

國立台灣大學醫學院微生物學科暨研究所



碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Dissertation

人類乳突瘤病毒 16 型 通過 E2 蛋白質 S243 磷酸化修

飾調節與 Brd4 及宿主染色體連接

Phosphorylation of HPV-16 E2 at serine 243 enables

binding to Brd4 and mitotic chromosomes

劉未辰

Wei-Chen Liu

指導教授：陳小梨 博士

Advisor: Show-Li Chen, Ph. D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：人類乳突瘤病毒 16 型 E2 蛋白質磷酸化修飾對其與宿主染色體鏈接的影響

英文題目：Phosphorylation Regulates Binding of the Human Papillomavirus Type 16 E2 Protein to Host Chromosomes

本論文係 劉未辰 君 (學號 R00445129) 在國立臺灣大學微生物學所完成之碩 (博) 士學位論文，於民國 103 年 7 月 25 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

陳小梨

(簽名)

(指導教授)

陳善如

李迺之

系主任、所長

鄧 (杜)

(簽名)

序言

經過三年時間，由中國大陸來到台灣，完成了與以往大學學習迥然不同的學術經歷。我想我在此學到的不僅僅是知識和實驗方法，還有更進一步的思考問題以及面對困難的態度。不僅限於學術領域，這些收穫對於我今後生活必當有莫大幫助。

首先我要感謝我的家人，特別是我的父母，在他們的支持與鼓勵下，我最終決定來到台灣大學。有了他們不斷的支持，我得以克服學術及生活中面對的各種困難。我今後如果有些微成就，也同樣是屬於你們的

由衷感謝的是 陳小梨老師，除了給予學術上的指導與支持，老師對於學術的熱忱與堅持，對未知事物探索的行動力，是我最好的榜樣。面對困難時，老師對我的包容以及教導也使我能夠順利完成碩班的研究。另外特別感謝陳美如老師，詹迺立老師對我的不吝指導。

感謝實驗室的大家：秉昌、立博、思為、信雄、楚歲、思瑜、怡真、婉倫、元駿、彥嘉、孟萱、暉竣、冠渝、怡文還有許多曾經相處的學長姐與學弟妹，大家在實驗和生活中給予我很多的幫助，從清晨到午夜，小梨實驗室總是充滿著歡笑與溫馨。特別感謝思為學長在實驗知識技術上對我的耐心指導及關鍵的幫助，讓我建立了對生物學實驗方法的正確認識與操作。

特別感謝國立海洋大學的許邦弘博士，第一共研顯微影像核心的黃博士與徐華蔓小姐。在我不熟悉的領域，這些專業人士給予了我關鍵性的幫助。



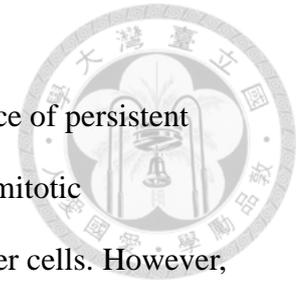
中文摘要



人類乳突瘤病毒(Human papillomavirus,HPV)的 E2 蛋白對病毒生命週期有著重要的影響。E2 蛋白會影響病毒的複製，轉錄和 segregation。之前大量研究表明 E2 蛋白在細胞分裂時鏈接病毒 DNA 與宿主染色體，使病毒 DNA 可以均勻分佈到兩顆細胞。根據前人研究得知人類乳突瘤病毒 8 型 E2 蛋白的 S253 位置的磷酸化會消失會導致 E2 蛋白在宿主細胞細胞分裂時不能與染色體鏈接。其中一個人類乳突瘤病毒 16 型 E2 蛋白上的磷酸化位置 S243。其磷酸化的消失會使大部分 E2 蛋白在細胞分裂時從染色體脫落。並且其影響 E2 蛋白與染色體鏈接的能力是通過 (Bromodomain-containing protein 4) Brd4 實現的。

ABSTRACT

The human papillomavirus E2 protein is involved in the maintenance of persistent infection and known to bind either to cellular factors or directly to mitotic chromosomes in order to partition the viral genome into the daughter cells. However, how the HPV-16 E2 protein acts to facilitate partitioning of the viral genome remains unclear. In this study, we found that serine 243 of HPV-16 E2, located in the hinge region, is crucial for chromosome binding during mitosis. Bromodomain protein 4 (Brd4) has been identified as a cellular binding target through which the E2 protein of bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) tethers the viral genome to mitotic chromosomes. Mutation analysis showed that, when the residue serine 243 was substituted by glutamic acid or aspartic acid, whose negative charges mimic the effect of constitutive phosphorylation, the protein still can interact with Brd4 and colocalize with Brd4 in condensed metaphase and anaphase chromosomes. However, substitution by the polar uncharged residues asparagine or glutamine abrogated Brd4 and mitotic chromosome binding. Thus, phosphorylation of serine 243 in the hinge region of HPV-16 E2 is essential for interaction with Brd4 and required for host chromosome binding.



目 錄



口試委員會審定書

序言.....	i
中文摘要	ii
Abstract	ii
第一章 緒論	1
第二章 材料和方法	4
第三章 試驗結果	6
第四章 討論	9
參考文獻	12
表格圖片	17
附錄	22

第一章 緒論



乳突瘤病毒 (papillomavirus, PV) 是一種常見的小雙鏈 DNA 病毒，感染人類的皮膚或粘膜細胞。人類乳突瘤病毒作為一種廣泛傳播的性傳染病，大部分感染者並不產生明顯的症狀表現。但是部分感染者會被該病毒誘發癌症或感染部位的疣狀病變。由該病毒誘發的子宮頸癌在發達國家女性當中發病率很高[1-3]。乳突瘤病毒的複製週期與宿主基底層細胞的分化週期相同。病毒感染皮膚和粘膜的基底層細胞之後，以低拷貝數遊離 DNA 存在於細胞中，且病毒的複製週期與宿主 DNA 同步。E2 蛋白鏈接病毒 DNA 宿主染色體，從而在有絲分裂過程中病毒 DNA 伴隨姐妹染色體分離，分配病毒 DNA 到兩個細胞中。這一機制可以使病毒在低拷貝數的情況維持持續感染，使病毒 DNA 可以隨著被感染宿主細胞的分化和分裂，到達皮膚或粘膜的表層，並最終完成病毒的組裝。[4-6]。乳突瘤病毒的 E2 蛋白在病毒感染過程中發揮多種功能，除了病毒 DNA segregation，還參與調節病毒蛋白 E6 和 E7 的轉錄，以及參與病毒基因複製起始。E2 蛋白由三個主要的結構域組成，位於 C 端的與 DNA 結合或二聚化結構域 (carboxy-terminal DNA binding and dimerization domain, CTD)，位於 N 端的轉錄活化結構域 (N-terminal transcriptional activation domain, TAD); 以及中間的連接結構域 (hinge region, HR) [7-8]。其中 CTD 與 TAD 的序列在不同類型 HPV 直接相對保守，而 HR 則變化很多[4]。通過 CTD，E2 蛋白可以與病毒 DNA 上位於 long control

region (LCR)的 12bp 的重複序列 (fACCN₆GGT) 結合，從而參與病毒轉錄的調節。而位於 N 端的 TAD 則通過結合多種宿主細胞的轉錄調控蛋白 (TFIIB, NAP-1, p300/CBP, p/CAF, 9GR, NRIP and Brd4) 參與轉錄調節[10-17]。



