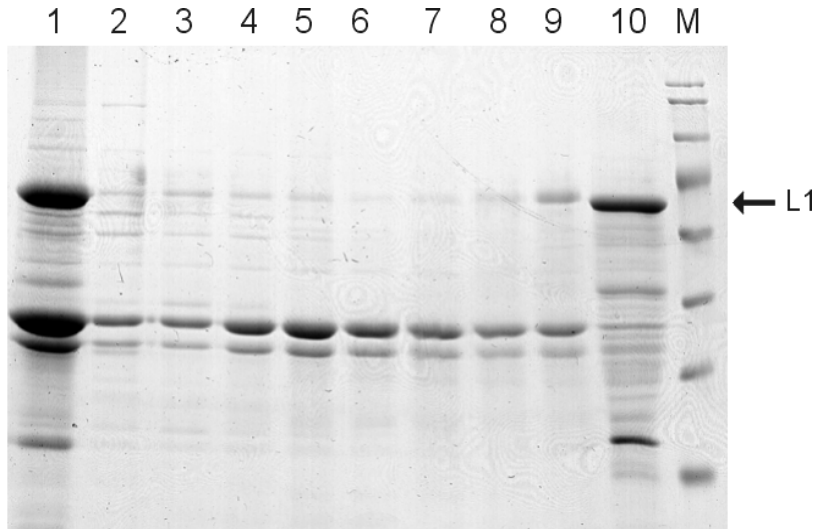
Joonis 5. BPV L1 valgu puhastamine inklusioonkehadest. 10% SDS PAAG elektroforees (Geel värviti *Coomassie Brilliant Blue*-ga). Rada 1 – puhastatud inklusioonkehad. Rada 2 – inklusioonkehade pesu 1M ureat sisaldavas puhvr. Rada 3 – pesu 2M ureat sisaldavas puhvr. Rada 4 – Pesu 3M ureat sisaldavas puhvr. Rada 5 – Pesu 4M ureat sisaldavas puhvr. Rada 6 – Pesu 5M ureat sisaldavas puhvr. Rada 7 – Pesu 6M ureaga puhvr. Rada 8 – Pesupuhver 7M ureaga. Rada 9 - inklusioonkehade pesu 8M ureat sisaldavas puhvr. Rada 10 – inklusioonkehade pesu 6M guanidiini sisaldavas puhvr. Rada 11 – 6M guanidiinis mitte lahustunud fraktsioon *laemml* puhvr.

4.2 HPV11 L1 valgu puhastamine ja VLP-de formeerimine

4.2.1 HPV11 L1 valgu puhastamine inklusioonkehadest

Inklusioonkehadest õnnestus puhastada seevastu inimese papilloomiviirus tüüp 11 (HPV11) L1 valku, mida oli võimalik hiljem lahustada 6M guanidiinis (joonis 6, rada 10). Kuna ka HPV11 L1 valk oli äärmiselt halvasti lahustuv, siis oli võimalik pärast inklusioonkehade konventsionaalset puhastamist neid kõrget urea kontsentratsiooni sisaldavate ekstraktsioonipuhvritega pestes suurel määral vabaneda kahest põhilisest kontamineerivast valgust ~41 ja 38 kd kõrgusel (joonis 6, rajad 2-9).

Samas jääb terve rida erinevaid kontamineerivaid valke siiski lahustumatuks ka 8M ureat sisaldava lahusega pesemisel ja saadud valgupreparaadi puhtus ei ületa 70%. Selle meetodiga õnnesus puhastada umbes 3 mg L1 valku.



joonis 6. HPV11 L1 valgu puhastamine inklusioonkehdest (10% SDS PAAG elektroforees, geel värviti *Coomassie Brilliant Blue*-ga). Rada 1 – Puhastatud inklusioonkehad, Rada 2 – inklusioonkehade pesu 1M ureat sisaldavas puhvril. Rada 3 – pesu 2M ureat sisaldavas puhvril. Rada 4 – Pesu 3M ureat sisaldavas puhvril. Rada 5 – Pesu 4M ureat sisaldavas puhvril. Rada 6 – Pesu 5M ureat sisaldavas puhvril. Rada 7 – Pesu 6M ureaga puhvril. Rada 8 – Pesupuhver 7M ureaga. Rada 9 - inklusioonkehade pesu 8M ureat sisaldavas puhvril, rada 10 – 6M guanidiini sisaldavas puhvril lahustatud inklusioonkehad. M – *Prestained protein ladder (Fermentas)*.

4.2.2 HPV11 L1 valgu renatureerimine lahjendamisega

Valgu renatureerimiseks on vaja vabaneda kõrgetest denatureeriva agendi (antud juhul 6M guanidiin) kontsentratsioonidest lahuses. Selleks on lihtne ja käepärane võimalus lahjendamine. Lahjendamisel on mitmeid eeliseid teiste renatureerimismeetodite ees. Seda on lihtne teostada ning toimub ka valgu kontsentratsiooni langemine, mis vähendab sadenemist. Teiselt poolt on valgu lahjenemine antud meetodi negatiivseks omaduseks. Liiga madal valgu lõppkontsentratsioon muudab hilisema analüüsi keerukaks ja

Tabel 1. 6M guanidiini sisaldavas puhvris lahustatud inklusioonkehadedest puhastatud HPV11 L1 lahuse lahjendamine.

2X	4X	5X	6X	8X	10X	Lahjendus
-	-	-	-	+/-	+/-	Lahustumatu
+	+	+	+	+	+/-	Lahustuv

vajalikuks võib osutada proovi hilisem kontsentreerimine. Lahjendamist on ka varem kasutatud papilloomiviiruse L1 valgu renatureerimiseks (Lai and Middelberg, 2002).

