

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

探討 BFRF1 與 ESCRT 模組在 EB 病毒出核時所扮演的角色與機制

The role of BFRF1 and cellular ESCRT components in regulating the nuclear egress of Epstein-Barr virus

莊詒捷

Yi-Jie Juang

指導教授：陳美如 博士

Advisor: Mei-Ru Chen, Ph.D.

中華民國 105 年 7 月

July, 2016

國立臺灣大學（碩）博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：探討 BFRF1 與 ESCRT 模組在 EB 病毒出核時所扮演的角色與機制

英文題目：The role of BFRF1 and cellular ESCRT components in regulating the nuclear egress of Epstein-Barr virus

本論文係莊詒捷君（學號 r03445108）在國立臺灣大學微生物學所完成之碩（博）士學位論文，於民國 105 年 7 月 14 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

陳美如 (簽名)
(指導教授)

林孝芳

劉雅雯

李重霽

系主任、所長

鄭述諤

(簽名)

致謝


還記得兩年前初次踏入台北這個陌生城市時，帶著行李箱，俗裡俗氣的進到 EBV 這個大家庭。很感謝美如老師願意包容我的實驗精神，屢次嘗試錯誤享受實驗結果的酸甜苦辣，讓我自己嘗試做出最好的魚桿，而不是讓我平白無故地得到美味可口的魚，也像媽媽一樣叮囑我們要多出外踏青，享受生活保持健康。亦感謝我的口試委員：林素芳老師、劉雅雯老師、李重霽老師，給予我許多寶貴建議，當我實驗滯礙難前時，一路替我披荊斬棘，因為有各位老師的協助與愛護，才能使我的碩班研究多采多姿。

感謝美慈學姊，擁有溫柔的外表、強悍的心臟，總是能很有耐心的教導實驗室的每個大朋友小朋友，替我們處理各種雜事、心事，忍受詭譎偶爾的人來瘋，大呼小叫地耍猴戲，還要幫我們發聲出氣抵擋討人厭的壞朋友。感謝權杭學長，一直對我發出甜食攻擊，彌補小小脆弱心靈，也謝謝你常在我們得意忘形之際，給一記當頭棒喝讓我能迅速振作。美慈姐和權杭兄如同 R720 的慈母嚴父，照顧我們一家子平安順利的長大。

感謝薺萱和亭瑋美女陪伴我的實驗室生活，兩年內有你們的陪伴，一起哭一起笑一起追韓劇，跟著我一起當肖婆，一起和 105 屆同學製造許多美好回憶，走過宜蘭、花蓮、台東、東北角、林口、基隆，一起認真玩認真做實驗。感謝唯逸、晏慈、宜君，雖然你們很雷一直挨我罵，不過貼心如你們，總是在我準備報告煩躁之際，偷偷塞小紙條給我加油打氣，幫我們團購許多美食，也製造了很多笑話，期待三位小女警，有機會透過繪本的方式記錄研究生的生活，再分我一點版稅。

到 24 歲的這年，一路成長有許多人的幫助，亦有許多無名人士默默地在照顧著我們，如無名男子提供我恰好缺少的一塊錢，每天溫暖道早安的公車司機，幫助微生物所環境整潔的秀娟阿姨，解決疑難雜症的助教們，半夜跟我講醫學院電梯鬼故事的警衛，各家廠商銷售專員，還有我記不得名字但曾經幫助過我的各家實驗室學長姊，謝謝各位溫暖的台灣人，有你們世界變得更美好。

摘要

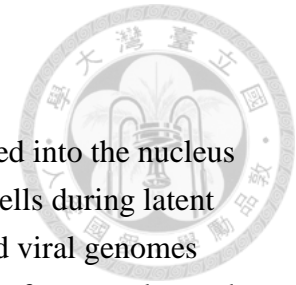


當 EB 病毒進入宿主細胞後，其線型 DNA 會進到細胞核內成為環型結構，當病毒於細胞內呈潛伏期時，其 DNA 會隨著細胞週期進行複製。當病毒進入溶裂期複製，病毒 DNA 在核內完成複製與殼體組裝後成為核殼體，會藉由出核複合體 BFRF1/BFLF2 促進核殼體由細胞核穿越核膜並釋出至細胞質。實驗室先前證明 BFRF1 會透過 Alix 吸引 ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) 膜剪切模組幫助 BFRF1 產生核膜衍生液泡 (nuclear envelope-derived vesicle) 以加速核殼體出核。由於 ESCRT 系統是由三十多個成員串連而執行功能，已知參與細胞內膜的剪接運輸及多種病毒的成熟過程。對於 ESCRT 如何參與核膜結構的改變仍只有少數研究報導，因此在本論文中首先探討 BFRF1 如何利用其不同功能區域吸引 Alix 並將核膜塑形產生核膜衍生液泡。同時利用不同 ESCRT 成員的 shRNA 使其表現量下降，以探討那些 ESCRT 膜剪切蛋白成員會參與在 EB 病毒核殼體出核的過程。為了之後得到大量的 BFRF1 蛋白質以建構抗體，本論文也嘗試建立大腸菌產生的重組 BFRF1 蛋白質表現系統。本論文之結果發現 (I) 在共免疫沉澱試驗中發現 BFRF1 會分別利用 LD1 (8-65 a.a) 與 ESR (180-313 a.a) 和 Alix 的 Bro (1-358 a.a) 及 PRR (703-868 a.a) 功能區域結合。當 BFRF1 這兩個區域的刪除或是點突變會影響到細胞內 Alix 的分布及 BFRF1 產生核膜衍生液泡的能力。(II) 同時也利用含有 EB 病毒的鼻咽癌上皮細胞 NA 觀察，以 shRNA 病毒使 ESCRT 表現量下降時，會影響釋出細胞的病毒數量。(III) 利用大腸桿菌表現大量重組 BFRF1 蛋白，可用於生產高專一性的抗體，以探討 BFRF1 在 EB 病毒核殼體出核過程的路徑與機制。這些發現將有助於了解 BFRF1 在調控核膜塑形上的分子機制。