Brd4 是一個 BET 家族蛋白，通過兩個 bromodomains 結合 histone H3 H4 上面乙酰化的 lysine，並且參與維持有絲分裂時期染色體的結構[18,19]。前人的研究發現 Brd4 與 E2 存在很多重要的相互作用。Brd4 通過它的 C-terminal domain (CTD)與 HPV 或 BPV 的 E2 蛋白結合[18-22]。Brd4 的 CTD 被發現可以作為 dominant-negative inhibitor 阻止 Brd4 與 E2 的相互作用，使 E2 蛋白從染色體上面脫離。並且 Brd4 被發現參與 HPV 的 DNA 複製，在有絲分裂時參與 segregation [24-26]。

至今，E2 蛋白在有絲分裂分配病毒 DNA 的具體機制仍然沒有全面瞭解。前人研究發現 E2 蛋白的功能受轉錄後磷酸化修飾調節。hinge regions 的磷酸化會改變 E2 與染色質結合的能力(HPV-8)，以及影響 E2 通過蛋白酶降解 (BPV-1)[27,28]。實驗室之前的研究發現 HPV-16 E2 蛋白會被磷酸化修飾，而且通過 NRIP 介導的 Ca²⁺/calcineurin phosphatase 去磷酸化可以改變 E2 蛋白的半衰期。

根據前人研究結論，因為 HPV-16 E2 的磷酸化會改變其半衰期，HPV-8 E2 hinge region S253 磷酸化會其參與 segregation 功能及穩定性，Brd4 是已知與 HPV-16 E2 segregation 功能相關的蛋白[24-26]。因此，我計劃研究在 HPV-16 E2

上磷酸化位點與其參與 segregation 的關係，同時瞭解 HPV-16 E2 磷酸化與 E2 和 Brd4 相互作用的關係。



在實驗過程中，發現了 HPV-16 E2 蛋白 hinge region 上 S207，S243 兩個氨基酸殘基可以被磷酸化修飾。而且通過的點突變改變位於的 243 的氨基酸，證實 S243 在 E2 蛋白 結合染色體及 Brd4 的過程中起了重要作用。之後又發現 Brd4 抑制劑 JQ1(+)可以使 E2 foci 從染色體上脫落。根據試驗結果，推斷 HPV-16 E2 蛋白通過 S243 的磷酸化結合 Brd4，從而使其在宿主細胞有絲分裂的過程中可以連接在染色體上面。

第二章 材料和方法



Plasmid Construction

pEGFP-16E2 由實驗室張思為博士製作[15]。E2 蛋白的點突變

pEGFP-16E2-S207A，pEGFP-16E2-S243A，pEGFP-16E2-S243D，

pEGFP-16E2-S243E，pEGFP-16E2-S243N，pEGFP-16E2-S243Q 是以 pEGFP-16E2

為範本通過 PCR-directed mutagenesis 得到。

Immunoprecipitation and western blotting

pEGFP-16E2 轉染 293T 細胞中表達 24h，MG132 處理 16h 抑制 E2 蛋白被

proteasome 降解，用 0.1% 及 1% NP-40 提取細胞核蛋白，使用 anti EGFP 抗體進

行免疫沉澱濃縮 E2，及 tris-acetic acid gel SDS-PAGE 分離，之後用 coomassie blue

染色

Cell culture

HEK293，C33A 及 Cos-7 細胞系使用 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium)

培養基，並添加 10% FBS, 1% MEM nonessential amino acids solution

(Invitrogen)，2 mM L-glutamine，以及抗生素培養。

Fluorescence microscopy assay and cell cycle control

使用 hyperfectin (Omics Bio), Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) 或 FuGENE® HD 對 C33A 及 Cos-7 細胞進行質粒轉染,將 GFP 熒光蛋白 fusion 的 HPV-16 E2 送入細胞。轉染 24h 後,培養基中加入 2 mM thymidine (Sigma)作用 14 h,之後移除 thymidine 並持續培養 9h。JQ1(+) (Bio Vision)在培養過程最後 3 小時加入。細胞在室溫經由 4% paraformaldehyde-phosphate-buffered saline (PBS)固定 10min,含 0.3% Triton X-100 的 PBS 溶液進行穿孔 5min,0.5% bovine serum albumin (BSA) 進行 block, Brd4 經由 monoclonal rabbit anti-Brd4 antibody (Abcam)偵測。最後在使用 monoclonal rabbit anti-Brd4 antibody (Abcam)封片後,利用 Leica TCS-SP5 laser scanning confocal imaging system 進行共軛焦掃描分析。



第三章 實驗結果



HPV-16 E2 243 絲氨酸 (serine) 的磷酸化會影響 E2 蛋白在細胞有絲分裂時與宿主染色體的結合。

之前研究證實 E2 蛋白的磷酸化與 E2 蛋白的穩定性有很大關係[15]，使用 EGFP 標記的 HPV-16 E2 質粒轉染 293T 細胞，並且為了得到可以滿足分析需要的磷酸化 E2 蛋白，使用 proteasomal inhibitor MG132 抑制 E2 蛋白的降解。對所得蛋白質使用 anti-EGFP 抗體純化後，進行質譜(Mass Spectrometry,MS)分析來確定 E2 蛋白有可能的磷酸化位置(Tab. 1)(Fig. 1A, lane 1)。經過試驗找到了 E2 蛋白上 2 個可能的磷酸化位置 S207 和 S243。而這 2 個氨基酸均位於 E2 蛋白的 hinge region 202-286 (Fig. 1C)。相較於較為保守的 TAD 與 CTD，hinge region 在不同的 PV 當中更加多變[29]。