Puhastatud HPV11 L1 valku lahjendati kahel moel. Esiteks lahjendati 6M guanidiini sisaldavas puhvris (tabel 1) olevat valku, mille käigus alandati guanidiini kontsentratsiooni lahuses. Teisel juhul dialüüsiti valk esmalt 8M urea vastu ning lahjendati seejärel saadud lahust (tabel 2). Kontrollimaks valgu sadenemist pärast lahjenduse tegemist tsentrifuugiti pärast lahjendamist saadud lahust 16000g 10' ja supernatant viidi uude tuubi. Sade lahustati 10% SDS lahuses. Nii supernatant kui sade analüüsiti *Coomassie spot* testi abil (Harlow and Lane, 1988) (tabelid 1 ja 2). Test näitab millisesse fraktsiooni valk jääb. Guanidiinis jääb osa valku lahustuvaks ka 10 x lahjendamisel (600 mM guanidiini lõppkontsentratsioon) (tabel 1, 10x lahjendus) kuid valgu kontsentratsioon langeb väga madalaks. Ureas lahustatud valku on võimalik

lahjendada kuni 2M urea lõppkontsentratsioonini (tabel 2, pH 8,0, 4x lahjendus), sellest

Tabel 2 8M ureas lahustatud HPV11 L1 valgu lahuse lahjendamine ja lahustuvuse lõltuvus lahuse pH-st.

0X	2X	4X	8X	2X	4X	Lahjendus
-	-	-	+	+/-	+	Lahustumatu
+	+	+	-	+/-	-	Lahustuv
pH 8,0				pH 5,5		

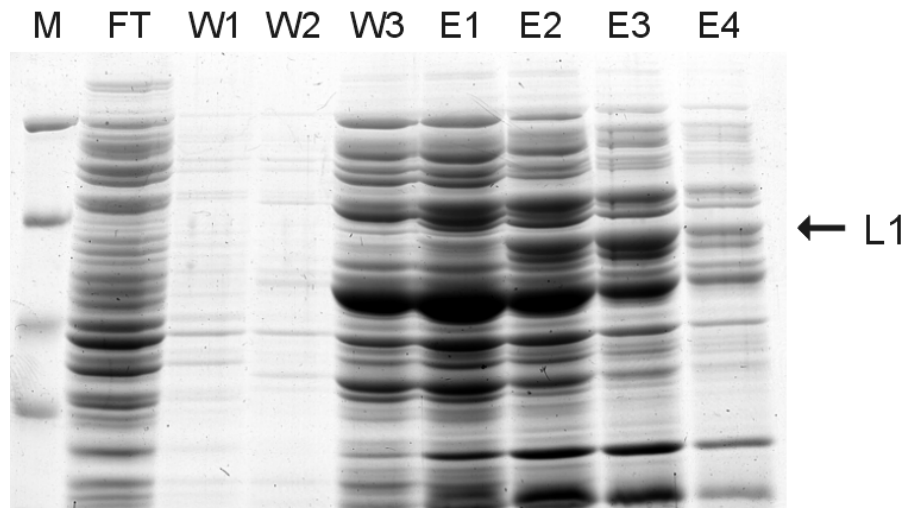
madalamal kontsentratsioonil sadeneb valk välja (tabel 2. pH 8,0, 8x lahjendus). Analüüsi ka pH mõju valgu lahustuvusele (tabel 2). L1 valgu teoreetiline pI on 8,75. Valkude lahustuvus üldjuhul on halvim isoelektrilise punkti lähedal ja paraneb sellest eemaldudes. Denatureeritud L1 valgu puhul osutus olukord vastupidiseks, pH 5,5 juures sadenes valk juba osaliselt 4M urea juuresolekul ning 2M ureas (4x lahjendus), lahustuvat valku enam detekteerida ei olnud võimalik (tabel 2. pH 5,5).

4.2.3 HPV11 L1 valgu renatureerimine dialüüsil

Kuna lahjendamisel langes valgu kontsentratsioon liiga madalaks, et võimaldada edasist analüüsi sahharoosi gradiendis tsentrifuugimise teel, kasutati denaturantidest vabanemiseks dialüüsimeetodit. Dialüüsi esimeses etapis vahetati 6M guanidiin 8M urea vastu ning seejärel sammhaaval alandati karbamiidi kontsentratsiooni lahuses. Urea kontsentratsiooni alandamine toimus läbi 6M, 4M, 2M ja 1M urea kontsentratsioonidega vaheetappide. Dialüüsil kasutatavad puhvrid sisaldasid lisaks denaturandile veel 300 mM NaCl ja 50 mM fosfaatpuhvrit (NaH_2PO_4). Lahuste pH oli 8,0. Madala pH-ga (5,5) puhvrite vastu dialüüsimisel toimus sadenemine varem, juba 6M urea vastu dialüüsimisel hakkas valk osaliselt sadenema. Seega käitus valk aeglase denaturandi