關鍵字：

EB 病毒、BFRF1、核膜衍生液泡、出核過程、Alix、ESCRT

Abstract



Upon its entrance into the cell, the linear EBV genome is injected into the nucleus and becomes circular episomes, which can be maintained in these cells during latent infection. When virus is induced into lytic replication, the replicated viral genomes are packaged into procapsids to form nucleocapsids in the nucleus before translocated into the cytoplasm for subsequent maturation process. The nuclear egress complex (NEC) composed of BFRF1 and BFLF2 can facilitate the budding of nucleocapsids across the nuclear envelope (NE). Previously, our laboratory demonstrated that BFRF1 interacts with Alix to recruit ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) machinery to induce nuclear envelope-derived vesicles for promoting nuclear egress. ESCRT machinery is composed of at least 30 proteins to mediate membrane scission and cytoplasmic budding of various virus. How the ESCRT system is involved in modulating nuclear envelope structure is just emerging. Therefore, in the first part of this study, we intend to define how the viral membrane protein BFRF1 recruits Alix and the functional domains required for nuclear envelope-derived vesicle formation. Secondly, a shRNA approach is used to knockdown individual ESCRT components to examine the participation of different ESCRT components in EBV nuclear egress or mature virion secretion. Bacterially expressed recombinant BFRF1 protein expression system was used to obtain purified BFRF1 for generating antibody. Three different aspects of BFRF1 is achieved in this study. (I) Co-immunoprecipitation results showed that LD1 (8-65 a.a) and ESR (180-313 a.a) domains of BFRF1 interacted with Alix Bro (1-358 a.a) and PRR (703-868 a.a), respectively. Site-directed mutagenesis of LD1 or ESR in BFRF1 reduced BFRF1 induced vesicle formation and affected cellular Alix subcellular distribution. (II) shRNA targeting various ESCRT components were used in EBV positive epithelial cells NA, the preliminary data indicate that knockdown of ESCRT components does affect virion release but not viral DNA replication. (III) A bacterially recombinant BFRF1 protein was expressed and purified for generating highly specific antibody to study the intracellular trafficking of BFRF1 during EBV nuclear egress process. Overall, this study will help to reveal the molecular mechanisms of BFRF1-mediated budding and scission of EBV nuclear egress vesicles.

Keywords:

Epstein-Barr virus (EBV) 、 BFRF1 、 nuclear envelope-derived vesicles 、 nuclear egress 、 Alix 、 ESCRT machinery

目錄



1. 序論	1
1.1 EB 病毒(Epstein-Barr virus).....	1
1.1.1 EB 病毒與疾病.....	1
1.1.2 EB 病毒基因體與結構.....	1
1.1.3 EB 病毒生活史.....	2
1.2 疱疹病毒顆粒出核過程(nuclear egress).....	5
1.2.1 核膜結構.....	5
1.2.2 疱疹病毒利用蛋白質激酶促使 nuclear lamina 結構鬆散，促使核殼體出核.....	6
1.2.3 初次套膜化(primary envelopment).....	6
1.2.4 去套膜化 (de-envelopment).....	7
1.2.5 二次套膜化 (secondary envelopment or re-envelopment).....	7
1.3 BFRF1 及其同源蛋白質.....	8
1.3.1 BFRF1 在 α 型疱疹病毒的同源蛋白質 (UL34).....	8
1.3.2 BFRF1 蛋白質在 EB 病毒中的發現與功能.....	8
1.4 BFRF1 衍生液泡結構可能與 ESCRT 膜剪切機制相關.....	10
1.4.1 ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport).....	10
1.4.2 BFRF1 和 Alix 的結合並與核膜產生衍生液泡.....	11
1.5 研究目的.....	11
2. 實驗材料與方法	13
2.1 建構質體.....	13
2.1.1 本論文建構之質體.....	13
2.1.2 其他質體.....	14
2.3 引子序列.....	16
2.4 細胞培養.....	16
2.5 細胞轉染.....	16
2.6 正二十丙烷硫酸鈉-聚丙烯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 及西方墨點法(Western Blot).....	17
2.7 共同免疫沉澱(co-immunoprecipitation).....	17
2.8 間接免疫螢光染色(indirect immunofluorescence assay).....	18
2.9 表現及純化 BFRF1 蛋白質.....	19
2.10 慢病毒製備 (Lentivirus packaging).....	21
2.11 慢病毒感染 (Lentivirus infection).....	21
2.12 細胞內 EBV 病毒核酸萃取.....	21
2.13 細胞外 EBV 病毒核酸萃取.....	22