之前的研究發現磷酸化以及 hinge region 分別或影響 E2 蛋白與染色體的結合[4,27,30]。經由點突變 PCR，這兩個位置的 serine 改為 alanine(分別命名為 S207A 和 S243A)，從而不能被磷酸化，進一步可以研究兩個氨基酸殘基磷酸化對 HPV-16 E2 蛋白與染色體結合的影響。之後在共軛焦顯微鏡觀察過程中，有絲分裂時 E2 蛋白位置發生變化，如圖 Fig. 1C 所示在 G1/S phase，S207A 和 S243A 與 wild type E2 均無明顯差別。但是在有絲分裂的 metaphase 和 anaphase S243A 分散在細胞質中，失去與染色體結合形成 foci 的能力。



位於 243 的 serine 進一步突變為帶有負電荷的 glutamic acid (E) 和 aspartic acid (D) (S243E 和 S243D)，以及極性不帶電荷的 asparagine (N) 和 glutamine (Q) (S243N 和 S243Q)。如果 HPV-16 E2 S243 被磷酸化，作為化學性質類似磷酸化的突變，帶負電的 S243E 和 S243D 應該與 wild type 性質類似。從 Fig. 2 可以看出 S243E 和 S243D 在共軛焦顯微鏡的觀察下類似 wild type 或 S207A，即在有絲分裂的 metaphase 或 anaphase E2 蛋白位於染色體，證實了 E2 hinge region Serine 243 存在促進 E2 蛋白結合染色體的磷酸化修飾。之後以大規模的統計進行確認 (Tab. 2)。

綜上所述，HPV-16 E2 存在兩個潛在的磷酸化位置 serine207 和 serine243，其中 serine243 可以調控有絲分裂時 E2 與染色體的結合。通過替換 243 位置氨基酸殘基，證實了 S243 位置通過被磷酸化使 E2 蛋白與染色體的結合。

HPV-16 E2 243 絲氨酸 (serine) 通過 Brd4 影響 E2 蛋白在細胞有絲分裂時與宿主染色體的結合。

E2 蛋白在乳突瘤病毒感染過程中起了重要作用。其中在感染基底層細胞初期，病毒 genome 低拷貝數的情況下，通過結合宿主細胞染色體，確保病毒 DNA 在宿主細胞有絲分裂的過程中分配到兩個子細胞無疑至關重要[31]。前人的研究表明 Brd4 參與了大多數乳突瘤病毒 E2 蛋白與染色體的結合過程[20,24,25]。Brd4 作為 BET family 的成員，通過 bromodomains 結合乙酰化(acetylation)的 histone。

因而，Brd4 在有絲分裂時可以與染色體結合[19]。

為了研究 Brd4 與 HPV-16 E2 S243 的關係，對比 243 位置氨基酸殘基改變後 E2 與 Brd4 相互作用，利用免疫熒光觀察 Cos-7 細胞有絲分裂時期 Brd4 與 E2 的位置關係。試驗結果顯示在 metaphase 時除了少部分 E2 foci (Fig. 2A wild type 黃色箭頭所示)，大部分位於染色體的 E2 foci 都與 Brd4 位置重疊。

實驗結果表明在 Cos-7 細胞 metaphase 時，Brd4 分散於整個細胞，而前人研究發現 Brd4 在 C33A 細胞 metaphase 則集中於染色體[18,19,34]。但是當 Cos-7 細胞處於 late anaphase 或 telophase 時，Brd4 則集中於分開的兩條染色體上(Fig. 2B)，與 HeLa 或 C127 細胞類似[35]。在 C33A 細胞分別表現 wild type 與 S243A 的 E2，Fig. 3A 所示在 metaphase 時 wild type 的 E2 與 Brd4 結合並且在染色體上形成 foci，而 S243A 則分散與細胞質，進一步證實了 HPV-16 E2 與 Brd4 在 metaphase colocalization 在染色體上 (Fig. 3A)。通過以上實驗證實 HPV-16 E2 在細胞有絲分裂時通過 Brd4 連接宿主染色體。

第四章 討論



經過上述實驗，證實 HPV-16 E2 蛋白上面的 serine 243 是一個轉錄後磷酸化位置，且與 E2 蛋白在有絲分裂時期與染色體的結合相關。對 HPV-16 E2 質譜分析找到的兩個潛在的磷酸化位置，對 E2 蛋白(wild type)進行 mutation 得到了 S207A 和 S243A。在細胞間期(interphase)它們與 wild type 一樣都位於細胞核。但是在 metaphase 與 anaphase，S243A 失去了 wild type 與 207A 定位在染色體的能力(Fig. 1C)。之後，利用更多種類氨基酸替換 S243，其中 S243E 和 S243D 在 anaphase 和 metaphase 可以與 Brd4 結合並定位於染色體，而 S243N 和 S243Q 失去該機能(Fig. 2)。暗示了 S243 磷酸化在 E2 蛋白與 Brd4 相互作用定位於染色體起了重要作用。之後，加入 Brd4 抑制劑 JQ1(+)，E2 與 Brd4 形成的 foci 從染色體上面脫離，則支持了 HPV-16 E2 蛋白在有絲分裂時期結合染色體是通過 Brd4。

根據之前發表的 paper，在有絲分裂的 metaphase 和 anaphase 觀察 alpha-PVs (HPV-11, 16, 31, 57)與 Brd4 在染色體上面的結合很困難[16,36,37]。但是在 C33A 或 CV-1 有絲分裂的開始階段(prophase)或最後階段(telophase)卻比較常見。然而在研究進程中發現了絕大部分 wild type E2 與 Brd4 在 metaphase 和 anaphase 形成的 foci，這很有可能與實驗過程中使用不同的細胞系或不同的 E2 蛋白標記方法有關（通過 EGFP 連接 E2 的 N 端並且在 Cos-7 細胞中表達）。或許更多的 cellular factors 參與了有絲分裂時期含 E2 染色體上 foci 形成。



前人研究表明 E2 蛋白的 N 端與 E2 和 Brd4 結合相關。在 BPV-1 中，N 端的兩個氨基酸殘基 R37 和 I73 在有絲分裂時期 E2 與 Brd4 連接起了重要作用，這兩個位置的 mutation 可以使 E2 失去通過 Brd4 連接染色體的能力[16,20,38,39]。而實驗結果證實了位於 HPV-16 E2 的 S243 是一個新的 Brd4 binding site，如果將 S243 替換為 alanine 或其他集中不帶負電荷的氨基酸，可以使 E2 失去通過 Brd4 連接染色體的能力。試驗結果表明 S243 磷酸化是 HPV-16 E2 結合有絲分裂時期染色體的 key factor。

