

鼠疱疹病毒 68 复制转录激活蛋白结合元件的鉴定*

洪云^{1, 2)} 齐静^{1, 2)} 宫丹阳^{1, 2)} 邓健文^{1, 2)} 邓红雨^{1)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所感染免疫中心, 中国科学院感染与免疫重点实验室, 北京 100101; (²⁾中国科学院研究生院, 北京 100080)

摘要 复制转录激活蛋白(replication and transcription activator, RTA)是 γ 疱疹病毒的一个具序列保守性的蛋白质分子, 由即时早期基因 ORF50 所编码. RTA 可通过激活裂解期基因转录而使病毒进入裂解感染. 鼠疱疹病毒 68(MHV-68)亦属 γ 疱疹病毒, 该病毒能体外感染多种细胞, 并且能感染实验小鼠, 是研究 γ 疱疹病毒的良好模型. 在 MHV-68 中, 目前只有两个受 RTA 调控的基因被报道, 但调控机制未明. 之前的研究鉴定出一个新的 RTA 的 DNA 结合序列(RTA response element, RRE), 以此为基础, 首先通过基因比对在病毒基因组上找到具有较高同源性的核酸序列片段(ORF9p-RRE), 该序列在病毒基因组上位于 ORF9 启动子区, 通过双重荧光素酶报告基因系统证实了 RTA 可作用于该启动子区进而激活下游基因转录, 并且该转录激活是 ORF9p-RRE 依赖的. 凝胶阻滞电泳实验(EMSA)和染色质免疫沉淀实验(ChIP)分别证实了 RTA 可在体外、体内与 ORF9p-RRE 直接结合. 研究结果初步揭示了 RTA 与 ORF9p-RRE 相互作用的机制, 为深入了解 RTA 激活病毒基因转录的机理提供了更多依据.

关键词 γ 疱疹病毒, 鼠疱疹病毒 68(MHV-68), 转录激活蛋白(RTA)

学科分类号 Q74

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00158

鼠疱疹病毒 68(MHV-68)是从野生仓鼠中分离得到的一种疱疹病毒, 由于其基因序列和基因结构与 γ 疱疹病毒亚科中的人类疱疹病毒, 如 Epstein-barr 病毒(EBV)以及卡波西肉瘤相关病毒(KSHV)具较高同源性, 因此被归为 γ 疱疹病毒^[1]. 和其他 γ 疱疹病毒一样, MHV-68 感染宿主后经历两种不同的感染状态: 潜伏感染和裂解感染. 潜伏状态下病毒基因组以附加体的形式存在, 表达少量潜伏相关基因, 不产生子代病毒; 裂解感染状态下, 病毒大量表达裂解期基因, 并产生子代病毒^[2].

已有的研究证实, 人类的一些恶性肿瘤的发生与 γ 疱疹病毒密切相关, 如 EBV 与鼻咽癌、伯基氏瘤、霍奇金斯病等, KSHV 与卡波西肉瘤及部分 AIDS 相关 B 淋巴瘤都密切相关. 在卡波西肉瘤组织内皮细胞中, 发现了处于潜伏状态的 KSHV, 但同时也存在小部分处于裂解期的 KSHV^[3-4]. 研究表明 KSHV 的两种感染周期都对肿瘤的产生起重要的作用. 潜伏期病毒编码的一些蛋白质可导致被感染细胞的生长和增殖的异常^[5], 而裂解期病毒表达的若干蛋白质则可以直接或间接导致感染细胞周围血管增生和炎性浸润^[6]. 因此研究 γ 疱疹病毒两种

生活周期的调控对于了解肿瘤的发病机理具有重要的意义.

但 EBV 和 KSHV 作为种属特异性病毒, 仅能感染人类和一些灵长类动物, 动物实验存在很大局限性. 此外, EBV 体外感染细胞效率低, KSHV 的体外研究亦缺乏有效的细胞系, 病毒滴度低. 这些因素都极大地制约了对它们的进一步研究. 同属 γ 疱疹病毒的 MHV-68, 可在多种细胞系中建立潜伏和裂解感染, 可以建立体外从头感染模型, 可获得高滴度的病毒颗粒, 此外, 该病毒还可以感染实验小鼠. 因此 MHV-68 已经成为研究 γ 疱疹病毒裂解期 DNA 复制、病毒宿主相互作用等基本生物学过程的良好模型^[2, 7].

复制转录激活蛋白(RTA)是 γ 疱疹病毒裂解期表达的重要的即时早期蛋白, 主要由 ORF50 编码, 并在 γ 疱疹病毒中具较高同源性^[8]. 研究表明,

* 国家自然科学基金资助项目(30930007).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888407, E-mail: rrain6@yahoo.com

收稿日期: 2011-04-12, 接受日期: 2011-05-12

RTA 单独存在的情况下即可有效将处于潜伏状态的 KSHV 和 MHV-68 病毒激活进入裂解感染^[9-10], 被喻为 KSHV 和 MHV-68 生活周期的“分子开关”。因此研究 RTA 的功能对于了解病毒调节自身潜伏和裂解状态的转化机制具有重要作用。对于 KSHV RTA 的研究表明, 其主要功能集中在两方面, 即参与病毒裂解期基因组复制以及参与激活大量的裂解期基因的转录^[11-12]。