2.14	即時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative polymerase chain reaction)	23
3.	實驗結果	24
3.1	BFRF1 的 ESR 功能區正電胺基酸，對於 BFRF1 和 Alix PRR 功能區的結合是重要的	24
3.2	HA-BFRF1 mutants 使衍生液泡減少並且改變內生性 Alix 於細胞內的分布位置	25
3.3	HA-BFRF1 mutants 減弱核膜塑形能力使核膜衍生液泡減少	25
3.4	以免疫沉澱法偵測 BFRF1 mutants 與 Alix 蛋白結合能力無明顯差異	26
3.5	pLenti4-GFP-BFRF1 短暫的轉染與篩選為誘導穩定細胞株後的表現形態不同	27
3.6	Knockdown Chmp4B 和 Vps4A 促進 EBV 病毒釋出	28
3.7	Knockdown ESCRT-III (Chmp4A/Chmp4B/Chmp4C/Chmp6/Chmp7) 對促進 EBV 病毒的釋出	28
3.8	Knockdown ESCRT-III (Vps4A/Chmp1B/Chmp2B/Chmp3) 對於 EBV 病毒複製與釋出的影響	29
3.9	建立細菌表現重組蛋白 His-BFRF1 及以變性環境的純化系統	30
4.	討論	32
4.1	HA-BFRF1 mutants 使衍生液泡減少的可能原因	32
4.2	透過其他蛋白-蛋白結合試驗偵測 BFRF1 mutants 與 Alix 蛋白結合能力	32
4.3	pLenti4-GFP-BFRF1 轉染初期與篩選為誘導穩定細胞株後的表現形態不同的原因	33
4.4	NA 細胞以 Rta 質體轉染誘導進入融裂期，因誘導時間不同而使 extracellular EBV copy number 有所差異	33
4.5	ESCRT-III 蛋白對於調控 EB 病毒殼體釋出的意義	33
4.6	總結	34
Figure.....	36
圖一、	當 BFRF1 的 ESR 功能區正電胺基酸突變時，會影響 BFRF1 和 Alix PRR 功能區的結合能力	36
圖二、	細胞內生性 Alix 與 HA-BFRF1 mutants 之分布情形	37
圖三、	細胞內生性 Emerin 與 HA-BFRF1 mutants 之分布情形	38
圖四、	以免疫沉澱法偵測 BFRF1 mutants 與 Alix 蛋白結合能力	39
圖五、	BFRF1 inducible plasmid 轉染至 T-REx HeLa 細胞，與藥物篩選後穩定細胞株的表現型態差異	40
圖六、	當 knockdown Chmp4B 和 Vps4A 對於 EBV 病毒複製與釋出的影響	41
圖七、	當 knockdown Chmp4A、Chmp4B、Chmp4C、Chmp6 和 Chmp7 對於 EBV 病毒複製與釋出的影響	42
圖八、	當 knockdown Vps4A、Chmp1B、Chmp2B 和 Chmp3 對於 EBV 病毒複製與釋出的影響	43
圖九、	於 E. coli BL21 中可表現 His-BFRF1 蛋白，以尿素變性環境下純化 His-BFRF1 蛋白	

.....	44
Table	45
表一、RNAi core 盤式病毒詳細資訊	45
表二、ESCRT-III 利用 siRNA 使表現量下降或以 dominant negative ESCRT-III 使功能異常 時對各類病毒釋出量的影響	46
表三、ESCRT-III 利用 siRNA 使表現量下降時對細胞功能有影響的功能異常時對各類病毒釋 出量的影響	47
5. 附錄	48
附錄一、人類單純皰疹病毒 HSV 進行出核的假說模型圖	48
附錄二、ESCRT 模組中個別蛋白的結合方式與組成示意圖	49
附錄三、HA-BFRF1 WT 及 deletion mutants 和 Alix 三個功能區的結合能力	50
附錄四、BFRF1 與 Alix PRR 功能區結合需要仰賴 nucleic acid	51
6. 參考文獻	52





1. 序論

1.1 EB病毒(Epstein-Barr virus)

1.1.1 EB病毒與疾病

EB病毒屬於 Herpesviridae 疱疹病毒科中 Gamma-herpesvirinae 次病毒科，lymphocryptovirus 病毒屬，又稱人類疱疹病毒第四型 (HHV-4) (for a review, (McGeoch, et al. 2006))。1958年英國外科醫師 Denis Burkitt 在非洲發現一種好發於小孩頭頸部的淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma) (Burkitt 1958)。在1964年由Epstein、Achong、Barr等人在Burkitt's淋巴瘤培養分離的細胞中以電子顯微鏡發現EB病毒顆粒 (Epstein, et al. 1964)，故以該等人命名為 Epstein-Barr virus，同時也是第一個被發現與人類腫瘤相關的病毒。人類是這種病毒的主要天然宿主，盛行率高，全世界有高達百分之九十以上的人類被感染，大部分無明顯症狀。因為病毒可以透過唾液傳染，特稱為親吻病 (kissing disease)。大部分的人類早在幼兒時期即被感染，在幼兒期被感染者無症狀者居多(Biggar, et al. 1978)，倘若是在青少年時期感染患者易引發傳染性單核球增多症 (infectious mononucleosis) (Henle, et al. 1968)，被感染後終其一生EB病毒都會潛伏於體內 (W. S. Tsai, et al. 1989)。此外，EB病毒也被認為與許多人類惡性腫瘤形成具有高度相關性，包含鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma) (Old, et al. 1966)、巴氏淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤 (Hodgkin's lymphoma) (Weiss, et al. 1989)、T細胞淋巴瘤 (T cell lymphoma) (Jones, et al. 1988)以及胃癌 (gastric carcinoma) (Burke, et al. 1990)。

1.1.2 EB病毒基因體與結構

EB病毒顆粒直徑約為130-150 nm，由外而內的結構為外套膜-披膜蛋白質-病毒殼體-病毒核酸。外套膜 (envelope) 來自宿主細胞核膜的磷脂質雙層外套膜，帶有醣蛋白突起 (glycoprotein spike)。介於套膜與殼體之

間存在許多披膜蛋白質 (tegument protein)，病毒殼體則由162個次蛋白衣 (capsomer) 所組成，包裹著病毒核酸 (for a review, (Longnecker 2013))。

EB病毒基因體約為172 kbp雙股 DNA，GC含量比高達60%，在病毒殼體內呈現線狀結構。感染宿主後潛伏於宿主細胞中則呈現環狀的游離質體狀態 (episomal form)，是透過基因組中特殊的兩端的尾端重複序列 terminal repeats，(TR) 連接形成環狀 (Kuppers 2003)，會表現出大約100多種病毒蛋白質。

於1984年，Baer 等人利用 B95-8 細胞所產生的病毒株揭示限制酶圖譜，他們利用 BamHI 限制酶將 DNA 片段大小按英文字母大寫 A-Z 排列，更小的片段則英文字母小寫 a-f 命名(Baer, et al. 1984)，在利用開放閱讀架的轉錄方向和順序編列數字，以此標準制訂出EB病毒基因名，以BFRF1 為例，即表示病毒基因體經 BamHI 限制酶切割後(B)，片段大小為第六片段(F)，右向(R)第一段(1)開放閱讀架，已知EB病毒約有85開放閱讀架 (open reading frame，ORF)。

