

TARTU ÜLIKOOL  
BIOLOOGIA-GEOGRAAFIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
MIKROBIOLOOGIA JA VIROLOOGIA ÕPPETOOL

Mari Ojarand

**Erinevatelt papilloomiviiruste URR järjestustelt lähtuv  
replikatsioon HeLa rakkudes**

Magistritöö

Juhendaja: Ene Ustav, Ph. D

TARTU 2005

# SISUKORD

|                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| SISUKORD .....                                                                                                                                                                                          | 2  |
| KASUTATUD LÜHENDID .....                                                                                                                                                                                | 3  |
| SISSEJUHATUS .....                                                                                                                                                                                      | 5  |
| KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....                                                                                                                                                                               | 6  |
| 1. Papilloomiviiruste üldiseloomustus .....                                                                                                                                                             | 6  |
| 2. Papilloomiviiruste elutsüklil ja DNA replikatsioon.....                                                                                                                                              | 7  |
| 2.1 Papilloomiviiruste DNA replikatsiooniks vajalikud <i>cis</i> -järjestused .....                                                                                                                     | 8  |
| 2.2 Replikatsioonivalgud E1 ja E2 .....                                                                                                                                                                 | 9  |
| 2.3 Papilloomiviiruste geeniekspressioon ja selle regulatsioon diferentseerivas<br>epiteelis.....                                                                                                       | 11 |
| 2.4 Papilloomiviiruste genoomi stabiilne episomaalne säilimine rakkudes.....                                                                                                                            | 18 |
| 3. Papilloomiviirused ja kasvaja .....                                                                                                                                                                  | 19 |
| 3.1 HPVde onkogeensid .....                                                                                                                                                                             | 21 |
| 3.2 HPVde DNA füüsiline staatus kasvajakarides .....                                                                                                                                                    | 22 |
| 4. HeLa ja teised HPV uuringutes kasutatavad rakuliinid.....                                                                                                                                            | 23 |
| EKSPERIMENTAALNE OSA .....                                                                                                                                                                              | 26 |
| TÖÖ EESMÄRGID .....                                                                                                                                                                                     | 26 |
| MATERJALID JA METOODIKA .....                                                                                                                                                                           | 28 |
| TULEMUSED .....                                                                                                                                                                                         | 34 |
| 1. HPV-18, HPV-16, HPV-11 ja BPV-1 URRI sisaldavate plasmiidide replikatsioon HeLa<br>rakkudes .....                                                                                                    | 34 |
| 2. HPV-18 E1 ja E2 ekspresseerimine HeLa rakkudes tekitab HPV-spetsiifilisi<br>replikatsiooniprodukte.....                                                                                              | 36 |
| 3. Integreerunud HPV-18 ori järjestuselt saab HeLa rakkudes replikatsiooni esile kutsuda<br>ka HPV-16 E1 ja E2 abil, kuid mitte HPV-11 ega BPV-1 vastavaid replikatsioonivalke<br>ekspresseerides ..... | 40 |
| 4. Erinevate HPV-18 URRI sisaldavate plasmiidide replikatsioon HeLa rakkudes.....                                                                                                                       | 42 |
| 5. HeLa rakkudesse integreerunud HPV-18 ori järjestuselt lähtuvate<br>replikatsiooniproduktide analüüs erinevaid hübriidatsiooni proove kasutades .....                                                 | 45 |
| ARUTELU .....                                                                                                                                                                                           | 47 |
| KOKKUVÕTE.....                                                                                                                                                                                          | 54 |
| SUMMARY .....                                                                                                                                                                                           | 56 |
| KASUTATUD KIRJANDUS .....                                                                                                                                                                               | 57 |

## KASUTATUD LÜHENDID

AP-1 – aktivaatorvalk 1 (*activator protein 1*)  
AE – lisa-enhanser (*auxiliary enhancer*)  
BPV – veise papilloomiviirus (*bovine papillomavirus*)  
CDK – tsükliin-sõltuv kinaas (*cyclin-dependent kinase*)  
CDP – CCAAT tõrjuv faktor (*CCAAT displacement protein*)  
CIN – emakakaela intraepiteliaalne neoplaasia (*cervical intraepithelial neoplasia*)  
hDlg – inimese *discs large* valk (*human discs large protein*)  
DBD – DNA-ga seondumise domään (*DNA binding domain*)  
E1BS – valgu E1 seostumiskoht (*E1 binding site*)  
E2BS – valgu E2 seostumiskoht (*E2 binding site*)  
E2TA – täispikk E2 valk (*E2 transactivator*)  
E2TR – E2 repressorvorm, ilma transaktivatsioonidomäänita (*E2 transcriptional repressor*)  
E6AP – E6ga seostuv valk (*E6-associated protein*)  
EDTA – etüleendiamiintetraädikhape (*ethylenediaminetetraacetic acid*)  
GR – glükokortikoidireseptor (*glycocorticoid receptor*)  
HPV – inimese papilloomiviirus (*human papillomavirus*)  
KE – keratinotsüüdispetsiifiline enhanser (*keratinocyte enhancer*)  
LCR – pikk kontrollpiirkond (*long control region*)  
MME – minikromosoomi säilitamise järjestus (*minichromosome maintenance element*)  
MO – minimaalne replikatsiooniks vajalik järjestus (*minimal origin*)  
NF1 – tuumafaktor 1 (*nuclear factor 1*)  
ori – replikatsiooni initsiatsiooniks vajalikud DNA järjestused (*origin of replication*)  
PBS – fosfaatpuhvriga soolalahus (*phosphate buffered saline*)  
PV – papilloomiviirus  
PCNA – jagunevate rakkude tuuma antigeen (*proliferating cell nuclear antigen*)  
Rb – retinoblastoomi valk (*retinoblastoma protein*)  
RPA – replikatsioonivalk A (*replication protein A*)  
rpm – pöörded minutis (*revolutions per minute*)  
SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (*sodium dodecylsulphate*)  
SIL – muutunud ala sarvepiteelis (*squamous intraepithelial lesion*)

Sp1 – *selective promoter factor 1*

SNF – *simply not fertile* valk

SSC – naatriumkloriidi ja naatriumtsitraadi lahus (*saline-sodium citrate*)

SV40 – *simian virus 40*

SWI – *single wings* valk

Tris – trishüdroksümetüülaminometaan

TF1 – transkriptsioonifaktor 1 (*transcription factor 1*)

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

YY1 – *yin yang 1* valk

## SISSEJUHATUS

Naistel leitud vähivormidest on esinemissageduselt teisel kohal emakakaelavähk, mis jääb arvukuselt maha vaid rinnavähist. Pääaegu kõigist vähieelses seisundis olevatest või väljakujunenud kartsinoomile iseloomulike tunnustega emakakaelarakkudest leitakse inimese papilloomiviiruste (HPVde) DNA-d, mis on viinud arusaamisele, et HPV nakkus on emakakaelavähi tekkimiseks vajalik eeltingimus. Muutunud emakakaelarakkudes esineva HPV DNA uurimine on näidanud, et sageli on viiruse normaalne elutsükkel katkenud ning HPV genoom või selle osa integreerunud peremeesraku kromosoomi. HPV-positiivsetest kartsinoomidest saadud stabiilsed rakuliinid on saanud laialt kasutatavateks mudelsüsteemideks viirus-peremeesrakk interaktsioonide uurimiseks, et mõista paremini, kuidas papilloomiviiruste onkogeneenne potentsiaal realiseerub.

Meie laboris on papilloomiviiruste URRI sisaldavate konstruktide replikatsiooni koekultuuris uuritud juba pikka aega. Hiljuti õnnestus meie töögrupis valmistada efektiivsed ekspressiooniplasmiidid HPV-11 ja HPV-16 E1 ja E2 jaoks lisaks varem olemas olnud HPV-18 ja BPV-1 replikatsioonivalgude konstruktidele. Nende konstruktide abil on saanud võimalikuks uurida E1 valgu tasemest sõltuvat HPV oridelt lähtuvat amplifikatsioonilist DNA replikatsiooni erinevates rakuliinides ja analüüsida erinevuste esinemist nn kõrge riskiga (ehk halvaloomulisi kasvajaid tekitavate, näiteks HPV-16 ja HPV-18) ja madala riskiga papilloomiviiruste (HPV-11) replikatsiooniprotsessides.

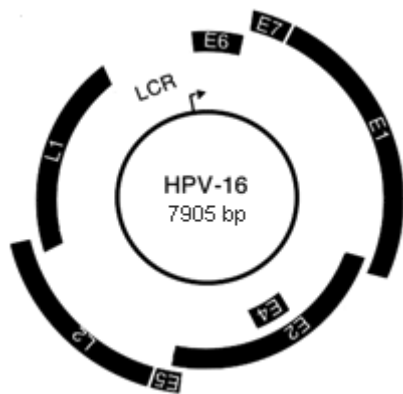
Käesoleva töö teoreetiline osa annab ülevaate papilloomiviiruste replikatsiooni-, geeniekspressiooni- ning kasvajate tekitamise mehhanismidest. Töö eksperimentaalne osas analüüsitakse erinevate papilloomiviiruste URRI järjestustelt initsieeritud replikatsiooni-produkte, mis on sünteesitud kas madala või kõrge riski HPVde replikatsioonivalke kasutades. Katsed on läbi viidud koekultuuri tingimustes HPV-18 positiivses kartsinoomirakuliinis HeLa.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis mikrobioloogia ja viroloogia õppetoolis. Olen tänulik juhendamise eest Ene ja Mart Ustavile ning kõigile teistele, kes mind töö valmimisel on aidanud.

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1. Papilloomiviiruste üldiseloostus

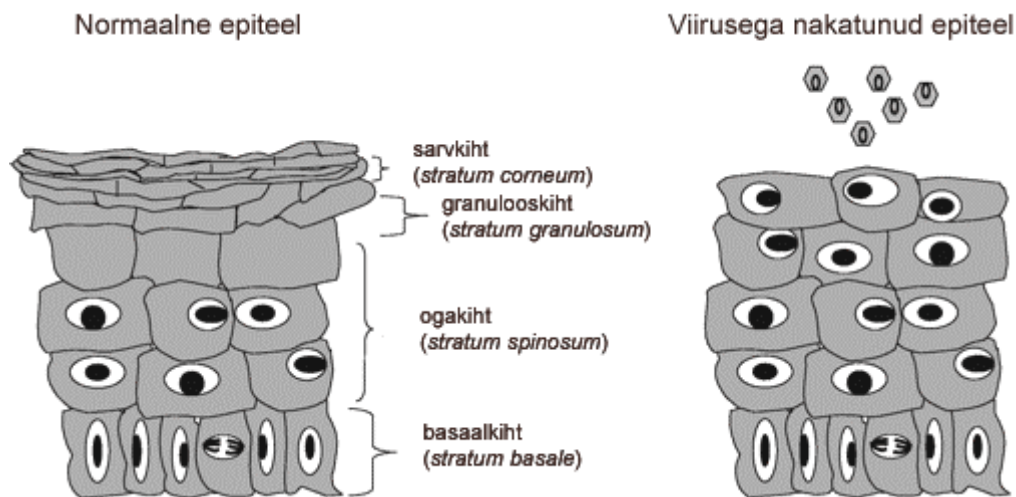
Papilloomiviirused on üsna suur klass patogeene, mis nakatavad paljude imetaja- ja linnuliikide epiteelkudesid. Looduslikes tingimustes on nakkus tugevalt liigispetsiifiline. Ühte liiki nakatavad papilloomiviirused jagatakse järjestushomoloogia alusel tüüpidesse ja subtüüpidesse. Inimese papilloomiviiruse (HPV) puhul on täielikult iseloomustatud subtüüpe teada üle 100 (zur Hausen, 2002). Papilloomiviiruste ümbriseta kapsiid sisaldab tsirkulaarset kaheahelalist genoomset DNA-d suurusega umbes 8 kb. Genoom jagatakse kolmeks piirkonnaks: varajane kodeeriv ala (*early* – E), hiline kodeeriv ala (*late* – L) ning mittekodeeriv ala (ehk *upstream regulatory region* – URR, ka *long control region* – LCR) (joonis 1). Mittekodeerivas alas asub replikatsiooni alguspunkt (*origin*), samuti nii transkriptsiooni kui replikatsiooni regulatsiooni võimaldavad järjestused. Viiruse poolt kodeeritud valkude funktsioonidest on enim teada E1 (põhiline replikatsioonivalk), E2 (osaleb nii transkriptsiooni kui replikatsiooni reguleerimisel), E6 ja E7 (onkovalgud) ning L1 ja L2 (kapsiidivalgud) kohta. Papilloomiviirused nakatavad nahavigastuse kaudu epiteeli basaalkihis olevaid jagunemisvõimelisi rakke ning viiruse elutsükli edasine kulg on tihedalt seotud epiteelkoe diferentseerumisega. Reeglina esineb viiruse genoom nakatunud rakkude tuumas episoomina. Papilloomiviirused on olnud uurijate kõrgendatud tähelepanu all eelkõige seetõttu, et nende nakkusega kaasnev onkovalkude süntees tekitab peremeesorganismis mitmesuguseid kasvajasid muutusi. Inimese genitaaltrakti nakatavatest HPV-dest tekitab osa (nn madala riskiga HPV-d) ainult healoomulisi vohandeid, samal ajal kui teiste subtüüpide (nn kõrge riskiga HPV-d) nakkus võib anda tõuke kartsinoomide välja kujunemiseks. Viimasel juhul on viiruse DNA sageli leitud ka raku kromosoomi integreerituna.



**Joonis 1.** HPV-16 genoomi ülesehitus. Märkitud on varajased (E) ja hilised (L) geenid ning mittekodeeriv ala (LCR) Nool tähistab peamise varajase promootori ( $P_{97}$ ) asukohta (Münger *et al.*, 2004).

## 2. Papilloomiviiruste elutsükkel ja DNA replikatsioon

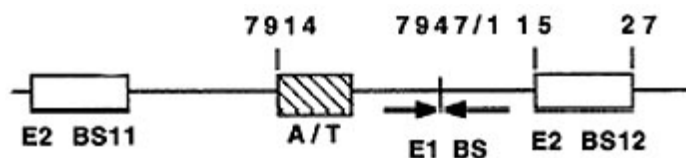
Papilloomiviiruste tavapärase elutsükli saab jagada kolme etappi, mida eristatakse viirusgenoomi replikatsioonimehhanismide järgi (Howley, 1996). Kui epiteeli basaalkihis olevat rakku nakatanud viiruse genoom jõuab raku tuuma, algab varajaste geenide ekspressioon, mis teeb võimalikuks viiruse replikatsiooni käivitumise. Esimeses etapis tõuseb viirusgenoomide arv mõnekümne (kuni -saja) episomaalse koopiani raku kohta. Mitte-produktiivse nakkuse vältimiseks (basaalsetes rakkudes papilloomiviiruste kapsiidivalke ei ekspresseerita ja virione moodustuda ei saa) toimub peagi ümberlülitus latentssesse faasi, kus viiruse genoom replitseerub samal tasemel raku kromosoomidega. Kui basaalkihis olev viirust sisaldav rakk jaguneb, lahkub üks tekkinud tütarrakkudest basaalkihist, migreerudes granulooskihi suunas ja läbib diferentseerumisprotsessi. Normaalses nakatumata epiteelis väljuvad rakud pärast basaalkihist lahkumist rakutsüklist ning selle tulemusena on suprabasaalsed rakud sageli ilma tuumata. Papilloomiviiruse genoomi sisaldavates rakkudes aga hoitakse rakutsükli käigus ka epiteeli ülemistes kihtides, selle funktsiooni eest vastutab ilmselt E7 onkovalk (Cheng *et al.*, 1995). Kui võrrelda viirusnakatunud ja normaalseid epiteele, siis papilloomiviirust sisaldavatele on iseloomulik epiteelikihtide paksenemine ja rakutuumade esinemine ülemistes kihtides (joonis 2). Kõrgelt diferentseerunud supra-basaalsetes rakkudes käivitub papilloomiviiruse elutsükli viimane faas – genoomide amplifikatsioon, hiliste geenide ekspressioon ja virionide moodustumine.



**Joonis 2.** Skeem normaalse ja papilloomiviirusega nakatunud epiteeli erinevuste kohta. Näidatud on diferentseerumisel eristatavad kihid ja virionide tekkimine (Longworth *and* Laimins, 2004).

## 2.1 Papilloomiviiruste DNA replikatsiooniks vajalikud *cis*-järjestused

Papilloomiviiruste lühiajaliseks DNA amplifikatsiooniliseks replikatsiooniks vajalikest *cis*-järjestustest (e oridest) identifitseeriti esimesena veise papilloomiviiruse tüüp 1 (BPV-1) minimaalne ori järjestus (MO) (Ustav *et al.*, 1991). MO asub URR piirkonnas ning on umbes 90 aluspaari pikk, sisaldades E1 valgu seostumiskohta (E1BSi) ning replikatsiooni alguskoha lahtikeerdumist hõlbustavat A/T-rikast ala, millega külgnevad 2 E2 valgu seostumiskohta (E2BSi) (Ustav *et al.*, 1991; Ustav *et al.*, 1993) (joonis 3). Praeguseks on kindlaks tehtud ka mitmete HPV tüüpide orid, näiteks HPV-11 (Chiang *et al.*, 1992; Del Vecchio *et al.*, 1992), HPV-18 (Remm *et al.*, 1992; Del Vecchio *et al.*, 1992), HPV-16 (Del Vecchio *et al.*, 1992) jt. HPVde DNA replikatsiooni orid sarnanevad BPV-1 MOle, sisaldades samuti seostumiskohti E1 ja E2 valkudele, kuid replikatsiooniks absoluutselt vajalike *cis*-järjestuste osas on leitud mõningaid erinevusi. On näidatud, et HPV-18 replikatsiooni orina on võimeline töötama sünteetiline oligonukleotiid, mis sisaldab vaid kahte E2BSi (Sverdrup *and* Khan, 1995). Seevastu HPV-1a replikatsiooni toimumiseks on vajalik ainult E1BS, kuid replikatsioonitase on sellisel juhul küllaltki madal. Kui süsteemis on olemas E2 valk, stimuleerib E2BSi olemasolu replikatsiooni (Gopalakrishnan *and* Khan, 1994). Hiljem on kõrgemat replikatsioonitaset näidatud ka E2BSi puudumisel, duplitseerides *origin*'is E1BSi sisaldavat järjestust (Gopalakrishnan *et al.*, 1995).



**Joonis 3.** BPV-1 replikatsiooniks vajalik minimaalne järjestus (ori). Valged ristkülikud kujutavad E2 seondumiskohti, viirutatud ristkülik A/T-rikast ala ja nooled tähistavad E1 seondumiskohta. Numbrid tähistavad positsioone BPV-1 genoomis (Ustav *et al.*, 1993).

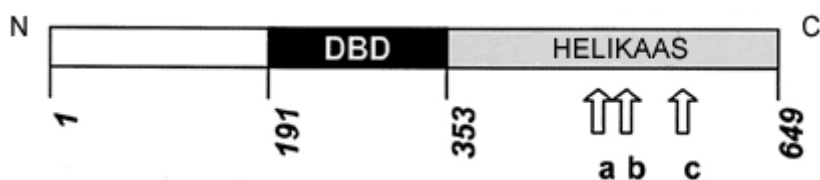
Pikemaajaliseks rakkudes püsimiseks ei ole BPV-1 MO piisav, lisaks vajatakse ka minikromosoomi säilitamiselementi (*minichromosome maintenance element* – MME), mis paikneb samuti URR piirkonnas ja koosneb mitmetest E2 valgu seostumiskohtadest, kusjuures tähtis on E2BSide arv ja nende seondumise afiinsus (Piirsoo *et al.*, 1996). HPVde puhul toimub säilimine ilmselt mõnevõrra teistsuguse mehhanismi alusel, kuna mitmete HPV tüüpide URR piirkonnas on vaid 4 E2BSi. Siiski on ka HPVde puhul näidatud, et stabiilseks replikatsiooniks on nõudmised E2BSide osas suuremad: muteerides ükshaaval nelja HPV-31 URR piirkonnas asuvat konserveerunud E2BSi, tuvastati, et ükski konkreetne E2BS polnud transientse replikatsiooni jaoks hädavajalik (kui ülejäänud 3 olid intaktsed), kuid stabiilset replikatsiooni ei toetanud neist neljast mutandist kolm (Stubenrauch *et al.*, 1998).

## 2.2 Replikatsioonivalgud E1 ja E2

BPV-1 puhul on näidatud, et nii transientseks kui stabiilseks DNA replikatsiooniks on viiruse poolt kodeeritavatest valkudest vajalikud ja piisavad E1 ja E2 (Ustav *and* Stenlund, 1991; Piirsoo *et al.*, 1996). Ka HPVde DNA transientse replikatsiooni jaoks on viiruse poolt enamasti vajalikud ja piisavad vastavad E1 ja E2 valgud (Chiang *et al.*, 1992; Del Vecchio *et al.*, 1992; Remm *et al.*, 1992; Frattini *and* Laimins, 1994). Erandina on HPV-1a puhul näidatud madalal tasemel replikatsiooni ka vaid E1 manulusel, kuid siingi stimuleerib E2 lisamine replikatsiooni tunduvalt (Gopalakrishnan *and* Khan, 1994).

Papillomiviiruste E2 on multifunktsionaalne valk, funktsioneerides nii replikatsioonivalgu kui transkriptsiooni moduleerijana (põhjalikum ülevaade E2 valgust asub peatükis 2.3 „Papillomiviiruste geeniekspressioon ja selle regulatsioon diferentseerivas epiteelis“). E1 valgul on mitu replikatsiooni initsiatsiooniks vajalikku aktiivsust, ta seondub ori järjestustega ja omab DNA-sõltuvat ATPaaset ja helikaaset aktiivsust (Hughes *and* Romanos, 1993; Seo

*et al.*,1993; Yang *et al.*, 1991). Umbes 68 kDa suuruste E1 valkude ülesehitus on papilloomiviiruste hulgas kõrgelt konserveerunud, koosnedes C-terminaalsest domäänist, mis on piisav ATPaasset ja helikaasset aktiivsust omavate E1 heksameeride moodustumiseks; DNAd siduvast domäänist (DBD) ja suuresti seni kindlaks tegemata aktiivsusega N-terminaalsest domäänist (joonis 4). On näidatud, et E1 valk üksi seondub oma AT-rikka äratundmisjärjestusega küllaltki vähespetsiifiliselt ja nõrgalt, kuid teine viiruseline valk E2 on võimeline E1 seondumist viimase seondumiskohale efektiivsemaks muutma (Mohr *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1991; Frattini and Laimins, 1994; Dixon *et al.*, 2000). Kui DNA1 esineb E2BS, stimuleerib E2 valk madalas kontsentratsioonis oleva E1 valgu orile seondumist kuni 40 korda (Seo *et al.*, 1993b). *In vitro* katsetes on leitud, et kõrgel E1 kontsentratsioonis toimub BPV-1 DNA replikatsioon ka E2 juuresolekuta (Bonne-Andrea *et al.*, 1995), kuid esineb ka küllatki palju mittespetsiifilist replikatsiooni initsiatsiooni. E2 lisamine süsteemi surub mittespetsiifilise initsiatsiooni täielikult maha (Bonne-Andrea *et al.*, 1997). BPV-1 E1 valgu puhul on selgunud, et selle DBD üksi seob DNAd spetsiifiliselt, kuid täispika E1 valgu koosseisus on see aktiivsus maskeeritud helikaasses domäänis asuva mittespetsiifilise DNAGA seondumise aktiivsuse poolt (Stenlund, 2003).



**Joonis 4.** Skeem E1 valgu ülesehitusest 649-aminohappejäägilise HPV-11 E1 näitel. Näidatud on helikaasse domääni (aminohapped 353-649) ja DNAd siduva domääni (DBD, aminohapped 191-353) asukohad. Helikaasses domäänis on tähistatud ka 3 ATPd siduvat motiivi (a, b, c) (Titolo *et al.*, 2003).

DNA replikatsiooni initsiatsioonis vajalikke aktiivsusi saab E1 valk läbi viima hakata siis, kui orile on moodustunud heksameerne E1 kompleks (Sedman and Stenlund, 1998). Kuna papilloomiviiruste genoom ise on väike, kasutavad nad ära paljusid peremeesraku replikatsiooni masinavärgi komponente. *In vitro* süsteemis on näidatud, et papilloomiviiruste DNA replikatsiooni on võimalik läbi viia puhastatud valkude ning rakkudest pärinevat osaliselt puhastatud ekstraktide kombinatsiooni kasutades (Melendy *et al.*, 1995). Vajalikest rakulistest faktoritest suudeti identifitseerida replikatsioonivalk A (RPA), replikatsioonifaktor

C, jagunevate rakkude tuuma antigeen (PCNA), DNA polümeraas  $\alpha$ -primaas ja DNA polümeraas  $\delta$ . E1 valgud aitavad rakulisi replikatsioonikomplekse PV oridele kohale tuua, seondudes näiteks DNA polümeraas  $\alpha$ -primaasiga (Park *et al.*, 1994; Masterson *et al.*, 1998) ja RPA-ga (Han *et al.*, 1999). HPV E1 seondumine SWI/SNF kompleksi kuuluva hSNF5-ga (Lee *et al.*, 1999) ja histoon H1-ga (Swindle and Engler, 1998) on viinud hüpoteesile, et E1 võib osaleda ka kromatiini remodelleerivate komplekside kohaletoomises ja muuta seeläbi nukleosoomide paiknemist replikatsioonikahvli piisava protsessiivsuse tagamiseks. Lisaks on kindlaks tehtud, et tsükliin E/CDK (CDK- tsükliin-sõltuv kinaas) võib seonduda HPV-11 E1ga ja seda fosforüleerida (Ma *et al.*, 1999). Sellise protsessingu eesmärk näib olevat E1 N-terminuses asuva potentsiaalse tuumaekspordi signaali maskeerimine, et tagada E1 paiknemine eelistatult tuumas (Deng *et al.*, 2004). Selline fosforüleerimine annab E1 valgule võimaluse käituda erinevalt rakulistest initsiatsioonifaktoritest, mis pärast ühekordset replikatsiooni toimumist fosforüleeritud kujul tuumast välja viiakse. Analoogne modifikatsioon viiruse E1-l aga hoiab seda tuumas niikaua, kuni sobivaid CDKsid leidub ja võimaldab replitseerida oma genoomi mitmeid kordi.