MHV-68 的 RTA 主要是由 ORF50 基因所编码, 和 KSHV 一样, MHV-68 的 RTA 蛋白也可以将潜伏感染的病毒激活进入裂解感染。目前已有多个实验组通过不同方法证实 RTA 蛋白在 MHV-68 的激活过程中起着不可或缺的作用^[13-15]。尽管如此, 目前对 RTA 蛋白调控 MHV-68 裂解期基因表达的具体机理还了解不多, 已报道受 RTA 调控的基因仅有两个, 即 ORF57 和 ORF72^[16-17], 虽然 RTA 对这两个基因启动子区的作用区域已经找到, 但鉴定出的作用区域较大, 具体作用机制亦不清楚。我们之前的研究证实 RTA 可通过直接结合其反应元件的方式激活基因的转录, 并鉴定出一个新的 RTA 结合序列(RRE-B)^[18]。在本研究中, 我们利用上述已鉴定的 RRE-B 序列在 MHV-68 基因组上进行比对, 找到了一个具有一定同源性的核苷酸序列并命名为 ORF9p-RRE, 初步探讨了 RTA 与 ORF9p-RRE 相互作用的机制, 证实 RTA 能通过直接与 ORF9p-RRE 直接结合而激活下游基因的转录。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人上皮细胞 293T、仓鼠成纤维细胞 BHK-21、小鼠胚成纤维细胞 3T3 均来源于本实验室, 培养于含 10% 的灭活胎牛血清(Hyclone 公司), 1% 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen 公司) 的 DMEM 培养基 (Hyclone 公司) 中, 置于 5% CO₂ 培养箱内, 37°C 培养。

1.2 质粒构建

pORF9P 质粒是用引物 9pF: 5' GAC GCT AGC GCT AAA CCT CTC AAG CAT CGC 3' 和引物 9pR: 5' GAC AAG CTT CTT AAC TCG AGA GGG GGC GAG 3', 以 MHV-68 病毒基因组为模板, 经 PCR 方法扩增后将其克隆至质粒 pGL3-Basic 的 *Nhe* I 和 *Hind* III 酶切位点之间。pORF9PΔRRE 质粒是以重叠延伸定点突变的方法, 以 ORF9P 片段为模板扩增的, 所使用的重叠延伸引物为

9PΔR: 5' TTT ATT ATT CGT CAT GGG GAG GCC ACT AGA 3' 和 9PΔF: 5' ACC CCA TGA CGA ATA ATA AAC TGG TTT CTG 3'。突变完成后将扩增片段克隆至质粒 pGL3-Basic 的 *Nhe* I 和 *Hind* III 酶切位点之间。

原核表达质粒 pET30b-RDBD 是以 MHV-68 病毒基因为模板, 经 PCR 将 ORF50 的两个外显子相连并得到 3' 端截短的 ORF50 序列, 并将其克隆至质粒 pET30b 的 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切位点之间, 所用引物 E-RDBD F: 5' GCG AAT TCG ATG GCC TCT GAC TCG GAT TCC CCT TCA GCC GAT AAG GAC TGG CAC GGA TCG AA 3', E-RDBD R: 5' GCA AGC TTT TAA GAC AGT CCT GAA AAG ACC A 3'。

1.3 双重荧光素酶报告基因系统

双重荧光素酶报告基因系统(E1910)和内参对比对照荧光素酶载体 pCMV-RL (E6271)购自 Promega 公司。24 孔培养板的每孔细胞转染 100 ng 报告基因, 1 ng 内参对比报告基因载体 pCMV-RL 以及 20 ng pCMV-FLAG-RTA(空余量以空载体补齐至等质量)进行转染。转染 24 h 之后, 细胞以 1×Passive 裂解缓冲液(Promega 公司)室温裂解 20 min 后, 以 TD-20 luminometer (Turner Designs Instruments) 进行双荧光检测。每个样品最终 RTA 激活转录的倍数计算: (pCMV-FLAG-RTA 激活样品水平 / pCMV-FLAG-RTA 激活内参水平)/(pCMV-FLAG 激活样品水平 / pCMV-FLAG 激活内参水平)。

1.4 细胞核提取

收集已处理细胞, 预冷 PBS 洗涤 1 次, 加入 1 ml 核提取液 A(10 mmol/L HEPES pH7.9, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF)并反复吹打充分重悬细胞, 冰上放置 15 min。加入 5 μl NP-40 并剧烈涡旋 10 s 之后 4°C 3 000 r/min 离心 1 min, 弃上清。用 1 ml 核提取液 A 洗涤沉淀 2 次, 4°C 3 000 r/min 离心 1 min。弃上清。加入适量核提取液 C(20 mmol/L HEPES pH 7.9, 600 mmol/L KCl, 25% 甘油, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L EDTA), 4°C 剧烈涡旋 15 min。4°C 13 000 r/min 离心 15 min, 收集上清即为细胞核提取物。

1.5 凝胶阻滞电泳实验 (electrophoretic mobility shift assays, EMSA)

将 5 μg 细胞核提取物, 2 μl 生物素标记探针, 1 μg poly-dI:dC 和 4 μl 5 × 结合缓冲液用去离子

水配成终体积 15 μ l, 冰上孵育 30~40 min. 若进行超迁移实验, 则先将 5 μ g 细胞核提取物, 4 μ l 5 \times 结合缓冲液和抗体用去离子水配成终体积 12 μ l, 冰上孵育 10 min 后再加入 2 μ l 已标记的探针和 1 μ g poly-dI:dC, 冰上孵育 30~40 min.

