

國立台灣大學醫學院微生物學所微生物及免疫學組



碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

雙特異性去磷酸酶 6 及 8 於 EB 病毒感染之調控

與生物功能

Regulation and Biological Functions of

DUSP6 and DUSP8 in Epstein-Barr viral infection

林佩頤

Pei-Yi Lin

指導教授：蔡錦華 博士

Advisor: Ching- Hwa Tsai, PhD

中華民國 103 年 7 月

July, 2014

致謝

密集且繁忙的碩士班兩年研究生涯終於畫下了完美的句點。這段期間，學習到很多，也很辛苦，一早到實驗室，就進入無限實驗循環中，直到晚上才得以暫時結束。許多挫折與失敗，重複嘗試新條件，漸漸累積實驗經驗，終於完成一張可能可以用的結果！慢慢的集結成冊，提進度報告，上台述說研究成果，接受口委老師建議與指教下摸索出實驗方向，繼續前進。

謝謝這兩年來，EBV 實驗室的蔡老師、素真老師、李明學老師的指導與建議以及學長姐、實驗同伴和學弟妹的協助，度過紮實辛苦卻又歡樂有趣的研究生活。君翰學長的一步步帶領，從無到有的教導每一項實驗技巧及報告要領，及分享生活小確幸。雅菁學姊每日帶著溫柔笑容，治癒心靈。雅琪學姊不斷提醒實驗上不可忽略的關鍵，否則會萬劫不復。奐勻學姊能夠讓我以正向的態度面對每一天的挑戰與每周進度的壓力，以及尋找美食吃大餐和實驗室出遊騎腳踏車平安回家。維筑姊的爽朗笑聲，分享家中毛孩子小趣事，桌上總是有無限飲料。實驗同伴家裡有噴水池之坤詣兄無厘頭的玩鬧，不疾不徐的個性，手拔河還是弱弱的。阿啤導遊包辦無限行程，出遊超安心。小昱真冷靜地推你入坑，很完美的記錄每一項消費是個完美的總務長。全國第六名的陳彥儒，謝謝你幫忙搬東搬西，提供每日聊天話題，不得不承認唱歌很好聽。外語很好的楷敏，謝謝你總是默默幫我補貨訂東西，出遊很罩！就用西班牙文打論文吧！感覺進來很久即唱歌好聽的亭瑋，加油未來兩年會過得很充實的，和薺萱組雙人團體不時舉辦小出遊吧 XD。目前很害羞的又寧，要多多跟大家吃午餐唷，快脫離彥儒的掌控！兩年實驗生活加油！有時像 A 型的 B 型之正央之薺萱只獲得沒多久而已，真是捨不得 XD 實驗加油喔。

最後，謝謝大家，謝謝你們，我們要保持聯絡唷

摘要

EB 病毒(Epstein-Barr virus)屬於疱疹病毒家族的一員，是第一個由 WHO 組織認證為與腫瘤高度相關的 DNA 病毒。在體外實驗，具有能夠將 B 細胞不朽化(Immortalize)，使其成為不斷增生的淋巴母芽細胞株(Lymphoblastic cell line, LCLs)。文獻指出 EB 病毒與許多人類惡性腫瘤有高度相關，如巴氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、霍金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、移植後淋巴增生疾病(Post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLD)、鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)等。

EB 病毒為了長期存活於宿主細胞內，會抑制細胞凋亡因子，並且持續性活化利於生長之訊息傳遞路徑，例如 NF- κ B、ERK、JNK、p38、Akt。最重要地，EB 病毒藉由調控宿主免疫反應，使得 EB 病毒得以逃避免疫攻擊，穩定存活於細胞內。本實驗室先前利用 cDNA 微陣列實驗，分析 CD19⁺初級 B 細胞(primary B cells)及 LCLs，探查兩者細胞內基因表現之變化情形。發現 EB 病毒感染 B 細胞後，影響 B 細胞內多種雙特异性磷酸酶(Dual specificity phosphatase, DUSPs)之基因表現，如 DUSP1、DUSP2、DUSP6、DUSP8。DUSP 於細胞內主要使特定目標之 MAPK 去磷酸化，使 MAPK 活性降低，扮演負向調控角色。其中，DUSP6 及 DUSP8 分別可調控 ERK 或 JNK/p38 之磷酸化程度。因此，我們想了解 MAPK 之表現與調控對 EB 病毒在不朽化 B 細胞之過程有何影響。根據 DUSPs 對於下游目標 MAPK 專一性，我們選擇其中 13 種 DUSPs，利用 RT-PCR 分析 CD19⁺初級 B 細胞及相對應之 LCLs 細胞，發現當 B 細胞受到 EB 病毒感染時 DUSP1、DUSP2、DUSP6、DUSP8 表現量明顯受到抑制。同樣地利用西方墨點法也觀察到 DUSP6 及 DUSP8 蛋白質表現量下降。進一步確認上述現象，以四個來源之初級 B 細胞及相對應 LCLs 觀察到 DUSP6 及 DUSP8 蛋白質表現量有相同趨勢。下一步，我們欲探查 EB 病毒透過何種病毒基因抑制 DUSP6 及 DUSP8 基因表現。由慢病毒感染細胞株 Akata 及 BJAB 之實驗中，發現 EB 病毒潛伏期膜蛋白 LMP1

具有抑制 DUSP6 及 DUSP8 之能力。進而以 shRNA 方法證明 LMP1 的確參與 EB 病毒抑制 DUSP6 及 DUSP8 之過程。並且，LMP1 可能藉由其 C 端活化區域 CTAR1 或 CTAR2 活化 ERK 訊息傳遞路徑，抑制 DUSP6 及 DUSP8 之表現。於細胞內訊息傳遞方面，LMP1 可能藉由 ERK 同時抑制兩者 DUSP 之表現。此外，EB 病毒活化 Elk-1 轉錄因子而使 DUSP6 表現量下降，但不影響 DUSP8 之表現量。利用螢光酵素報導基因分析顯示，LMP1 可透過抑制 DUSP6 及 DUSP8 之啟動子藉以影響其基因表現，但可能透過不同之轉錄因子調控。

進一步，欲瞭解 DUSP6 及 DUSP8 在 EB 病毒感染宿主細胞中所扮演之生物角色及生理功能。發現 LCLs 以慢病毒方式轉導入 DUSP6 質體，使 LCLs 聚球型態變小，並且 LCLs 細胞數目也隨表現 DUSP6 而下降。進一步，欲探查表現 DUSP6 之 LCLs 命運為何，利用流式細胞儀分析細胞週期，發現大量表現 DUSP6 之 LCLs 細胞週期 subG1 百分比明顯增加。此外，也探查 p-ERK、ERK、caspase 及 PARP 表現量，於西方墨點法結果發現，ERK 磷酸化程度降低，而 caspase3 及 PARP 有受到活化情形。以上結果顯示於 LCLs 表現 DUSP6 促使細胞凋亡。並且，當 DUSP6 催化區域突變，則無法導致上述現象。另一方面，DUSP8 大量表現於 LCLs 中同樣造成 LCLs 聚球變小，細胞週期停留於 subG1 比率增加。然而，DUSP8 促使細胞凋亡機制與 DUSP6 不同。當大量表現 DUSP8 於 LCLs，p38 磷酸化程度下降，卻不活化 caspase3，而活化 Bcl-2 及 PUMA。然而，DUSP8 催化區域突變型對於細胞增生之影響仍尚未有進一步結果。

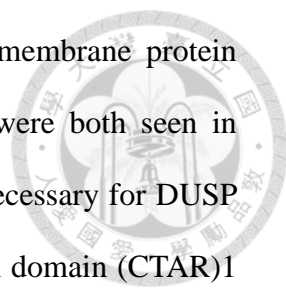
總結以上，EB 病毒不朽化初級 B 細胞過程中，透過 LMP1 抑制 DUSP6 及 DUSP8 表現，因而防止細胞凋亡。

關鍵字：EB 病毒、MAPKs、雙特異性磷酸酶、LMP1。

Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) belongs to human Herpesviridae family. This virus is first virus defined by WHO as a human oncogenic virus. In vitro, EBV can immortalize primary B cells into lymphoblastoid cell lines (LCLs). Many studies evidence that EBV is associated with many human malignancies, such as Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, Post-transplant lymphoproliferative disorder, nasopharyngeal carcinoma etc and so on.

In order to persistent in host cells, EBV activate downstream signaling transduction pathway, such as NF- κ B, ERK, JNK, p38, Akt, to induce host cell constitutive proliferation, and to prevent host cell from program cell death. Most importantly, EBV manipulates the host immune response so that it can escape the immune surveillance and persist in host cells. Previously, we utilized cDNA microarray to compare the whole panel of cellular gene expression between CD19⁺ primary B cells and LCLs which immortalized with B95.8 strain EBV. Preliminarily, we found that EBV influences the gene expression of many kinds of dual specificity phosphatase (DUSP), such as DUSP1, DUSP2, DUSP6 and DUSP8. One of the major functions for DUSP is to negatively regulate MAPK activities by dephosphorylation of MAPK and inactivate their kinase activities. So, we wonder the expression and regulation of MAPK during the EBV immortalization process. According to their substrate specificity, we selected 13 DUSPs to test their kinetic mRNA expression by RT-PCR. Among them, we saw the DUSP1, 2, 6, and 8 are obviously down-regulated when primary B cells become LCLs. Among them, we chose the DUSP6 and 8 as our study targets. In further Western blotting assay, the protein expression of both DUSP6 and 8 are also decreased. To further confirm these phenomena, four pairs of primary B cells and LCLs are detected for their protein expression of DUSP6 and 8. Next, we would like to know which viral gene is involved in these down-regulation effects.



According to the results of lentiviral infection, the EBV latent membrane protein 1(LMP1) is responsible for this down-regulation. These results were both seen in Akata and BJAB cell lines. Furthermore, we show that LMP1 is necessary for DUSP 6 and 8 downregulation by shRNA approach. C-terminal activation domain (CTAR)1 and CTAR2 of LMP1 were required for this downregulation. In signaling, LMP1-mediated ERK pathway was involved in both DUSP-downregulation. In addition, ERK-downstream Elk1 was required for DUSP6 but not DUSP8 down-regulation. Based on the results of luciferase reporter assay, we demonstrated that LMP1 downregulates DUSP6 and DUSP8 through inhibiting their promoter activity, but probably with different transcriptional factors.

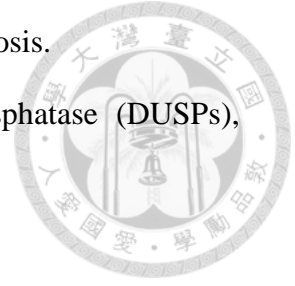
Of note, we desired to address the influence of this down-regulation. LCL clumping morphology was shrinking upon the DUSP 6-expressive lentivirus were transduced into LCLs. Consistently, the cell number were decreased during lentivirus infection. To clarify the question what is fate of DUSP6-overexpressive LCLs, we checked the cell cycle by flowcytometry. The sub-G1 population was obviously increased after over-expression. Meanwhile, we examined the expression of p-ERK, ERK, caspase and PARP. Obviously, Western-blotting data indicated that the amounts of p-ERK are decreased, while cleaved caspase 3 and cleaved PARP are increased. All the results hinted that over-expression DUSP 6 can cause cell apoptosis. Of note, the kinase mutated DUSP 6 would not trigger the above phenomena. In the case of DUSP8, the LCL clumping was also shrinking and the sub-G1 population was also increased. However, their apoptotic mechanism is different from over-expression DUSP6. During over-expression of DUSP8, p38 was decreased but caspase 3 kept the same. On the other hand, cleaved Bcl-2 and PUMA were increased. However, the kinase dead DUSP 8 did not cause any change for cell proliferation.

So, we conclude that DUSP6 and DUSP8 are downregulated during EBV

immortalization since LMP1 should prevent their effect from apoptosis.

Key words: Epstein-Barr virus, MAPKs, Dual specificity phosphatase (DUSPs),

LMP1.



目錄



摘要	I
Abstract.....	III
序論.....	1
研究目的.....	12
材料與方法.....	13
結果.....	34
討論	43
圖.....	49
表.....	81
附錄.....	85
參考文獻.....	93

序論



1. EB 病毒(Epstein-Barr virus)

EB 病毒最初於 1964 年由 Epstein、Achong，以及 Barr 經由電子顯微鏡觀察巴氏淋巴瘤細胞株而發現(Epstein et al., 1964)。EB 病毒屬於人類疱疹病毒第四型，為 γ 疱疹病毒家族之一。EB 病毒具有套膜，為雙股 DNA 病毒，是第一個被認為與腫瘤生成高度相關的 DNA 病毒。EB 病毒主要可感染 B 細胞以及上皮細胞(Sixbey et al., 1983)。EB 病毒藉由套膜上糖蛋白 gp350 結合上 B 細胞之細胞膜表面上受器 CD21，又稱 C3d 補體受器及利用 gp42 結合上第二型 MHC 分子作為共同受器而感染 B 細胞(Borza and Hutt-Fletcher, 2002; Nemerow et al., 1987)。並且具有將人類初級 B 細胞不朽化成為淋巴母芽球細胞株(Lymphoblastoid cell line, LCLs)的能力(Pope et al., 1968)。在全世界人口中，百分之九十以上的人口受到 EB 病毒感染並且長期生存在體內(Macsween and Crawford, 2003; Yao et al., 1985)。當青少年初次感染 EB 病毒時，會引起個體限制(self-limited)且短暫的症狀，稱為傳染性單核球增多症(Infectious mononucleosis disease)，而後在體內長期潛伏(Schuster and Kreth, 1992)。除此之外，EB 病毒也與霍金氏症(Hodgkin's lymphoma)、巴氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)以及鼻咽癌(Nasopharyngeal carcinoma)等等疾病有高度相關(Epstein et al., 1964; Johansson et al., 1970; Jones et al., 1988; Pallesen et al., 1991; zur Hausen et al., 1970)。在免疫力低下的病人體內，例如 AIDS 病人或服用免疫抑制劑之病人，EB 病毒與引起移植後淋巴增生疾病(Post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLN)以及口腔毛狀白斑病(oral hairy leukoplakia)有關(Greenspan et al., 1985; Ziegler et al., 1982)。

2. EB 病毒生活史(潛伏期/溶裂期)

EB 病毒傳染途徑主要經由唾液傳染，並潛藏於唾液中，感染咽喉部，為初次感染區域(Yao et al., 1985)，進行複製並傳播，引發傳染性單核球增多症，出現發燒、淋巴結腫大、倦怠等急性感染症狀，此種傳染途徑常發生在青少年透

過親吻行為藉由唾液傳染，因此又稱為親吻病(Kissing disease)(Ebell, 2004)。EB 病毒主要感染處於靜息狀態且成熟 B 細胞(resting B cells)，藉由感染 B 細胞躲藏於咽喉部，並隨著 B 細胞循環於全身血流(Babcock et al., 1998)。EB 病毒感染 B 細胞後，線性雙股 DNA 轉為環狀雙股 DNA，上體(episome)型式潛伏於細胞中，並且維持潛伏時期存於細胞中(Yates et al., 1985)。EB 病毒可藉由表現不同病毒蛋白分為潛伏期(latency phase) 與溶裂期(Lytic phase)。在體外，EB 病毒感染靜息 B 細胞，此時 EB 病毒處於潛伏期第三型，表現六種核蛋白 EBNA-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-LP、三種膜蛋白 LMP1、LMP2A、LMP2B、微小 RNA 包含 EBER1、EBER2，主要促使靜息 B 細胞活化，持續分裂生長並且防止細胞凋亡，使 EB 病毒得以長期生存於細胞內(Joseph et al., 2000)。然而，當 EB 病毒受到外界刺激下，例如：壓力、Sodium butyrate、TPA、免疫球蛋白交叉結合，活化 PKC 訊息路徑，活化 EB 病毒即刻早期溶裂基因 BZLF1 及 BRLF1 啟動子，啟動 EB 病毒基因組上 oriLyt(Hammerschmidt and Sugden, 1988)，可促使 EB 病毒進入溶裂時期。BZLF1 及 BRLF1 基因可轉錄出活化宿主或病毒上特定啟動子之反式激活子(transactivator)Zta 及 Rta(Countryman and Miller, 1985; Hardwick et al., 1988)，導致一系列病毒基因表現。病毒早期基因(early gene)表現參與進行 EB 病毒 DNA 基因組複製與代謝，此時 EB 病毒 DNA 可被放大百倍以上(Hammerschmidt and Sugden, 1988)。病毒晚期基因(late gene)表現與病毒顆粒結構蛋白質有關。最終將 EB 病毒 DNA 基因體包裹入病毒顆粒中釋出於宿主細胞外，完成一次生命週期。

3. LMP1

EB 病毒體外感染 B 細胞使不朽化為 LCL，而 EB 病毒在 LCL 細胞中維持潛伏期，並表現九種病毒蛋白質，其中包含有潛伏期膜蛋白 LMP1。EB 病毒 BNLF1 基因之產物。於 1984 年 Kieff 博士認為 EB 病毒最主要的致癌基因(Hennessy et al., 1984)。對於促進細胞生長、逃避細胞凋亡及 EB 病毒不朽化 B 細胞過程扮演重要角色。LMP1 約有 386 胺基酸，大小約 63kDa。其結構分為三大部分；(一)細

胞內 N 端，約 23 胺基酸，使 LMP1 具有特定方向性表現在細胞膜上；(二)六段穿膜結構，約 163 胺基酸。LMP1 可藉由此區域聚集為多元體，形成脂質豐富區域(lipid raft)強化對下游之訊息傳遞；(三)細胞內 C 端，約 195 胺基酸。此區域為 LMP1 最主要向下游進行訊息傳遞之區域(Eliopoulos and Young, 2001)。LMP1 之 C 端主要分為三區域，C 端活化區域(C terminal activation regions):CTAR1、CTAR2、以及 CTAR3。CTAR1(胺基酸 194-231)主要參與啟使細胞生長；CTAR2(胺基酸 351-386)對於淋巴母芽細胞株(LCL)維持持續且永久生長是重要的；CTAR3(胺基酸 232-350)位於 CTAR1 及 CTAR2 區域之間，目前已知可活化 JAK/STAT3 訊息傳遞路徑(Fennewald, van Santen, & Kieff, 1984; Liebowitz, Wang, & Kieff, 1986)。LMP1 結構相似於持續活化之腫瘤壞死因子受體(tumor necrosis factor receptor)CD40，不需依賴細胞外配體(ligand)刺激，可自體聚集成多元體而活化(Gires et al., 1997; Mosialos et al., 1995)。LMP1 主要活化訊息傳遞路徑包含有 ERK、p38、JNK 等 MAPK 家族訊息傳遞因子，以及 Akt、NFκB、JAK/STAT3 等訊息傳遞因子。(圖一)

4. 絲裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)

MAPK 為細胞內廣泛存在之蛋白激酶家族之一，其功能及調控下游目標蛋白乃藉由磷酸化目標蛋白之絲胺酸或蘇胺酸(serine/threonine)，調節目標蛋白活性藉以影響下游訊息傳遞調控細胞活性，包含調控細胞基因表現、細胞分裂、移動、代謝以及細胞凋亡等等(Avruch, 2007; Boutros et al., 2008)。當細胞受到外來刺激，包含生長因子、胰島素、或是壓力，活化 MAPK 訊息傳遞路徑，MAPK 傳遞路徑為三級聯鎖訊息傳遞(Avruch, 2007)。活化細胞內 MAPKKK，而後活化一連貫信號級連放大(signaling cascade)，磷酸化 MAPKK，進而磷酸化 MAPK 高度保守之 threonine-X-tyrosine 殘基(X 為任意胺基酸)，藉此活化下游目標蛋白(Ahn et al., 1991; Payne et al., 1991; Robbins et al., 1993)。在不同細胞種類中，MAPK 家族依胺基酸序列相似性、受質特異性、與其參與之調控路徑可區分為三種廣為所知其功能及細胞角色之成員：包含有細胞外訊息調控激酶 (extracellular

signal-regulated kinase, ERK)、壓力活化蛋白激酶 (stress-activated protein kinases, SAPKs) 家族中之 c-Jun amino-terminal kinase (JNK) 以及 p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) (Kultz, 1998)。然而近期研究，利用人類胎兒腦部基因庫(human fetal brain cDNA library)做基因序列分析，發現第四種 MAPK，命名為 ERK5，在細胞中扮演之生物角色及功能尚未明朗(Zhou et al., 1995)。此外，近期利用生物化學或是經由人類或小鼠基因組序列分析(genome sequence)發現 ERK7 是目前可能成為 MAPK 分類中之候選成員(Johnson and Lapadat, 2002)。

4.1 細胞外訊息調控激酶

包含有 ERK1 以及 ERK2，其廣泛存在於細胞中，參與調控細胞有絲分裂 (meiosis) 或無絲分裂 (mitosis) 以及分化中細胞之無絲分裂後生物功能 (postmitotic functions) (Payne et al., 1991; Robbins et al., 1993)。細胞受到外界刺激，例如生長因子、細胞激素、病毒感染，以及致癌因子等等，而活化 MAKKK、Raf 或 Ras，進而活化 ERK1 及 ERK2 訊息傳遞路徑 (Kolch, 2000)。已知許多人類腫瘤中因 Ras 獲得性突變 (gain of function) 可永久性活化 ERK1 及 ERK2，而增加腫瘤細胞生長速率 (Fernandez-Medarde and Santos, 2011)。因此目前許多進入臨床試驗之抗癌藥物乃藉由抑制 ERK 路徑以抑制腫瘤生長。(Johnson and Lapadat, 2002)

4.2 壓力活化蛋白激酶

包含有 JNK1、JNK2、JNK3。JNK 可藉由約十三種 MAPKKK 調控其傳遞路徑，活化之 JNKs 進而磷酸化 DNA 轉錄因子 c-Jun，使 c-Jun 活性增加進入細胞核中，c-Jun 為轉錄複合體 AP-1 成員之一，AP-1 對於調控基因表現扮演重要角色 (Weston and Davis, 2002)。細胞受到外界環境生存壓力，例如放射線、生長因子，而活化 AP-1，AP-1 結合上 DNA 特定結合區域後調節許多細胞激素之基因轉錄 (Nishina et al., 2004)。JNK 也與細胞計畫性死亡或細胞凋亡調控相關 (Tournier et al., 2000)。此外，亦有文獻指出 JNK 促進腫瘤生長，因此認為 JNK 可成為癌症治療之分子標靶之一。在小鼠模式中，JNK 抑制劑可用於治療類風濕性關節炎，因此 JNK 抑制劑已進入臨床試驗中治療相關疾病 (Z.Han et al.,

2001)。

4.3 p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)

成員有 p38 α 、p38 β 、p38 γ 、p38 δ ，分子量為 38kDa，其生物功能及角色研究較為清楚(Zarubin and Han, 2005)。p38 α 可表現於大部分組織中，可調節細胞反應以因應滲透壓改變造成之環境壓力。而其他 p38 亞型較具組織專一性，例如：p38 β 表現於腦部，p38 γ 表現於骨骼肌，p38 δ 則表現於內分泌腺體(Cuadrado and Nebreda, 2010)。p38 調控許多細胞激素表現，於免疫細胞中受到發炎細胞激素，例如 interleukin-1，刺激可活化 p38 訊息路徑(Freshney et al., 1994)，因此 p38 對於活化免疫反應扮演重要角色，例如格蘭氏陰性菌之脂質多醣體(lipopolysaccharides, LPS)可快速活化 p38 並使 p38 之酪胺酸殘基磷酸化，而活化下游反應(Zarubin and Han, 2005)。此外，p38 也受到其他刺激，例如賀爾蒙、G 蛋白複合受器之配體(ligands of G protein-coupled receptor)、環境壓力而活化(Cuadrado and Nebreda, 2010)。由於 p38 參與調節發炎細胞激素表現，p38 被發現與氣喘及其他人類自體免疫疾病相關(J.C.Lee et al., 1994)。

5. MAPKs 之於癌症

在廣泛之人類惡性疾病、癌症中存在著異常之 MAPK 訊息傳遞路徑(Dhillon et al., 2007)。典型之 ERK 訊息傳遞路徑與癌細胞能不斷生長，不受正常細胞之生長訊號控制，在近乎 30% 人類腫瘤中，皆發現不正常之 ERK 大量活化。包含 ERK 上游傳遞路徑中成員異常，例如酪胺酸激酶受器(receptor tyrosine kinase)大量表現或 Ras GTPase 之活化型突變(activating mutations)以及 MAPK 激酶激酶 B-raf 之絲胺酸/蘇胺酸(serine/threonine)之突變(Dhillon et al., 2007)。而壓力活化 MAPK，如 JNK，對於癌症中扮演角色比較複雜。有研究顯示，體外培養中，Ras 誘導轉型之小鼠纖維母細胞(fibroblast derived from mice)發現 JNK 參與在腫瘤之形成，認為 JNK 扮演致癌角色(Kennedy and Davis, 2003)。然而，也有文獻指出 JNK 可能扮演相反的角色，在活體內實驗中，將 Ras 誘導轉型之小鼠纖維母細胞，剔除 JNK1 及 JNK2 後移植入裸鼠中，並不能防止腫瘤之產生。並且，

在體內實驗中，剔除 JNK 時會促使肺臟腫瘤細胞之轉移，因此認為在體內試驗中，JNK 可能扮演腫瘤抑制角色(Kennedy et al., 2003)。



6. MAPK 訊息路徑之調控

當細胞受到外界環境影響而活化細胞內 MAPK 訊息傳遞路徑，訊息不斷放大，促使細胞有利於生存與生長之同時，細胞為了不過度活化與生長，存在負向調控 MAPK 機制。已知活化 MAPK 需透過同時磷酸化 MAPK 活化位(activation lip)之 threonine 以及 tyrosine 兩種胺基酸(Bellon et al., 1999; Canagarajah et al., 1997)，因此若移除其中之一或同時移除兩處之磷酸根即可使 MAPK 活性下降。細胞中存在有各式磷酸酶(phosphatase)可移除 MAPK 之磷酸根，使 MAPK 失去活性，依據其專一性可分為酪胺酸磷酸酶(tyrosine phosphase)、絲氨酸/蘇胺酸磷酸酶(serine/threonine phosphatase)以及雙特異性磷酸酶(Dual-specificity phosphatase, DUSP)。其中，又以 DUSP 中存在一群對 MAPK 具專一性，稱為 MAP kinase phosphatase (MKPs)最為重要，可在適當之時間及位置使 MAPK 去磷酸化(Pearson et al., 2001)。

7. 雙特異性磷酸酶

DUSP 可同時調節兩種磷酸化胺基酸殘基，可能因為其酵素活性位較淺且具有彈性，因此可容納不同種之磷酸化胺基酸，並將之去磷酸化(Farooq and Zhou, 2004)。包含有磷酸化酪胺酸(phosphotyrosine)以及磷酸化絲氨酸或磷酸化蘇胺酸(phosphoserine/threonine)去磷酸化(Guan et al., 1991)。

7.1 DUSP 之結構與分類

結構上，所有 DUSP 家族成員皆具有一相同磷酸酶活性區域(phosphatase domain)，內含有高度保守之催化區域(catalytic site)，由天冬胺酸(aspartic acid)、半胱胺酸(cysteine)以及精氨酸(arginine)所組成。DUSPs 之 N 端具有兩個 CDC25 同源區域(CDC25 homology region)，兩者之間含有一群鹼性胺基酸形成之 MAPK 結合區域，稱為 MAP kinase-binding motif (MKB)或 kinase-interacting motif(KIM)。MKB/KIM 可與特定目標 MAPK 之 common domain 結合，在以酵素活性位使目

標 MAPK 去磷酸化(Farooq and Zhou, 2004)。目前於人類基因體組織資料庫 (Human Genome Organization database)中有 25 個基因被定義為 DUSPs 成員，命名為 DUSP1-28，其中 DUSP17、DUSP20、DUSP23 分別與 DUSP19、DUSP18、DUSP23 重複命名(Huang and Tan, 2012)。在 25 種 DUSPs 成員中，MS-STYX/DUSP24 以及 DUSP27 之酵素催化活性區域缺乏 cysteine，轉而以 serine 取代，因此不具有磷酸酶之酵素活性，又稱為假性磷酸酶 (pseudo-phosphatase)(Wishart and Dixon, 1998)。DUSP 依據其結構是否含有 MKB/KIM 區域，可區分為：典型 DUSPs 與非典型 DUSPs。典型 DUSP(typical DUSPs)或 MAPK 磷酸酶 (MAP kinase phosphatase, MKPs)皆包含有 MKB/KIM。反之，DUSPs 缺乏 MKB/KIM 者稱為非典型 DUSP(atypical DUSPs)(Lang et al., 2006)

7.1.1 典型 DUSPs (typical DUSPs)

依據其主要之細胞位置可分為三大類：細胞核、或細胞質以及可同時位於細胞質與細胞核(Huang and Tan, 2012)。位於細胞核之 DUSPs 包含有 DUSP1、DUSP2、DUSP4、DUSP5；位於細胞質之 DUSPs 包含有 DUSP6、DUSP7、DUSP9；位於細胞核及細胞質之 DUSPs 包含有 DUSP8、DUSP10、DUSP16 圖三)(Huang and Tan, 2012)

7.1.2 非典型 DUSPs (Atypical DUSPs, A-DUSPs)

部分 DUSPs 與對 MAPK 專一性之 DUSPs 有相同特性，但與 VH1 磷酸酶 (vaccinia virus open reading frame H1 phosphatase)更為相似，因此認為此類 DUSPs 不同於典型蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase)以及亦不同於 MKPs，而被認為是非典型 DUSPs(Liu et al., 1995)。其成員包含有 19 種 DUSPs，例如：DUSP3、DUSP14、DUSP19、DUSP22。大部分之非典型 DUSPs 不具有 N 端之 Cdc 同源區域，但具有 C 端之 DUSP 酵素催化區域。然而此類 DUSPs 之特性及專一性目標仍需進一步研究(Patterson et al., 2009)。

7.2 DUSP 之調控與功能

DUSPs 基因轉錄可受到 MAPK 下游調控之轉錄因子所活化，例如 AP-1(Brondello et al., 1997)。DUSP 也可受到其他轉錄因子調控，例如 DUSP1(MKP1)啟動子具有 Sp1、Sp3、CREB、USF1 等轉錄因子之結合位(Ryser et al., 2004);細胞受到 FGF 刺激後活化 ETS-1 而誘導 DUSP6 基因表現(Zhang et al., 2010); 以及研究顯示，p53 可調控四種位於細胞核之 DUSPs，包含有 DUSP1、DUSP2、DUSP4、DUSP5(Li et al., 2003; Shen et al., 2006; Ueda et al., 2003; Yin et al., 2003)。此外，活化 DUSPs 基因轉錄也可受到附基因修飾(epigenetic modifications)調控，例如於胰臟癌細胞中，DUSP6 啟動子受到高度甲基化(Furukawa et al., 2003)。而 DUSP mRNA 主要以 micro RNA 調控之基因靜默(gene silencing)機制相關，例如 DUSP1 可受到 miRNA-101 調控(Zhu et al., 2010)。在細胞中 DUSP 蛋白質表現程度也受到轉譯後之調節機制(post-translationally regulation)嚴格監控。例如：DUSP6 可受到 mTOR 訊息傳遞路徑而磷酸化，進而透過泛素蛋白機制(ubiquitination)降解 DUSP6 蛋白質(Bermudez et al., 2008)。所以許多 DUSPs 種類半衰期大約只有一小時(Huang and Tan, 2012)。細胞內調控 DUSP 機制多樣且複雜暗示著 DUSP 對於許多細胞生理功能之調控扮演重要角色。DUSP 能夠因應不同的刺激或因誘導而活化特定之 DUSP 調控路徑，可能因不同組織、分化狀態或細胞活化狀態而表現不同 DUSPs 種類，可分為三類：

7.2.1 誘發型細胞核之 DUSPs (inducible nuclear DUSPs)

顧名思義此類 DUSPs 可受到 MAPK 之活化而誘導表現。成員有 DUSP1、DUSP2、DUSP4、DUSP5。這些 DUSPs 之基因密碼子中含有高度保守之四個外顯子(exons)及四個內含子(introns)(Kwak et al., 1994; Noguchi et al., 1993; Yi et al., 1995; Zhang et al., 2001)。誘導型細胞核 DUSPs 對於 ERKs、JNK、p38 去磷酸化之能力不分軒輊(Bermudez et al., 2010)。特別的是，DUSP1 可受到血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)之誘導而活化，使組蛋白次單位 H3(histone H3)去磷酸化(Kinney et al., 2009)。

7.2.2 對 ERK 專一性且位於細胞質 DUSPs (Cytoplasmic ERK-specific DUSPs)

包含有 DUSP6、DUSP7、DUSP9、DUSP10，對於 ERK1/2 具有高度專一性，然而對 ERK5 不具有去磷酸化之能力(Arkell et al., 2008)。其中，DUSP6 可在細胞核與細胞質之間穿梭(shuttle)，但主要位於細胞質中，因其 N 端具有豐富白胺酸之出核訊號(leucine-rich nuclear export signal)(Karlsson et al., 2004)。因此 DUSP6 被認為像是不活化態之 ERK 船錨(anchor)，使之停留於細胞質中(Brunet et al., 1999)，甚至 DUSP6 可能參與將細胞核中不活化態 ERK 運輸至細胞質中之過程(Karlsson et al., 2004)。

7.2.3 對 JNK 與 p38 專一性之 DUSPs

成員包含有 DUSP8、DUSP10、DUSP16。可同時位於細胞質與細胞核，並對於 JNK 及 p38 具有專一性。(Bermudez et al., 2010)