1.1.3 EB病毒生活史

目前已知人類為EB病毒唯一宿主，主要感染人類的 B 細胞、T 細胞以及上皮細胞 (Sixbey, et al. 1983)，其生活史可分潛伏期 (latent stage)與溶裂期 (lytic stage) (for a review, (Longnecker 2013))。EB病毒於B細胞中多以潛伏期的狀態存在，有理論提出說病毒會視宿主免疫能力而定伺機轉為溶裂期，使咽部上皮細胞與唾液中的病毒量上升，再次感染新宿主。

EB病毒可藉由唾液傳播感染咽部上皮細胞，在由咽部淋巴結或韋氏環淋巴組織 (Waldeyer's ring) 轉而感染淋巴附近的 B 細胞 (Tugizov, et al. 2013)，EB病毒感染上皮細胞需要至少三個病毒蛋白協助 (Chesnokova and Hutt-Fletcher 2014)，以膜融合 (membrane fusion) (Sorem



and Longnecker 2009)或胞移作用 (Transcytosis) 的方式侵入細胞 (Tugizov, et al. 2013)。然而，EB病毒感染 B 細胞時需要五個病毒蛋白、兩個宿主細胞蛋白 (Chesnokova and Hutt-Fletcher 2014)，外套膜具有醣蛋白 gp350/220 會與 B 細胞的 CD21，並配合醣蛋白 gH、gL、gB，以及 gp42 結合宿主 HLA-II，將 HLA-II 作為輔因子以內吞作用感染 B 細胞 (Miller and Hutt-Fletcher 1992; Q. Li, et al. 1997)。當病毒成功感染細胞後，上皮細胞可透過細胞微管 (microtubules)、細胞骨架 (actin cytoskeleton)；B 細胞僅需要細胞微管 (microtubules) 的協助，將病毒移動到宿主細胞核 (Shannon-Lowe, et al. 2009; Valencia and Hutt-Fletcher 2012)。

病毒移至宿主細胞核時，由核孔將病毒核酸注入細胞核內 (Johnson and Baines 2011)，隨著宿主細胞 DNA 同步複製 (Yates, et al. 1985)。可分為潛伏期 (latent stage) 和溶裂期 (lytic stage)。當病毒以潛伏 (latent stage) 狀態存在，過程中最多僅表現11個基因產物以維持EB病毒於細胞內 (Young and Rickinson 2004)。可透過化學藥物 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)、sodium butyrate (SB) (zur Hausen, et al. 1978)，物理性 UV 照射，或是利用抗免疫球蛋白抗體 (anti-human Ig) 刺激 B 細胞 (Tovey, et al. 1978)，以及於細胞內表現病毒蛋白轉活化子 (transactivator) Zta 及 Rta (Mauser, et al. 2002)，皆可促使EB病毒再活化並進入溶裂期，依照病毒蛋白表現先後順序可分為三個時期：

(1) 特早期 (immediate early, IE)：此時期會表現病毒轉活化子

(transactivator) Zta (BZLF1) 以及 Rta (BRLF1) 是主要調控溶裂期的關鍵角色 (Miller, et al. 2007)，可單獨或協同活化許多早期基因的表現 (for a review, (Longnecker 2013))。

(2) 早期 (early, E)：早期所表現出的蛋白，多為幫助EB病毒複製的蛋

白，例如：BALF2 單股 DNA 結合蛋白 (single strand DNA binding protein, SSB)、BALF5 DNA 聚合酶 (DNA polymerase)、BBLF4 解旋酶(helicase)、BSLF1 導引酶 (primase)、BMRF1 DNA 聚合酶輔助因子 (DNA polymerase processivity factor, PPF) (for a review, (Münz 2015))。

(3) 晚期 (late, L)：EB病毒晚期時表現約36種晚期蛋白質 (Yuan, et al. 2006)，由晚期基因調控子 (late gene regulator) BcRF1 (TATA box binding protein like protein, TBP like protein) 及 BGLF4 (EBV-encoded serine/threonine kinase) 調控表現 (Aubry, et al. 2014; El-Guindy, et al. 2014)。在此時期主要表現病毒結構蛋白質 (structure protein)、醣蛋白以及披膜蛋白，例如：病毒外殼抗原 (viral capsid antigen, VCA)、膜抗原 (membrane antigen, MA) 以及套膜上的醣蛋白 gp350、gp42等晚期病毒蛋白質 (Dolyniuk, et al. 1976)，會影響著病毒殼體的成熟與組裝，甚至是新病毒感染進程與貼附 (for a review, (Münz 2015))。

病毒釋放核酸物質進入核內複製，表現出病毒早期及晚期蛋白質，此時會在細胞核內先組裝成未成熟的病毒核殼體(nucleocapsid)，在金染色電子顯微鏡實驗分析中發現，BORF1 和BDLF1 蛋白質位在EB病毒核殼體上，證實了EB病毒殼體是由 BORF1 和 BDLF1 等病毒殼體蛋白質組成。另外，BORF1 和 BDLF1 會形成類似於人類單純疱疹病毒 (Human simplex virus-1, HSV-1)中 VP19C 和 VP23 蛋白質所組成的 triplex 結構，並且 triplex 可以幫助連繫殼體上的次蛋白衣 (capsomer)，促進病毒二十面殼體的形成 (Wang, et al. 2011)。核殼體具有液晶密度壓力 (liquid crystalline density) 能讓病毒核酸進入核殼體內 (Johnson and Baines 2011)。再透過病毒出核複合體 (nuclear egress complex) BFRF1/BFLF2 的協助 (Blossom Damania 2009)，將病毒核殼體送至細胞質，推測在此以類似

HSV-1方式獲得披膜蛋白，藉由反式高基氏網 (trans-Golgi network, TGN) 或細胞膜 (plasma membrane) 做最後的套膜化 (envelopment) (Granzow, et al. 2001)。



1.2 疱疹病毒顆粒出核過程(nuclear egress)