提前配制 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶, 并在 0.5 \times TGE 电泳缓冲液中以 90 V 恒压预电泳 30 min. 待结合反应完毕后, 加入上样缓冲液, 充分混匀后上样, 90 V 恒压电泳 1 h. 电泳结束后, 以 300 mA 恒流转膜 1 h, 将结合膜取出, 结合面朝上, 于紫外交联仪中交联. 使用封闭液封闭 30 min 后, 弃封闭液, 将结合膜与新配制的 15 ml 链霉素标记的亲合素反应液室温孵育 40 min. 以漂洗液洗膜 5 次, 每次 10 min. 将结合膜从漂洗液中移出, 加入化学发光底物, 暗室压片显影.

1.6 染色质免疫沉淀实验 (chromatin immunoprecipitation, ChIP)

收集处理组或者对照组细胞于 15 ml 离心管中, 加入甲醛使终浓度达到 1%, 在 37 $^{\circ}$ C 交联 10 min. 离心后弃上清 PBS 洗涤后, 将 1×10^6 细胞加入 200 μ l 裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.1, 10 mmol/L EDTA, 1% SDS), 置于冰上裂解 20 min. 利用超声破碎仪 (sonics), 70% 功率, 2 min, 打断基因组. 之后用稀释液 (16.7 mmol/L Tris-HCl pH 8.1, 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mmol/L EDTA, 167 mmol/L NaCl) 将样品稀释 10 倍, 并在 4 $^{\circ}$ C, 13 000 r/min 离心 15 min, 取上清用以免疫沉淀实验. 留取 20 μ l 上清作为对照. 将上清加入一抗后, 4 $^{\circ}$ C 混匀过夜, 同时设不加抗体对照. 加入已进行预封闭的 Protein G Agarose, 置于 4 $^{\circ}$ C 再混匀 2 h. 2 000 r/min 离心 2 min 后得免疫沉淀复合物. 并依次用低盐缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.1, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl), 高盐缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.1, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl), 氯化锂漂洗缓冲液 (10 mmol/L Tris pH 8.1, 0.25 mol/L LiCl, 1% IGEPALCA630, 1% 脱氧胆酸 (钠盐), 1 mmol/L EDTA) 和 1 \times TE 缓冲液洗涤 1 次, 每次 5 min. 其间保持样品 4 $^{\circ}$ C. 加入洗脱缓冲液进行洗脱, 每次 250 μ l 混匀 15 min, 2 次洗脱共得 500 μ l. 500 μ l 洗脱液中加入 20 μ l 5 mol/L 的 NaCl, 并置于 65 $^{\circ}$ C 4 h. 加入 10 μ l 0.5 mol/L 的 EDTA, 20 μ l 1 mol/L Tris-HCl pH 6.5, 和 2 μ l 10 g/L 的蛋白酶 K, 45 $^{\circ}$ C

孵育 1 h. 用苯酚 / 氯仿 / 异戊醇抽提 DNA, 70% 乙醇洗涤 DNA, 然后风干. 用 20 μ l 蒸馏水溶解 DNA, 并取 2 μ l 按标准体系进行 PCR 扩增, 所用引物为: ChIP-9RRE-F, 5' CCA CCC CAT GAC TCA GAC ACT 3', ChIP-9RRE-R, 5' ACT CAA CAA AAG AGA GCA CAA CA 3'; ChIP-ORF65-F, 5' GTC AGG GCC CAG TCC GTA 3', ChIP-ORF65-R, 5' TGG CCC TCT ACC TTC TGT TGA 3'; ChIP-actin-F, 5' GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG 3'; ChIP-actin-R, 5' AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG 3'. 扩增结束后用琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增结果.

2 结 果

2.1 在 MHV-68 基因组存在 RRE-B 同源序列

我们之前的研究数据显示, MHV-68 病毒的 RTA 蛋白可以通过直接结合的方式作用于病毒基因启动子区域的 RTA 反应元件 (RRE-B) 进而激活基因转录^[8]. 利用已鉴定的 RRE 序列在 MHV-68 基因组范围内进行序列比对, 发现位于基因组 19 071~19 096 nt 的核苷酸片段与 RRE-B 的同源程度达到 78%. 分析其在 MHV-68 基因组上下游的病毒开放读码框 (ORF), 发现该核苷酸片段位于 ORF9 起始位点上游 -60 bp 的区域内. 基于上述两点, 即与 RRE-B 高度同源性、位于 ORF9 的启动子区域, 我们假设位于 19 071~19 096 nt 的核苷酸序列介导 RTA 对 ORF9 基因转录的激活, 并将其命名为 ORF9p-RRE (图 1). 基于此假设, 对 ORF9p-RRE 核苷酸序列和 RTA 的相互作用进行了研究.

2.2 RTA 通过作用于 ORF9 的启动子区域可有效激活下游基因转录

我们首先利用双重荧光素酶报告基因系统对 RTA 对 ORF9 的启动子是否具有激活能力进行了研究. 选取 ORF9 翻译起始位点 ATG 至上游约 800 bp 范围的核苷酸片段插入质粒 pGL3-Basic 而构建出质粒 pORF9P (图 2a), 将该质粒和 RTA 表达质粒 pCMV-FLAG-RTA 共转染 NIH3T3 细胞, 通过检测荧光素酶基因被激活的水平以确定 RTA 是否对 ORF9 启动子区域具有转录激活作用. 在实验中使用 MHV-68 病毒 ORF57 基因启动子作为阳性对照, 该启动子区域已证实可被 RTA 有效激活^[9]. 实验结果显示, RTA 能够显著激活 pORF9P 的荧光素酶基因转录近 800 倍, 而阳性对照 pORF57P

被激活倍数为 400 倍左右. 作为实验阴性对照, 载体 pGL3-Basic 的激活倍数仅为 3 倍左右(图 2b), 证实了在体外 RTA 通过作用于 ORF9 的启动子区域可有效激活下游基因的转录.

