

Epstein-Barr 病毒潜伏性膜蛋白 1 CTAR₃ 缺失突变体的构建与功能分析

张志伟^{2*}, 张琼¹, 余艳辉¹, 欧阳咏梅¹, 贺智敏^{1*}

(¹中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

(²南华大学医学院肿瘤研究所, 衡阳 421001)

摘要:【目的】探讨 Epstein-Barr 病毒潜伏性膜蛋白 1 (LMP1) 促细胞转化的主要活性部位及其作用机制。【方法】采用 PCR 方法重组 LMP1 羧基末端活化域 3 (aa232-aa351) 对应密码子缺失突变体 (LMP1^{Δ232-351}), 将突变型 LMP1^{Δ232-351} 和野生型 LMP1 (LMP1^{WT}) 分别导入永生化的鼻咽上皮细胞 NP69 中, 比较二者对细胞的转化作用。同时, 构建含 JAK3 启动子序列的荧光素酶表达质粒 (pGL-2/JAK3-LUC), 将 LMP1^{Δ232-351} 与 LMP1^{WT} 分别与含有 JAK3 启动子序列或 NF-κB 结合序列启动子的荧光酶表达质粒共转染 293 细胞 (用 pLNSX 质粒作对照), 比较二者活化 JAK3 启动子或转录因子 NF-κB 的功能。【结果】(1) LMP1^{Δ232-351} 促 NP69 细胞转化的能力较 LMP1^{WT} 显著降低 (n=3, p<0.01)。(2) LMP1^{WT} 能明显呈浓度依赖性活化 JAK3 启动子, 而 LMP1^{Δ232-351} 上调能力几乎丧失。【结论】LMP1 羧基末端活化域 3(aa232-aa351) 是 LMP1 的重要活性部位之一, 其促细胞转化的作用与 JAK3 蛋白表达调节有关。

关键词: EB 病毒; 潜伏性膜蛋白; 缺失突变体; NF-κB; JAK3 启动子

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1308-06

EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 是最早发现的人类 DNA 肿瘤病毒, 与伯基特氏淋巴瘤、鼻咽癌和胃癌等人类恶性肿瘤有关^[1]。EBV 潜伏性膜蛋白 1 (Latent membrane protein-1, LMP1) 是 EBV 中具有瘤基因转化活性的蛋白质, 其在 EBV 介导的 B 淋巴细胞增殖和永生化的起非常重要作用^[2], 并能单独促进体外永生化的啮齿类纤维细胞^[3] (如 Rat1 和 Balb/C 3T3) 和永生化的人、鼠上皮细胞的恶性转化, 诱导原代小鼠胚胎纤维母细胞的体外增殖和永生化的^[4], 增强癌细胞侵袭转移能力等, 因而被公认为病毒基因组编码的具有促细胞癌变和转移作用的瘤蛋白。但其转化作用机理一直不十分清楚。研究表明, LMP1 羧基末端存在 3 个结构活化域 (Carboxyl Terminal Activating Region, CTAR), 即 CTAR₁、CTAR₂

和 CTAR₃, 其中 CTAR₁ 和 CTAR₂ 介导活化 NF-κB、AP-1 信号途径^[5,6], 有报道认为 CTAR₃ 参与活化 JAK3 信号通路, 但其功能仍存在分歧^[7,8]。为进一步研究 LMP1-CTAR₃ 在细胞信号传导和细胞转化中的作用机制, 本文构建了 LMP1 的 CTAR₃ 缺失突变体和含 JAK3 启动子序列的荧光酶表达质粒, 并对该区域在促细胞转化的作用进行初步分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞: pLNSX 逆病毒质粒、pLNSX-LMP1^{WT} 逆病毒质粒^[6,10]、pGL-2 质粒由本室提供; β-半乳糖苷酶质粒 (pβ-gal) 和含 NF-κB 结合序列的启动

基金项目: 国家自然科学基金(30470668); 湖南省卫生厅科研基金(B2006-100)

*通讯作者。Tel: +86-734-8281075; E-mail: hezhimin2005@yahoo.com.cn

作者简介: 张志伟(1974-), 男, 湖南安化县人, 讲师, 医学硕士, 主要从事肿瘤病毒学研究。E-mail: zhangzhiweichina@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-05-21; 修回日期: 2008-06-21