E2 蛋白在細胞有絲分裂時分配病毒 genome 到兩顆子細胞來維持病毒的持續感染[29]。然而在不同類型 PV 中，介導 E2 與染色體結合的機制也不盡相同。BPV-1 的 E2 蛋白通與 Brd4 形成可定位於染色體任何位置的小顆粒複合體 [18,21]; HPV-8 則以特殊的方式，在染色體上靠近著絲粒的地方形成一個大的 foci [4,30]。實驗結果顯示 HPV-16 E2 與 Brd4 在染色體任何範圍形成小 foci，類似 BPV-1。但是仍然發現 E2 也可以不經由 Brd4 與染色體結合(Fig4)。前人對更多類型的 PV 研究也發現更多種類的宿主蛋白及 E2 上面氨基酸殘基參與到 E2 與有絲分裂時期染色體的結合[36,40,41,42,43]。因此，HPV-16 E2 很有可能不僅僅依靠一種機制與染色體結合。

Brd4 屬於 double bromodomain-containing 蛋白，可以通過 bromodomain 結合乙酰化的染色體，在細胞生長的過程中參與調控細胞週期。前人發現 Brd4 的 C 段可以結合 E2 的 TAD，增強 E2 CTD 的活性，從而調節 HPV 的基因表達[4]。

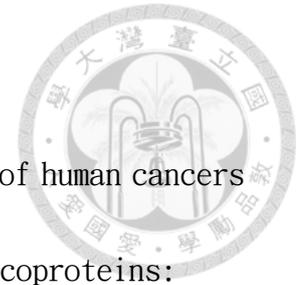
Brd4 曾被認為在有絲分裂過程中始終與染色體結合。然而，實驗過程中發現 Brd4 在 Cos-7 細胞 metaphase 時分佈與整顆細胞(Fig. 2A)而這與在其他細胞系觀察到的情況又有不同 (C33A)，Brd4 在 metaphase 可形成 speckles [18,19,34]。

但是，在 Cos-7 細胞進入 late-anaphase 或 telophase 時 Brd4 被發現集中於染色體(Fig. 2B)，這與在 HeLa 細胞及 C127 細胞觀察到的結果相同[35]。而 C33A 細胞在 metaphase 或 anaphase 均集中於染色體(Fig. 3A)。因此由於 Brd4 的分佈變化，HPV-16 E2-Brd4 foci (speckles)在 metaphase 或 anaphase，Cos-7 或 C33A 均可被觀察到。

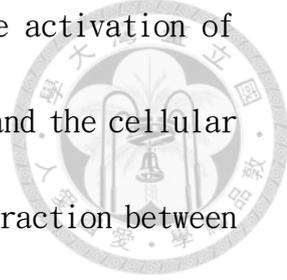
實驗結果顯示 S243 位於 RXXS domain 這與前人發現的 HPV8 E2 S253 一致 [4,27]。S253 不經由 Brd4，控制 E2 與染色體結合，但是 S253 被替換為 D 時失去與染色體結合的功能。而新的實驗過程中，發現到無論 metaphase 或 anaphase，HPV-16 E2 S243D 可以與 Brd4 結合。這可能暗示了 S243 位置磷酸化通過提供負電荷促使 E2 與 Brd4 的結合，從而在染色體上形成 foci。E2 該位置的帶負電確保與 Brd4 的相互作用。

綜上所述，實驗證實了 HPV-16 E2 hinge region 上的 S243 對於 E2 結合有絲分裂時期染色體起了至關重要的作用。進一步發現在 S243 相關 E2 結合染色體的過程中過程中 Brd4 起了關鍵作用。HPV-16 E2 hinge region 上 serine 243 通過調節 E2 與 Brd4 相互作用，控制 E2 與宿主細胞染色體的結合。

參考文獻



1. zur Hausen H (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology* 384: 260–265.
2. Moody CA, Laimins LA (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10: 550–560.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74–108.
4. Sekhar V, Reed SC, McBride AA (2010) Interaction of the betapapillomavirus E2 tethering protein with mitotic chromosomes. *J Virol* 84: 543–557.
5. Ilves I, Kivi S, Ustav M (1999) Long-term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites. *J Virol* 73: 4404–4412.
6. Lehman CW, Botchan MR (1998) Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4338–4343.
7. McBride AA, Romanczuk H, Howley PM (1991) The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 266: 18411–18414.
8. Hamid NA, Brown C, Gaston K (2009) The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell Mol Life Sci* 66: 1700–1717.
9. Thierry F (2009) Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 384: 375–379.
10. Yao JM, Breiding DE, Androphy EJ (1998) Functional interaction of the bovine papillomavirus E2 transactivation domain with TFIIB. *J Virol* 72: 1013–1019.
11. Rehtanz M, Schmidt HM, Warthorst U, Steger G (2004) Direct interaction between nucleosome assembly protein 1 and the papillomavirus E2 proteins involved in activation of transcription. *Mol Cell Biol* 24: 2153–2168.

- 
12. Muller A, Ritzkowsky A, Steger G (2002) Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300. *J Virol* 76: 11042-11053.
13. Lee D, Hwang SG, Kim J, Choe J (2002) Functional interaction between p/CAF and human papillomavirus E2 protein. *J Biol Chem* 277: 6483-6489.
14. Wu MH, Chan JY, Liu PY, Liu ST, Huang SM (2007) Human papillomavirus E2 protein associates with nuclear receptors to stimulate nuclear receptor- and E2-dependent transcriptional activations in human cervical carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 413-425. 32
15. Chang SW, Tsao YP, Lin CY, Chen SL (2011) NRIP, a novel calmodulin binding protein, activates calcineurin to dephosphorylate human papillomavirus E2 protein. *J Virol* 85: 6750-6763.
16. McPhillips MG, Oliveira JG, Spindler JE, Mitra R, McBride AA (2006) Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. *J Virol* 80: 9530-9543.
17. Schweiger MR, You J, Howley PM (2006) Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol* 80: 4276-4285.
18. You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM (2004) Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 117: 349-360.
19. Dey A, Chitsaz F, Abbasi A, Misteli T, Ozato K (2003) The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8758-8763.
20. Baxter MK, McPhillips MG, Ozato K, McBride AA (2005) The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with

interaction

with the cellular chromosomal protein, Brd4. *J Virol* 79: 4806–4818.

21. McPhillips MG, Ozato K, McBride AA (2005) Interaction of bovine papillomavirus

E2 protein with Brd4 stabilizes its association with chromatin. *J Virol* 79:

8920–8932.