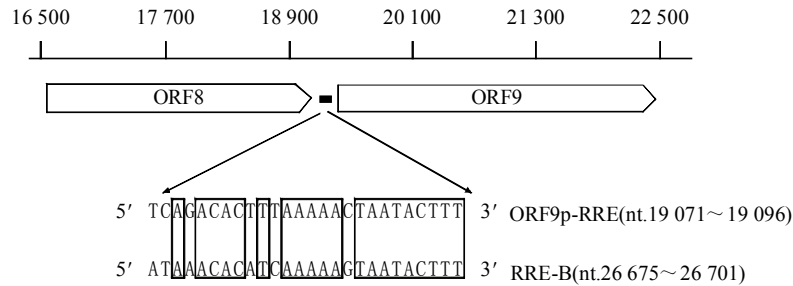


Fig. 1 Schematic diagram of the location and the nucleotide sequence of ORF9p-RRE on MHV-68 genome

The ORF9p-RRE is marked as a filled rectangle on the genome. A comparison of the sequence of ORF9p-RRE and RRE-B sequence is shown with the conserved nucleotides in boxes.

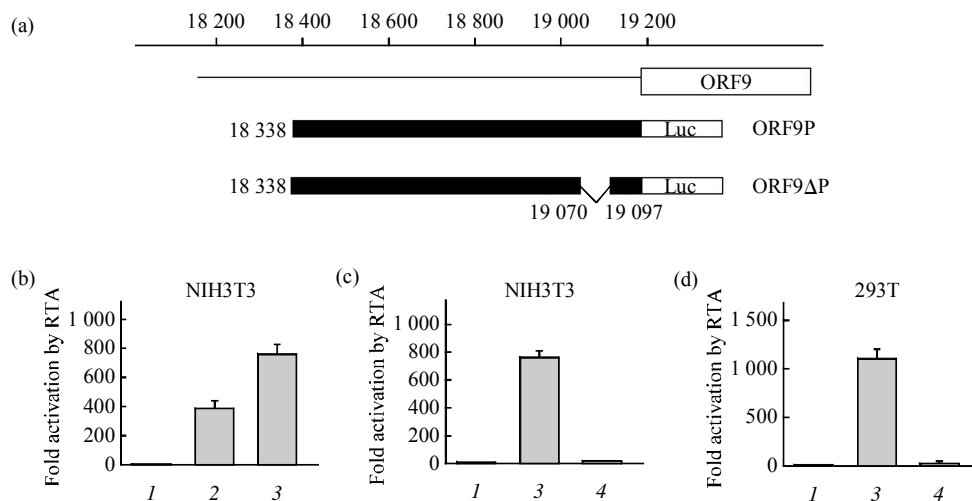


Fig. 2 Analysis of the ORF9 promoter region of MHV-68 using a reporter assay

(a) Schematic diagram of ORF9 promoter fragment of MHV-68 and internal deletion of the same region. These fragments were cloned upstream of the firefly luciferase coding sequence in vector pGL3-Basic and named ORF9P and ORF9ΔP, respectively. The MHV-68 genomic coordinates are noted for each constructs. (b) Transcriptional activation of ORF9 promoter fragment by RTA. pORF9P was co-transfected into NIH3T3 cells with pFLAG-CMV2 or pCMV-FLAG-RTA in the presence of a control vector, pRL-CMV, which constitutively expresses Renilla luciferase driven by the cytomegalovirus immediate-early enhancer/promoter. Fold activation of the promoter was calculated by comparing the normalized luciferase activity stimulated by pCMV-FLAG-RTA to that by pFLAG-CMV2. pORF57p, which contains the ORF57 promoter of MHV-68, and pGL3-Basic served as positive and negative controls, respectively. The data were compiled from three independent experiments with the standard deviation shown. (c) and (d) Transcriptional activation of ORF9P and ORF9ΔP by RTA in NIH3T3 or 293T cell, respectively. The experiment followed as described above. 1: pGL3-Basic; 2: pORF57P; 3: pORF9P; 4: pORF9ΔP.

2.3 ORF9p-RRE 对于 RTA 激活 ORF9 启动子的转录起关键作用

在报告基因体系中, RTA 可通过作用于 ORF9 启动子区域而激活下游基因转录. 为了研究位于该区域内的 ORF9p-RRE 在 RTA 转录激活过程中的

作用, 将 ORF9p 区域内的 ORF9p-RRE 进行了删除突变(图 2a)并构建出质粒 pORF9ΔP. 在 NIH3T3 细胞和 293T 细胞两个细胞系中, 检测了 ORF9p-RRE 缺失后 RTA 对 ORF9P 的激活情况. 实验结果显示, 将 ORF9p-RRE 删除后, RTA 对荧

光素酶基因的转录激活水平在两个细胞系中都显著下降, 在 NIH3T3 细胞中, RTA 对 pORF9P 的激活倍数接近 800 倍, 而对 pORF9ΔP 仅有 20 倍左右的激活, 而阴性对照 pGL3-Basic 的激活倍数仅为 3 倍左右(图 2c); 类似的, 在 293T 细胞中, RTA 对 pORF9P 的激活倍数超过 1 000 倍, 对 pORF9ΔP 的激活仅有 30 倍左右, 而 pGL3-Basic 的激活倍数则为 10 倍(图 2d). 上述结果说明, ORF9p-RRE 对 RTA 作用于 ORF9 启动子区域从而激活下游基因转录起关键性作用.