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

子荧光酶报告基因质粒 (ELAM-luc)^[6,10] 由 Dr. David Goeddel 惠赠。293 细胞、PA317 病毒包装细胞和永生化的淋巴细胞由本室保存, 永生化的鼻咽上皮细胞 NP69 由香港大学 Dr. Tsao 惠赠, 上述细胞分别用含 10% 小牛血清的 (购自杭州四季青公司) 的 DMEM (Gibco BRL 公司)、RPM-1640 (Gibco BRL) 或无血清的 K-SFM (invitrogen 公司) 培养基中培养, 传代消化所用胰酶和 EDTA 均系 Gibco BRL 产品。

1.1.2 主要试剂: 实验所用内切酶均为 NEB 产品, 连接酶、碱性磷酸酶购自宝灵曼 (B.M.) 公司, AMV Reverse Transcription 试剂盒、PCR 系列及荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司, G418 和 Lipfect2000

脂质体购自 invitrogen 公司, 单克隆抗体 (一抗和二抗) 购自 Zymed Ltd, 其他化学和生化试剂均为 Sigma 产品。

1.1.3 引物: 根据 LMP^{WT} 序列^[6,10] 和参考文献^[9] 中 JAK3 启动子区核心序列, 采用 Primer5 引物设计软件, 分别设计引物, 不同引物的序列和扩增产物大小如表 1, 所有引物均由 invitrogen 公司合成。

1.2 pLNSX-LMP1^{Δ232-351} 逆病毒质粒的重组

以质粒 pLNSX-LMP1^{WT} 为模板, P1 与 P2、P3 与 P4 为引物, 分别设 50 μL 反应体系, 于 PCR 仪 (Eppendorf 公司) 中扩增 (94°C 5 min, 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环), 用 1% 琼脂糖

表 1 引物与序列
Table 1 Primers and their sequence.

Primers	Sequence(5'→3')	Production size/bp
cDNA of LMP1 ^{Δ232-351}	P1: CTCGGCCTCTGAGCTATCC	P1 and P2: 793
	P2: GCCGCATGGGCTCCACTCACGAGCAG	P3 and P4: 1297
	P3: AGTGGAGCCCATGGCGGGCGGTGACCCA	P1 and P4: 506(Plasmid)
	P4: CGAGAAGCGAAGCTGATTGGT	2450(LMP1 ^{WT}) 2090(LMP1 ^{Δ232-351})
critical domain of JAK3 promoter	P5: CGCTCGAGGTGCCCAACTCACACATGCTACAGAT (boldface type contains an <i>Xho</i> I enzyme site)	324
	P6: CCCAAGCTTAGAGGAAAGTCCCACTCGGCTCCTT (boldface type contains a <i>Hind</i> III enzyme site)	
β-actin	P7: ACCGTGGAGAAGAGCTACGA	309
	P8: GTACTTGCCTCAGAAGGAG	

凝胶电泳回收目的片断。再用以上片断为模板, P1 与 P4 为引物进行 PCR 扩增 (94°C 5min, 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环) 得到缺失 CTAR₃ 的 LMP1 片断, 回收、纯化后, 用限制性内切酶 *Hind* III 与 *Xba* I 对其与 pLNSX 载体质粒分别进行酶切, 回收纯化后, 进行连接, 随后将连接产物转化感受态 DH5α, 挑取菌落制备质粒后, 用 PCR 和酶切鉴定重组体, 将质粒送 invitrogen 公司进行全长序列测定, 获 pLNSX-LMP1^{Δ232-351} 逆病毒质粒。

1.3 pGL-2/JAK3-LUC 质粒 (JAK3 启动子核心区域) 的重组

培养、收集淋巴细胞, 提取细胞基因组 DNA, 取 100 ng 的 gDNA 为模板, 以 P5 与 P6 为引物, 设 50 μL 反应体系于 PCR 仪中扩增 (94°C 5 min, 94°C 30 s, 62°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环), 检测、纯化目的片断后, 用限制性内切酶 *Hind* III 与 *Xho* I 分别对目的片断与 pGL-2 质粒进行酶切, 分别回收片断, 连接、转化感受态 JM109, 筛选挑取菌落, 制备质粒 DNA。用 PCR、酶切和测序鉴定, 获得 pGL-2/JAK3-LUC 质粒质粒。