### **2.3 Papilloomiviiruste geeniekspressioon ja selle regulatsioon diferentseeruvas epiteelis**

Papilloomiviiruste elutsükli uurimist *in vitro* tingimustes takistas varem asjaolu, et viiruse elutsükli hilisemate faaside uuringuks oli vaja keratinotsüütide diferentseerumise toimumist. Praeguseks on välja töötatud kolm erinevat süsteemi, mis võimaldavad diferentseerumisest sõltuvaid viiruse aktiivsusi uurida – organotüüpsed ehk nn parvkultuurid (*raft cultures*), rakkude suspendeerimine ja kasvatamine metüülselluloosis ja kõrge kaltsiumisisaldusega söötmete kasutamine. Neist esimene meetod sarnaneb kõige enam keratinotsüütide diferentseerumisele epiteelis, kuid on võrreldes metüülselluloosi meetodiga ebamugavam kasutada, kuna nõuab enam aega – hiliste papilloomiviiruste mRNAde ekspressioon toimub vastavalt 12 päeva (Ozbun and Meyers, 1997) või 1 päev (Ruesch *et al.*, 1998) pärast diferentseerumise indutseerimist.

Papilloomiviiruste geenide transkriptsioon on küllaltki keerukas protsess, kuna kasutatakse mitmeid promootoreid ja paljusid erinevaid splaissingukohti. Transkriptsiooni regulatsiooni suunavas URR piirkonnas on kindlaks tehtud hulgaliselt seondumiskohti nii viiruselistele kui peremeesraku transkriptsioonifaktoritele (joonis 6). HPV-31 URR piirkonnas eristatakse 5

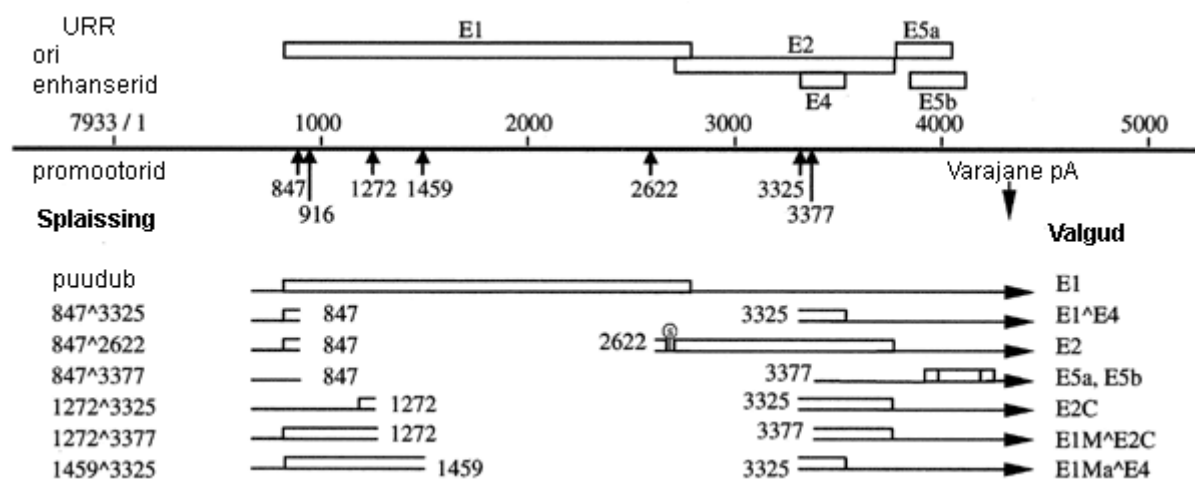
Viiruse valkudest on E2 geeni produktid kõige olulisemad transkriptsiooni moduleerijad. Juba 1985. aastal näidati, et BPV-1 E2 valk toimib transkriptsiooni aktivaatorina (Spalholz *et al.*, 1985), täites seda funktsiooni viiruse genoomis esinevate E2-sõltuvate elementide kaudu (Spalholz *et al.*, 1987). Papilloomiviiruste täispikk E2 valk (E2TA) koosneb kolmest osast, milleks on N-terminaalne transaktivatsioonidomään, C-terminaalne dimeriseerumise- ja DNAle seondumise domään ning neid kahte eraldav nn hingeregioon. Lühematel E2 geeni produktidel (E2TR ehk E2C ja E8/E2 ehk E8E2C) puudub N-terminaalne transaktivatsioonidomään ning nad toimivad transkriptsiooni repressoritena (Lambert *et al.*,

1987; Choe *et al.*, 1989; Stubenrauch *et al.*, 2001), konkureerides seondumiskohtade pärast täispika E2 valguga (Chin *et al.*, 1988) või moodustades inaktiivseid heterodimeere E2TAga (McBride *et al.*, 1989).

E2 mõju transkriptsioonile on palju uuritud ka HPVdel. On näidatud, et erinevalt BPV-1st toimib genitaalsetel HPVdel onkovalkude sünteesi juhtiva promootori repressioon lisaks E2C-le ka E2TA mõjul (Cripe *et al.*, 1987, Garcia-Carranca *et al.*, 1988, Romanczuk *et al.*, 1990). Genitaalsete HPVde URR piirkonnas asub 4 E2BSi, mille positsioonid on tugevalt konserveerunud. Analüüsides HPV-16, HPV-18 ja HPV-11 E6(/E7) promootorite maha surumist E2TA poolt, näidati, et selles osalevad promootorite lähedal asuvad E2 seostumiskohad (Romanczuk *et al.*, 1990; Thierry and Howley, 1991; Dong *et al.*, 1994). Kui E2 seostumiskohad asuvad väga lähedal promootori TATA järjestusele, häirib E2 seondumine nendele transkriptsiooni preinitsiatsioonikompleksi teket ja tõrjub kõrvale rakulisi transkriptsioonifaktoreid, näiteks Sp1 (Tan *et al.*, 1992, Dong *et al.*, 1994, Stubenrauch *et al.*, 1996). Kõigil nahapapilloome tekitavatel HPVdel toimib E2TA transaktivaatorina, kuna E2BSid paiknevad E6 promootori TATA elemendist vähemalt 100 aluspaari kaugusel (Guido *et al.*, 1992). Lisaks transkriptsiooni represseerivale toimele on genitaalsetel HPVde E2 valkudel leitud ka aktiveerivat toimet (Ushikai *et al.*, 1994). On näidatud, et HPV-18 P<sub>105</sub> promootori reguleerimine sõltub E2 valgu kontsentratsioonist: madalatel kontsentratsioonidel toimub transkriptsiooni aktiveerimine, kõrgetel aga repressioon. HPV-18 E2 seondumiskohtade afiinsuse analüüsimine näitas, et kõige suurema afiinsusega on distaalne E2BS, mis asub promootorist 500 aluspaari „ülesvoolu“, promootorile lähim E2BS aga sidus E2 kõige nõrgemini (Steger and Corbach, 1997). Seega toimub madalal E2 kontsentratsioonil seondumine vaid distaalsesse seondumiskohta ning promootor aktiveeritakse, kõrgel kontsentratsioonil hõivatakse lisaks ka repressiooni vahendavad proksimaalsed seondumiskohad. Sarnast E2 kontsentratsioonist sõltuvat transkriptsiooni aktivatsiooni või repressiooni on näidatud ka *epidermodysplasia verruciformis*'ega seotud HPV-8 puhul (Stubenrauch and Pfister, 1994).

HPVde varajane promootor paikneb E6 geeni ees ning sellelt toimub kõigi viiruse esimestes elutsükli faasides vajalike valkude (E6, E7, E1, E2) ekspressioon. Onkovalke kodeerivate E6 ja E7 geenide avaldumise uurimisel on leitud, et „madala riskiga“ ja „kõrge riskiga“ HPVdel toimub E6 ja E7 geenide ekspressioon erineva mehhanismi alusel (Smotkin *et al.*, 1989; Barbosa *et al.*, 1991). „Kõrge riskiga“ HPVdel juhib nii E6 kui E7 mRNA sünteesi üks

promootor, mida tähistatakse P<sub>97</sub> (HPV-16 ja HPV-31) või P<sub>105</sub> (HPV-18). Seevastu „madala riskiga“ HPVdel (HPV-6 ja HPV-11) ekspresseeritakse E6 ja E7 geenid kahelt erinevalt promootorilt, mida reguleeritakse üksteisest sõltumatult (DiLorenzo *and* Steinberg, 1995; Rapp *et al.*, 1997). Ilmselt toimub mitmete viirusvalkude süntees polütsistronselt mRNAlt, näiteks HPV-18 puhul on näidatud, et E1 ekspresseeritakse E1, E6 ja E7 sisaldavalt mRNAlt (Remm *et al.*, 1999). Selline keerukas ekspressioonisüsteem võimaldab viirusel ilmselt toota sama promootori alt varajases elutsükli faasis suures hulgas onkovalke E6 ja E7, samal ajal vältides enneaegset viirusgenoomide amplifikatsiooni, mis käivituks suure hulga E1 valgu olemasolu korral. HPVga nakatunud rakkude testimisel on täispika E1 valgu tase olnud üldjuhul madal, mis viitab samuti selle valgu sünteesi kontrollivate mehhanismide olemasolule viiruse elutsükli. Ka E1 valku kõrgel tasemel ekspresseerivate plasmiidide konstrueerimine on osutunud keerukaks, kuid üheks tulemusi andnud meetodiks HPV-18 ja HPV-11 puhul on E1 järjestuses esinevate splaissingukohtade muteerimine (Remm *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2003). Kui splaissingukohtades muutusi mitte teha, sisaldab enamik tekkinud mRNAdest E1-E4-le vastavat järjestust, kuna mRNAde protsessimisel kasutatakse tugevat splaissingu doonorkohta, mis HPV-11 genoomis asub positsioonis 847 (joonis 7).



**Joonis 7.** HPV-11 varajased lugemisraamid E1 kuni E5b ja nende poolt kodeeritud valgud. Vertikaalsete nooltega on tähistatud splaissingu doonor- (positsioonides 847, 916, 1272, 1459) ja aktseptorkohad (2622, 3325, 3377), lisaks on ära märgitud varajane polüadenülatsoonijärjestus (Varajane pA). Varajaselt promootorilt ekspresseeruvatest E1 sisaldavatest mRNAdest tekkivad splaissinguvariandid on esitatud vasakus tulpas ja neile vastavad valgude nimetused paremas tulpas (Deng *et al.*, 2003).

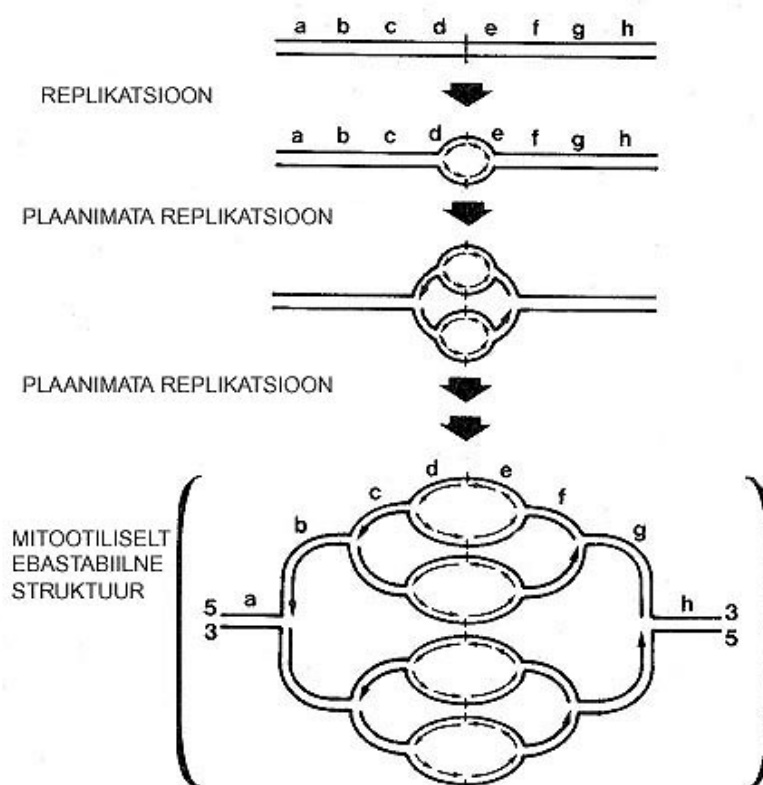
Diferentseerumise käigus muutuvat alternatiivset splaissingut on papilloomiviiruste geeniekspressiooni regulatsioonil kirjeldatud ka varem (Barksdale *and* Baker, 1995), seega võib oletada, et ka E1 tase võiks olla samase kontrolli all, võimaldades hoida viiruse varajastes elutsükli faasides selle põhilise replikatsioonivalgu taseme madalal, kuid vastata samas suurenenud replikatsioonivalkude vajadusele hilisemas amplifikatsioonifaasis.

Lisaks alternatiivse splaissingu ja polüadenülatsiooni kasutamisele (McPhillips *et al.*, 2004) valgusünteesi regulatsioonil on näidatud, et HPVde geeniekspressioonil kasutatakse osa promootoritest konstitutiivselt, osa aga indutseeritakse diferentseerumisest sõltuvalt (Hummel *et al.*, 1992; Ozbun *and* Meyers, 1998b). E7 lugemisraamis asuv ja diferentseerumisel indutseeritav promootor on leitud näiteks HPV-31-l (tähistatakse P<sub>742</sub>) (Hummel *et al.*, 1992) ja HPV-16-l (tähistatakse P<sub>670</sub>) (Grassmann *et al.*, 1996). See promootor juhib E1 ja sellele järgnevate viirusgeenide ekspressiooni. Diferentseerumisega kaasnev hiliselt promootorilt lähtuv transkriptide taseme tõus saab põhimõtteliselt tekkida kolme mehhanismi abil: esiteks, replikatsioonipõhiselt – transkribeeritavaid järjestusi tekib juurde; teiseks, muutuvad transkriptsiooni regulatsioonis osalevad DNAGA seonduvad faktorid ja transkriptsiooni tase tõuseb; kolmandaks, suureneb transkriptide stabiilsus. Kahe uurimisgrupi poolt hiljuti avaldatud tulemused viitavad sellele, et vähemasti ainult DNA amplifikatsiooniefektiga diferentseerunud rakkudes esinevat HPV-31 P<sub>742</sub> promootorilt lähtuvate transkriptide hulga suurenemist seletada ei saa, kuna keemiliste mõjurite abil õnnestus DNA amplifikatsioon spetsiifiliselt alla suruda, kuid hiliste transkriptide tase tõusis sellegipoolest märgatavalt (Bodily *and* Meyers, 2005; Spink *and* Laimins, 2005). 1995. aastal leiti, et HPV-6 URR 5' otsas asuv järjestus funktsioneerib transkriptsiooni negatiivse regulaatorina (Farr *et al.*, 1995), hiljem identifitseeriti selle koosseisus seondumiskoht CCAAT tõrjuvale valgule ehk CDPle (*CCAAT displacement protein* – CDP). Selle faktori juures on huvitav asjaolu, et CDP ekspresseerub kõrgel tasemel diferentseerumata kartinotsüütides, kuid rakkude diferentseerumise käigus langeb valgus aktiivsuse tase oluliselt (Pattison *et al.*, 1997). Edasiste uuringute käigus leiti CDP seostumiskohti ka teises URR piirkonnas, nimelt ori järjestuste lähedal, kus ta vahendab kolme HPV-6 promootori (vastavalt E6, E7 ja E1 ees) mahasurumist (Ai *et al.*, 1999). Lisaks HPV-6le on nüüdseks CDP seondumine URRiga dokumenteeritud ka HPV-16, HPV-31, HPV-33, HPV-18, HPV-45, HPV-11 ja HPV-2 puhul ning näidatud CDP negatiivset efekti HPV-16 ja HPV-31 URRi sisaldavate plasmiidide transientsel replikatsioonile *in vivo* (O'Connor *et al.*, 2000). Kuna CDP seostumiskohad kattuvad HPV-16

URRis replikatsioonivalgu E1 omaga (joonis 6), võib CDP olemasolu lisaks transkriptsiooni represseerimisele segada otseselt ka replikatsiooni toimumist. Nende andmete põhjal võib arvata, et CDP ja tema seostumiskohtade süsteem on üks võimalus, kuidas papilloomiviiruste transkriptsiooni ja replikatsiooni regulatsioon on võimalik siduda peremeesraku diferentseerumisega. Teise HPV-6 (aga mitte HPV-31) E1 ekspressiooni eest vastutavat promootorit negatiivselt reguleeriva transkriptsioonifaktori – Yin Yang 1 (YY1) – funktsioneerimine leiti sarnaselt CDPga vaid diferentseerumata keratinotsüütides (Ai *et al.*, 2000). DNAasi tundlike piirkondade muutumine HPV-31 URRis diferentseerumise käigus on andnud aluse hüpoteesile, et hiliste transkriptide sünteesi toimumiseks võib olla vajalik ka kromatiini remodelleerimine, võimaldades sel viisil muuta kättesaadavaks transkriptsioonifaktorite seondumiskohad hilise transkriptsiooni initsiatsioonikoha läheduses (del Mar Pena *and* Laimins, 2001).

Millistest faktoritest ümberlülitus ühest replikatsioonifaasist teise täpselt sõltub, ei ole teada. HPV-31 puhul on vegetatiivsele replikatsioonile üleminekuks olulisena välja pakutud muutust E1 valgu kontsentratsioonis. Nimelt tuvastati katsetes parvkuultuuridega, et samal ajal kui E2 mRNA tase püsis viiruse elutsükli vältel küllaltki konstantsena, tõusis E1 mRNA tase vegetatiivse replikatsiooni etapis tunduvalt (Ozbun *and* Meyers, 1998a). Suurenenud HPV-31 E1 mRNAde süntees diferentseerunud rakkudes on kindlaks tehtud algavat just diferentseerumisest sõltuvalt E7 lugemisraamis paiknevalt P<sub>742</sub> promootorilt (Klumpp *and* Laimins, 1999). Replikatsioonimehhanismi vahetuses võiks ilmselt lisaks E1 ja E2 valkude hulgale rolli mängida ka nende tasemete omavaheline suhe. HPV-31 E1 ja E2 ekspressioon tunduvad olevat nende valkude endi tasemete poolt autoreguleeritud, kuid samas üksteisest erinevalt – E1 aktiveeris nii enda kui E2 ekspressiooni, samal ajal kui E2 enda ekspressiooni ei mõjutanud, kuid E1 omale mõjus madalates kontsentratsioonides aktiveerivalt, aga kõrgetes maha suruvalt (Hubert *and* Laimins, 2002). Selle artikli autorid pakuvad välja E1/E2 sõltuva ümberlülituste mehhanismi: pärast nakkust on esialgu E1 ja E2 valke madalal tasemel ja toimub mõlema geeni aktivatsioon, mis võimaldab toimuda algsel amplifikatsioonil. E2 kogunemine süsteemi hakkab aga seejärel E1 sünteesi alla suruma ja toimub üleminek latentsesse replikatsioonifaasi. Vegetatiivse amplifikatsiooni faasi üleminekuks aktiveeritakse E1 sünteesiks lisapromootor – diferentseerumisest sõltuv ja E2st sõltumatu (P<sub>742</sub> HPV-31 puhul), mis võimaldab uuesti saada suuri E1 koguseid.

Selleks, et viiruse viimases elutükli faasis saaks väga suurtes kogustes DNAd sünteesida, on välja pakutud ka mudel, et viirusgenoomi vegetatiivsel amplifikatsioonil toimub ümberlülitus bidireksionaalselt replikatsioonilt „veereva ratta“ tüüpi mehhanismile (Flores *and* Lambert, 1997). Monokihina kasvava rakukultuuri tingimustes on BPV-1 URRi sisaldavate plasmiidide replikatsiooni CHO rakuliinis uurides avastatud lisaks veel üks eriline replikatsioonimehhanism, mis käivitub sel juhul, kui BPV-1 URRi ning E1 ja E2 sisaldavas süsteemis esineb E1 valku kõrgel tasemel (Männik *et al.*, 2002). Arvatakse, et kui koos URR-plasmiidiga transfekteerida rakkudesse suures koguses viiruse E1 ekspresseerivat konstrukti, muutub BPV-1 orilt replikatsiooni initsieerimine vähem kontrollituks – lõpuni sünteesitud täispika reporterplasmiidi signaalile vastavaid molekule tekib vähe, samal ajal kui enamiku tugevast kogusignaalist moodustab üle foreesiraja ulatuv smäär. BPV-1 URRi sisaldava plasmidi replikatsiooniproduktide analüüs erinevaid restriksiooniensüüme, CsCl gradiendis ultratsentrifuugimist ja nii ühe- kui kahedimensionaalset geelektroforeesi kasutades näitas, et URR piirkond on võrreldes teiste plasmidi osadega märgatavalt amplifitseeritud ning esineb väga erineva suurusega lineaarsete ja tsirkulaarsete DNA molekulide koosseisus (Männik *et al.*, 2002). Sellise replikatsiooni toimumise aluseks on välja pakutud nn „onion-skin“-tüüpi amplifikatsiooni mudelit (joonis 8), mida iseloomustab replikatsiooni initsiatsiooni- ja elongatsiooniprotsesside koordineerimatu toimumine – uued initsiatsioonikompleksid formeeritakse ori järjestusele enne, kui eelnevad samal molekulil liikuvad replikatsioonikahvlid on sünteesi lõpetanud. Mitu üksteisele järgnevalt erineva kiirusega liikuvat replikatsioonikompleksi võivad üksteise tööd segama hakata ning enne ahelate sünteesi lõpule viimist laguneda, andes aluse erineva suurusega ori-sisaldavate fragmentide tekkeks. Katsetes BPV-1 URR plasmiididega detekteeritud algplasmiidist suuremate ori sisaldavate replikatsiooniproduktide genereerimine toimub ilmselt mingite rekombinatsiooniprotsesside kaudu (Männik *et al.*, 2002). Sellise amplifikatsioonimehhanismi kasutamist viiruste poolt on varem kirjeldatud näiteks integreerunud SV40 genoomide puhul (Botchan *et al.*, 1979).



**Joonis 8.** „Onion-skin“-tüüpi amplifikatsiooni mudel. Replikatsiooni alguskohast initsieeritakse DNA sünteesi korduvalt uuesti, kuigi eelnevalt moodustunud replikatsioonikahvlid pole veel elongatsiooni lõpetanud. Replikatsioonikompleksid hakkavad ilmselt üksteise tööd segama ning osa neist laguneb, tekitades erineva pikkusegaprodukte. (Stark and Wahl, 1984).

## 2.4 Papilloomiviiruste genoomi stabiilne episomaalne säilimine rakkudes

Papilloomiviiruste genoomi stabiilseks püsimiseks rakkudes pikema aja vältel vajavad nad mehhanismi, mis võimaldaks neil pärast peremeesraku jagunemist edukalt järglasrakkudesse sattuda. BPV-1 genoom seondub peremeesraku mitoetilistele kromosoomidele ja kandub sel viisil tütar-rakkudesse (Skiadopoulos and McBride, 1998; Lehman and Botchan, 1998). Selle protsessi vahendajaks on E2 valk, mis seondub ühelt poolt URR piirkonnas asuvatele E2 seostumiskohtadele ja teiselt poolt peremeesraku kromosoomidele (Ilves *et al.*, 1999). Rakulistest valkudest näib üheks E2 partneriks selles protsessis olevat Brd4 (You *et al.*, 2004). HPV-de stabiilne episomaalne püsimine toimub ilmselt veidi teistsuguse mehhanismi alusel, kuna HPVde URR sisaldab E2BSe vähem, kui on minimaalselt vajalik BPV-1 MME funktsiooniks. Hiljuti avaldatud andmed näitavad, et ka HPV genoomid käituvad mitoosis E2 vahendusel minikromosoomidena, kuid erinevalt BPV-1st ei ole tegemist mitte seondumisega

kromosoomidele, vaid pigem mitoosikäävi struktuuridele (Van Tine *et al.*, 2004). Lisaks E1 ja E2 valkudele on säilimiseks vajalikena välja pakutud mitmesuguseid faktoreid. Näiteks HPV-31 puhul näidati, et mutandid, millel oli rikutud splaissingu aktseptorkoht positsioonis 3295, replitseerusid transientselt, kuid ei säilinud episoomina stabiilse replikatsiooni katsetes – toimus integreerumine peremeesraku kromosoomi (Klumpp *et al.*, 1997). Seda splaissingukohta kasutatakse muuhulgas ka E8E2C valgu sünteesil. Kuigi E8 geeni rikkumine tõstab HPV-31 transientsse replikatsiooni taset, kaob samas viirusgenoomide võime rakkudes episomaalselt püsima jääda (Stubenrauch *et al.*, 2000).

Viimasel ajal on saadud mitmeid tõendeid, et onkovalkude E6 ja E7 mõju papilloomiviiruste elutsüklile on mitmekesisem, kui lihtsalt nakatunud rakkude eluea pikendamine. HPV-31 E6 ja E7 lugemisraamidesse viidi sisse mitmeid mutatsioone ning näidati, et mutandid replitseerusid küll transientselt, kuid mitte stabiilselt (Thomas *et al.*, 1999). HPV-16 E6 mutantide replikatsiooni analüüsides leiti, et 4 mutanti, mis ei suutnud stimuleerida p53 lagundamist, ei toetanud ka viirusgenoomi stabiilset püsimist (Park *and* Androphy, 2002). Katsed parvkuultuuridega on näidanud, et HPV-16 E7 on vajalik viiruse produktiivses elutsüklis – vastasel juhul ei toimu diferentseerunud epiteelirakkudes DNA amplifikatsiooni ja piisavat L1 valgu sünteesi, mistõttu virionide moodustumine on häiritud (Flores *et al.*, 2000). Lisaks eelpool kirjeldatud katsetele kõrgesse riskigruppi kuuluvate HPVdega on hiljuti näidatud, et ka HPV-11 episomaalseks säilimiseks on E6 ja E7 valkude intaktsus hädavajalik (Oh *et al.*, 2004).

### **3. Papilloomiviirused ja kasvaja**

Kuna papilloomiviiruste produktiivseks nakkuseks on vajalik peremeesraku replikatsiooni masinavärk, vajavad viirused mehhanismi, mis tagaks nakatunud epiteelirakkude jätkuva jagunemisvõime. Juba 1970. aastate lõpus näidati, et BPV-1 on võimeline transformeerima hiire rakke, muutes nende morfoloogiat ning põhjustades kinnitumisvajaduse ja kontaktinhibitsiooni kadu (Dvoretzky *et al.*, 1980). BPV-1 genoomi integreerumine ei ole transformeerunud fenotüübi tekkeks ega säilitamiseks vajalik (Law *et al.*, 1981). BPV-1 poolt läbiviidavas transformatsioonis osalevad kolm viiruse valku: E5 (Groff *and* Lancaster, 1986; Schiller *et al.*, 1986; DiMaio *et al.*, 1986), E6 ja E7 (Neary *and* DiMaio, 1989).