8. DUSP6

DUSP6，又稱為 MKP3，由 381 個胺基酸所組成，屬於 ERK 特異性 MKPs，可表現於細胞質中，主要針對 ERK MAPK 進行去磷酸化作用(Arkell et al., 2008)。DUSP6 主要表現於靜息且未受刺激之細胞中。DUSP6 之基因結構具有保守之催化區域，含有半胱胺酸活化位點於 Cys296 之位置(Farooq and Zhou, 2004)。其中，連結區域(linker region)含有出核訊號(Karlsson et al., 2004)。目前認為 DUSP6 具有抑制腫瘤之角色於胰臟癌及食道上皮細胞癌(Furukawa et al., 2003; Ma et al., 2013)。例如：體外實驗，胰臟腫瘤細胞株中大量表現 DUSP6 使細胞生長速率變慢，甚至細胞凋亡(Furukawa et al., 2003)。在許多腫瘤細胞中，DUSP6 之啟動子高度甲基化(hyper-methylation)，如食道扁平上皮細胞癌(Esophagus squamous cell carcinoma, ESCC)、鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)(Ma et al., 2013)。其中，因 DUSP6 表現量下降，使得 ERK 活性增加，並且伴隨著 Ras 獲得性突變(gain of function)，而加速腫瘤細胞之癌化(Furukawa et al., 2003)。若將 DUSP6 大量表現在 ESCC 或 NPC 細胞株中，能夠抑制腫瘤細胞之轉移及上皮至間質轉型(Epithelial-Mesenchymal transition)之過程(Wong et al., 2012)。



9. DUSP8

DUSP8, 又稱為 hVH-5 (homologue of vaccinia virus H1 gene clone 5) 或 M3/6, 由 625 個胺基酸所組成, 屬於 JNK/p38 特異性 MKPs, 可表現於細胞核內或細胞質, 主要針對壓力活化蛋白激酶包含 JNK 及 p38 MAPK 進行去磷酸化作用。最早於 1995 年 Martell 等人報導 DUSP8 於 PC12 細胞株中可受到神經生長因子 (nerve growth factor) 與胰島素刺激時被大量誘發, 為一立即早期基因 (Martell et al., 1995; Theodosiou et al., 1996)。DUSP8 主要表現於大腦、心臟、肺臟及骨骼肌、骨髓、活化之 B 細胞、記憶性 B 細胞內, 而神經系統之表現量最高且分布最廣泛。DUSP8 之基因結構具有保守之催化區域, 含有半胱胺酸活化位點於 Cys246 之位置。其 C 端具有一富含脯胺酸之區域 (proline-rich region) 與一段 PEST 區段, 由四種胺基酸脯胺酸 (proline, P)、麩胺酸 (glutamic acid, E)、絲胺酸 (serine, S) 及蘇胺酸 (threonine, T) 所組成, 被認為與調控 DUSP8 於細胞內之功能、位置及穩定性相關。此外, DUSP8 之 C 端亦含有出核訊號以及入核訊號 (NLS), 以利於其於核質間移動。DUSP8 雖為第一個被報導可調控 SAPKs 之 MKPs, 然而, 目前關於 DUSP8 可能於細胞內扮演之角色仍屬未知。部分研究曾報導 DUSP8 之催化能力下降於細胞接收特定刺激如氧化壓力、熱休克或化學藥物 arsenite。(Chen et al., 2001; Palacios et al., 2001); 進一步 Theodosiou 等人實驗發現於砷刺激之下, JNK 能引起 DUSP8 之磷酸化, 以調控 DUSP8 之催化能力, 提升 JNK 之活性與壓力反應的活化 (Cotsiki et al., 2012); 而化學藥物 anisomycin 之刺激, 則能促進 DUSP8 泛素化, 進而抑制細胞內 DUSP8 之表現 (Theodosiou and Ashworth, 2002)。以上研究皆顯示當細胞受到特定刺激時, 可能藉由某些分子影響 DUSP8 之表現, 調控 JNK 之活性, 以達成壓力反應的活化; 且另一方面, JNK 也具有透過轉譯後修飾影響 DUSP8 催化能力之功能, 然詳細的調控機制仍待更多研究釐清。

10. EB 病毒與 MAPK

在 LCL 中，MAPK 訊息傳遞路徑呈持續且穩定之活化狀態 (Fenton and Sinclair, 1999; Satoh et al., 2002)，為 EB 病毒可透過其病毒蛋白活化 MAPK 訊息傳遞路徑，藉以促進宿主細胞生長，避免細胞凋亡。EB 病毒潛伏期膜蛋白 LMP1 可透過其 C 端活化區域 CTAR1、CTAR2，透過 TARFs、TRADD 等接頭蛋白質 (adapter protein) 活化 MAPKs 訊息傳遞路徑 (如圖一)，例如：ERK、JNK、p38 (Dawson et al., 2008; Eliopoulos et al., 1999; Kieser et al., 1997; Schultheiss et al., 2001)。此外，EB 病毒潛伏期膜蛋白 LMP2A 可透過其 N 端之 ITAM 區域活化 ERK 路徑，進而活化 JNK 訊息傳遞路徑 (Anderson and Longnecker, 2008; Chen et al., 2002; Young and Rickinson, 2004)。而 EB 病毒溶裂期之基因產物 Zta 也可藉由活化 p38 及 JNK，影響下游基因表現 (Adamson et al., 2000)。在本實驗室研究發現，EB 病毒溶裂其蛋白 Zta 可透過活化 ERK 路徑，活化下游轉錄因子 Elk-1，進而調控 Egr-1 啟動子，得以活化 EB 病毒之再活化路徑 (Chang et al., 2006)。

研究目的

已知 EB 病毒可透過潛伏期蛋白，例如 LMP1、LMP2A，及溶裂期極早期蛋白質，例如 Zta，活化 MAPK，影響細胞分裂、生長，抑制細胞凋亡，促使細胞不斷生長，使 EB 病毒得以長期潛伏在宿主細胞中。並且，EB 病毒使初級 B 細胞不朽化之 LCL 中，發現 MAPK 呈持續活化狀態。然而，在細胞中，存在一群雙特异性磷酸酶 DUSPs，可將同一蛋白質上磷酸化酪胺酸(phosphor-tyrosine)或磷酸化絲胺酸/蘇胺酸(phosphor-serine/phosphor-threonine)同時去磷酸化，得以使特定目標 MAPK 失去活性，為細胞中負向調控 MAPK 之路徑。

本論文主要利用 EB 病毒 B95.8 strain 感染 CD19⁺ 初級 B 細胞使不朽化為淋巴瘤母芽細胞株，以 cDNA 微陣列實驗分析細胞內基因表現之變化情形，發現 LCL 相較於初級 B 細胞而言，DUSP 表現量明顯減少，例如 DUSP1、DUSP2、DUSP6、DUSP8。因此，本研究欲探討 EB 病毒感染細胞後可能透過何種病毒蛋白，於何種機制影響 DUSP 之表現，以及 DUSP 對於 EB 病毒感染後細胞中扮演之生物角色及功能。

材料與方法



1.材料

1.1 細胞株 (Cell line)

Lymphoblastoid cell line (LCL)

為 CD19⁺ B 細胞以 B95.8 strain EB 病毒感染後不朽化而成之細胞株。

Human embryonic kidney (HEK) 293T cells

人類胚胎腎臟細胞，由第五型腺病毒 (adenovirus type5) E1 抗原及猿猴病毒 (Simian virus 40, SV40) large T 抗原轉形而成之細胞株 (ATCC no. CRL-1573)。

Akata cells

取自日本患者巴氏淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)建立之細胞株，不具有 EB 病毒基因體。(Shimizu et al. (1994)

BJAB cells

取自非洲患者巴氏淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)建立之細胞株，不具有 EB 病毒基因體。(Menezes et al., 1975)

Ramos cells

取自美國患者巴氏淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma)建立之細胞株，不具有 EB 病毒基因體。(Klein et al., 1975)

KMH2 cells

取自德國患者霍金氏淋巴瘤 (Hodgkin lymphoma)建立之細胞株，不具有 EB 病毒基因體。

1.2 藥品

藥品名稱	廠牌名稱
2-mercaptoethanol, 2-ME	Sigma
2-propanol	J.T. Baker
Acetic acid	J.T. Baker

Acrylamide	Merck
Agar A	Bionovas
Agarose	Invitrogen
Ammonium persulfate, APS	Sigma
Ampicillin	Sigma
Bisacrylamide	Usb
Bovine serum albumin, BSA	Roche
Bromophenol blue	Sigma
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliant blue G-250	Bionovas
Diethyl pyrocarbonate, DEPC	Sigma
Dimethyl sulfoxide, DMSO	Merck
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	Merck
Disodium phosphate (Na_2HPO_4)	Merck
Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM	Hyclone
Ethanol	Burnett
Ethidium bromide, EtBr	Sigma
Ethylene diamine tetra-acetic acid, EDTA	J.T. Baker
Fast green	Sigma
Fat-free skim milk	安佳
Fetal bovine serum, FBS	Hyclone
G418 sulfate	Merck
Glycerol	J.T. Baker
Glycine	Bio Basic
Hydrochloric acid (HCl)	J.T. Baker

Imidazole	Usb
Isopropylthio- β -galactoside	Protech
Kanamycin	Sigma
L-glutamine	Sigma
LY294002	Cell signaling
Methanol	J.T. Baker
Opti-MEM [®]	Invitrogen
Penicillin:streptomycin solution	Gemini
Peptone	Usb
RNase A	Sigma
Roswell Park Memorial Institute medium, RPMI	Hyclone
Potassium chloride (KCl)	J.T. Baker
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	Merck
Propidium iodide	Sigma
Complete Protease inhibitor cocktail tablets	Roche
Puromycin	Sigma
SB203580	Merck
Sodium acetate (NaOAc)	Merck
Sodium azide	Sigma
Sodium chloride (NaCl)	J.T. Baker
Sodium deoxycholate	Sigma
Sodium dodecyl sulfate, SDS	Merck
Sodium fluoride (NaF)	Merck
Sodium hydroxide (NaOH)	J.T. Baker
Sodium orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma

SP600125	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, TEMED	Sigma
Tris	Bio Basic
Triton X-100	Merck
TRIZol® reagent	Invitrogen
Trypan blue	Sigma
Trypsin	Biological Industries
Tween 20	J.T. Baker
U0126	Merck
Xylene cyanol FF	BDH
Yeast extract	BD

1.3 套組試劑 (Kit)

套組試劑名稱	廠牌名稱
AlamarBlue®	AbD Serotec
Bio-Rad protein assay	Bio-Rad
Calf intestinal alkaline phosphatase, CIP	New England Biolabs
Deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP	Protech
DETACHaBEAD® CD19	Invitrogen
Dithiothreitol, DTT	Promega
Dual-Glo® Luciferase Substrate	Promega
Dynabeads® CD19 Pan B	Invitrogen
Faststart Universal Master Mix	Roche
Ficoll-Paque	GE Healthcare
Gel/PCR DNA fragments extraction kit	Geneaid
High-speed plasmid mini kit	Geneaid

Immobilon-P Transfer Membranes, PVDF	Millipore
KAPA HiFi DNA polymerase	Kapa Biosystems
Klemow fragment	New England Biolabs
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
M-MLV Reverse transcriptase	Promega
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Non-liposome transfection reagent II, NTR II	T-pro
Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
QIAGEN Plasmid maxi kit	Qiagen
ProZyme DNA polymerase	Protech
Random primers	Bionovas
Rnasin RNase inhibitor	Promega
T4 DNA ligase	New England Biolabs
Western Lightning™ chemiluminescence reagent plus	PerkinElmer

1.4 溶液 (Buffer)

0.5% Trypan blue (per 100 ml)

Trypan blue 0.5 g, add PBS to 100 ml

10X Phosphate-buffered saline (PBS) (per liter)

KCl 2.0 g, KH₂PO₄ 2.4 g, NaCl 80.0 g, Na₂HPO₄ 14.4 g, adjust to pH 7.4 with NaOH, mix and add ddH₂O to 1 liter

PBS-EDTA (per liter)

EDTA 0.2 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.2 g, NaCl 8.0 g, Na₂HPO₄ 1.15 g, add ddH₂O to 1 liter, autoclaved

LB medium (per liter)

NaCl 10.0 g, Peptone 10.0 g, Yeast extract 5.0 g, adjust to pH 7.0 with NaOH, mix

and add ddH₂O to 1 liter, autoclaved

TB medium (per liter)

Glycerol 4 ml, KH₂PO₄ 2.31 g, K₂HPO₄ 12.54 g, Peptone 12.0 g, Yeast extract 24.0 g, mix and add ddH₂O to 1 liter, autoclaved



50X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (per liter)

Acetic acid 57.1 ml, 0.5M EDTA (pH 8.0) 100 ml, Tris 242.0 g, mix and add ddH₂O to 1 liter

6X DNA loading dye (per 100 ml)

Glycerol 30 ml, Xylene cyanol FF 0.25 g, mix and add ddH₂O to 100 ml

4X Sample loading buffer (per 100 ml)

Bromophenol blue 0.4 g, Glycerol 40 ml, SDS 8.0 g, 1M Tris (pH 6.8) 20 ml, mix and add ddH₂O to 100 ml, store at -20°C (supplemented with 2-ME 14.3 µl/ml freshly when in use)

DEPC ddH₂O (per liter)

DEPC 1.0 g, add ddH₂O to 1 liter, autoclaved

Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (per liter)

0.5M EDTA (pH 8.0) 4 ml, NaCl 87.0 g, NaF 2.1g, Na₃VO₄ 0.018 g, 10% SDS 10 ml, Sodium deoxycholate 5.0 g, 1M Tris (pH 7.4) 50 ml, mix and add ddH₂O to 1 liter (supplemented with 25X Complete protease inhibitor 40 µl/ml freshly when in use)

10X Western blot running buffer (per liter)

Glycine 188.0 g, SDS 10.0 g, Tris 30.0 g, adjust to pH 8.3 with NaOH, mix and add ddH₂O to 1 liter

10X Western blot transfer buffer (per liter)

Glycine 188.0 g, Tris 30.0 g, mix and add ddH₂O to 1 liter (supplemented with Methanol 200 ml/liter 1X transfer buffer freshly when in use)

Western blot blocking buffer (per 100 ml)



Fat-free skim milk 4.0 g, add Western blot washing buffer to 100 ml

10X Western blot washing buffer (per liter)

NaCl 90.0 g, 1M Tris (pH 7.4) 100 ml, Tween 20 20 ml, mix and add ddH₂O to 1 liter

Antibody dilution buffer (per 50 ml)

Fat-free skim milk 0.25 g, 20% Sodium azide 0.5 ml, add Western blot washing buffer to 50 ml

Stripping buffer (per 100 ml)

10% SDS 20 ml, 1M Tris (pH 6.8) 6.68 ml, add ddH₂O to 100 ml (supplemented with 2-ME 8.2 µl/ml freshly when in use)

Fast Green (per liter)

Acetic acid 100 ml, 95% ethanol 263 ml, Fast green 1.0 g, add ddH₂O to 1 liter

PI staining

100mg PI powder, add 1xPBS to 100ml, then filtered with 0.22µm filter.

0.2% TritonX-100

200ul TritonX-100, add 1xPBS to 100ml.

1.5 質體 (Plasmid)

pMD2.G

帶有以 CMV 啟動子表現 VSV 套膜糖蛋白之表現質體，用於包裹慢病毒。此質體由陽明大學王學偉老師惠贈。

p8.91

帶有以 CMV 啟動子表現 HIV-1 gag、pol、tat、rev 之表現質體，用於包裹慢病毒。此質體由陽明大學王學偉老師惠贈。

pMD.G

帶有以 CMV 啟動子表現 VSV 套膜糖蛋白之表現質體，用於包裹慢病毒。此質體購自中研院 RNAi core 核心設施。



pCMVΔR8.91

帶有以 CMV 啟動子表現 HIV-1 Gag、Pol、Tat、Rev 之表現質體，用於包裹慢病毒。此質體購自中研院 RNAi core 核心設施。

pSIN-MCS

慢病毒表現載體，以 SFFV 啟動子表現目標基因，且具有 ampicillin 抗藥基因。此載體由陽明大學王學偉老師惠贈。

pSIN-LMP1

以 SFFV 啟動子表現 LMP1 之慢病毒質體，由本實驗室蔡淑君學姊構築。

pSIN-LMP2A

以 SFFV 啟動子表現 LMP2A 之慢病毒質體，由本實驗室蔡淑君學姊構築。

pSIN-Zta

以 SFFV 啟動子表現 Zta 之慢病毒質體，由本實驗室吳韶文學姊構築。

pSIN-LMP1 ΔCTAR1

以 SFFV 啟動子表現去除胺基酸第 194-232 片段之 LMP1 的慢病毒質體，由本實驗室林巧潔學姊構築。

pSIN-LMP1 ΔCTAR2

以 SFFV 啟動子表現去除胺基酸第 351-386 片段之 LMP1 的慢病毒質體，由本實驗室林巧潔學姊構築。

pSIN-LMP1 ΔCTAR1+2

以 SFFV 啟動子表現去除胺基酸第 194-232 及胺基酸第 351-386 片段之 LMP1 的慢病毒質體，由本實驗室林巧潔學姊構築。

pSG5

表現載體，以 SV40 啟動子表現目標基因，且具有 ampicillin 抗藥基因。(Stratagene)

pSG5-LMP1

以 SV40 啟動子表現 LMP1 之表現質體。此載體由英國伯明罕大學 Dr. Alan B. Rickinson 惠贈。



pLKO AS2.neo

慢病毒表現載體，以 CMV 啟動子表現目標基因，且具有 neomycin 抗藥基因。
此載體購自中研院 RNAi core 核心設施。

pLKOAS2.neo-DUSP6

以 CMV 啟動子表現人類 *DUSP6* 基因的慢病毒質體，由本實驗室董姿巡學姊構築。

pLKOAS2.neo-DUSP6 C293S

以 CMV 啟動子表現人類具有催化區域突變 *DUSP6* 之基因的慢病毒質體，其 *DUSP6* 之催化區域第 293 位點由 cysteine 突變為 serine。由本實驗室董姿巡學姊構築。

pLKO AS2.neo-DUSP8

以 CMV 啟動子表現人類 *DUSP8* 基因的慢病毒質體，由本實驗室翁培倫學長構築。

pCMV-Tag2B

以 CMV 啟動子表現目標基因，可在真核細胞表現蛋白質之載體，並具有 flag 標籤，載體上具有 neomycin/kanamycin 抗藥基因。

pCMV-Tag2B-DUSP6

以 CMV 啟動子表現 N 端帶有 flag 標籤之人類 *DUSP6* 基因的表現質體。由美國西北大學 Jonathan D. Licht 教授惠贈(Morrison et al., 2008)。

pCMV-Tag2B-DUSP6 ΔC293S

以 CMV 啟動子表現 N 端帶有 flag 標籤之人類具有催化區域突變 *DUSP6* 之基因的表現質體，其 *DUSP6* 之催化區域第 293 位點由 cysteine 突變為 serine，由美國西北大學 Jonathan D. Licht 教授惠贈(Morrison et al., 2008)。

pCMV-Tag2B-DUSP8

以 CMV 啟動子表現 N 端帶有 flag 標籤之人類 DUSP8 之基因的表現載體(附錄六)。

pCMV-Tag2B-DUSP8 CS

以 CMV 啟動子表現 N 端帶有 flag 標籤之具有催化區域突變之人類 DUSP8 之基因的表現載體，其 DUSP8 之催化區域第 246 位點由 cysteine 突變為 serine(附錄七)。

pMT-SM-myc

來自國外實驗室，希臘之 B.S.R.C “Alexander Fleming”單位，由 George Panayoutou 博士惠贈之表現蛋白質的基因載體。(Oehrl et al., 2013)

pMT-SM-myc-M3/6 WT

來自國外實驗室，希臘之 B.S.R.C “Alexander Fleming”單位，由 George Panayoutou 博士惠贈之表現人類之野生型 DUSP8 (又稱為 M3/6)基因的基因載體。(Oehrl et al., 2013)

pMT-SM-myc-M3/6 CS

來自國外實驗室，希臘之 B.S.R.C “Alexander Fleming”單位，由 George Panayoutou 博士惠贈之表現人類之催化區域突變型之 DUSP8(又稱為 M3/6)基因的基因載體。其 DUSP8 催化區域第 246 位點由 cysteine 突變為 serine。(Oehrl et al., 2013)

pEGFP-C1

以 CMV 啟動子表現綠色螢光蛋白質 (GFP) 之表現質體，具有 neomycin/kanamycin 抗藥基因。(Promega)

pGL3-basic

帶有表現 Luciferase 之報導基因載體，但不具啟動子，且帶有 ampicillin 抗藥基因。

pGL3-DUSP8 (-820/+20)

將人類 DUSP8 基因啟動子(-820/+20)，嵌入 pGL3 之質體。

pGL3-DUSP8 (-645/+20)

設計引子去除 pGL3-DUSP8 (-820/+20)質體之 DUSP8 啟動子第-820 至-646 序列。

pGL3-DUSP8 (-500/+20)

設計引子去除 pGL3-DUSP8 (-820/+20)質體之 DUSP8 啟動子第-820 至-501 序列。

pGL3-DUSP8 (-280/+20)

設計引子去除 pGL3-DUSP8 (-820/+20)質體之 DUSP8 啟動子第-820 至-281 序列 (附錄八)。

pGL2-DUSP6 (-2018/+133)

將人類 *DUSP6* 基因啟動子(-2018/+133)，嵌入帶有 *Luciferase* 基因及 ampicillin 抗藥基因，但不具啟動子之 pGL2-Basic 載體。此質體由美國西北大學 Jonathan D. Licht 教授惠贈(Morrison *et al.*, 2008)。

pGL2-DUSP6 (-1003/+133)

設計引子將 pGL2-DUSP6 質體中，*DUSP6* 啟動子第-2018 至-1004 序列去除。

pGL2-DUSP6 (-546/+133)

設計引子將 pGL2-DUSP6 質體中，*DUSP6* 啟動子第-2018 至-547 序列去除。

pGL2-DUSP6 (-300/+133)

設計引子將 pGL2-DUSP6 質體中，*DUSP6* 啟動子第-2018 至-301 序列去除。

pLKO.1-shLuciferase

表現專一降解人類 luciferase mRNA 之 shRNA 慢病毒質體，目標序列為 5'-CCTAAGGTTAAGTCGCCCT。此質體購自中研院 RNAi core 核心設施。

pLKO.1-shLMP1

表現專一降解 LMP1 mRNA 之 shRNA 慢病毒質體，目標序列為 LMP1 mRNA 第 459 至 476 之 DNA 序列 5'-GCTCTTATTGCTCTCTAT。此質體由本實驗室蔡淑君學姊構築。



1.6 勝任細胞 (Competent cell)

DH5 α

為 *recA* 及 *endA* 基因突變之大腸桿菌菌株，可降低質體被重組的機率，增加質體穩定性，具有高轉形效率及高質體 DNA 增殖能力。

JM109

為 *recA* 及 *endA* 基因突變之大腸桿菌菌株，可降低質體被重組的機率，並可避免質體受核酸限制酶之影響。此菌株用以表現 pLKO.AS2neo 系列基因。

2. 方法

2.1 細胞培養 (Cell culture)

附著性細胞如 HEK293T 細胞以含有 10% FBS、1 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin 與 100 μ g/ml streptomycin 之 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)於 37°C、含 5% CO₂ 培養箱培養。懸浮細胞如 B 細胞以含有 10% FBS、1 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin 與 100 μ g/ml streptomycin 之 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)於 37°C、含 5% CO₂ 培養箱培養。

細胞保存以細胞計數器計數細胞後，取 1×10^7 細胞以 1 ml 含有 10% DMSO 之 FBS 回溶，取至細胞冷凍管內置於 4°C、5 分鐘後，移置於 -20°C、20 分鐘，最後儲存於 -80°C 或液態氮中保存。

2.2 質體構築 (Plasmid construct)

目標載體以適當限制酶在特定的溫度條件下切割，加入 CIP 於 37°C 作用 1 小時後，利用 Gel/PCR DNA fragments extraction kit 進行純化，儲存於 -20°C。

設計含有適當限制酶切位之引子，製備目標基因片段。利用 KAPA HiFi DNA polymerase 或 PhusionTM Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase 進行 PCR 反應，放大目標基因片段，接著利用 Gel/PCR DNA fragments extraction kit 進行純化，以適當限制酶在特定的溫度條件下切割，利用 Gel/PCR DNA fragments extraction

kit 純化出於洋菜膠體電泳作用分離之目標基因片段，儲存於-20°C。

目標載體與目標基因片段以 1:6 之比例，取總量約 200-300 ng 混合均勻，以 65°C 反應 10 分鐘後，加入 T4 DNA ligase 於 16°C 水浴槽進行 DNA 接合作用 (ligation) 24 小時，即完成質體構築。接合後之產物利用轉型作用作進一步篩選，儲存於-20°C。

2.3 轉形作用 (Transformation)

取 100 ng 質體與 90 μ l 勝任細胞混合至 0.6 ml 微量離心管，置於冰上 30 分鐘，以 42°C 水浴反應 90 秒後，立即置於冰上 30 分鐘，接著加入含 1 ml SOC medium 之養菌管於 37°C 培養箱以轉速 160 rpm (FIRSTEK S-300R) 振盪培養 1 小時。以轉速 13200 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R) 離心 1 分鐘，保留約 100 μ l 上清液回溶 pellet，將之利用 4°C 無菌玻璃珠均勻塗佈於含有適量抗生素之 LB 或 TB 固態培養基於 37°C 培養箱培養 16-18 小時。

挑選數個獨立菌落種於 2 ml 含有適量抗生素之 LB 或 TB medium 中於 37°C 培養箱以轉速 160 rpm (LM-530D) 振盪培養 16-18 小時，利用 High-speed plasmid mini kit 抽取小量質體 (依照操作手冊提供之流程進行)，利用限制酶切割與核酸定序進行確認。

2.4 定點突變法 (Site-directed Mutagenesis)

設計單一突變引子，以欲突變之質體為模板，製備目標基因片段。利用 KAPA HiFi DNA polymerase 或 PhusionTM Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase 進行 PCR 反應，放大目標基因片段，反應完成後加入 1 μ l *DpnI* 於 37°C 水浴槽作用 24 小時，再加入 1 μ l *DpnI* 於 37°C 水浴槽作用 1-2 小時。取作用完之產物進行轉形作用，利用限制酶切割與核酸定序進行確認突變質體是否正確。

2.5 質體大量製備 (Plasmid maxi preparation)

實驗利用 QIAGEN Plasmid maxi kit 進行質體大量製備。將含有目標質體之

獨立菌落種於 3 ml 含有適量抗生素之 LB medium 中於 37°C 培養箱，以轉速 160 rpm (LM-530D) 振盪培養 16-18 小時，取 1 ml 菌液利用 High-speed plasmid mini kit 抽取小量質體利用限制酶切割進行確認。

餘 2 ml 菌液倒入 200 ml 含有適量抗生素之 TB medium 中於 37°C 培養箱以轉速 160 rpm (LM-530D) 振盪培養 16-18 小時。將菌液倒入 250 ml 離心瓶以轉速 6000 rpm (Beckman JA14 rotor)、4°C，離心 15 分鐘，去除上清液後加入 10 ml P1 打散 pellet 並取至 50 ml 離心管，接著加入 10 ml P2 上下翻轉 10 次、靜置於室溫 5 分鐘，再加入 10 ml P3 上下翻轉 10 次、置於冰上作用 20 分鐘。以轉速 20000 rpm (Beckman JA25.5 rotor)、4°C，離心 20 分鐘，將上清液倒入新的 50 ml 離心管重複離心一次，此時以 10 ml QBT 平衡管柱。將上清液倒入管柱中，待過濾完成後以 30 ml QC 清洗管柱兩次，接著以 15 ml QF 回溶質體至新的 50 ml 離心管，並加入 10.5 ml 2-propanol，混勻後以轉速 20000 rpm (Beckman JA25.5 rotor)、4°C，離心 30 分鐘，去除上清液後加入 5 ml 75% Ethanol 以轉速 20000 rpm (Beckman JA25.5 rotor)、4°C，離心 15 分鐘，去除上清液後風乾，以 2 ml TE buffer 回溶 pellet 並分裝至 4 個 1.5 ml 微量離心管 (各 500 μ l)，每管加入 1 ml 100% Ethanol 與 50 μ l 3M Sodium acetate (NaOAc) 於 -80°C 作用 24 小時析出 DNA，以轉速 14000 rpm (Sigma 2K15)、4°C，離心 30 分鐘，去除上清液後各加入 1 ml 75% Ethanol，以轉速 14000 rpm (Sigma 2K15)、4°C，離心 15 分鐘，去除上清液後倒扣風乾，以適量 ddH₂O 回溶，利用 Nanodrop 2000c (Thermo) 測定質體濃度，儲存於 -20°C。

2.6 基因轉染 (Transfection)

Lipofectamine™ 2000

主要用於附著性細胞。利用細胞計數器計數細胞後，取 2×10^6 細胞至 10 公分組織培養盤中以 12 ml DMEM 於 37°C、含 5% CO₂ 培養箱培養，待細胞均勻貼附於培養盤後，於轉染前一小時將原有培養液置換為 12 ml FBS-free DMEM。目標質體與 Lipofectamine™ 2000 以 1:1.5 (w:v) 之比例分別與適量 Opti-MEM 混

勻後靜置於室溫 5 分鐘，再將二者混合靜置於室溫 20 分鐘。細胞去除原有培養液後均勻滴入質體混合液於培養箱作用 16 小時，將質體混合液置換為新鮮的 DMEM 繼續培養，即完成目標質體之轉染。



NTR II

主要用於附著性細胞。利用細胞計數器計數細胞後，取 1×10^5 細胞至 12 孔組織培養盤中以 1 ml DMEM 於 37°C 、含 5% CO_2 培養箱培養，待細胞均勻貼附於培養盤後，目標質體與適量 Opti-MEM 混合後，以質體與 NTR II 為 1:2 (w:v) 之比例加入 NTR II，混勻後靜置於室溫 15 分鐘。細胞均勻滴入質體混合液後繼續培養，即完成目標質體之轉染。

2.7 慢病毒包裹及感染 (Lentivirus package and infection)

利用細胞計數器計數 HEK293T 細胞後，取 6×10^6 細胞至 75T 細胞培養角瓶中以 12 ml DMEM 於 37°C 、含 5% CO_2 培養箱，待細胞均勻貼附於培養角瓶底面後，於轉染前一小時將原有培養液置換為 12 ml FBS-free DMEM。將 pMD2.G、p8.91 與欲包裹之目標質體以 1:2:3 之比例混合 (pMD.G、pCMV Δ R8.91 與欲包裹之目標質體比例則為 1:9:10)，混合後之質體與 LipofectamineTM 2000 以 1:1.5 (w:v) 之比例分別與 4ml Opti-MEM 混勻後靜置於室溫 5 分鐘，再將二者混合靜置於室溫 20 分鐘(共 8ml)。細胞去除原有培養液後均勻滴入質體混合液於培養箱作用 16 小時，將質體混合液置換為 15 ml 含有 1% BSA 新鮮的 DMEM 繼續培養，24 小時後收取上清液至 50 ml 離心管，暫存於 4°C ，原 75T 再加入 15 ml 含有 1% BSA 新鮮的 DMEM 繼續培養，24 小時後收取上清液至同一 50 ml 離心管。收取之上清液以轉速 1000 rpm (BECKMAN GS-6R) 離心 5 分鐘後，以 $0.22 \mu\text{m}$ 過濾膜 (MillexTM) 過濾並分裝，保存於 -80°C 。

慢病毒液主要用於感染懸浮細胞。利用細胞計數器計數細胞後，依實驗設定之病毒感染劑量 (Multiplicity of infection, MOI)，取特定數目之細胞至 6 孔組織培養盤中，均勻加入慢病毒液，以轉速 2250 rpm (BECKMAN GS-6R)，於室溫離

心 30 分鐘 (關閉離心機降速時之剎車功能)，於 37°C、含 5% CO₂ 培養箱培養，並於隔天回補適量之新鮮的 RPMI 繼續培養，即完成慢病毒感染。此流程所收集之慢病毒液取 1 ml 感染 1×10⁶ 細胞時 MOI 定義為 1。



2.8 RNA 萃取 (RNA extraction)

細胞取至 1.5 ml 微量離心管，以轉速 2000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R)、4°C，離心 5 分鐘後，去除上清液以 1 ml TRIzol® reagent 打散細胞，靜置於室溫 5 分鐘，加入 200 µl Chloroform，將離心管劇烈震盪 15 秒 (Vortex-Genie 2)，使呈均勻粉紅色，以轉速 14000 rpm (Sigma 2K15)、4°C，離心 15 分鐘。將上層透明水層取至含有 600 µl 2-propanol 與 4 µg Glycogen 之 1.5 ml 微量離心管 (此步驟需避免取到中央白色層)，混合均勻後靜置於室溫 10 分鐘，儲存於-80°C 或以轉速 14000 rpm (Sigma 2K15)、4°C，離心 30 分鐘。去除上清液後加入 1 ml 75% Ethanol (以 DEPC ddH₂O 配製)，以轉速 14000 rpm (Sigma 2K15)、4°C，離心 20 分鐘，去除上清液後倒扣風乾，以適量 DEPC ddH₂O 回溶，利用 Nanodrop 2000c (Thermo) 測定 RNA 濃度，儲存於-80°C。

2.9 反轉錄反應 (Reverse transcription, RT)

取 3µg RNA 至 0.6 ml 微量離心管，加入 1 µg Random primers 與 DEPC ddH₂O 至體積為 4 µl，於 95°C 反應 90 秒後，靜置於室溫 10 分鐘。再加入 2 µl 5X RT reaction buffer、2 µl 2.5 mM dNTP、1 µl 100 mM DTT、0.2 µl Rnasin RNase inhibitor (40 U/µl)、0.8 µl M-MLV Reverse transcriptase (200 U/µl) 至體積為 10 µl，於 42°C 反應 80 分鐘、70°C 反應 20 分鐘、4°C 停止反應，生成 cDNA。cDNA 以 DEPC ddH₂O 稀釋 10 倍後儲存於-20°C。