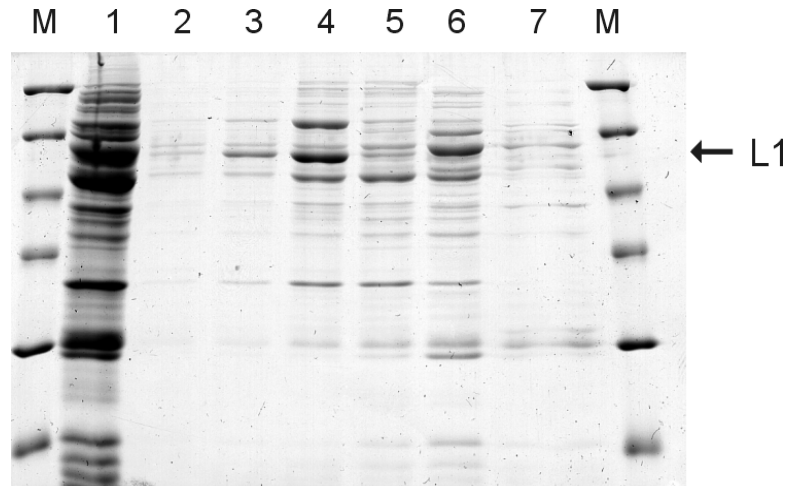
eemaldamise korral sarnaselt denaturandi kiire lahjendamise korral kirjeldatule. Sarnaseks jooneks lahjendamisel kogetuga toimus ka dialüüsidis urea kontsentratsiooni alandamisel alla 2M valgu sadenemine. Eriti intensiivselt sadenes valk 1M ureat sisaldava valgulahuse dialüüsimisel ilma ureata lahuse vastu. Urea täielikul eemaldamisel jäi lahustuvaks nii väike kogus valku, et analüüsimiseks oli võimalik kasutada ainult *western blot* meetodit.

4.2.4 HPV11 L1 valgu puhastamine natiivsetes tingimustes



Joonis 7. – HPV11 L1 puhastamine Ni NTA kolonnil natiivsetes tingimustes 10% SDS PAAG elektroforees, geel värviti *Coomassie brilliant blue*-ga. FT – läbijooks, W1 – pesu 20mM imidasooliga, W2 – pesu 50 mM imidasooliga, W3 – pesu 100 mM imidasooliga, E1 – elueerimine 250 mM imidasooliga, E2 – elueerimine 500 mM imidasooliga, E3 ja E4 – elueerimine 500 mM imidasooliga.

Olgugi et enamus bakteriaalselt ekspresseeritud L1 akumulereb inklusioonkehadesse, leidub ka väikeses koguses lahustuvat valku, mida on võimalik puhastada. Puhastamisel kasutati sarnaselt denatureerivate tingimuste korral rakendatuga Ni-NTA

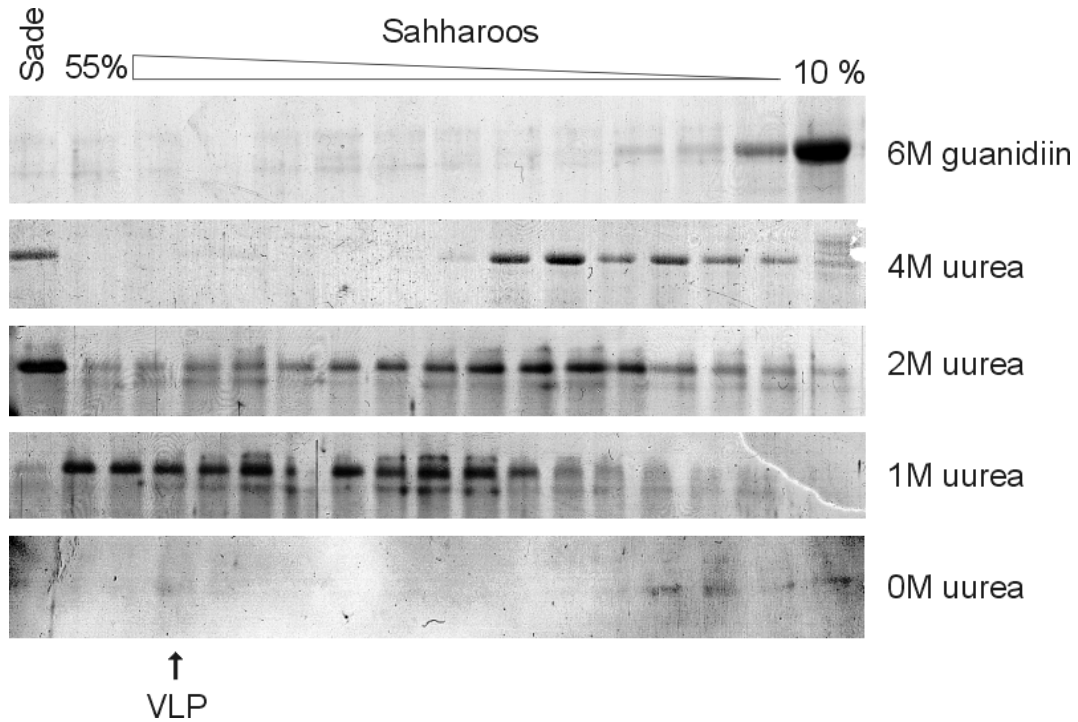


Joonis 8. – HPV11 L1 valgu selektiivne sadestamine ammoniumsulfaadiga (Coomassie Brilliant Blue-ga värvitud 10% SDS PAAG elektroforees). M – *Protein molecular weight marker* (Fermentas). Rada 1 – Ni NTAgas natiivsetes tingimustes puhastatud L1 valk. Rada 2 – 10% ammoniumsulfaadiga sadenenud valgud. Rada 3 – 20% ammoniumsulfaadiga sadenenud valgud. Rada 4 – 30% ammoniumsulfaadiga sadenenud valgud. Rada 5 – 40% ammoniumsulfaadiga sadenenud valgud. Rada 6 – 50% ammoniumsulfaadi lahuses sadenenud valgud. Rada 7 – Valgud, mis ei sadenenud 50% ammoniumsulfaadi juuresolekul.

afiinsuskromatograafiat (joonis 7) ja seejärel valgu selektiivset sadestamist ammoniumsulfaadiga (joonis 8). Saadud valgupreparaat sisaldas ohtralt kontamineerivaid bakteriaalseid valke (joonis 8 rajad 3 ja 4). Natiivse puhastamise madalat efektiivsust on võimalik seletada lahustuva L1 (inklusioonkehades olev L1 valk läheb kaduma) madala kontsentratsiooniga bakterilüsaadis ning samuti on võimalik, et his tag on valgumolekulide tertsiaarstruktuuri tõttu halvemini eksponeeritud kui denatureerivates tingimustes. Selektiivse sadestamise abil oli võimalik valgu küllastatust lahuses oluliselt tõsta kuna L1 sadenes eelistatult küllaltki madalatel ammoniumsulfaadi kontsentratsioonidel (20-30%) (joonis 8 rajad 3 ja 4).