Inimese papilloomiviirused jagatakse „kõrge riskiga“ ja „madala riskiga“ tüüpideks vastavalt sellele, kas nendega seostatakse pahaloomuliste kasvajate teket või mitte. „Madala riskiga“ HPVd (HPV-6, HPV-11, HPV-42, HPV-43, HPV-44) (Lorincz *et al.*, 1992) tekitavad healoomulisi kondüloome genitaalidel ning papilloome neelupiirkonnas. „Kõrge riskiga“ HPVd (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58) (Lorincz *et al.*, 1992) on seotud suure enamikuga (üle 90%) emakakaela kartsinoomidest ning samuti suu- ja neelupiirkonna kasvajatega. Lisaks on näidatud, et teised HPV tüübid on seotud nahavähiga, eriti *epidermodysplasia verruciformis* 'e (HPV-5 ja HPV-8) ja mitte-melanoomi tüüpi nahavähiga (ülevaated: Harwood and Proby, 2002; Münger, 2002). „Kõrge riskiga“ HPVde puhul on näidatud nende võimet transformeerida koekultuuris näriliste ja inimese rakke (Yasumoto *et al.*, 1986; Durst *et al.* 1987; Pirisi *et al.*, 1987), selle funktsiooni eest vastutavad E6 ja E7 valgud (Bedell *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1989; Münger *et al.*, 1989; Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Hudson *et al.*, 1990). Seevastu „madala riskiga“ HPV tüüpide transformeerimis- ja immortaliseerimisvõime on oluliselt nõrgem (Storey *et al.*, 1988; Pecoraro 1989; Woodworth *et al.*, 1989; Halbert *et al.*, 1991), kuid ka HPV-11 genoomi sisaldavate keratinotsüütide eluiga pikeneb vähemalt kaks korda (Thomas *et al.*, 2001).

HPVde DNAd on leitud valdavast enamikust muutunud rakkudega piirkondadest (*lesion*) inimese genitaaltraktis. Epidemioloogilistele uuringutele toetudes on näidatud, et HPV nakkus tõepoolest põhjustab pahaloomulise emakakaelakartsinoomi tekkimist – 99,7% invasiivsetest vähkidest (uuriti üle 1000 juhu) olid HPV-positiivsed (Munoz, 2000). Samas areneb vähk vaid suhteliselt väikesel osal HPV nakkusega inimestest, enamik tekkinud tsütoloogilisi muutusi taandub iseeneslikult. Esmase nakatumise ja kasvaja ilmnemise vahel esineb sageli pikk latentsusperiood, mis annab alust arvata, et kasvaja tekkes on olulised ka lisafaktorid. Välja pakutakse näiteks järgmisi: seksuaalharidus ja -käitumine (Kohler and Wuttke, 1994; Shepherd *et al.*, 2000), immuunsüsteemi seisund, geneetiline eelsoodumus, toitumisharjumused, sotsiaal-majanduslik olukord (Mougin *et al.*, 2001), suitsetamine (Zivaljevic *et al.*, 2001; Castle *et al.*, 2002), pikaaegne suukaudsete rasestumisvastaste vahendite kasutamine (Lindstrom *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2002), raseduste arv (Bayo *et al.*, 2002; Munoz *et al.*, 2002).

### 3.1 HPVde onkovalgud

Et aru saada, kuidas HPVde onkovalgud kasvajate tekkes osalevad, on püütud välja selgitada rakulised valgud, mida E6 ja E7 mõjutavad. HPVde E7 valk on võimeline seonduma tuumorsupressorvalguga Rb (Dyson *et al.*, 1989), samuti pRb perekonna teiste valkudega, p107 ja p130-ga. pRb perekonna valgud seonduvad E2F perekonna valkudega ja reguleerivad viimaste aktiivsust (Dyson, 1998; Nevins, 1998). Ilma HPV E7 juuresolekuta represseerivad Rb-E2F kompleksid E2F valkude seostumiskohti sisaldavaid promootoreid. Paljud selliselt mahasurutud geenid kodeerivad faktoreid, mis on vajalikud üleminekuks G<sub>0</sub> või G<sub>1</sub> faasist S-faasi (DeGregori *et al.*, 1995). HPV E7 suudab Rb-E2F valkude kompleksid lõhkuda (Chellappan *et al.*, 1992), mis viib kontrollimatule rakkude kasvule (Nevins, 1992). Peremeesraku normaalne vastus valel ajal indutseeritud jagunemisele oleks kasvu peatamine (*growth arrest*) ja/või apoptoos. Nende viirusele ebasoodsate protsesside vältimises osaleb teine onkovalk - E6, seondudes paljude rakuliste valkudega, mis selliseid kaitseprotsesse juhivad. HPV E6 rakulistest märklaudadest on tähtsaim tuumorsupressorvalk p53. p53 on võimeline aktiveerima p21 geeni, mille produkt toimib tsükliin-sõltuvate kinaaside inhibiitorina ja peatab rakutsükli (el-Deiry *et al.*, 1993, Harper *et al.*, 1993) „Kõrge riskiga“ HPVde E6 suunab p53 ubikvitinüleerimisele, millele järgneb p53 lagundamine proteosoomirajas (Scheffner *et al.*, 1990). On näidatud, et E6 seondub ubikvitiinligaasi E6AP-ga ning E6-E6AP kompleks seejärel p53-ga (Huibregtse *et al.*, 1993). Suunates stressi tingimustes p53 lagundamisele ja takistades apoptoosi, soodustab E6 mutatsioonide kogunemist rakkudesse, mis omakorda võib viia pahaloomuliste kasvajate tekkele. „Madala riskiga“ HPVde E6 valkude võime p53 degradeerimisele suunata on oluliselt nõrgem (Storey *et al.*, 1998). E6 suudab rakkude vananemist ja surma takistada ka p53-st sõltumatult. HPV-16 puhul on näidatud, et vastav E6 valk suudab takistada telomeeride lühenemist, aktiveerides telomeraasi geeni transkriptsiooni (Klingelhutz *et al.*, 1996; Veldman *et al.*, 2001). Lisaks on invasiivsete ja metastaatiliste kasvajate tekkes ilmselt oluline E6 võime lõhkuda rakkudevahelisi kontakte ja kaotada rakkude polaarsus, takistades keratinotsüütide normaalset küpsemist. Nimelt seondub „kõrge riskiga“ HPVde E6 konserveenud C-terminaalse domääni abil PDZ-motiivi sisaldavate valkudega, näiteks valguga hDlg (Kiyono *et al.*, 1997, Lee *et al.*, 1997), mis seejärel lagundatakse (Gardioli *et al.*, 1999, Mantovani *et al.*, 2001). hDlg paikneb epiteelirakkude liitekohtades ning interakteerub paljude teiste valkudega (Ide *et al.*, 1999).

### 3.2 HPVde DNA füüsiline staatus kasvajakudedes

Küllaltki palju on uuritud HPVde DNA füüsilist staatust kasvajakudedes. Pahaloomulistest kasvajatest eraldatud materjalis ja sellest saadud rakuliinides leitakse viiruse DNA peamiselt integreerituna, kusjuures tavaliselt on osa genoomist kaduma läinud. Alles jäävad terviklikena URR piirkond, onkovalkude E6 ja E7 (vahel lisaks ka E1 ja L1) lugemisraamid (Shirasawa *et al.*, 1987, Chen *et al.*, 1994). Seevastu E2 lugemisraam reeglina lõhutakse (Choo *et al.*, 1987; Daniel *et al.*, 1997), suurendades oluliselt E6 ja E7 ekspressiooni, kuna viiruse normaalses elutsüklis vastavat promootorit negatiivselt kontrollivat E2 valku ei sünteesita. Samuti on tuvastatud, et E6 ja E7 geenid püsivad muutumatutena ja ekspresseeruvad (el Awady *et al.*, 1987; Baker *et al.*, 1987; Takebe *et al.*, 1987), seevastu kui teistes integreerunud järjestustes esineb mitmeid mutatsioone (Cone *et al.*, 1992). HPVde integreerumine on lokaliseeritud peremeesraku kromosoomide erinevatesse piirkondadesse (Kalantari *et al.*, 2001; Brink *et al.*, 2002) ning arvatakse toimuvat mittehomooloogse rekombinatsiooni teel (Einstein *et al.*, 2002). Integreerumiskohtadel on siiski leitud mõningane sarnasus – nimelt sisaldavad need aktiivselt transkribeeritavaid geene. Sellised piirkonnad on ilmselt võõr-DNA integratsioonile vastuvõtlikumad vähese kondenseerumisastme tõttu (Choo *et al.*, 1996; Klimov *et al.*, 2002). Tõenäolisemate integratsioonikohtadena on välja pakutud ka kromosoomides esinevaid fragiilsaite (Smith *et al.*, 1992; Wilke *et al.*, 1996; Thorland *et al.*, 2000).

Vähieelsetes seisundites (SIL – intraepiteelsete muutustega alad sarvepiteelis ehk CIN – emakakaela intraepiteelsed neoplaasiad) eristatakse 2 või 3 staadiumit (SIL I-II või CIN I-III). 5910 HPV-positiivse SILI juhu uurimine on näidanud, et kõige sagedasemad HPV tüübid neis on HPV16 (26.3%), HPV31 (11.5%), HPV51 (10.6%) ja HPV53 (10.2%) (Clifford *et al.*, 2005), samal ajal kui levinuimad tüübid kartsinoomides on HPV-16 ja HPV-18 (koos üle 65%), esinedes kas eraldi või ka koos (Bosch *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1997; Badaracco *et al.* 2002; Munoz, 2002). Seega võib öelda, et osa HPV tüüpide puhul on risk kasvajakas progresseeruda suurem. HPV-16 puhul on leitud korrelatsioon neoplaasia staadiumi ja viiruse DNA esinemise suhtes – erinevates uuringutes leiti HPV-16 DNAd vastavalt 23%-il või 12%-il madalama astme neoplaasiatest ja 55%-il või 70%-il kõrgema astme neoplaasiatest (Shirasawa *et al.*, 1986; Giannoudis *et al.*, 2001), rõhutades papilloomiviiruste osa muutunud morfoloogiaga rakkude säilitamises. HPV-16 DNA füüsilise staatuse uurimine on näidanud, et nii neoplaasiad kui kartsinoomid sisaldavad viiruse DNAd kas episomaalsena (36.7%), integreerituna (35.4%) või ka mõlema vormi seguna (27.8%) (Badaracco *et al.*, 2002). Park *et*

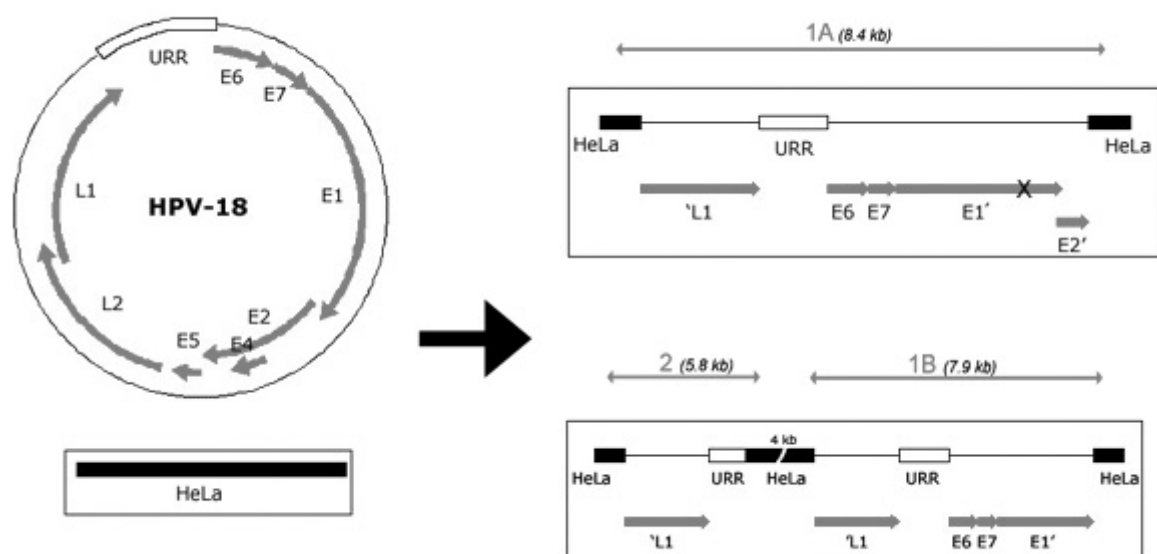
*al.* uurisid vaid kartsinoomidest pärinevaid proove ning tuvastasid episoomide 9.8%-il, integreeritud vorme 70.6%-il ja seguvorme 19.6%-il HPV-16-positiivsetest kartsinoomidest (Park *et al.*, 1997). Mõlemas viimatikirjeldatud uuringus leiti, et HPV-16 integreerumine on tugevalt seotud kasvaja invasiivsusega. Lisaks analüüsiti nendes uuringutes ka HPV-18 genoomi staatust, tuvastades kõigil juhtudel (ka madala astme neoplaasias) vaid integreeritud vormi, mis viitab ilmselt HPV-18 suuremale patogeensele potentsiaalile. HPV-18 genoomi esinemist kasvajates valdavalt integreerituna on täheldatud ka varem (Cullen *et al.*, 1991). Võrreldes erineva astme neoplaasiate ja kartsinoomide rakke (HPV-16-positiivsed) E2 geeni olemasolu suhtes, leiti positiivne korrelatsioon E2 lugemisraami rikkumise ja neoplaasia progresseerumise vahel – terviklik E2 geen esines 92%-il SIL I, 33%-il SIL II ning 17%-il invasiivsete kartsinoomide proovidest (Tonon *et al.*, 2001). Samasugust seost näitasid ka Giannoudis *et al.* (Giannoudis *et al.*, 2001). E2 olemasolu tähtsusest annab tunnistust ka see, et HPV-positiivsetesse kasvajarakkudesse E2 sisseviimine annab tulemuseks kasvu maha surumise (Hwang *et al.*, 1993; Dowhanick *et al.*, 1995; Moon *et al.*, 2001), mis toimub läbi E6/E7 promootori repressiooni (Francis *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2000).

#### **4. HeLa ja teised HPV uuringutes kasutatavad rakuliinid**

Papilloomiviiruste uurimiseks kasutatakse enamasti neile ka looduslikeks tingimustes peremeesteks olevaid normaalseid keratinotsüüte või erinevatel viisidel immortaliseeritud püsirakuliine. Algselt saadi HPVd sisaldavaid rakke kasvajatest eemaldatud materjalist, hiljem on õnnestunud püsiliine tekitada ka koekultuuris HPV DNAGA keratinotsüüte transfekteerides. HPVde elutsükli ja replikatsiooni uurimiseks on kasutusel nii HPV negatiivseid (primaarsed keratinotsüüdid; C33A); episomaalseid koopiaid sisaldavaid, näiteks W12 (Stanley *et al.*, 1989) ja CIN612 9E (Hummel *et al.*, 1992); kui integreerunud HPV DNAGA rakuliine S12 (Jeon *et al.*, 1995), HeLa (Gey *et al.*, 1952), SiHa (Friedl *et al.*, 1970), CaSki (Pattillo *et al.*, 1977) jt. Tänu kommertsiaalsele kättesaadavusele, iseloomustatud bioloogilistele ja geneetilistele omadustele ning stabiilsele HPV DNA säilitamisele ka pikemaajalisel kasvatamisel koekultuuris on viimasest kolmest nimetatud liinist saanud sageli kasutatavad mudelsüsteemid viiruse ja raku valk-valk ja valk-DNA interaktsioonide uurimiseks (Meissner, 1999).

Meie laboris on HPV-positiivse kartsinoomiliinina kasutusel HeLa, mis on tuntud selle poolest, et see oli esimene inimese epiteelikasvaja rakuliin, millest õnnestus saada stabiilne kultuur (Gey *et al.*, 1952). HeLa rakkude kohta on teada, et neil on hüpertriploidne kromosoomistik (Chen, 1988), mis sisaldab vähemalt 3 erinevat subgenoomset HPV-18 fragmenti (Schwarz *et al.*, 1985) integreerituna 10-50 koopias raku kromosoomidesse 8 (põhiline integratsioonikoht 8q24), 5, 9 ja 22 (Popescu *et al.*, 1987). Nagu mitmelteki teiselt kartsinoomidest leitud integreeritud HPV järjestuselt, toimub ka HeLas onkogeenide E6 ja E7 transkriptsioon (Schwarz *et al.*, 1985; Lazo, 1987), mida on võimalik aga maha suruda rakkudes BPV-1 või HPV-18 E2 valku ekspresseerides, põhjustades sel viisil HeLa rakutsükli blokeerumist ja apoptoosi (Hwang *et al.*, 1993; Desaintes *et al.*, 1997). HeLa kromosomaalset DNAd on analüüsitud erinevate restriksiooniensüümidega lõigates ning seejärel materjali HPV-spetsiifilise prooviga hübridiseerides. Lõikus ensüümiga *HindIII*, mille äratundmiskohti HPV-18 järjestuses ei esine, tekitab kolm erineva pikkusega HPV-spetsiifilist fragmenti, mida on tähistatud kui 1A, 1B ja 2 (Lazo, 1987) (joonis 9). Neist kaks pikemat – 1A ja 1B, suuruselga vastavalt 8.4 kb ja 7.9 kb – sisaldavad HPV-18 URR piirkonda, E6 ja E7 geenide järjestusi ning osa L1 ja E1(E2) järjestustest. Väiksemas 5.8 kb suuruselga fragmendil 2 esineb vaid osa L1st ja URRist. Vähemalt ühes integratsioonikohas paiknevad fragmendid 2 ja 1B kromosoomis lähedikkude, olles eraldatud umbes 4 kb peremeesgenoomi järjestuse poolt (Picken *and* Yang, 1987).

HeLa ja ka teiste HPV-positiivsete rakuliinide kasutamine PV ori sisaldavate plasmiidide replikatsiooni uurimiseks on näidatud, et need toetavad reporterkonstruktidel replikatsiooni märksa nõrgemal tasemel võrreldes näiteks HPV-negatiivse liiniga C33A (Chiang *et al.*, 1992). Selle fenomeni selgituseks on välja pakutud mehhanism, et HeLa rakkudes HPV-18 järjestustelt ekspresseeritav E1 N-terminust sisaldav valk interakteerub tsükliin E/CDK2 kompleksidega ja korjab need rakukeskkonnast ära, takistades nii rakkudesse transfekteeeritud konstruktidelt ekspresseeritava täispika E1 valgu funktsioneerimist replikatsiooniprotsessis (Lin *et al.*, 2000).



**Joonis 9.** HPV-18 järjestused HeLa rakkudes. Vasakul üleval on kujutatud HPV-18 genoom rõngasmolekulina ja paremal HeLa kromosoomidesse integreerunud HPV-18 järjestuste struktuur. Mustad ristkülikud tähistavad HeLa kromosoomide järjestusi, tühjad ristkülikud HPV-18 URR piirkonda ja hallid nooled HPV-18 avatud lugemisraame. 1A, 1B ja 2 tähistavad kolme *HindIII* abil HeLa DNAST välja lõigatavat HPV-18 järjestust sisaldavat erineva suurusega fragmenti (Lazo, 1987 ja Meissner, 1999, järgi).

## EKSPERIMENTAALNE OSA

### TÖÖ EESMÄRGID

Papilloomiviiruste DNA replikatsiooniks on viiruslikest faktoritest minimaalselt vaja E1 ja E2 valke ning nende seostumiskohti sisaldavat järjestust DNAs (ehk ori). Meie laboris on papilloomiviiruste replikatsioonimehhanismide uurimisega tegeletud juba pikka aega, kasutades muuhulgas viiruse ori sisaldavate reporterplasmiidide replikatsiooni jälgimist erinevates rakuliinides koekultuuri tingimustes. Mõni aasta tagasi tuvastati, et kõrgel BPV-1 E1 valgu kontsentratsioonil muutus BPV-1 URR piirkonda sisaldavate reporterplasmiidide replikatsioonilaad CHO rakkudes – toimus ori piirkonna tugev ülereplikatsioon ja selle tulemusena genereeriti hulgaliselt suhteliselt lühikesi lineaarseid fragmente, mis sisaldasid ori ning sellega külgnevaid järjestusi (Männik *et al.*, 2003). Kuna sellised fragmendid sarnanavad ülesehituselt emakakaelakartsinoomidest leitud HPVde järjestustega (URR ja viirusgenoomis selle kõrval olevad E6/E7 järjestused, joonis 9), tekkis hüpotees, et ka HPVde puhul võib aset leida sarnane “*onion-skin*”-tüüpi DNA amplifikatsioon, kui E1 valku ekspresseeritakse tavapärasest kõrgemal tasemel. Tekkinud lineaarsetest fragmentidest võiksid osa olla võimelised integreeruma peremeesraku kromosoomi ning nendelt ekspresseeritavad onkovaigud kutsuda rakkudes esile muutusi, mis võivad lõpuks viia pahaloomulise kasvaja tekkeni. Hiljuti õnnestus meie töögrupis valmistada uued efektiivsed E1 valkude ekspressioonikonstruktid lisaks varem olemas olnud HPV-18 ja BPV-1 omadele ka HPV-11 ja HPV-16 E1 jaoks. Nende konstruktide abil on saanud võimalikuks võrdlevalt uurida nn kõrge (HPV-16, HPV-18) ja madala riskiga (HPV-11) HPVde DNA replikatsiooni erinevates rakuliinides.

Varasemate avaldatud andmete kohaselt toimub PV ori järjestusi sisaldavate plasmiidide replikatsioon integreerunud kujul HPV DNAd sisaldavates kartsinoomirakuliinides (sh HeLas) väga madalal tasemel, võrrelduna näiteks HPV-negatiivse kartsinoomiliiniga C33A (Chiang *et al.*, 1992). Minu töö eemärgiks oli testida erinevate PV URR-konstruktide replikatsiooni HeLa rakuliinis (HPV-18-positiivne kartsinoomirakuliin) erinevaid (sh „kõrge riskigrupi“ HPVde) E1 ja E2 valke kasutades; jälgida replikatsioonisignaalide muutusi kõrget

E1 valgu taset kasutades ning samuti kindlaks teha, kas replikatsioonivalkude transientne ekspressioon mõjutab ka raku kromosoomi integreerunud HPV-18 ori sisaldavate järjestuste stabiilsust.

# MATERJALID JA METOODIKA

## Rakuliinid ja söötmed

Kasutati rakuliini HeLa (HPV-18 järjestusi sisaldav inimese emakakaelakartsinoomi rakuliin) (ATCC). Rakke kasvatati 100 mm plaatidel IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) söötmes (GibcoBRL), millele oli lisatud 10 % veise loote seerumit (Sebac) ning penitsilliini 100 IU/ml ja streptomütsiini 100 ng/ml. Rakke inkubeeriti 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> sisalduse juures. Transfektsiooniks kasutati 80-90% konfluentsuseni kasvanud rakkudega plaate (~2 x 10<sup>6</sup> rakku), transfektsioon viidi läbi elektroporatsiooni meetodil (Ustav *and* Stenlund, 1991) Gene Pulser II abil (Bio-Rad Instruments), kasutatud pinge oli 220 V ja mahutavus 975 µF. Poratsioonijärgselt kanti rakud 60 mm või 100 mm koekultuuri plaatidele.

## Plasmiidid

Replikatsioonikatsete läbi viimiseks kasutati järgmisi plasmiide:

1. pUC-URRH18 ehk pLCR (Remm *et al.*, 1992). Sisaldab HPV-18 URR piirkonda (viiruse genoomist nukleotiidid 6929 kuni 119) pUC18 vektoris.
2. pUC-H18 (konstrueeris A.Velthut). Sisaldab HPV-18 genoomi järjestust, mis on avatud L1 järjestusest ja kloneeritud vektorisse pUC18.
3. pUC-URRH16 (konstrueeris J. Geimanen). Sisaldab HPV-16 URR piirkonda (nt 6360 kuni 280) pUC18 vektoris.
4. pUC-URRH11 (konstrueeris A. Sumerina). Sisaldab HPV-11 URR piirkonda (nt 7072 kuni 206) pUC18 vektoris.
5. pUC-URRB1 (konstrueeris M. Ojarand). Sisaldab BPV-1 URR piirkonda (nt 6959 kuni 40) pUC18 vektoris.
6. pfsE67 (Remm *et al.*, 1999). Sisaldab HPV-18 E1 ning E6 ja E7 järjestusi (nt 105 kuni 2996) pCG vektoris. E6 ja E7 geenide ekspressioon on välja lülitatud *Bam*HI (nt 123 juures) ja *Msp*I (nt 655) lõikekohtades sisse viidud raaminihke mutatsioonidega. 12CA5 *tag*'i kodeeriv järjestus on sisestatud pärast E1 4 koodonile vastavat järjestust.

7. pQM16E6/7E1 12CA5 (konstrueeris A. Velthut). Sisaldab HPV-16 E1 ning E6 ja E7 järjestusi (nt 83 kuni 2813) PQM vektoris. 12CA5 tag'i kodeeriv järjestus on sisestatud pärast E1 4 koodonile vastavat järjestust.
8. pQM11E1 12CA5 (konstrueeris A. Velthut). Sisaldab HPV-11 E1 järjestust (nt 832 kuni 2781) PQM vektoris, milles on koodoni suhtes vaikiva mutatsiooniga rikutud splaissingu aktseptorkoht nt 2622 juures. 12CA5 tag'i kodeeriv järjestus on sisestatud pärast E1 4 koodonile vastavat järjestust.
9. pCGEag 12CA5 (konstrueeris I. Ilves). Ekspressioonivektoris pCG on lisatud BPV-1 E1 geeni järjestus (nt 619 kuni 2766 ja 3881 kuni 4450) ning E1 järjestuse ette lisatud 12CA5 tag'i kodeeriv järjestus.
10. pQME2(HPV-18) (konstrueeris M. Kadaja). Ekspressioonivektoris pQM on lisatud HPV-18 E2 geeni järjestus (nt 2817 kuni 3914).
11. PQM16E2 (konstrueeris A. Sumerina). Ekspressioonivektoris pQM on lisatud HPV-16 E2 geeni järjestus (nt 2755 kuni 3852).
12. pQM11E2 (konstrueeris M. Kadaja). Ekspressioonivektoris pQM on lisatud HPV-11 E2 geeni järjestus (nt 2723 kuni 3826).
13. pCGE2(BPV-1) (Ustav *and* Stenlund, 1991). Ekspressioonivektoris pCG on lisatud BPV-1 E2 geeni järjestus, (nt 2600 kuni 4450) E2C startkoodon on muteeritud.
14. pUCcasp3.