2.10 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

取適量 cDNA 至 0.2 ml PCR 反應小管，以滅菌 ddH₂O 調整體積為 4 µl，加入 0.2 µl 10 µM 正向及反向引子、1 µl 10X PCR buffer、1.5 µl 2.5 mM dNTP、0.7

μl ProZyme DNA polymerase (2 U/ μl)，以 DEPC ddH₂O 調整體積至 10 μl 。利用循環溫控儀 (T3 Thermocycler) 以 94°C 反應 3 分鐘、進入 94°C 反應 1 分鐘、60°C 反應 1 分鐘、72°C 反應 1 分鐘，重複此一循環 (次數視目標基因片段而定)、接著以 72°C 反應 7 分鐘、4°C 停止反應，即完成聚合酶連鎖反應。反應完成之產物加入 6X DNA loading dye 以 2% 洋菜膠進行膠體電泳分析。

2.11 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative PCR, Q-PCR)

取適量 cDNA 於 96 孔組織培養盤，加入 0.5 μl 10 μM 正向及反向引子、12.5 μl FastStart Universal Master Mix、0.25 μl Universal ProbeLibrary™ probe，以 ddH₂O 調整體積至 25 μl 。封上塑膠膜與墊片後以轉速 100 rpm (Beckmen GS-6R) 離心 3-5 分鐘，利用同步即時定量聚合酶連鎖反應儀 (ABI PRISM 7900) 進行即時定量聚合酶連鎖反應。

2.12 蛋白質萃取 (Protein extraction)

細胞取至 1.5 ml 微量離心管，以轉速 2000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R)、4°C，離心 5 分鐘，去除上清液後加入 1 ml 1X PBS (4°C) 清洗細胞，以轉速 2000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R)、4°C，離心 5 分鐘，去除上清液後以適量 RIPA buffer (4°C) 回溶細胞，此即全細胞蛋白質萃取液 (whole cell lysate)。

全細胞蛋白質萃取液利用超音波以間隔 2 秒、震盪 2 秒的方式進行震盪 (UP400A Sonicor)，待萃取液呈透明澄清後，以轉速 13200 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R)、4°C，離心 2 分鐘，收取上清液至新的 1.5 ml 微量離心管，儲存於 -80°C。

2.13 蛋白質濃度測定 (Protein concentration quantification)

取 1 μl 全細胞蛋白質萃取液至含有 799 μl ddH₂O 之 1.5 ml 微量離心管中，加入 200 μl Bio-Rad protein assay reagent 混合均勻後避光，於室溫反應 5 分鐘。

利用分光光譜儀 (UltraSpec 3000 DU-64)測定波長 595 nm 之吸光值，並以已知濃度之 BSA 制定標準曲線，推算蛋白質濃度。



2.14 西方墨點法 (Western blot analysis)

取 12 μg 蛋白質至 0.6 ml 微量離心管，加入 4X Sample loading dye，以 RIPA buffer (4 $^{\circ}\text{C}$)調整體積至 12 μl ，此即蛋白質樣本。

蛋白質樣本於 95 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 5 分鐘後，利用十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺膠體進行電泳分析 (SDS-PAGE)。依 Molecular cloning (Sambrook et al., 1989)所述之配方製備下層 10%分離膠體 (resolving gel)與上層 5%聚積膠體 (stacking gel)，以直立式電泳裝置，於電泳槽注入 1X Running buffer，以電壓 70 伏特作用 30 分鐘，再提高電壓至 120 伏特。

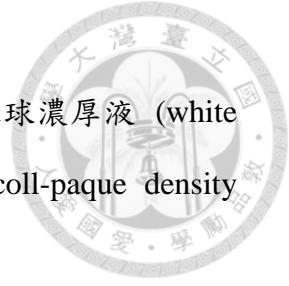
待蛋白質樣本分離至適當距離後，取出膠體以活化後之 PVDF 轉漬膜覆蓋，與濾紙、海棉墊片以三明治之方式置入卡夾中，於轉漬槽注入 1X Transfer buffer，以電流 300 毫安培進行轉漬作用 90 分鐘。完成轉漬後，取出轉漬膜以 Fast Green 染色，經 ddH₂O 潤洗後保持濕潤，依實驗需求進行裁切。接著浸入 Blocking buffer 室溫振盪作用 1 小時後進行抗體標定。

將轉漬膜浸入以 Antibody dilution buffer 稀釋至適當濃度之 1 級抗體中，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 作用 24 小時。以 1X Washing buffer 清洗 4 次、每次 5 分鐘後，浸入以 Blocking buffer 稀釋至適當濃度之 2 級抗體中，室溫振盪作用 2 小時，再以 1X Washing buffer 清洗 4 次、每次 5 分鐘。接著加入 Western LightningTM chemiluminescence reagent plus 進行反應，於暗房中以 X 光底片 (Fuji)偵測特定蛋白質之表現。

將轉漬膜浸入 Stripping buffer 於 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴槽作用 10 至 20 分鐘，卸除抗體後，以 1X Washing buffer 清洗 4 次、每次 5 分鐘，接著浸入 Blocking buffer 室溫振盪作用 1 小時後，即可再次進行抗體標定。

實驗中所使用之抗體資訊與稀釋倍數詳見表。

2.15 周邊血液單核球細胞分離 (Isolation of peripheral blood mononuclear cells)



(PBMCs))

自台北捐血中心取得兩單位 (500 ml) 周邊血分離出白血球濃厚液 (white blood cells concentrate) 約 40-45 ml，以密度梯度離心法 (Ficoll-paque density gradient centrifugation) 分離單核球細胞。

將白血球濃厚液倒入 50 ml 離心管以轉速 1000 rpm (BECKMAN GS-6R)、室溫 (20-25°C)，離心 5 分鐘，去除上層油脂及血漿 (plasma) 後，移至含有 100 ml FBS-free RPMI 之 75T 培養瓶，同時以 30 ml FBS-free RPMI 清洗殘留於離心管內的白血球濃厚液，回收至同一培養瓶，混合後各取 30 ml 至含有 15 ml Ficoll-paque 之 50 ml 離心管 (離心管傾斜，緩慢加入以避免破壞 Ficoll-paque 與白血球濃厚液分層之界線)。以轉速 2400 rpm (BECKMAN GS-6R)、20°C，離心 30 分鐘 (關閉離心機降速時之剎車功能，減少分層受到擾動)。離心結束後，去除上層血漿，將中間白色單核球細胞層移至新的 50 ml 離心管，加入 FBS-free RPMI 補滿至 50 ml 進行清洗，以轉速 2000 rpm (BECKMAN GS-6R)、20°C，離心 15 分鐘後，去除上清液，重複此一步驟兩次，並逐步降低離心轉速、溫度及時間為 1800 rpm、20°C、12 分鐘 (合併為三管) 和 1500 rpm、4°C、5 分鐘 (合併至一管)。接著以事先預冷之 10 ml purify buffer (buffer 1) (2 mM EDTA, 0.1% BSA in PBS) 回溶細胞，即完成周邊血液單核球細胞分離。

2.16 CD19⁺ B 細胞純化 (Purification of CD19⁺ B cells)

取適量 CD19⁺ Dynabeads 至 15 ml 離心管後，加入等體積 purify buffer 放入磁架中清洗磁珠，去除上清液後，以等體積 purify buffer 回溶磁珠。

接著取 25 μ l 磁珠與 5×10^7 PBMCs 於 4°C 轉盤 (DISHUNG) 轉速 12 rpm 作用 20 分鐘後，以 0.5 ml purify buffer 清洗磁珠四次，取適量 RPMI 回溶磁珠。此時，CD19⁺ B 細胞會吸附於磁珠上，初估每 1×10^7 B 細胞，加入 10 μ l DETACHaBEAD 於室溫下以轉盤 (DISHUNG) 轉速 12 rpm 作用 60 分鐘，釋放 B 細胞，以適量 RPMI 回溶磁珠四次，收取上清液至新的 15 ml 離心管，即完成 CD19⁺ B 細胞之

純化。



2.17 LCL 建立 (LCL establishment)

將 CD19⁺ B 細胞調整濃度為 1×10^6 /ml，取至 12 孔組織培養盤中，每 1 ml 加入 20 μ l B95.8 strain EB virus stock (以 1:50 之比例稀釋)，於 37°C、含 5% CO₂ 培養箱培養 28 天後即完成 LCL 之建立。

2.18 螢光酵素報導基因分析 (Luciferase reporter assay)

附著性細胞利用細胞計數器計數後，取 1×10^5 細胞至 12 孔組織培養盤中以 1 ml DMEM 於 37°C、含 5% CO₂ 培養箱培養。每組樣本進行三重複實驗，24 小時後，利用 NTR II 以質體與 NTR II 為 1:2 (w:v) 之比例進行轉染 (質體包含 0.25 μ g Effector、0.5 μ g Reporter 及 0.05 μ g GFP)，繼續培養 72 小時。

懸浮性細胞利用細胞計數器計數後，取 3×10^5 細胞至 12 孔組織培養盤中 1 ml RPMI 於 37°C、含 5% CO₂ 培養箱培養。每組樣本進行三重複實驗，利用慢病毒液轉導 Effector 與 Reporter，培養適當時間。

接著將細胞取至 1.5 ml 微量離心管，以 1X PBS (4°C) 清洗後，以 110 μ l FBS-free RPMI 回溶，取 50 μ l 至 96 孔組織培養盤，各加入 50 μ l Bright-Glo[®] Luciferase Substrate 混合均勻後，以微盤式閃爍冷光分析儀 (PerkinElmer TopCount) 測定冷光讀值，並以酵素免疫微量計數器 (Molecular Devices SpectraMax M5) 測定 GFP 讀值，計算出螢光酵素活性。剩餘約 60 μ l 細胞萃取蛋白質後，以西方墨點法進行分析。

2.20 AlamarBlue[®] 活細胞增生分析法

利用細胞計數器計數細胞後，取 1×10^4 細胞至 96 孔組織培養盤中於 37°C、含 5% CO₂ 培養箱培養。每組樣本進行三重複實驗，分別於第 0、24、48、72、

96 及 120 小時各加入 10 μ l AlamarBlue[®]，繼續培養 4 小時後以紫外光可見光分光光譜儀 (Beckman Coulter DU 730)測定樣本於波長 570 nm 與波長 600 nm 之吸光值，套用公式：

$$\text{Percentage reduction of alamarBlue}^{\text{®}} = \frac{(117216 \times A1) - (80586 \times A2)}{(155677 \times N2) - (14652 \times N1)}$$

其中，A1、A2 分別為樣本於波長 570 nm 及波長 600 nm 之吸光值，N1、N2 為陰性控制組樣本於波長 570 nm 及波長 600 nm 之吸光值，計算出每組樣本活細胞氧化還原之程度。

2.21 細胞週期轉換分析 (Cell cycle progression analysis)

以 PI 染色分析細胞週期轉換之情形。細胞取至 1.5 ml 微量離心管，以轉速 2000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R)、4 $^{\circ}$ C，離心 5 分鐘，去除上清液後加入 1 ml 1X PBS (4 $^{\circ}$ C)清洗細胞，以轉速 2000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R)、4 $^{\circ}$ C，離心 5 分鐘，去除上清液後以 250 μ l 1X PBS (4 $^{\circ}$ C)回溶，緩慢加入 100% Ethanol 固定細胞，儲存於-20 $^{\circ}$ C (可保存約 1 周時間)。

取出以酒精固定之細胞，以轉速 2000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R)、4 $^{\circ}$ C，離心 5 分鐘，去除上清液後以含 0.2% Triton X-100 之 1X PBS (4 $^{\circ}$ C)回溶，接著將細胞通過篩網至分析儀專用圓管 (BD Falcon[™])，加入含 0.1 mg/ml RNase A 與 10 μ g/ml Propidium iodide 之 1X PBS (4 $^{\circ}$ C)，置於 37 $^{\circ}$ C 作用 1-2 小時後，利用流式細胞儀 (BD Bioscience FACS Calibur)測定螢光強度，並以 Cell Quest[™]軟體 (BD Bioscience)進行分析。

2.22 數據分析 (Data analysis)

實驗所得之數據利用 EXCEL Student's t-test 統計方法進行分析，以顯著水準 (P value < 0.05)表示具有顯著差異。

結果



1. 探查 EB 病毒感染後 CD19⁺ B 細胞內 DUSPs 之表現情形

文獻指出,EB 病毒可透過其基因產物調控宿主細胞中 MAPK 訊息傳遞路徑,藉以調控細胞增生及避免細胞凋亡,使 EB 病毒得以長期潛伏於細胞之中。於實驗室蔡淑君學姊之 cDNA 微陣列結果顯示,分析 CD19⁺初級 B 細胞及相配對之 LCLs,比較兩者細胞內基因變化情形,發現 EB 病毒能夠影響 DUSPs 之基因表現量,例如 DUSP1、DUSP2、DUSP6、DUSP8(附錄一)。

因此,進一步利用 RT-Q-PCR 確認 cDNA 微陣列數據,觀察初級 B 細胞以及 LCLs,兩者細胞內 DUSPs 表現量。結果與 cDNA 微陣列結果一致,相較於初級 B 細胞,LCL 內 DUSP1、DUSP2、DUSP6 及 DUSP8 表現量明顯下降(附錄二)。並且利用 EB 病毒感染 CD19⁺初級 B 細胞,分別收取感染後第 0、4、8、12、16、20、24、48、72 小時之細胞,以及收取 EB 病毒感染 B 細胞 28 天後使之不朽化為 LCLs,萃取 RNA 以 RT-PCR 分析 DUSPs mRNA 表現之變化情形,發現隨著 EB 病毒感染時間增加,DUSP1、DUSP2、DUSP6 與 DUSP8 mRNA 表現量隨之下降(附錄三)。進一步確認此現象,利用 EB 病毒感染 CD19⁺初級 B 細胞,分別收取感染後第 1、2、3、7、14、21 天之細胞,以及收取 EB 病毒感染 B 細胞 28 天後使之不朽化為 LCLs,萃取 RNA 以 RT-Q-PCR 分析 DUSP6 及 DUSP8 mRNA 表現之變化情形;萃取蛋白質以西方墨點法分析 DUSP6 及 DUSP8 蛋白質之變化情形。實驗結果顯示,隨著 EB 病毒感染時間天數增加,DUSP6 及 DUSP8 mRNA 及蛋白質表現量皆隨之下降(圖四)。並且比較初級 B 細胞及 LCLs 細胞內 DUSP6 及 DUSP8 蛋白質表現量,顯示 DUSP6 及 DUSP8 蛋白質表現量明顯受到 EB 病毒感染而下降(圖五)。以上結果顯示 EB 病毒可能透過某種機制抑制宿主細胞內 DUSP6 及 DUSP8 之表現量。

2. 探查 EB 病毒基因產物對 DUSPs 表現之調控情形

因此為了進一步探查 EB 病毒透過何種病毒蛋白抑制 DUSP6 及 DUSP8 之表現量,於 Akata 及 BJAB,利用帶有 EB 病毒基因產物之慢病毒轉導入細胞中,

包含有：LMP1、Zta、LMP2A(附錄四)，以及利用電脈衝穿孔術(electroporation)將 EB 病毒基因產物轉導入細胞中，包含有 EBNA1、EBNA2，及 EBNA3C(附錄五)，收取細胞並萃取 RNA 以 RT-PCR 分析 DUSP1、DUSP2、DUSP6、DUSP8 mRNA 表現變化情形。結果顯示 LMP1 具有抑制 DUSP6 及 DUSP8 mRNA 之能力。

進一步，於 BJAB 細胞株中，利用帶有 pSIN、pSIN-LMP1 質體之慢病毒轉導入 EB 病毒潛伏膜蛋白 LMP1，以 MOI=0.125、0.25、0.5、1、2 感染細胞，五天後收取細胞萃取蛋白質，以西方墨點法分析 DUSP6 及 DUSP8 蛋白質表現情形。發現隨著 LMP1 表現量增加，DUSP6 及 DUSP8 蛋白質表現量隨之下降(圖六)。並於 LCLs 細胞中，利用帶有 shLMP1 質體之慢病毒，轉導 EB 病毒基因 LMP1 shRNA，使 LCLs 之 LMP1 表現量下降，觀察 DUSP6 及 DUSP8 蛋白質表現量之變化情形，結果顯示，當 LCL 細胞中 LMP1 表現量下降，可使細胞內 DUSP6 及 DUSP8 蛋白質表現量回復(圖七)。

以上結果顯示 EB 病毒透過其潛伏膜蛋白 LMP1 抑制 DUSP6 及 DUSP8 蛋白質表現量。

3. 探查 EB 病毒潛伏膜蛋白 LMP1 調控 DUSP6 及 DUSP8 基因表現之分子機制

為了探討是否 EB 病毒一方面藉由 LMP1 透過其 CTAR 區域持續活化 MAPK 路徑利於細胞生長，一方面也可抑制 DUSP6 及 DUSP8 等負向調控 MAPK 之因子表現量。利用巴氏細胞株 BJAB，以帶有野生型 LMP1 或刪除突變型 LMP1 pSIN-LMP1 Δ CTAR1、pSIN-LMP1 Δ CTAR2、pSIN-LMP1 Δ CTAR1/2 之慢病毒轉導入細胞中，利用西方墨點法分析細胞內 DUSP6 及 DUSP8 之蛋白質表現量，並確認 LMP1 野生型及各刪除突變型之表現量(圖八)。結果顯示 BJAB 細胞轉導入 LMP1 可明顯抑制 DUSP6 及 DUSP8 之表現量。當刪除 LMP1 之 C 端 CTAR1 或 CTAR2 區域時，LMP1 即無法抑制 DUSP6 及 DUSP8 之蛋白質表現量，若同時刪除 CTAR1 及 CTAR2 區域，DUSP6 及 DUSP8 蛋白質表現量恢復。意味著 LMP1 可能藉由其 CTAR 區域所活化之訊息傳遞路徑調控 DUSP6 及 DUSP8 之表

現量。

已知，LMP1 可透過其 C 端活化區 CTAR 區域活化訊息傳遞路徑，調控細胞生長，包含有 ERK、Akt 等等。進一步欲了解 LMP1 透過何種訊息傳遞路徑調控 DUPS6 及 DUSP8 之表現，實驗利用 BJAB 及 KMH2，以帶有 LMP1 之慢病毒，並於感染後三天加入 ERK 訊息傳遞抑制劑 U0126 (20uM)、AKT 訊息傳遞抑制劑 LY294002 (20uM)處理兩天後，以西方墨點法分析 DUSP6 及 DUSP8 之蛋白質表現量，並確認 ERK、Akt 訊息傳遞路徑是否成功受到藥物抑制(圖九)。結果顯示，於 BJAB 細胞轉導 LMP1 可抑制 DUSP6 及 DUSP8 之蛋白質表現。然而，加入 ERK 訊息傳遞抑制劑 U0126 之實驗組別，則 LMP1 較無法抑制 DUSP6 及 DUSP8 表現；加入 Akt 訊息傳遞抑制劑 LY294002 之實驗組無明顯差異。

為確認上述實驗結果，實驗於二株 LCL 加入 ERK 訊息傳遞抑制劑 U0126 20uM、AKT 訊息傳遞抑制劑 LY294002 20uM、p38 訊息傳遞抑制劑 SB202190 10uM、NF- κ B 訊息傳遞抑制劑 Bay11 5uM 處理兩天後，以西方墨點法分析 DUSP6 及 DUSP8 之蛋白質表現量，並確認 ERK、Akt、p38、NF- κ B 訊息傳遞路徑是否成功受到藥物抑制(圖十)。結果發現，加入 ERK 訊息傳遞抑制劑 U0126 於 LCL 細胞之組別，明顯看到 DUSP6 及 DUSP8 表現量不受到抑制。然而，加入 p38 訊息傳遞抑制劑 SB202190 於 LCL 也看到 DUSP8 表現量回復。顯示於 p38 訊息傳遞路徑也參與其中。

文獻中指出，細胞受到外界刺激可活化 ERK，使 ERK 磷酸化為 p-ERK，進而活化下游轉錄因子，例如 Elk-1、Ets-1，調控目標基因表現。因此，為探查 LMP1 活化 ERK 訊息傳遞路徑後，透過何種轉錄因子調控 DUSP6 及 DUSP8 之表現量。實驗於 LCL-52 細胞株，利用帶有 shElk-1 之慢病毒，轉導 Elk-1 shRNA 入細胞中，感染五天，並以 10ug/ml puromycin 篩選七天後，利用西方墨點法分析 DUSP6 及 DUSP8 之蛋白質表現量，及確認 Elk-1 是否受到 shRNA 成功抑制(圖十一 A 及 B)。結果顯示，LCL 中轉錄因子 Elk-1 表現量下降，可使 DUSP6 蛋白質表現量回復，DUSP8 表現量則無差異。為確認上述結果，實驗於 BJAB，用帶有 shElk-1

之慢病毒，轉導 Elk-1 shRNA 入細胞中，感染五天後，以 10ug/ml puromycin 篩選兩天，同時感染帶有 LMP1 之慢病毒，感染五天後以西方墨點法分析 DUSP6 之表現量，並確認 Elk-1 成功受到 shRNA 而抑制(圖十一 C)。結果顯示，BJAB 轉導入 LMP1，DUSP6 表現量受到抑制。然而 Elk-1 表現量下降時，LMP1 則無法抑制 DUSP6 之蛋白質表現量。

4. 探查 LMP1 是否透過抑制 DUSP6 及 DUSP8 之啟動子影響其表現量

為了解，LMP1 是否可透過作用於 DUSP6 及 DUSP8 基因轉錄調控其表現。實驗於人類腎臟上皮細胞 HEK293T，以 NTRII 試劑轉染方式，轉染 EB 病毒基因 LMP1 及 DUSP6、DUSP8 啟動子報導質體，利用螢光酵素報導基因分析細胞內 DUSP6 及 DUSP8 啟動子活化情形(圖十二)。結果發現，LMP1 能夠抑制 DUSP6 及 DUSP8 之啟動子活性。顯示在上皮細胞內 LMP1 可透過影響 DUSP6 及 DUSP8 啟動子之活性調控其基因轉錄。

進而，為探討 LMP1 透過 DUSP6 及 DUSP8 何段啟動子區域調控其表現量，因此，利用 PROMO 及 TFSEARCH 轉體分析 DUSP6 及 DUSP8 中可能與轉錄因子作用之 DNA 結合位。預測結果顯示，DUSP6 啟動子-2018 至+133 序列中，包含五段 c-Jun DNA 結合位，分別坐落於-1906、-1097、-916、-764 及-111 的位置；兩段 Elk-1 DNA 結合位，分別坐落於-565 及-425 的位置；三段 AP-1 DNA 結合位，分別坐落於-1914、-692 及-403 的位置；八段 NF- κ B DNA 結合位，分別坐落於-1753、-1514、-1410、-1368、-1157、-1107、-810 及-58 的位置(如圖十三 A)。DUSP8 啟動子-820 至+20 序列中，包含兩段 c-Jun DNA 結合位，分別坐落於-655 及-375 的位置；兩段 Elk-1 DNA 結合位，分別坐落於-625 及-565 的位置；兩段 CREB DNA 結合位，分別坐落於-470 及-426 的位置，以及 NF- κ B DNA 結合位，坐落於-251 的位置(圖十四 A)。

實驗利用 NTRII 轉染方式，於 HEK293T 轉染 EB 病毒基因 LMP1 及 DUSP6 啟動子野生型之報導質體 pGL2-DUSP6 -2018/+133 及不同刪除片段之報導質體 pGL2-DUSP6 -1003/+133、pGL2-DUSP6 -546/+133、pGL2-DUSP6 -300/+133，利

用螢光酵素報導基因分析細胞內 DUSP6 啟動子活化之情形(圖十三 B)。結果發現，LMP1 能夠抑制 DUSP6 野生型之啟動子活性，然而於不同 DUSP6 啟動子刪除片段中，於 DUSP-1003/+133 及 DUSP-546/+133 組別，LMP1 抑制能力些微喪失。於 DUSP6-300/+133 組別則 LMP1 持續抑制其活性。因此初步認為，LMP1 仍持續抑制各個片段之 DUSP6 啟動子活性，無明顯回復情形。

另一方面，實驗利用 NTRII 轉染，HEK293T 轉染 EB 病毒基因 LMP1 及 DUSP8 啟動子野生型之報導質體 pGL3-DUSP8 -820/+20 及不同刪除片段之報導質體 pGL3-DUSP8 -645/+20、pGL3-DUSP8 -500/+20、pGL3-DUSP8 -280/+20，利用螢光酵素報導基因分析細胞內 DUSP8 啟動子活化之情形(圖十四 B)。結果顯示，LMP1 能夠抑制 DUSP8 野生型之啟動子活性，然而於不同刪除片段之 DUSP8 啟動子報導質體，LMP1 能持續抑制 DUSP8 啟動子之活性。因此初步認為，LMP1 仍持續抑制各個片段之 DUSP8 啟動子活性，並無明顯回復情形。

進一步，確認 LMP1 透過何種訊息傳遞因子調控 DUSP6 及 DUSP8 啟動子活性。實驗利用 NTRII 轉染 HEK293T 細胞，轉染 LMP1 及 DUSP6 啟動子野生型或 DUSP8 啟動子野生型之報導載體，利用螢光酵素報導基因分析細胞內 DUSP6 或 DUSP8 啟動子活化情形(圖十五及圖十六)。結果顯示，LMP1 透過 ERK 訊息傳遞路徑抑制 DUSP6 啟動子活性，另一方面透過 p38 訊息傳遞路徑抑制 DUSP8 啟動子活性。

5. 探討 DUSPs 表現在 LCLs 之生物功能與意義

過去研究已知 EB 病毒可透過活化 MAPKs 訊息路徑維持宿主細胞生長與存活。而宿主細胞中 DUSPs 可負向調控 MAPK 訊息路徑。因此為了瞭解 EB 病毒為何影響 DUSPs 之表現，是否為了使 EB 病毒感染細胞之存活與生長有關，因此欲進一步研究 DUSPs 在 EB 病毒感染細胞中扮演的生物角色及其功能。

5.1 探討 DUSP6 表現對 LCLs 之影響

已知在 LCL 生長過程中聚集成球(clumping)的型態，為重要的生長特徵。實驗以慢病毒感染的方式，於兩株 LCL 細胞株 LCL-48 及 LCL-49 轉導 DUSP6，

感染後五天以含有 G418 之培養液進行篩選，於篩選後一周後觀察細胞型態變化情形(圖十七)。結果顯示，轉導 DUSP6 於兩株 LCL 時可觀察到 LCLs 聚球較小之情形。

為進一步探討此現象是否因 DUSP6 影響 LCLs 生長情形，實驗以慢病毒感染方式，於兩株 LCL 細胞株 LCL-48 及 LCL-49 轉導 DUSP6，感染五天後以含有 G418 之培養液進行篩選，並於篩選一周後利用 alamarBlue® 活細胞增生分析法進行分析(圖十八)。實驗發現，兩株 LCLs 中皆發現 DUSP6 明顯使 LCLs 細胞增生能力受到抑制的情形。進而，欲觀察 DUSP6 是否影響 LCLs 之生長周期而使細胞生長能力下降。實驗以慢病毒感染方式，於兩株 LCL 細胞株 LCL-48 及 LCL-49 轉導 DUSP6，感染五天後以含有 G418 之培養液進行篩選，並於篩選一周後以 PI 染色並利用流式細胞儀分析細胞週期(圖十九)。結果發現，轉導 DUSP6 入 LCLs 之細胞，LCL-48 細胞週期之 subG0 佔有比例由 8.46% 增加至 61.53%；LCL-49 細胞週期之 subG0 佔有比例由 6.11% 增加至 79.45%。兩株轉導入 DUSP6 之 LCLs 其生長週期之 subG0% 明顯增加。

以上結果顯示，於 LCLs 轉導入 DUSP6 後，使得細胞生長下降，並且影響細胞生長週期，使細胞停留於 subG0% 明顯增加，表示 DUSP6 表現不利於 LCLs 細胞生長。

因此，欲探查 DUSP6 是透過何種訊息傳遞而抑制 LCLs 細胞生長能力。實驗以慢病毒感染方式，於兩株 LCL 細胞株 LCL-48 及 LCL-49 轉導 DUSP6，感染五天後以含有 G418 之培養液進行篩選，並於篩選一周後以西方墨點法分析 ERK 及促細胞凋亡因子：caspase 3、PARP 之活化情形，及確認 DUSP6 是否成功轉導入 LCLs 中(圖二十)。結果顯示，LCLs 轉導入 DUSP6，ERK 之磷酸化程度下降，並且 caspase 3 及 PARP 皆有活化情形。

已知，DUSP6 透過其蛋白結構之 C 端催化區域之第 293 位點上之 cystein，使下游目標蛋白 ERK 去磷酸化，使失去活性。因此，將 DUSP6 之 C 端催化區域第 293 位點之 cystein 點突變為 serine，使 DUSP6 失去酵素催化能力(圖二十一

A)。初步，於 HEK293T 細胞以 NTRII 轉染方式，轉染 DUSP6 野生型及 DUSP6 催化區域突變型 DUSP6-CS，三天後以西方墨點法分析 ERK、JNK、p38 及 Akt 磷酸化情形，及確認 DUSP6 成功轉染入細胞內(二十一 B)。結果顯示，DUSP6 野生型專一性影響 ERK 之磷酸化程度，然而，於不做任何處理之 HEK293T，原有部分內生性 DUSP6，因此 ERK 訊息傳遞路徑無大量活化情形，故 DUSP6 野生型抑制 ERK 磷酸化之情形不明顯。相反的，DUSP6 催化區域突變型 DUSP6-CS 大量表現於細胞時明顯無法抑制 ERK 磷酸化。以上結果顯示，DUSP6 確實透過催化區域第 293 位點 cystein 專一性調控 ERK 磷酸化。

進一步，欲探查 DUSP6 是否透過催化區域第 293 位點 cystein 調控 ERK 活性，進而影響 LCLs 之型態、生長並且影響細胞凋亡。實驗以慢病毒感染方式，於三株 LCL 細胞株 LCL-48、LCL-49 及 LCL-52 轉導 DUSP6 野生型及 DUSP6 催化區域突變型，感染五天後以含有 G418 之培養液進行篩選，並於篩選一周後觀察細胞型態(圖二十二)。結果顯示，DUSP6 催化區域突變型不影響聚球情形。接著觀察是否影響 LCLs 生長能力。以慢病毒感染方式，於 LCL 細胞株 LCL-49 轉導 DUSP6 及 DUSP6 催化區域突變型，感染五天後以含有 G418 之培養液進行篩選，並於篩選一周後以 alamarBlue® 活細胞增生分析法，分析細胞生長能力(圖二十三)。結果發現，DUSP6 催化區域突變型不影響 LCLs 細胞生長，甚至生長能力優於載體控制組。進而觀察是否影響 LCLs 生長週期。以慢病毒感染方式，於 LCL 細胞株 LCL-49 轉導 DUSP6 野生型及 DUSP6 催化區域突變型，感染五天後以含有 G418 之培養液進行篩選，並於篩選一周後以 PI 染色並且利用流式細胞儀分析細胞週期(圖二十四)。結果顯示，DUSP6 野生型明顯使細胞週期之 subG0% 增加，由 6.05% 增加為 58.97%。然而，DUSP6 催化區域突變型(DUSP6-CS) 轉染之 LCLs 細胞週期之 subG0% 相較於控制組，由 6.05% 增加為 14.53%，相較於 DUSP6 野生型轉染之 LCLs 細胞週期之 subG0% 明顯下降。顯示 DUSP6 透過其催化區域調控細胞生長與細胞週期。

探討 DUSP6 是否透過催化區域影響下游 ERK 磷酸化程度，進而使得促細胞

凋亡因子活化，影響細胞生長與存活。以慢病毒感染方式，於兩株 LCL 細胞株 LCL-48、LCL-49 轉導 DUSP6 野生型及 DUSP6 催化區域突變型，感染五天後以含有 G418 之培養液進行篩選，並於篩選一周後以西方墨點法分析 ERK 磷酸化程度與促細胞凋亡因子 caspase 3 與 PARP 活化情形，並確認 DUSP6 成功轉導入細胞內(圖二十五)。結果顯示，DUSP6 野生型轉染之 LCLs 細胞內 ERK 磷酸化程度明顯受到抑制，並且 caspase 3 及 PARP 成活化狀態。然而，DUSP6 催化區域突變型 DUSP6-CS 轉染之 LCLs 細胞內 ERK 磷酸化程度回復，並且 caspase 3 與 PARP 恢復為不活化狀態。

顯示，DUSP6 透過催化區域抑制 ERK 磷酸化，進而活化細胞內促凋亡因子 caspase 3 及 PARP，使細胞凋亡，不利於 LCLs 細胞生長與存活。

5.2 探查 DUSP8 表現對於 LCLs 之影響

為了解 DUSP8 是否影響 LCLs 之生長與存活。初步，觀察 LCLs 生長型態，LCLs 生長時聚球型態作為指標。實驗以慢病毒感染方式，於兩株 LCL 細胞株 LCL-48、LCL-49 轉導 DUSP8，感染五天後以含有 G418 之培養液進行篩選，並於篩選一周後觀察細胞型態(圖二十六)。結果顯示，DUSP8 轉染之 LCLs 細胞聚球情形明顯受到抑制。