1.2.1 核膜結構

細胞核膜由內外雙層磷脂質組成，分別稱為內核膜及外核膜 (inner and outer nuclear membrane)，內外核膜間具有空隙稱膜核周腔 (perinuclear space) (Mettenleiter, et al. 2013)，核膜上鑲嵌著核孔複合體 (nuclear pore complex, NPC)，核孔複合體由30幾種核孔蛋白 (nucleoporin, Nup) 組成，可以做為細胞核質間的運輸屏障，控制大分子物質的進出 (Hoelz, et al. 2011; Suntharalingam and Wentz 2003)。細胞內核膜的內層還有 nuclear lamina (V型中間絲, type V intermediate filament) 作為膜內網狀支撐結構(C. P. Lee, et al. 2007; C. P. Lee and M. R. Chen 2010)。因為EB病毒 DNA 完成複製，組裝好核殼體後，會將核殼體(約 115-130 nm)運至細胞質，首先穿過微小的 nuclear lamina 間隙 (約 15 nm) (C. P. Lee and M. R. Chen 2010)，以及細胞核核孔，核孔直徑僅約 40 nm，因此核殼體 (nucleocapsid) 無法直接由核孔運出，對病毒來說直接出核是一大挑戰。

在先前研究利用電子顯微鏡發現，EB病毒的成熟核殼體會以兩種形式出核，一是由內質網 (endoplasmic reticulum) 出核，內質網獲得套膜，特點是具有較平滑的套膜。另一方式則是藉由細胞分裂時核膜較為鬆散，EB病毒顆粒藉機出核，伺機脫逃的EB病毒顆粒未套膜化，因此再由細胞質空泡膜(cytoplasmic membranes of vacuoles)或高基氏體(Golgi network)套膜化，特點則是具有較厚且粗糙的套膜(Seigneurin, et al. 1977)。之後也有其他研究團隊進一步研究指出，疱疹病毒的出核機制可

能具有高度相似性，在這部分 Alphaherpesviruses 較具完善的研究，Betaherpesviruses 和 Gammaherpesviruses 則與 Alphaherpesviruses 相比的話僅有些微不同 (Johnson and Baines 2011)。Alphaherpesviruses 主要是以連續性的初次套膜化-去套膜化-二次套膜化 (primary envelopment – de-envelopment – re-envelopment) 使核殼體穿越核膜(附圖一)，進而完成出核過程 (nuclear egress) (Johnson and Baines 2011; Mettenleiter 2002; Mettenleiter, et al. 2009)。

1.2.2 疱疹病毒利用蛋白質激酶促使 nuclear lamina 結構鬆散，促使核殼體出核

Alphaherpesviruses 表現病毒激酶 Us3 和 UL13 (Mettenleiter, et al. 2009)，其他疱疹病毒亦具有同源蛋白激酶，如人類巨細胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 的 UL97 (Hamirally, et al. 2009)、EB病毒的 BGLF4 (Lee, et al. 2008) 以及卡波西氏肉瘤相關疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) 的 ORF36 (Park, et al. 2000; Park, et al. 2007)，這幾個病毒激酶皆可藉由激酶活性磷酸化 nuclear lamina，使 nuclear lamina 結構重新分布並更加鬆散、薄化，有助於核殼體出核 (Hertel 2011)。

1.2.3 初次套膜化(primary envelopment)

在 Alphaherpesviruses - HSV 會表現病毒出核複合體 (nuclear egress complex) 蛋白 UL34/UL31，這兩個蛋白會在病毒溶裂期早期表現 (Blossom Damania 2009)。UL34 蛋白會聚集形成六聚體 (hexamer) 晶體結構，再由 UL31 蛋白質 N 端二級結構形成的鈎子 (hook)，與 UL34 重複的兩段 β 螺旋結構交互作用，而共同聚集於核膜邊緣(nuclear rim) (Bigalke and Heldwein 2015; Y. E. Chang and Roizman 1993)。當 UL34/UL31 與 lamin A/C 結合時，可以競爭掉 lamin 蛋白間的交互作用，對 nuclear lamin 產生局部性穿孔效果 (Reynolds, et al. 2002)，使結

構更加鬆散，有助於核殼體接觸內核膜 (INM) (Muranyi, et al. 2002)。此外，出核複合體可以辨認成熟的病毒核殼體，利用 UL31 將病毒殼體帶到內核膜 (INM)，以出芽 (budding) 的方式進到核周腔。在EB病毒的部分亦有同源出核複合體 BFRF1/BFLF2，會促使核膜結構改變，並和 Lamin B 結合，以促進 EB病毒的出核(Blossom Damania 2009; Farina, et al. 2005; Gonnella, et al. 2005)。

1.2.4 去套膜化 (de-envelopment)

病毒核殼體進入核周腔後要再穿越外核膜(ONM)，穿越外核膜時病毒核殼體會將套膜去除，前面有提到 HSV 出核複合體 UL34/UL31 會和殼體結合，並一起運行至核周腔，但另有研究指出以免疫螢光顯微鏡觀察，細胞質內的殼體並沒有偵測到出核複合體的訊號，表示出核複合體會被滯留於外核膜(Fuchs, et al. 2002)。

1.2.5 二次套膜化 (secondary envelopment or re-envelopment)

順利移至細胞質的病毒核殼體，會在細胞質可以得到披膜蛋白，例如：EB病毒披膜蛋白 BPLF1 (具有deubiquitinases的活性) (van Gent, et al. 2014)。被披膜蛋白完整包覆的核殼體，會與細胞質內的網狀胞器結合，例如內質網 (endoplasmic reticulum)、高基氏體 (Golgi apparatus)、反式高基氏網 (trans-Golgi network) (Harley, et al. 2001; Wisner and Johnson 2004)。二次套膜化的 HSV病毒，套膜上就具有各式醣蛋白 gE-gI、gD、gB、gH-gL (Johnson and Baines 2011)，細胞內的液泡會將套膜化殼體運送至細胞膜，與細胞膜融合後病毒顆粒即被釋出細胞外 (Johnson and Baines 2011; Mettenleiter 2002; Mettenleiter, et al. 2009)。前人曾以電子顯微鏡觀察 B95-8 B細胞，EBV 病毒醣蛋白 gp110 會表現在細胞核膜上及細胞內質網，也是少數一個醣蛋白可以進到內核膜的蛋白，但不會與核內未成熟的核殼體結合，gp110 在核膜及內質網上扮演的功能為