2.4 RTA 与 ORF9p-RRE 在体外直接结合

以上结果说明 ORF9p-RRE 在 RTA 激活下游基因转录中起关键作用, 为了研究 RTA 与 ORF9p-RRE 之间的相互作用机制, 我们进行了凝胶阻滞电泳实验(EMSA)以确认在体外它们是否能够直接结合. 图 3a 为生物素标记的含 ORF9p-RRE 的探针, 下划线显示 ORF9p-RRE 序列. 作为阳性对照的 RRE-B 探针序列也列在图 3a 中. 利用转染

了 RTA 表达质粒(pCMV-FLAG-RTA)的 293T 细胞核提取物与探针结合反应后进行凝胶电泳. 可以看到作为阳性对照的 RRE-B 与核提取物中的 RTA 结合后出现迁移条带(图 3b, 泳道 1), 在结合反应体系中加入过量抗 FLAG 标签抗体后, 带 FLAG 标签的 RTA 蛋白被抗体全部结合. 在电泳时, 抗体-RTA-RRE-B 复合物的迁移速度慢于 RTA-RRE-B, 因此电泳图中迁移条带消失, 代之以超迁移条带(图 3b, 泳道 2). 该超迁移条带在泳道 1 中对应位置没有相似条带, 可以确认为特异性超迁移条带. 说明泳道 1 中的迁移条带确为 RTA 与 RRE-B 特异性结合而产生. 类似的, ORF9p-RRE 探针与表达 RTA 的细胞核提取物反应后产生迁移条带(图 3b, 第 3 泳道三角所示), 而在结合反应体系中加入抗 FLAG 标签抗体后, 该迁移条带发生超迁移(图 3b, 第 4 泳道箭头所示), 这样就证实 RTA 在体外能够与 ORF9p-RRE 发生特异性结合.

2.5 RTA 结合结构域重组蛋白与 ORF9p-RRE 的相互作用

由于细胞核提取物中含各种细胞蛋白, 在 EMSA 实验中出现多条不相关蛋白产生无关的迁移条带, 干扰目标条带的识别. 同时, 细胞蛋白的存在也使我们无法判断 RTA 是与 ORF9p-RRE 直接结合还是通过与细胞蛋白的相互作用间接与 ORF9p-RRE 结合.

在对 KSHV RTA 的研究中, 有研究者使用原核表达的 RTA 蛋白 N 端 DNA 结合结构域(RDBD)进行蛋白质结合实验^[19-20]. 在对 MHV-68 的 RTA 研究中也有使用原核表达的 RDBD 进行研究的报道^[21]. 因此, 我们也利用原核表达系统, 依照报道表达纯化出了 MHV-68 的 RDBD 作为核提取物的替代物进行 EMSA 实验. 图 4a 为已报道的全长 RTA 蛋白以及 RDBD 示意图, 图 4b 显示纯化后的 RDBD 蛋白, 其大小约为 45 ku. 在 EMSA 实验中, 使用 RDBD 与 ORF9p-RRE 探针反应, 电泳后产生单一的迁移条带(图 4c, 第 2 泳道); 在结合反应体系中加入未标记的 RRE-B 片段进行冷竞争后, 迁移条带消失(图 4c, 第 3 泳道), 说明 RDBD 与 ORF9p-RRE 可在体外发生特异性结合, 且该结合不依赖于其他蛋白质的作用.

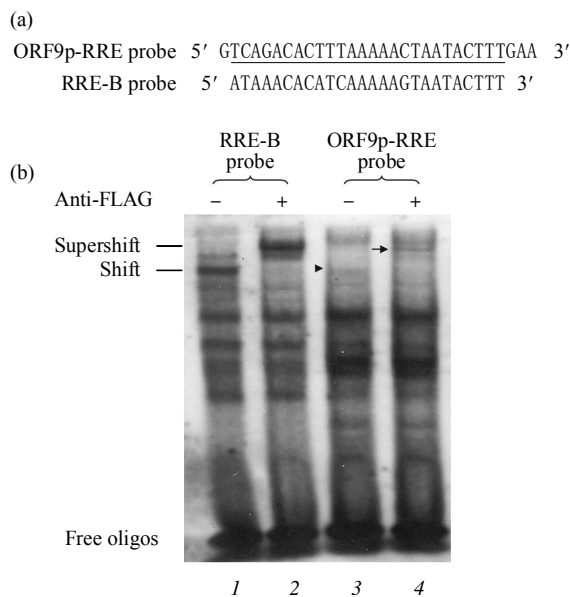


Fig. 3 Electrophoretic mobility shift assay of the RTA response fragment

(a) Sequences of ORF9p-RRE probe and RRE-B probe. (b) RTA binds to ORF9p-RRE probe and RRE-B probe in EMSA. Nuclear extracts of 293T cells transfected with pCMV-FLAG-RTA were used in EMSA. Antibody to FLAG tag was used to supershift the complexes formed. The shifted and supershifted bands of RTA-DNA complexes were indicated with filled arrowheads and arrow, respectively. RRE-B probe, previously identified by our laboratory, was used in EMSA as positive controls.