進而探討是否因 DUSP8 影響 LCLs 細胞生長能力所致。實驗以慢病毒感染方式，於兩株 LCL 細胞株 LCL-48 及 LCL-57 轉導 DUSP8，感染五天後以含有 G418 之培養液進行篩選，並於篩選一周後以 alamarBlue® 活細胞分析法分析細胞生長能力。(圖二十七)。結果發現，轉染 DUSP8 之 LCL 細胞生長能力較弱。探查是否 DUSP8 影響 LCLs 之細胞週期使得細胞生長受到限制。實驗以慢病毒感染方式，於兩株 LCL 細胞株 LCL-48、LCL-49 轉導 DUSP8，感染五天後以含有 G418 之培養液進行篩選，並於篩選一周後觀察細胞週期(圖二十八)。結果發現，轉染 DUSP8 之 LCL-48 生長週期 subG0% 由 8.46% 增加為 27.16%；轉染 DUSP8 之 LCL-49 生長週期 subG0% 由 8.11% 增加至 11.02%。顯示，DUSP8 使得細胞停留於 subG0 階段之比率增加，因而不利於細胞生長。

而後，欲探討 DUSP8 是透過下游何種訊息傳遞路徑及細胞生長相關分子調控 LCLs 之細胞生長與存活。實驗以慢病毒感染方式，於兩株 LCL 細胞株 LCL-22、LCL-57、LCL-48 及 LCL-49 轉導 DUSP8，感染五天後以含有 G418 之培養液進行篩選，並於篩選一周後利用西方墨點法分析 DUSP8 下游目標 MAPK，p38 及 JNK 磷酸化程度，促細胞凋亡分子 caspase 3、PARP、Bcl-2 及 PUMA，並且確認 DUSP8 是否成功轉染入 LCLs 內。(圖二十九、圖三十)。結果顯示，轉染 DUSP8 之 LCLs 細胞內 p38 磷酸化程度下降，不影響 JNK 磷酸化，caspase 3 及 PARP 無活化情形(圖二十九)。然而可活化 Bcl-2 與 PUMA(圖三十)。

因此認為 DUSP8 降低 LCLs 細胞內磷酸化程度並且活化 Bcl-1 及 PUMA，不利於細胞生長與存活。

已知 DUSP8 透過其 C 端上催化區域第 246 位點 cysteine 調控 p38 及 JNK 之磷酸化，使其去磷酸化並失去活性，進而影響 LCLs 生長與存活。將 DUSP8 之 C 端上催化區域第 246 位點 cysteine 點突變為 serine，使失去酵素活性，無法使 p38 及 JNK 去磷酸化(圖三十一 A)。初步，於 HEK293T 利用 NTRII 轉染方法，轉染 DUSP8 野生型及 DUSP8 催化區域突變型，三天後以西方墨點法分析 ERK、JNK、p38、Akt 磷酸化程度，並且確認 DUSP8 成功轉染入細胞內(圖三十一 B)。結果顯示，轉染 DUSP8 野生型之細胞內 JNK 與 p38 磷酸化程度下降，Akt 磷酸化程度則無影響。然而，轉染 DUSP8 催化區域突變型之細胞內 JNK 及 p38 磷酸化程度回復。顯示，DUSP8 確實藉由催化區域 246 位點 cysteine 專一性使下游 JNK 及 p38 去磷酸化，使失去活性。

進一步，未來將於 LCLs 中探討是否 DUSP8 藉由其催化區域影響 p38 或 JNK 之路徑，進而影響細胞生長與存活。

綜合以上結果，本研究提出一 EB 病毒感染細胞內 DUSPs 可能受到之調控機制與 DUSPs 在 EB 病毒感染細胞內扮演之生物角色與功能 之示意圖(圖三十二)。

討論

本研究論文主要探討 EB 病毒對於 DUSPs 表現之影響，EB 病毒與 DUSPs 之間調控關係，以及 DUSPs 對於 EB 病毒感染細胞內扮演之生物角色與功能。初步於 cDNA 微陣列分析並且利用 RT-PCR 及 RT-Q-PCR 確認其結果，觀察到 DUSPs，包含 DUSP1、DUSP2、DUSP6、DUSP8 等，相較於初級 B 細胞，於 EB 病毒感染細胞內表現量明顯下降(附錄一至附錄三)。而後利用西方墨點法探查 DUSP6 及 DUSP8 蛋白質表現量，發現 EB 病毒感染細胞內 DUSP6 及 DUSP8 表現量明顯減少，並且隨者 EB 病毒感染時間增加而隨之下降(圖四及圖五)。進一步，實驗探查 EB 病毒透過何種基因產物抑制 DUSP6 及 DUSP8 表現量，分別分析 LMP1、LMP2A、Zta、EBNA1、EBNA2、EBNA3C 等，實驗發現 EB 病毒可能透過 LMP1 抑制 DUSP6 及 DUSP8 之表現量。(附錄四、附錄五)。並且隨著 LMP1 表現量增加，DUSP6 及 DUSP8 表現隨之下降(圖六)。此外當 LCL 中 LMP1 表現量減少，DUSP6 及 DUSP8 表現量回復(圖七)。因此認為 EB 病毒透過 LMP1 抑制 DUSP6 及 DUSP8 之表現。進而，LMP1 藉由其 C 端活化區域 CTAR1 或 CTAR2 調控 DUSP6 及 DUSP8 之表現(圖八)，並且 LMP1 利用活化下游 ERK 訊息傳遞路徑達到抑制 DUSP6 及 DUSP8 表現之目的(圖九及圖十)。此外，LMP1 藉由活化 ERK，活化轉錄因子 Elk-1 調控 DUSP6 之表現(圖十一)。LMP1 抑制 DUSP6 及 DUSP8 之啟動子活性，降低 DUSP6 及 DUSP8 之表現(圖十二至十四)。並且藉由活化 ERK 抑制 DUSP6 之啟動子活性(圖十五)。另一方面透過 p38 抑制 DUSP8 之啟動子活性(圖十六)。

另一方面，DUSP6 於 EB 病毒感染細胞內能降低 ERK 磷酸化程度，並且活化促細胞凋亡因子 Caspase 3 及 PARP，不利於 LCLs 細胞生長與存活(圖十七至圖二十)。DUSP6 乃透過其催化區域第 293 位點 cysteine 調控 ERK 磷酸化程度，活化促細胞凋亡因子，影響 LCLs 細胞生長能力與存活(圖二十一至圖二十五)。DUSP8 於 EB 病毒感染細胞內能降低 p38 磷酸化程度，並且活化促細胞凋亡因子 Bcl-2 及 PUMA，使 LCLs 細胞生長與存活能力下降(圖二十六至圖三十)。已知

DUSP8 乃透過其催化區域調控 MAPK 之磷酸化程度，因此初步利用 DUSP8 催化區域突變型轉染於 HEK293T 細胞內，探查到 DUSP8 調控 p38 及 pJNK 磷酸化能力即喪失(圖三十一)。總結以上結果，本研究提出之示意圖，包含 EB 病毒調控 DUSPs 表現之機制以及 DUSPs 於 EB 病毒感染細胞中扮演生物角色及功能(圖三十二)。而後，將於 LCLs 中觀察是否 DUSP8 確實透過其催化區域藉由調控下游 MAPK 磷酸化程度，影響 LCLs 之生長與存活。

1. EB 病毒對於 DUSPs 之調控

EB 病毒為了長期存活於宿主細胞內，而調控細胞內與存活及生長相關因子。而 EB 病毒之 LMP1 被認為不朽化 B 細胞最主要蛋白之一。EB 病毒利用 LMP1 提高 Bcl-2 及 A20 等抑制細胞凋亡因子之表現量，並且藉由抑制腫瘤抑制因子之 DOK-1 啟動子之活性，抑制細胞凋亡(Siouda et al., 2014; Young and Rickinson, 2004)。此外 EB 病毒也透過 LMP1 活化 NF- κ B 訊息傳遞路徑調控免疫反應，增加 IL-6 及 IL-8 表現量，吸引周邊血液初級 B 細胞，使 EB 病毒得以進一步感染(Young and Rickinson, 2004)。另一方面，也發現 LMP1 透過甲基化細胞黏附因子 E-cadherin 之啟動子降低其活性，促使鼻咽癌細胞株轉移作用(Tsai et al., 2002)。

於 2007 年，Baik 等學者以 cDNA 微陣列方法分析比較 LCLs 與初級 B 細胞之細胞內基因表現情形，探查到 LCLs 細胞中有 112 個基因表現量受到抑制，此類基因多參與於細胞生長、細胞凋亡、細胞週期、免疫反應或訊息傳遞等調控，其中包含 DUSP1(Baik et al., 2007)。2008 年，Chen 等學者也以 cDNA 微陣列方法分析有無 EB 病毒感染之鼻咽癌細胞，以及利用化學藥劑 TPA、sodium butyrate (SB)使 EB 病毒進入溶裂期，比較 EB 病毒感染時潛伏期與溶裂期之基因表現。其中發現 DUSP1 與 DUSP6 於 EB 病毒感染細胞，無論於潛伏感染或溶裂時期表現量皆受到抑制(Chen et al., 2008)。

2. DUSPs 影響 EB 病毒感染 B 細胞中 MAPK 之調控

DUSPs 為細胞中一群可負向調控 MAPKs 訊息傳遞路徑之磷酸酶，可將特定目標之 MAPKs 進行去磷酸化，使其失去活性。例如：DUSP6 可專一性調控 ERK

之磷酸化程度，而 DUSP8 則專一性調控 JNK 及 p38 之磷酸化程度(Jeffrey et al., 2007)。

另一方面，MAPK 可反向調控 DUSPs 之表現。文獻指出，當細胞受到外界刺激，例如 FBS、生長因子等活化酪胺酸激酶受體(receptor tyrosine kinase)，進而活化 ERK，活化之 ERK 可負向調控 DUSP6 之表現，主要透過磷酸化 DUSP6 之第 159 和 197 位點之 serine，藉由泛素化路徑以蛋白酶體(proteasome)將 DUSP6 降解(Bermudez et al., 2008; Jurek et al., 2009; Marchetti et al., 2005)。

然而於 2010 年，Zhang 等學者探查非小細胞肺腺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)內 ERK 及 DUSP6 之間關係。提出 EGFR 持續活化使下游 ERK 高度磷酸化，進而透過活化 Ets-1 轉錄因子活化 DUSP6 啟動子，使 DUSP6 表現量增加，認為當細胞中 ERK 過度活化時，促使 DUSP6 表現量增加，藉以調控 ERK 磷酸化程度，以平衡細胞內 ERK 訊息傳遞路徑活化程度(Zhang et al., 2010)。由於 NSCLC 癌細胞常觀察到 EGFR 之高度活化，並且伴隨著高度 ERK 磷酸化程度。於是上述文獻中利用二十四株非小細胞肺腺癌細胞株，以西方墨點法分析 EGFR、ERK 磷酸化程度以及 DUSP6 表現量，發現，ERK 磷酸化與 DUSP6 表現量呈正相關。並且以 NSCLC 捐贈者之腫瘤細胞組織切片中，以免疫化學染色法分析 ERK 磷酸化程度與 DUSP6 表現量，觀察到相同結果。並且，以報導基因方法，觀察到 Ets-1 可使 DUSP6 啟動子活性增加。染色體免疫沉澱法(chromatin immunoprecipitation, CHIP)發現，Ets-1 可接合在 DUSP6 啟動子上-265 至-245 位置，序列為 GGAXxxTCC。進而，以轉染方式於 NSCLC 細胞株表現不同濃度的 Ets-1 siRNA，發現 DUSP6 表現隨著 Ets-1 表現減少而下降。顯示，Ets-1 可使 DUSP6 表現量增加。顯示，ERK 可透過轉錄因子 Ets-1 使 DUSP6 表現量增加。

本研究以及文獻上皆探查到 DUSP6 可透過其催化區域調控 ERK 之磷酸化程度。然而，DUSP6 也可受到 ERK 調控其表現，可能受到 ERK 抑制透過以下方式：(一)透過轉譯後修飾路徑，ERK 磷酸化 DUSP6 蛋白質方式，使 DUSP6 透過蛋白酶體路徑降解(Bermudez et al., 2008)。(二)本研究發現 LMP1 藉由活化 ERK，

並進而活化下游轉錄因子 Elk-1 調控 DUSP6 蛋白質表現量。此外藉由活化 ERK 間接抑制 DUSP6 啟動子方式調控 DUSP6 表現量(圖十五)。

另一方面，DUSP8 與 MAPK 也存有反向調控關係。研究中發現當細胞受到環境壓力時，例如：砷(Arsenite)、胰島素、生長因子等等，活化細胞內 JNK 及 p38 訊息傳遞因子，可誘導 DUSP8 表現，認為 JNK 及 p38 與 DUSP8 之間存在著負向回饋機制(negative feedback)(Oehrl et al., 2013)。

顯示，DUSP 與 MAPK 之間存有許多相互調控表現之回饋機制。

2. DUSPs 於 EB 病毒感染 B 細胞之生物角色

DUSPs 可藉由調控下由特定目標之 MAPK 之活性，間接控制細胞生長、細胞存活、免疫反應等等，DUSPs 於許多癌症之間相互關係廣泛受到討論，例如 DUSP6 在許多癌症及腫瘤細胞中表現量大量下降，例如胰臟癌、鼻咽癌以及食道上皮細胞癌，並且可能與調控 ERK 活性相關，並且影響腫瘤細胞生長與轉移(Furukawa et al., 2003; Ma et al., 2013; Wong et al., 2012)。另一方面，文獻指出 DUSP8 於乳癌腫瘤細胞以及乳癌細胞株中，觀察到 DUSP8 啟動子受到高度甲基化之現象(van Huijsduijnen et al., 2013)。上述實驗利用甲基化專一性 PCR (methylation-specific PCR)分析九株卵巢癌細胞株以及七十四位捐贈者之卵巢癌細胞，探查 DUSPs 之啟動子甲基化程度以及表現量。結果發現，DUSP1、DUSP2、DUSP4、DUSP6、DUSP7 以及 DUSP8 之啟動子皆有甲基化之現象。但未進一步探查其原因及對於卵巢細胞癌之生物角色。

EB 病毒也可透過其病毒蛋白質產物調控目標基因之啟動子甲基化，影響其表現量，如 E-cadherin。2006 年 Dr. Chang 研究發現 EB 病毒可藉由 LMP1 藉由甲基化 E-cadherin 之啟動子而降低其表現量，促使癌細胞轉移(Tsai et al., 2006)。70% 之鼻咽癌細胞可測到 EB 病毒潛伏蛋白 LMP1 之表現(Tsao et al., 2002)。文獻指出 LMP1 活化 JNK 訊息傳遞路徑，進而活化轉錄因子 AP-1，使 AP-1 結合於 DNA methyltransferase 1 (DNMT1)之啟動子 P1 結合位而活化 DNMT1，使 E-cadherin

之啟動子甲基化而降低其表現量。(Tsai et al., 2006)。因此，未來本研究可進一步探討 EB 病毒是否也可以藉由 LMP1 以甲基化 DUSPs 之啟動子而調控其表現量。

目前研究多著重於 DUSPs 對於癌症及腫瘤細胞內之調控與角色。另一方面，病毒與 DUSPs 之間之研究，於 2013 年 Dr. Qin 研究發現 KSHV 藉由 miR-K12-11 活化 KSHV 之胺基酸轉運蛋白 xCT，進一步活化抑制型轉錄因子 14-3-3 β ，而降低 DUSP1 表現量，加速 KSHV 感染造成之腫瘤形成(Qin et al., 2013)。然而，仍然較少研究專注於探查病毒與 DUSPs 之間相互關係，本論文欲進一步探討 DUSPs 對於 EB 病毒感染細胞內，可能扮演之生物角色及功能。

本論文中實驗結果提到 DUSP6 可透過活化 caspase 3 及 PARP 之路徑，促使 LCLs 細胞凋亡。文獻中，於食道上皮細胞癌細胞株，利用轉染方式大量表現 DUSP6 表現質體後以 PI 與 Annexin V 染色，利用流式細胞儀方式分析細胞凋亡情形，並且觀察 PARP 活化情形(Ma et al., 2013)。發現若大量表現 DUSP6 於食道上皮細胞癌細胞株，於流式細胞儀分析觀察到細胞凋亡比例增加，比例由 4.6% 增加為 14.4%，並且促使 PARP 活化情形。

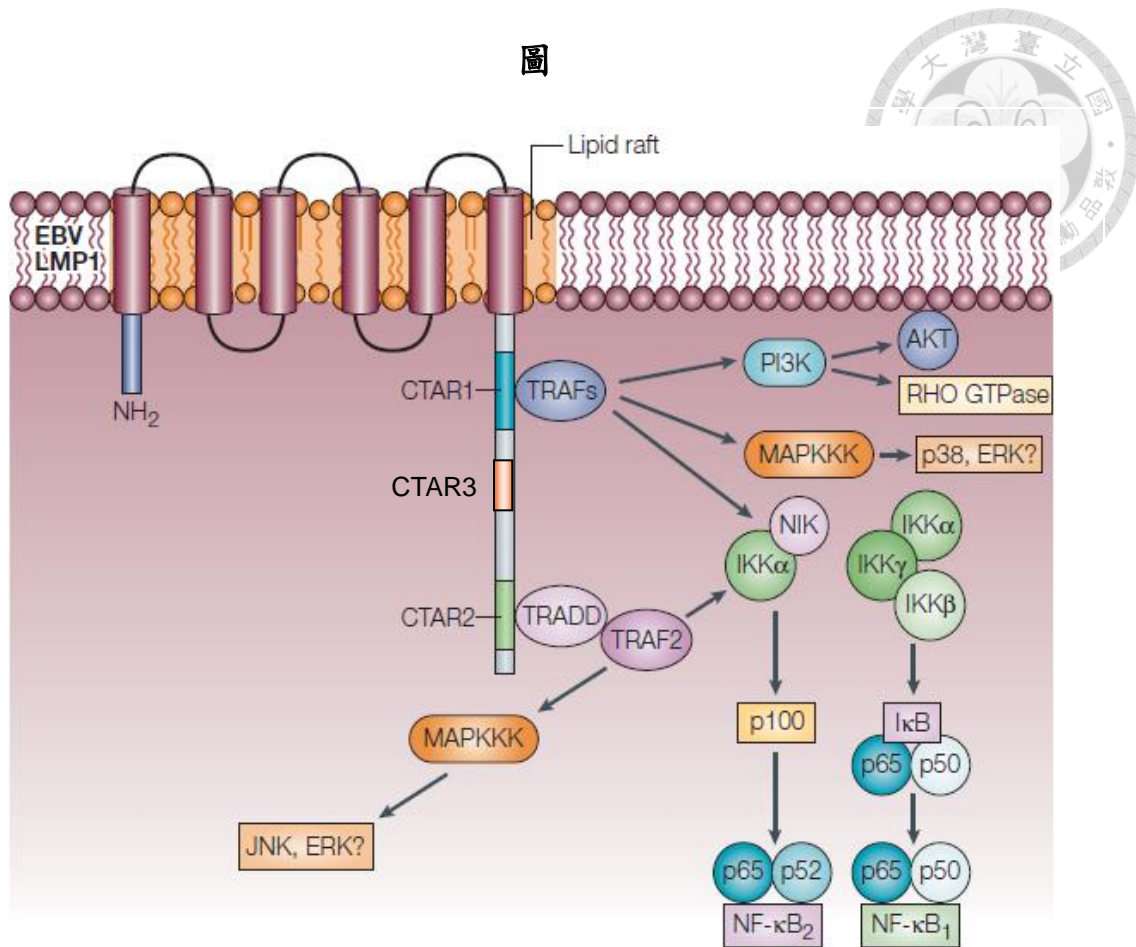
然而，Caspase3 可反向調控 DUSP6 表現。於 2012 年 Cejudo-Marin 等學者於直腸癌細胞株 HCT116，利用過氧化物誘導細胞進入細胞凋亡，活化 caspase 路徑，發現 DUSP6 蛋白質受到切割形成小片段。並進一步利用專一性抑制劑，發現 caspase 3 可利用其切割蛋白質之活性將 DUSP6 蛋白質切割，進而分析 DUSP6 結構，包含有 N 端調控區域(regulatory domain)，連接區域(linker domain)，以及催化區域(catalytic domain)，發現其連接區域具有相似於 caspase 3 切割目標序列 DxxD，於是以各種點突變方式分析 caspase 3 切割位點，發現 caspase 3 目標切割 DUSP6 位點為 DUSP6 連接區域之 Asp152 及 Asp193 位點切斷，使 DUSP6 蛋白質形成較小片段，使得 ERK 於細胞凋亡時期，維持活化狀態，推論可阻止細胞凋亡過程進行。(Cejudo-Marin et al., 2012)。

本論文研究發現 DUSP6 可活化 caspase 3 以及 PARP 等促細胞凋亡因子，可能透過 ERK 之訊息傳遞路徑。顯示著細胞中 DUSP6 與 Caspase 3 之間具有相互

調控關係。

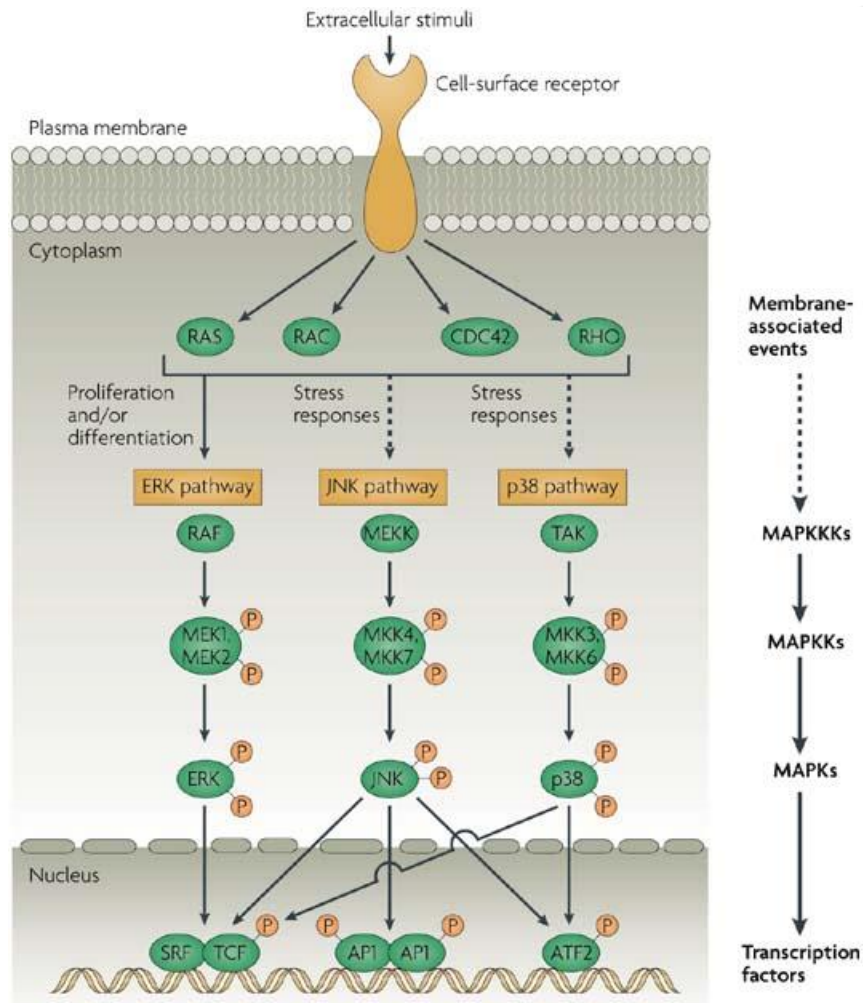
另一方面，本論文發現 DUSP8 可抑制 p38 磷酸化程度，影響 Bcl-2 及 PUMA 之表現。2010 年文獻指出，在黑色素細胞瘤之細胞株中發現 p38 之磷酸化程度可影響 Bcl-2 蛋白質 PUMA 之表現量，而造成細胞死亡(Keuling et al., 2010)。在黑色素細胞瘤之細胞株中，MAPK 持續活化使癌細胞持續生長，並且伴隨著抗細胞凋亡因子 Bcl-2 家族大量表現，避免癌細胞走向凋亡。因此臨床上利用 Bcl-2 家族抑制劑 ABT-737 藥物試圖治療黑色素細胞瘤，但成效有限。此文獻發現若將 ABT-737 合併 p38 訊息傳遞抑制劑 SB202190 可有效降低黑色素瘤細胞株生長活性，並且增加 PUMA 表現量，促使細胞死亡。

本研究說明了 EB 病毒除了能透過基因產物調控細胞內 MAPKs 之表現，亦能調控 MAPKs 負向調控分子 DUSPs，使細胞內 MAPKs 訊息傳遞路徑持續活化，促使宿主細胞存活並持續生長。EB 病毒透過抑制 DUSP6 及 DUSP8 蛋白質表現，防止其活化細胞凋亡路徑相關路徑，避免宿主細胞走向凋亡。意味著，EB 病毒可透過多方面策略，調控細胞內分子路徑，維持宿主細胞之存活，並且促進宿主細胞持續生長，使其得以長期潛伏於宿主細胞中，躲避免疫系統攻擊，伺機活化。



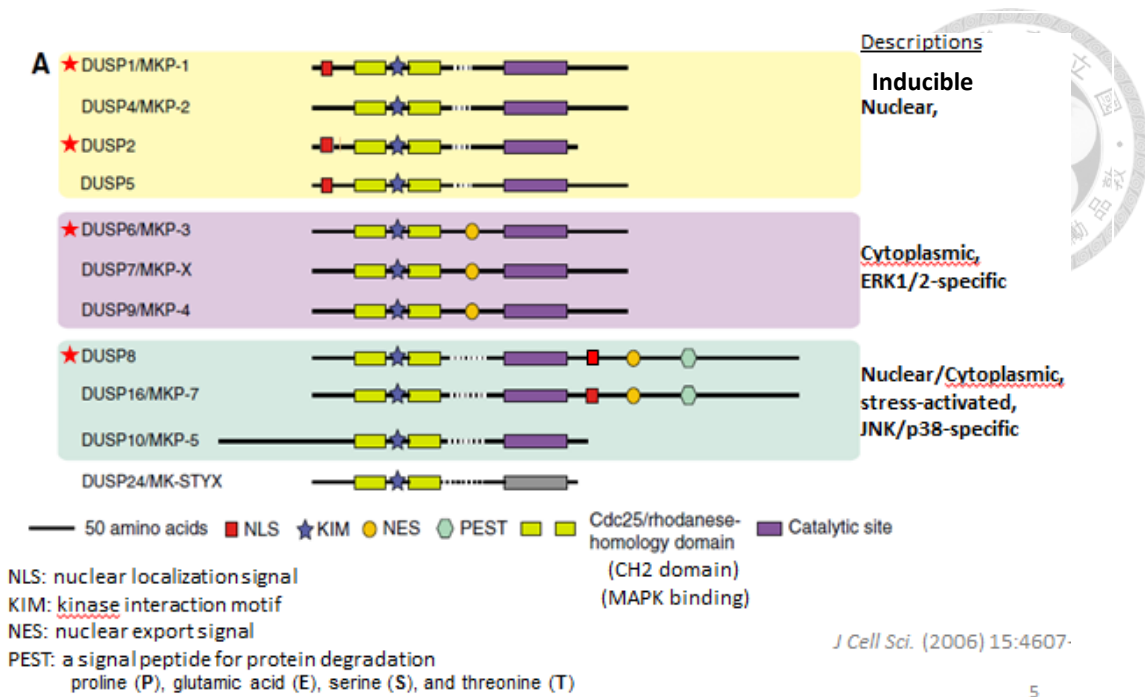
圖一、 LMP1 結構之示意圖

EB 病毒潛伏膜蛋白 LMP1 為穿膜蛋白質(transmembrane protein)，具有一個短的 N 端(17 個胺基酸)、六段疏水性穿膜片段，以及長片段 C 端細胞質內區域(200 個胺基酸)。細胞內 N 端區域將蛋白質固定於細胞膜上並且確認其方向性。疏水性穿膜片段促進蛋白質持續性的相互聚集，形成低聚合作用。細胞內 C 端區域其上具有兩段 C 端活化區域，近端的 CTAR1(胺基酸 194-232)，CTAR3(胺基酸 275-330)及遠端的 CTAR2(胺基酸 351-386)，負責細胞內多樣訊息傳遞，對於 EB 病毒將原發性 B 細胞不朽化是重要的。(Eliopoulos and Young, 2001; Young and Rickinson, 2004) 圖改自於(Young and Rickinson, 2004)



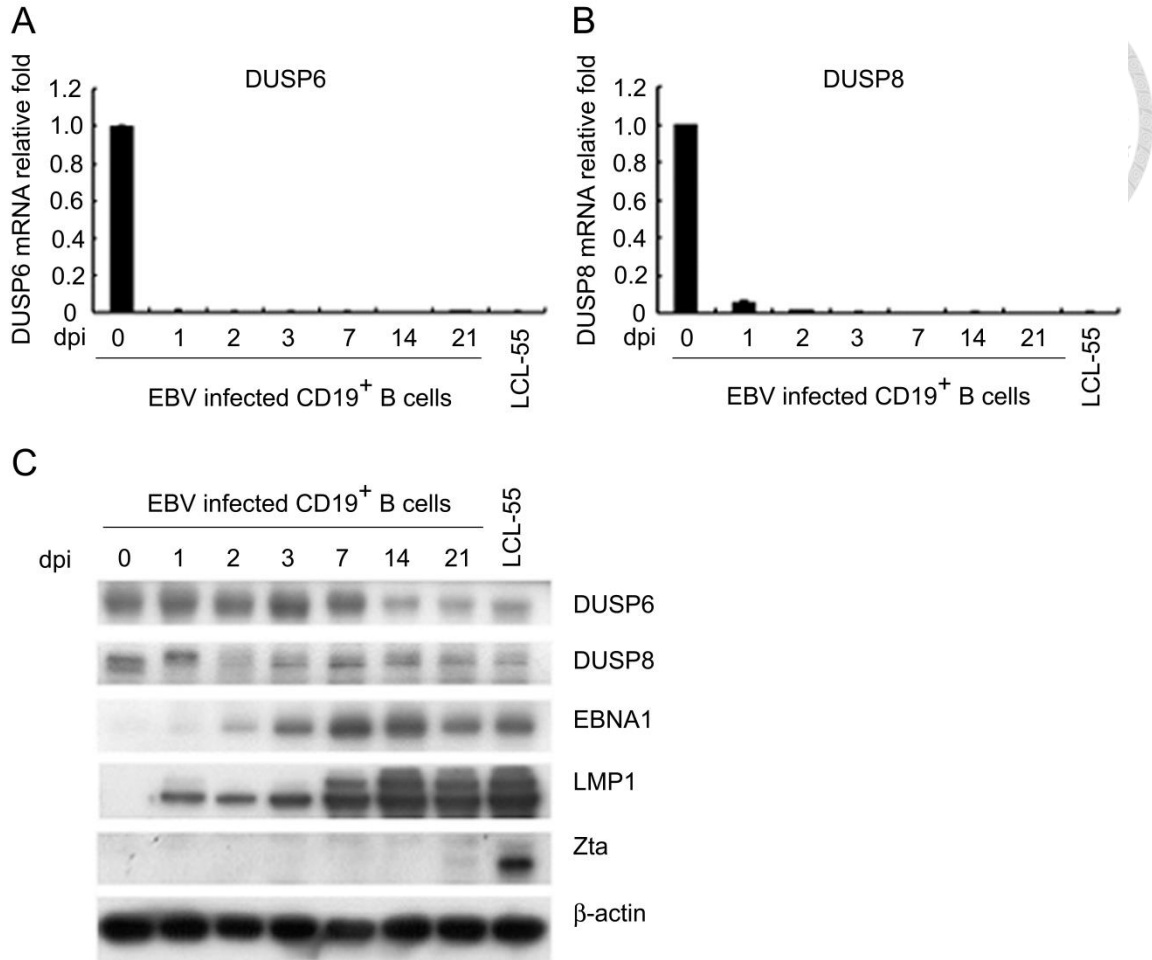
圖二、MAPK 訊息傳遞路徑示意圖

當細胞受到外來刺激，例如生長因子，細胞介質或是壓力刺激下，透過結合細胞膜上特定受器，進而活化下游訊息傳遞因子，如絲裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases)。絲裂原活化蛋白激酶為廣泛存在細胞中的絲氨酸/蘇胺酸蛋白激酶，皆具有高度保守的 Thr-X-Tyr 結構。絲裂原活化蛋白激酶分為三大類，細胞外訊息調控激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)、壓力活化蛋白激酶 (stress-activated protein kinases, SAPKs) 家族中之 c-Jun amino-terminal kinase (JNK) 以及 p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)。絲裂原活化蛋白激酶信號傳導通路是一種三級激酶之級聯傳遞信號過程，藉以調控細胞生長、分化、細胞凋亡、及抵抗壓力和免疫反應。(Liu et al., 2007)