4.2.5 L1 valgu analüüs sahharoosi gradiendis

Selleks, et saada ettekujutus L1 molekulide omavaheliset interakteerumist ja jälgida

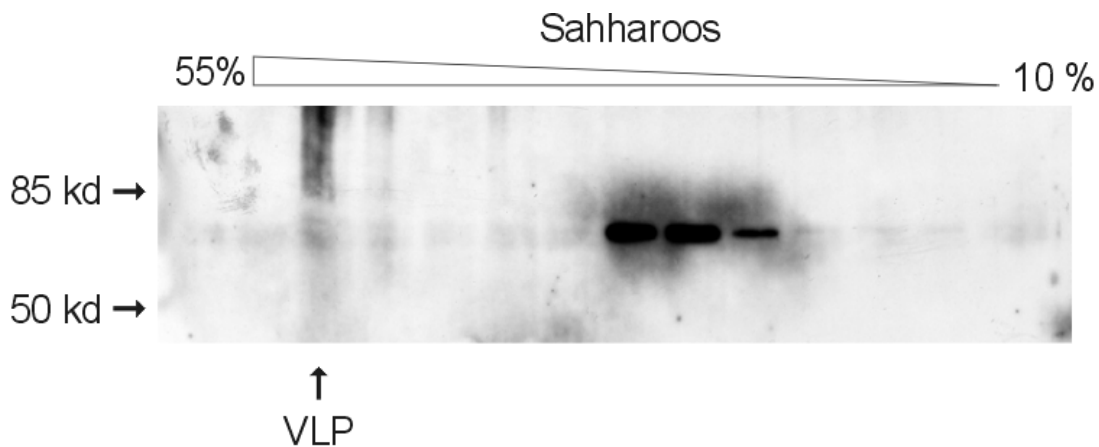


joonis 9. Denatureerivates tingimustes puhastatud L1 valgu analüüs 10-55% sahharoosi gradiendis ultratsentrifuugimisel 6 tunni jooksul (10% SDS PAAG elektroforees). Valgu liikuvus erinevate denaturandi kontsentratsioonide korral. Vasakule jääb gradiendi põhi ja paremale pinnaosa. 6M guanidiini ja 1M, 2M ja 4M uureat sisaldavate gradientide pildid on värgitud *Coomassie brilliant blue*-ga. Ilma denaturandita gradiendil on valgud visualiseeritud *western blot* meetodil. Kasutades HPV L1 vastast primaarset antikeha (Chemicon) ja aluselise fosfataasiga konjugeeritud sekundaarset antikeha (LabAS Ltd.) Noolega on märgitud eeldatava VLP asukoht ja sellele vastav signaal *western blotil*. Sade – tsentrifuugimisel gradiendi põhja sedimenteerunud materjal, mis lahustati *laemml*i puhvr

kapsiidide ning kapsomeeride moodustumist analüüsiti valgulahust 10-55% sahharoosi gradiendis ultratsentrifuugimise teel (40000 rpm Sorvall sw55 rootoris 6 tunni jooksul)

(joonis 9). 6M guanidiinis on L1 vastavalt eeldatule monomeeridena. Juba 4M ureas hakkab L1 aga oligomeriseeruma ja liikuma gradiendis sügavamale. Võib oletada, et 4 ja 2M ureas on L1 valk valdavalt pentameersel kujul. Ka kirjanduse andmetel ei lõhu kahe molaarne urea kapsomeere (Finnen et al. 2003). 1M ureas moodustab L1 aga heterogeense multimeeride segu, mis tõenäoliselt kujutab endast erinevaid kapsiidi laadseid struktuure, mis suuremalt jaolt on valesti pakkunud. On leitud, et mitteoptimaalsetes tingimustes moodustuvad kapsomeeridest kergesti heterogeensed ebakorrekse struktuuriga kapsiidilaadsed struktuurid, mis on kas pikergused või kujult spiraalsed (Zhang et al. 1998). Kui aga kogu urea on välja dialüüsitud siis jääb lahusesse sedavõrd vähe sadenemata lahustuvat valku, et seda ei ole enam võimalik *Coomassie brilliant blue*'ga visualiseerida ja kasutada tuleb *western blot* meetodit (joonis 9, 0M urea). Osutub, et väikese osa L1 liikuvus gradiendis vastab VLPde eeldatavale liikuvusele.

Sarnaselt reantureeritud valgule analüüsiti ka natiivsetes tingimustes puhastatud HPV11



joonis 10. Natiivsetes tingimustes puhastatud HPV11 L1 valgu analüüs 10-55% sahharoosi gradiendis ultratsentrifuugimisel 4 tunni jooksul (10% SDS PAAG elektroforees, *western blot* HPV L1 vastase antikehaga (Chemicon). Noolega on märgitud VLP eeldatav asukoht. Gradiendi pind on paremal ja põhi vasakul.