1.4 重组子功能试验^[10]

用 200 ng 含 NF-κB 结合序列的启动子荧光酶报告基因质粒与 500 ng pLNSX-LMP1^{Δ232-351} 质粒 (以 pLNSX 与 pLNSX-LMP1^{WT} 分别为阴性和阳性对照) 及 300 ng pβ-gal 共转染 293 细胞, 实验共设 3 组, 每组设 3 个平行孔。48 h 后, 按荧光酶活性检测试剂盒操作指南, 溶解、离心, 从每个样本取 20 μL 上清分别与 100 μL 荧光检测试剂混合置 TD-20/20 荧光检测仪 (bio-Rad) 中读数, 用校正值 (测量值与酶标仪测定 β-gal 数值之商) 表示转录因子 NF-κB 的相对活性 (以平行孔的均数和标准差表示), 本实验独立进行了 3 次。

将 200 ng pGL-2/JAK3-LUC 和 300 ng pβ-gal 分别与不同量的 pLNSX-LMP1^{WT} (150 ng, 300 ng, 450 ng, 600 ng) 和 pLNSX-LMP1^{Δ232-351} (150 ng, 300 ng, 450 ng, 600 ng) 共转染 293 细胞, 每孔转染总量为 1100 ng, 不足部分用 pLNSX vector 补齐。实验共设 9 组, 每组设 3 个平行孔。48 h 后, 按荧光酶活性检测试剂盒操作指南, 在 TD-20/20 荧光中检测仪进行检测, 用校正值 (测量值与酶标仪测定 β-gal 数值之

商)表示 JAK3 启动子活化的相对活性(以平行孔的均数和标准差表示),本实验亦独立进行了 3 次。

1.5 感染性逆转录病毒制备和感染

参考文献进行^[11],将 pLNSX、pLNSX-LMP1^{WT}和 pLNSX-LMP1^{Δ232-351}质粒分别转染 PA317 细胞,600 μg/mL G418 筛选 2 周后,汇合克隆扩大培养,获得稳定产逆病毒的 PA317 病毒包装细胞系。收集细胞上清,4℃,10000 r/min 离心 15 min,去细胞碎片,4℃,30000 r/min 离心 90 min,病毒颗粒沉淀用 1:100 体积新鲜 K-SFM 培养基溶解沉淀,过滤除菌,过滤液即为逆病毒浓缩液,-70℃储存备用。

将 NP69 细胞种入 6 孔板培养,分别用 RV-LNSX、RV-LMP1^{WT}和 RV-LMP1^{Δ232-351}逆病毒和 8 mg/L 聚凝胺 37℃孵育(感染)NP69 细胞 2 次(3~4 h/次,间隔 8~12 h/次),400 μg/mL G418 筛选 2-3 周,汇合克隆扩大培养,建成稳定传代的转染细胞系(NP69-pLNSX、NP69-LMP1^{WT}和 NP69-LMP1^{Δ232-351})。对上述细胞分别进行免疫荧光、RT-PCR 鉴定。

1.6 免疫荧光试验

参照文献^[10]制备细胞爬片,用甲醇、丙酮(1:1)固定、洗片、干燥后用抗 LMP1 单抗 S12 标记 1 h(37℃),洗片后用 FITC 标记的羊抗鼠二抗标记 1 h(37℃),洗涤后甘油封片,于荧光显微镜下观察,拍照。

1.7 RT-PCR

收集细胞,按 Trizol 试剂操作程序抽提细胞总 RNA,用紫外分光光度计和凝胶电泳检测 RNA 的浓度、纯度和质量,分装冻存于-70℃。RT-PCR 按照 AMV 逆转录试剂盒操作步骤进行逆转录。然后取 RT 产物 3 μL,加入 P1 与 P4 引物和内对照 P7 与 P8 引物分别各 1 μL(10 μmol/L)设 30 μL PCR 反应体系,在 PCR 仪中扩增(94℃ 5 min,94℃ 1 min,58℃ 1 min,72℃ 1.5 min,40 个循环,72℃ 10 min)。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物(结果未显示)。