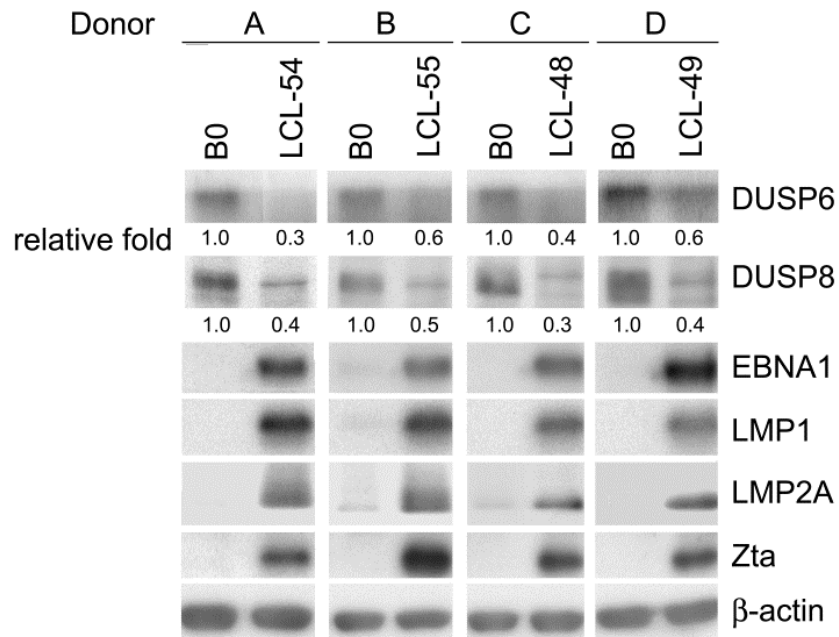
圖三、MKPs 分類及結構示意圖

細胞中具有一群可將絲氨酸/蘇胺酸或酪胺酸上磷酸根進行去磷酸化作用，稱為雙特异性磷酸酶(Dual-specificity phosphatase)。其中 DUSPs 針對絲裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases)進行去磷酸化的家族，稱為絲裂原活化蛋白激酶磷酸酶(MAP kinase phosphatase, MKPs)。其結構主要可分為兩個區域，分別為 N 端及 C 端。N 端為高度保守性區域，具有與特定絲裂原活化蛋白激酶磷酸酶專一性結合的 Cdc25/rhodanese 同源性區域，其中包含 Kinase-interaction motif 與特定激酶直接作用。C 端較具變異性，含有催化區域，利用其上半胱氨酸殘基將特定激酶去磷酸化。目前 MKPs 分為三大類，分別為誘發性 MKPs(inducible nuclear group)包含有 DUSP1、DUSP2、DUSP4、DUSP5；ERK 專一性 MKPs (cytoplasmic ERK-selective group)包含有 DUSP6、DUSP7、DUSP9，以及 JNK/p38 專一性 MKPs(JNK/p38-selective group)。(Dickinson and Keyse, 2006)包含有 DUSP8、DUSP10、DUSP16。



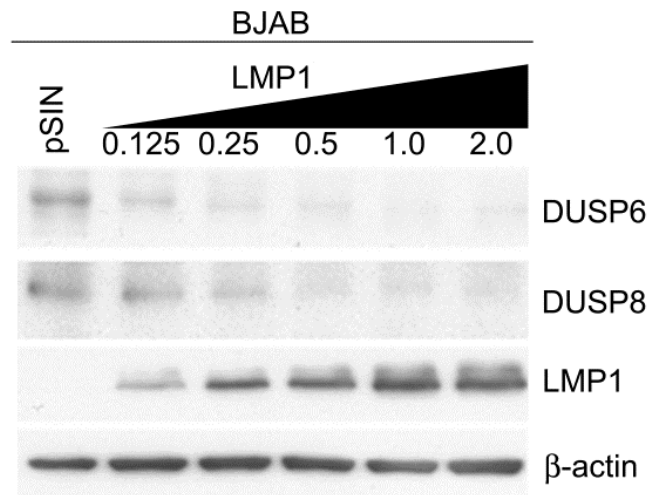
圖四、探查 EB 病毒感染 B 細胞不同時間後 DUSP6 及 DUSP8 之表現量

利用由捐贈者之白血球濃厚液以 CD19⁺磁珠方式，分離出 CD19⁺初級 B 細胞 (primary B cells)，以 EB 病毒 B95.8 strain 感染初級 B 細胞，分別收取 EB 病毒感染後 0、1、2、3、7、14、21 天數之細胞，以及感染 28 天後不朽成為 LCL(LCL-55)。圖 A 及圖 B，萃取其 RNA 進行 RT-Q-PCR 分析 DUSP6 及 DUSP8 mRNA 表現情形，並以β-actin 作為內控制組，將數據以 primary B0 所得之相對訊號為 1 進行量化得到相對比值，並以 Excel 軟體作圖。圖 C，萃取其蛋白質進行西方墨點法分析細胞內 DUSP6 以及 DUSP8 蛋白質表現情形，並以β-actin 作為內控制組。



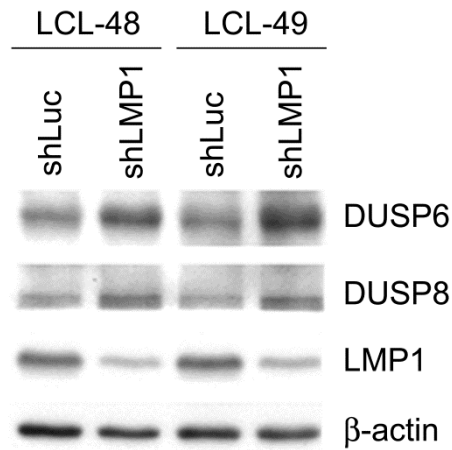
圖五、探查 EB 病毒感染 B 細胞後 DUSP6 及 DUSP8 之表現量

利用四位捐贈者的白血球濃厚液，以 CD19⁺磁珠純化出 CD19⁺初級 B 細胞 (primary B cells)，再以 EB 病毒 B95.8 strain 感染初級 B 細胞 28 天後，使不朽化為淋巴母芽球細胞株(LCLs)。分別收取初級 B 細胞以及淋巴母芽球細胞株，萃取其蛋白質進行西方墨點法，分析 DUSP6、DUSP8、EBNA1、LMP1、LMP2A、Zta 蛋白質表現情形，以 β -actin 做為內控制組。



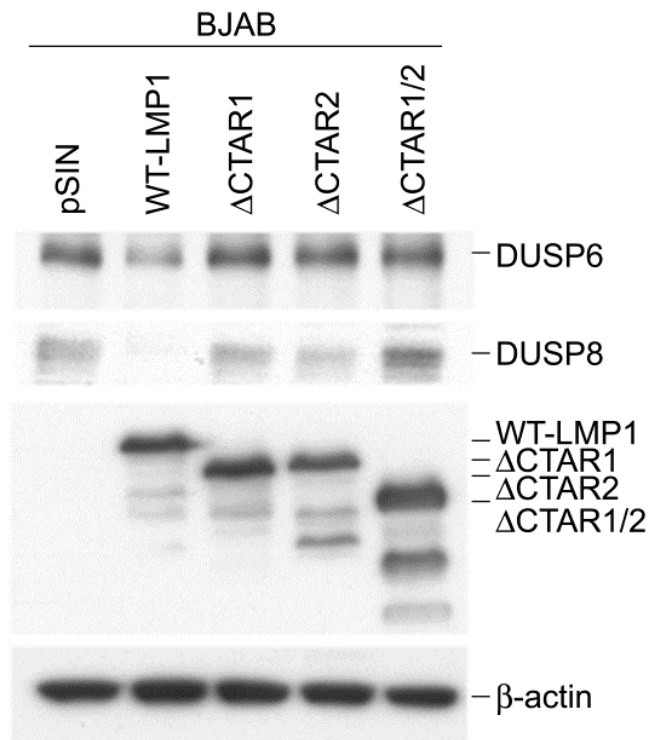
圖六、探查 EB 病毒潛伏期膜蛋白 LMP1 在 B 細胞內對於 DUSP6 以及 DUSP8 表現量之影響

於六孔細胞培養盤放置 1×10^6 /ml BJAB 細胞，利用帶有 pSIN 或 pSIN-LMP1 質體之慢病毒以 MOI= 0.125、0.25、0.5、1、2 感染 BJAB 細胞株，轉導 EB 病毒基因 LMP1，於感染五天後收取細胞萃取其蛋白質，進行西方墨點法分析，觀察 LMP1、DUSP6 以及 DUSP8 蛋白質表現情形，並以 β -actin 作為內控制組。



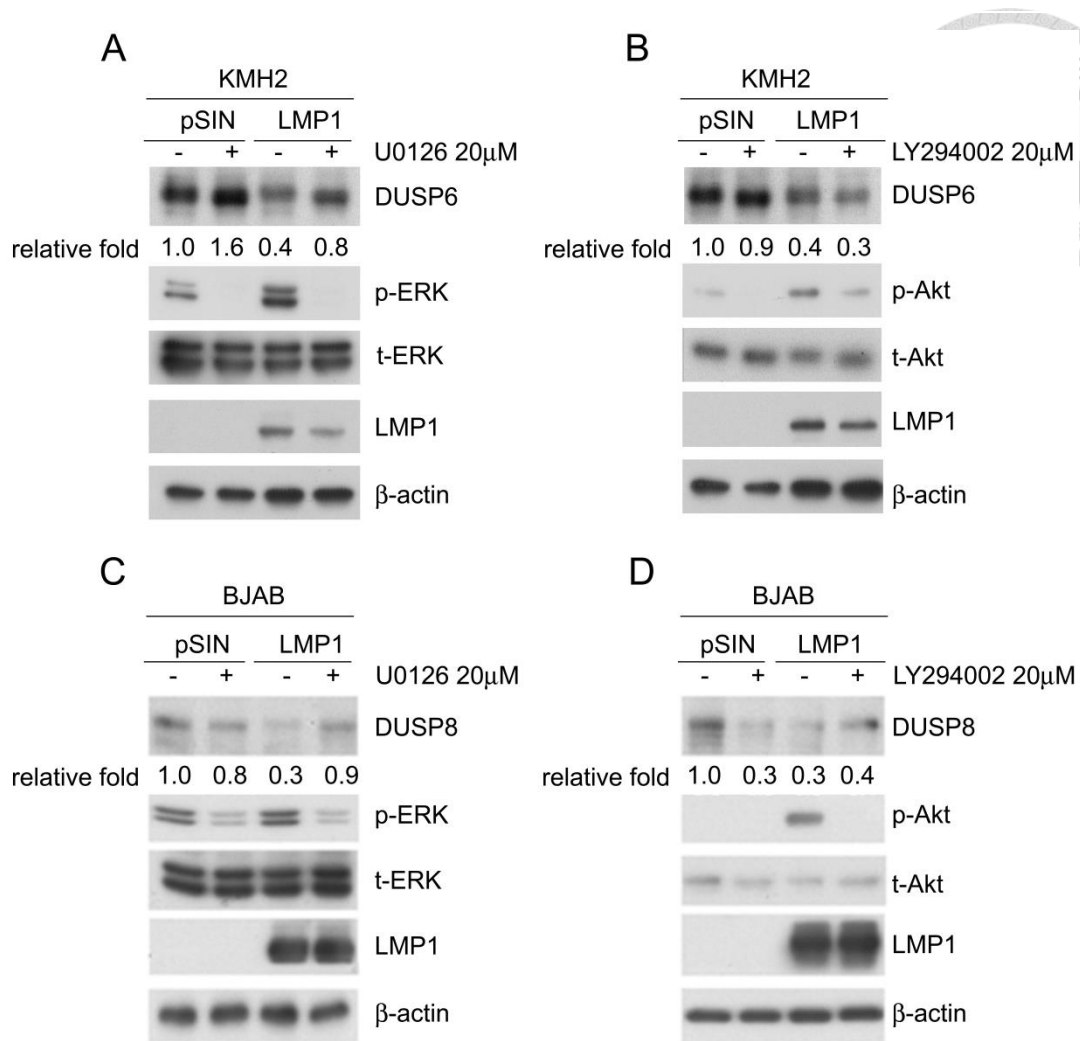
圖七、探查在 LCL 中減量 EB 病毒潛伏期膜蛋白 LMP1 對 DUSP6 及 DUSP8 表現量之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml LCL 細胞，利用帶有 pLKO.1-shLuciferase 或 pLKO.1-shLMP1 質體之病毒(MOI=3)感染 LCL-48 及 LCL-49 細胞株，轉導 EB 病毒基因 LMP1 shRNA，於感染後第五天，加入含有 10ug/ml Puromycin 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選。於篩選七天後收取細胞並萃取蛋白質，進行西方墨點法分析 LMP1、DUSP6 以及 DUSP8 表現情形，並以 β -actin 作為內控制組。



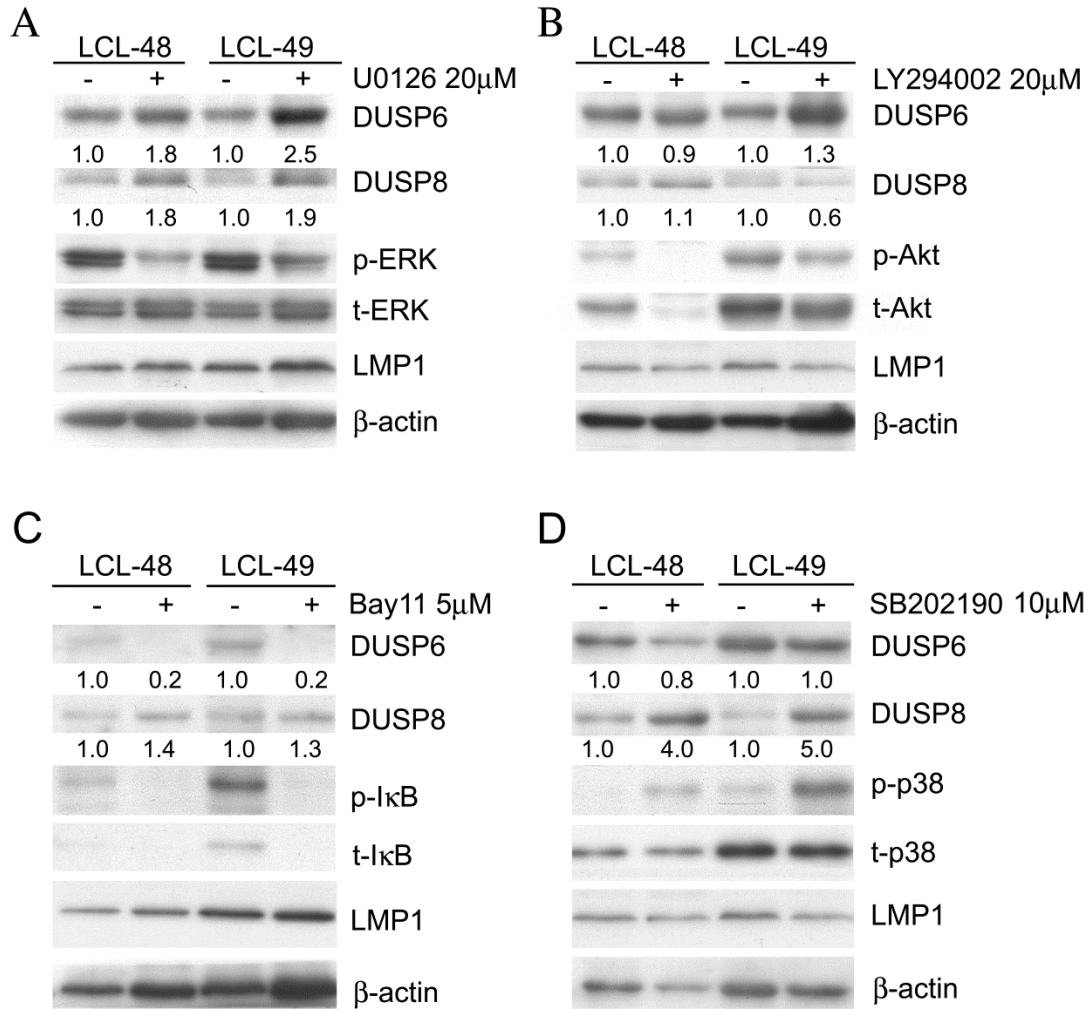
圖八、探查 EB 病毒潛伏期模蛋白質 LMP1 之 C 端活化區域對於 DUSP6 以及 DUSP8 表現量之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml BJAB 細胞，利用帶有 pSIN、pSIN-LMP1、pSIN-LMP1 Δ CTAR1、pSIN-LMP1 Δ CTAR2 及 pSIN-LMP1 Δ CTAR1/2 質體之慢病毒(MOI=1)感染 BJAB 細胞株，轉導 EB 病毒基因 LMP1 之野生型或刪除突變型，於感染五天後收取細胞並萃取其蛋白質，利用西方墨點法分析 DUSP6 及 DUSP8 及 LMP1 表現情形，並以 β -actin 作為內控制組。



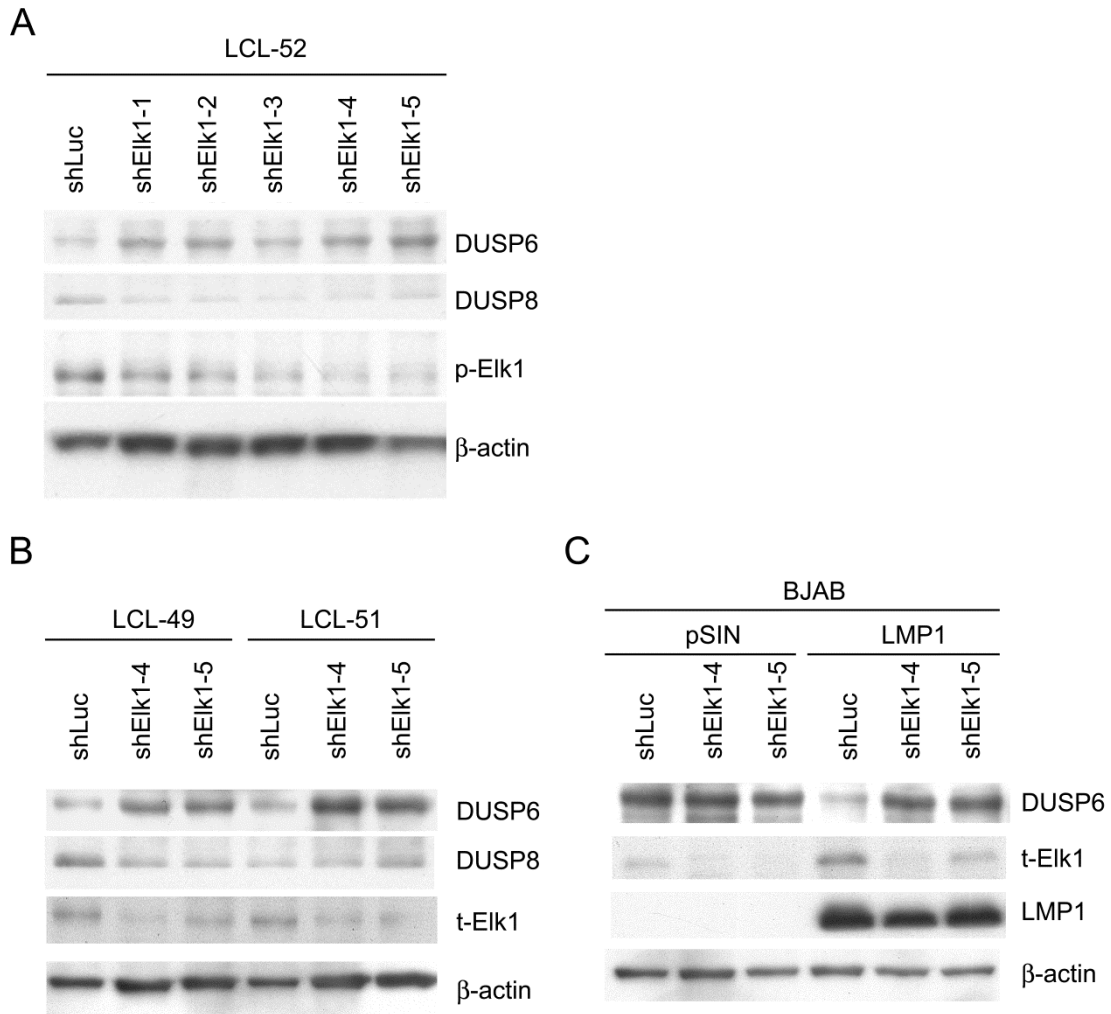
圖九、探查 EB 病毒潛伏期模蛋白質 LMP1 調控之訊息路徑對 DUSP6 及 DUSP8 表現量之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml BJAB 或 KMH2 細胞，利用帶有 pSIN 或 pSIN-LMP1 質體之慢病毒感染 BJAB 或 KMH2 細胞株，轉導 EB 病毒基因 LMP1，於感染後三天後以 20μM U0126 (ERK 訊息傳遞路徑抑制劑)或 20μM LY294002 (AKT 訊息傳遞路徑抑制劑)處理細胞，以 DMSO 作為控制組，48 小時候收取細胞萃取蛋白質，進行西方墨點法分析 DUSP6、DUSP8、t-ERK、t-AKT 表現情形，以及 ERK、Akt 磷酸化情形 pERK、pAkt，並以β-actin 作為內控制組。



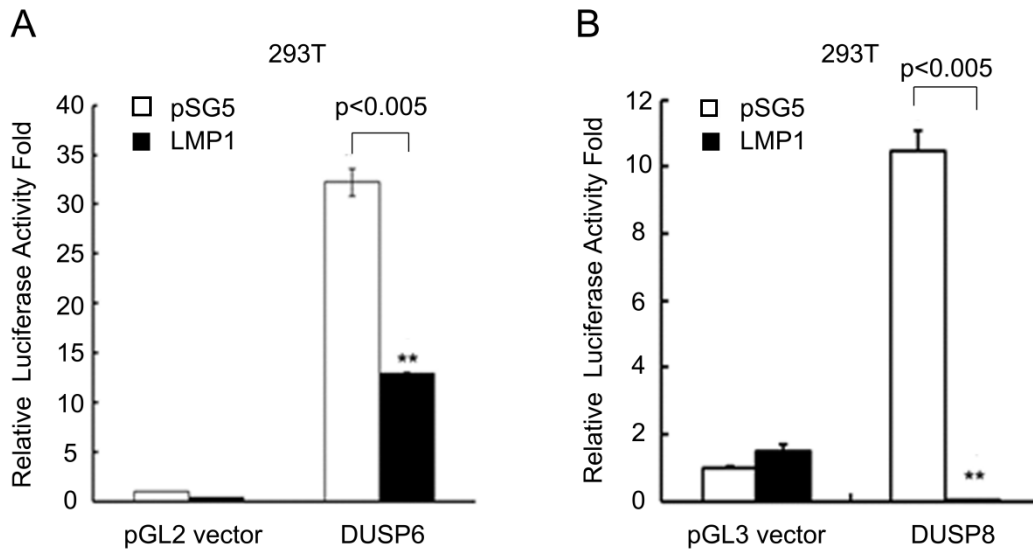
圖十、探查 EB 病毒潛伏期模蛋白質 LMP1 調控之訊息傳遞路徑對於 DUSP6 及 DUSP8 表現量之影響

於六孔細胞培養盤中放置二株淋巴母芽球細胞株 LCL-48 及 LCL-49，分別以 20 μ M U0126 (ERK 訊息傳遞路徑抑制劑)、20 μ M LY294002 (AKT 訊息傳遞路徑抑制劑)、5 μ M Bay11(NF κ B 訊息傳遞路徑抑制劑)、10 μ M SB202190(p38 訊息傳遞路徑抑制劑)處理細胞，以 DMSO 作為控制組，48 小時後收取細胞萃取蛋白質，進行西方墨點法分析 DUSP6、DUSP8、ERK、Akt 表現情形，以及 ERK、Akt 磷酸化情形 p-ERK、p-Akt，並以 β -actin 作為內控制組。



圖十一、探查 EB 病毒潛伏期蛋白質 LMP1 調控之訊息傳遞路徑 Elk-1 轉錄因子對於 DUSP6 及 DUSP8 表現量之影響

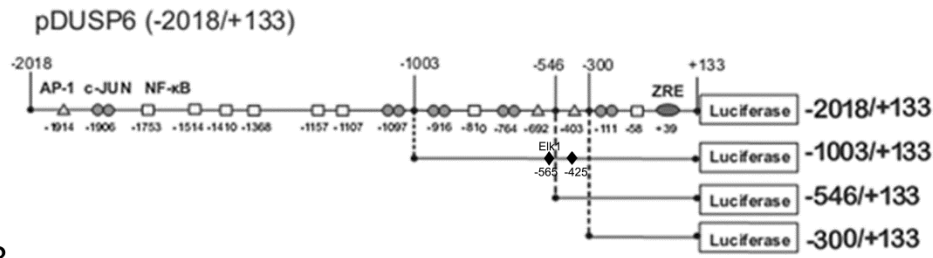
圖 A 及圖 B，於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml LCL-49、LCL-51、LCL-52 或 BJAB 細胞，以帶有 pLKO.1-shLuciferase 或 pLKO.1-shElk-1 質體之病毒(MOI=1.5) 感染細胞，轉導 Elk-1 shRNA，於感染後第五天，加入含有 10ug/ml Puromycin 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選。於篩選七天後收取細胞並萃取蛋白質，進行西方墨點法分析 p-Elk-1、DUSP6 以及 DUSP8 表現情形，並以β-actin 作為內控制組。圖 C，將轉導 Elk-1 shRNA 後 10ug/ml puromycin 篩選兩天之 BJAB 細胞株，同時感染 pSIN 或 pSIN-LMP1 質體之慢病毒以 MOI=1 感染 BJAB 細胞株，轉導 EB 病毒基因 LMP1，於感染五天後收取細胞萃取其蛋白質，進行西方墨點法分析，觀察 DUSP6、Elk-1、LMP1 蛋白質表現情形，並以β-actin 作為內控制組。



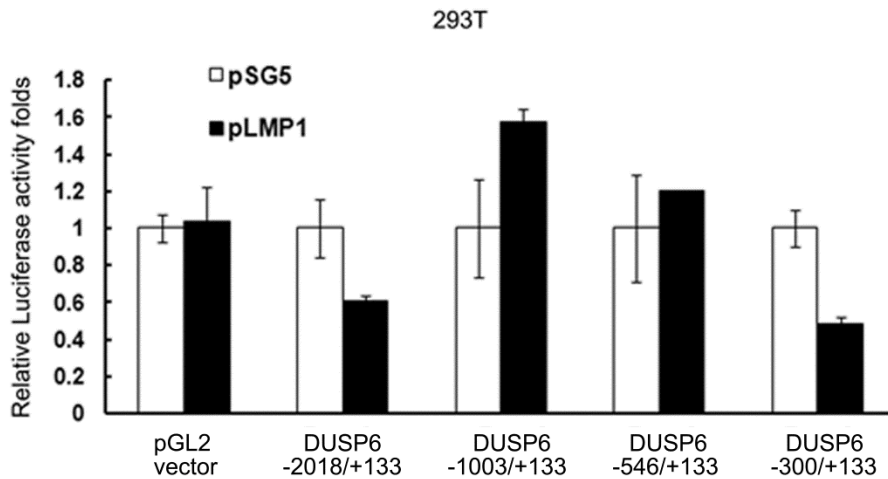
圖十二、探查 EB 潛伏期膜蛋白 LMP1 對於 DUSP6 及 DUSP8 啟動子活性之影響

圖 A 及圖 B，於十二孔細胞培養盤中種植 1×10^5 /ml 之 HEK293T 細胞，24 小時後，利用 NTRII 將 pSG5 或 pSG5-LMP1，以及 pGL2、pGL3 報導基因載體(作為控制組)，或帶有 DUSP6 啟動子活性之 pGL2-DUSP6，以及帶有 DUSP8 啟動子活性之 pGL3-DUSP8，轉染至 HEK293T 細胞，每組樣本進行三重複實驗，於 72 小時收取細胞進行螢火蟲冷光活性方法(Luciferase Activity Assay)分析。各組冷光之讀值分別以 GFP 讀值校正，計算出相對於控制組之螢火蟲冷光活性，並以 vector 控制組(pSG5/pGL2, pSG5/pGL3)為 1 進行量化，計算其相對冷光讀值之比值，並以 EXCEL 軟體作圖。

A



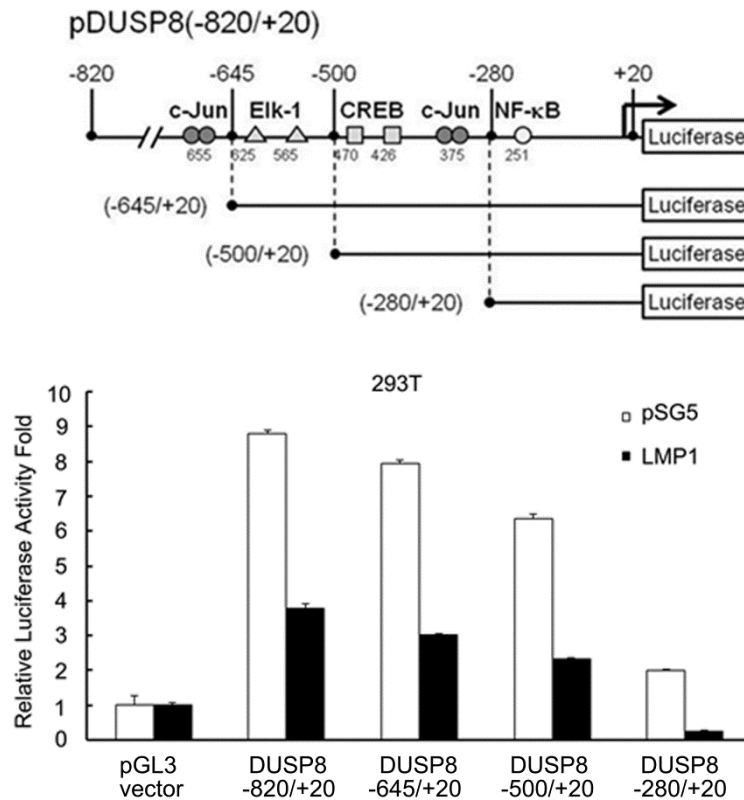
B



圖十三、探查 EB 病毒潛伏期蛋白質 LMP1 對於不同片段突變型 DUSP6 啟動子活性之影響

圖 A，DUSP6 啟動子之不同片段突變型及其轉錄因子結合位示意圖

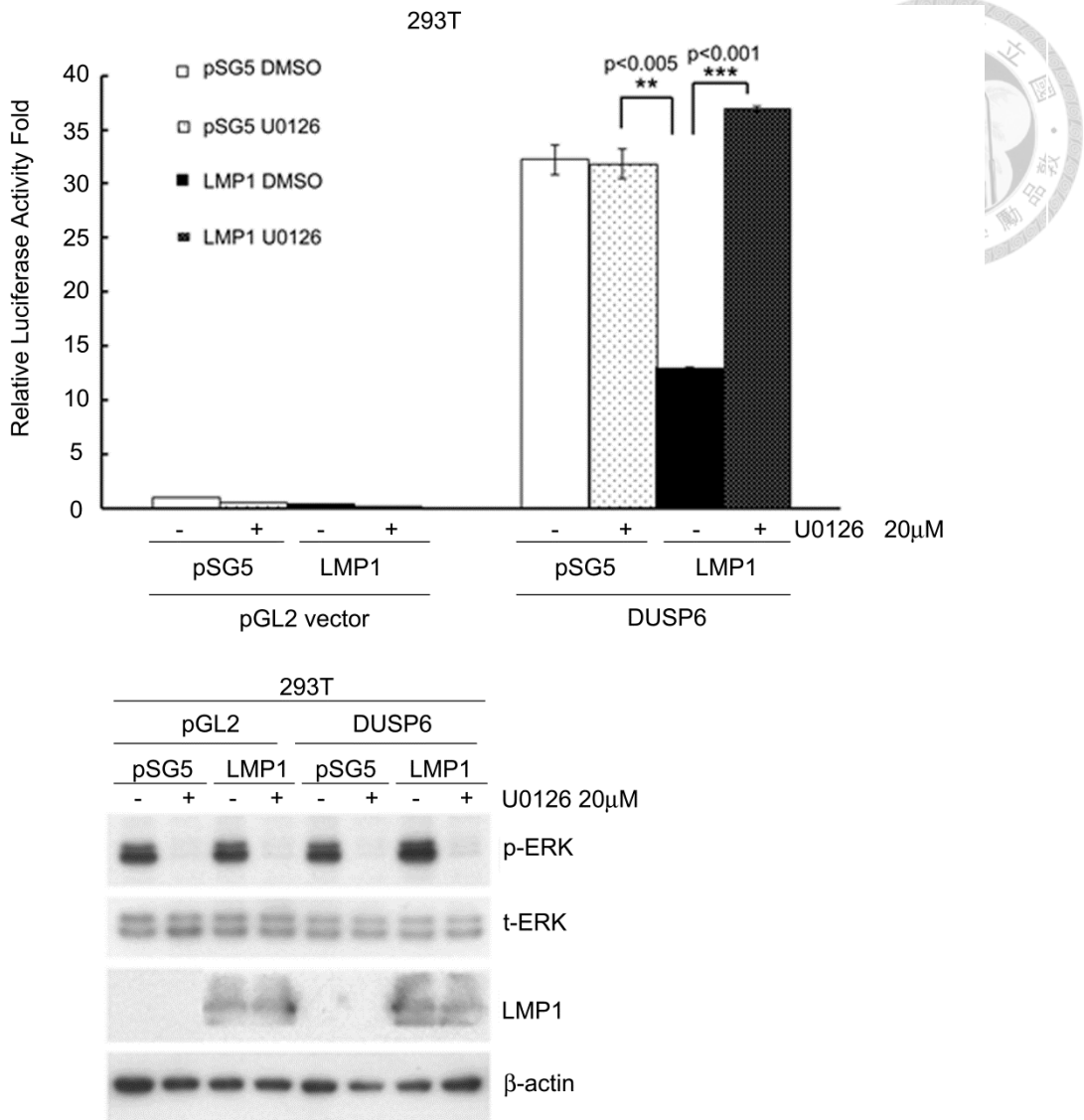
圖 B，於十二孔細胞培養盤中放置 1×10^5 /ml 之 HEK293T 細胞，利用 NTRII 將 pSG5、pSG5-LMP1、pGL2 報導基因載體(作為控制組)、以及帶有不同刪減突變片段 DUSP6 啟動子之 pGL2-DUSP6 (-2018/+133)、pGL2-DUSP6 (-1003/+133)、pGL2-DUSP6 (-546/+133)，以及 pGL2-DUSP6 (-300/+133)轉染至 HEK293T 細胞，每組樣本進行二重複實驗，於 72 小時後收取細胞進行螢火蟲冷光活性方法 (Luciferase Activity Assay)分析。每組冷光讀值以 GFP 讀值校正，計算相對於控制組之螢火蟲冷光活性，並以各組 pSG5 組別之相對冷光讀值為 1 進行量化，計算其相對冷光讀值之比值，並以 EXCEL 軟體作圖。