## Transfektsioon

Transfektsiooniks kasutati rakke, mis olid 100 mm koekultuuri plaatidel kasvanud 80-90% konfluentsuseni ( $2-3 \times 10^6$  rakku). Plaatidelt eemaldati sööde ning pesti tasse 2 korda 1x PBSiga, seejärel lisati tassi kohta 2 ml 0.25% trüpsiinilahust, oodati, kuni rakud plastiku küljest lahti tulid ning kanti nad seejärel plaatide pealt kokku 50 ml koekultuuri tuubi, kus oli 5 ml söödet. Seejärel tsentrifuugiti rakud 5 minuti jooksul põhja, kasutades tingimusi 1000 rpm 20°C (Eppendorf 5810). Sööde eemaldati ning rakud suspendeeriti tranfektsiooniks vajalikus söötmehulgas (ühe transfektsiooni kohta 250 µl), millele oli lisatud Na-BES puhvrit lõppkontsentratsioonini 5 mM. Kuvetti lisati rakususpensioonile 50 µg kandja DNAd (*carrier*; lõhe või heeringa spermi DNA) ning uuritav plasmiidne DNA. Poreerimiseks kasutati Gene Pulser II (Bio-Rad Instruments), pinget oli 220 V ja mahutavus 975 µF. Seejärel pipeteeriti kuvetti värsket söödet juurde, suspendeeriti rakud selles ning kanti 15 ml koekultuuri tuubi,

mis sisaldas 4 ml söödet. Tsentrifugeeriti 1000 rpm 20°C juures 10 minutit, seejärel aspireeriti sööde ning resuspendeeriti rakud värskes söötmes ning kanti 60 mm või 100 mm koekultuuri plaatidele.

### **Hübridisatsiooniproovide sünteesiks vajalike DNA fragmentide ette valmistamine**

Plasmiidse DNA restriksioon viidi läbi firma MBI Fermentas ensüüme kasutades. Ensüümi kogus reaktsioonis oli 10 ühikut ja reaktsioon toimus 37°C juures ensüümidele sobivas puhvris 1 tunni jooksul. Saadud DNA fragmendid lahutati geel-elektroforeesil 0.8%-lises agarosgeelis, seejärel puhastati DNA geelist kasutades *Ultra Clean DNA Purification Kit*'i (MO Bio) vastavalt valmistaja soovitatud protokollile. Eraldatud DNA fragmentide kvaliteedi ja ligikaudse kontsentratsiooni kontrollimine toimus geel-elektroforeesi kasutades.

### **Rakkude lugemine**

Enne madalmolekulaarse DNA eraldamist ja valguanalüüsi loeti rakud Bürkeri hemotsütomeetrit kasutades. Selleks eemaldati rakkudelt sööde ning tase pesti 2 korda 1x PBSiga. Seejärel lisati plaatidele 1 ml PBSi, mis sisaldas EDTAd kontsentratsioonis 3 mM. Pärast 10 minutilist inkubatsiooni toatemperatuuril suspendeeriti rakud lahuses ja kanti 1.5 ml tuubi. 50 µl saadud suspensioonist eraldati rakkude lugemise jaoks ja ülejäänud fuugiti põhja lauatsentrifuugiga 2000 rpm 2 minuti jooksul.

### **DNA eraldamine eukarüootsetest rakkudest**

**Madalmolekulaarse DNA eraldamine aluselise lüüsi meetodil:** Rakud võeti plaatidelt lahti PBS-EDTA lahust kasutades (vt Rakkude lugemine). Pärast fuugimist aspireeriti supernatant ja rakud suspendeeriti üles 200 µl Sol I (50 mM glükoos, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0), seejärel lisati lüüsimiseks 400 µl Sol II (200 mM NaOH, 1% SDS) ja keerati tuubi mõned korrad segamiseks. Lüsate inkubeeriti jääl 5 minutit, seejärel lisati 300 µl külma Sol III (60 ml 5 M kaalium atsetaati, 11.5 ml jää-äädikhapet + H<sub>2</sub>O 100 ml-ni) ning hoiti veel 10 minutit jääl. Järgnes fuugimine lauafuugiga 13 000 rpm 4°C juures 15 minutit. Supernatant

kanti üle uude tuubi ning DNA sadestati 0.6 ruumala isopropanooliga. Seejärel tsentrifuugiti 13 000 rpm 4°C juures 10 minutit ning sade võeti üles 200 µl Sol IV-s (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.2 % SDS), millele oli lisatud proteinaas K lõppkontsentratsioonini 0.1 µg/µl ning inkubeeriti 56°C juures 1 tund. Seejärel lisati 200 µl fenooli ja kloroformi segu (suhtes 1:1), tuubi sisu segati *vortex*'il ning tsentrifuugiti 13 000 rpm 2 minutit. Vesifaas kanti uude 1.5 ml tuubi ning nukleiinhapped sadestati 2.5 mahu 96% etanooliga, tsentrifuugiti 13 000 rpm 4°C juures 10 minutit. DNA sade pesti 70% etanooliga, kuivatati korralikult ning suspendeeriti 25 µl TE puhvril, mis sisaldas RNAasi lõppkontsentratsiooniga 20 µg/ml. Lahust inkubeeriti 56°C juures 30 minutit.

**Madalmolekulaarse DNA eraldamine Hirti lüüsimetodil:** Rakud võeti plaatidelt lahti PBS-EDTA lahust kasutades (vt Rakkude lugemine). Pärast fuugimist aspireeriti supernatant ja rakud lüüsi 800 µl Hirti lüüsi puhvril (0.5 % SDS, 50 mM TRIS pH 8.0, 10 mM EDTA). Pärast 15 minutist inkubeerimist toatemperatuuril lisati 5 M NaCl lahust lõppkontsentratsioonini 1 M. Segu hoiti üleöö jääl. Järgmisel hommikul fuugiti lauafuugiga 13 000 rpm 4°C juures 15 minutit. Supernatant kanti üle uude tuubi ja edasi toimus DNA puhastamine samal viisil kui on kirjeldatud lõigus “Madalmolekulaarse DNA eraldamine aluselise lüüsi meetodil.”

**Totaalse DNA eraldamine:** rakkudelt eemaldati sööde ning tasse pesti 2 korda 1x PBSiga. Seejärel lüüsi rakud kandes tassile (100 mm) 1 ml Sol IV (0.2 % SDS, 20 mM TRIS pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl) ja kallutades plaati kuni lahus muutus viskoosseks. Lüsaat koguti nn “kummimiilitsa” abil 1.5 ml tuubidesse ja tõmmati 5 korda läbi süstla (nõel 0.42 mm). Seejärel lisati proteinaas K lõppkontsentratsioonini 0.2 µg/µl ning inkubeeriti 56°C juures üleöö. Seejärel lisati võrdne maht kloroformi segu (suhtes 1:1), tuubi sisu segati *vortex*'il ning tsentrifuugiti 13 000 rpm 2 minutit. Vesifaas jagati pooleks kahte uude 1.5 ml tuubi ning nukleiinhapped sadestati 2 mahu 96% etanooliga, sade koguti tsentrifuugimisel 13 000 rpm 4°C juures 10 minuti jooksul. Sade võeti üles 300 µl TE puhvril, mis sisaldas RNAasi lõppkontsentratsiooniga 20 µg/ml ja lahust inkubeeriti 37°C juures 1 tund. DNA sadestamiseks lisati seejärel 5M NaCl lõppkontsentratsioonini 200mM ja 2 mahtu 96% etanooli ning asetati proovid -70°C juurde vähemalt 30 minutiks. Järgnes tsentrifuugimine 13 000 rpm 4°C juures 10 minutit. DNA sade pesti 70% etanooliga, kuivatati korralikult ning suspendeeriti 30-200 µl TE-s vatavalt sademe kogusele. Eraldatud totaalse DNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nm.

## Replikatsioonianalüüs (*southern blot* meetodil)

Transfekteeritud rakkudest eraldati madalmolekulaarne või totaalne DNA 48, 72 või 96 tundi pärast transfektsiooni erinevaid meetodeid kasutades. Enne madalmolekulaarse DNA eraldamist rakud loeti.

Kõigis katsetes kasutati eraldatud DNA proovide töötlemiseks ensüümi *DpnI*, mis lõikab katki rakkudesse transfekteeritud ja seal mitte replitseerunud bakteriaalse päritoluga metüleeritud plasmiidse DNA. Replikatsiooniproduktide analüüsimiseks kasutati lisaks ensüüme *HindIII* või *BamHI*. Restriktsioon kestis 37°C juures 12-16 tundi. Seejärel lahutati DNA fragmendid geel-elektroforeesil 0.8% agarosgeelis. Pärast foreesi loksutati geeli denatureerimiseks 45 minutit Sol A lahuses (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) ning seejärel neutraliseerimiseks Sol B lahuses (1 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl) 20 minutit. DNA kanti geelist filtrile ("Hybond-N+", Amersham Pharmacia Biotech) kapillaarse ülekande abil ning seoti filtriga seejärel UV Starlinker 1800 (Stratagene) abil. Filter hübridiseeriti spetsiifilise prooviga, milles dCTP  $\alpha$ -fosfor oli radioaktiivne. Proovi valmistamiseks kasutati *DecaLabel<sup>TM</sup> DNA Labeling Kit*'i (Fermentas) ja  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Du Pont NEN). Kõigepealt blokeeriti mittespetsiifiline seondumine prehübridisatsioonisegu abil (6x SSC, 5x Denhardti reaktiiv, 0.5% SDS, 200  $\mu\text{g/ml}$  kandja DNA, mis denatureeriti eelnevalt 100°C juures 10 minutit). Prehübridisatsioon toimus 65°C juures 1 tund. Proovi valmistamiseks segati 1.5 ml tuubis ~150 ng eelnevalt ette valmistatud vajaliku spetsiifilise järjestusega DNA *template*'i, dekanukleotiidpraimerid ning viidi ruumala deioniseeritud veega 40  $\mu\text{l}$ -ni. Segu inkubeeriti 100°C juures 10 minutit ja jahutati seejärel jääl. Lisati 3  $\mu\text{l}$  MixC (-dCTP), 6  $\mu\text{l}$   $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP ja 1  $\mu\text{l}$  Klenowi fragmenti (*exo-*) ning segu inkubeeriti 37°C juures 5-10 minutit. Seejärel lisati 4  $\mu\text{l}$  dNTP segu ning inkubeeriti 37°C juures veel 10 minutit. Reaktsioon peatati 1  $\mu\text{l}$  0.5 M EDTA lisamisega ja proov denatureeriti 10 minuti jooksul 100°C juures kuumutamiseega. Hübridisatsioon toimus 65°C juures 20 tundi. Pärast hübridisatsiooni pesti filtrit 3 x 15 min pesulahusega I (2x SSC, 0.2% SDS) ja seejärel 3 x 15 min pesulahusega II (0.2x SSC, 0.1% SDS). Signaal detekteeriti filtrit röntgenfilmile (Fuji) eksponeerides.

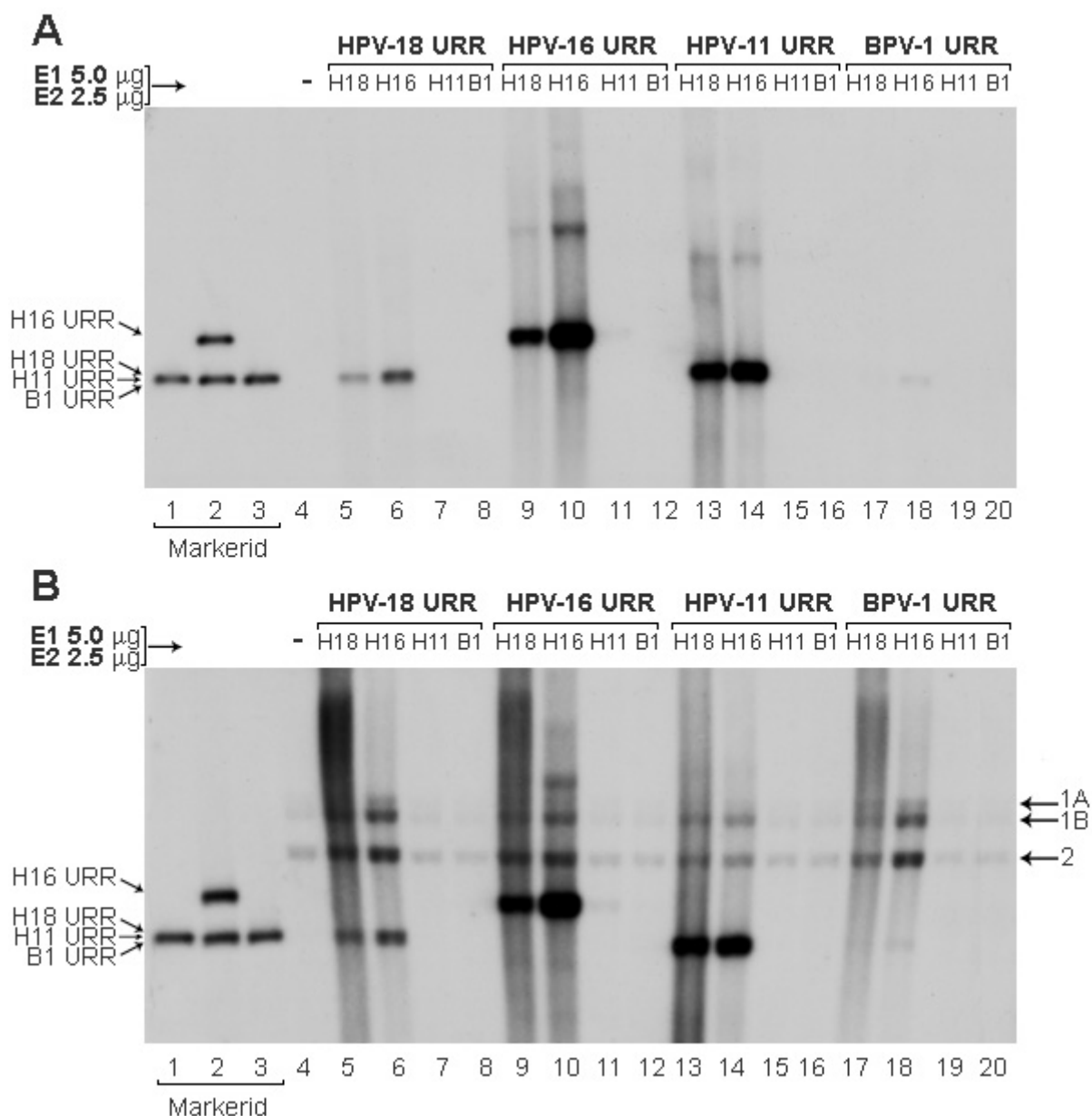
## Valkude ekspressiooni analüüs (*western blot*)

Rakud võeti plaatidelt lahti PBS-EDTA lahust kasutades (vt Rakkude lugemine). Pärast fuugimist aspireeriti supernatant ja rakud suspendeeriti üles 30 µl-s PBSis kasutades ja lüüsi seejärel 70 - 200 µl 2x Laemmli puhvris (120mM TrisCl (pH 6.8), 100mM DTT, 4% SDS, 20% glütserool, 0.02% broomfenoolsinine). Lüsaati kuumutati 5 minutit 100°C juures ja tsentrifuugiti seejärel lauafuugiga 13 000 rpm 10 minutit. Valgud lahutati 10% SDS-polüakrüülamiidgeelis 1xSDS puhvris (0.125 M TrisCl, 0.96 M glütsiin, 0.5% SDS), kasutades pinget 7,5 V/cm. Valgud kanti geelist üle 0.45 µm poori läbimõõduga PVDF filtrile Immobilon-P (Millipore) *semi-dry* ülekandepuhvris (48 mM Tris, 39 mM glütsiin, 0.037% SDS, 20% etanool) poolkuiva ülekandeparaadi abil (Bio-Rad Instruments) pingel 15 V 45 minuti jooksul. Filter blokeeriti 5% lõssipulbri lahuses (50mM TrisHCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20) 4°C üleöö. Blokeerimislahus kallati ära ning filtrit inkubeeriti E1 detekteerimiseks E1 valkudes sisalduva 12CA5 epitoobi vastase peroksüdaasiga konjugeeritud antikehaga 3F10 HRP (Roche), kasutades 1:1000le lahjendust 2% lõssipulbri lahuses (50mM TrisHCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20) 1 tund ning pesti seejärel 6 x 10 minutit pesulahusega (50mM TrisHCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20). Signaal detekteeriti *ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Kit*'i (Amersham Pharmacia Biotech) abil, eksponeerides filtrit röntgenfilmile (Fuji).

## TULEMUSED

### 1. HPV-18, HPV-16, HPV-11 ja BPV-1 URRi sisaldavate plasmiidide replikatsioon HeLa rakkudes

Katse eesmärgiks oli uurida, kuidas toimub erinevate papilloomiviiruste (HPV-18, HPV-16, HPV-11 ja BPV-1) URR piirkonda sisaldavate reporterkonstruktide replikatsioon HeLa-s, kui nende viiruste replikatsioonivalke transientselt rakkudes ekspresseerida. Info kasutatud pUC-põhiste URR-plasmiidide (pUCURR-H18, pUCURR-H16, pUCURR-H11, pUCURR-B1) ning E1 (pfsE67, pQM16E6/7E1 12CA5, pQM11E1 12CA5, pCGEag 12CA5) ja E2 (pQME218, pQME216, pQME11, pCGE2(BPV-1)) ekspressioonikonstruktide kohta on esitatud peatükis „Materjal ja meetoodika.“ Kõiki nelja reporterplasmidi tranfekteeriti HeLa rakkudesse koguses 1 µg koos ekspressiooniplasmiididega homoloogsete viirustüüpide E1 ja E2 jaoks (vastavalt 5 µg ja 2.5 µg). Plasmiidide kogused valiti esialgu varasemate erinevates rakuliinides (C33A, CHO jt) läbi viidud replikatsioonikatsete põhjal. 48 tunni möödudes eraldati rakkudest totaalne DNA ning igast proovist analüüsiti võrdne kogus (5 µg) geelelektroforeesi ja sellele järgnevat *southern blot* hübridisatsiooni kasutades (protokollid peatükis „Materjal ja meetoodika“). Eraldatud proovides esinev rakkudesse sisse viidud DNA lõigati katki ensüümi *DpnI* abil, replitseerunud plasmiidide lineariseerimiseks kasutati lõikust ensüümiga *HindIII* ning spetsiifilise hübridisatsiooniproovi sünteesiks pUC vektori järjestust või kõigi nelja viiruse URR fragmentide segu. Joonisel 10 esitatud pildilt on näha, et kooskõlas varem avaldatud tulemustega (Chiang *et al.*, 1992) toimub HPV-11 ja BPV-1 E1 ja E2 valkude ekspresseerimisel HeLa rakkudes nii vastava viiruse URRi (joonis 10 A ja B, rajad 15 ja 20) kui teiste papilloomiviiruse tüüpide URRi (rajad 7, 11, 19 ja 8, 12, 16) sisaldavate plasmiidide replikatsioon väga madalal tasemel kui üldse. Veidi üllatavalt aga on samades tingimustes võimalised replikatsiooni edukalt toetama HPV-16 ja HPV-18 E1 ja E2 valgud. Replitseerinud plasmidi lineaarsele vormile vastavaid signaale võrreldes näeb, et kõige rohkem tekib eeldatud pikkusega produkti HPV-16 URRi sisaldavalt plasmiidilt (rajad 9-10), millele järgnevad kahanevas reas HPV-11 (rajad 13-14), HPV-18 (rajad 5-6) ning BPV-1 (rajad 17-18) URRiga konstruktide signaalid. Üldjuhul on HPV-16 E1 ja E2 ekspressioonikonstrukte kasutades kõigi URR-plasmiidide signaalid tugevamad kui HPV-18 vastavaid valke ekspresseerides (võrdle omavahel radasid 5 ja 6; 9 ja 10; 17 ja 18), vaid



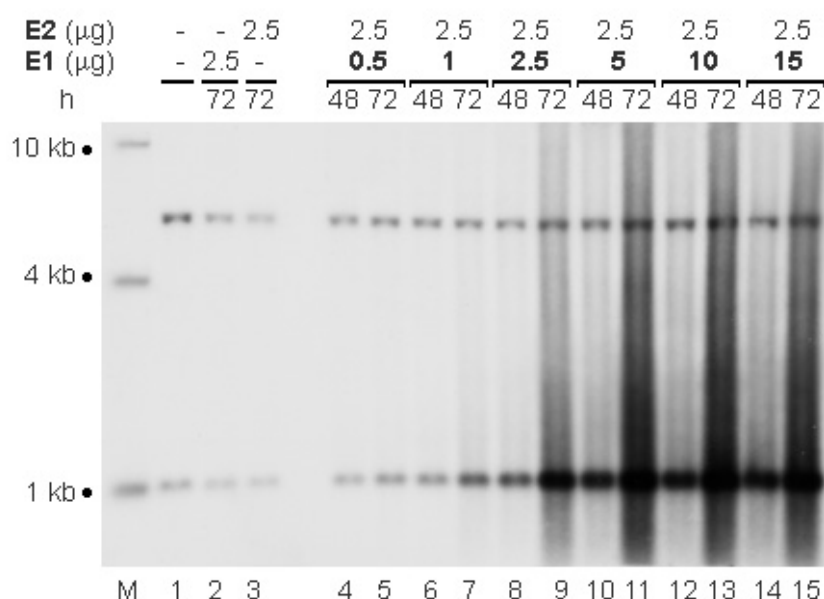
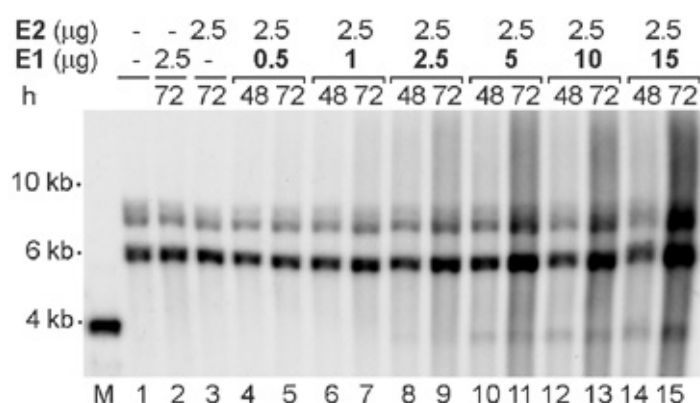
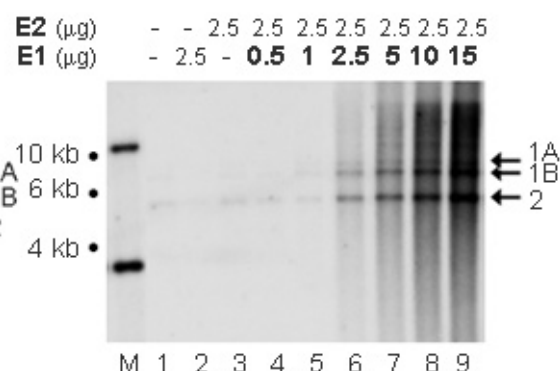
**Joonis 10.** HPV-18, HPV-16, HPV-11 ja BPV-1 URRi sisaldavate plasmiidide transientne replikatsioon HeLa rakkudes. Rakkudesse transfecteeriti 1 µg URR-plasmidi koos sama viiruse E1 ja E2 ekspressioonikonstruktidega, vastavalt 5 µg ja 2.5 µg. Totaalne DNA on eraldatud 48 tundi pärast transfectiooni ja igast proovist 5 µg lõigatud ensüümidega *HindIII*, mis lineariseerib URRi sisaldavad plasmiidid ja lõikab HeLa kromosoomidest välja kolm HPV-18 järjestust sisaldavat fragmenti: 1A, 1B ja 2; ning *DpnI*. Markeriks on kõiki nelja lineariseeritud URR-plasmidi kasutatud koguses 100 pg (A ja B, rajad 1-3). Radadel 4 on kontrolliks 5 µg transfecteerimata HeLa rakkudest puhastatud ja *HindIII*-ga lõigatud totaalselt DNA-d. Radadel 5-20 on transfecteeritud rakkudest eraldatud DNA. Rakkudesse olid transfecteeritud HPV-18 URRi (rajad 5-8), HPV-16 URRi (rajad 9-12), HPV-11 URRi (rajad 13-16) või BPV-1 URRi (rajad 17-20) sisaldavad reporterplasmiidid koos ekspressioonikonstruktidega HPV-18 (rajad 5, 9, 13, 17), HPV-16 (rajad 6, 10, 14, 18), HPV-11 (rajad 7, 11, 15, 19) või BPV-1 (rajad 8, 12, 16, 20) E1 ja E2 jaoks. Hübridisatsiooniproovi sünteesiks kasutati lineariseeritud pUC vektori järjestust (A) või segu kõigi nelja viiruse URR-fragmentidest (B). Eksponeerimisajad olid 9h (A) või 56 h (B).

HPV-11 URR plasmidi korral on signaalitugevused visuaalselt väga sarnased (rajad 13 ja 14). pUC-spetsiifilist proovi kasutades (joonis 10A) on enamik replikatsioonisignaalist detekteeritav ühe fragmendina, samal ajal kui URRide segu põhjal sünteesitud proovi kasutamine (joonis 10B) annab teistsuguse signaalide mustri. Kooskõlas kirjanduse andmetega (Lazo, 1987) on kõigis *HindIII* ensüümiga lõigatud HeLa totaalse DNA proovides näha kolm erineva pikkusega HPV-18 järjestusi sisaldavat fragmenti, mis on tähistatud kui 1A, 1B ja 2 (joonis 9). Huvitav on aga asjaolu, et nendele fragmentidele vastavate signaalide intensiivsus suureneb transfekteeritud rakkudest pärinevates DNA proovides (võrdle joonisel 10B kontrollrada nr 4 radadega 5, 6, 10, 14 jt). Kõige enam on signaalide intensiivsuse muutus märgatav taas HPV-16 E1 ja E2 olemasolu korral süsteemis (rajad 6, 10, 14 ja 18). Ka HPV-18 replikatsioonivalkude ekspressioon tundub esile kutsuvat integreerunud järjestustele vastavate 1A, 1B ja 2 signaalide muutusi, kuid diskreetsetele bändide eristamist raskendab asjaolu, et osa hübridisatsioonisignaalist esineb üle foreesiraja ulatuva smäärina (rajad 5, 9, 13, 17). Selline signaal viitab tõenäoliselt erineva pikkusega ori järjestust sisaldavate replikatsiooniproduktide esinemisele ja sarnaneb papilloomiviiruste ori piirkonna üleamplifikatsioonil saadud signaalile, mida on kirjeldatud BPV-1 ja HPV-18 URRi sisaldavate plasmidide transientsel replikatsioonil kõrgetel E1 valgu tasemetel CHO või C33A rakkudes (Männik *et al.*, 2002; labori avaldamata andmed). Joonisel 10 esitatud tulemuste põhjal ei saa kindlaks teha, kas smääri tekitavate produktide replikatsioon lähtub plasmiidides sisalduvatelt oridelt või võib tegemist olla ka integreeritud HPV-18 järjestustelt algava DNA sünteesiga.