1.8 平板克隆形成实验

取对数生长期的细胞,制成细胞悬液,按 1000 个细胞/孔接种于 6 孔板中,静置培养 2 周。取出培养皿,用 PBS 洗 2 次,甲醇固定 15 min 后,0.4%结晶紫染色。用肉眼直接计数克隆数,或在显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆。然后,按公式计算克隆形成率:克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数)×100%,本实验独立进行了 3 次。

1.9 软琼脂集落实验

用 K-SFM 培养基、0.6%琼脂糖(终浓度)配制底层琼脂,取 1.5 mL 匀铺于 6 孔板内,4℃放置 10 min,

另外用转染的 NP69 细胞(密度为 5×10⁴ 个细胞/孔)、K-SFM 培养基、0.3%琼脂糖(终浓度)配制顶层琼脂,待底层琼脂凝固后将顶层琼脂铺于底层琼脂上,37℃,5% CO₂ 温箱内连续培养 2 周后,计数集落数。实验设 3 组:NP69-pLNSX、NP69-LMP1^{WT}和 NP69-LMP1^{Δ232-351},每组 3 个平行孔,集落形成率计数:于倒置显微镜下观察集落(≥50 个细胞为 1 个集落)的数目和大小,计数每组每孔集落数的平均,计算出细胞集落形成率(集落形成率=集落数/接种细胞数×100%),本实验亦独立进行了 3 次。

1.10 统计学分析

用 SPSS11.0 统计软件包进行 t 检验。数据以均数±标准差表示,p<0.05 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 重组 pLNSX-LMP1^{Δ232-351} 质粒鉴定

本实验设计了特殊的 PCR 引物(如材料和方法),以野生型 LMP1 为模板进行扩增,构建了 LMP1 232-351 氨基酸序列对应 cDNA 密码子的缺失突变体。重组 pLnsx-LMP1^{Δ232-351} 质粒经 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切鉴定得到了证实,经测序结果证实序列完全正确(结果未显示)。

2.2 重组 pGL-2/JAK3-LUC 质粒鉴定

实验以 B95-8 细胞基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,将产物纯化、酶切重组至 pGL-2 的荧光素酶表达质粒,即 pGL-2/JAK3-LUC,重组质粒经 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切鉴定(如图 1),及测序证实为 JAK3 基因启动子区域(-289/+35)。

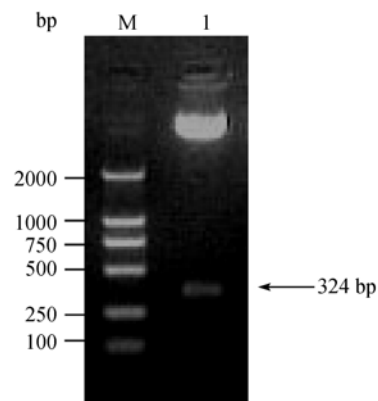


图 1 酶切分析 pGL-2/JAK3-LUC 质粒

Fig. 1 The pGL-2/JAK3-LUC plasmid digested by *Hind* III and *Xho* I. M.marker; 1. pGL-2/JAK3-LUC recombinant plasmid digested by the *Xho* I and *Hind* III restrictive enzyme.

2.3 突变型 LMP1^{Δ232-351} 的功能活性

经β-半乳糖苷酶测定值校正后反映 LMP1 诱导

NF-κB 活性的相对荧光素酶值。突变型 LMP1^{Δ232-351} 活化转录因子 NF-κB 的活性与野生型 LMP1 基本相似 (如图 2), 说明构建的突变型 LMP1^{Δ232-351} 具有生物学活性, 第三个活性区域的缺失不影响对转录因子 NF-κB 的活化。

