

· 论著 ·

人乳头瘤病毒 2(HPV2) E2 蛋白不同功能区突变对转录抑制作用影响的研究

高晨, 雷艳君, 姜慧英, 石琦, 田婵, 韩俊, 董小平

【摘要】 目的 研究 HPV2 变异株上 E2 蛋白不同功能区域的点突变对其转录作用的影响。**方法** 根据 HPV2 突变株 E2 上的突变点设计引物, 采用延伸法构建不同的 E2 突变体, 并插入到真核表达质粒 pcDNA3.1 中。表达不同突变体 E2 的 pcDNA3.1-E2 与带有 HPV 原毒株 LCR 的 CAT 报道基因载体进行共转染 HeLa 细胞。通过检测 CAT 的表达量对不同 E2 突变体的转录抑制作用进行评估。**结果** 与全长的原毒株 E2 相比较, 去除 N 端及 C 端功能区的 E2 蛋白均降低了 E2 蛋白对启动子活性的抑制作用。位于 E2 蛋白转录激活区(nt 3037), 铰链区(nt 3387)及 DNA 结合区(nt 3697)的点突变明显影响了其转录抑制功能。**结论** HPV2 E2 蛋白的转录调节功能与其转录激活区以及 DNA 结合区密切相关。HPV2 突变株上的不同的 E2 的单个突变点能够明显降低 E2 蛋白对启动子活性的抑制作用。

【关键词】 乳头状病毒, 人; 病毒蛋白质类; 突变; 启动区(遗传学)

Mutations in various functional domains of HPV2 E2 protein inhibit the transcriptional depression activities GAO Chen, LEI Yan-jun, JIANG Hui-ying, SHI Qi, TIAN Chan, HAN Jun, DONG Xiao-ping. State key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

Corresponding author: DONG Xiao-ping, Email: dongxp238@sina.com

【Abstract】 Objective To study the potential transcriptional depression activities of HPV2 E2 proteins with mutations in different functional domains. **Methods** The primers for constructing various E2 mutants were synthesized based on a HPV2 isolate containing several point mutations within E2 open reading frame. Different E2 mutations were generated by the method of extending PCR and inserted into plasmid pcDNA3.1. Various recombinant mammalian expression plasmids pcDNA3.1-E2 were co-transfected into HeLa cells together with a CAT-reporter plasmid pBLCAT-LCR containing HPV-2 prototype LCR, respectively. The transcriptional repression activities of the E2 mutants were evaluated by detection of CAT expression values. **Results** Compared with the full-length prototype E2, removals of both N- and C-terminal domains abolished E2 transcriptional repressive activities. The point mutations in the transactivation domain (nt 3037), the internal hinge region (nt 3387) and DNA binding domain (nt 3697) showed remarkable inhibition on its transcriptional depression function. **Conclusion** The transcriptional regulation activity of HPV2 E2 is related with its DNA binding and transactivation domains. The exchanges of the single amino acid within E2, derived from a HPV2 isolate, abolish significantly the repressive effect on viral promoter in the context of full-length E2.

【Key words】 Papillomavirus, human; Viral proteins; Mutation; Promoter regions (genetics)

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的早期蛋白 E2 可以通过与 LCR 上的转录因子结合位点(binding sites, BS)结合, 从而调节早期启动子的

活性。

我们以前的研究发现, 一株来自巨大寻常疣患者的 HPV2 变异株 E2 蛋白存在有少量的氨基酸突变, 变异株的 E2 蛋白对病毒启动子的抑制活性显著降低^[1]。在此基础上, 我们构建了有不同单一点突变的 E2 蛋白的重组真核表达质粒, 与带有 HPV LCR 序列的 CAT 报道基因重组质粒进行共转染, 对 E2 不同区域点突变的转录作用进行了研究。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2011.03.002

作者单位: 100052 北京, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室

通信作者: 董小平, Email: dongxp238@sina.com

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂 带有突变 HPV2 E2 的哺乳动物细胞表达重组质粒 pc-DNA3.1-E2、带有 HPV-2 原毒株 LCR 序列的报道质粒 pBLCAT-LCR 为本课题组保存^[1]。CAT ELISA Kit 购自瑞士 Roche 公司。

1.2 E2 蛋白的突变体序列的引物设计 我们以往研究证明来自一例巨大寻常疣患者组织中的 HPV-2 分离株 (Isolate 1) 的 E2 蛋白对病毒早期启动子活性的抑制作用明显降低^[1]。经过对 E2 开放阅读框架 (Open reading frame, ORF) 测序后,发现存在多点突变 (表 1):

表 1 HPV-2 变异株 E2 核酸及氨基酸序列的突变

Tab. 1 Nucleotide and amino acid mutations of HPV-2 variant within E2 ORF

核酸 Nucleotide			氨基酸 Amino acid		
位置 (nt) Position	标准株 Prototype	变异株 Variant	位置 (aa) Position	标准株 Prototype	变异株 Variant
3037	T	C	118	L	S
3387	T	C'	235	S	P
3543	T	C	287	Y	H
3561	A	C	293	S	R
3697	C	T	338	A	V