## **2. HPV-18 E1 ja E2 ekspresseerimine HeLa rakkudes tekitab HPV-spetsiifilisi replikatsiooniprodukte**

Kuna joonisel 10 esitatud katse tulemuste põhjal tekkis hüpotees, et E1 ja E2 valkude süsteemi lisamisel on HeLa rakkudes võimalik esile kutsuda spetsiifilist DNA sünteesi ka integreerunud HPV-18 URRi sisaldavatelt järjestustelt, oli järgmise katse eesmärgiks selgitada, kas HPV-spetsiifiliste replikatsiooniproduktide teket on HeLa rakkudes võimalik detekteerida ka juhul, kui rakkudesse transfekteerida vaid E1 ja E2 ekspressioonivektoreid ilma ühegi eksogeense URR-plasmiidita. Katses kasutamiseks valiti kõigepealt HPV-18 replikatsioonivalkude ekspressioonivektorid, kuna HeLa rakkudes sisalduvad URR järjestused pärinevad just selle viiruse genoomist. Kuna just E1 on varasemate andmete põhjal kõige

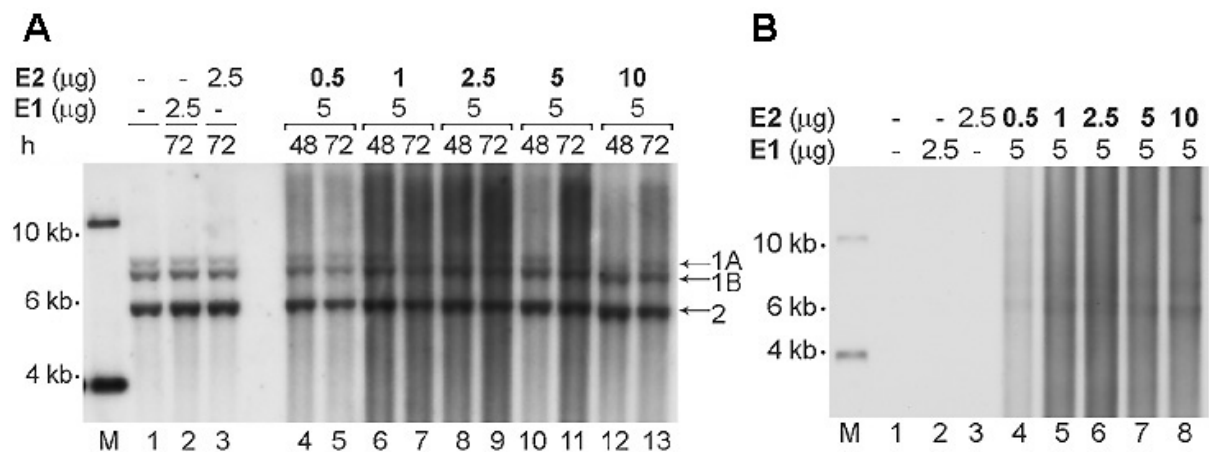
olulisem PV replikatsioonitaseme määraja, kasutati erinevaid E1 ekspressioonikonstrukti koguseid (0.5 kuni 15 µg) hoides E2 konstrukti taset paigas (2.5 µg). Kontrollimaks, kas ka selles protsessis on absoluutselt vajalik mõlema replikatsioonivalgu olemasolu, transfekteeeriti rakke ka kummagi ekspressioonikonstruktiga eraldi. 48 ja 72 tunni möödudes eraldati rakkudest totaalne DNA analoogselt eelmise katsega. Lisaks eraldati rakkudest 48 tunni möödudes veel madalmolekulaarne DNA Hirti lüüsimetodit kasutades (protokollid peatükis „Materjal ja metoodika“), et jälgida, kas ka selles fraktsioonis replikatsiooniprodukte detekteerida õnnestub. Paralleelselt jälgiti E1 ja E2 valkude tasemeid ka *western blot* analüüsi kasutades (labori esitamata andmed). Eraldatud madalmolekulaarset DNA-d lõigati ensüümiga *HindIII* (võrdsete koguste määramiseks loeti rakud vahetult enne lüüsimist) ja totaalse DNA proovidest 5 µg ensüümidega *HindIII* või *BamHI*. HPV-18 genoom sisaldab kaht ensüümi *BamHI* äratundmiskohta, mis paiknevad L1 ja E6 geenide järjestustes (nt 6929 ja 119), võimaldades viirusgenoomist välja lõigata terve URR piirkonna. Kahte tüüp HeLa-s esinevas HPV-18 fragmentides – 1A ja 1B – peaksid *BamHI* lõikamiskohad olema säilinud, fragmentis 2 aga E6-poolne puuduma. Hübridisatsiooniproovi sünteesiks kasutati HPV-18 URR fragmendi järjestust. Replikatsioonikatse tulemused on esitatud joonisel 11. Ükshaaval HPV-18 E1 või E2 ekspressioonivektoriga transfekteeerides ei ole replikatsioonisignaalid võrreldes kontrolliga muutunud (võrdle joonisel 11ABC kontrollradasid 1 radadega 2 ja 3), samal ajal kui mõlema vektori kombinatsioone kasutades on detekteeritav nii kindla suurusega restriksioonifragmentide kui smäärina esinevate produktide signaalide intensiivsuse kasv. Nähtava muutuse esile kutsumiseks minimaalne E1 ekspressioonivektori kogus on selles katses 1 ja 2.5 µg vahel (joonisel 11A ja 11B rajad 7-9, 11C rajad 5-6). Rakkudes E1 taseme tõustes ja hilisemates ajapunktides replikatsioonisignaalid tugevnevad. Esitatud tulemustest võib järeldada, et HPV-18 E1 ja E2 transientne koekspressioon HeLa rakkudes initsieerib tõepoolest replikatsiooni raku kromosoomi integreerunud viiruslikelt ori järjestustelt ja mida rohkem esineb süsteemis E1 valku, seda intensiivsem on replikatsioon. Replikatsioonisignaalide esinemine ka madalmolekulaarse DNA fraktsioonis (joonis 11C rajad 6-9) viitab ilmselt sellele, et osa tekkinud replikatsiooniproduktidest ei jää selles protsessis kromosoomidega seotuks. *HindIII*-fragmentidele 1B ja 2 vastavad replikatsioonisignaalid (joonis 11BC) tugevnevad E1 taseme tõustes märgatavalt, samal ajal kui 1A-le vastav signaal muutub vähe. Proovide lõikus ensüümiga *BamHI* (joonis 11A) annab tulemuseks E1-sõltuvalt märgatavalt tugevneva HPV-18 URR fragmendile (~1 kb) vastava

**A****B****C**

**Joonis 11.** HPV-18 replikatsioonivalkude E1 ja E2 koekspressioon käivitab replikatsiooni HeLa rakkude kromosoomidesse integreerunud HPV-18 ori järjestustelt. Totaalne DNA (A ja B) on eraldatud 48 ja 72 tundi ning madalmolekulaarne DNA (C) 48 tundi pärast transfektsiooni. Proovidest on võrdne kogus lõigatud ensüümidega *Bam*HI (A), mis lõikab HeLa kromosoomidest välja HPV-18 URR piirkonna või *Hind*III (B ja C), mis lõikab välja kolm HPV-18 järjestust sisaldavat fragmenti: 1A, 1B ja 2; ning *Dpn*I. Markeriks (M) on kasutatud lineariseeritud plasmide pUCURR-H18, pUC-H18 (A ja C) koguses 200 pg ning HPV 18 URR fragmenti (A) koguses 100 pg. Radadel 1 on kontrolliks transfekteerimata HeLa rakkudest puhastatud DNA; radadel 2 ainult HPV-18 E1 ekspressioonikonstruktiga (10 μg) ja radadel 3 ainult E2 konstruktiga (2.5 μg) transfekteeritud rakkudest pärinev DNA. Radadel 4-15 (A ja B) ning 4-9 (C) on suureneva E1 ekspressioonivektori kogusega (0.5 kuni 15 μg) ja sama E2 konstrukti kogusega (2.5 μg) transfekteeritud rakkudest pärinevad DNA proovid. Hübridisatsiooniproovi sünteesiks kasutati HPV-18 URR fragmenti. Eksponeerimisajad olid 2 h (A), 24 h (B) või 48 h (C).

signaali, samal ajal kui ~5 kb suuruse kõrgemal liikuva fragmenti (kattub ilmselt osaliselt *Hind*III lõikusega saadava fragment 2-ga) hulk muutub suhteliselt vähem.

Seni läbi viidud katsetes oli transfekteerimisel kasutatud vaid ühte E2 ekspressioonivektori kogust – 2.5 µg. Kuna joonisel 11 esitatud tulemused näitavad, et replikatsiooniproductide hulk sõltub otseselt HPV-18 E1 valgu tasemest, viidi järgmisena läbi analoogne tiitrimise katse ka HPV-18 E2 ekspressioonikonstrukti suhtes, uurimaks E2 valgu koguse tähtsust selles replikatsioonisüsteemis. Kasutatud vahemik oli 0.5 kuni 10 µg HPV-18 E2 ekspressioonikonstrukti, mis transfekteeriti rakkudesse koos 5 µg E1 konstruktiga. 48 ja 72 tunni möödudes eraldati rakkudest totaalne DNA, 72 tunni ajapunktis ka madalmolekulaarne DNA aluselise lüüsi meetodit kasutades (protokollid peatükis „Materjal ja metoodika“). Paralleelselt jälgiti E1 ja E2 valkude tasemeid ka *western blot* analüüsi kasutades (labori esitamata andmed). DNA proovide lõikamiseks kasutati ensüüme *Hind*III ja *Dpn*I ja hübridisatsiooniproovi sünteesiks HPV-18 URR fragmenti. Joonisel 12 esitatud tulemustest on näha, et HeLa rakkudes olevatelt integreerunud HPV järjestustelt lähtuv replikatsioon sõltub ka E2 valgu tasemest, kuid erinevalt E1 kohta täheldatust (joonis 11), ei ole replikatsioonisignaalid tugevaimad mitte suurimat E2 ekspressioonikonstrukti kogust (10 µg) kasutades, vaid pigem tekib nende maksimum 1 ja 2.5 µg selle plasmidi transfekteerimise korral (võrdle joonisel



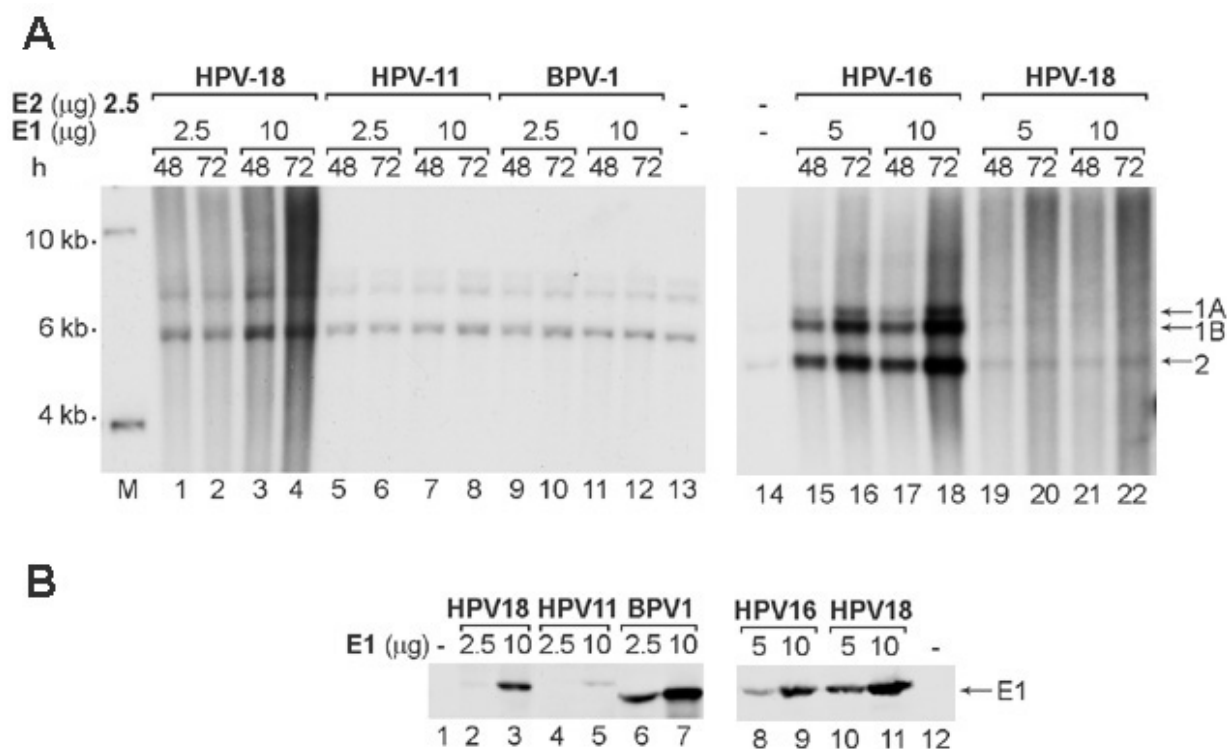
**Joonis 12.** Integreerunud HPV-18 ori järjestustelt algava replikatsiooni intensiivsus sõltub replikatsioonivalgu E2 hulgast rakkudes. Totaalne DNA (A) on eraldatud 48 ja 72 tundi ning madalmolekulaarne DNA (B) 48 tundi pärast transfektsiooni. Proovidest on võrdne kogus lõigatud ensüümidega *Hind*III ja *Dpn*I. Markeriks (M) on kasutatud lineariseeritud plasmide pUCURR-H18 ja pUC-H18 koguses 200 pg. Radadel 1 on kontrolliks transfekteerimata HeLa rakkudest puhastatud DNA; radadel 2 ainult HPV-18 E1 ekspressioonikonstruktiga (10 µg) ja radadel 3 ainult E2 konstruktiga (2.5 µg) transfekteeritud rakkudest pärinev DNA. Radadel 4-13 (A) ning 4-8 (B) on suureneva E2 ekspressioonivektori kogusega (0.5 kuni 10 µg) ja sama E1 konstrukti kogusega (5 µg) transfekteeritud rakkudest pärinevad DNA proovid. Hübridisatsiooniproovi sünteesiks kasutati HPV-18 URR fragmenti. Eksponeerimisajad olid 24 h.

12A radasid 6-9 radadega 10-13; 12B radasid 5-6 radadega 7 ja 8). Nende tulemuste põhjal valiti edasisteks replikatsioonikatseteks välja ekspressioonivektorite kogused – E1 jaoks vahemik 2.5 kuni 10 µg ning E2 jaoks 2.5 µg.

### **3. Integreerunud HPV-18 ori järjestuselt saab HeLa rakkudes replikatsiooni esile kutsuda ka HPV-16 E1 ja E2 abil, kuid mitte HPV-11 ega BPV-1 vastavaid replikatsioonivalke ekspresseerides**

Seniste tulemuste (joonised 11 ja 12) põhjal on teada, et HPV-18 replikatsioonivalgud suudavad initsieerida replikatsiooni HPV-18 URR järjestustelt, mis esinevad HeLa rakkudes kromosoomidesse integreeritud kujul. Järgmise katse eesmärgiks oli välja selgitada, kas ka teiste viiruste (HPV-16, HPV-11, BPV-1) replikatsioonivalgudel on võime sarnaselt funktsioneerida. Rakkudesse transfekeeriti 2.5 (HPV-16 ja HPV-18 puhul ka 5) või 10 µg E1 ekspressioonikonstrukte koos sama viiruse E2 ekspressioonikonstruktidega (2.5 µg). 48 ja 72 tundi pärast transfektsiooni eraldati rakkudest totaalne DNA, 48 tunni pärast ka madalmolekulaarne DNA aluselise lüüsi meetodil (esitamata andmed) ning osa rakke lüüsi ka valguanalüüsi jaoks (protokoll peatükis „Materjalid ja metoodika“). Lõikamiseks kasutati ensüümi *HindIII*. Sarnaselt eelmiste katsete tulemusega olid ka seekord HPV-18 puhul nähtavad E1 kontsentratsioonist sõltuva tugevusega replikatsioonisignaaliid (joonis 13A, rajad 1-4 ja 19-22), lisaks olid kontrollrajaga võrreldes tunduvalt muutunud fragmentide 1A, 1B ja 2 signaaliid HPV-16 replikatsioonivalke ekspresseerivate konstruktid kasutamisel (rada 14 võrreldes radadega 15-18). Ka HPV-16 puhul tundub replikatsioonitase sõltuvat E1 valgu tasemest (võrdle radasid 16 ja 18), kuid replikatsioonimehhanism tundub olevat HPV-18 E1/E2 omast erinev, kuna enamik replikatsioonisignaalist on koondunud diskreetsetesse fragmentidesse, smääriosa annab kogusignaali väiksema panuse (võrdle radasid 15-18 ja 19-22 omavahel). Erinevalt kõrge riskiga viiruste HPV-16 ja HPV-18 puhul nähtust ei ole samas koguses HPV-11 või BPV-1 replikatsioonivalgude ekspressioonikonstruktid HeLa rakkudesse transfekeerimisel saadud DNA proovidest võimalik HPV-18 URRil põhinevat hübidsatsiooniproovi kasutades replikatsiooniproductide olemasolu detekteerida (rajad 5-12). Põhjuseks, miks replikatsioon toimub ainult HPV-16 ja HPV-18 E1 ja E2 konstruktid kasutamisel võiks välja pakkuda seda, et nende plasmiidide valguekspressioonivõime on HeLa rakkudes märksa suurem kui HPV-11 või BPV-1 omadel. Selle hüpoteesi kontrollimiseks analüüsiiti paralleelselt *southern blot* hübidsatsioonikatsetega ka E1 valkude

taset transfecteeritud rakkude lüsaatides *western blot* meetodil (joonis 13B), kasutades selleks kõigis E1 valkudes sisalduva 12CA5 epitooibi vastast antikeha 3F10-HRP (protokoll peatükis „Materjalid ja meetoodika“). Erinevate E1 tasemeid võrreldes tundub, et kõige kõrgemal tasemel ekspresseerub selles süsteemis BPV-1 E1 valk (joonis 13B, rajad 6-7), järgnevad sarnase tasemega HPV-16 ja HPV-18 valgud (rajad 8-11 ja 2-3) ning kõige madalam on lüsaatides HPV-11 E1 tase (rajad 4-5). 10 µg HPV-11 ekspressioonivektoriga transfecteeritud rakkude lüsaadist detekteeritav E1 valgule vastav signaal (joonis 13B, rada 5) on siiski



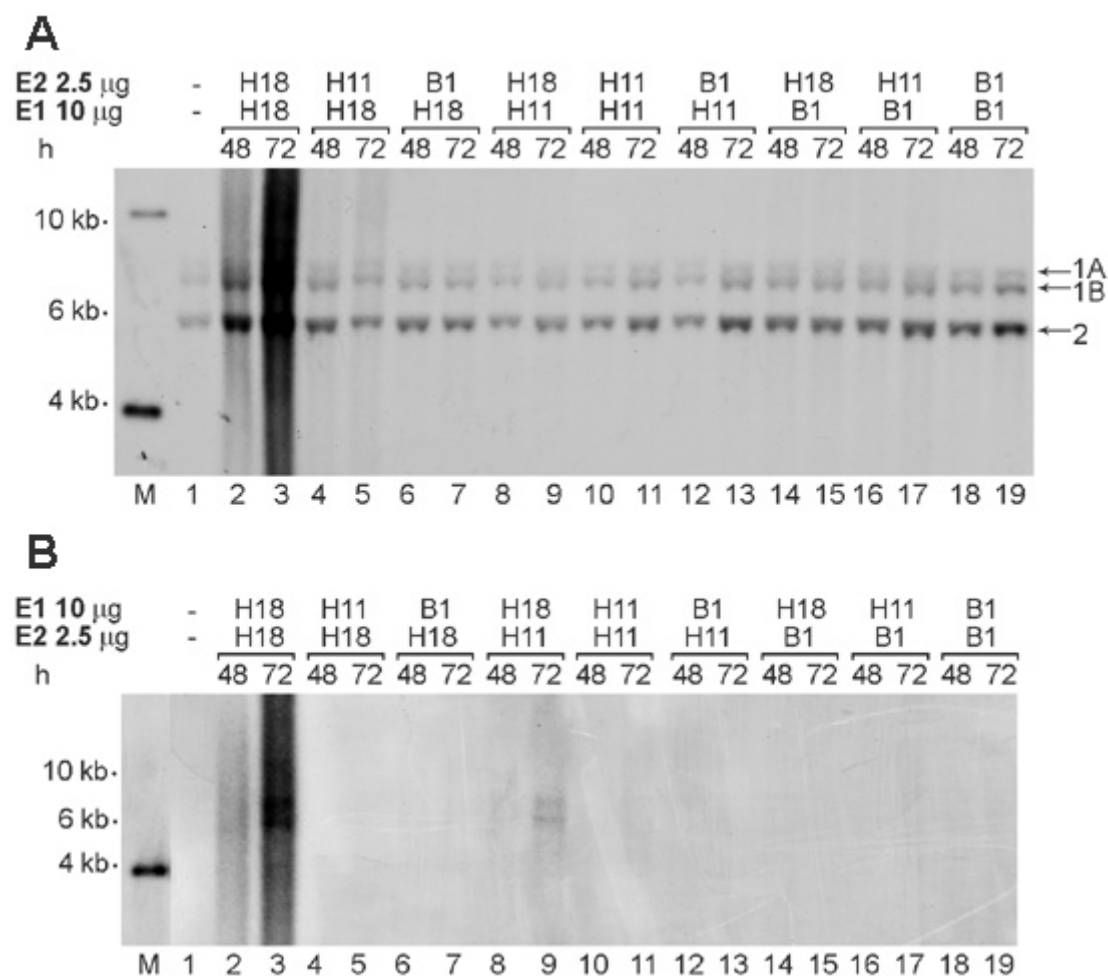
**Joonis 13.** Integreerunud HPV-18 oridelt lähtuvate spetsiifiliste replikatsiooniproduktide teke HPV-18, HPV-11, HPV-16 ja BPV-1 E1 ja E2 valkude abil HeLa rakkudes. **(A)** Totaalne DNA on eraldatud 48 ja 72 tundi pärast transfectsiooni. Proovidest on võrdne kogus lõigatud ensüümidega *HindIII* ja *DpnI*. Markeriks (M) on kasutatud lineariseeritud plasmide pUCURR-H18 ja pUC-H18 koguses 200 pg. Radadel 1 ja 14 on kontrolliks transfecteerimata HeLa rakkudest puhastatud DNA. Radadel 1-12 ja 14-22 on transfecteeritud rakkudest eraldatud DNA. Kasutatud on ekspressioonikonstrukte HPV-18 E1 jaoks koguses 2.5 µg (rajad 1-2), 5 µg (19-20) või 10 µg (3-4 ja 21-22); HPV-11 E1 jaoks 2.5 µg (5-6) või 10 µg (7-8); BPV-1 E1 jaoks 2.5 µg (9-10) või 10 µg (11-12); HPV-16 E1 jaoks 5 µg (15-16) või 10 µg (17-18). Kõigil juhtudel on E1 konstruktid kotransfecteeritud 2.5 µg sama viiruse E2 ekspressioonikonstruktiga. Eksponeerimisajad olid 24 h (vasakpoolne blokk) või 6h (parempoolne blokk). **(B)** Erinevate E1 valkude ekspressioon HeLa rakkudes. Transfecteeritud rakud on lüüsitud 72 tundi pärast transfectsiooni. Kasutatud on ekspressioonikonstrukte HPV-18 E1 jaoks koguses 2.5 µg (rada 2), 5 µg (10) või 10 µg (3 ja 11); HPV-11 E1 jaoks 2.5 µg (4) või 10 µg (5); BPV-1 E1 jaoks 2.5 µg (6) või 10 µg (7); HPV-16 E1 jaoks 5 µg (8) või 10 µg (9). Radadel 1 ja 12 on negatiivseks kontrolliks *carrier* DNAGA transfecteeritud rakkude lüsaat. E1 detekteerimiseks on kasutatud 12CA5 epitooibi vastast antikeha 3F10-HRP.

võrreldav 2.5 µg HPV-18 E1 konstruktiga saadavale (rada 2), samal ajal kui replikatsioonianalüüsi pildil nähtavad samadele kogustele vastavad signaalid on erinevad (võrdle joonisel 13A radasid 2 ja 8). Kõigi erinevate E2 valkude esinemine transfekteeeritud HeLa rakkude lüsaadis on samuti kindlaks tehtud (labori avaldamata andmed), nii et integreerunud HPV-18 ori järjestustelt replikatsiooni käivitamisel näivad kõige olulisemad olevat just erinevate E1 ja E2 valkude omadused.