協助EB病毒核殼體出核，推論當缺乏 gp110 會影響病毒殼體出核的效率，以及會影響核殼體的組裝與成熟(Gong and Kieff 1990; Lee and Longnecker 1997)，因此gp110這醣蛋白不但扮演著幫助EB病毒感染細胞的功能，還可以調控EB病毒核殼體的組裝與成熟。



1.3 BFRF1 及其同源蛋白質

1.3.1 BFRF1 在 α 型疱疹病毒的同源蛋白質 (UL34)

在細胞內轉染 UL34/UL31 質體，可同時表現 UL34/UL31 使細胞內核膜結構衍生出液泡，須兩個病毒蛋白同時存在才能有液泡的產生 (Klupp, et al. 2007)。在EB病毒的部分，雖然 BFRF1/BFLF2 與 UL34/UL31 是同源蛋白質扮演相似的功能，但在EBV僅需要單獨表現 BFRF1 即可觀察到產生衍生液泡的功能。在哺乳類細胞中，以轉染方式表現 BFRF1 會有細胞膜增生的情形 (Luitweiler, et al. 2013)。此外，我們實驗室先前研究證明了，BFRF1 能透過 ESCRT 膜剪切機制調整核膜結構(C. P. Lee, et al. 2012)。

1.3.2 BFRF1 蛋白質在EB病毒中的發現與功能

Faggioni 研究團隊觀察到在含有 EB 病毒的細胞株 Akata、Raji、B95-8 B 細胞或是口腔毛狀白斑上皮細胞 (oral hairy leukoplakia)，利用化學藥物 TPA/SB 等方法促進 EB 病毒進入溶裂期，BFRF1 病毒蛋白都主要表現在核膜上 (Farina, et al. 2004)。當 BFRF1 C 端的穿膜功能區被刪除時，會減少病毒產量，表示 BFRF1 的穿膜功能及正確坐落 (locate) 於內核膜上的能力對病毒釋出很重要 (Farina, et al. 2004)。此外，Delecluse 研究團隊建構一個 BFRF1 缺失的病毒細胞株，以電子顯微鏡觀察，發現當缺乏 BFRF1 病毒蛋白表現，會使病毒核殼體累積於細胞核內，影響病毒釋出感染新細胞，使得感染效率下降 (Farina, et al. 2005)，表示 BFRF1 對病毒殼體的運送及成熟組裝很重要，進而影響病毒釋出及感染效率。




1.4 BFRF1 衍生液泡結構可能與 ESCRT 膜剪切機制相關

1.4.1 ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)

ESCRT膜剪切模組約30種蛋白組成，蛋白間可連續性的結合與作用，主要分為五大群，ESCRT-0、-I、-II、-III 和 associated proteins，可以調整及剪接膜狀結構。目前顯著的研究多與內吞體 (endosome)形成許多腔內液泡 (intraluminal vesicles, ILVs)的多液泡囊體 (multivesicular bodies, MVB)相關 (Hanson and Cashikar 2012)。ESCRT 膜剪切機制最早的起源是在古生菌的細胞分裂期中發現。隨著目前的研究資料顯示，酵母菌、哺乳類動物到人類皆具有 ESCRT，因此，ESCRT 在演化上具高度保留性，證明了其對生物的重要性 (Samson and Bell 2009)。ESCRT 模組在人類細胞中發現可以維持穩定細胞核完的完整性，在核纖層蛋白綜合症(laminopathies)的情況下，會使 ESCRT 作用不正常，導致肌肉營養不良和早老症狀(Hatch and Hetzer 2014; Munoz-Alarcon, et al. 2007; Sundquist and Ullman 2015)。

在細胞中多液泡囊體 (MVB) 形成為例，可以說明 ESCRT 系統的作用方式。為了將細胞內的廢物清除，會將受損的蛋白質回收分解以做為製造新產物的原料，以減少細胞的能量耗損。細胞內的 ESCRT-0 蛋白會與泛素化的胞膜蛋白 (ubiquitinated membrane proteins) 連接形成一個作用平面 (Katzmann, et al. 2001; Raiborg, et al. 2001; Sachse, et al. 2002; Samson and Bell 2009; Wideman, et al. 2014)，吸引 ESCRT-I 和ESCRT-II 幫該處的胞膜做折疊與塑形，關鍵的 ESCRT-III 會形成彈簧樣纖維使細胞膜彎曲，由將芽胞連結 (budding site) 掐斷 (pinch off)。接著 ESCRT associated 蛋白 — VPS4 (vacuolar protein sorting 4) 則具有 AAATPase 的活性，可使全部的ESCRT 蛋白在膜剪切活動結束之後，蛋白間的聯結被打斷，ESCRT 蛋白離開作用平面，因而生成了囊泡 (Guizetti, et al. 2011; Raiborg and Stenmark 2011)。



到目前為止被認為與 ESCRT 膜剪切模組相關的有：(1)多液泡囊體 (MVB) 形成、(2)人類免疫缺陷病毒的釋出 (human immunodeficiency virus, HIV budding) (Demirov, et al. 2002; Garrus, et al. 2001; Guizetti, et al. 2011; Martin-Serrano, et al. 2001)、(3)哺乳類細胞分裂 (mammalian cytokinesis) (Carlton and Martin-Serrano 2007; H. H. Lee, et al. 2008; Morita, et al. 2007)、(4)EB病毒的出核 (EBV nuclear egress) (Lee, et al. 2012) (5)在細胞分裂後的細胞核膜修復 (nuclear envelope sealing) (Olmos, et al. 2015; Vietri, et al. 2015) , 在不同的情況下, 所需要的 ESCRT 蛋白種類不同, 並不需要全部的 ESCRT 蛋白都參與。以 HIV 為例, 僅需要 ESCRT-I、ESCRT-III 和 VPS4等associated 蛋白 (Prescher, et al. 2015)。