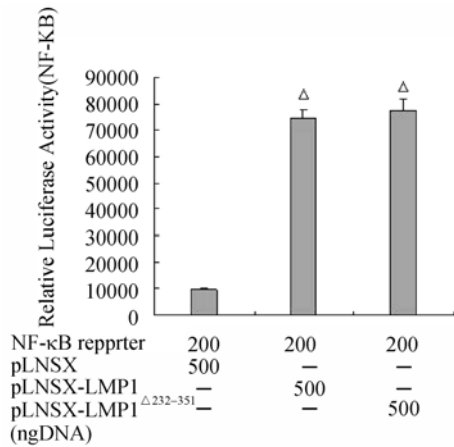


图 2 突变型 LMP1^{Δ232-351} 对 NF-κB 报告基因的活化作用
Fig. 2 Mutant type LMP1^{Δ232-351} transactivation of NF-κB reporter. Values are means ± standard deviations (SD). (n=3, ^ΔP<0.005, VS pLNSX).

2.4 LMP1 对 JAK3 启动子的上调作用

经β-半乳糖苷酶测定值校正后反映 LMP1^{WT} 诱导 JAK3 启动子活化的相对荧光素酶值。发现 LMP1^{WT} 能明显上调 JAK3 启动子报告基因活性, 并呈浓度依赖性; LMP1^{Δ232-351} 对其的上调作用几乎丧失 (图 3)。提示 LMP1^{WT} 可能参与了 JAK3 启动子的活化, CTAR₃ 是 LMP1^{WT} 发挥这一作用的重要活性部位。

2.5 稳定转染的 NP69 细胞免疫荧光检测

转染 LMP1^{WT} 和 LMP1^{Δ232-351} 的 NP69 细胞, 经免疫荧光染色, 荧光显微镜下观察, LMP1^{Δ232-351} 和 LMP1^{WT} 的蛋白表达一致, 主要位于细胞膜和细胞浆内 (如图 4), 说明第三个活性区域缺失后, 不影响其在细胞中的表达与定位。

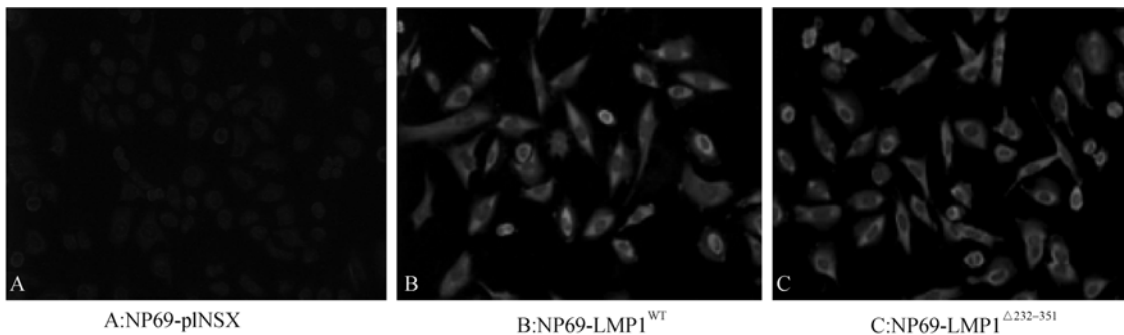


图 4 LMP1^{Δ232-351} 在 NP69 细胞的免疫荧光染色

Fig. 4 The proteins expression of LMP1^{Δ232-351} in NP69 cells detection by immunofluorescence. A: NP69-pLNSX; B: NP69-LMP1^{WT}; C: NP69-LMP1^{Δ232-351}

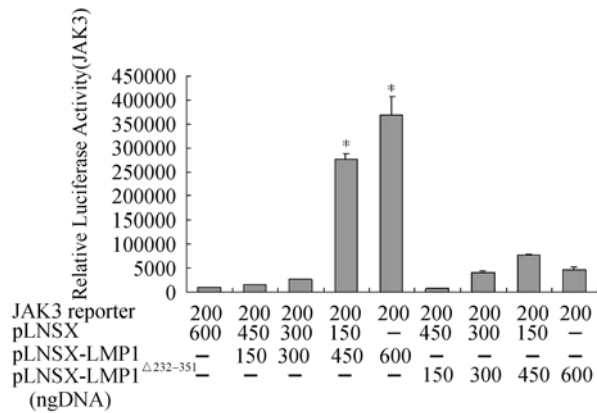


图 3 LMP1 对 JAK3 启动子活性的影响

Fig. 3 Wild type LMP1 effecting the activity of JAK3 promoter. Values are means ± standard deviations. (n=3, *P<0.005, VS pLNSX and pLNSX-LMP1^{Δ232-351}).