22. Brannon AR, Maresca JA, Boeke JD, Basrai MA, McBride AA (2005) Reconstitution

of papillomavirus E2-mediated plasmid maintenance in *Saccharomyces cerevisiae* by the Brd4 bromodomain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2998–3003.

23. You J, Schweiger MR, Howley PM (2005) Inhibition of E2 binding to Brd4 enhances viral genome loss and phenotypic reversion of bovine papillomavirus-transformed cells. *J Virol* 79: 14956–14961.

24. Abbate EA, Voitenleitner C, Botchan MR (2006) Structure of the papillomavirus

DNA-tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. *Mol Cell* 24: 877–889.

25. Helfer CM, Wang R, You J (2013) Analysis of the papillomavirus E2 and bromodomain protein Brd4 interaction using bimolecular fluorescence complementation. *PLoS One* 8: e77994.

26. Wang X, Helfer CM, Pancholi N, Bradner JE, You J (2013) Recruitment of Brd4 to

the human papillomavirus type 16 DNA replication complex is essential for replication of viral DNA. *J Virol* 87: 3871–3884.

27. Sekhar V, McBride AA (2012) Phosphorylation regulates binding of the human

papillomavirus type 8 E2 protein to host chromosomes. *J Virol* 86: 33 10047–10058.

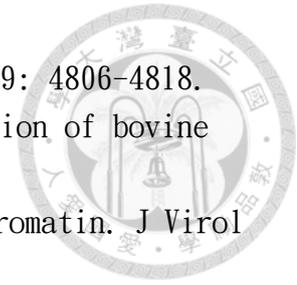
28. Penrose KJ, Garcia-Alai M, de Prat-Gay G, McBride AA (2004) Casein Kinase II

phosphorylation-induced conformational switch triggers degradation of the

papillomavirus E2 protein. *J Biol Chem* 279: 22430–22439.

29. McBride AA (2013) The papillomavirus E2 proteins. *Virology* 445: 57–79.

30. Poddar A, Reed SC, McPhillips MG, Spindler JE, McBride AA (2009) The human



papillomavirus type 8 E2 tethering protein targets the ribosomal DNA loci of

host mitotic chromosomes. *J Virol* 83: 640–650.

31. McBride AA (2008) Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv*

Virus Res 72: 155–205.

32. Gagnon D, Joubert S, Senechal H, Fradet-Turcotte A, Torre S, et al. (2009)

Proteasomal degradation of the papillomavirus E2 protein is inhibited by overexpression of bromodomain-containing protein 4. *J Virol* 83: 4127–4139.

33. Lee AY, Chiang CM (2009) Chromatin adaptor Brd4 modulates E2 transcription

activity and protein stability. *J Biol Chem* 284: 2778–2786.

34. Nishiyama A, Dey A, Miyazaki J, Ozato K (2006) Brd4 is required for recovery from

antimicrotubule drug-induced mitotic arrest: preservation of acetylated chromatin. *Mol Biol Cell* 17: 814–823.

35. Yang Z, He N, Zhou Q (2008) Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis

to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 28:

967–976.

36. Donaldson MM, Boner W, Morgan IM (2007) TopBP1 regulates human papillomavirus type 16 E2 interaction with chromatin. *J Virol* 81: 4338–4342.

37. Gammoh N, Grm HS, Massimi P, Banks L (2006) Regulation of human papillomavirus type 16 E7 activity through direct protein interaction with the

E2 transcriptional activator. *J Virol* 80: 1787–1797.

38. Zheng PS, Brokaw J, McBride AA (2005) Conditional mutations in the mitotic

chromosome binding function of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein.

J Virol 79: 1500–1509.

Abroi A, Ilves I, Kivi S, Ustav M (2004) Analysis of chromatin attachment and

partitioning functions of bovine papillomavirus type 1 E2 protein. *J Virol*



78:

2100–2113.

40. Parish JL, Bean AM, Park RB, Androphy EJ (2006) ChlR1 is required for loading

papillomavirus E2 onto mitotic chromosomes and viral genome maintenance. *Mol Cell* 24: 867–876.

41. Dao LD, Duffy A, Van Tine BA, Wu SY, Chiang CM, et al. (2006) Dynamic localization of the human papillomavirus type 11 origin binding protein E2

through mitosis while in association with the spindle apparatus. *J Virol* 80: 34

4792–4800.

42. Yu T, Peng YC, Androphy EJ (2007) Mitotic kinesin-like protein 2 binds and

colocalizes with papillomavirus E2 during mitosis. *J Virol* 81: 1736–1745.

43. Senechal H, Poirier GG, Coulombe B, Laimins LA, Archambault J (2007) Amino

acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of

papillomavirus E2 affect binding to the long isoform of Brd4. *Virology* 358:

10–17.

44. Zheng G, Schweiger MR, Martinez-Noel G, Zheng L, Smith JA, et al. (2009) Brd4

regulation of papillomavirus protein E2 stability. *J Virol* 83: 8683–8692.

45. Penrose KJ, McBride AA (2000) Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number. *J Virol* 74: 6031–6038.

46. Vosa L, Sudakov A, Remm M, Ustav M, Kurg R (2012) Identification and analysis of

papillomavirus E2 protein binding sites in the human genome. *J Virol* 86: 348–357.



Table 2. E2 在細胞有絲分裂時 foci 所在位置統計



E2 mutation type	M phase cell express E2 number	E2 express rate	E2 localized on chromosome rate(mitosis)	E2 localized on chromosome rate(metaphase)	E2 localized on chromosome rate(anaphase)
wild type	122	28.6%	74.6%	70.1%	82.2%
S207A	86	30.8%	75.6%	66.7%	84.1%
S243A	133	33.9%	19.5%	20.4%	17.1%
S243D	105	33.6%	65.7%	56.5%	79.1%
S243E	78	27.9%	70.5%	62.5%	76.1%
S243N	83	23.4%	14.5%	14.9%	13.9%
S243Q	80	24.2%	20.0%	18.9%	22.2%