L1 valgu sahharoosi gradiendis (joonis 10). Saadud tulemus erineb mitmeti renatureeritud

L1 valgu puhul kogetust. Esiteks on eeldatavas VLP gradiendifraktsioonis märgata, et valk ei liigu mitte monomeerina vaid suuremate kompleksidena, seda võivad põhjustada kapsomeere ühendavad disulfiidsillad, mis pole katkenud ka denatureeriva elektroforeesi tingimustes. Teiseks erinevuseks on asjaolu, et natiivselt puhastatud L1 valk paikneb põhiliselt kapsomeeridele vastavate tihedustega fraktsioonides või isegi pisut sügavamal, samal ajal kui renatureeritud L1 puhul vabu kapsomeere ei ole võimalik detekteerida (joonis 7. 0M urea) – valk on kas monomeeridena või vähesel määral VLPlle vastavas fraktsioonis. Võimalik, et kapsomeerid ja ebakorrektselt formeerunud partiklid sadenevad eelistatult renatureerimisprotsessi viimases etapis kui toimub üleminek 1M ureast ilma denaturandita lahusesse.

4.3 Renaturatsiooniprotsessi analüüs

4.3.1 Renaturatsiooniprotsessi mõjutavad tegurid

Valkude renatureerumine ja korrektse natiivse konformatsiooni omandamine on äärmiselt keeruline protsess, mida mõjutavad terve hulk muutujaid. Kõigi parameetrite optimeerimine on komplitseeritud, kui mitte võimatu. Paljude valkude puhul ei ole renaturatsioon üldse võimalik. Vajalikud võivad olla molekulaarsed chaperonid või posttranslatsioonilised modifikatsioonid. Samuti toimub enamiku valkude voltumine neile omasesse konformatsiooni kotranslatsiooniliselt. Mõningad valgud omavad seevastu stabiilseid ja hästi defineeritud tertsiaarstruktuure ja on võimelised hästi renatureeruma näiteks RNAasid. Ka viiruste kapsiidivalgud omavad tihti äärmiselt tugevaid ja stabiilseid struktuure kuna nad peavad kaitsma viiruse genoomi erinevate väliskeskkonna mõjude eest, oli alust arvata, et VLP-d on võimelised formeeruma renaturatsiooni käigus.

Oluliseks faktoriks, mis määrab renaturatsiooni efektiivsuse on kasutatava valgupreparaadi puhtus. Kontamineerivad valgud võivad interakteeruda osaliselt renatureerunud valguga ja segada õige konformatsiooni leidmist. Antud töös kasutatud valgupreparaatide madal puhtusaste võib ka seletada renaturatsiooni väikest saagikust.

Dialüüsiga renatureerimise katses kasutatud valgu puhtusaste oli ligikaudu 70% (joonis 6 rada 10), mis tõenäoliselt ei olnud piisav.

Renatureerimisel tuleb silmas pidada ka L1 valgu kontsentratsiooni. Liialt kõrgel kontsentratsioonil kipuvad valgud agregeeruma ja välja sadenema. Valgupreparaatide kontsentratsioonide täpset määramist takistasid kõrged deanturandi kontsentratsioonid ja ka kontamineerivate valkude ohtrus. Ligikaudselt määratult olid antud töös renaturatsioonikatsetes valgukontsentratsioonid viidud 0,1-0,2 mg/ml vahemikku.

Kolmandaks on oluline denatureeriva reagenti eemaldamise kiirus dialüüsil. On leitud, et L1 valgule on soodsaim dialüüsimine neljas nelja tunni pikkuses etapis (4M, 2M, 1M ja 0M urea vastu) (Zhang et al. 1998). Käesolevas töös leiti, et kadusid aitab vähendada täiendav dialüüsietapp 6M urea vastu.

Eduka renaturatsiooni jaoks on kriitilise tähtsusega valgu jaoks sobiva pH leidmine. Varem on leitud, et L1 jaoks on sobivaim madal pH 5,5 (Finnen et al. 2003, Chen et al. 2000). Samas on mitmetes töödes osutunud sobivaimaks kergelt aluseline keskkond (Li et al. 1997, McCarthy et al. 1998, Zhang et al. 1998). Käesolevas töös tehtud katsed valgupreparaatide lahjendamisega (Tabel 2) näitavad, et antud tingimustes HPV11 L1 jaoks on sobivaim aluseline pH (8,0), sarnased tulemused saadi ka dialüüsi katsetes (andmed pole välja toodud).

Lahuse optimaalse soolasisalduse kohta on kirjanduses samuti erinevaid arvamusi. Ja kasutatavad NaCl kontsentratsioonid algavad 100 millimolaarsest (Zhang et al. 1998) ja ulatuvad 500 millimolaarseni (McCarthy et al. 1998). Käesolevas töös kasutati rutiinselt 300-400 mM NaCl kontsentratsioone, samu tulemusi andis aga ka 800 mM NaCl kontsentratsiooni kasutamine.

Kasutatud pET-19b-HPV11-L1 plasmiidilt kodeeritud L1 valgu N-terminusega on ühendatud 10x His *tag* ja enterokinaasi lõikekoht. See, rohkem kui 20 aminohappe pikkune liiderjärjestus, võib samuti mõjutada valgu renaturatsiooni ja VLPde

moodustumist. Olgugi, et L1 N-terminus otseselt ei osale valgu struktuuri moodustamisel ega kapsomeeride virionideks ühendamisel, (Chen et al. 2000) on võimalik, et sellise pikkusega liiderjärjestus võib mõjutada nii intra- kui ka intermolekulaarseid interaktsioone.