2.6 转化细胞平皿克隆形成能力

以 NP69-pLNSX 为阴性对照, NP69-LMP1^{WT} 为阳性对照, 以每孔 1000 个的相同数量接种 NP69-LMP1^{Δ232-351} 细胞于 6 孔板中, 每组设 3 个平行孔。结果显示 (表 2), NP69-LMP1^{WT} 组较 NP69-pLNSX 和 NP69-LMP1^{Δ232-351} 组的克隆数多。

表 2 NP69-LMP1^{Δ232-351} 细胞形成克隆的统计

Table 2 Statistics of NP69-LMP1^{Δ232-351} cell forming colony number

Cells	CFN(average±SD)	Cloning efficiency/%
NP69-pLNSX	74±4	7.4
NP69-LMP1 ^{WT}	484±17	48.4*
NP69-LMP1 ^{Δ232-351}	214±10	21.4

NP69-LMP1^{WT} VS NP69-pLNSX and NP69-LMP1^{Δ232-351}; # p<0.05

2.7 突变型 LMP1^{Δ232-351} 促 NP69 细胞的软琼脂集落形成能力

NP69-pLNSX、NP69-LMP1^{WT} 和 NP69-LMP1^{Δ232-351} 细胞在软琼脂中的集落形成数/率, 结果显示 (表 3), NP69-pLNSX 组、NP69-LMP1^{Δ232-351} 组与 NP69-LMP1^{WT} 组进行比较, 集落数明显减少, 且较体积明显缩小, 差异有显著性意义 (P<0.01)。

表 3 NP69-LMP1^{Δ232-351} 细胞的集落形成能力
Table 3 The ability of NP69-LMP1^{Δ232-351} cell forming colony

Groups	CFN(average±SD)	Cloning efficiency/%
NP69-pLNSX	3±1	0.06
NP69-LMP1 ^{WT}	256±14	5.12 [▲]
NP69-LMP1 ^{Δ232-351}	88±7	1.78

NP69-LMP1^{WT} VS NP69-pLNSX and NP69-LMP1^{Δ232-351};
[▲]*p*<0.01

3 讨论

EB 病毒潜伏性膜蛋白-1 cDNA 全长 1158 bp, 是一个由 386 个氨基酸残基组成的跨膜糖蛋白, 其主要功能部位位于羧基端活化域^[12]。目前, LMP1 被认为是一种不需要配体起作用的 CD40 模拟分子, 其自身聚集即可启动其下游信号传导的致癌蛋白^[13]。在 B 细胞中的研究认为 LMP1 可以模拟 CD40 起作用, 而 JAK3/STAT 信号途径在 CD40 的信号传导中起重要作用。通过对 CD40 和 LMP1 胞浆段氨基酸序列的比较发现, 除 CTAR₁、CTAR₂ 一致的共有序列外, LMP1 还有另外一段富含脯氨酸的相似序列 PXXXP Box1, 以及紧邻的 Box2, 可能与 Box1 辅助激活有关, 并命名该结构区域为 CTAR₃^[7]。Hammerschmidt 等^[7]在 B 细胞和 293 细胞中的研究认为 LMP1 可以通过该区域激活 JAK 家族其他成员 JAK3。而 Izumi 等^[8]认为 LMP1 的 CTAR₃ 区与 JAK3 的关系不明确。然而, JAK/STAT 信号途径是细胞因子作用的重要途径。近年的研究发现, 细胞因子与其相应受体结合启动其下游 JAK/STAT 信号, 参与调控与细胞增殖、分化和凋亡相关的多种基因表达^[14], 如细胞周期素 D1(cyclin D1) 和 Bcl-XL^[15]等。本研究参考 Izumi 等的报道^[16], 以 LMP1 羧基末端 232-351aa 为靶点, 构建了 232-351 位氨基酸缺失突变的 LMP1, 在其功能检测中发现突变型 LMP1^{Δ232-351} 与野生 LMP1 活化转录因子 NF-κB 的功能相似(图 2), 与 Izumi 报道结果基本一致^[16], 说明本研究构建的突变型 LMP1^{Δ232-351} 载体成功, 可进行下一步研究。NF-κB 信号通路的活化与 LMP1 的 CTAR₁ 和 CTAR₂ 参与调节关系十分密切, 本研究结果突变型 LMP1^{Δ232-351} 与野生 LMP1 能同样有效活化转录因子 NF-κB, 说明 LMP1 的 CTAR₃ (232-351aa) 缺失突变后对 CTAR₁ 和 CTAR₂ 区域的功能影响较小, 同时可以推测 CTAR₃ 并未参与介导 NF-κB 信号通路的活化。而突变型 LMP1^{Δ232-351} 与野生型 LMP1 相比丧失了对 JAK3 启动子活化的功能(图 3), 结果提示 CTAR₃ 可能参与调节 JAK3 蛋白的表达, 进一步证实了 Hammerschmidt 等提出的 CTAR₃ 参与