圖十四、探查 EB 病毒潛伏期蛋白質 LMP1 對於不同片段突變型 DUSP8 啟動子活性之影響

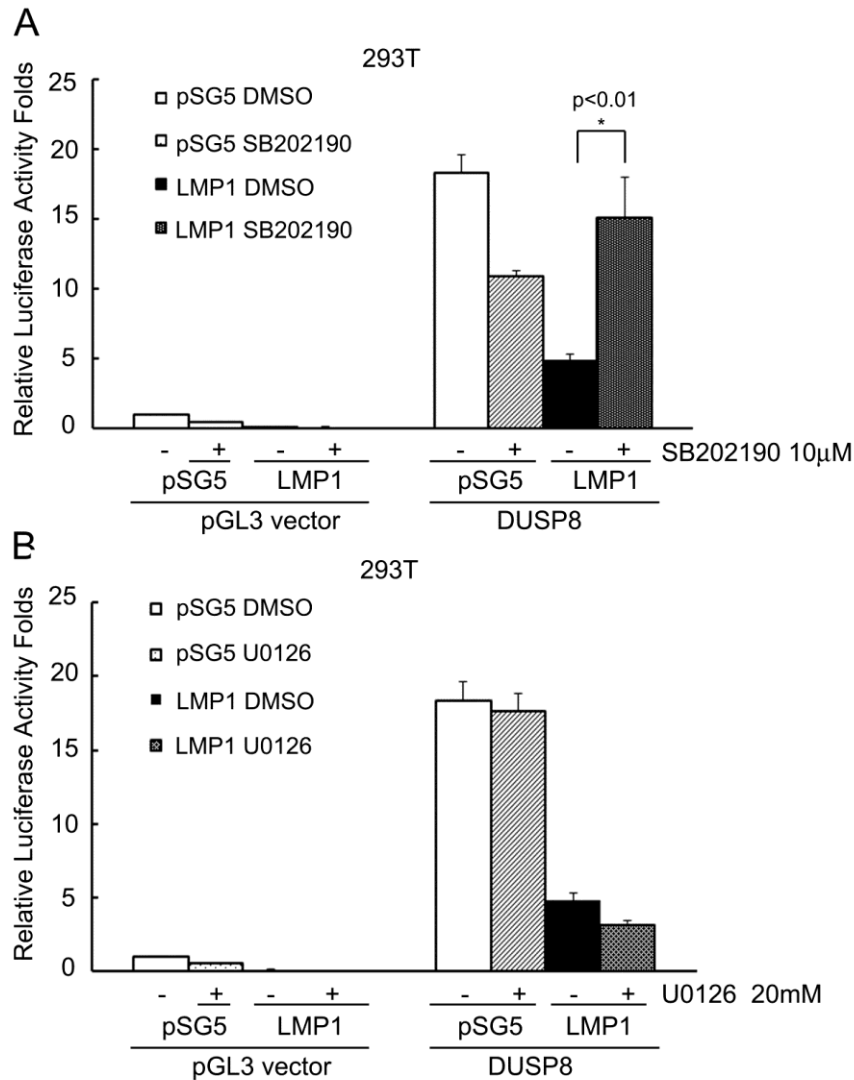
圖 A，DUSP8 啟動子之不同片段突變型及其轉錄因子結合位之示意圖

圖 B，於十二孔細胞培養盤中放置 1×10^5 /ml 之 HEK293T 細胞，利用 NTRII 將 pSG5、pSG5-LMP1、pGL3 報導基因載體(作為控制組)、以及帶有不同刪減突變片段 DUSP8 啟動子之 pGL3-DUSP8 (-820/+20)、pGL3-DUSP8 (-645/+20)、pGL3-DUSP8 (-500/+20)，以及 pGL3-DUSP8 (-280/+20)轉染至 HEK293T 細胞，每組樣本進行二重複實驗，於 72 小時後收取細胞進行螢火蟲冷光活性方法(Luciferase Activity Assay)分析。每組冷光讀值以 GFP 讀值校正，並以各組控制組為 1，計算相對於控制組之螢火蟲冷光活性比值，並以 EXCEL 軟體作圖。



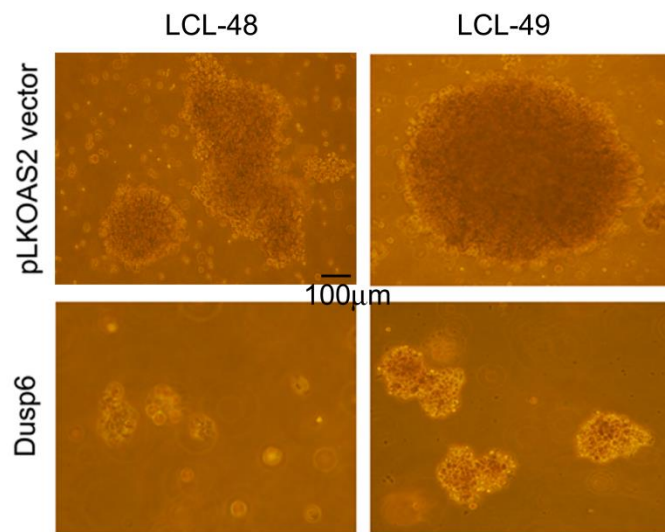
圖十五、探查 EB 病毒潛伏期膜蛋白質 LMP1 調控之訊息傳遞因子 ERK 對於 DUSP6 啟動子活性之影響

於十二孔細胞培養盤中放置 1×10^5 /ml 之 HEK293T 細胞，利用 NTRII 將 pSG5、pSG5-LMP1、pGL2 報導基因載體(作為控制組)、以及 DUSP6 啟動子之 pGL2-DUSP6 (-2018/+133)轉染至 HEK293T 細胞，每組樣本進行二重複實驗，於 24 小時後以 20μM U0126 (ERK 訊息傳遞因子抑制劑)處理細胞，抑制劑處理細胞 48 小時後，收取細胞進行螢火蟲冷光活性方法(Luciferase Activity Assay)分析。每組冷光讀值以 GFP 讀值校正，計算相對於控制組之螢火蟲冷光活性比值，並以 EXCEL 軟體作圖。並萃取蛋白質分析 pERK、ERK、LMP1 之表現量，並以β-actin 作為內控制組。



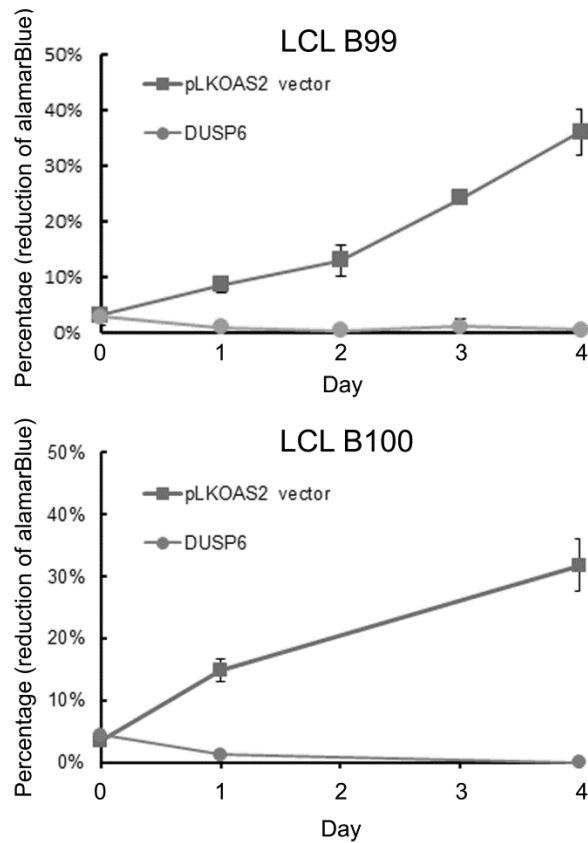
圖十六、探查 EB 病毒潛伏期膜蛋白質 LMP1 調控之訊息傳遞路徑 ERK 及 p38 對於 DUSP8 啟動子活性之影響

於十二孔細胞培養盤中放置 1×10^5 /ml 之 HEK293T 細胞，利用 NTRII 將 pSG5、pSG5-LMP1、pGL3 報導基因載體(作為控制組)、以及 DUSP8 啟動子之 pGL3-DUSP8 (-820/+20)轉染至 HEK293T 細胞，每組樣本進行二重複實驗，於 24 小時後以 20 μ M U0126 (ERK 訊息傳遞因子抑制劑)、10 μ M SB202190 (p38 訊息傳遞因子抑制劑)處理細胞，抑制劑處理細胞 24 小時後，收取細胞進行螢火蟲冷光活性方法(Luciferase Activity Assay)分析。每組冷光讀值以 GFP 讀值校正，計算相對於控制組之螢火蟲冷光活性比值，並以 EXCEL 軟體作圖。並萃取蛋白質分析 pERK、ERK、LMP1 之表現量，並以 β -actin 作為內控制組。



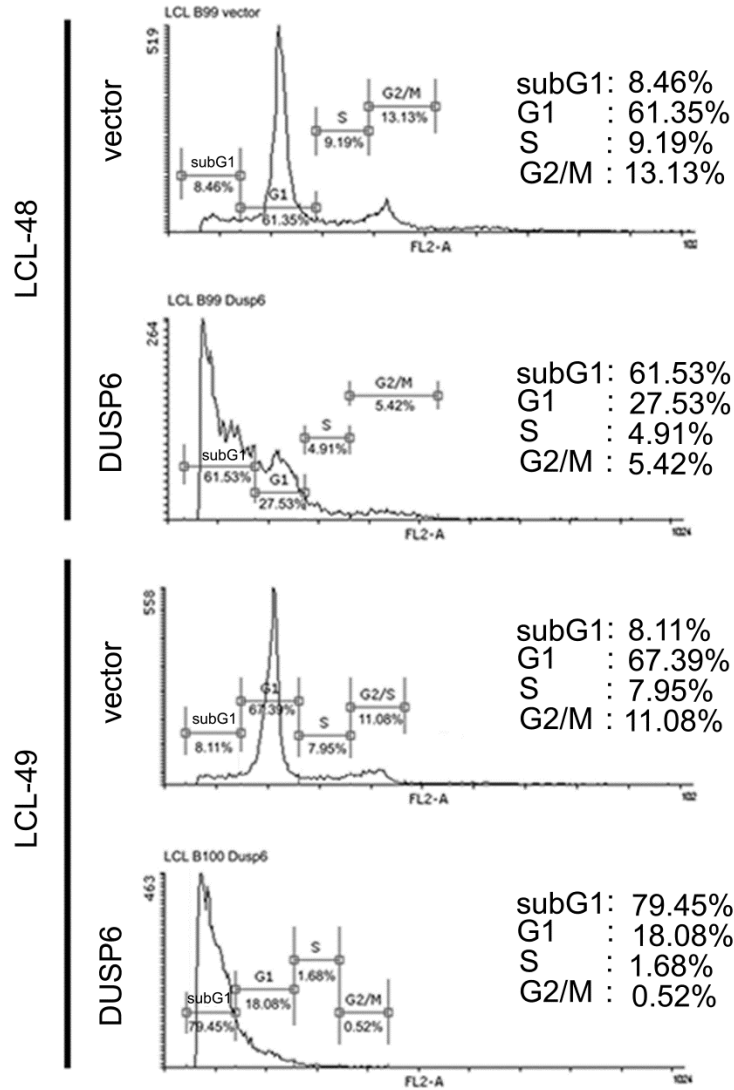
圖十七、探查 DUSP6 表現對於 LCLs 細胞型態之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 LCL-48、LCL-49 細胞，利用帶有 pLKOAS2.neo 或 pLKOAS2.neo-Dusp6 質體之慢病毒(MOI=1)感染 LCL-48 及 LCL-49 細胞株，轉導 DUSP6 基因，於感染後五天，加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選。並於篩選一周後利用亮視野顯微鏡觀察細胞型態。



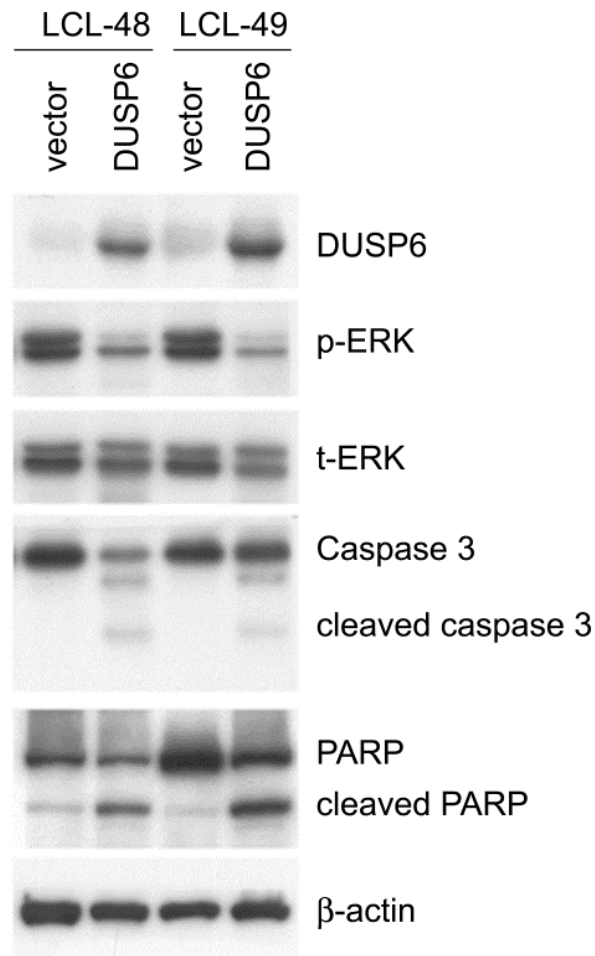
圖十八、探查 DUSP6 表現對於 LCLs 生長情形之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 LCL-48、LCL-49 細胞，利用帶有 pLKOAS2.neo 或 pLKOAS2.neo-Dusp6 質體之慢病毒(MOI=1)感染 LCL-48、LCL-49 細胞株，轉導 DUSP6 基因，於感染後五天，加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選。並於篩選一周後利用 AlamarBlue® 活細胞增生分析法進行分析，套用公式計算出每組樣本活細胞氧化還原之程度，並以 EXCEL 軟體作圖。



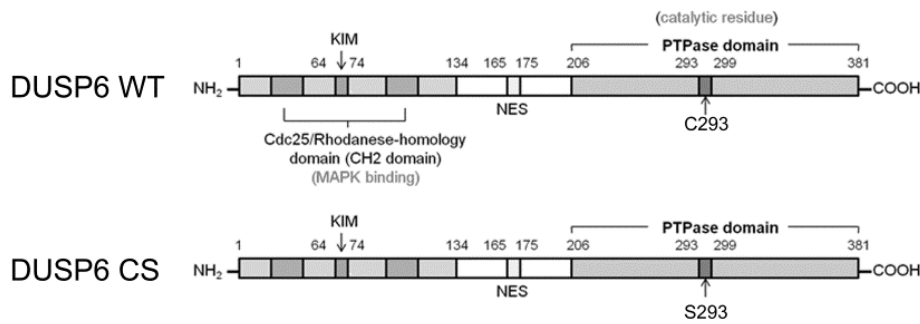
圖十九、探查 DUSP6 表現對於 LCLs 生長週期之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 LCL-48、LCL-49 細胞，利用帶有 pLKOAS2.neo 或 pLKOAS2.neo-DUSP6 質體之慢病毒(MOI=1)感染 LCL-48 及 LCL-49 細胞株，轉導 DUSP6 基因，於感染後五天，加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選。並於篩選一周後利用收取細胞以 PI 染色方法，利用流式細胞儀分析細胞週期轉換情形，並以 Flowing software 2 軟體作圖。

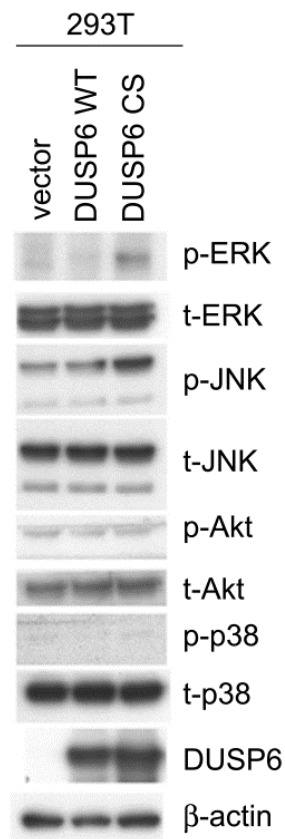


圖二十、探查 DUSP6 表現對於 LCLs 內促細胞凋亡蛋白質及 MAPKs 之影響
於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 LCL-48、LCL-49 細胞，利用帶有 pLKOAS2.neo 或 pLKOAS2.neo-DUSP6 質體之慢病毒(MOI=1)感染 LCL-48 及 LCL-49 細胞株，轉導 DUSP6 基因，於感染後五天，加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選。並於篩選一周後利用收取細胞萃取蛋白質，進行西方墨點法分析 DUSP6、pERK、t-ERK，以及細胞內促細胞凋亡蛋白質 (Caspase3 及 PARP)活化情形，並以 β -actin 作為控制組。

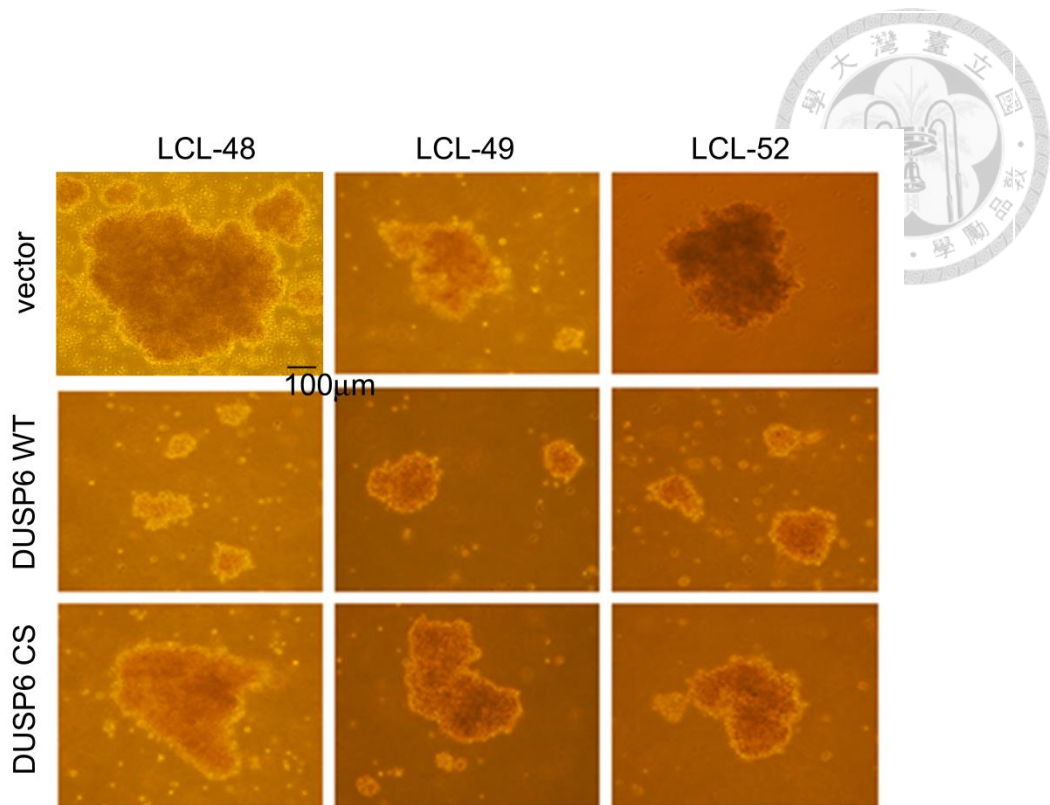
A



B

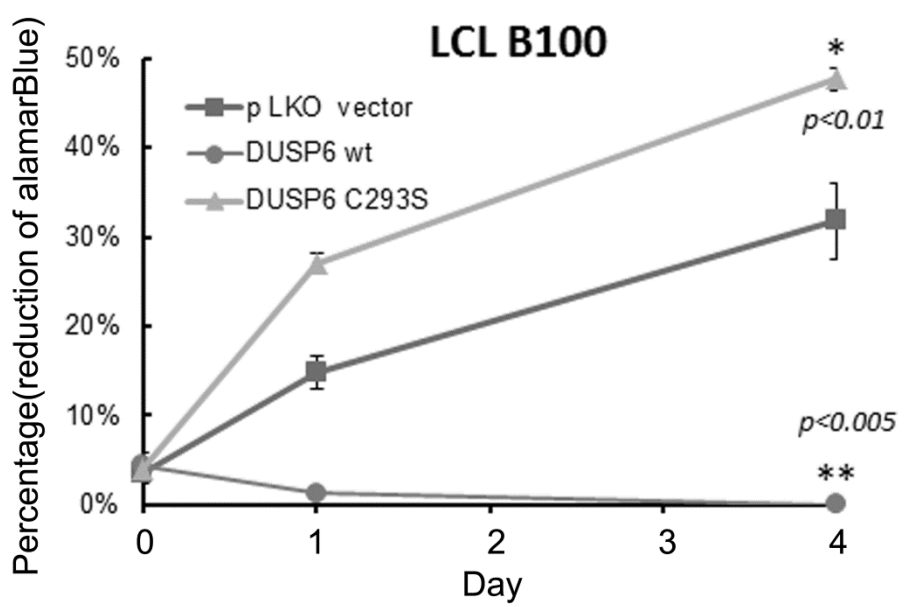


圖二十一、探查 DUSP6 催化區域突變型表現對於上皮細胞內 MAPKs 磷酸化程度之影響 圖 A，DUSP6 野生型及 DUSP6 突變型(DUSP6-CS)示意圖。DUSP6 突變型乃將其催化區域第 293 位點之胺基酸由 cysteine 突變為 serine。圖 B，於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml，利用 NTRII 將 pCMV-Tag2B、pCMV-Tag2B-DUSP6，以及帶有 DUSP6 催化區域突變型 pCMV-Tag2B -Dusp6 Δ C293S 質體，轉染至 HEK293T 細胞，72 小時後收取細胞萃取其蛋白質，以西方墨點法分析 DUSP6、MAPK 表現情形(t-ERK、t-JNK、t-p38、t-Akt)，以及 MAPKs 磷酸化情形(p-ERK、p-JNK、p-p38、p-Akt)，並以 β -actin 作為內控制組。



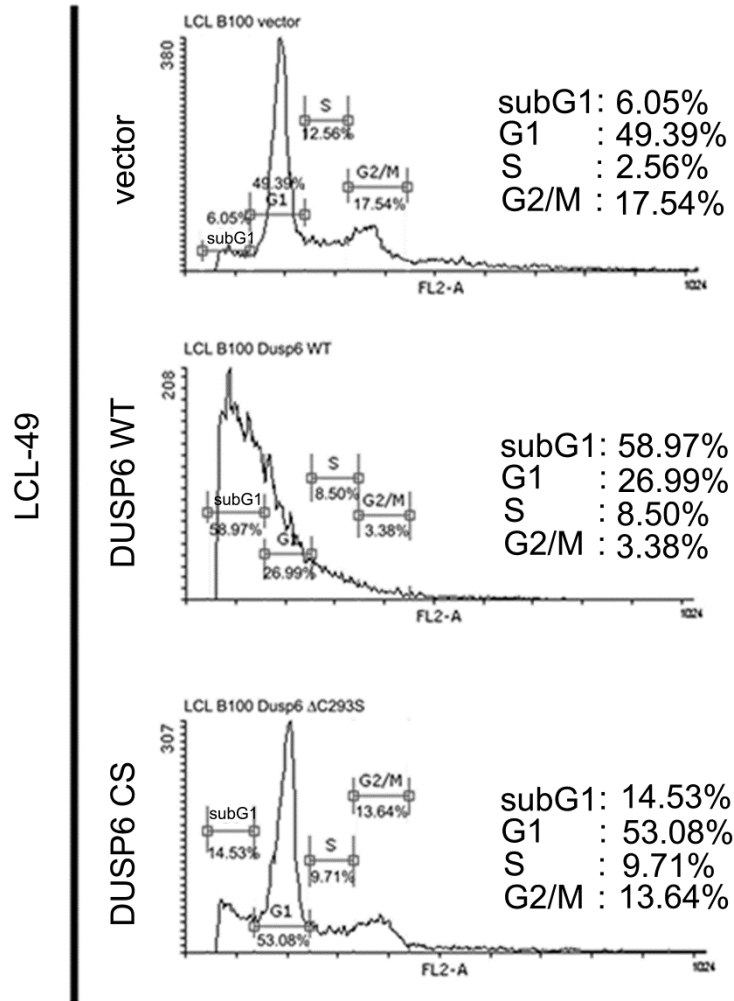
圖二十二、探查 DUSP6 催化區域突變型表現對於 LCLs 細胞型態之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 LCL-48、LCL-49、LCL-52 細胞，利用 pLKOAS2.neo、pLKOAS2.neo-DUSP6 野生型以及 pLKOAS2.neo-DUSP6 CS(Δ C293S)之慢病毒感染 LCL-48、LCL-49 及 LCL-52 細胞，轉導 DUSP6 及 DUSP6 催化區域突變型基因(Δ C293S)，於感染後第五天加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選，並於篩選七天後以亮視野顯微鏡觀察細胞型態。



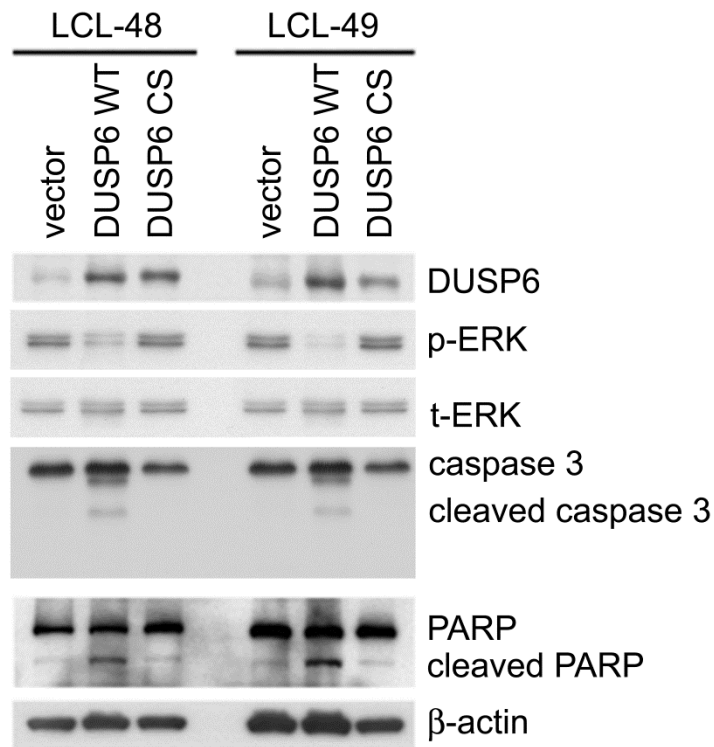
圖二十三、探查 DUSP6 催化區域突變型表現對於 LCLs 生長情形之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 LCL-49，利用 pLKOAS2.neo、pLKOAS2.neo-DUSP6 野生型以及 pLKOAS2.neo-DUSP6-CS(Δ C293S)之慢病毒感染 LCL-49 細胞，轉導 DUSP6 及 DUSP6 催化區域突變型基因(Δ C293S)，於感染後第五天加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選，並於篩選七天後利用 AlamarBlue® 活細胞增生分析法，套用公式計算出各組樣本活細胞氧化還原之程度，並以 EXCEL 軟體作圖。



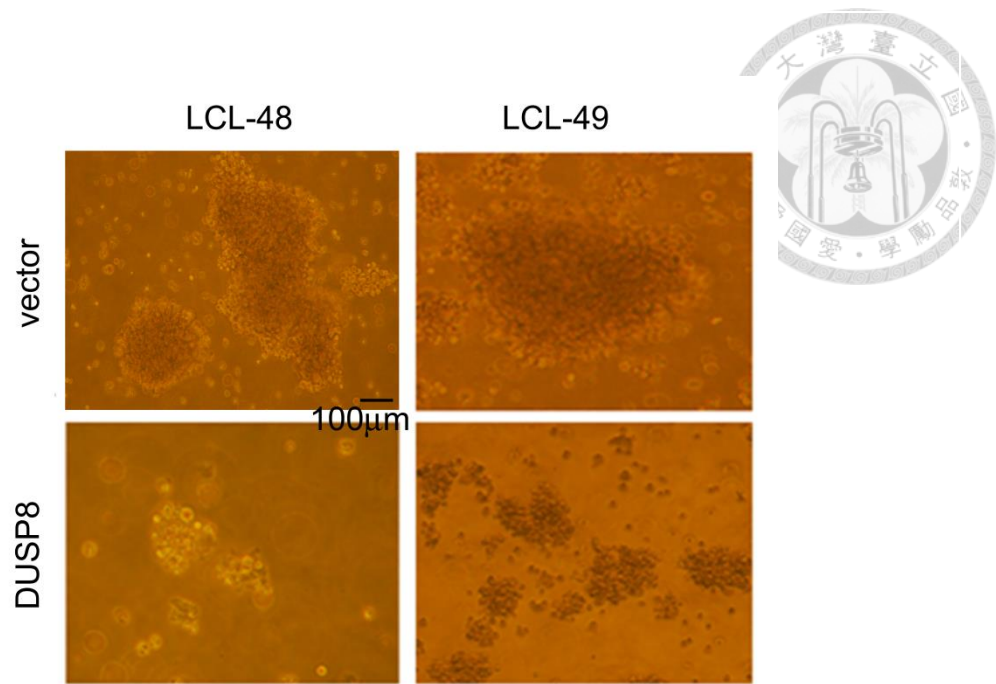
圖二十四、探查 DUSP6 催化區域突變型表現對於 LCLs 細胞週期之影響

於六孔細胞培養盤中放置 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 之 LCL-49，利用 pLKOAS2.neo、pLKOAS2.neo-DUSP6 野生型以及 pLKOAS2.neo-DUSP6-CS(Δ C293S)之慢病毒感染 LCL-49 細胞，轉導 DUSP6 及 DUSP6 催化區域突變型基因(Δ C293S)，於感染後第五天加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選，並於篩選七天後以 PI 染色，並利用流式細胞儀分析細胞週期轉換情形，以 Flowing software 2 軟體作圖。



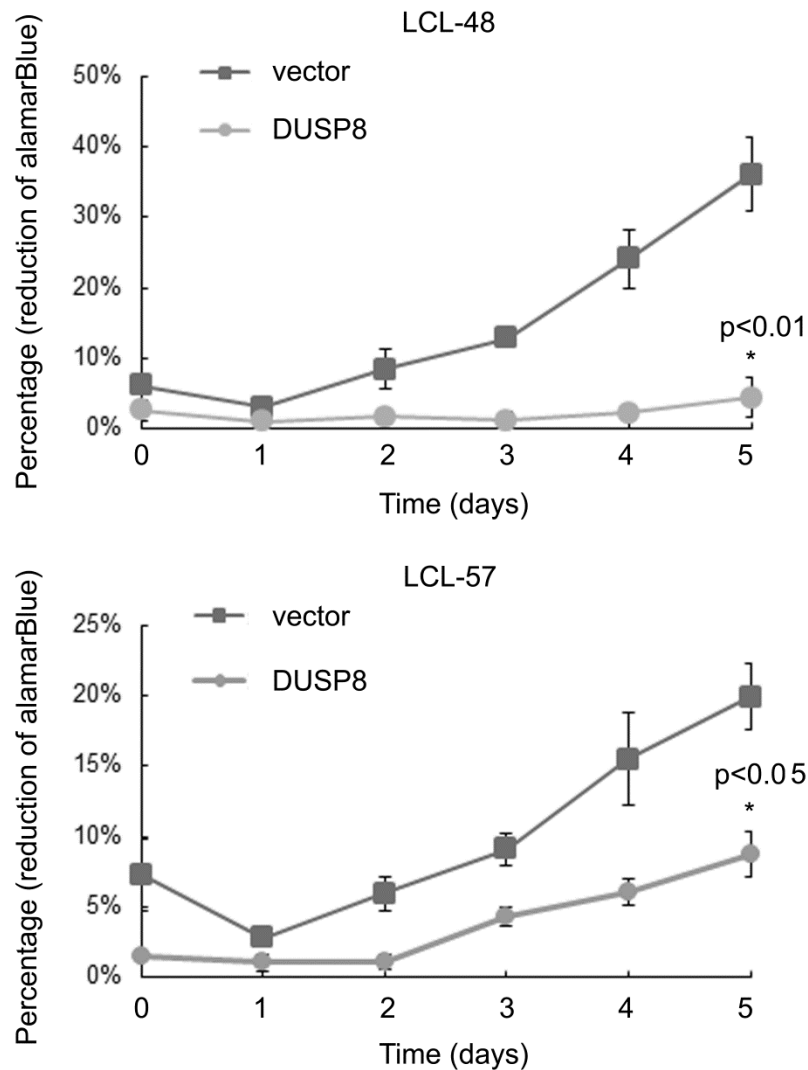
圖二十五、探查 Dusp6 催化區域突變型表現對於 LCLs 內促細胞凋亡蛋白質及 MAPKs 之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 LCL-48、LCL-49，利用 pLKOAS2.neo、pLKOAS2.neo-DUSP6 野生型以及 pLKOAS2.neo-DUSP6-CS(Δ C293S)之慢病毒感染 LCL-48、LCL-49 細胞，轉導 DUSP6 及 DUSP6 催化區域突變型基因 (Δ C293S)，於感染後第五天加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選，並於篩選七天後收取細胞萃取其蛋白質，利用西方墨點法分析 DUSP6、t-ERK 表現情形，以及 ERK 磷酸化情形(p-ERK)、細胞內促細胞凋亡蛋白質 (caspase3 及 PARP)活化情形，並以 β -actin 作為內控制組。