4.3.2 Renaturatsiooni kulg

Lähtudes töö käigus saadud andmetest on võimalik kirjeldada diskreetseid etappe L1 valgu renatureerumise protsessis. Saadud tulemused lubavad oletada, et antud valgu natiivse koformatsiooni saavutamine ei ole pidev protsess, vaid koosneb reast üksteisest lahutatavatest etappidest. Renaturatsiooni käigus tuleb ette ka punkte kus valk läbib olulisi konformatsioonilisi muutusi, sellele viitab asjaolu, et kindlates dialüüsi etappides toimub intensiivne valgu sadenemine. Võib oletada, et suur osa osaliselt valesi voltunud valgumolekulidest ei ole võimeline nendes etappides enam korrektset konformatsiooni leidama ja edasi renatureeruma. Eelistatuks saavad hoopis agregatsiooniprotsessid, mis viivad valgu sadenemiseni.

Välja võib tuua kaks tähtsamat renaturatsiooni käigus toimuvat sündmust. Esimene neist leiab aset uurea kontsentratsiooni alandamisel 4 molaarseni. Kui kõrgematel uurea kontsentratsioonidel on valk denatureeritud olekus ja monomeeridena, siis selles etapis saavutavad L1 valgu molekulid tertsiaarstruktuuri ja algab ka kvaternaarstruktuuride teke – moodustuvad kapsomeerid. See, et L1 molekulid on võimalised kõrgel uurea kontsentratsioonil natiivset konformatsiooni saavutama kinnitab varasemaid andmeid, et L1 peamiselt β -lehtedest koosnevas põhistruktuuris (Chen et al. 2000) ja kapsomeeri sisestes kontaktides domineerivad hüdrofoobsed interaktsioonid (Finnen et al. 2003).

Teiseks oluliseks staadiumiks on kapsomeeride ühinemine suurteks makrokompleksideks ja kapsiidilaadseteks struktuurideks, mis leiab aset uurea kontsentratsiooni alanemisel 1 molaarseni. Kuna kapsomeere ühendavad omavahel põhiliselt hüdrofiilse iseloomuga sidemed (vesiniksidemed ja soolasillad (Chen et al. 2000, McCarthy et al. 1998)), ehkki HPV puhul on olulised ka disulfiidsillad (Li et al. 1998), on loomulik, et need protsessid

ei saa aset leida kõrgetel urea kontsentratsioonidel. Samuti võib oletada, et 1M urea takistab kapsomeeride korrektset ühinemist, mille tulemusena tekib heterogeenne populatsioon erinevatest valesti pakkunud ja väikesest kogusest korrektselt formeerunud kapsiidi laadsetest struktuuridest.

Saadud tulemused näitavad, et L1 valgu renatureerimisel ei ole kriitiliseks etapiks mitte L1 monomeeride korrektne voltumine ega kapsomeeride moodustumine vaid hoopis hilisem kapsomeeride omavaheline liitumine viiruslaadseteks partikliteks. Selle põhjuseks võib olla kas asjaolu, et kapsomeeride omavaheline ühinamine on olemuselt keerukam protsess või, mis veelgi tõenäolisem, töös kasutatud tingimused ja molekulaarne keskkond ei ole soodsad korrektsete kapsomeeride vaheliste interaktsioonide moodustumiseks.

Kokkuvõtteks tuleb tõdeda, et kumbki kasutatud meetoditest ei võimalda DNA pakkimist moodustuvatesse partiklitesse kuna dialüüsi protsessi käigus toimub sujuv üleminek kõrgelt denaturandi kontsentratsioonilt, kus denatureerub ka DNA, madalale kontsentratsioonile, kus partikkel on juba moodustunud, ning DNA sisenemine kapsiidi on võimatu. Natiivse L1 avalgu puhastamisel seevastu tekivad partiklid juba puhastamise käigus ja DNA hilisem lisamine formeerunud partiklitele ei ole efektiivne.

Samuti on probleemiks renaturatsiooniprotsessi madal saagis ja suured kaod valesti formeerunud partiklite näol. Hinnanguliselt võib dialüüsil õigesti formeerunud partiklite saagiseks pidada umbes 0,1 % algmaterjalist.

Kokkuvõte

Käesoleva töö käigus õnnestus saavutada nii natiivselt puhastatud kui ka renatureeritud bakteriaalselt ekspresseeritud papilloomiviiruse L1 valgu pakkumine viiruslaadseks partiklaks *in vitro*. Välja töötatud protsess on aga väga madala efektiivsusega ja osutub, et enamik L1 valku ei pakku korrektselt ning sadeneb menetluse käigus. Lisaks kirjeldati L1 valgu käitumist erinevate denaturandi kontsentratsioonide korral, ning määrati kindlaks olulisemad verstepostid L1 renaturatsiooniprotsessis. Osutus võimalikuks defineerida kaks kriitilist punkti L1 valgu pakkumisel:

- 1) Üleminek 8M ureast 4M ureale, kus toimub pentameeride moodustumine.
- 2) Üleminek 2M urealt 1M ureale, mil hakkab aset leidma pentameeride omavaheline interakteerumine ja kapsiidilaadsete struktuuride moodustumine. Selles etapis toimub ka intensiivne valgu sadenemine, mis viitab asjaolule, et paljud valgumolekulid võtavad just selles renaturatsiooni staadiumis pöördumatult vale konformatsiooni.

Summary

The major achievement of this work is the demonstration of *in vitro* assembly of virus like particles by both native and refolded bacterially expressed papillomavirus L1 protein. However, the developed process has a very low yield and evidently majority of the L1 protein is folded incorrectly and is precipitated in the course of the procedure. In addition, the behaviour of L1 protein under different concentrations of denaturing agent was characterized and major milestones in the L1 renaturation process were determined. It was possible to define two critical checkpoints in the course of L1 protein refolding.

- 1) Transition from 8M urea to 4M urea, the starting point of pentamer formation.
- 2) Transition from 2M urea to 1M urea, at this point interpentameric interactions start to take place and the the formation of capsid-like structures has begun. Extensive protein precipitation is also perceived in this stage, this suggests that a large amount of protein molecules are irreversibly misfolded at this turningpoint.