Järgmises katses kasutati erinevate viiruste E1 ja E2 valkude kombineerimist, et kindlaks teha, kas koostöös HPV-18 E1 või E2ga suudab ka mõni teist tüüpi viiruse (HPV-11 või BPV-1) replikatsioonivalk integreerunud HPV-18 ori järjestuselt replikatsiooni initsieerimises osaleda või on selleks vajalik aktiivsus vaid homoloogsete HPV-18 replikatsioonivalkude kombinatsioonil. Rakkudesse transfekteeeriti 10 µg igat E1 ekspressiooniplasmiidi (HPV-18, HPV-11, BPV-1) koos sama või erinevate viiruste E2 konstruktidega (2.5 µg). 48 ja 72 tundi pärast transfektsiooni eraldati rakkudest totaalne ja madalmolekulaarne DNA (aluseline lüüs), lõikamiseks kasutati ensüüme *HindIII* ja *DpnI*. HPV-18 E1 ja E2-ga on taaskord näha korralik signaal (joonis 14AB, rajad 2-3), kuid ühegi muu kombinatsiooniga sarnast efekti pole. Väga nõrgal tasemel toimub replikatsioon ka sellisel juhul, kui HPV-18 E1 täiendab HPV-11 E2 (joonis 14A, rada 5; 14B, rada 9). Need andmed kinnitavad taas, et olulisim spetsiifikaat määrav komponent selles replikatsioonisüsteemis on HPV-18 E1 Valk. Edaspidi on kindlasti plaanis kaasata sellisesse katsesse ka kombinatsioonid HPV-16 E1 ja E2 valkudega.

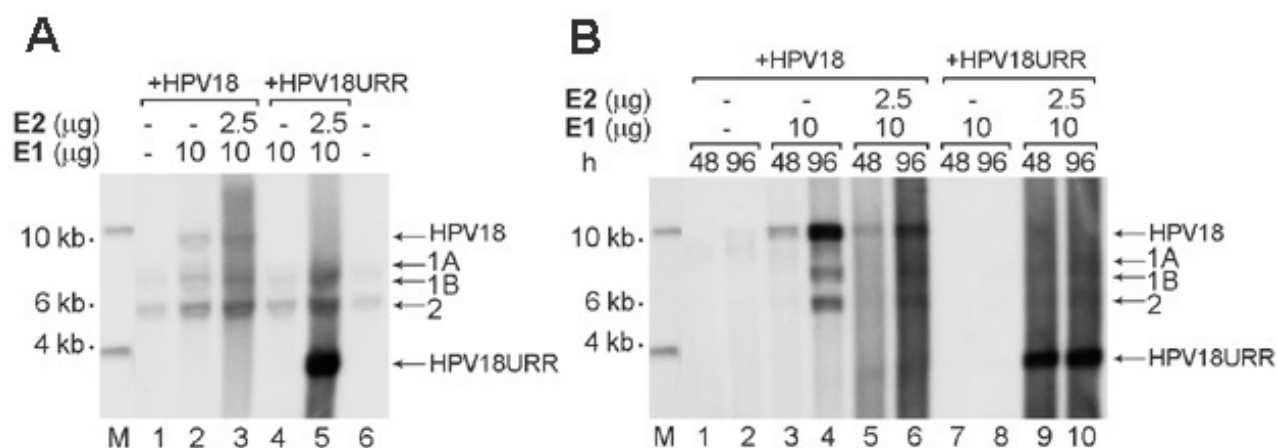
#### **4. Erinevate HPV-18 URRi sisaldavate plasmiidide replikatsioon HeLa rakkudes**

Varasemad katsed näitasid, et HeLa rakkudesse integreerunud HPV-18 URRi sisaldavatelt järjestustelt õnnestub sama viiruse E1 ja E2 valkude ekspresseerimisel initiseerida spetsiifilist replikatsiooni ning samuti toimub neis rakkudes pUC vektoris HPV-18 URRi sisaldavate plasmiidide replikatsioon (joonis 10). Lisaks on meie laboris olemas veel teist tüüpi HPV-18 ori sisaldav konstrukti – kogu HPV-18 viirusgenoomi järjestus pUC vektoris (pUC-H18). Järgmises katses testitigi võrdlevalt nende kahe HPV-18 ori sisaldava plasmiidi replikatsiooni HeLa rakkudes, üheks eesmärgiks oli ka uurida HPV-18 genoomilt viiruslike promootorite alt ekspresseeritavate valkude mõju HeLa süsteemile. Rakkudesse transfekteeeriti HPV-18 genoomi sisaldavat vektorit (3.3 µg) kas üksi, koos HPV-18 E1 ekspressioonikonstruktiga või



**Joonis 14.** HeLa rakkude kromosoomis olevate HPV-18 ori järjestuste replikatsioon erinevate papilloomiviiruste (HPV-18, HPV-11, BPV-1) E1 ja E2 valkude kombinatsioone kasutades. Rakkudesse transfecteeriti 10 µg igat E1 ekspressiooniplasmiidi koos sama või erinevate viiruste E2 konstruktiividega (2.5 µg). 48 ja 72 tundi pärast transfectsiooni eraldati transfecteeritud rakkudest totaalne (A) ja madalmolekulaarne DNA (B). Proovidest on võrdne kogus lõigatud ensüümidega *HindIII* ja *DpnI*. Markeriks (M) on kasutatud lineariseeritud plasmiide pUCURR-H18 (A ja B) ja pUC-H18 (A) koguses 200 pg. Radadel 1 on kontrolliks transfecteerimata HeLa rakkudest puhastatud DNA, radadel 2-19 on transfecteeritud rakkudest eraldatud DNA. Transfecteerimiseks on kasutatud HPV-18 E1 konstrukti (A, rajad 2-7; B, rajad 2-3, 8-9, 14-15), HPV-11 E1 konstrukti (A, rajad 8-13; B, rajad 4-5, 11-12, 16-17) või BPV-1 E1 konstrukti (A, rajad 14-19; B, rajad 6-7, 13-14, 18-19) koos HPV-18 E2 konstrukti (A, rajad 2-3, 8-9, 14-15; B, rajad 2-7), HPV-11 E2 konstrukti (A, rajad 4-5, 11-12, 16-17; B, rajad 8-13) või BPV-1 E2 konstruktiga (A, rajad 6-7, 13-14, 18-19; B, rajad 14-19). Hübridisatsiooniproovi sünteesiks kasutati HPV-18 URR fragmenti. Eksponeerimisajad olid 24 h (A) ja 72 h (B). Tähistused: H18 – HPV-18; H11 – HPV-11; B1 – BPV-1.

koos E1 ja E2 konstruktidena. Võrdluseks kasutatud ainult HPV-18 URRi sisaldavat plasmidi (1 µg) transfekeeriti koos E1 konstruktiga või koos E1 ja E2 konstruktidena. Kasutatud plasmidide kogused olid 10 µg (E1) ja 2.5 µg (E2). 48 tunni möödudes eraldati transfekeeritud rakkudest totaalne ning 48 ja 96 tunni pärast madalmolekulaarne DNA (aluseline lüüs). DNA proove restrikteeriti analüüsi jaoks ensüümidega *DpnI* ja *HindIII*, viimane lineariseerib mõlemad HPV-18 järjestusi sisaldavaid plasmide. Tulemused on esitatud joonisel 14. Üksi rakkudesse transfekeeritud tervet viirusgenoomi sisaldava konstrukti replikatsioonisignaali oli küllaltki nõrk (joonis 15A, rada 1 ja 15B, rajad 1-2), kuid pikema ekspositsiooni korral siiski tuvastatav (esitamata andmed). Samas piisas juba E1 ekspressioonikonstrukti lisamisest, et saada pUC-H18 plasmidi replikatsioonisignaali (joonis 15A, rada 2; joonis 15B, rajad 3-4). Huvitav on seejuures asjaolu, et 48 tundi pärast transfektsiooni lüüsitud rakkudest saadud materjal on detekteeritav vaid plasmidilt



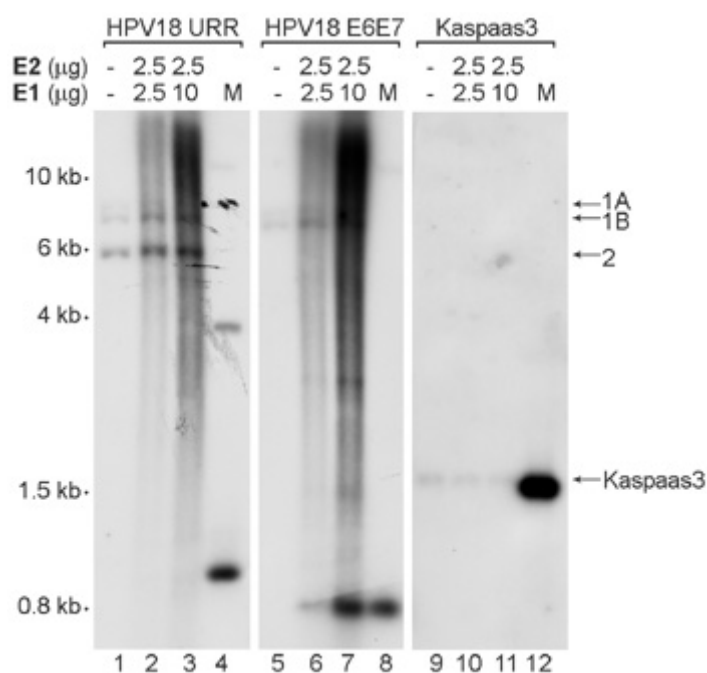
**Joonis 15.** Kaht tüüpi HPV-18 URRi sisaldavate plasmidide transientne replikatsioon HeLa rakkudes. Rakkudesse transfekeeriti reporterplasmide, mis sisaldasid tervet HPV-18 genoomi (3.3 µg) või ainult URR piirkonda (1 µg). 48 (A ja B) ja 96 (B) tundi pärast transfektsiooni eraldati transfekeeritud rakkudest totaalne (A) ja madalmolekulaarne DNA (B). Proovidest on võrdne kogus lõigatud ensüümidega *HindIII* ja *DpnI*. Markeriks (M) on kasutatud lineariseeritud plasmide pUCURR-H18 ja pUC-H18 koguses 200 pg. Radadel 1 (A ja B) on kontrolliks transfekeerimata HeLa rakkudest puhastatud DNA. Tervet HPV-18 genoomi sisaldavat plasmidi transfekeeriti rakkudesse üksi (A, rada 1; B, rajad 1-2), koos HPV-18 E1 konstruktiga (A, rada 2; B, rajad 3-4) või koos E1 ja E2 konstruktidena (A, rada 3; B, rajad 5-6). Ainult HPV-18 URR piirkonda sisaldavat plasmidi transfekeeriti rakkudesse koos E1 konstruktiga (A, rada 4; B, rajad 7-8) või koos E1 ja E2 konstruktidena (A, rada 5; B, rajad 9-10). E1 konstrukti hulk oli kõigil juhtudel 10 µg ja E2 konstrukti hulk 2.5 µg. (A) rajal 6 on kontrolliks transfekeerimata HeLa rakkudest puhastatud DNA. Hübridisatsiooniproovi sünteesiks kasutati HPV-18 URR fragmenti. Ekspositsioonisajad olid 6 h. Tähistused: HPV-18 – pUC-H18 plasmid; HPV18URR – pUC-URRH18 plasmid.

lähtuvatele replikatsiooniproduktile vastav signaal (15B, rada 3), kuid järgmise 48 tunni pärast on lisandunud ka HeLa genoomist pärinevatele 1A, 1B ja 2 fragmentidele vastavad signaalid (15B, rada 4). Seega tundub eelistatud *template* olevat plasmiidis asuv URR, kuid hiljem kasutatakse ka kromosoomis olevaid variante ning protsessiks piisab suure hulga E1 valgu olemasolu korral ka vaid viiruse genoomi kontekstist ekspresseeritavast E2 valgust. Kui sellesse süsteemi ekspressioonikonstruktilt ka HPV-18 E2 valku juurde lisada, muutub signaali koguhulk küll suuremaks, kui diskreetsete bändide hulk taaskord väheneb (15B, rajad 5-6). Ootuspäraselt toimub ainult HPV-18 URR fragmenti sisaldava plasmidi replikatsioon vaid sel juhul, kui rakkudes ekspresseeritakse eraldi konstruktidelt nii E1 kui E2 valku (võrdle joonisel 15A radasid 4 ja 5; 15B radasid 7-8 ja 9-10).

## **5. HeLa rakkudesse intergreerunud HPV-18 ori järjestuselt lähtuvate replikatsiooniproduktide analüüs erinevaid hübriidsatsiooniproove kasutades**

Järgmise katse eesmärgiks oli välja selgitada, kas HeLa/E1/E2 süsteemis tekkivaid signaalimuutusi on võimalik detekteerida ka mõne rakulise geeni järjestuse põhjal sünteesitud hübriidsatsiooniproovi abil. Selleks kasutati kaspaas-3 geeni (paikneb inimese genoomis 4. kromosoomis, teadaolevaid HPV-18 järjestuste integratsioonikohti selles regioonis ei ole) järjestust sisaldavat DNA fragmenti. Samuti kasutati proovi sünteesiks HPV-18 E6 ja E7 geenidele vastavaid järjestusi (HPV-18 genoomist nukleotiidid 119 kuni 907) sisaldavat fragmenti, millega hübriidiseerimine peaks andma infot selle kohta, kas ka integreerunud ori järjestuselt algav replikatsioon kulgeb bidirektsionaalselt. Analüüsiks kasutati totaalse DNA proove, mis olid eraldatud transfekkeerimata HeLa rakkudest või HPV-18 E1 ja E2 konstruktidega (vastavalt 2.5 µg; 2.5 µg või 10 µg) transfekteeritud rakkudest (72 tunni ajapunkt). Restrikteerimiseks kasutati koos *DpnI*-ga ensüümi *HindIII*, mis lõikab HeLa kromosoomidest välja varem kirjeldatud HPV-18 spetsiifisi järjestusi sisaldavad fragmendid (1A, 1B ja 2) ning rakulise geeni kaspaas-3 järjestusest 1.8 kb suuruse (ligikaudu 8. eksonile vastava) fragmendi. Joonisel 16 esitatud pildilt on näha, et E1 ja E2 juuresolekul on nii HPV-18 URRi kui E6/E7 põhise prooviga detekteeritav replikatsiooniproduktide signaalide olemasolu (joonis 16, rajad 2-3 ja 6-7). Signaalide sarnane tugevus viitab sellele, et replikatsioonikahvlid liiguvad DNAd sünteesides ka nendelt oridelt kahes suunas. HeLa rakkudesse integreerunud HPV-18 järjestuste kohta on teada (Lazo, 1987), et fragmendi 2

koosseisus viiruslike onkogeenide järjestusi ei ole ning sellega on kooskõlas ka praegune tulemus – HPV-18 E6/E7 proov tõepoolest selles katses fragmendile 2 vastaval kõrgusel signaali ei anna (rajad 5-7). Inimese genoomis ühe koopiana esineva kaspas-3 geeni 8. eksonile vastav fragment on samuti *HindIII*ga lõigatud HeLa totaalsest DNAST detekteeritav, kuid HPV-18 E1 ja E2 olemasolu rakkudes ei muuda sellele vastava signaali intensiivsust (võrdle rajad 9, 10, 11), samuti ei esine smääri. Sarnane tulemus saadi ka rakulise proto-onkogeeni c-Myc (paikneb 8. kromosoomis ühest teadaoleva HPV-18 integratsioonikohast ~50 kb kaugusel) järjestuse põhise hübridisatsiooniprooviga (esitamata andmed). Need tulemused kinnitavad arvamust, et viiruslike E1 ja E2 valkude ekspresseerimine HeLa rakkudes põhjustab just HPV-18 URRI ja seda ümbritsevale DNAle vastavate järjestuste spetsiifilist amplifikatsiooni.



**Joonis 16.** Erinevate hübridisatsiooniproovide kasutamine HeLa rakkudes HPV-18 E1 ja E2 ekspresseerimisel tekkivate signaalimuutuste täienavaks iseloomustamiseks. Totaalne DNA on eraldatud 72 tundi pärast transfektsiooni ja proovidest võrdne kogus (5 μg) lõigatud ensüümidega *HindIII* ja *DpnI*. Markeriks (M) on kasutatud lineariseeritud plasmide pUCURR-H18, pUC-H18 ning HPV 18 URR fragmenti ja kaspas-3 8. eksonit sisaldavat fragmenti koguses 200 pg. Radadel 1, 5 ja 9 on kontrolliks transfekteeimata HeLa rakkudest puhastatud DNA, radadel 2, 6 ja 10 2.5 μg E1 konstruktiga ja radadel 3, 7 ja 11 10 μg E1 konstruktiga transfekteeeritud rakkudest eraldatud proovid. Mõlemal juhul kotransfekteeeriti E1 konstruktiga ka E2 konstrukti (2.5 μg). Hübridisatsiooniproovi sünteesiks kasutati HPV-18 URRIle (rajad 1-4), HPV-18 E6 ja E7 geenide järjestustele (rajad 5-8) või rakulise geeni kaspas-3 8. eksoni järjestusele (rajad 9-12) vastavaid DNA fragmente. Eksponeerimis-ajad olid 24 h (rajad 1-8) või 72 h (rajad 9-12).

## ARUTELU

Papilloomiviiruste elutsükli käigus toimub viirusgenoomide DNA amplifikatsioon kaks korda – esimest korda vahetult nakatamise järgselt epiteeli basaalkihi rakkudes ning teist korda enne järglasvirionide valmimist diferentseerunud suprabasaalsetes rakkudes. Viiruse kodeeritud valkudest osalevad PV DNA replikatsioonis 2 valku – E1 ja E2. On teada, E2 osaleb abivalguna vaid replikatsiooni initsiatsioonistaadiumis aidates E1 ori järjestele laadida, samal ajal kui E1 täidab põhilise replikatsioonivalgu funktsioone, omades ori äratundmiseks, DNA ahelate lahtisulatamiseks ja helikaasina töötamiseks vajalikke aktiivsusi. Seega on tekkinud arvamus, et aktiivne viirusgenoomide replikatsioon vajab eelkõige kõrget E1 valgu taset rakkudes.

Koekultuuris BPV-1 esialgsele DNA amplifikatsioonile vastavate tingimuste loomine on olnud suhteliselt hõlbus, kuna kõrgel tasemel BPV-1 E1 valgu ekspresseerivate plasmiidide konstrueerimine probleeme ei tekitanud (Ustav *and* Stenlund, 1991). Seevastu sarnaste konstruktide tegemine HPVde E1 jaoks on nii meie kui ka teiste uurimisgruppide jaoks olnud tõsine väljakutse, kuna tugevat promootorit sisaldavasse ekspressioonivektoris lisatud E1 kodeerivalt järjestuselt sünteesitava täispika E1 valgu hulk on väike (transfekteritud rakkude lüsaadist spetsiifiliste antikehade abil vaevalt detekteeritav) (Remm *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2003; labori avaldamata andmed). Ühe põhjusena on kindlaks tehtud alternatiivse splaissingu toimumine E1 kodeerivalt mRNAlt. Mitmete papilloomiviiruste E1 valkude mRNAdes paikneb 4. koodoni juures tugev splaissingu doonorjärjestus ning suur osa küpseid mRNAsid sisaldab seetõttu vaid osa E1 kodeerivast järjestusest (näide HPV-11 kohta joonisel 7) ning neilt sünteesitavad valgud ei ole võimelised täispikka E1 replikatsiooniprotsessis asendama. Viiruse elutsükli vegetatiivseks replikatsiooniks vajaliku kõrge E1 taseme saavutamiseks võiks seega välja pakkuda ka peremeesrakkude diferentseerumisest sõltuva splaissingukohtade kasutamise. Sarnast mehhanismi on leitud seni BPV-1 L1 valgu ekspressiooni regulatsioonil (Barksdale *and* Baker, 1995). Hiljuti on siiski õnnestunud lisaks varem olemas olnud BPV-1 ja HPV-18 E1 konstruktidele valmistada võrreldavad ekspressiooniplasmiidid ka HPV-11 ja HPV-16 jaoks, mis on võimaldanud meie töögrupis alustada süsteemsemat nn kõrge (HPV-16, HPV-18) ja madala riskiga (HPV-11) HPVde replikatsiooni võrdlevat uurimist erinevates rakuliinides.

Käesoleva töö tulemuste osas on kirjeldatud minu poolt läbi viidud katseid HPV-18 järjestusi sisaldavas HeLa rakuliinis, mis on olnud üheks HPV-positiivsete kartsinoomide uurimise mudelsüsteemiks juba pikka aega. Varasemate andmete põhjal pakuti välja, et HeLa-s (ja ka mõnedes teistes HPV-positiivsetes rakuliinides) ei ole transientselt E1 ja E2 valke ekspresseerides võimalik efektiivset papilloomiviiruste URRi sisaldavate plasmiidide replikatsiooni saavutada (Chiang *et al.*, 1992) ning ühe võimaliku põhjusena on nimetatud seda, et integreerunud HPV-18 järjestustelt ekspresseeritav E1 N-terminaalsele osale vastav valk korjab süsteemist välja replikatsiooniprotsessiks olulise aktiivsusega tsükliin E/CDK2 komplekse (Lin *et al.*, 2000). Märkimist väärib asjaolu, et nendes ülalnimetatud katsetes kasutati analüüsiks vaid HPV-11 ja BPV-1 replikatsioonisüsteemide komponente. Minu poolt läbi viidud katsed näitasid, et nende viiruste E1 ja E2 valkude ekspresseerimisel oli erinevate URR-plasmiidide replikatsioon tõepoolest vaevu detekteeritav, kuid samas selgus, et kõigi papilloomiviiruste kohta seda arvamust laiendada ei saa – nii HPV-16 kui HPV-18 E1 ja E2 valkude abil oli võimalik saada tugevaid replikatsioonisignaale nii homoloogset kui teist tüüpi viiruste URRi sisaldavatelt plasmiididelt (joonis 10). Ühe võimaliku seletusena võiks välja pakkuda, et HPV-16 ja HPV-18 E1 valgud suudavad HeLa rakkudes esineva E1N-vormiga tsükliin E/CDK2 komplekside sidumise pärast edukamalt konkureerida kui HPV-11 ja BPV-1 homoloogid seda teevad, ja seeläbi siiski PV oride replikatsiooni läbi viia.

HeLa-s E1 ja E2 valkude ekspresseerimisel saadud replikatsioonisignaalid sõltuvad ka sellest, millise URR-plasmiidide osa järgi on sünteesitud hübriidsatsiooniproov (joonis 10). Kõigi reporterplasmiidide selgrooks oleva pUC plasmidi järjestuse kasutamine proovi sünteesiks annab replikatsiooniproduktide *southern blot* analüüsil tulemuseks suures osas plasmidi täispikale vormile vastavad signaalid (joonis 10A). Pilt aga muutub suuresti, kui proov on tehtud kõigi nelja katses kasutatud viiruse URRi järjestuste põhjal (joonis 10B). Kooskõlas kirjanduses avaldatud andmetega (Lazo, 1987) ilmuvad *Hind*III ensüümi kasutades sel juhul nähtavale ka HeLa kromosoomidest välja lõigatavad fragmendid 1A, 1B ja 2 (sisaldavad kõik HPV-18 URRi); kuid samas on üllatav, et neile fragmentidele vastavate signaalide tugevus muutub juhul, kui replikatsiooniproduktid pärinevad HPV-18 või HPV-16 E1 ja E2 konstruktidega transfekteeeritud rakkudest. Lisaks esineb osa URRi sisaldavatest replikatsiooniproduktidest üle foreesiraja ulatuva hajusa smäärina, mis näib viitavat varieeruva suurusega DNA molekulide esinemisele. Smääri esinemine on eelkõige detekteeritav HPV-18 E1 ja E2 konstruktidega transfekteeeritud rakkudest pärinevas materjalis

(joonis 10B, rajad 5, 9, 13, 17). Replikatsiooniproduktide esinemist sarnasel kujul on meie laboris läbi viidud katsetes märgatud ka varem – BPV-1 ja HPV-18 URRi sisaldavate plasmiidide replikatsioonil CHO või C33A rakkudes, kui süsteemis esineb kõrgel tasemel sama viiruse E1 valku (Männik *et al.*, 2002; labori avaldamata andmed). On välja pakutud, et selline ori ja külgnevate järjestuste amplifitseerimist tekitav DNA süntees toimub „*onion-skin*“ mehhanismi alusel (joonis 8) ja just kõrge E1 valgu tase muudab viiruse orilt replikatsiooni initsieerimise kontrollimatuks, mille tagajärjel tekib lõpuni sünteesitud reporterplasmidi molekule vähe, enamiku nähtavast tugevast kogusignaalist moodustab üle foresiraja ulatuv smäär.

Joonisel 10 esitatud tulemuste põhjal tekkinud hüpotees, et HeLa rakkudes on mõnede E1 ja E2 valkude abil võimalik HPV-spetsiifilisi replikatsiooniprodukte tekitada ka ilma täiendavat URR-plasmidi rakkudesse transfekteerimata, leidis kinnitust (joonised 11, 12, 13), seega peab vähemalt osa HeLa rakkudes kromosoomidesse integreerituna esinevaid HPV-18 URR järjestusi olema replikatsioonifunktsiooni suhtes intaktsed ja E1 ja E2 seondumisest võimaldavate struktuuride koosseisus. Sellist paikenemist toetavad põhimõtteliselt ka kirjanduse andmed, HPV genoomide integreerumine näib toimuvat eelkõige vähem kondenseerunud kromosoomiosadesse (Choo *et al.*, 1996; Klimov *et al.*, 2002). Kuna varieeruva suurusega replikatsiooniproduktide esinemisele viitav laialimääritud replikatsioonisignaal esineb HPV-18 E1 ja E2 ekspresseerimisel ka eksogeenset ori-plasmidi mitte sisaldavate proovide analüüsil (joonised 11, 12, 13), võib arvata, et intensiivse replikatsiooni initsiatsiooniga toimuvat *onion-skin* mehhanismi on võimalik käivitada ka kromosoomi koosseisus olevatelt HPV-18 oridelt. Kui kaugele HPV URRilt lähtuvad replikatsioonikompleksid orist sellisel DNA sünteesil jõuavad, on raske seniste tulemuste põhjal öelda. Kui replikatsiooniproduktide restrikteerimiseks kasutada ensüümi *Bam*HI, mis lõikab kaht tüüpi (1A, 1B) järjestustest välja enam-vähem URR piirkonnale vastava tüki, koondub suhteliselt suur osa signaalist sellesse fragmenti (joonis 11A). Teise kasutatud ensüümi, *Hind*III, äratundmiskohti HPV genoomis ei esine, seega viitab saadud fragmentide signaalide tugevnemine sellele, et hulk replikatsioonikahvleid peaks olema jõudnud mingil määral amplifitseerida ka HPV DNAGA külgnevaid rakulisi järjestusi, tekitades üle 8 kb suuruseid produkte. Mõneti erinevalt *Bam*HI kasutades nähtust paiknevad *Hind*IIIga lõigatud replikatsiooniproduktid hajusamalt üle kogu foresiraja, suur osa jääb neist ka 10 kb piirist ülespoole (joonised 12, 13A jt). Seega tundub, et sarnaselt tulemustele BPV-1 URR plasmiididega (Männik *et al.*, 2002) on ka HeLa süsteemis kõige rohkem kordistatud vahetult

origa külgnevaid järjestusi. Huvitav aspekt erinevate fragmentide signaalitugevuste kasvu omavahel võrreldes on see, et HPV-18 E1 ja E2 (ja eriti sarnaste koguste HPV-16 E1 ja E2) kasutamisel tugevneb katsetes korduvalt ka fragmendile 2 vastav signaal (nt joonised 10B, 13A), kuigi kirjandusest pärinevate sekveneerimisandmete kohaselt selles fragmendis E1 seostumiskohta ja seega võimalikku funktsionaalset ori olla ei tohiks (Lazo, 1987; Meissner, 1999). Sellele tulemusele on vähemalt kaks võimalikku seletust: esiteks, et lisaks praeguseks kirjeldatud struktuuriga nr 2 fragmentidele esineb mõnes teises integratsiooni-kohas ka veidi enam viirusgenoomi sisaldav sarnane fragment; teiseks, kuna vähemalt ühes integratsiooni-kohas paikneb fragment 2 järjestus kromosoomis füüsiliselt lähedal tervikliku origa 1B järjestusele (Picken *and* Yang, 1987; joonis 9), siis replitseeritakse 1B URRilt algava DNA sünteesi käigus ka järjestust 2. Replikatsiooni alguskohast kaugemale jäävate proovidega hübriidiseerimiskatsete läbi viimist on esialgu takistanud integratsiooni-kohaga külgnevate rakuliste järjestuste kohta täpsema info puudumine. Kogu rakus olevat DNAd see aga ei hõlma, nagu näitab kaspas-3 järjestuse koopiite arvu püsimine muutumatuna ka E1 ja E2-ga transfekteritud HeLa rakkudes (joonis 16). Vähemalt esialgu tundub DNA süntees kulgevat kahes suunas, kuna HPV-18 URRI ning E6 ja E7 põhiste hübriidisatsiooniproovide kasutamisel saadud replikatsioonisignaalide tugevused on sarnased (joonis 16).