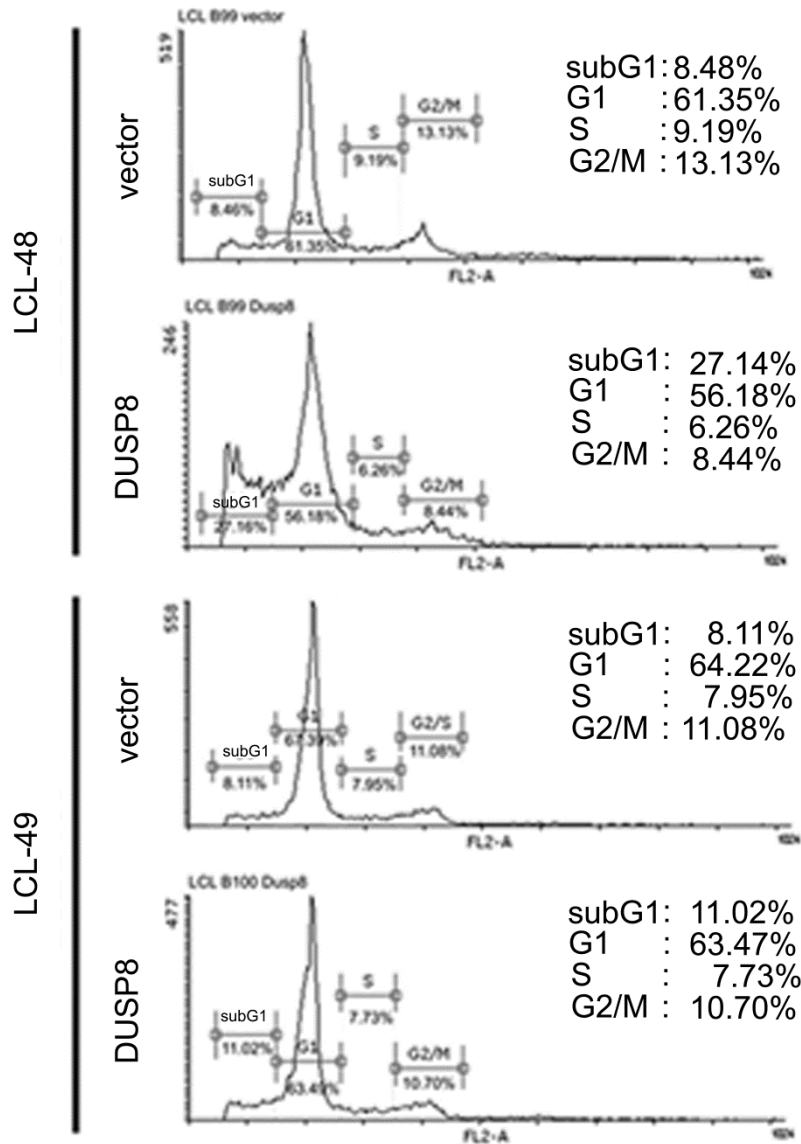
圖二十六、探查 DUSP8 表現對於 LCLs 細胞型態之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 LCL-48、LCL-49，利用帶有 pLKOAS2.neo 或 pLKOAS2.neo-DUSP8 質體之慢病毒(MOI=1)感染 LCL-48 及 LCL-49 細胞株，轉導 DUSP8 基因，於感染後五天，加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選。並於篩選一周後利用亮視野顯微鏡觀察細胞型態。



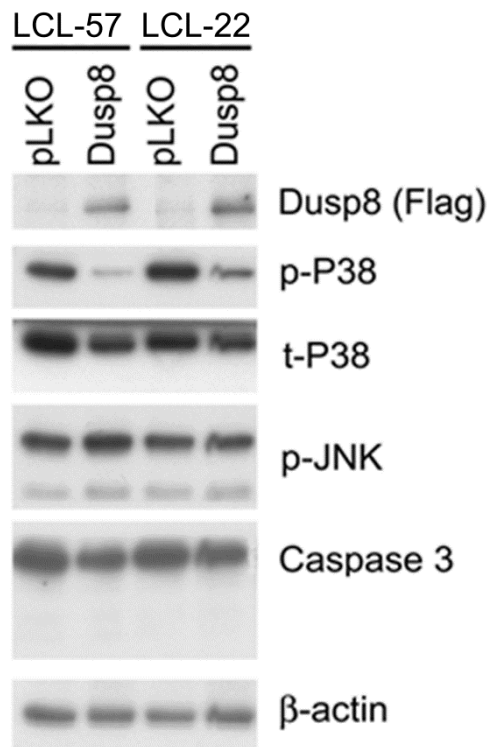
圖二十七、探查 DUSP8 表現對於 LCLs 生長情形之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 LCL-48 及 LCL-57，利用帶有 pLKOAS2.neo 或 pLKOAS2.neo-DUSP8 質體之慢病毒(MOI=1)感染 LCL-48 及 LCL-57 細胞株，轉導 DUSP8 基因，於感染後五天，加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選。並於篩選一周後利用 AlamarBlue® 活細胞增生分析法，套用公式計算出各組樣本活細胞氧化還原之程度，並以 EXCEL 軟體作圖。

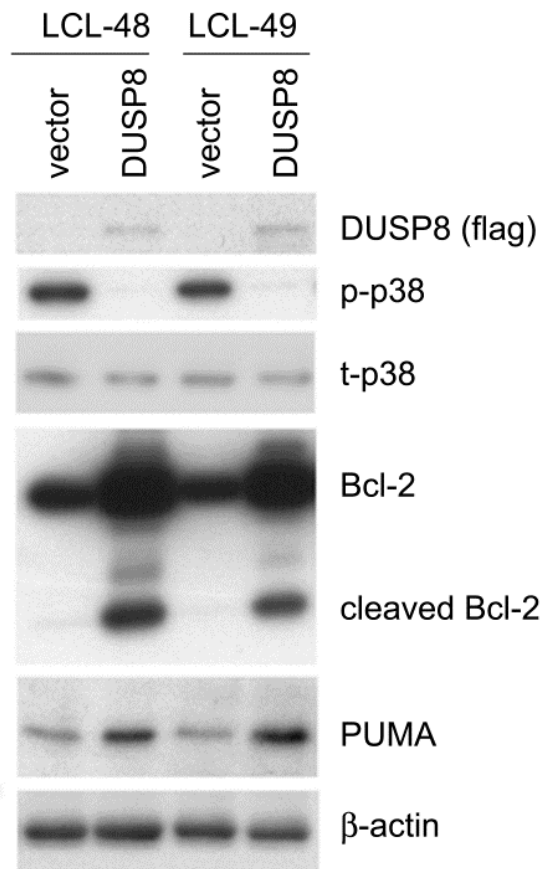


圖二十八、探查 DUSP8 表現對於 LCLs 細胞週期之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 LCL-48、LCL-49，利用帶有 pLKOAS2.neo 或 pLKOAS2.neo-DUSP8 質體之慢病毒(MOI=1)感染 LCL-48 及 LCL-49 細胞株，轉導 DUSP8 基因，於感染後五天，加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選。並於篩選一周後利用收取細胞以 PI 染色方法，利用流式細胞儀分析細胞週期轉換情形，並以 Flowing software 2 軟體作圖



圖二十九、探查 DUSP8 表現對於 LCLs 內促細胞凋亡蛋白質及 MAPKs 之影響於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 LCL-22、LCL-57，利用帶有 pLKOAS2.neo 或 pLKOAS2.neo-DUSP8 質體之慢病毒(MOI=1)感染 LCL-22 及 LCL-57 細胞株，轉導 DUSP8 基因，於感染後五天，加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選。並於篩選一周後收取細胞萃取蛋白質，以西方墨點法分析 Dusp8、MAPKs 表現情形(t-p38、t-JNK)，以及 MAPKs 磷酸化情形(p-p38、p-JNK)、細胞內促細胞凋亡蛋白質(caspase3)活化情形，並以β-actin 作為內控制組。



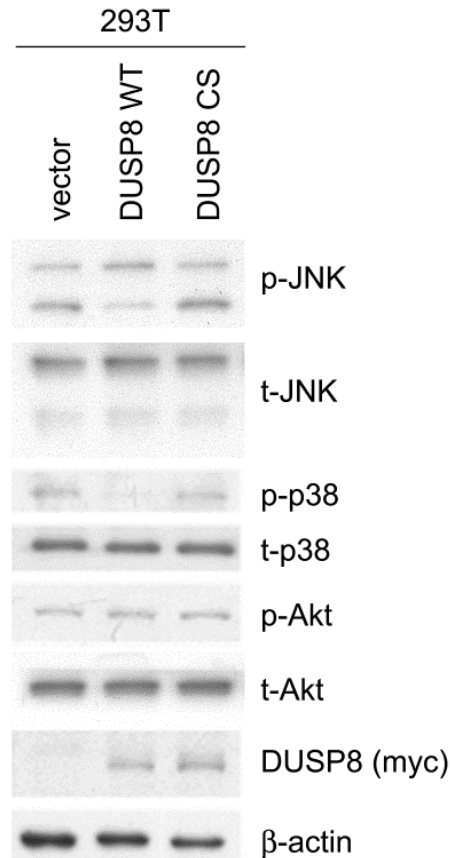
圖三十、探查 DUSP8 表現對於 LCLs 內促細胞凋亡蛋白質之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 LCL-48、LCL-49，利用帶有 pLKOAS2.neo 或 pLKOAS2.neo-DUSP8 質體之慢病毒(MOI=1)感染 LCL-48 及 LCL-49 細胞株，轉導 DUSP8 基因，於感染後五天，加入含有 1mg/ml G418 之 RPMI/10%FBS 培養液進行篩選。並於篩選一周後收取細胞萃取蛋白質，以西方墨點法分析 DUSP8、p-p38、t-p38、細胞內促細胞凋亡蛋白質(Bcl-2、PUMA)活化情形，並以 β -actin 作為內控制組。

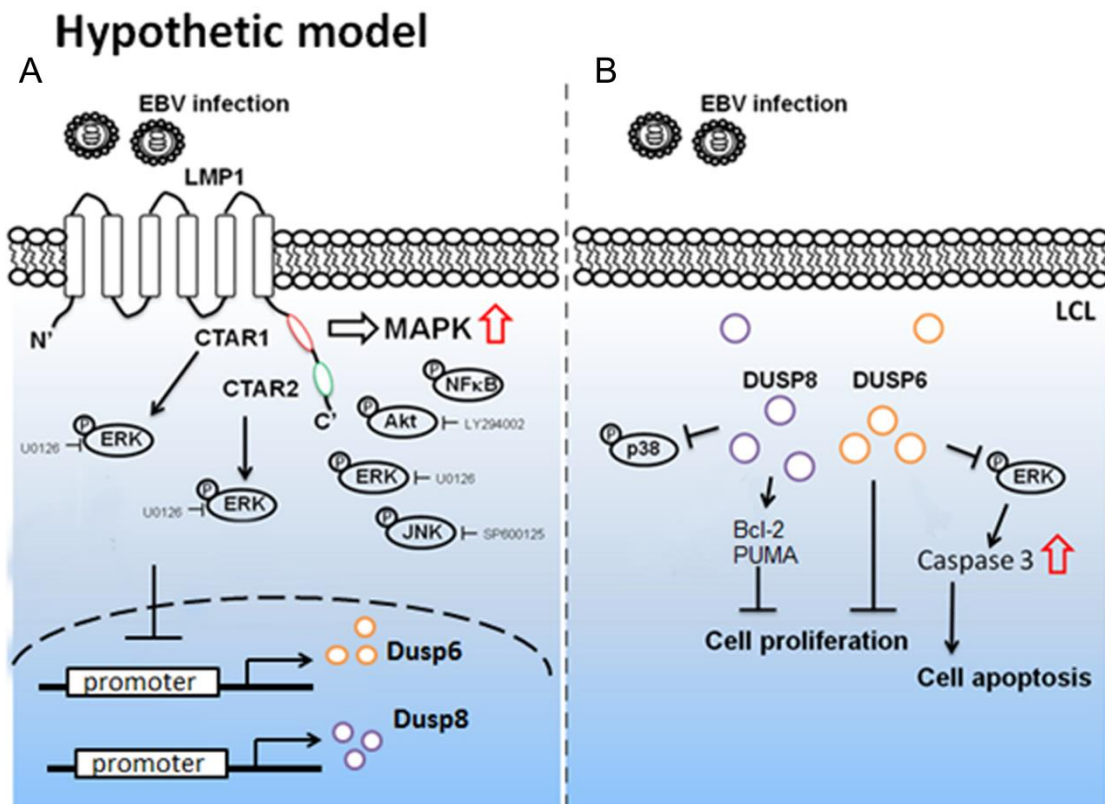
A



B



圖三十一、探查 DUSP8 催化區域突變型表現對於上皮細胞內 MAPKs 磷酸化程度之影響 圖 A，DUSP8 野生型及 DUSP8 催化區域突變型(C246S)之示意圖。DUSP8 催化區域突變型乃將 DUSP8 催化區域第 246 位點由 cysteine 突變為 serine。圖 B，利用 NTRII 將 pMT-SM-myc、pMT-SM-myc-M3/6(DUSP8)，DUSP8 催化區域突變型 pMT-SM-myc-M3/6-CS (Dusp8-CS)質體，轉染至 HEK293T 細胞，72 小時後收取細胞萃取其蛋白質，以西方墨點法分析 DUSP8、MAPKs 表現情形(t-ERK、t-JNK、t-p38、t-Akt)，以及 MAPKs 磷酸化情形(p-ERK、p-JNK、p-p38、p-Akt)，並以β-actin 作為內控制組。



圖三十二、DUSPs 於 EB 病毒感染細胞內受到調控路徑之示意圖

本研究探討 EB 病毒感染對 DUSPs 表現之影響，EB 病毒與 DUSPs 之間之調控關係。發現 EB 病毒潛伏期膜蛋白 LMP1 可透過 DUSP6 及 DUSP8 啟動子調控 DUSP6 及 DUSP8 基因表現。且其 C 端活化區域 CTAR1 或 CTAR2，與下游 ERK 訊息傳遞路徑，對於 LMP1 調控 DUSP6 及 DUSP8 之表現佔有重要角色，並可能透過 Elk-1 細胞內轉錄因子調控 DUSP6 表現。另一方面，DUSPs 於 EB 病毒感染細胞內能降低特定 MAPKs 之磷酸化程度，並且降低細胞生長能力，活化細胞內促細胞凋亡因子，使細胞凋亡。並由實驗證明，DUSPs 之催化區域對於降低細胞內特定 MAPKs 之磷酸化，以及促使細胞走向凋亡過程扮演重要角色。

表



用於質體構築之引子序列

1. 構築 pCMV.Tag2B-DUSP8-CS

引子名稱	引子鹼基序列 (5'→3')	產物長度
<i>Bam</i> HI-D8-F	CGCGGATCCGCGATGGCTGGGGACCGGCTCCC	1902 bp
<i>Xho</i> I-D8-R	CCGCTCGAGCGGTCAGGACACCTCGATGACCT	

附註：標示底線為限制酶切位序列

2. 構築 pLKOAS2.neo-DUSP8-CS

引子名稱	引子鹼基序列(5'→3')	產物長度
<i>Nhe</i> I-DUSP-F	CTAGCTAGCTAGGCCACCATGGATTACAAG	1902bp
<i>Eco</i> RI-DUSP-R	CGGAATTCCGACACTTACCTGGTACCTT	

附註：標示底線為限制酶切位序列

用於聚合鍊連鎖反應之引子序列

目標	引子名稱	引子鹼基序列 (5'→3')	產物長度 (bp)
DUSP1	DUSP1-5'	GAGCTGTGCAGCAAACAGTC	362
	DUSP1-3'	ACCCTTCCTCCAGCATTCTT	
DUSP2	DUSP2-F	CCACTGCCGTGTACTTCCTG	329
	DUSP2-R	CTCCACCATCTGGTTGTCCT	
DUSP6	DUSP6-F	AGCAGCGACTGGAACGAGAA	301
	DUSP6-R	TGTTGGACAGCGGACTACCAT	
DUSP8	DUSP8-5'	GTCAACATCTGCTGCTCCAA	369
	DUSP8-3'	GTAGAGGTGAGGCAGGATGC	
LMP1	LMP1-1	CTTCAGAAGAGACCTTCTCT	104
	LMP1-2	ACAATGCCTGTCCGTGCAAA	

LMP2A	LMP2A-F	ATGACTCATCTCAACACATA	280
	LMP2A-R	CATGTTAGGCAAATTGCAAA	
Zta	Zta-F	TTCCACAGCCTGCACCAGTG	182
	Zta-R	GGCAGCAGCCACCTCACGGT	
EBNA1	EBNA1-F	ATCGTCAAAGCTGCACACAG	253
	EBNA1-R	CAACCTAAGGCGAGGAACTG	
EBNA2	EBNA2-F	ACTTTGAGCCACCCACAGTAACCA	338
	EBNA2-R	TGGAGTGTCTGACAGTTGTTCTG	
EBNA3C	EBNA3C-F	CGAGGACCCACCAGATTATG	308
	EBNA3C-R	AGGTCCGATTGAACATGGAA	
β -actin	β -actin-F	TTCTACAATGAGCTGCGTGT	636
	β -actin-R	GCCAGACAGCACTGTGTTGG	

用於即時定量聚合鍊連鎖反應之引子序列

目標	引子名稱	引子鹼基序列 (5'→3')	探針	產物長度 (nt)
DUSP1	DUSP1-F	CGAGGCCATTGACTTCATAGA	#86	96
	DUSP1-R	AGGCAGATGGTGGCTGAC		
DUSP2	DUSP2-F	GCCCACTGCCGTGTACTT	#66	115
	DUSP2-R	GCTGGTTTTGTCCCCTGTT		
DUSP6	DUSP6-F	CGACTGGAACGAGAATACGG	#66	112
	DUSP6-R	TTGGAACCTACTGAAGCCACCT		
DUSP8	DUSP8-F	GACCATTGCGGAGCTCAT	#71	78
	DUSP8-R	TCATAGACCACCACGTCCTGT		

西方墨點法所使用之抗體稀釋倍數

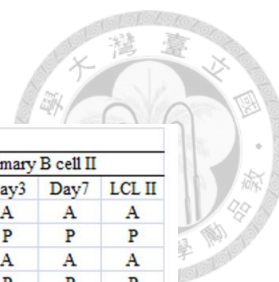
抗體名稱	稀釋倍數	Clone	catalog	廠商/文獻
Human anti-EBNA1 pAb	1/1000	NPC47	-	Patient serum
Mouse anti-LMP1 mAb	1/100	S12	-	(Chang et al., 2004)
Mouse anti-LMP1 mAb	1/1000	CS.1-4	M0897	DakoCytomation
Rabbit anti-LMP2A pAb	1/500	-	-	(Chen et al., 2002)
Mouse anti-Zta mAb	1/20	1B4	-	(Tsai et al., 1997)
Mouse anti-Rta mAb	1/50	467	-	(Hsu et al., 2005)
Mouse anti-Flag mAb	1/1000	M2	F3165	Sigma
Mouse anti-β-actin mAb	1/5000	AC-15	A5441	Sigma
Mouse anti-DUSP6 mAb	1/1000	-	Ab54940	Abcam
Mouse anti-DUSP8 mAb	1/100	B-9	sc-271250	Santa cruz
Rabbit anti-ERK 1 mAb	1/500	K-23	sc-94	Santa cruz
Mouse anti-p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	1/2000	E10	#9106	Cell signaling
Rabbit anti-JNK pAb	1/500	-	#9252	Cell signaling
Rabbit anti-p-JNK pAb (Thr183/Tyr185)	1/500	-	#9251	Cell signaling
Rabbit anti-p38 pAb	1/500	-	#9212	Cell signaling
Rabbit anti-p-p38 pAb (Thr180/Tyr182)	1/250	-	#9211	Cell signaling
Rabbit anti-Akt pAb	1/200	H-136	sc-8312	Santa cruz
Rabbit anti-p-Akt pAb (Ser473)	1/500	-	#9271	Cell signaling
pElk-1 (Ser383)	1/600	2B-1	#9186	Cell signaling

Elk-1	1/250	I-20	sc-355	Santa cluz
Caspase 3	1/250	-	#9662	Cell signaling
PARP-1	1/250	F-2	sc-8007	Santa cluz
Bcl-2	1/200	100	sc-509	Santa cluz
PUMA	1/500	-	#4976	Cell singaling
Myc	1/1	9E-10	-	(Evan et al., 1985)
HRP-conjugated	1/10000	-	-	Jackson
anti-mouse IgG Ab				
HRP-conjugated	1/5000	-	-	Jackson
anti-rabbit IgG Ab				

shRNA 目標基因序列

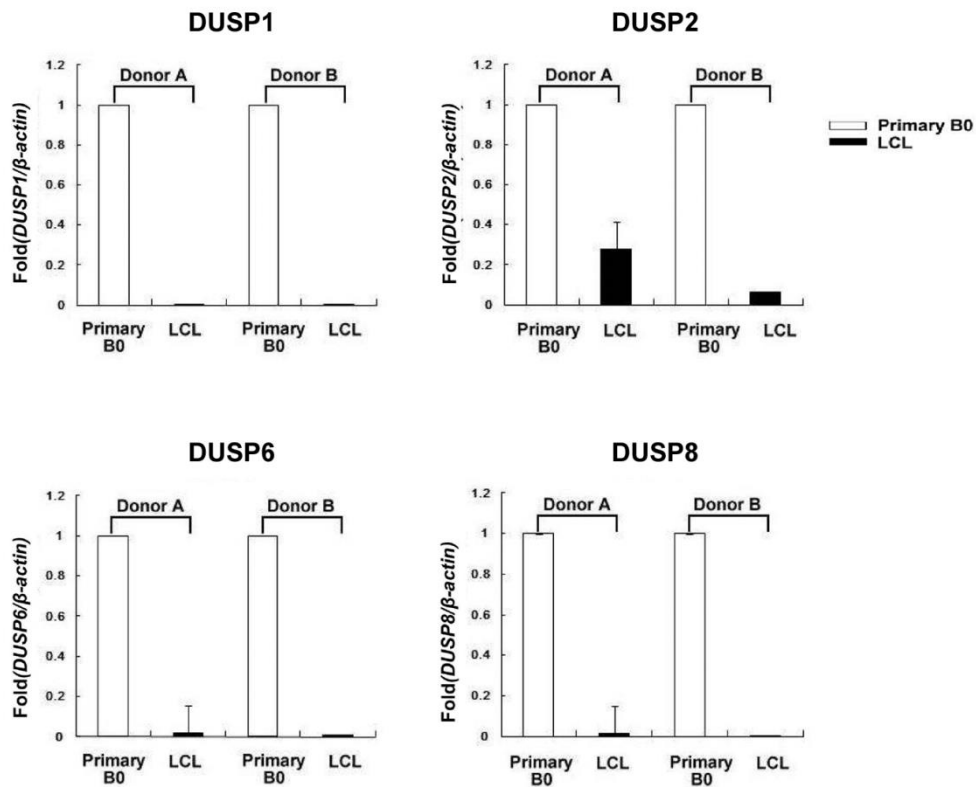
shRNA 名稱	Clone ID	目標序列
shElk1-1	TRCN0000237872	CCCTGCTTCCTACGCATACAT
shElk1-2	TRCN0000237873	GAGAGGGTTTGTGCCAGAAAC
shElk1-3	TRCN0000237874	GTGAGTAGAAGAGTTAGTTTG
shElk1-4	TRCN0000237875	CCAAGCTCTCCTTCCAGTTTC
shElk1-5	TRCN0000237876	TGAAATCGGAAGAGCTTAATG

附錄



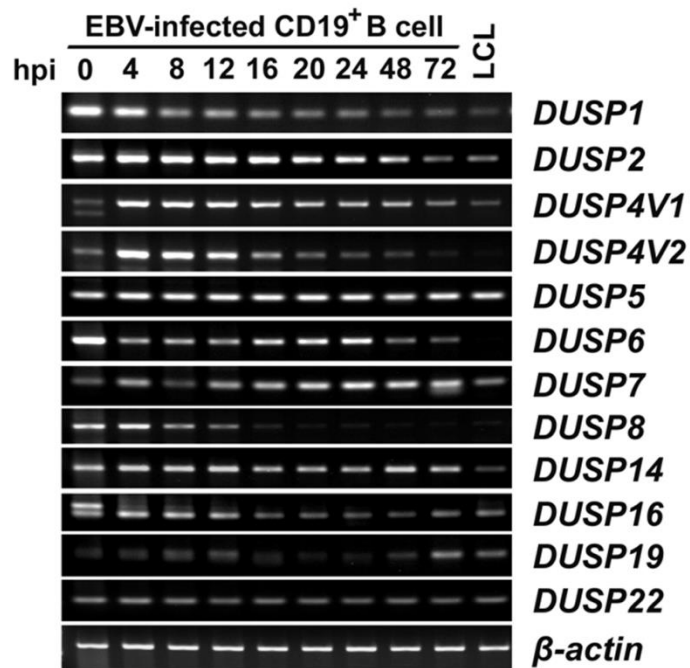
Gene Symbol	Relative Intensity						Status					
	Primary B cell I		Primary B cell II				Primary B cell I		Primary B cell II			
	B0	LCL I	B0	Day3	Day7	LCL II	B0	LCL I	B0	Day3	Day7	LCL II
DUSP1	1	0.09	1	0.02	0.01	0.00	P	A	P	A	A	A
DUSP1	1	0.08	1	0.01	0.01	0.01	P	P	P	P	P	P
DUSP1	1	1.68	1	0.47	0.60	0.60	A	A	A	A	A	A
DUSP2	1	9.40	1	0.85	2.11	4.27	P	P	P	P	P	P
DUSP3	1	2.37	1	0.95	1.80	1.76	P	P	A	P	P	P
DUSP3	1	15.00	1	2.02	6.41	5.20	A	P	A	P	P	P
DUSP3	1	36.59	1	4.14	3.35	4.81	A	P	A	P	P	P
DUSP4	1	0.97	1	1.56	2.83	2.81	P	P	A	P	P	P
DUSP4	1	11.71	1	1.21	2.22	5.87	P	P	P	P	P	P
DUSP5	1	3.29	1	0.84	1.90	1.19	P	P	P	P	P	P
DUSP6	1	0.34	1	0.21	0.21	0.03	P	A	P	P	P	A
DUSP6	1	0.37	1	0.07	0.02	0.03	A	A	A	A	A	A
DUSP6	1	0.04	1	0.13	0.17	0.00	P	A	P	A	P	A
DUSP7	1	10.60	1	1.27	1.90	0.34	A	A	A	A	A	A
DUSP7	1	15.29	1	9.88	11.72	7.64	A	P	A	P	P	P
DUSP8	1	0.08	1	0.12	0.17	0.15	P	P	P	P	P	P
DUSP8	1	0.10	1	0.04	0.35	0.16	P	A	P	A	A	A
DUSP9	1	0.31	1	0.32	0.62	0.59	A	A	A	A	A	A
DUSP10	1	1.18	1	1.41	1.25	1.21	P	P	P	P	P	P
DUSP10	1	0.59	1	0.91	0.87	0.64	P	P	P	P	P	P
DUSP11	1	1.85	1	2.65	1.23	0.97	P	P	P	P	P	P
DUSP12	1	0.76	1	0.77	0.62	0.67	P	P	P	P	P	P
DUSP13	1	1.28	1	0.46	0.98	0.17	M	A	A	A	P	A
DUSP14	1	3.18	1	3.43	2.02	2.84	M	P	A	P	P	P
DUSP15	1	1.31	1	0.77	0.60	1.01	A	A	A	M	A	A
DUSP16	1	0.03	1	0.06	0.10	0.07	P	A	P	P	P	P
DUSP16	1	0.01	1	0.13	0.05	0.11	P	A	P	A	A	A
DUSP16	1	0.15	1	0.20	0.16	0.17	P	P	P	P	P	A
DUSP16	1	1.86	1	0.21	0.56	0.94	A	P	A	A	A	A
DUSP16	1	4.50	1	0.30	0.05	0.35	A	A	A	A	A	A
DUSP16	1	9.56	1	2.37	2.84	7.40	A	P	A	A	A	P
DUSP16	1	1.76	1	0.90	1.16	0.77	A	A	A	A	A	A
DUSP16	1	12.83	1	18.94	38.71	81.37	A	P	A	P	P	P
DUSP18	1	0.60	1	0.72	0.49	0.55	P	P	P	P	P	P
DUSP18	1	2.02	1	2.16	1.75	3.83	A	A	A	A	A	A
DUSP19	1	22.18	1	7.27	5.54	1.46	A	P	A	A	A	A
DUSP19	1	1.65	1	0.68	0.74	0.80	A	P	A	A	A	P
DUSP19	1	63.73	1	8.50	5.96	17.81	A	P	A	A	P	P
DUSP21	1	0.88	1	2.27	0.47	2.08	A	A	A	A	A	A
DUSP22	1	2.79	1	0.93	1.57	1.50	P	P	P	P	P	P
DUSP22	1	2.95	1	0.91	1.92	1.75	P	P	P	P	P	P
DUSP23	1	2.08	1	2.58	2.46	0.80	A	A	A	P	A	A
DUSP26	1	3.95	1	0.06	0.89	0.39	A	A	A	A	A	A
DUSP27	1	0.59	1	0.04	0.65	0.13	A	A	A	A	A	A

附錄一、探查 EB 病毒感染 CD19⁺初級 B 細胞後 cDNA 微陣列分析 DUSPs 基因表現之變化情形 自捐贈者之白血球濃厚液利用 CD19⁺磁珠分離出 CD19⁺初級 B 細胞，以 B95.8 strain 之 EB 病毒感染初級 B 細胞，收取細胞於感染後第三天及第七天，以及感染後第二十八天不朽化 B 細胞而成之 LCLs。萃取其 RNA 進行 cDNA 微陣列分析，並將數據已 CD19⁺初級 B 細胞所得之相對數據為 1 進行量化。Primary B cell I 為混合自第一位至第五位捐贈者所純化出之 CD19⁺B 細胞。Primary B cell II 為混合第六位至第十位捐贈者所純化出之 CD19⁺B 細胞。此實驗由本實驗致蔡淑君學姊完成。表格內「P」代表 present、「A」為 absent、「M」為 marginal。



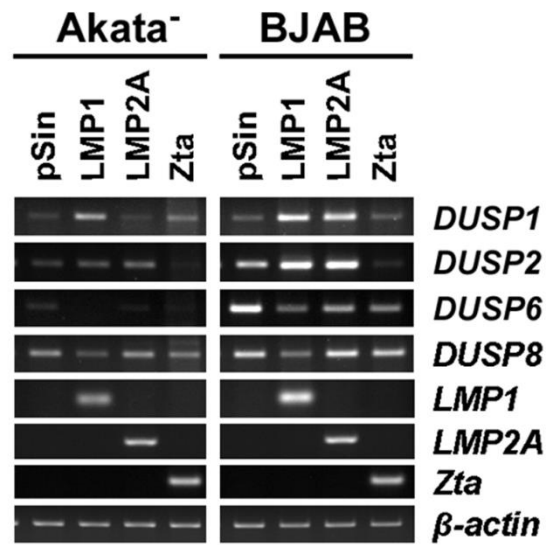
附錄二、探查 EB 病毒感染後 B 細胞內 DUSPs mRNA 表現量之影響

自兩位捐贈者(Donor A 與 Donor B)所得之白血球濃厚液，利用 CD19⁺磁珠純化出 CD19⁺初級 B 細胞(primary B0)，以 B95.8 strain EB 病毒感染細胞，於感染後二十八天收取 EB 病毒不朽化初級 B 細胞之 LCLs 細胞，萃取 RNA 進行 RT-Q-PCR，分析 DUSP1、DUSP2、DUSP6、DUSP8 mRNA 表現情形，並以β-actin 作為內控制組。將數據以 primary B0 所得之相對數據為 1 進行量化。此實驗由本實驗室董姿巡學姊完成。



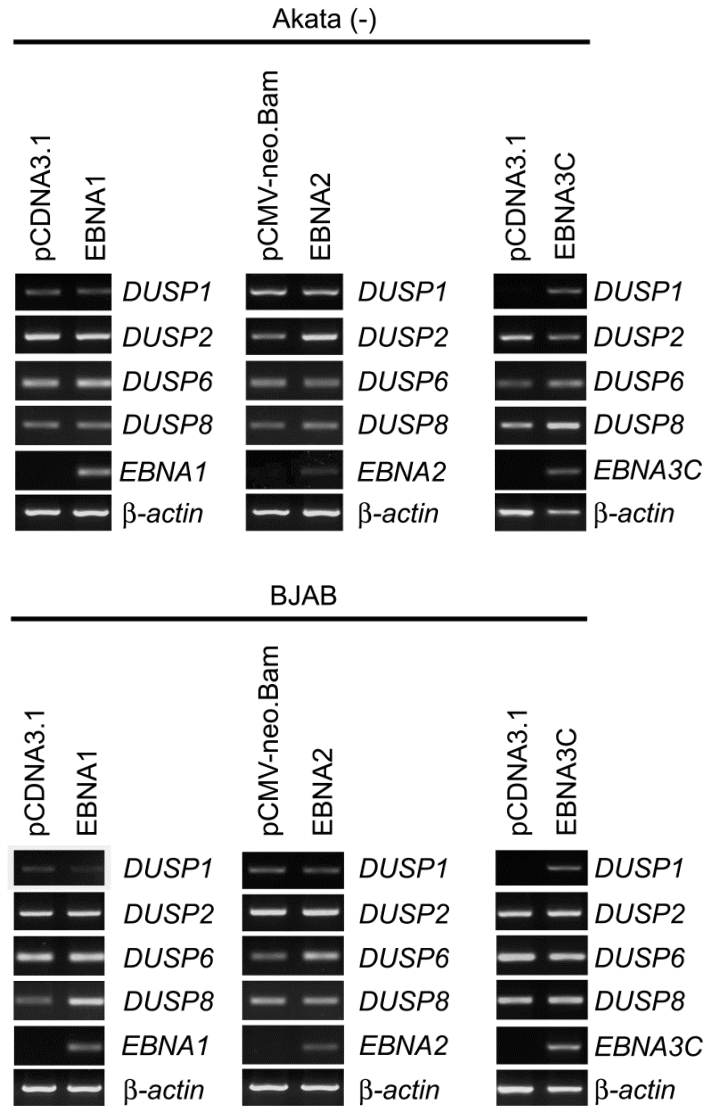
附錄三、探查 EB 病毒感染後於不同時間點 B 細胞內 DUSPs mRNA 表現量之影響