Fig. 1

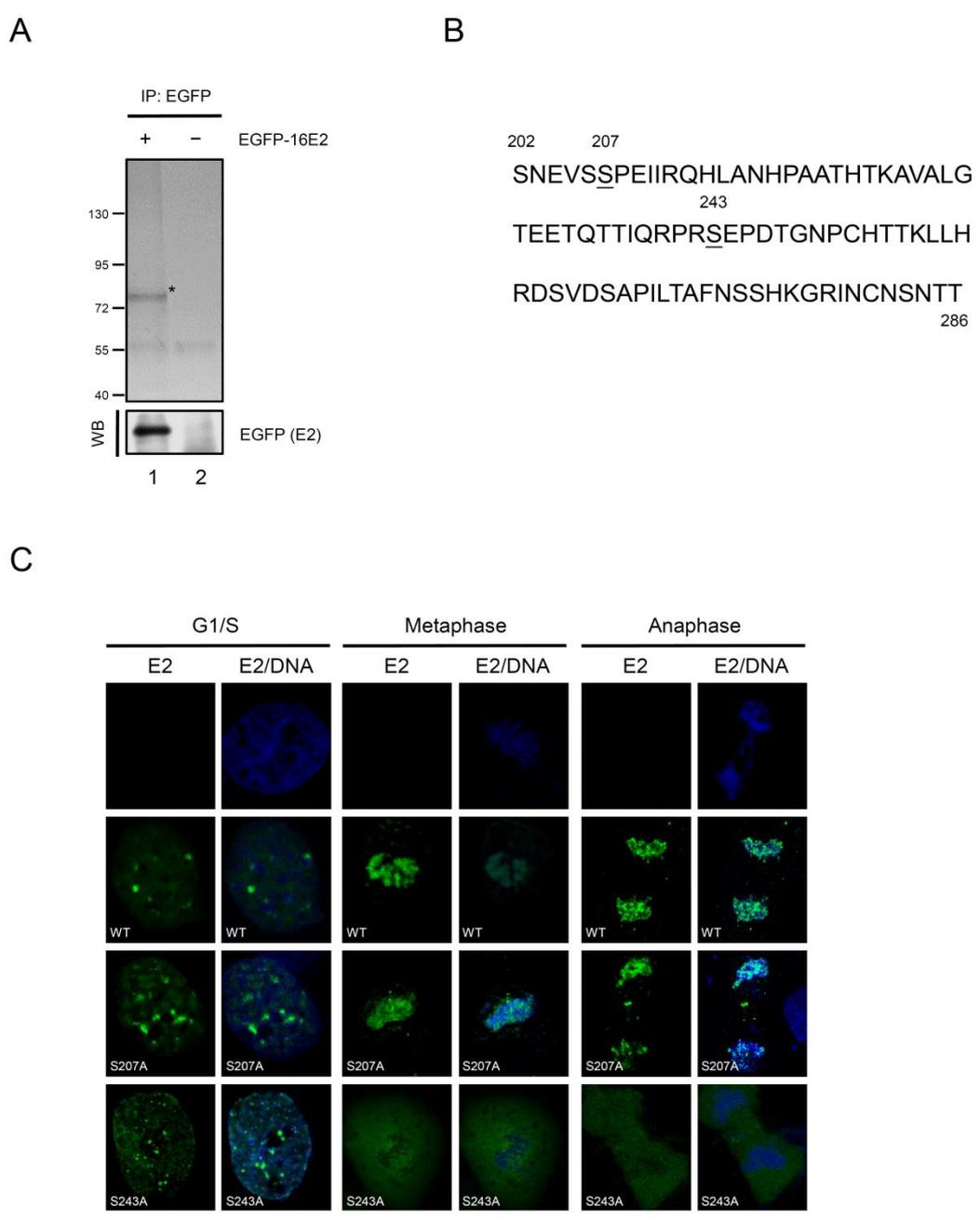


Figure 1. Serine 207 和 serine243 是潛在的磷酸化氨基酸殘基，並且 S243 可以影響 HPV-16 E2 與染色體的結合。A)通過 MG132 protease inhibitor 抑制 HPV-16 E2 降解，利用免疫沉澱收集濃縮 E2 蛋白，Coomassie brilliant blue (upper)染色，對*所示位置蛋白切下並進行質譜分析。B)質譜分析結果 S207 和 S243 是 HPV-16 E2 潛在的磷酸化位置。C)觀察 E2 wild type 和兩個 mutation 在細胞 G1/S metaphase 和 anaphase 的分佈，HPV-16 E2 通過 fusion 的綠色 EGFP 定位，DNA 則通過 DAPI 染藍色。

Fig. 2

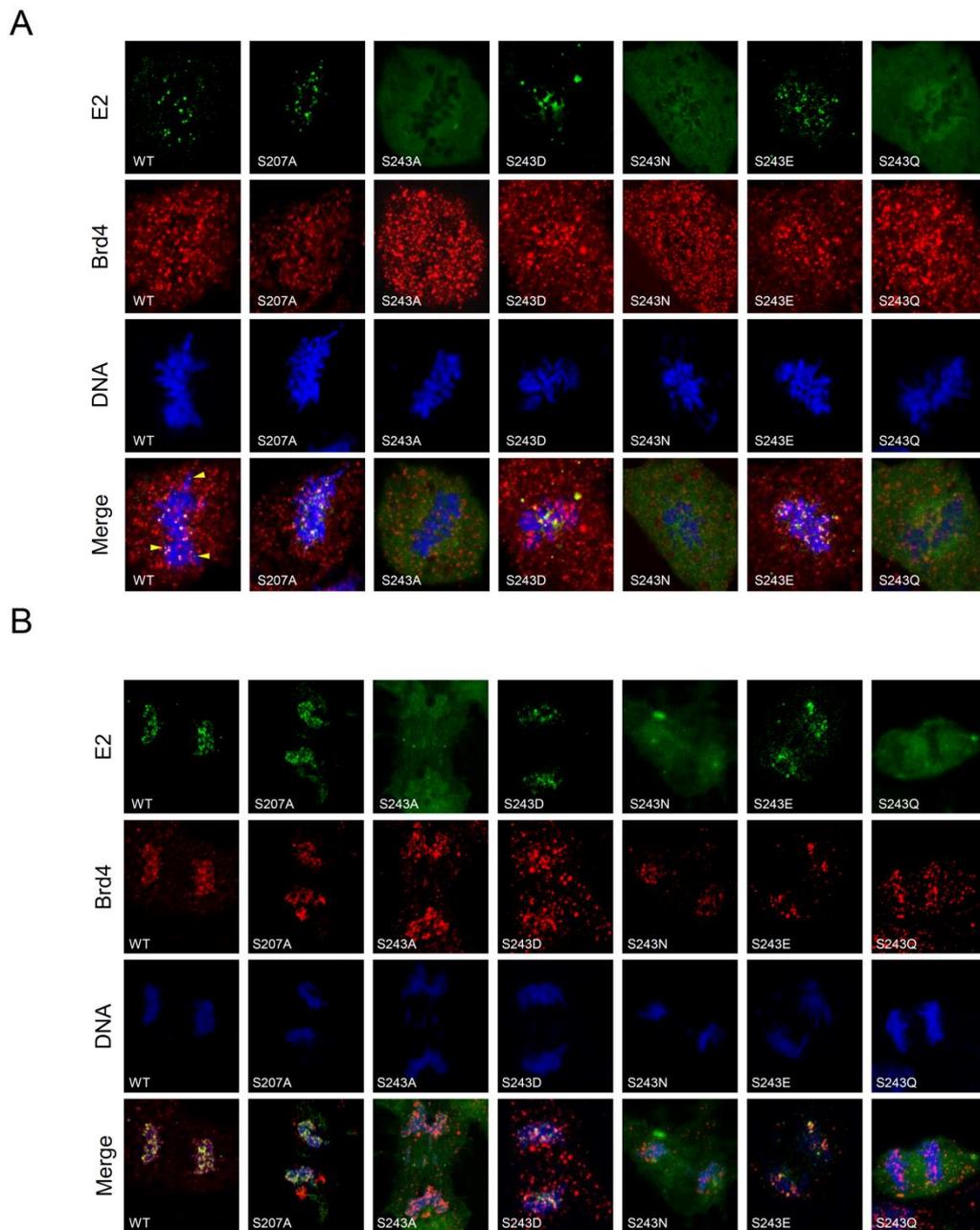
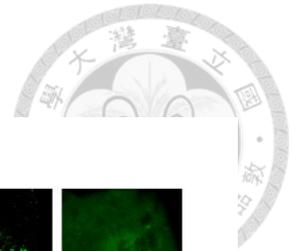