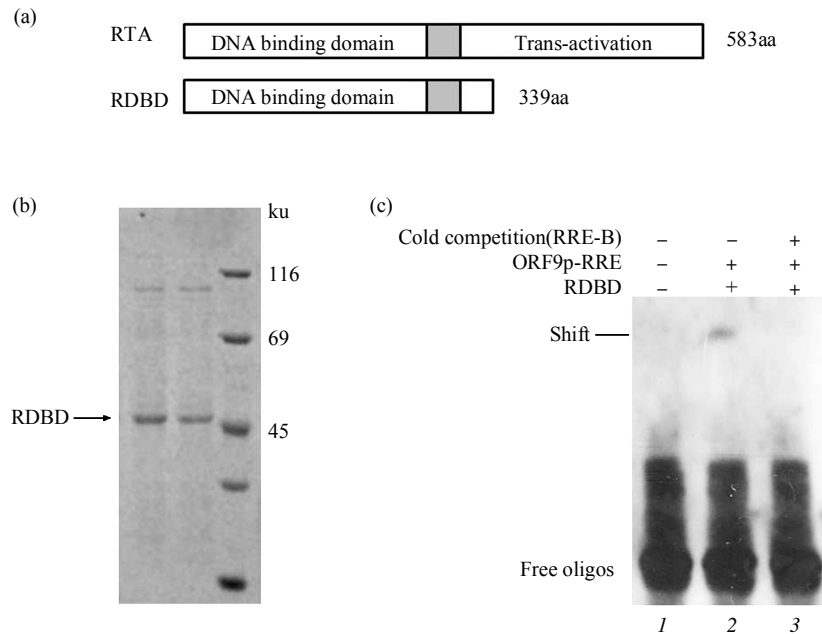


Fig. 4 Purified RDBD binds to the ORF9p-RRE probe

(a) The 583 aa MHV-68 RTA protein has two functional domains, the N-terminal DNA binding domain and C-terminal trans-activation domain. The expressed RTA DNA-binding domain (RDBD) contains the N-terminal 339 aa. (b) The RDBD was expressed in Rosette (DE3) *E. coli* and purified by Ni-NTA column. The molecular mass of the RDBD is about 45 ku. (c) ORF9p-RRE probe was 3' end labeled with Biotin and incubated with 200 ng of purified RDBD for EMSA. RRE probe was used as cold competitor to validate the binding specificity of RTA to the ORF9p-RRE probe.

2.6 在病毒感染过程中 RTA 与 ORF9p-RRE 的相互作用

上述实验证实了 RTA 可以和 ORF9p-RRE 序列在体外发生结合. 为了明确在体内病毒感染过程中是否同样存在这种结合, 我们进行了染色质免疫沉淀实验(ChIP). 将 RTA 表达质粒 pCMV-FLAG-RTA 转入 293T 细胞, 转染后 24 h 再用病毒感染 12 h, 收获细胞后进行 ChIP 实验, 最终通过 PCR 检测以确定是否有相关基因片段被蛋白质结合. 在实验中使用了无关 IgG 抗体作为 FLAG 抗体的阴性对照. 此外, 由于在病毒 ORF65 和细胞 β -actin 编码区内不存在 RTA 作用片段, 因此在实验中还同时 PCR 扩增这两个区域的基因片段作为 ORF9p-RRE 扩增的阴性对照. 最终实验结果显示, RTA 在体内可与 ORF9p-RRE 结合而在 PCR 时出现扩增条带 (图 5, 第 3 泳道), 而使用无关 IgG 的阴性对照中没有发现扩增条带 (图 5, 第 2 泳道). 同时, 对病毒 ORF65 和细胞 β -actin 基因的扩增均没有发现阳性条带. 说明在病毒感染的情况下 RTA 确实能与病毒基因组上的 ORF9p-RRE 结合.

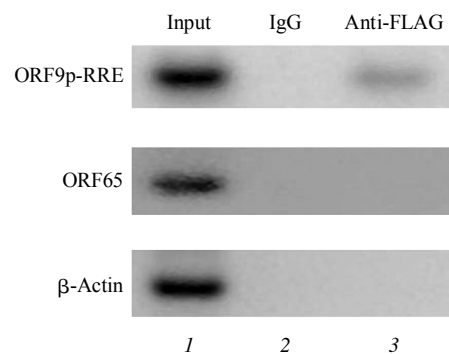


Fig. 5 RTA binds to ORF9p-RRE on viral genome in a ChIP assay

293T cell were transfected with pCMV-FLAG-RTA for 24 h and then infected with wild-type MHV-68 virus for 12 h (MOI=1). The immunoprecipitates by anti-FLAG antibody were analyzed by PCRs which would amplify ORF9p-RRE fragment between nucleotides 19 059~19 151. A pair of primers used to amplify the sequence between nucleotides 94 119~94 185 (in ORF65) and a pair of primers used to amplify the β -actin sequence were used as negative control. IgG was used as antibody control and PCR performed on total cellular extract served as input.

3 讨 论

RTA 是 MHV-68 病毒裂解感染期所表达的重要的即时早期蛋白, 它可以有效地激活处于潜伏状态的病毒进入裂解感染^[10, 13], 而利用 RNAi 干扰病毒的 RTA 表达后发现子代病毒生成水平与正常感染组相比出现明显下降^[22]. 另外, 在利用可持续表达 RTA 蛋白的重组 MHV-68 感染细胞后, 几乎全部的病毒蛋白表达水平都较野生病毒感染对照有所上调^[23], 提示转录激活下游基因是 RTA 蛋白发挥其重要功能的主要途径.