1.4.2 BFRF1 和 Alix 的結合並與核膜產生衍生液泡

2012 年本實驗室研究團隊, 在對於 ESCRT 膜剪切機制與 EB 病毒的研究中, 發現 ESCRT 連結蛋白 Alix (apoptosis-linked gene-2 interacting protein X)會與病毒蛋白 BFRF1 結合。當以 siRNA 使 Alix 表現量下降時, 會使 BFRF1 衍生液泡減少。亦利用 GFP-Chmp4B dominant negative plasmid 送入 NA 細胞(含 EB 病毒的鼻咽癌上皮細胞), 會使釋出的 EB 病毒 copy number 下降, 因而發現另一個 ESCRT 蛋白 Chmp4B (Chromatin modifying protein 4B) 可以幫助 EB 病毒釋出。因此, 我們研究團隊認為 BFRF1 產生衍生液泡與 ESCRT 相關 (Lee, et al. 2012)。

1.5 研究目的

在 HIV 的研究中發現, Gag 蛋白會利用 Late domain 功能區含特定胺基酸序列組合白胺酸-任意兩種胺基酸-白胺酸-苯基丙胺酸(LXXLF) (Jouvenet, et al. 2011)。本實驗室的成員將預測區段的作刪除及突變, 將改造後的基因送入細胞表現, 發現特別是將 ⁶¹VYKFLAFKL⁶⁹ 突變為 ⁶¹AAKFAAFKA⁶⁹ 時 (以下簡稱為BFRF1 LD1_2LA), 對於 BFRF1 和 Alix

的結合力影響最大。另外，劉冠婷於研究中發現 BFRF1 會和 Alix 的三段功能基其中的兩段結合。Alix 分別有 Bro (1–358 a.a)、V (362–702 a.a)、PRR (703–868 a.a)，會和 BFRF1 結合的功能區是 Bro 和 PRR (Liu 2014)。因此，我們想更詳細的去探討 BFRF1 和 Alix 結合方式和機制為何。

所以我的研究目標有二，第一是探討 BFRF1 和 Alix 結合時，所需要有哪些功能區段與詳細機制為何，另外，BFRF1 如何利用 Alix 幫助產生衍生液泡。第二個目標則是找出還會有那些 ESCRT-III 蛋白參與，以幫助 BFRF1 產生衍生液泡，帶著 EB 病毒出核，促進病毒殼體成熟與釋出。第三是表現與純化 BFRF1 重組蛋白，以製作一高專一性的抗體用來觀察 BFRF1 在EB病毒核殼體出核過程中的路徑與機制。



2. 實驗材料與方法

2.1 建構質體

2.1.1 本論文建構之質體

pEGFP-BFRF1 (pYJJ-1)

BFRF1序列來自 pCDNA3.0-HA-BFRF1 (中研院施修明老師提供)，以引子 LMRC751、LMRC752 進行聚合酶鏈鎖反應，得到 BFRF1 序列片段，以限制酶 BamHI 及 XhoI 切割後接合至 pEGFP-c1 中。

pLenti4-GFP-BFRF1 (pYJJ-2)

將pEGFP-BFRF1，以引子 LMRC915、LMRC916進行聚合酶鏈鎖反應，得到 GFP-BFRF1 序列片段，再以限制酶 RsrII(CPO) 切位鑲嵌至 pLenti4-CPO-V5-His-V2 (來自國衛院林素芳老師)。之後送入T-Rex誘導細胞株中，以 Blasticidine、Zeocin 挑選穩定細胞株，以四環黴素 (Doxycycline) 誘導細胞表現病毒蛋白 BFRF1 。

pCDNA3.0-HA-BFRF1-PCM (pYJJ3)

以施修明老師所提供的 HA-BFRF1 作為模板，透過定點誘變法 (mutagenesis strategy) (Makarova, et al. 2000)，利用LMRC864、997引子，將BFRF1²⁷³RRHRTRETRMR²⁸⁵ 正電核苷酸 (精胺酸 Arginine) 置換為丙氨酸 Alanine，突變後為²⁷³AAHATAETAAMA²⁸⁵。



pRSET-6xHis-BFRF1 (pYJJ4)

BFRF1(1-336 a.a) 序列來自 pCDNA3.0-HA-BFRF1，以引子 LMRC759、LMRC874 做聚合酶鏈鎖反應，得到 BFRF1 序列片段，以限制酶 EcoRI 及 BglIII 切割後鑲嵌至 pRSET-6xHis 中。

pRSET-6xHis-BFRF1 Δ TM (pYJJ5)

BFRF1 Δ TM (1-313 a.a) 序列來自 pCDNA3.0-HA-BFRF1，以引子 LMRC759、LMRC995 做聚合酶鏈鎖反應得到序列片段，但不含 BFRF1 原有的穿膜功能片段 (transmembrane domain)，以限制酶 EcoRI 及 BglIII 切割後鑲嵌至 pRSET-6xHis 中。

2.1.2 其他質體

pCDNA3.0 (Invitrogen)

真核細胞的表現載體，大小約5446個含氮鹼基，帶有 CMV 啟動子，在細菌中的抗藥基因為 Ampicillin，在細胞中的篩選抗藥基因為 Neomycin。

pCDNA3.0-HA-BFRF1 (中研院施修明實驗室提供)

將帶有 HA 標籤的 BFRF1 序列以限制酶 XhoI-HA-BFRF1-Not 切位鑲嵌至 pcDNA3.0 載體(Invitrogen)上。

pCDNA3.0-HA-BFRF1 LD1_2LA (劉冠婷所建構)