Kromosoomis asuvatelt HPV-18 järjestustelt on võimalik spetsiifilist replikatsiooni initsieerida ka HPV-16 E1 ja E2 valke kasutades, kuid väärib mainimist, et saadud replikatsiooniproductide muster oli erinev HPV-18 valkude abil tekkivast (joonis 13A). Eelkõige on detekteeritav muutus diskreetsetele fragmentidele vastavate signaalide tugevustes, smääri esineb väga vähe kui üldse. Samades kogustes HPV-11 või BPV-1 replikatsioonivalkude rakkudesse transfekterimine detekteeritaval tasemel spetsiifilist DNA sünteesi esile ei kutsunud (joonis 13A), vaid HPV-11 E2 kasutamine koos HPV-18 E1ga annab nõrga signaali (joonis 14). BPV-1, HPV-16 ja HPV-18 E1 valkude ekspressioonitasemed HeLa rakkudes tunduvad olevat küllaltki sarnased (joonis 13B), niisiis tuleneb replikatsioonimehhanismide erinevus (ning selle funktsiooni puudumine BPV-1 puhul) tõenäoliselt pigem E1 (ja E2) valkude erinevustest. Võib välja pakkuda mudeli, et kõrge riski HPVde E1 valkude võime nii homoloogset kui teiste viiruste ori järjestustelt replikatsiooni initsieerida on suurem kui madala riski viirusel või BPV-1-l (näiteks võib olla E1 seondumine origa efektiivsem; suudab rohkem rakulisi kromatiini remodelleerimis- või replikatsioonikompleksi kuuluvaid valke orile kohale tuua; enda aktiveerimiseks vajalikku modifitseerivat ensüümi CDKd siduda jpm). Lisaks on kindlasti oma roll ka E2 valgul ja

konkreetsel E1/E2 kompleksil – HPV-18 E1-ga koos BPV-1 ega HPV-11 E2 valkude kasutamine HPV-18 homoloogse süsteemi abil saavutatule võrreldavat replikatsioonisignaali ei andnud (joonis 14). Edasistes katsetes on plaanis erinevate viiruste E1 ja E2 kombineerimisse kaasata ka HPV-16 valgud. Omavahel kahe kõrge riski viiruse – HPV-18 ja HPV-16 – valkude abil tekitatud replikatsiooniprodukte võrreldes näib, et mõlemate E1/E2 kompleksid suudavad HeLa-s edukalt replikatsiooni initsieerida tekitades tugevaid signaale, kuid produktide jaotust jälgides tundub HPV-16 E1 olevat elongatsioonietapis protsessiivsem, sünteesides vähemalt 6-8 kb pikkuseid DNA järjestusi suuremas koguses kui HPV-18 E1. Viimase poolt koos HPV-18 E2-ga tekitatud heterogeenne suuremate replikatsiooniproduktide populatsioon on moodustunud tõenäoliselt hoopis väiksemate ori sisaldavate fragmentide ligeerimisel ja rekombineerimisel, nagu seda on näidatud BPV-1 URRilt lähtuva *onion-skin* replikatsioonil (Männik *et al.*, 2002).

Kliiniliste proovide analüüsid on näidanud, et umbes 10 %-il HPV nakkusjuhtudest leitakse rakkudest mitme erineva viirusetüübi DNAd. Standardtestidega ei saa aga eristada, kas mitu viirust olnud võimelised nakatama ka ühte ja sedasama rakku või on üks osa rakupopulatsioonist nakatunud ühe ja teine osa teise HPVga. *In vitro* eksperimendid selle küsimuse selgitamiseks on näidanud, et lühikese perioodi jooksul on samas rakus võimalik detekteerida ka mitme HPV tüübi DNA esinemist, kuid peagi kipub üks variantidest kaduma (McLaughlin-Drubin *and* Meyers, 2004). Käesolevas töös esitatud katsete tulemusena on selgunud, et vähemasti samas HeLa rakkude populatsioonis saavad replikatsiooniliselt aktiivsed olla nii episoomide kui kromosoomide koosseisus olevad HPV ori järjestused (joonis 10B, joonis 15). HeLa genoomis esineb HPV-järjestusi umbes 50 koopiana, rakkudesse transfekteeritud URR-plasmiidide koosseisus võiks oride arv teoreetiliste arvutuste kohaselt olla kümneid kuni sadu kordi suurem ja seega ka tõenäolisem/kättesaadavam sihtmärk E1/E2 kompleksidele. Ilmselt kasutatud katsesüsteemis enamasti viiruslikke replikatsioonivalkude hulk limiteerivaks ei jää, replikatsiooni initsieeritakse efektiivselt mõlemas konfiguratsioonis oridelt. Huvitavaid tulemusi andis selles osas aga tervet HPV-18 genoomi sisaldava plasmiidi rakkudesse transfekteerimine (joonis 14B). Kui eraldi plasmiidilt sünteesitakse juurde HPV-18 E1, piisab sellest koos viirusgenoomi kontekstist ekspresseeritava E2 kogusega nii ori-plasmiidilt kui integreerunud HPV-18 järjestustelt algava replikatsiooni jaoks. Eelistatud tundub selles süsteemis siiski olevat episomaalne ori, millele vastav signaal on nähtav juba 48 tundi pärast transfektsiooni (joonis 15B, rada 3), 96 h pärast võetud analüüsipunktis on episoomi signaal veelgi tugevam

ning lisandud ka kromosoomist pärinevatele HPV-18 ori järjestustele vastavad signaalid (joonis 15B, rada 4). See, millised on episoomilt ja kromosoomis olevatelt oridelt alanud replikatsioonisignaalide suhted, näib sõltuvat ka sellest, millise viiruse URR (plasmidi koosseisus) integreeritud HPV-18 origa konkureerib (võrdlen fragmentide 1B või 2 signaalide tugevusi transfekteritud URR-plasmiididele vastavate signaalidega) – jooniselt 10 on näiteks näha, et HPV-16 E1/E2 +18 URR süsteemis tekivad enam-vähem võrdse tugevusega signaali kõigi kolme fragmendi (1B, 2, URR-plasmiid) puhul (rajad 5-6); HPV-16 E1/E2 +11 URR puhul on URR-plasmidi signaal teistest kahest tunduvalt tugevam (rajad 13-14); HPV-16 E1/E2 + BPV-1 URR puhul aga jällegi oluliselt nõrgem (rajad 17-18). Nagu varemgi öeldud, tundub laialimääritud replikatsioonisignaali tekitamine olevat omane eelkõige HPV-18 E1/E2 kombinatsioonile (joonis 10B, joonis 13A). Osalt aga näib selles rolli mängivat ka HPV-18 ori järjestus ise, kuna näiteks plasmiididelt, kus esineb HPV-11 või HPV-16 URR, tekib ka HPV-18 valkude abil küllaltki palju täispikka episomaalset produkti (joonis 10B, rajad 9 ja 13). Eelnevat kokku võttes võib öelda, et ilmselt on replikatsioonisignaali tugevuse ja iseloomu määramisel roll mängida kõigil PV replikatsioonisüsteemi viiruslikel komponentidel – nii ori järjestusel kui E1 ja E2 valkude komplekside omadustel.

Varasemates katsetes on näidatud, et BPV-1, HPV-16 või HPV-18 E2 ekspressioon kutsub HeLa rakkudes esile rakutsükli blokeerumist ja apoptoosiprotsessi sageduse tõusu (Hwang *et al.*, 1993; Dowhanick *et al.*, 1995). Minu poolt läbi viidud katsetes vähenes küll suuremate DNA kogustega transfekterides analüüsipunktideks (48 kuni 96 tundi pärast transfektsiooni) elus olevate rakkude arv, kuid materjali oli siiski piisavalt, et detekteerida replikatsiooni toimumist. Paralleelselt replikatsioonianalüüsiga läbi viidud FACSi katse *annexin-FITC*'i kasutades näitas, et apoptoosi on võimalik E2 ekspressioonikonstruktiga transfekteritud rakkudes detekteerida ~2 korda rohkem kui kontrollrakkudes, E1 lisamine süsteemi mõju ei avaldanud (apoptootilised vastavalt 12%, 20% ja 17-20% rakkudest, labori avaldamata andmed).

Esitatud katsete tulemuste põhjal võib väita, et integreerunud HPV-18 oridelt algava E1/E2 sõltuva replikatsiooni käigus kordistatakse ka viiruse DNA külgnevaid rakulisi järjestusi. Selline protsess võiks potentsiaalselt olla raku elutegevust häiriv, kuna tekib mitmes korduses esinevaid DNA fragmente, mis on tõenäoliselt on võimelised olema substraadiks näiteks DNA reparatsiooni- ja rekombinatsiooniprotsessides ja võivad tekitada rakkudes täiendavat geneetilist ebastabiilsust (duplikatsioone, deletsioone). Sellel taustal võiks välja pakkuda

modeli, et nii esialgsel HPV järjestuste integreerumisel kui hilisemal suure arvu HPV-integratsioonikohtade tekkel võib oluline olla „onion-skin“-tüüpi DNA amplifikatsiooni mehhanism, mis käivitub juhul, kui mõne kõrge riski HPV E1 tase reguleeritakse rakkudes mingil põhjusel kõrgeks. Kliiniliste proovide uurimine on näidanud, et HPV-18 DNA esineb kasvajarakkudes eriti sageli integreerunud vormis, näiteks teise kõrge riski viiruse – HPV-16 – puhul leitakse episomaalset vormi märksa enam (Park *et al.*, 1997; Badaracco *et al.*, 2002). Meie laboris tehtud katsetes erineb HPV-18 replikatsioonisüsteem samuti teiste papilloomiviiruste omadest – just HPV-18 replikatsioonikomponentide kasutamisel tekib kõige rohkem varieeruva suurusega ori järjestusi sisaldavaid replikatsiooniprodukte, mis võiks olla „onion-skin“-tüüpi amplifikatsiooni tulemus. Mõnes kartsinoomipäritolu rakuliinis esineb HPV järjestusi väga paljudes kordustes – näiteks rakuliinis CaSki arvatakse olevat 60-600 koopiat HPV-16 järjestusi (Pattillo *et al.*, 1977). Kui oletada, et esialgu toimub HPV intergatsioon vaid mõnesse kohta kromosoomides, võiks nendes järjestustes leiduvatelt oridelt esile kutsutav replikatsioon tekitada HPV DNAd sisaldavate fragmentide arvu suurenemist ja seejärel ka uusi integratsioonisündmusi. Kuna integreerumisel enamasti E1 ja E2 avatud lugemisraamid lõhutakse, võiks sellise replikatsiooni käivitada rakkude teistkordsel nakatumisel kas sama või mõnd teist tüüpi HPVga. Minu poolt läbi viidud katsete põhjal selgus, et HPV-18 genoomi kontekstist ekspresseritavast E2 valgust piisas integreerunud oride aktiveerumiseks täiesti, edaspidi oleks vaja veel täiendavat infot, millistel tingimustel võidakse rakkudes kõrgeks reguleerida E1 taset (alternatiivne splaissing, promootorite kasutamine?). Ilmselt ei saa episomaalsed ja integreerunud HPV genoomide järjestused samas rakus pikemat aega paralleelselt eksisteerida, kuna igas S-faasis uuesti HPV oridelt alustatav kontrollimatu replikatsioon põhjustaks aina suurenevat genoomi ebastabiilsust ja viiks varsti tõenäoliselt rakkude surmani. Seega on tõenäoline, et integreerumissündmustele järgnevas mitoosifaasis segregeeruvad episomaalsed HPV genoomid ebaühtlaselt, osa integreerunud järjestusi sisaldavaid tütarake vabaneb episomaalsetest genoomidest ja neis enam E1 ja E2 valke ei ekspresseerita, saabub stabiilsem seisund. Suuremas koguses HPV genoomifragmente sisaldavates rakkudes on suurem tõenäosus ka intensiivsemaks viiruslike onkovalkude E6 ja E7 ekspressiooniks ning rakkude transformeerunud fenotüübi tekkeks ja säilitamiseks.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse ülevaade papilloomiviirustest, keskendudes nende transkriptsiooni- ja replikatsioonimehhanismide ning kasvaja tekketele viivate protsesside kirjeldamisele. Eksperimentaalses osas uuriti nii rakkudesse transfekteeritud plasmiidides kui raku kromosoomide koosseisus olevatelt papilloomiviiruste ori järjestustelt algavaid replikatsiooniprotsesse, kasutades võrdlevalt ekspressioonikonstrukte nii kõrge kui madala riskiga HPVde E1 ja E2 valkude jaoks.

Töö tulemused:

1. Kõrge riskiga viiruste (HPV-18 või HPV-16) E1 ja E2 valkude ekspressioon HeLa rakkudes käivitab efektiivselt spetsiifilise DNA sünteesi nii vastava viiruse kui teiste viirustüüpide URRidelt. Samadel tingimustel ei ole aga HPV-11 ja BPV-1 replikatsioonivalkude abil võimalik papilloomiviiruste ori järjestustelt replikatsiooni initsieerida, mis viitab sellele et kõrge ja madala riskiga viiruste replikatsioonisüsteemide omadused on põhimõtteliselt erinevad.
2. Vähemalt osa kromosoomis olevaid HPV-18 URR järjestusi peab olema funktsionaalselt terviklikud. Nimelt on lisaks episomaalsete URR-plasmiididele vastavatele signaalidele kõrge riskiga HPVde E1 ja E2 valkude abil detekteeritavad ka teistsugused replikatsiooniproduktid, mis saavad alguse HeLa kromosoomidesse integreerunud HPV-18 järjestustelt ja sisaldavad ka külgevate rakuliste järjestuste DNAd.
3. Kahe testitud kõrge riskiga viiruse – HPV-18 ja HPV-16 – E1 ja E2 valkude poolt tekitatud replikatsiooniproduktide võrdlemine viitab sellele, et nende poolt läbi viidava DNA sünteesi mehhanism on mõnevõrra erinev – kõrgel HPV-18 E1 valgu tasemel tundub algavat nn „onion-skin“ amplifikatsioon, mis viib heterogeense replikatsiooni-produktide populatsiooni tekkeni (signaal on üle foresiraja laiali määratud), samal ajal kui HPV-16 replikatsioon tundub olevat rohkem tasakaalus ja sünteesitavad produktid on pikemad.

4. Samas HeLa rakkude populatsioonis saavad korraga replikatsiooniliselt aktiivsed olla nii plasmidi kui kromosoomide koosseisus papilloomiviiruste ori sisaldavad järjestused.

HeLa katsesüsteemist saadud tulemused võiksid olla kasulikud mõistmaks, miks osa kõrge riski viiruste nakkusjuhtude korral toimub viiruse DNA intergeerumine peremeesraku kromosoomi. Praeguste tulemuste põhjal võiks välja pakkuda hüpoteesi, et esmase eelduse integratsiooniks tekitab episomaalse viirusgenoomi koosseisus oleva ori-piirkonna amplifitseerimine, kui E1 tase reguleeritakse mingil põhjusel süsteemis kõrgeks. Integreeritud vormis viiruse DNAd sisaldavate rakkude teistkordne nakatumine mõne kõrge riski HPV tüübiga võib aga tekitada viirusjärjestuste täiendavat kordistamist ja olulist geneetilist ebastabiilsust, mis võiks kokkuvõttes olla tõukeks pahaloomulistele kasvajatele iseloomulike tunnustega rakupopulatsiooni väljakujunemiseks.

## SUMMARY

### **Replication initiation from various types of papillomaviral origins in HeLa cells**

For quite a long time it has been acknowledged that human papillomavirus infection is the primary cause of the cellular changes leading to the formation of cervical carcinoma. In HPV positive cervical cell populations (especially in malignant cancers), viral DNA is often found integrated into the cellular genome. Cell lines derived from such carcinomas maintain papillomaviral DNA over long-term passaging (i.e. HeLa – established in 1951) and have therefore served as model systems for studying viral-cellular interactions. Integrated sequences can contain various parts of HPV genome, but most often the URR region is present and E6 and E7 ORFs are intact and respective genes expressed. At the same time, E1 and E2 ORFs frequently become disrupted during integration.

It has been stated that HPV positive cell lines, such as HeLa and CaSki, support replication of transfected HPV-origin containing plasmids poorly. In this study I show that efficient replication from papillomavirus origins can take place in HeLa cells when certain conditions are used. Additional expression of high-risk HPV-18 or HPV-16 E1 and E2 replication proteins in these cells gives rise to replication products from plasmids containing variety of papillomavirus origins. Also other types of replication products occur, which seem to have arisen as a result of amplification process starting from integrated HPV-18 origins and extending to surrounding cellular sequences, which suggests, that at least some of the chromosomally integrated HPV-18 origins in HeLa cells must be replication competent. At the same time, comparative analysis of the replication signals while using expression constructs for E1 and E2 of other papillomaviruses types – low risk HPV-11 and BPV-1 –, showed no detectable replication from episomal nor integrated origins. When replication products achieved with high risk HPV-18 and HPV-16 proteins are compared, respective replication mechanisms seem to be somewhat different – with HPV-18 E1 and E2, “onion skin” type amplification of the HPV18 origin linked sequences seems to be started when increased amounts of E1 protein are present, population of replication products is very heterogeneous, appearing as a smear. HPV-16 induced replication also depends on E1 protein level expressed, but replication seems to be more balanced and create longer products. This system may be useful for understanding how integrated state of the high risk papillomaviruses is established in the course of infection.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Ai, W., Narahari, J. and Roman, A. (2000). Yin yang 1 negatively regulates the differentiation-specific E1 promoter of human papillomavirus type 6. *J Virol* **74**(11): 5198-205.
- Ai, W., Toussaint, E. and Roman, A. (1999). CCAAT displacement protein binds to and negatively regulates human papillomavirus type 6 E6, E7, and E1 promoters. *J Virol*. **73**(5): 4220-9.
- Badaracco, G., Venuti, A., Sedati, A. and Marcante, M. L. (2002). HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol* **67**(4): 574-82.
- Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A. and Howley, P. M (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* **61**(4): 962-71.
- Barbosa, M.S., Vass, W. C, Lowy, D. R. and Schiller, J. T. (1991). In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J Virol* **65**(1): 292-8.
- Barksdale, S. and Baker, C. C. (1995). Differentiation-specific alternative splicing of bovine papillomavirus late mRNAs. *J Virol* **69**(10): 6553-6.
- Bayo, S., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Munoz, N., Combita, A. L., Coursaget, P., Diaz, M., Dolo, A., van den Brule, A. J. and Meijer, C. J. (2002). Risk factors of invasive cervical cancer in Mali. *Int J Epidemiol* **31**(1): 202-9
- Bedell, M. A., Jones, K. H. and Laimins, L. A. (1987). The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and rat-1 cells. *J Virol* **61**(11): 3635-40.
- Bodily, J., M. and Meyers, C. (2005). Genetic analysis of the human papillomavirus type 31 differentiation-dependent late promoter. *J Virol* **79**(6):3309-21.
- Bonne-Andrea, C., Santucci, S. and Clertant, P. (1995). Bovine papillomavirus E1 protein can, by itself, efficiently drive multiple rounds of DNA synthesis in vitro. *J Virol* **69**(5): 3201-5.
- Bonne-Andrea, C., Tillier, F., McShan, G. D., Wilson, V. G. and Clertant, P. (1997). Bovine papillomavirus type 1 DNA replication: the transcriptional activator E2 acts in vitro as a specificity factor. *J Virol* **71**(9): 6805-15.
- Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H, Moreno, V., Kurman, R. and Shah, K. V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* **87**(11): 796-802.
- Botchan, M., Topp, W. and Sambrook, J. (1979). Studies on simian virus 40 excision from cellular chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 43 Pt 2:709-19.
- Brink, A. A., Wiegant, J. C., Szuhai, K., Tanke, H. J., Kenter, G. G., Fleuren, G. J., Schuurin, E. and Raap, A. K. (2002). Simultaneous mapping of human papillomavirus integration sites and molecular karyotyping in short-term cultures of cervical carcinomas by using 49-color combined binary ratio labeling fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **134**(2): 145-50.
- Castle, P.E., Wacholder, S., Lorincz, A. T., Scott, D. R., Sherman, M. E., Glass, A. G., Rush, B. B., Schussler, J. E. and Schiffman, M. (2002). A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst* **94**(18): 1406-14.

- Chan, W. K., Klock, G. and Bernard, H. U. (1989). Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol* **63**: 3261-3269
- Chellappan, S., Kraus, V. B., Kroger, B., Münger, K., Howley, P. M., Phelps, W. C. and Nevins, J. R. (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(10): 4549-53.
- Chen, C. M., Shyu, M. P., Au, L. C., Chu, H. W., Cheng, W. T. and Choo K. B. (1994). Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *J Med Virol* **44**(2):206-11.
- Chen, T. R. (1988). Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEp-2 karyotypes. *Cytogenet Cell Genet* **48**(1): 19-24.
- Chiang, C. M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T. F., Broker, T. R. and Chow, L. T. (1992). Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 5799-803.
- Chiang, C. M., Dong, G., Broker, T. R. and Chow L. T. (1992). Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol* **66**(9): 5224-31.
- Chin, M. T., Hirochika, R., Hirochika, H., Broker, T. R. and Chow, L. T. (1988). Regulation of human papillomavirus type 11 enhancer and E6 promoter by activating and repressing proteins from the E2 open reading frame: functional and biochemical studies. *J Virol* **62**(8): 2994-3002.
- Choe, J., Vaillancourt, P., Stenlund, A. and Botchan, M. (1989). Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J Virol* **63**(4): 1743-55.
- Chong, T., Apt, D., Gloss, B., Isa, M. and Bernard, H. U. (1991). The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol* **65**(11): 5933-43.
- Choo, K. B., Pan, C. C. and Han, S. H. (1987). Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. *Virology* **161**(1): 259-61
- Choo, K. B., Chen, C. M., Han, C. P., Cheng, W. T. and Au, L. C. (1996). Molecular analysis of cellular loci disrupted by papillomavirus 16 integration in cervical cancer: frequent viral integration in topologically destabilized and transcriptionally active chromosomal regions. *J Med Virol* **49**(1):15-22.
- Clifford, G. M., Rana, R. K., Franceschi, S., Smith, J. S., Gough, G. and Pimenta, J. M. (2005). Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**(5): 1157-64.
- Cone, R.W., Minson, A. C., Smith, M. R. and McDougall, J. K. (1992). Conservation of HPV-16 E6/E7 ORF sequences in a cervical carcinoma. *J Med Virol* **37**(2): 99-107.
- Cripe, T. P., Haugen, T. H., Turk, J. P., Tabatabai, F., Schmid, P. G. 3rd, Durst, M., Gissmann, L., Roman, A. and Turek, L. P. (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J* **6**(12): 3745-53.
- Cullen, A. P., Reid, R., Campion, M. and Lorincz, A. T. (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* **65**(2):606-12.

- Daniel, B., Rangarajan, A., Mukherjee, G., Vallikad, E. and Krishna, S. (1997). The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. *J Gen Virol* **78**(Pt 5):1095-101.
- DeGregori, J., Kowalik, T. and Nevins, J. R. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* **15**(8): 4215-24.
- del Mar Pena, L. M., Laimins, L. A. (2001). Differentiation-dependent chromatin rearrangement coincides with activation of human papillomavirus type 31 late gene expression. *J Virol* **75**(20): 10005-13.
- Del Vecchio, A. M., Romanczuk, H., Howley, P. M. and Baker, C. C. (1992). Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol* **66**(10): 5949-58.
- Deng, W., Jin, G., Lin, B. Y., Van Tine, B. A., Broker, T. R. and Chow, L. T. (2003). mRNA splicing regulates human papillomavirus type 11 E1 protein production and DNA replication. *J Virol*. 2003 Oct;77(19):10213-26.
- Deng, W., Lin, B. Y., Jin, G., Wheeler, C. G., Ma, T., Harper, J. W., Broker, T. R. and Chow, L. T. (2004). Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase. *J Virol* **78**(24): 13954-65.
- DiLorenzo, T. P. and Steinberg, B. M. (1995). Differential regulation of human papillomavirus type 6 and 11 early promoters in cultured cells derived from laryngeal papillomas. *J Virol* **69**(11): 6865-72.
- DiMaio, D., Guralski, D. and Schiller, J. T. (1986). Translation of open reading frame E5 of bovine papillomavirus is required for its transforming activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(6): 1797-801.
- Dixon, E. P., Pahel, G.L., Rocque, W. J., Barnes, J. A., Lobe, D. C., Hanlon, M. H., Alexander, K. A., Chao, S. F., Lindley, K. and Phelps, W. C. (2000). The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* **270**(2): 345-57.
- Dong, G., Broker, T. R. and Chow, L. T. (1994). Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J Virol* **68**(2): 1115-27.
- Dowhanick, J. J., McBride, A. A. and Howley, P. M. (1995). Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol* **69**(12): 7791-9.
- Drummond-Barbosa, D. A., Vaillancourt, R. R., Kazlauskas, A. and DiMaio, D. (1995). Ligand-independent activation of the platelet-derived growth factor beta receptor: requirements for bovine papillomavirus E5-induced mitogenic signaling. *Mol Cell Biol* **15**(5): 2570-81.
- Durst, M., Dzarlieva-Petrusevska, R. T., Boukamp, P., Fusenig, N. E. and Gissmann, L. (1987). Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* **1**(3): 251-6.
- Dvoretzky I, Shober R, Chattopadhyay SK, Lowy DR. (1980). A quantitative in vitro focus assay for bovine papilloma virus. *Virology* **103**(2): 369-75.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**(15): 2245-62.
- Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K. and Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**(4893): 934-7.
- Einstein, M. H., Cruz, Y., El-Awady, M. K., Popescu, N. C., DiPaolo, J. A., van Ranst, M., Kadish, A. S., Romney, S., Runowicz, C. D. and Burk, R. D. (2002). Utilization of the human genome sequence localizes human papillomavirus type 16 DNA integrated into the TNFAIP2 gene in a fatal cervical cancer from a 39-year-old woman. *Clin Cancer Res* **8**(2): 549-54.