根据 HPV-2 原毒株基因序列 (NC001352) 设计 HPV-2 E2 基因 (nt 2685 ~ 3860) 的引物,上下游引物分别引入 Hind III、BamHI 酶切位点。Primer-E2 上游: 5' AAGCTTATGGAAACACTGGCGAACCGT3', Primer-E2 下游: 5' GGATCCTTATACAAATGCAGACATATACCC3'。同时设计 E2 蛋白 N (nt 3252) 端和 C 端扩增引物 (nt 3389), Primer-E2N 下游: 5' GGATCCTTATGATTCTGCTGAGGC3', Primer-E2C 上游: 5' CTTAAGGTGGCTGGG ACTGTTATTCAC3' 根据突变株上的突变点设计引物,以标准株为模板,对 3037nt、3387nt 和 3697nt 位置进行突变。突变引物如下: Primer-3037: 上游 5' GGACAATCAGTATCAGTGAATTTGATGGCAGCAG3'; 下游 5' CTGCTGCCATCAAATTTCACTGATACTGATTGTCC3'; Primer-3387: 上游 5' CCTCAGCAGAACCAACAGGAGCAGGAAGA 3'; 下游 5' TCTTCCTGCTCCTGTGGTTCTGCTGAGG3'; Primer-3697: 上游 5' AGACGTACTGTATGTCAGGGTGTCTCCACGT3', 下游: 5' ACGTGGAGGACACCCTGACATACAGTACGTCT3'。

1.3 E2 突变体序列的扩增及质粒构建 分别以 Primer-E2 上游引物和 Primer-E2N 下游扩增 E2 蛋

白 N 端, Primer-E2C 上游和 Primer-E2 下游引物扩增 E2 蛋白 N 端。回收纯化后连接,构建重组质粒 pT-E2ΔC 和 pT-E2ΔN。经测序正确后,游离出片段并亚克隆至载体 pcDNA3.1,构建质粒 pc-E2ΔC 及 pc-E2ΔN。

采用延伸法构建突变的 E2 基因序列。以构建带有 3037 点突变的 HPV-2 E2 基因为例,用 Primer-E2 上游和 Primer-3037 下游引物,以及 Primer-3037 上游和 Primer-E2 下游引物分别扩增 HPV-2 E2 基因的 N 和 C 端。扩增出的 DNA 片段回收纯化后进行重叠延伸反应。回收产物,与 pMD18-T vector 连接构建重组质粒 pT-3037E2。经测序正确后,游离出 E2 片段并亚克隆至载体 pcDNA3.1,构建质粒 pc-3037E2。以同样的方法构建质粒 pc-3387E2 和 pc-3697E2。

1.4 脂质体介导的 HeLa 细胞瞬时转染 人宫颈癌上皮细胞系 HeLa 细胞在含有 10% 小牛血清的 DMEM 中生长。收集对数生长期细胞,调整细胞浓度,以 $(0.5 \sim 1) \times 10^6$ /孔接种至 6 孔板中,按 Lipofectamine TM 2000 Reagent 说明进行质粒 DNA 转染。分别以 2 μg 报道质粒 pBLCAT-LCR 与 500 ng 的各种 HPV2 E2 蛋白重组表达质粒共转染 HeLa 细胞。以上转染均以 1 μg pCMV-β-gal 质粒作为内对照来消除由于不同孔、不同批次之间转染效率不同对实验结果造成的影响。

1.5 转染细胞中 CAT 表达量的检测 细胞转染后 48 h 收获细胞,裂解细胞获得细胞上清液。ELISA 方法检测上清中 CAT 的表达量,具体操作按 CAT ELISA Kit 说明进行。β-gal 表达量按照 ONPG 检测方法测定。以 CAT 测定值与 β-gal 测定值之比为 CAT 表达值,以各实验组 CAT 值与单纯转染质粒 pBLCAT-LCR 的 CAT 之比为相对 CAT 表达值。

2 结果

2.1 设计的突变株 HPV2 E2 上的点突变 分别构建了位于不同 E2 蛋白功能区的重组真核表达质粒,包括位于 C 端 DNA 结合区的突变体 3697 E2 和 C 端完全缺失的 E2ΔC; N 端转录激活区的突变体 3037 E2 和 N 端缺失体 E2ΔN; 以及位于两个功能域之间铰链区的突变株 3387 E2。所有 HPV2 E2 突变体序列均经序列测定证实,各突变体的构成和突变位点如图 1 所示。

2.2 各种 HPV-2E2 蛋白突变体对启动子抑制作用

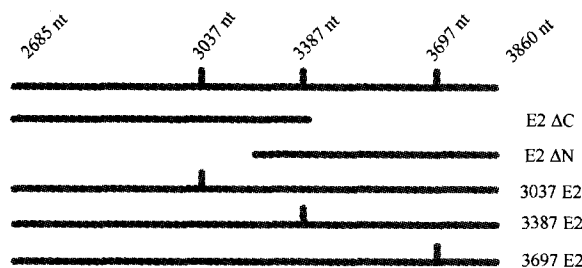


图 1 各种 HPV E2 突变体突变位点示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the constructed HPV2 E2 mutants