作为同属 γ 疱疹病毒的 KSHV, 其 RTA 对病毒多个基因具有转录激活作用, RTA 通过两种机制参与这些基因转录激活作用, 一是直接结合在基因启动子区^[24-25], 二是与其他转录因子相互作用共同作用于基因启动子区^[26-29]. 而对于 MHV-68, 目前受 RTA 调控的基因仅发现 ORF57 和 ORF72, 且调控机制不明. 我们之前的研究鉴定出一个新的 RTA 结合序列(RRE-B)^[18], 在本研究中, 我们首先通过基因比对, 在 MHV-68 基因组上找出与 RRE-B 具较高同源性的核苷酸片段, 该片段位于 ORF9(DNA 聚合酶基因)的启动子区, 通过研究证实 RTA 作用于含 ORF9p-RRE 片段的 ORF9 启动子区域能够有效地激活下游基因的转录. 进一步研究 RTA 与其相互作用机制证实 RTA 可以在体内实验与该序列发生结合, 在体外结合实验中, 单独 RTA 即可与该序列发生特异性结合. 本研究继 RRE-B 之后又新鉴定出一段 RTA 结合元件, 为今后进一步研究 RTA 对 ORF9 基因的转录调控以及通过调控 ORF9 的转录水平而影响病毒生活周期的研究提供了数据支持.

利用细胞核提取物进行体外结合实验(EMSA)发现, 与阳性对照相比 RTA 与 ORF9p-RRE 的结合能力相对较弱, 分析其原因: a. 可能是因为 ORF9p-RRE 中个别对 RTA 结合起关键作用的碱基发生了变化, 对于这种现象有解释称 RTA 的不同结合能力部分决定了基因转录水平的差异, 这也许也是病毒调控不同基因转录水平差异的一个有效的方式^[30]; b. RTA 与 RRE-B 的结合水平高于与 ORF9p-RRE 的结合, 可能由于在体内 RTA 除了直接与 RRE-B 结合外, 还存在与其他细胞蛋白相互作用共同与 RRE-B 结合的现象. ORF9p-RRE 位于病毒 ORF9 的启动子区域内, 在本研究中, 我们在荧光报告基因系统中证实了 RTA 可以通过作用于

ORF9 的启动子而激活荧光素酶基因的转录, 并且这种激活是依赖于 ORF9p-RRE 序列的. 但 RTA 对于 ORF9 在病毒感染过程中表达水平的影响, 还需进一步深入研究. 此外, 由于 ORF9 是病毒的 DNA 聚合酶基因, 其转录、表达水平对病毒裂解期复制具有关键性作用, 如证实 RTA 对于 ORF9 在体内的表 1 达具有调控作用, 就可以为阐明 RTA 激活病毒裂解感染提供新的证据.

我们所鉴定的 ORF9p-RRE, 其碱基序列长度为 27 bp, 与之前鉴定的 RRE 的碱基同源性高达 78%, 而 RTA 与 ORF9p-RRE 在体内和体外实验中发生直接结合说明 RTA 对其结合序列具有一定保守性, 同时也提示 RTA 可能通过与不同基因启动子区内的保守序列直接结合而参与对多个基因的转录调控, 依据这个思路, 我们计划在 MHV-68 基因组范围内继续寻找具不同同源性的核苷酸序列, 分别研究 RTA 与这些片段的相互作用, 进而鉴定出更多受 RTA 调控的基因.

参 考 文 献

- [1] Efstathiou S, Ho Y M, Hall S, *et al.* Murine herpesvirus 68 is genetically related to the gammaherpesviruses Epstein-Barr virus and herpesvirus saimiri. *J General Virology*, 1990, **71**(Pt 6): 1365-1372
- [2] Simas J P, Efstathiou S. Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 1998, **6**(7): 276-282
- [3] Staskus K A, Zhong W, Gebhard K, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J Virology*, 1997, **71**(1): 715-719
- [4] Boshoff C, Schulz T F, Kennedy M M, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. *Nature Medicine*, 1995, **1**(12): 1274-1278
- [5] Rivas C, Thlick A E, Parravicini C, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53. *J Virology*, 2001, **75**(1): 429-438
- [6] Nicholas J, Ruvolo V R, Burns W H, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nature Medicine*, 1997, **3**(3): 287-292
- [7] Stevenson P G, Efstathiou S. Immune mechanisms in murine gammaherpesvirus-68 infection. *Viral Immunol*, 2005, **18**(3): 445-456
- [8] Staudt M R, Dittmer D P. The Rta/Orf50 transactivator proteins of the gamma-herpesviridae. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2007(312): 71-100
- [9] Gradoville L, Gerlach J, Grogan E, *et al.* Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50/Rta protein activates the entire viral lytic cycle in the HH-B2 primary effusion