- el Awady, M. K., Kaplan, J. B., O'Brien, S. J. and Burk, R. D. (1987). Molecular analysis of integrated human papillomavirus 16 sequences in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology* **159**(2): 389-98.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**(4): 817-25.
- Farr, A., Pattison, S., Youn, B. S. and Roman, A. (1995). Detection of silencer activity in the long control regions of human papillomavirus type 6 isolated from both benign and malignant lesions. *J Gen Virol* **76**(Pt 4):827-35.
- Flores, E. R. and Lambert, P. F. (1997). Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol* **71**(10): 7167-79.
- Flores, E. R., Allen-Hoffmann, B. L., Lee, D. and Lambert, P. F. (2000) The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* **74**(14): 6622-31.
- Francis, D. A., Schmid, S. I. and Howley, P. M. (2000). Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *J Virol* **74**(6): 2679-86.
- Frattini, M. G. and Laimins, L. A. (1994). The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* **204**(2): 799-804.
- Frattini, M. G. and Laimins, L. A. (1994). Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci* **91**(26): 12398-402.
- Friedl, F., Kimura, I., Osato, T. and Ito, Y. (1970). Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. *Proc Soc Exp Biol Med* **135**(2): 543-5.
- Garcia-Carranca, A., Thierry, F. and Yaniv, M. (1988). Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol* **62**(11): 4321-30.
- Gardiol, D., Kuhne, C., Glaunsinger, B., Lee, S. S., Javier, R. and Banks, L. (1999). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* **18**(40): 5487-96.
- Gey, G. O., Coffman, W. D. and Kubicek, M. T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* **12**: 264-265.
- Giannoudis, A., Duin, M., Snijders, P. J. and Herrington, C. S (2001). Variation in the E2-binding domain of HPV 16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Br J Cancer* **84**(8): 1058-63.
- Gius, D., Grossman, S., Bedell, M. A., Laimins, L. A. (1988). Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J Virol* **62**(3): 665-72.
- Gloss, B., Bernard, H. U., Seedorf, K. and Klock, G. (1988). The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J* **6**(12): 3735-43.
- Gopalakrishnan, V., Khan, S. A. (1994). E1 protein of human papillomavirus type 1a is sufficient for initiation of viral DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20): 9597-601.
- Gopalakrishnan, V., Walker, S. and Khan, S. A. (1995). Stimulation of human papillomavirus type 1a DNA replication by a multimerized AT-rich palindromic sequence. *Virology* **214**(1): 301-6.
- Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K. U. and Iftner, T. (1996). Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol* **70**(4): 2339-49.

- Groff, D. E., Lancaster, W.D.(1986). Genetic analysis of the 3' early region transformation and replication functions of bovine papillomavirus type 1. *Virology* **150**(1): 221-30.
- Guido, M. C., Zamorano, R., Garrido-Guerrero, E., Gariglio, P. and Garcia-Carranca. A. (1992). Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *J Gen Virol* **73**(Pt 6): 1395-400
- Halbert, C. L., Demers, G. W., Galloway, D. A. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* **65**(1): 473-8.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**(4): 805-16.
- Harwood, C. A. and Proby, C. M. (2002). Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer. *Curr Opin Infect Dis* **15**(2): 101-14.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R. and Schiller, J. T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* **8**(12): 3905-10.
- Howley, P. M. (1996). Papillomavirinae: the viruses and their replication. In *Fields' Virology*, B. C. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. (Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers), pp 2045 – 2076.
- Hubert, W. G. and Laimins L. A. (2002). Human papillomavirus type 31 replication modes during the early phases of the viral life cycle depend on transcriptional and posttranscriptional regulation of E1 and E2 expression. *J Virol* **76**: 2263-73.
- Hubert, W. G., Kanaya, T. and Laimins L. A. (1999). DNA replication of human papillomavirus type 31 is modulated by elements of the upstream regulatory region that lie 5' of the minimal origin. *J Virol* **73**(3): 1835-45.
- Hudson, J. B., Bedell, M. A., McCance, D. J. and Laiminis, L. A. (1990). Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J Virol* **64**(2): 519-26.
- Hughes, F. J. and Romanos, M. A. (1993). E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* **25**;21(25): 5817-23.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M. and Howley, P. M. (1993). Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* **13**(2): 775-84.
- Hummel, M., Hudson, J. B., Laimins, L. A. (1992). Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol* **66**(10): 6070-80.
- Hwang, E. S., Riese, D. J. 2nd, Settleman, J., Nilson, L. A., Honig, J., Flynn, S. and DiMaio, D. (1993). Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene. *J Virol* **67**: 3720-9.
- Ide, N., Hata, Y., Nishioka, H., Hirao, K., Yao, I., Deguchi, M., Mizoguchi, A., Nishimori, H., Tokino, T., Nakamura, Y. and Takai, Y. (1999). Localization of membrane-associated guanylate kinase (MAGI)-1/BAI-associated protein (BAP) 1 at tight junctions of epithelial cells. *Oncogene*. Dec 16;18(54):7810-5. *J Clin Virol* **19**(1-2): 1-5.
- Jeon, S., Allen-Hoffmann, B. L. and Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* **69**(5): 2989-97.
- Kalantari, M., Blennow, E., Hagmar, B. and Johansson, B. (2001). Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas *Diagn Mol Pathol* **10**(1): 46-54

- Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama and T., Ishibashi, M. (1997). Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11612-6.
- Klimov, E. A., Vinokourova, S., Moisjak, E. V., Rakhmanaliev, E.R., Kobzeva, V., Laimins, L., Kisseljov, F. L. and Sulimova, G. E. (2002). Human papilloma viruses and cervical tumors: mapping of integration sites and analysis of adjacent cellular sequences. *BMC Cancer* **2**(1): 24.
- Klingelutz, A. J., Foster, S. A., McDougall, J. K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**(6569): 79-82
- Klumpp, D. J., Laimins, L. A. (1999). Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. *Virology* **257**(1): 239-46.
- Klumpp, D. J., Stubenrauch, F. and Laimins, L. A. (1997). Differential effects of the splice acceptor at nucleotide 3295 of human papillomavirus type 31 on stable and transient viral replication. *J Virol* **71**(11): 8186-94.
- Kohler, U. and Wuttke, P. (1994). [Results of a case-control study of the current effect of various factors on risk of cervix cancer. 1. Factors in reproduction, sex behavior and infectious genital diseases] *Zentralbl Gynakol* **116**(6): 318-24.
- Lambert, P. F., Spalholz, B. A. and Howley, P. M. (1987). A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell*. Jul 3;50(1):69-78. *Lancet* **359**(9312): 1085-92.
- Law, M. F., Lowy, D. R., Dvoretzky, I. and Howley, P. M. (1981). Mouse cells transformed by bovine papillomavirus contain only extrachromosomal viral DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(5): 2727-31.
- Lazo, P. A. (1987). Structure, DNaseI hypersensitivity and expression of integrated papilloma virus in the genome of HeLa cells. *Eur J Biochem* **165**(2): 393-401.
- Lee, D., Sohn, H., Kalpana, G. V. and Choe, J. (1999). Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature* **399**(6735): 487-91.
- Lee, S. S., Weiss, R. S. and Javier, R.T. (1997). Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6670-5.
- Lehman, C. W. and Botchan, M. R. (1998). Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(8): 4338-43.
- Lin, B. Y., Ma, T., Liu, J. S., Kuo, S. R., Jin, G., Broker, T. R., Harper, J. W. and Chow, L. T. (2000). HeLa cells are phenotypically limiting in cyclin E/CDK2 for efficient human papillomavirus DNA replication. *J Biol Chem* **275**(9): 6167-74.
- Lindstrom, A., Backstrom, T., Hellberg, D., Tribukait, B., Strang, P. and Stendahl, U. (2000). Correlations between serum progesterone and smoking, and the growth fraction of cervical squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* **20**(5C): 3637-40.
- Longworth M. S. and Laimins, L. A. (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68**(2): 362-72.
- Lorincz, A.T., Reid, R., Jenson, A. B., Greenberg, M. D., Lancaster, W. and Kurman, R. J. (1992). Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* **79**(3): 328-37.
- Lu, J. Z., Sun, Y. N., Rose, R. C., Bonnez, W. and McCance, D. J. (1993). Two E2 binding sites (E2BS) alone or one E2BS plus an A/T-rich region are minimal requirements for the replication of the human papillomavirus type 11 origin. *J Virol* **67**(12): 7131-9.

- Ma, T., Zou, N., Lin, B. Y., Chow, L. T. and Harper, J. W. (1999). Interaction between cyclin-dependent kinases and human papillomavirus replication-initiation protein E1 is required for efficient viral replication. *Proc Natl Acad Sci* **96**(2): 382-7.
- Mantovani, F., Massimi, P. and Banks, L. (2001). Proteasome-mediated regulation of the hDlg tumour suppressor protein. *J Cell Sci* **114**(Pt 23): 4285-92.
- Masterson, P. J., Stanley, M. A., Lewis, A. P. and Romanos, M. A. (1998). A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J Virol* **72**(9):7407-19.
- McBride, A. A., Byrne, J. C. and Howley, P. M. (1989). E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(2): 510-4.
- McLaughlin-Drubin, M. E. and Meyers, C. (2004). Evidence for the coexistence of two genital HPV types within the same host cell in vitro. *Virology* **321**(2): 173-80.
- McPhillips, M. G., Veerapraditsin, T., Cumming, S. A., Karali, D., Milligan, S. G., Boner, W., Morgan, I. M. and Graham, S. V. (2004). SF2/ASF binds the human papillomavirus type 16 late RNA control element and is regulated during differentiation of virus-infected epithelial cells. *J Virol* **78**(19): 10598-605.
- Meissner, J. D. (1999). Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J Gen Virol* **80**: 1725-33.
- Melendy, T., Sedman, J. and Stenlund, A. (1995). Cellular factors required for papillomavirus DNA replication. *J Virol* **69**(12): 7857-67.
- Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P. and Botchan, M. R. (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**(4988): 1694-9.
- Moon, M. S., Lee, C. J., Um, S. J., Park, J. S., Yang and J. M., Hwang, E. S. (2001). Effect of BPV1 E2-mediated inhibition of E6/E7 expression in HPV16-positive cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol* **80**(2): 168-75.
- Moreno, V., Bosch, F. X., Munoz, N., Meijer, C. J., Shah, K. V., Walboomers, J. M., Herrero, R. and Franceschi, S. (2002). Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* **359**(9312): 1085-92.
- Morgenstern, J.P. and Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* **18**(12): 3587-96.
- Mougin, C., Dalstein, V., Pretet, J. L., Gay, C., Schaal, J. P. and Riethmuller, D. (2001). [Epidemiology of cervical papillomavirus infections. Recent knowledge] *Presse Med* **30**(20): 1017-23.
- Munoz, N. (2000) Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* **19**(1-2): 1-5
- Munoz, N., Franceschi, S., Bosetti, C., Moreno, V., Herrero, R., Smith, J. S., Shah, K. V., Meijer, C. J. and Bosch, F. X. (2002). Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* **359**(9312): 1093-101.
- Männik, A., Rünkorg, K., Jaanson, N., Ustav, M. and Ustav, E. (2002). Induction of the bovine papillomavirus origin "onion skin"-type DNA replication at high E1 protein concentrations in vivo. *J Virol* **76**(11): 5835-45.
- Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M. and Huh, K. W. (2004). Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. *J Virol* **78**(21):11451-60.

- Münger, K. (2002). The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci* **7**:d641-9.
- Münger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M. and Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* **63**(10): 4417-21.
- Neary, K. and DiMaio, D. (1989). Open reading frames E6 and E7 of bovine papillomavirus type 1 are both required for full transformation of mouse C127 cells. *J Virol* **63**(1): 259-66.
- Nevins, J. R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**(5081): 424-9.
- Nevins, J. R. (1998). Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ* **9**(8): 585-93.
- Nishimura, A., Ono, T., Ishimoto, A., Dowhanick, J. J., Frizzell, M. A., Howley, P. M. and Sakai, H. (2000). Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J Virol* **4**(8): 3752-60.
- O'Connor, M. and Bernard, H. U. (1995). Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology* **207**(1): 77-88.
- O'Connor, M., Chan, S. Y. and Bernard, H. U. (1995). Transcription factor binding sites in the long control regions of genital HPVs, p. 21-40. In G. Myers, H. U. Bernard, H. Delius, C. Baker, J. Icenogle, A. Halpern, and C. Wheeler (ed.), *Human papillomaviruses*, part III-A.
- Oh, S. T., Longworth, M. S. and Laimins, L. A. (2004). Roles of the E6 and E7 proteins in the life cycle of low-risk human papillomavirus type 11. *J Virol* **78**(5): 2620-6.
- Ozbun, M. A. and Meyers, C. (1998). Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology* **248**(2): 218-30.
- Ozbun, M. A. and Meyers, C. (1998). Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J Virol* **72**(4): 2715-22.
- Park, J. S., Hwang, E. S., Park, S. N., Ahn, H. K., Um, S. J., Kim, C. J., Kim, S. J. and Namkoong, S. E. (1997). Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol Oncol* **65**(1): 121-9.
- Park, P., Copeland, W., Yang, L., Wang, T., Botchan, M. R. and Mohr, I. J. (1994). The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc Natl Acad Sci* **91**(18): 8700-4.
- Park, R. B. and Androphy, E. J. (2002). Genetic analysis of high-risk e6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. *J Virol* **76**(22): 11359-64.
- Pattillo, R. A., Hussa, R. O., Story, M. T., Ruckert, A. C., Shalaby, M. R. and Mattingly, R. F. (1977). Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* **196**(4297): 1456-8.
- Pattison, S., Skalnik, D. G. and Roman, A. (1997). CCAAT displacement protein, a regulator of differentiation-specific gene expression, binds a negative regulatory element within the 5' end of the human papillomavirus type 6 long control region. *J Virol* **71**(3): 2013-22.
- Pecoraro, G., Morgan, D. and Defendi, V. (1989). Differential effects of human papillomavirus type 6, 16, and 18 DNAs on immortalization and transformation of human cervical epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(2): 563-7.
- Picken, R. N. and Yang, H. L. (1987). The integration of HPV-18 into HeLa cells has involved duplication of part of the viral genome as well as human DNA flanking sequences. *Nucleic Acids Res* **15**(23): 10068.

- Piirsoo, M., Ustav, E., Mandel, T., Stenlund, A. and Ustav, M. (1996). Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J* **15**(1): 1-11.
- Pirisi, L., Yasumoto, S., Feller, M., Doniger, J. and DiPaolo J. A. (1987). Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J Virol* **61**(4): 1061-6
- Popescu, N. C., DiPaolo, J. A. and Amsbaugh, S. C. (1987). Integration sites of human papillomavirus 18 DNA sequences on HeLa cell chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **44**(1): 58-62.
- Rapp, B., Pawellek, A., Kraetzer, F., Schaefer, M., May, C., Purdie, K., Grassmann, K. and Iftner, T. (1997). Cell-type-specific separate regulation of the E6 and E7 promoters of human papillomavirus type 6a by the viral transcription factor E2. *J Virol* **71**(9): 6956-66.
- Remm, M., Brain, R. and Jenkins, J. R. (1992). The E2 binding sites determine the efficiency of replication for the origin of human papillomavirus type 18. *Nucleic Acids Res* **20**(22): 6015-21.
- Remm, M., Remm, A. and Ustav, M. (1999). Human papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism. *J Virol* **73**(4): 3062-70.
- Romanczuk, H., Thierry, F. and Howley, P. M. (1990). Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol* **64**(6): 2849-59.
- Ruesch, M. N., Stubenrauch, F. and Laimins, L. A. (1998). Activation of papillomavirus late gene transcription and genome amplification upon differentiation in semisolid medium is coincident with expression of involucrin and transglutaminase but not keratin-10. *J Virol* **72**(6): 5016-24.
- Russell, J., Botchan, M. R. (1995). cis-Acting components of human papillomavirus (HPV) DNA replication: linker substitution analysis of the HPV type 11 origin. *J Virol* **69**(2): 651-60.
- Sailaja, G., Watts, R. M. and Bernard, H. U. (1999). Many different papillomaviruses have low transcriptional activity in spite of strong epithelial specific enhancers. *J Gen Virol* **80** (Pt 7): 1715-24.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. and Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**(6): 1129-36.
- Schiller, J. T., Vass, W. C., Vousden, K. H. and Lowy, D. R. (1986). E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J Virol* **57**(1): 1-6.
- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. and zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**(6006): 111-4.
- Sedman, J. and Stenlund, A. (1998). The papillomavirus E1 protein forms a DNAdependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J Virol* **72**(8): 6893-7.
- Seo, Y. S., Muller, F., Lusky, M. and Hurwitz, J. (1993). Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(2): 702-6.
- Seo, Y. S., Muller, F., Lusky, M., Gibbs, E., Kim, H. Y., Phillips, B. and Hurwitz, J. (1993). Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(7): 2865-9.
- Shepherd, J., Weston, R., Peersman, G. and Napuli, I. Z. (2000). Interventions for encouraging sexual lifestyles and behaviours intended to prevent cervical cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2):CD001035.
- Smith, P. P., Friedman, C. L., Bryant, E. M. and McDougall, J. K. (1992). Viral integration and fragile sites in human papillomavirus-immortalized human keratinocyte cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* **5**(2): 150-7.

Shirasawa, H., Tomita, Y., Kubota, K., Kasai, T., Sekiya, S., Takamizawa, H. and Simizu, B. (1986). Detection of human papillomavirus type 16 DNA and evidence for integration into the cell DNA in cervical dysplasia. *J Gen Virol* **67**: 2011-5.

Shirasawa, H., Tomita, Y., Sekiya, S., Takamizawa, H. and Simizu, B. (1987). Integration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cell lines derived from cervical carcinomas. *J Gen Virol* **68**(Pt 2): 583-91.

Skiadopoulos, M. H. and McBride, A. A. (1998). Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J Virol* **72**(3): 2079-88.

Smotkin, D., Prokoph, H. and Wettstein, F. O. (1989). Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J Virol* **63**(3): 1441-7.

Spalholz, B. A., Lambert, P. F., Yee, C. L. and Howley, P. M. (1987). Bovine papillomavirus transcriptional regulation: localization of the E2-responsive elements of the long control region. *J Virol* **61**(7): 2128-37.

Spalholz, B. A., Yang, Y. C. and Howley, P. M. (1985). Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell* **42**(1): 183-91.

Spink, K. M. and Laimins, L. A. (2005). Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification. *J Virol* **79**(8): 4918-26.

Stanley, M. A., Browne, H. M., Appleby, M. and Minson, A. C. (1989). Properties of a non-tumorigenic human cervical keratinocyte cell line. *Int J Cancer* **43**(4): 672-6.

Stark, G. R. and Wahl, G. M. (1984). Gene amplification. *Annu Rev Biochem* **53**: 447-91.

Steger, G. and Corbach, S. (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol* **71**(1): 50-8.

Stenlund, A. (2003). E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding. *EMBO J* **22**(4): 954-63.

Stenlund, A., Bream, G. L. and Botchan, M. R. (1987). A promoter with an internal regulatory domain is part of the origin of replication in BPV-1. *Science* **236**(4809): 1666-71.

Stenlund, A., Zabielski, J., Ahola, H., Moreno-Lopez, J. and Pettersson, U. (1985). Messenger RNAs from the transforming region of bovine papilloma virus type I. *J Mol Biol* **182**(4): 541-54.

Storey, A., Pim, D., Murray, A., Osborn, K., Banks, L. and Crawford, L. (1988). Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J* **7**(6): 1815-20.

Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., Breuer, J., Leigh, I. M., Matlashewski, G. and Banks, L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* **393**(6682): 229-34.

Stubenrauch, F. and Pfister, H. (1994). Low-affinity E2-binding site mediates downmodulation of E2 transactivation of the human papillomavirus type 8 late promoter. *J Virol* **68**(11): 6959-66.

Stubenrauch, F., Hummel, M., Iftner, T. and Laimins, L. A. (2000). The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J Virol* **74**(3): 1178-86.

Stubenrauch, F., Leigh, I. M. and Pfister, H. (1996). E2 represses the late gene promoter of human papillomavirus type 8 at high concentrations by interfering with cellular factors. *J Virol* **70**(1): 119-26.

Stubenrauch, F., Lim, H. B. and Laimins, L. A. (1998). Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. *J Virol* **72**(2): 1071-7.

Stubenrauch, F., Zobel, T. and Iftner, T. (2001). The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J Virol* **75**: 4139-49.

Sun, Y. N., Lu, J. Z. and McCance, D. J. (1996). Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology* **216**: 219-22

Sverdrup, F. and Khan, S. A. (1995). Two E2 binding sites alone are sufficient to function as the minimal origin of replication of human papillomavirus type 18 DNA. *J Virol* **69**(2): 1319-23.

Swindle, C. S. and Engler, J. A. (1998). Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1. *J Virol* **72**(3): 1994-2001.

Zivaljevic, B., Vlainjac, H., Adanja, B., Zivaljevic, V. and Kocev, N. (2001). Smoking as risk factor for cervical cancer. *Neoplasma* **48**(4): 254-6.

zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**(5):342-50.

Takebe, N., Tsunokawa, Y., Nozawa, S., Terada, M. and Sugimura, T. (1987). Conservation of E6 and E7 regions of human papillomavirus types 16 and 18 present in cervical cancers. *Biochem Biophys Res Commun* **143**(3): 837-44.

Tan, S. H., Gloss, B. and Bernard, H. U. (1992). During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res* **20**(2): 251-6.

Tanaka, A., Noda, T., Yajima, H., Hatanaka, M. and Ito, Y. (1989). Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *J Virol* **63**(3): 1465-9.

Thierry, F. and Howley, P. M. (1991). Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter. *New Biol* **3**(1): 90-100.

Thomas, D. B., Ray, R. M., Koetsawang, A., Kiviat, N., Kuypers, J., Qin, Q., Ashley, R. L. and Koetsawang, S. (2001). Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. I. Risk factors for invasive cervical carcinomas with human papillomavirus types 16 and 18 DNA. *Am J Epidemiol* **153**(8): 723-31

Thomas, J. T., Oh, S. T., Terhune, S. S. and Laimins, L. A. (2001). Cellular changes induced by low-risk human papillomavirus type 11 in keratinocytes that stably maintain viral episomes. *J Virol* **75**(16): 7564-71.

Thomas, J. T., Hubert, W. G., Ruesch, M. N. and Laimins, L. A. (1999). Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(15): 8449-54.

Thorland, E., Myers, S., Persing, D., Sarkar, G., McGovern, R. M., Gostout, B. and Smith, D. I. (2000) Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res* **60**: 5916-21.

Titolo, S., Brault, K., Majewski, J., White, P. W and Archambault, J. (2003). Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus e1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein. *J Virol* **77**(9): 5178-91.

Tonon, S. A., Picconi, M. A., Bos, P. D., Zinovich, J. B., Galuppo, J., Alonio, L. V. and Teyssie, A. R. (2001). Physical status of the E2 human papilloma virus 16 viral gene in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Clin Virol* **21**(2): 129-34.

Ushikai, M., Lace, M. J., Yamakawa, Y., Kono, M., Anson, J., Ishiji, T., Parkkinen, S., Wicker, N., Valentine, M. E., Davidson, I., et al. (1994). trans activation by the full-length E2 proteins of human papillomavirus type 16 and bovine papillomavirus type 1 in vitro and in vivo: cooperation with activation domains of cellular transcription factors. *J Virol* **68**(10): 6655-66.

- Ustav, E., Ustav, M., Szymanski, P. and Stenlund A. (1993). The bovine papillomavirus origin of replication requires a binding site for the E2 transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(3): 898-902.
- Ustav, M. and Stenlund, A. (1991). Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J* **10**(2): 449-57.
- Ustav, M., Ustav, E., Szymanski, P. and Stenlund, A. (1991). Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J* **10**(13): 4321-9.
- Van Tine, B. A., Dao, L. D., Wu, S. Y., Sonbuchner, T. M., Lin, B. Y., Zou, N., Chiang, C. M., Broker, T. R., and Chow, L. T. (2004). Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci* **101**(12): 4030-5.
- Veldman, T., Horikawa, I., Barrett, J. C. and Schlegel, R. (2001). Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* **75**(9): 4467-72.
- Wilke, C. M., Hall, B. K., Hoge, A., Paradee, W., Smith, D. I. and Glover, T. W. (1996). FRA3B extends over a broad region and contains a spontaneous HPV16 integration site: direct evidence for the coincidence of viral integration sites and fragile sites. *Hum Mol Genet* **5**(2): 187-95.
- Woodworth, C. D., Doniger, J. and DiPaolo, J. A. (1989). Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *J Virol* **63**(1): 159-64.
- Yang, L., Li, R., Mohr, I. J., Clark, R. and Botchan, M. R. (1991). Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature* **353**(6345): 628-32.
- Yasumoto, S., Burkhardt, A. L., Doniger, J. and DiPaolo, J. A. (1986). Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J Virol* **57**(2): 572-7.
- You, J., Croyle, J. L., Nishimura, A., Ozato, K. and Howley, P. M. (2004). Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* **117**(3): 349-60.