的影响 分别将带有 HPV-2 原毒株 LCR 序列的报道质粒 pBLCAT-LCR 和各种 HPV E2 表达质粒共转染 HeLa 细胞, 48h 后检测 CAT 表达值。结果显示与单纯转染 HPV-2 原毒株 LCR 报道质粒相比, 共转染 HPV-2 原毒株 E2 表达质粒的 CAT 相对表达值明显下降(图 2, 第 2 列), 降至 26% 以下, 提示 HPV E2 蛋白对于启动子活性呈现明显的抑制作用。

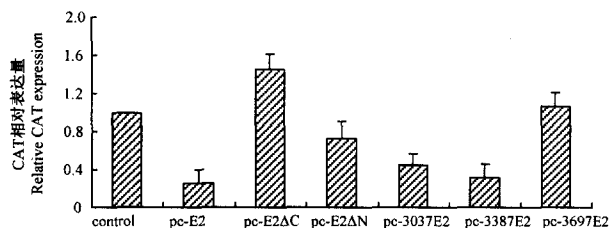


图 2 HPV-2 原毒株和突变株的 E2 蛋白对启动子活性的影响

Fig. 2 Analyses of the repressive effectiveness of prototype and mutations of HPV2 E2 proteins on the promoter activities

HPV E2 蛋白 C 端区被认为是 E2 蛋白的 DNA 结合区^[2]。共转染结果显示 C 端缺失的 E2 突变体 (E2ΔC) 不仅失去了对启动子活性的抑制作用, 而且在某种程度上促进了启动子活性 (CAT 相对表达值增加 1.45 倍, 图 2, 第 3 列)。位于 C 端的 E2 点突变株 (3697 E2) 也完全失去了启动子的抑制作用 (图 2, 第 7 列)。E2 蛋白 N 端区域是蛋白转录激活区, 共转染结果显示 N 端缺失突变体 (E2ΔN) 虽然仍具有部分启动子抑制活性, 但较全长原毒株 E2 蛋白的抑制作用明显为低 (图 2, 第 4 列)。同时位于 N 端的 E2 点突变体 (3037 E2, 图 2, 第 5 列) 对启动子抑制活性也明显低于全长原毒株 E2 蛋白, 但强于 N 端缺失突变体 (E2ΔN)。此外, nt 3387 的点突变位于 E2 蛋白的 DNA 结合区以及转录调节区之间的铰链区。共转染结果显示这一 E2 突变体

(3387E2) 也能够降低 E2 蛋白对病毒早期启动子的转录抑制作用 (图 2, 第 6 列)。

3 讨论

E2 蛋白结构上可分为 C 端的 DNA 结合区、N 端的转录调节区以及两者中间的铰链区^[3]。研究显示 E2 蛋白 C 端的缺失会影响其与 DNA 的结合, 从而去除了 E2 蛋白对转录复合物的空间阻碍作用, 使启动子的活性明显增加^[4], 这个结论在我们的实验中也得以证实。同时发现 C 端 nt 3697 位点丙氨酸转变为缬氨酸 (A→V) 的突变也能使启动子活性增加, 这提示这一位点可能存在于 E2 蛋白的 DNA 结合功能域。

E2 蛋白的 N 端区域具有转录调节作用, 我们实验证明缺失 N 端序列的 E2 蛋白其对启动子的转录调节作用明显减弱。同时位于 N 端区域的点突变 (nt 3307) 在全长 E2 蛋白的框架下对启动子活性的影响也减弱。这些结果提示 E2 蛋白对启动子的影响可能不仅仅是依赖其与启动子上游序列结合后的空间位阻效应, E2 蛋白 N 端区域本身也具有转录调节活性, 而 nt 3307 位的氨基酸可能是位于 E2 蛋白调节活性的核心。对于铰链区在 E2 功能中的作用研究较少, 我们发现铰链区的 3387 突变点也能够影响 E2 对启动子活性的抑制作用, 这说明铰链区的变化可能会影响到蛋白与 DNA 结合后的空间结构变化。对于这些 E2 突变位点与其启动子活性之间存在关系的研究, 将进一步研究 HPV E2 转录机制、揭示与罕见巨大寻常疣临床表型之间存在着重要的联系提供重要的线索。

4 参考文献

- [1] Lei YJ, Wang C, Gao C, et al. HPV-2 Isolates from Patients with Huge Verrucae Vulgaris Possess Stronger Promoter Activities. Intervirology, 2007, 50:353-360.
- [2] Burns JE, Burn CL, Hernandez-Ramon EE et al. Forms and functions of papillomavirus E2 proteins. Recent Res Dev Biochem, 2003, 4:795-832.
- [3] Turek LP. The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. Adv Virus Res, 1994, 44:305-356.
- [4] Hartley KA, Alexander KA. Human TATA binding protein inhibits human papillomavirus type 11 DNA replication by antagonizing E1-E2 protein complex formation on the viral origin of replication. J Virol, 2002, 76:5014-5023.

(收稿日期: 2010-08-12)