调节 JAK3 通路的报道, 至于由 LMP1 活化的调节途径还有待进一步研究。

EB 病毒编码的 LMP1 蛋白因其能致啮齿类纤维细胞系 Rat1、Balb/c3T3 恶性转化而被公认为具有转化功能的瘤蛋白, 许多研究揭示了 LMP1 对细胞增殖^[17]、分化^[18]、凋亡^[19]及细胞周期调控^[20]的影响及部分规律, 但对 LMP1 促上皮细胞转化的机制却一直尚未阐明。本研究缺失突变 LMP1 的 232-351 位氨基酸序列后, 将突变 LMP1^{Δ232-351} 导入鼻咽上皮细胞 NP69 中, 3 次独立的平板克隆和软琼脂集落试验均发现其转化作用比野生型 LMP1 明显降低(表 2, 3), 推测 LMP1 对 NP69 细胞的转化可能与其调节 JAK3 蛋白的表达有关, 为 LMP1 转化作用机制以及 EBV 在恶性肿瘤发病中的作用机制提供了有力证据。当然, 这种转化作用对 JAK3 信号途径活化的依赖, 其他具体作用过程尚需进一步的研究, CTAR₃ 所调节的信号网络途径将是我们下一步的工作。

参 考 文 献

- [1] Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2004, 10(3): 803-821.
- [2] Dirmeyer U, Neuhierl B, Kilger E, *et al.* Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus 1. *Cancer Research*, 2003, 63: 2982-2989.
- [3] 张志伟, 贺智敏, 周敏, 等. NF-κB 介导的 EB 病毒潜伏性膜蛋白 1 在 Rat-1 细胞转化和成瘤中的作用. *癌症(Chinese Journal of Cancer)*, 2007, 26(2): 118-122.
- [4] Ahsan N, Kanda T, Nagashima K, *et al.* Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 plays a critical role in virus production. *Journal of Virology*, 2005, 79(7): 4415-4424.
- [5] Mainou BA, Everly DN Jr, Raab-Traub N. Unique signaling properties of CTAR1 in LMP1-mediated transformation. *Journal of Virology*, 2007, 81(18): 9680-9692.
- [6] He ZM, Xin BZ, Yang X, *et al.* Nuclear factor-κB activation is involved in LMP1-mediated transformation and tumorigenesis of Rat-1 fibroblasts 1. *Cancer Research*, 2000, 60: 1845-1848.
- [7] Gires O, Kohlhuber F, Kilger E, *et al.* Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *The EMBO Journal*, 1999, 18: 3064-3073.
- [8] Higuchi M, Kieff E, Izumi KM. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-Lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *Journal of Virology*, 2002, 76: 455-459.
- [9] Aringer M, Hofmann SR, Frucht DM, *et al.* Characterization and analysis of the proximal janus kinase 3 promoter 1. *The Journal of Immunology*, 2003, 170: 6057-6064.
- [10] He ZM, Chen ZC. Construction and function analysis of a CTAR-2 Region mutant of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2003,