- lymphoma cell line. *J Virology*, 2000, **74**(13): 6207–6212
- [10] Wu T T, Usherwood E J, Stewart J P, *et al.* Rta of murine gammaherpesvirus 68 reactivates the complete lytic cycle from latency. *J Virology*, 2000, **74**(8): 3659–3667
- [11] Chen J, Ye F, Xie J, *et al.* Genome-wide identification of binding sites for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein, RTA. *Virology*, 2009, **386**(2): 290–302
- [12] Deng H, Young A, Sun R. Auto-activation of the rta gene of human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J General Virology*, 2000, **81**(Pt 12): 3043–3048
- [13] Pavlova I V, Virgin H W t, Speck S H. Disruption of gammaherpesvirus 68 gene 50 demonstrates that Rta is essential for virus replication. *J Virology*, 2003, **77**(10): 5731–5739
- [14] May J S, Coleman H M, Smillie B, *et al.* Forced lytic replication impairs host colonization by a latency-deficient mutant of murine gammaherpesvirus-68. *J General Virology*, 2004, **85**(Pt1): 137–146
- [15] Moser J M, Farrell M L, Krug L T, *et al.* A gammaherpesvirus 68 gene 50 null mutant establishes long-term latency in the lung but fails to vaccinate against a wild-type virus challenge. *J Virology*, 2006, **80**(3): 1592–1598
- [16] Pavlova I, Lin C Y, Speck S H. Murine gammaherpesvirus 68 Rta-dependent activation of the gene 57 promoter. *Virology*, 2005, **333**(1): 169–179
- [17] Allen R D, 3rd, DeZalia M N, Speck S H. Identification of an Rta responsive promoter involved in driving gammaHV68 v-cyclin expression during virus replication. *Virology*, 2007, **365**(2): 250–259
- [18] Hong Y, Qi J, Gong D, *et al.* Replication and transcription activator of murine gammaherpesvirus-68 binds to an RTA-responsive element and activates the expression of ORF18. *J Virol*, 2011-08-11
- [19] Song M J, Brown H J, Wu T T, *et al.* Transcription activation of polyadenylated nuclear rna by rta in human herpesvirus 8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virology*, 2001, **75**(7): 3129–3140
- [20] Song M J, Li X, Brown H J, *et al.* Characterization of interactions between RTA and the promoter of polyadenylated nuclear RNA in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *J Virology*, 2002, **76**(10): 5000–5013
- [21] Wu T T, Tong L, Rickabaugh T, *et al.* Function of Rta is essential for lytic replication of murine gammaherpesvirus 68. *J Virology*, 2001, **75**(19): 9262–9273
- [22] Jia Q, Wu T T, Liao H I, *et al.* Murine gammaherpesvirus 68 open reading frame 31 is required for viral replication. *J Virology*, 2004, **78**(12): 6610–6620
- [23] Martinez-Guzman D, Rickabaugh T, Wu T T, *et al.* Transcription program of murine gammaherpesvirus 68. *J Virology*, 2003, **77**(19): 10488–10503
- [24] Bowser B S, Morris S, Song M J, *et al.* Characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) K1 promoter activation by Rta. *Virology*, 2006, **348**(2): 309–327
- [25] Deng H, Song M J, Chu J T, *et al.* Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus). *J Virology*, 2002, **76**(16): 8252–8264
- [26] Liang Y, Ganem D. RBP-J (CSL) is essential for activation of the K14/vGPCR promoter of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by the lytic switch protein RTA. *J Virology*, 2004, **78**(13):6818–6826
- [27] Lan K, Kuppers D A, Robertson E S. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation is regulated by interaction of latency-associated nuclear antigen with recombination signal sequence-binding protein Jkappa, the major downstream effector of the Notch signaling pathway. *J Virology*, 2005, **79**(6): 3468–3478
- [28] Liang Y, Chang J, Lynch S J, *et al.* The lytic switch protein of KSHV activates gene expression *via* functional interaction with RBP-Jkappa (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes Dev*, 2002, **16**(15): 1977–1989
- [29] Chang P J, Boonsiri J, Wang S S, *et al.* Binding of RBP-Jkappa (CSL) protein to the promoter of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF47 (gL) gene is a critical but not sufficient determinant of transactivation by ORF50 protein. *Virology*, 2010, **398**(1): 38–48
- [30] Song M J, Deng H, Sun R. Comparative study of regulation of RTA-responsive genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *J Virology*, 2003, **77**(17): 9451–9462

Identification of an RTA Responsive Element in Murine Gammaherpesvirus-68 Genome*

HONG Yun^{1,2}, QI Jing^{1,2}, GONG Dan-Yang^{1,2}, DENG Jian-Wen^{1,2}, DENG Hong-Yu¹**

¹ CAS Key Laboratory of Infection and Immunity, Center for Infection and Immunity,
Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

² Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Murine gammaherpesvirus-68 (MHV-68), a close homologue of Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, can infect many cell lines efficiently and is able to infect laboratory mice, and has emerged as an excellent model for studying its human counterparts. The replication and transcriptional activator (RTA), mainly encoded by open read frame 50 (ORF50), is a conserved immediate-early protein in gammaherpesviruses. RTA initiates the viral lytic cycle by activating the expression of downstream viral lytic genes. Therefore, it is important to investigate the mechanism by which RTA regulates downstream gene expression. Two RTA dependent promoters of MHV-68 had previously been reported, however, the mechanism of the interaction between RTA and the promoters was not characterized. Our group has previously identified a new RTA responsive element (named RRE-B) in MHV-68 and characterized in detail the mechanisms involved. In the study, we first analyzed the MHV-68 genome and identified a sequence homologous to RRE-B in the promoter region of ORF9, and designated it as ORF9p-RRE. Dual luciferase reporter assay showed that RTA could activate the ORF9 promoter and this activation was dependent on ORF9p-RRE. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) further demonstrated that RTA bound to ORF9p-RRE *in vitro* and *in vivo*. In summary, we showed here that the promoter of MHV-68 ORF9 is responsive to RTA activation through ORF9p-RRE. The study provides support to further investigate and understand the role of RTA in regulating viral gene expression and viral life cycle.

Key words gammaherpesvirus, murine gammaherpesvirus 68 (MHV-68), replication and transcription actor (RTA)

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00158

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30930007).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888407, E-mail: rrain6@yahoo.com

Received: April 12, 2011 Accepted: May 12, 2011