Kasutatud kirjandus

- Barksdale, S. K., and C. C. Baker. 1993. Differentiation-specific expression from the bovine papillomavirus type 1 P2443 and late promoters. *J Virol* 67:5605-16.
- Berg, L., M. Lusky, A. Stenlund, and M. R. Botchan. 1986. Repression of bovine papilloma virus replication is mediated by a virally encoded trans-acting factor. *Cell* 46:753-62.
- Bream, G., Phelps, W. 1994. Shope Papilloma and Bovine Papillomaviruses. Encyclopedia of Virology. London, San Diego Academic Press: 1305-1311
- Biemelt, S. U. Sonnewald, P. Galmbacher, L. Willmitzer, M. Muller. 2003. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol* 77: 9211-20.
- Carter, J. J., M. Hagensee, M. C. Taflin, S. K. Lee, L. A. Koutsky, and D. A. Galloway. 1993. HPV-1 capsids expressed in vitro detect human serum antibodies associated with foot warts. *Virology* 195:456-62.
- Chen, X. S., R. L. Garcea, I. Goldberg, G. Casini, and S. C. Harrison. 2000. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* 5:557-67.
- Day, P. M., R. B. Roden, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* 72:142-50.
- Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean, and L. Crawford. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352:824-7.
- Doorbar, J., and P. H. Gallimore. 1987. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J Virol* 61:2793-9.

- Evander, M., I. H. Frazer, E. Payne, Y. M. Qi, K. Hengst, and N. A. McMillan. 1997. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 71:2449-56.
- Fang, N. X., I. H. Frazer, J. Zhou, and G. J. Fernando. 1999. Post translational modifications of recombinant human papillomavirus type 6b major capsid protein. *Virus Res* 60:113-21.
- Farthing, A. J., and K. H. Vousden. 1994. Functions of human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. *Trends Microbiol* 2:170-4.
- Finnen, R. L., D. K. D. Erickson, X. S. Chen, R. L. Garcea. 2003. Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. *J Virol* 77: 4818-26.
- Flores, E. R., B. L. Allen-Hoffmann, D. Lee, and P. F. Lambert. 2000. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* 74:6622-31.
- Flores, E. R., and P. F. Lambert. 1997. Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol* 71:7167-79.
- Giroglou, T., L. Florin, F. Schafer, R. E. Streeck, and M. Sapp. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* 75:1565-70.
- Harlow, E., Lane, D. 1988. Appendix II, Protein Techniques. *Antibodies a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: 672
- Heino, P., J. Dillner, and S. Schwartz. 1995. Human papillomavirus type 16 capsid proteins produced from recombinant Semliki Forest virus assemble into virus-like particles. *Virology* 214:349-59.
- Heino, P., J. Zhou, and P. F. Lambert. 2000. Interaction of the papillomavirus transcription/replication factor, E2, and the viral capsid protein, L2. *Virology* 276:304-14.
- Hofmann, K. J., J. C. Cook, J. G. Joyce, D. R. Brown, L. D. Schultz, H. A. George, M. Rosolowsky, K. H. Fife, and K. U. Jansen. 1995. Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* 209:506-18.

- Howley, P. M. 1996. "Papillomavirinae: the viruses and their replication," in *Filds Virology*. Edited by B. N. Fields.
- Ilves, I., S. Kivi, and M. Ustav. 1999. Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. *J Virol* 73:4404-12.
- Jin, X. W., L. M. Cowser, W. P. Pilacinski, and A. B. Jenson. 1989. Identification of L2 open reading frame gene products of bovine papillomavirus type 1 using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 70:1133-40.
- Kawana, Y., K. Kawana, H. Yoshikawa, Y. Taketani, K. Yoshiike, and T. Kanda. 2001. Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol* 75:2331-6.
- Kirnbauer, R., J. Taub, H. Greenstone, R. Roden, M. Durst, L. Gissmann, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1993. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 67:6929-36.
- Koffa, M. D., S. V. Graham, Y. Takagaki, J. L. Manley, and J. B. Clements. 2000. The human papillomavirus type 16 negative regulatory RNA element interacts with three proteins that act at different posttranscriptional levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4677-82.
- Lai, W. B. and A. P. J. Middelberg. 2002. The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from Escherichia coli inclusion bodies. *Bioprocess Biosyst Eng* 25: 121-8
- Lehman, C. W., and M. R. Botchan. 1998. Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4338-43.
- Li, M., P. Beard, P. A. Estes, M. K. Lyon, and R. L. Garcea. 1998. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol* 72:2160-7.
- Li, M., T. P. Cripe, P. A. Estes, M. K. Lyon, R. C. Rose, and R. L. Garcea. 1997. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in Escherichia

- coli: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J Virol* 71:2988-95.
- Liu, W. J., L. Gissmann, X. Y. Sun, A. Kanjanahaluethai, M. Muller, J. Doorbar, and J. Zhou. 1997. Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions. *Virology* 227:474-83.
- Lusky, M., and M. Botchan. 1981. Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences. *Nature* 293:79-81.
- Mallon, R. G., D. Wojciechowicz, and V. Defendi. 1987. DNA-binding activity of papillomavirus proteins. *J Virol* 61:1655-60.
- Maul, G. G. 1998. Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* 20:660-7.
- McBride, A. A., H. Romanczuk, and P. M. Howley. 1991. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 266:18411-4.
- McMillan, N. A., E. Payne, I. H. Frazer, and M. Evander. 1999. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* 261:271-9.
- Muller, M., L. Gissmann, R. J. Cristiano, X. Y. Sun, I. H. Frazer, A. B. Jenson, A. Alonso, H. Zentgraf, and J. Zhou. 1995. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol* 69:948-54.
- Neeper, M. P., K. J. Hofmann, and K. U. Jansen. 1996. Expression of the major capsid protein of human papillomavirus type 11 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 180:1-6.
- Okun, M. M., P. M. Day, H. L. Greenstone, F. P. Booy, D. R. Lowy, J. T. Schiller, and R. B. Roden. 2001. L1 interaction domains of papillomavirus L2 necessary for viral genome encapsidation. *J Virol* 75:4332-42.
- Paintsil, J., M. Muller, M. Picken, L. Gissmann, and J. Zhou. 1996. Carboxyl terminus of bovine papillomavirus type-1 L1 protein is not required for capsid formation. *Virology* 223:238-44.
- Paintsil, J., M. Muller, M. Picken, L. Gissmann, and J. Zhou. 1998. Calcium is required in reassembly of bovine papillomavirus in vitro. *J Gen Virol* 79:1133-41.