- 35 (3): 261–265.
- [11] 贺智敏, 张王伟, 杨芳, 等. EB 病毒潜伏性膜蛋白 1 促原代 MEF 细胞永生化中的作用及机制. *中国病毒学(Virologica Sinica)*, 2006, 21(1): 15–20.
- [12] Pandya J, Walling DM. Oncogenic activity of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) is down-regulated by lytic LMP-1. *Journal of Virology*, 2006, 80(16): 8038–8046.
- [13] Rastelli J, Holzel CH, Seagal J, *et al.* LMP1 signaling can replace CD40 signaling in B cells in vivo and has unique features of inducing class-switch recombination to IgG1. *Blood*, 2008, 111(3): 1448–1455.
- [14] Gamero AM, Larner AC. Vanadate facilitates interferon α -mediated apoptosis that is dependent on the Jak/Stat pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (17): 13547–13553.
- [15] Kung CP, Raab-Traub N. Epstein - Barr Virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor through effects on Bcl-3 and STAT3. *Journal of Virology*, 2008, 82(11): 5486–5493.
- [16] Izumi KM, Cahir McFarland ED, Riley EA, *et al.* The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-Lymphocyte growth transformation. *Journal of Virology*, 1999, 73(12): 9908–9916.
- [17] Lan K, Choudhuri T, Murakami M, *et al.* Intracellular activated notch1 is critical for proliferation of Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus-associated B-Lymphoma cell lines in vitro. *Journal of Virology*, 2006, 80(13): 6411–6419.
- [18] Dawson CW, Laverick L, Morris MA, *et al.* Epstein-Barr Virus-Encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *Journal of Virology*, 2008, 82(7): 3654–3664.
- [19] Le Cloennec C, Youlyouz-Marfak I, Adriaenssens E, *et al.* EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF- κ B, STAT1, and p53. *Blood*, 2006, 107(5): 2070–2078.
- [20] Mainou BA, Raab-Traub N. LMP1 Strain Variants: biological and molecular properties. *Journal of Virology*, 2006, 80(13): 6458–6468.

Construction and function analysis of the Epstein-Barr Virus-encoded latent membrane protein-1 of CTAR₃ region

Zhiwei Zhang^{2*}, Qiong Zhang¹, Yanhui Yu¹, Yongmei Ouyang¹, Zhimin He^{1*}

¹ Cancer Research Institute of Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China

² Cancer Research Institute of Medical College, Nanhua University, Hengyang 421001, China

Abstract: [Objective] The role of carboxyl terminal activating region of latent membrane protein1 (LMP1) in Epstein-Barr virus infection and oncogenesis is unclear. In this study, we investigated the activating sites and functionary mechanism of LMP1. **[Methods]** We recombined a deletion mutant type LMP1 (LMP1 ^{Δ 232–351}), deleted the amino acid residues including 232–351 codons in carboxyl terminal activating region-3 by PCR. Then we compared mutant type LMP1 ^{Δ 232–351} with wild type LMP1 (LMP1^{WT}) to alter biological effect in Nasopharyngeal Epithelial Cell line NP69. Moreover, we constructed a Janus Kinase 3 (JAK3) promoter luciferase reporter system (pGL-2/JAK3-LUC). We respectively cotransfected the LMP1 ^{Δ 232–351} and LMP1^{WT} with promoter including NF- κ B binding sequence or JAK3 promoter luciferase reporter into 293 cells (controlled with pLNSX vector), and compared their actions to activating promoters by results of luciferase activity assay. **[Results]** (1) The colony forming number (CFN) of NP69-LMP1 ^{Δ 232–351} cells significantly decreased to compare with CFN of NP69-LMP1^{WT} (n=3, p<0.01). (2) LMP1^{WT} was able to up-regulate the transcription activity of JAK3 promoter and the level of up-regulation was correlated with its concentration in Human embryonic kidney 293 cell line; while LMP1 ^{Δ 232–351} was almost defective ability to activate the promoter. **[Conclusion]** The carboxyl terminal activating region-3 may be one of the most important function sites of LMP1, which involved in activating the JAK3 promoter and regulating the expression of JAK3 protein.

Keywords: Epstein-Barr virus; LMP1; deletion mutant; NF- κ B; JAK3 promoter