Figure 2. Brd4 和 E2 蛋白在染色體的分佈。A, B) 243 位置氨基酸殘基磷酸化使 E2 與 Brd4 重合並且連接與染色體。不同 fusion 的綠色 EGFP 的 E2 蛋白 (WT, S207A, S243A, S243D, S243N, S243E, S243Q) 轉染 Cos-7 細胞，因此 E2 為綠色。Brd4 為紅色，DNA 為藍色。A 為 metaphase，B 為 anaphase

Fig. 3

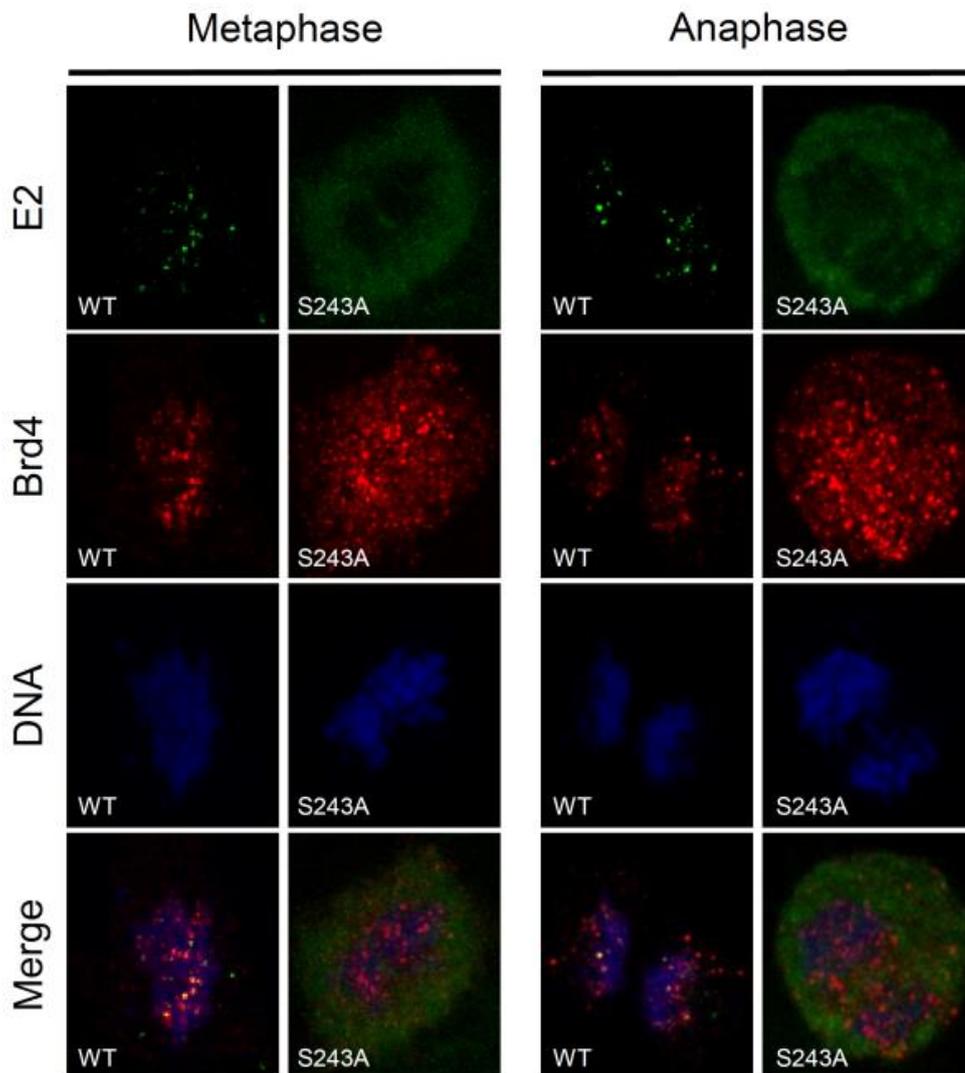
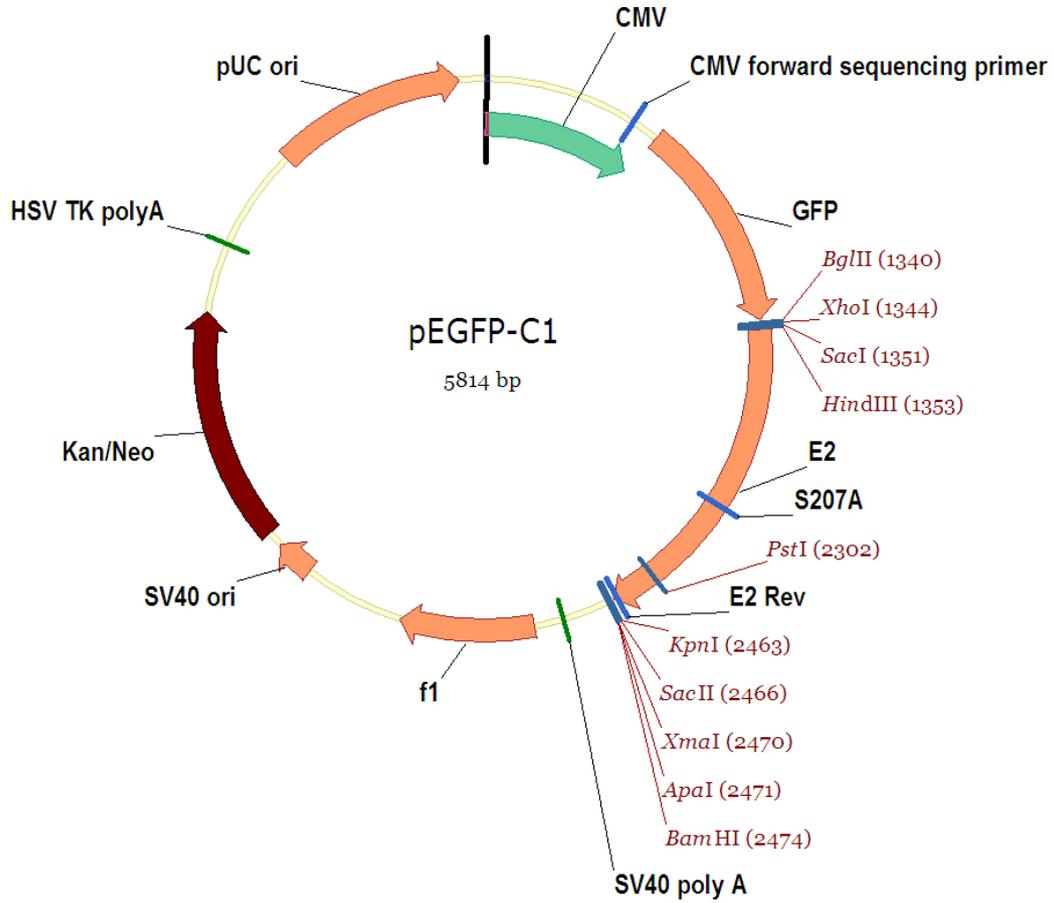