- Petti, L., and D. DiMaio. 1994. Specific interaction between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and the beta receptor for platelet-derived growth factor in stably transformed and acutely transfected cells. *J Virol* 68:3582-92.
- Quignon, F., F. De Bels, M. Koken, J. Feunteun, J. C. Ameisen, and H. de The. 1998. PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat Genet* 20:259-65.
- Roden, R. B., P. M. Day, B. K. Bronzo, W. H. t. Yutzy, Y. Yang, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 2001. Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. *J Virol* 75:10493-7.
- Roden, R. B., N. L. Hubbert, R. Kirnbauer, F. Breitburd, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1995. Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor. *J Virol* 69:5147-51.
- Roden, R. B., M. Ling, T. -C. Wu. 2004. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. *Hum Pathol* 35: 971-82.
- Roden, R. B., E. M. Weissinger, D. W. Henderson, F. Booy, R. Kirnbauer, J. F. Mushinski, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1994. Neutralization of bovine papillomavirus by antibodies to L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 68:7570-4.
- Rose RC, Bonneze W, Reichman RC, Garcea RL. 1993. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of viruslike particles. *J Virol* 67: 1936-44.
- Rossi, J. L., L. Gissmann, K. Jansen, and M. Muller. 2000. Assembly of human papillomavirus type 16 pseudovirions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Gene Ther* 11:1165-76.
- Sapp, M., C. Fligge, I. Petzak, J. R. Harris, and R. E. Streeck. 1998. Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. *J Virol* 72:6186-9.
- Sasagawa, T., P. Pushko, G. Steers, S. E. Gschmeissner, M. A. Hajibagheri, J. Finch, L. Crawford, and M. Tommasino. 1995. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* 206:126-35.
- Seeler, J. S., and A. Dejean. 1999. The PML nuclear bodies: actors or extras? *Curr Opin Genet Dev* 9:362-7.

- Seo, Y. S., F. Muller, M. Lusky, and J. Hurwitz. 1993. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:702-6.
- Sokolowski, M., W. Tan, M. Jellne, and S. Schwartz. 1998. mRNA instability elements in the human papillomavirus type 16 L2 coding region. *J Virol* 72:1504-15.
- Stauffer, Y., K. Raj, K. Masternak, and P. Beard. 1998. Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J Mol Biol* 283:529-36.
- Stubenrauch, F., A. M. Colbert, and L. A. Laimins. 1998. Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions. *J Virol* 72:8115-23.
- Sun, X. Y., I. Frazer, M. Muller, L. Gissmann, and J. Zhou. 1995. Sequences required for the nuclear targeting and accumulation of human papillomavirus type 6B L2 protein. *Virology* 213:321-7.
- Touze, A., and P. Coursaget. 1998. In vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucleic Acids Res* 26:1317-23.
- Unckell, F., R. E. Streeck, and M. Sapp. 1997. Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J Virol* 71:2934-9.
- Ustav, M., E. Ustav, P. Szymanski, and A. Stenlund. 1991. Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *Embo J* 10:4321-9.
- Wang, Z. G., L. Delva, M. Gaboli, R. Rivi, M. Giorgio, C. Cordon-Cardo, F. Grosveld, and P. P. Pandolfi. 1998a. Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* 279:1547-51.
- Wang, Z. G., D. Ruggero, S. Ronchetti, S. Zhong, M. Gaboli, R. Rivi, and P. P. Pandolfi. 1998b. PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* 20:266-72.
- Yaegashi, N., L. Xi, M. Batra, and D. A. Galloway. 1993. Sequence and antigenic diversity in two immunodominant regions of the L2 protein of human papillomavirus types 6 and 16. *J Infect Dis* 168:743-7.
- Zhang, W., J. Carmichael, J. Ferguson, S. Inglis, H. Ashrafian, and M. Stanley. 1998. Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Escherichia coli*:

- denaturation, renaturation, and self-assembly of virus-like particles in vitro. *Virology* 243:423-31.
- Zhao, K. N., I. H. Frazer, W. Jun Liu, M. Williams, and J. Zhou. 1999. Nucleotides 1506-1625 of bovine papillomavirus type 1 genome can enhance DNA packaging by L1/L2 capsids. *Virology* 259:211-8.
- Zhao, K. N., K. Hengst, W. J. Liu, Y. H. Liu, X. S. Liu, N. A. McMillan, and I. H. Frazer. 2000. BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. *Virology* 272:382-93.
- Zhao, K. N., X. Y. Sun, I. H. Frazer, and J. Zhou. 1998. DNA packaging by L1 and L2 capsid proteins of bovine papillomavirus type 1. *Virology* 243:482-91.
- Zhou, J., W. J. Liu, S. W. Peng, X. Y. Sun, and I. Frazer. 1999. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *J Virol* 73:4972-82.