利用 CD19⁺磁珠純化白血球濃厚液中 CD19⁺初級 B 細胞，以 B95.8 strain EB 病毒感染細胞，收取感染後第 0、4、8、12、16、20、24、48、72 小時之細胞，以及 EB 病毒感染 28 天後使 B 細胞不朽化之 LCL 細胞，萃取 RNA 進行 RT-PCR，分析 DUSP1、DUSP2、DUSP4V1、DUSP4V2、DUSP5、DUSP6、DUSP7、DUSP8、DUSP14、DUSP16、DUSP19、DUSP22 之 mRNA 表現情形，並以 β -actin 作為內控制組。此實驗由本實驗之林君翰學長完成。



附錄四、探查 EB 病毒基因位於 B 細胞內 DUSPs mRNA 表現之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 Akata 或 BJAB 細胞，以帶有 pSIN、pSIN-LMP1、pSIN-LMP2A、pSIN-Zta 質體之慢病毒(MOI=1)感染 Akata 或 BJAB 細胞株，轉導 EB 病毒基因 LMP1、LMP2A、Zta，於感染五天後收取細胞萃取 RNA 進行 RT-PCR，分析 *DUSP1*、*DUSP2*、*DUSP6*、*DUSP8*、*LMP1*、*LMP2A*、*Zta* mRNA 表現情形。並以 β -actin 作為內控制組。此實驗由本實驗室林君翰學長完成。

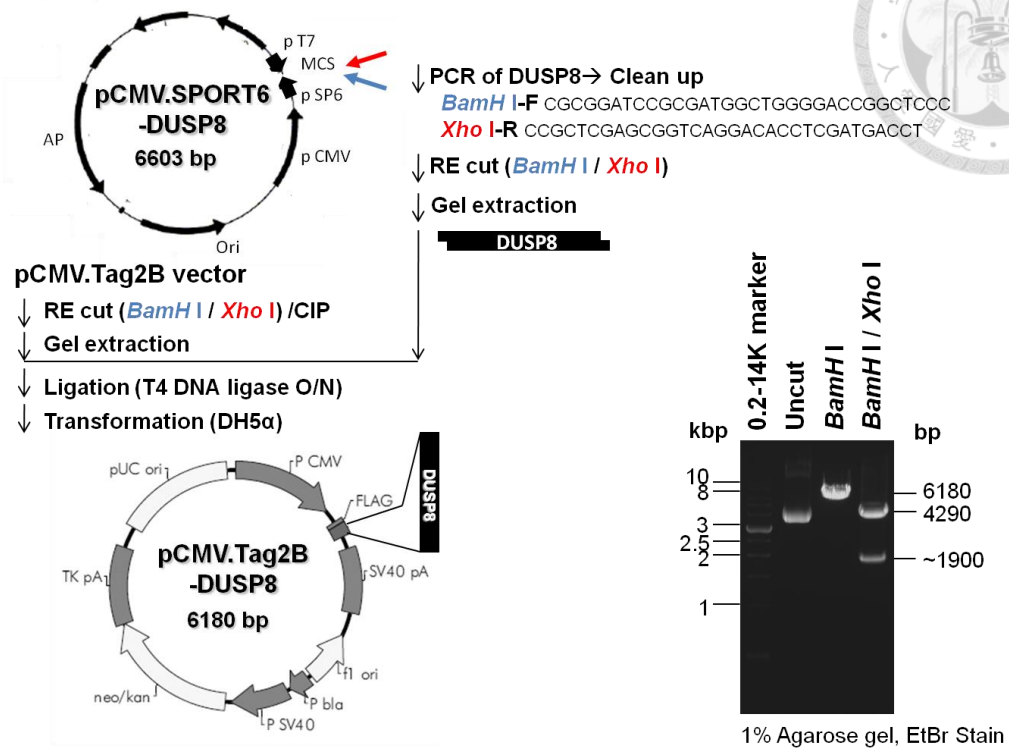


附錄五、探查 EB 病毒基因位於 B 細胞內 DUSPs mRNA 表現之影響

於六孔細胞培養盤中放置 1×10^6 /ml 之 Akata 或 BJAB 細胞，利用帶有 pCMV-neo.Bam、pCMV-neo.Bam-EBNA2、pCDNA3.1、pCDNA3.1-EBNA1、pCDNA3.1-EBNA3C 以電脈衝穿孔法(electroporation) 送入 Akata 或 BJAB 細胞株，轉導 EB 病毒基因 EBNA1、EBNA2、EBNA3C，以 20%FBS/RPMI 培養液培養 48 小時後，於 EBNA1 組別加入含有 200ug/ml hygromycin 之 10%FBS/RPMI 培養液；於 EBNA2、EBNA3C 組別加入含有 500ug/ml G418 之 10%FBS/RPMI 培養液進行篩選。篩選 48 小時後收取細胞萃取 RNA 進行 RT-PCR，分析 DUSP1、DUSP2、DUSP6、DUSP8、EBNA1、EBNA2、EBNA3C mRNA 表現情形。並以 β -actin 作為內控制組。本實驗之 cDNA 來自於陳奐勻學姊。



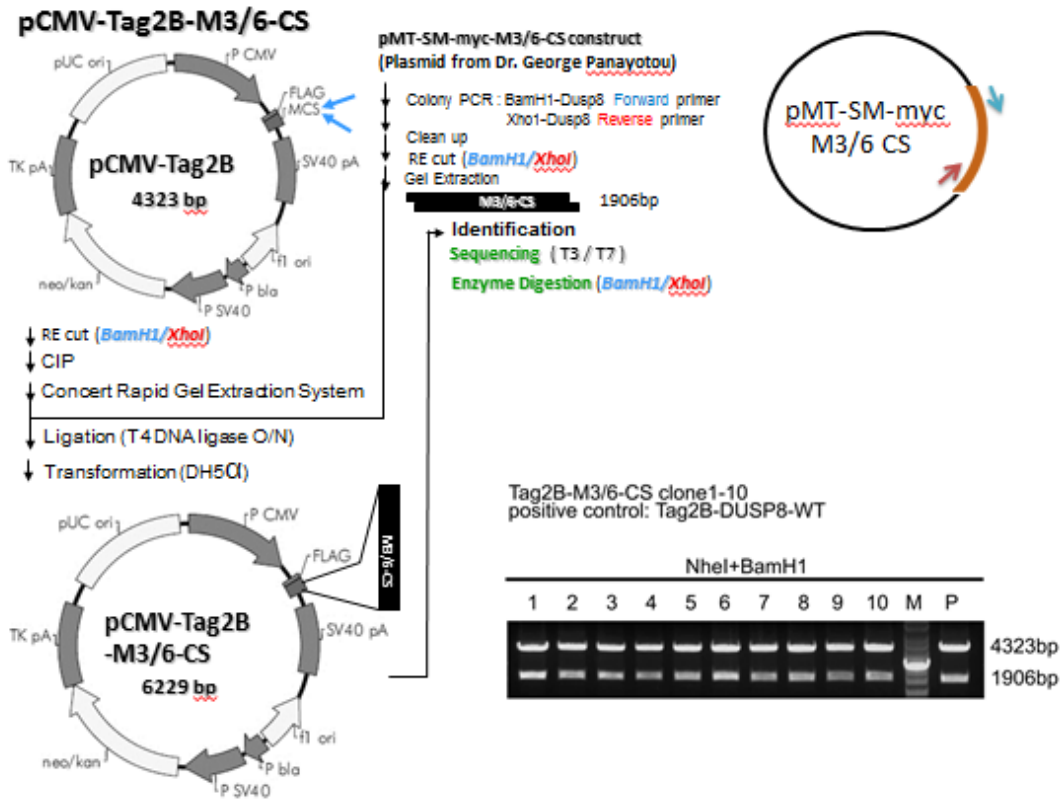
pCMV.Tag2B-DUSP8



附錄六、pCMV.Tag2B-DUSP8 表現質體

人類 DUSP8 基因位於人類基因體第十一對染色體 GRCh37.p5 (NCBI RefSeq : NC_000011.9)之 1575281 至 1593150 核苷酸序列。pCMV.Tag2B-DUSP8 為以 CMV 啟動子表現 N 端帶有 flag 標籤之人類 DUSP8 基因的表現質體。

pCMV-Tag2B-DUSP8-CS

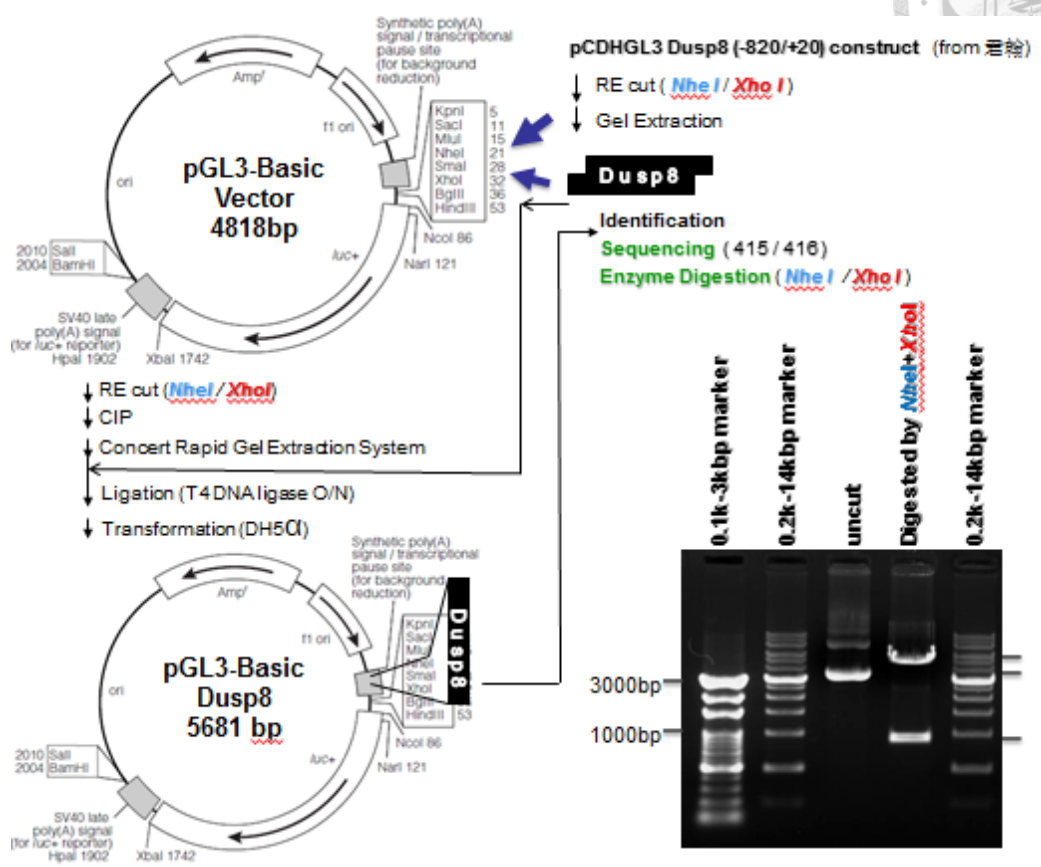


附錄七

人類 DUSP8 基因，又稱為 M3/6，位於人類基因體第十一對染色體 GRCh37.p5 (NCBI RefSeq : NC_000011.9) 之 1575281 至 1593150 核苷酸序列。pCMV.Tag2B-DUSP8-CS 為以 CMV 啟動子表現 N 端帶有 flag 標籤之具有催化區域突變之人類 DUSP8 之基因的表現載體，其 DUSP8 之催化區域第 246 位點由 cysteine 突變為 serine。



pGL3-DUSP8 promoter -820/+20



附錄八、pGL3-DUSP8 (-820/+20)啟動子報導質體

pGL3-DUSP8(-820/+20)為將人類 DUSP8 基因啟動子(-820/+20)嵌入 pGL3 之載體之構築方式。

參考文獻

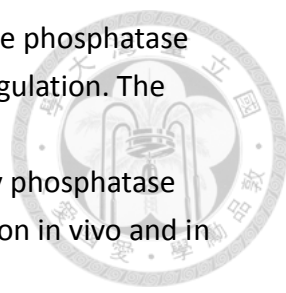
1. Adamson, A.L., Darr, D., Holley-Guthrie, E., Johnson, R.A., Mauser, A., Swenson, J., and Kenney, S. (2000). Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *Journal of virology* 74, 1224-1233.
2. Ahn, N.G., Seger, R., Bratlien, R.L., Diltz, C.D., Tonks, N.K., and Krebs, E.G. (1991). Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *The Journal of biological chemistry* 266, 4220-4227.
3. Anderson, L.J., and Longnecker, R. (2008). EBV LMP2A provides a surrogate pre-B cell receptor signal through constitutive activation of the ERK/MAPK pathway. *The Journal of general virology* 89, 1563-1568.
4. Arkell, R.S., Dickinson, R.J., Squires, M., Hayat, S., Keyse, S.M., and Cook, S.J. (2008). DUSP6/MKP-3 inactivates ERK1/2 but fails to bind and inactivate ERK5. *Cellular signalling* 20, 836-843.
5. Avruch, J. (2007). MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1150-1160.
6. Babcock, G.J., Decker, L.L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D.A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 9, 395-404.
7. Baik, S.Y., Yun, H.S., Lee, H.J., Lee, M.H., Jung, S.E., Kim, J.W., Jeon, J.P., Shin, Y.K., Rhee, H.S., Kimm, K.C., *et al.* (2007). Identification of stathmin 1 expression induced by Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Cell proliferation* 40, 268-281.
8. Bellon, S., Fitzgibbon, M.J., Fox, T., Hsiao, H.M., and Wilson, K.P. (1999). The structure of phosphorylated p38gamma is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation. *Structure* 7, 1057-1065.
9. Bermudez, O., Marchetti, S., Pages, G., and Gimond, C. (2008). Post-translational regulation of the ERK phosphatase DUSP6/MKP3 by the mTOR pathway. *Oncogene* 27, 3685-3691.
10. Bermudez, O., Pages, G., and Gimond, C. (2010). The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *American journal of physiology Cell physiology* 299, C189-202.
11. Borza, C.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nature medicine* 8, 594-599.
12. Boutros, T., Chevet, E., and Metrakos, P. (2008). Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and

- cancer. *Pharmacological reviews* 60, 261-310.
13. Brondello, J.M., Brunet, A., Pouyssegur, J., and McKenzie, F.R. (1997). The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *The Journal of biological chemistry* 272, 1368-1376.
14. Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., and Pouyssegur, J. (1999). Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *The EMBO journal* 18, 664-674.
15. Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90, 859-869.
16. Cejudo-Marin, R., Tarrega, C., Nunes-Xavier, C.E., and Pulido, R. (2012). Caspase-3 cleavage of DUSP6/MKP3 at the interdomain region generates active MKP3 fragments that regulate ERK1/2 subcellular localization and function. *Journal of molecular biology* 420, 128-138.
17. Chang, Y., Lee, H.H., Chang, S.S., Hsu, T.Y., Wang, P.W., Chang, Y.S., Takada, K., and Tsai, C.H. (2004). Induction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 by a lytic transactivator Rta. *Journal of virology* 78, 13028-13036.
18. Chang, Y., Lee, H.H., Chen, Y.T., Lu, J., Wu, S.Y., Chen, C.W., Takada, K., and Tsai, C.H. (2006). Induction of the early growth response 1 gene by Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta. *Journal of virology* 80, 7748-7755.
19. Chen, S.Y., Lu, J., Shih, Y.C., and Tsai, C.H. (2002). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A regulates c-Jun protein through extracellular signal-regulated kinase. *Journal of virology* 76, 9556-9561.
20. Chen, X., Liang, S., Zheng, W., Liao, Z., Shang, T., and Ma, W. (2008). Meta-analysis of nasopharyngeal carcinoma microarray data explores mechanism of EBV-regulated neoplastic transformation. *BMC genomics* 9, 322.
21. Chen, Y.R., Shrivastava, A., and Tan, T.H. (2001). Down-regulation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphatase M3/6 and activation of JNK by hydrogen peroxide and pyrrolidine dithiocarbamate. *Oncogene* 20, 367-374.
22. Cotsiki, M., Oehrl, W., Samiotaki, M., Theodosiou, A., and Panayotou, G. (2012). Phosphorylation of the M3/6 dual-specificity phosphatase enhances the activation of JNK by arsenite. *Cellular signalling* 24, 664-676.
23. Countryman, J., and Miller, G. (1985). Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 4085-4089.
24. Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38

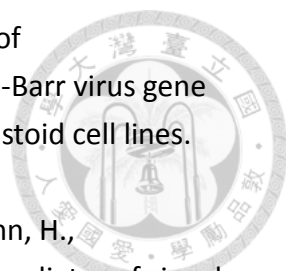
- MAPK signalling. *The Biochemical journal* 429, 403-417.
25. Dawson, C.W., Laverick, L., Morris, M.A., Tramoutanis, G., and Young, L.S. (2008). Epstein-Barr virus-encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *Journal of virology* 82, 3654-3664.
 26. Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290.
 27. Dickinson, R.J., and Keyse, S.M. (2006). Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *Journal of cell science* 119, 4607-4615.
 28. Ebell, M.H. (2004). Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *American family physician* 70, 1279-1287.
 29. Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W., and Young, L.S. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *The Journal of biological chemistry* 274, 16085-16096.
 30. Eliopoulos, A.G., and Young, L.S. (2001). LMP1 structure and signal transduction. *Seminars in cancer biology* 11, 435-444.
 31. Epstein, M.A., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1, 702-703.
 32. Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., and Bishop, J.M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Molecular and cellular biology* 5, 3610-3616.
 33. Farooq, A., and Zhou, M.M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cellular signalling* 16, 769-779.
 34. Fenton, M., and Sinclair, A.J. (1999). Divergent requirements for the MAPK(ERK) signal transduction pathway during initial virus infection of quiescent primary B cells and disruption of Epstein-Barr virus latency by phorbol esters. *Journal of virology* 73, 8913-8916.
 35. Fernandez-Medarde, A., and Santos, E. (2011). Ras in cancer and developmental diseases. *Genes & cancer* 2, 344-358.
 36. Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78, 1039-1049.
 37. Furukawa, T., Sunamura, M., Motoi, F., Matsuno, S., and Horii, A. (2003). Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. *The American journal of pathology* 162, 1807-1815.
 38. Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of

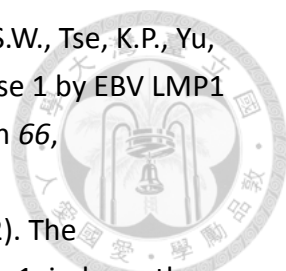
- Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *The EMBO journal* 16, 6131-6140.
39. Greenspan, J.S., Greenspan, D., Lennette, E.T., Abrams, D.I., Conant, M.A., Petersen, V., and Freese, U.K. (1985). Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *The New England journal of medicine* 313, 1564-1571.
40. Guan, K.L., Broyles, S.S., and Dixon, J.E. (1991). A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature* 350, 359-362.
41. Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* 55, 427-433.
42. Hardwick, J.M., Lieberman, P.M., and Hayward, S.D. (1988). A new Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of a cytoplasmic early antigen. *Journal of virology* 62, 2274-2284.
43. Hennessy, K., Fennewald, S., Hummel, M., Cole, T., and Kieff, E. (1984). A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 7207-7211.
44. Hsu, T.Y., Chang, Y., Wang, P.W., Liu, M.Y., Chen, M.R., Chen, J.Y., and Tsai, C.H. (2005). Reactivation of Epstein-Barr virus can be triggered by an Rta protein mutated at the nuclear localization signal. *The Journal of general virology* 86, 317-322.
45. Huang, C.Y., and Tan, T.H. (2012). DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell & bioscience* 2, 24.
46. Jeffrey, K.L., Camps, M., Rommel, C., and Mackay, C.R. (2007). Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature reviews Drug discovery* 6, 391-403.
47. Johansson, B., Klein, G., Henle, W., and Henle, G. (1970). Epstein-Barr virus (EBV)-associated antibody patterns in malignant lymphoma and leukemia. I. Hodgkin's disease. *International journal of cancer Journal international du cancer* 6, 450-462.
48. Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
49. Jones, J.F., Shurin, S., Abramowsky, C., Tubbs, R.R., Sciotto, C.G., Wahl, R., Sands, J., Gottman, D., Katz, B.Z., and Sklar, J. (1988). T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *The New England journal of medicine* 318, 733-741.
50. Joseph, A.M., Babcock, G.J., and Thorley-Lawson, D.A. (2000). Cells expressing the Epstein-Barr virus growth program are present in and restricted to the naive

- B-cell subset of healthy tonsils. *Journal of virology* 74, 9964-9971.
51. Jurek, A., Amagasaki, K., Gembarska, A., Heldin, C.H., and Lennartsson, J. (2009). Negative and positive regulation of MAPK phosphatase 3 controls platelet-derived growth factor-induced Erk activation. *The Journal of biological chemistry* 284, 4626-4634.
 52. Karlsson, M., Mathers, J., Dickinson, R.J., Mandl, M., and Keyse, S.M. (2004). Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. *The Journal of biological chemistry* 279, 41882-41891.
 53. Kennedy, N.J., and Davis, R.J. (2003). Role of JNK in tumor development. *Cell cycle* 2, 199-201.
 54. Kennedy, N.J., Sluss, H.K., Jones, S.N., Bar-Sagi, D., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2003). Suppression of Ras-stimulated transformation by the JNK signal transduction pathway. *Genes & development* 17, 629-637.
 55. Keuling, A.M., Andrew, S.E., and Tron, V.A. (2010). Inhibition of p38 MAPK enhances ABT-737-induced cell death in melanoma cell lines: novel regulation of PUMA. *Pigment cell & melanoma research* 23, 430-440.
 56. Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W., and Hammerschmidt, W. (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *The EMBO journal* 16, 6478-6485.
 57. Kinney, C.M., Chandrasekharan, U.M., Yang, L., Shen, J., Kinter, M., McDermott, M.S., and DiCorleto, P.E. (2009). Histone H3 as a novel substrate for MAP kinase phosphatase-1. *American journal of physiology Cell physiology* 296, C242-249.
 58. Klein, G., Giovanella, B., Westman, A., Stehlin, J.S., and Mumford, D. (1975). An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology* 5, 319-334.
 59. Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal* 351 Pt 2, 289-305.
 60. Kultz, D. (1998). Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *Journal of molecular evolution* 46, 571-588.
 61. Kwak, S.P., Hakes, D.J., Martell, K.J., and Dixon, J.E. (1994). Isolation and characterization of a human dual specificity protein-tyrosine phosphatase gene. *The Journal of biological chemistry* 269, 3596-3604.
 62. Lang, R., Hammer, M., and Mages, J. (2006). DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *J Immunol* 177, 7497-7504.

- 
63. Li, M., Zhou, J.Y., Ge, Y., Matherly, L.H., and Wu, G.S. (2003). The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. *The Journal of biological chemistry* 278, 41059-41068.
64. Liu, K., Lemon, B., and Traktman, P. (1995). The dual-specificity phosphatase encoded by vaccinia virus, VH1, is essential for viral transcription in vivo and in vitro. *Journal of virology* 69, 7823-7834.
65. Liu, Y., Shepherd, E.G., and Nelin, L.D. (2007). MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nature reviews Immunology* 7, 202-212.
66. Ma, J., Yu, X., Guo, L., and Lu, S.H. (2013). DUSP6, a tumor suppressor, is involved in differentiation and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology letters* 6, 1624-1630.
67. Macsween, K.F., and Crawford, D.H. (2003). Epstein-Barr virus-recent advances. *The Lancet infectious diseases* 3, 131-140.
68. Marchetti, S., Gimond, C., Chambard, J.C., Touboul, T., Roux, D., Pouyssegur, J., and Pages, G. (2005). Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Molecular and cellular biology* 25, 854-864.
69. Martell, K.J., Seasholtz, A.F., Kwak, S.P., Clemens, K.K., and Dixon, J.E. (1995). hVH-5: a protein tyrosine phosphatase abundant in brain that inactivates mitogen-activated protein kinase. *Journal of neurochemistry* 65, 1823-1833.
70. Menezes, J., Leibold, W., Klein, G., and Clements, G. (1975). Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBV)-negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV-genome-negative African Burkitt's lymphoma. *Biomedicine / [publiee pour l'AAICIG]* 22, 276-284.
71. Morrison, D.J., Kim, M.K., Berkofsky-Fessler, W., and Licht, J.D. (2008). WT1 induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 represents a novel mechanism of growth suppression. *Molecular cancer research : MCR* 6, 1225-1231.
72. Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389-399.
73. Nemerow, G.R., Mold, C., Schwend, V.K., Tollefson, V., and Cooper, N.R. (1987). Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *Journal of virology* 61, 1416-1420.
74. Nishina, H., Wada, T., and Katada, T. (2004). Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *Journal of biochemistry* 136, 123-126.
75. Noguchi, T., Metz, R., Chen, L., Mattei, M.G., Carrasco, D., and Bravo, R. (1993).

- Structure, mapping, and expression of *erp*, a growth factor-inducible gene encoding a nontransmembrane protein tyrosine phosphatase, and effect of ERP on cell growth. *Molecular and cellular biology* 13, 5195-5205.
76. Oehrl, W., Cotsiki, M., and Panayotou, G. (2013). Differential regulation of M3/6 (DUSP8) signaling complexes in response to arsenite-induced oxidative stress. *Cellular signalling* 25, 429-438.
77. Palacios, C., Collins, M.K., and Perkins, G.R. (2001). The JNK phosphatase M3/6 is inhibited by protein-damaging stress. *Current biology : CB* 11, 1439-1443.
78. Pallesen, G., Hamilton-Dutoit, S.J., Rowe, M., and Young, L.S. (1991). Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *Lancet* 337, 320-322.
79. Patterson, K.I., Brummer, T., O'Brien, P.M., and Daly, R.J. (2009). Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *The Biochemical journal* 418, 475-489.
80. Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J., and Sturgill, T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *The EMBO journal* 10, 885-892.
81. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22, 153-183.
82. Pope, J.H., Horne, M.K., and Scott, W. (1968). Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *International journal of cancer Journal international du cancer* 3, 857-866.
83. Qin, Z., Dai, L., Defee, M., Findlay, V.J., Watson, D.K., Toole, B.P., Cameron, J., Peruzzi, F., Kirkwood, K., and Parsons, C. (2013). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus suppression of DUSP1 facilitates cellular pathogenesis following de novo infection. *Journal of virology* 87, 621-635.
84. Robbins, D.J., Zhen, E., Owaki, H., Vanderbilt, C.A., Ebert, D., Geppert, T.D., and Cobb, M.H. (1993). Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *The Journal of biological chemistry* 268, 5097-5106.
85. Ryser, S., Massiha, A., Piuze, I., and Schlegel, W. (2004). Stimulated initiation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) gene transcription involves the synergistic action of multiple cis-acting elements in the proximal promoter. *The Biochemical journal* 378, 473-484.
86. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).

- 
87. Satoh, T., Fukuda, M., and Sairenji, T. (2002). Distinct patterns of mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Epstein-Barr virus gene expression in Burkitt's lymphoma cell lines versus B lymphoblastoid cell lines. *Virus genes* 25, 15-21.
88. Schultheiss, U., Puschner, S., Kremmer, E., Mak, T.W., Engelmann, H., Hammerschmidt, W., and Kieser, A. (2001). TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *The EMBO journal* 20, 5678-5691.
89. Schuster, V., and Kreth, H.W. (1992). Epstein-Barr virus infection and associated diseases in children. I. Pathogenesis, epidemiology and clinical aspects. *European journal of pediatrics* 151, 718-725.
90. Shen, W.H., Wang, J., Wu, J., Zhurkin, V.B., and Yin, Y. (2006). Mitogen-activated protein kinase phosphatase 2: a novel transcription target of p53 in apoptosis. *Cancer research* 66, 6033-6039.
91. Shimizu, N., Tanabe-Tochikura, A., Kuroiwa, Y., and Takada, K. (1994). Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *Journal of virology* 68, 6069-6073.
92. Siouda, M., Frecha, C., Accardi, R., Yue, J., Cuenin, C., Gruffat, H., Manet, E., Herceg, Z., Sylla, B.S., and Tommasino, M. (2014). Epstein-Barr virus down-regulates tumor suppressor DOK1 expression. *PLoS pathogens* 10, e1004125.
93. Sixbey, J.W., Vesterinen, E.H., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Walton, L.A., and Pagano, J.S. (1983). Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature* 306, 480-483.
94. Theodosiou, A., and Ashworth, A. (2002). Differential effects of stress stimuli on a JNK-inactivating phosphatase. *Oncogene* 21, 2387-2397.
95. Theodosiou, A.M., Rodrigues, N.R., Nesbit, M.A., Ambrose, H.J., Paterson, H., McLellan-Arnold, E., Boyd, Y., Leversha, M.A., Owen, N., Blake, D.J., *et al.* (1996). A member of the MAP kinase phosphatase gene family in mouse containing a complex trinucleotide repeat in the coding region. *Human molecular genetics* 5, 675-684.
96. Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870-874.
97. Tsai, C.H., Liu, M.T., Chen, M.R., Lu, J., Yang, H.L., Chen, J.Y., and Yang, C.S. (1997). Characterization of Monoclonal Antibodies to the Zta and DNase Proteins of Epstein-Barr Virus. *Journal of biomedical science* 4, 69-77.

- 
98. Tsai, C.L., Li, H.P., Lu, Y.J., Hsueh, C., Liang, Y., Chen, C.L., Tsao, S.W., Tse, K.P., Yu, J.S., and Chang, Y.S. (2006). Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV LMP1 Involves c-Jun NH(2)-terminal kinase signaling. *Cancer research* *66*, 11668-11676.
99. Tsai, C.N., Tsai, C.L., Tse, K.P., Chang, H.Y., and Chang, Y.S. (2002). The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 10084-10089.
100. Tsao, S.W., Tramoutanis, G., Dawson, C.W., Lo, A.K., and Huang, D.P. (2002). The significance of LMP1 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Seminars in cancer biology* *12*, 473-487.
101. Ueda, K., Arakawa, H., and Nakamura, Y. (2003). Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. *Oncogene* *22*, 5586-5591.
102. van Huijsduijnen, R.H., Guy, R.K., Chibale, K., Haynes, R.K., Peitz, I., Kelter, G., Phillips, M.A., Vennerstrom, J.L., Yuthavong, Y., and Wells, T.N. (2013). Anticancer properties of distinct antimalarial drug classes. *PloS one* *8*, e82962.
103. Weston, C.R., and Davis, R.J. (2002). The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in genetics & development* *12*, 14-21.
104. Wishart, M.J., and Dixon, J.E. (1998). Gathering STYX: phosphatase-like form predicts functions for unique protein-interaction domains. *Trends in biochemical sciences* *23*, 301-306.
105. Wong, V.C., Chen, H., Ko, J.M., Chan, K.W., Chan, Y.P., Law, S., Chua, D., Kwong, D.L., Lung, H.L., Srivastava, G., *et al.* (2012). Tumor suppressor dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6) impairs cell invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-associated phenotype. *International journal of cancer Journal international du cancer* *130*, 83-95.
106. Yao, Q.Y., Rickinson, A.B., and Epstein, M.A. (1985). A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *International journal of cancer Journal international du cancer* *35*, 35-42.
107. Yates, J.L., Warren, N., and Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* *313*, 812-815.
108. Yi, H., Morton, C.C., Weremowicz, S., McBride, O.W., and Kelly, K. (1995). Genomic organization and chromosomal localization of the DUSP2 gene, encoding a MAP kinase phosphatase, to human 2p11.2-q11. *Genomics* *28*, 92-96.
109. Yin, Y., Liu, Y.X., Jin, Y.J., Hall, E.J., and Barrett, J.C. (2003). PAC1 phosphatase is a

transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression.

Nature 422, 527-531.

110. Young, L.S., and Rickinson, A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. Nature reviews Cancer 4, 757-768.
111. Zarubin, T., and Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell research 15, 11-18.
112. Zhang, T., Choy, M., Jo, M., and Roberson, M.S. (2001). Structural organization of the rat mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 gene. Gene 273, 71-79.
113. Zhang, Z., Kobayashi, S., Borczuk, A.C., Leidner, R.S., Laframboise, T., Levine, A.D., and Halmos, B. (2010). Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) is an ETS-regulated negative feedback mediator of oncogenic ERK signaling in lung cancer cells. Carcinogenesis 31, 577-586.
114. Zhou, G., Bao, Z.Q., and Dixon, J.E. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. The Journal of biological chemistry 270, 12665-12669.
115. Zhu, Q.Y., Liu, Q., Chen, J.X., Lan, K., and Ge, B.X. (2010). MicroRNA-101 targets MAPK phosphatase-1 to regulate the activation of MAPKs in macrophages. J Immunol 185, 7435-7442.
116. Ziegler, J.L., Drew, W.L., Miner, R.C., Mintz, L., Rosenbaum, E., Gershow, J., Lennette, E.T., Greenspan, J., Shillitoe, E., Beckstead, J., *et al.* (1982). Outbreak of Burkitt's-like lymphoma in homosexual men. Lancet 2, 631-633.
117. zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., and Santesson, L. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. Nature 228, 1056-1058.