Figure 3. HPV-16 E2 通過 Brd4 與染色體結合。不同 fusion 的綠色 EGFP 的 E2 蛋白 (WT, S207A, S243A) 轉染 C33A 細胞。左右圖分別是 metaphase 和 anaphase。



Map 1 HPV-16 E2 serine 207 mutation



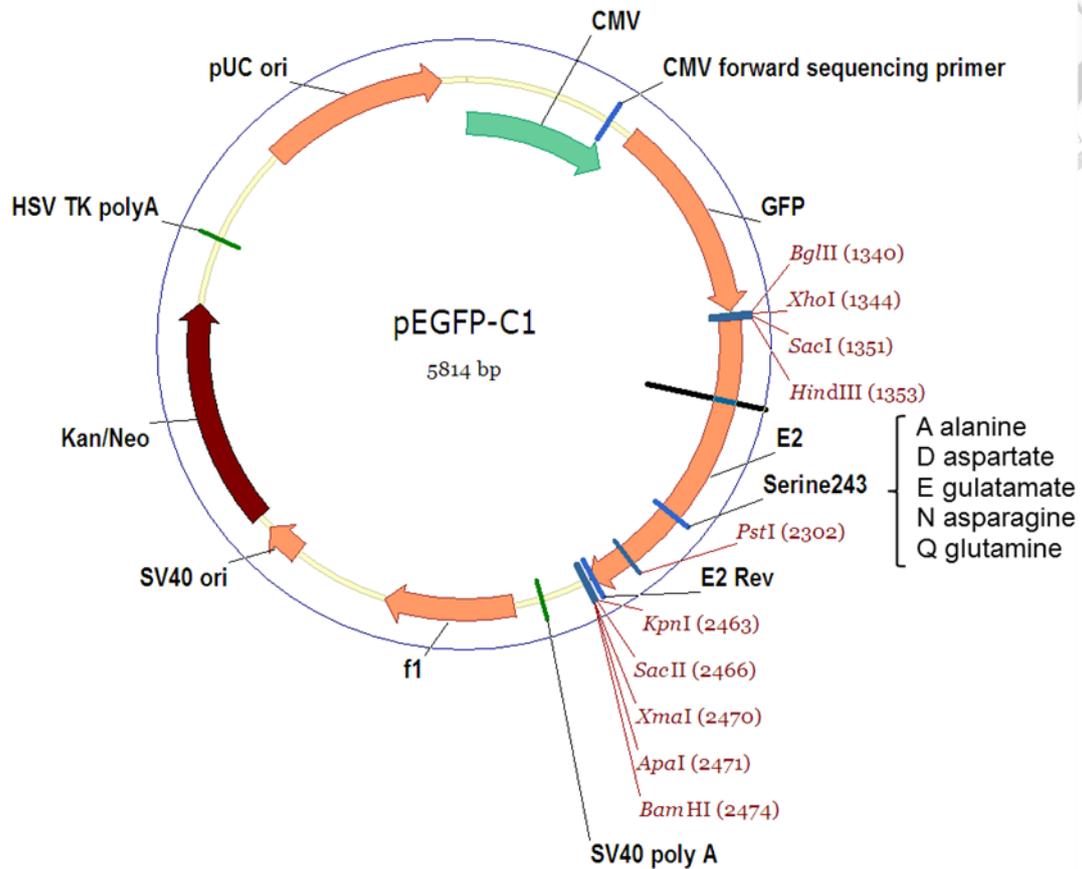
Description

通過對實驗室原先表達 HPV16-E2 的 pEGFP-E2 進行點突變，得到 S207A

Primer

Forward: 5'-ttagcagcaacgaagatcctctcctgaaattattaggcagca-3'

Map 2 HPV-16 E2 serine 243 mutation



Description

通過對實驗室原先表達 HPV16-E2 的 pEGFP-E2 進行點突變 得到 S243A,S243D, S243E,S243N,S243Q

Primer

S243A

Forward:5'-cgactatccagcgaccaagagcagagccagacaccggaaacc-3'

S243D

Forward:5'cgactatccagcgaccaagagatgagccagacaccggaaacc-3'

S243E

Forward:5'-cgactatccagcgaccaagagaagagccagacaccggaaacc-3'

S243N

Forward:5'-cgactatccagcgaccaagaaatgagccagacaccggaaacc-3'

S243Q

Forward:5'-cgactatccagcgaccaagacaagagccagacaccggaaacc-3'