以 pCDNA3.0-HA-BFRF1 為模板，利用 LMRC928以mutagenesis 方式將 ⁶¹VYKFLAFKL⁶⁹突變為⁶¹AAKFAAFKA⁶⁹。

pCDNA3.0-HA-BFRF1 2LA-PCM (陳忠寬建構)

pCDNA3.0-HA-BFRF1 LD1_2LA 和 pCDNA3.0-HA-BFRF1-PCM 以限制酶 XhoI-HA-BFRF1(245)-EcoRV，作direct cloning，將兩個質體嫁接在一起。



pEGFP-c1 (Clontech)

真核細胞的表現載體，大小約4731個含氮鹼基，帶有 CMV 啟動子，細菌中的抗藥基因為 Kanamycin，在細胞中的篩選抗藥基因為 Neomycin。

pLenti4-CPO-V5-His-V2(國衛院林素芳實驗室提供)

由國衛院林素芳老師實驗室重新修飾過的 pLenti4/V5-DEST，將多克隆位點 (multiple cloning site) 置換為限制酶 RsrII (CPO)切割位點，在這質體中含有，CMV 啟動子、V5、His 標籤，在細胞中的篩選抗藥基因為 Zeocine (Chen, et al. 2011)。

FLAG-Alix , FLAG-Alix-Bro, FLAG- Alix -V, and pC-FLAG- Alix-PRR

以聚合酶鏈鎖反應得到 Alix 功能片段序列，並建構於 pCAGGS/MCS 載體上表現，由威斯康辛大學 Yoshihiro Kawaoka 實驗室提供 (Shtanko, et al. 2011)。

pCR3.1 (Invitrogen)

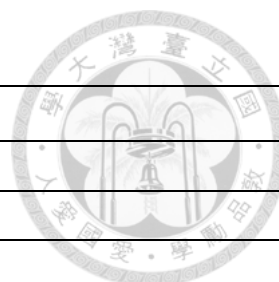
大小約5060個含氮鹼基，帶有 CMV 啟動子，在細菌中的抗藥基因為 Ampicillin。

pSG5 (Stratagene)

大小約4076個含氮鹼基，帶有 SV40 啟動子，在細菌中的抗藥基因為 Ampicillin。

pRTS15

pRTS15 是將 EBV 的 BRLF1 基因片段接至 pRTS2 (修飾過的 pSG5) 載體上，在細胞可驅動 Rta 病毒蛋白表現，是由美國霍普金斯大學 Dr. S. Diane Hayward 教授提供 (Sarisky and Hayward 1996)。



2.3 引子序列

引子序號	序列
LMRC751	5'-CCGCTCGAGCTATGGCAGCCCGGAA-3'
LMRC752	5'-CGGGATCCTCAGGTCCACCTCAGAA-3'
LMRC759	5'-GAAGATCTATGGCGAGCCCGGAA-3'
LMRC864	5'-GTTACGCTCCTTGGAGGGACAGGGACTCGTGGTCGGAATCCGA-3'
LMRC874	5'-GGAATTCTCAGGTCCACCTCAGAAACA-3'
LMRC915	5'-CACGGTCCGACCATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'
LMRC916	5'-CACGGACCGTCAGGTCCACCTCAGAAACAT-3'
LMRC928	5'-TGGAGTTTGCCGCCAAGTTCGCGGCCTTTAAGGCGAAGAAGTCAACTACCCCT-3'
LMRC995	5'-GGAATTCCTAGGCGCGCCAAGAATAACGC-3'
LMRC997	5'-TCGTGAGGCACCCCATCGCCGCGCACGCGA-3'

2.4 細胞培養

HeLa 細胞是由人類子宮頸上皮細胞分離的細胞株 (ATCC#CCL-2)，NA細胞是由本實驗室利用重組 Akata EB 病毒株感染鼻咽癌上皮細胞株 TW01 而來(Chang, et al. 1999)，上述的三種細胞都是以 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Hyclone) 含 10% fetal bovine serum、1% L-glutamine、penicillin (100 U/ml) / streptomycin (100 µg/ml) 培養，培養條件為37°C、5% CO₂。T-Rex HeLa 細胞株內帶有可以穩定表現 Tet-repressor 基因，利用 tetracycline 作為誘導物可以調控目標基因的表現，將 GFP-BFRF1 接入改造過的 pLenti4-CPO-V5-His-V2 載體，轉染至T-Rex HeLa 誘導細胞 (ThermoFisher)，以 300 µg/ml Zeocin, 5 µg/ml Blasticidine 進行抗生素篩選，挑出穩定細胞株，在培養誘導細胞需要使用 10% tetracycline-free 的胎牛血清，加入其餘成分皆相同的 DMEM 培養液。

2.5 細胞轉染

以 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) 試劑做細胞轉染，進行轉染前先更換成新鮮培養液。取適量 Opti-MEM (GIBCO-BRL) 培養液稀釋欲轉染的質體 DNA或 si-RNA，以及 Lipofectamine (核酸濃度(µg): Lipofectamine (µl) = 1: 1.5) 各自混勻後靜置5分鐘，兩者混合後再室溫靜置20分鐘，將混

和試劑隨機分布地滴入培養細胞內，待37 °C培養 4-6小時，細胞攝入核酸後，再更換為新鮮培養液，後續待指定時間點收取細胞。

2.6 正二十丙烷硫酸鈉-聚丙烯胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 及西方墨點法(Western Blot)

使用 Bio-Rad 直立式電泳裝置，依據欲分析的蛋白分子量大小配置 10-15% Resolving Gel，上層則固定為 5% stacking gel。蛋白質樣品與 4 倍 sample buffer (200mM Tris, 8% SDS, 4% glycerol, 0.4% bromophenol blue, 400 mM DTT) 混合，95 °C 加熱 10 分鐘使蛋白質變性，將處理完畢的蛋白樣品注入 SDS-PAGE 樣品槽內，於 running buffer (25 mM Tris, 250 mM Glycine, 0.1% SDS) 中以 80-120 伏特進行膠體分析。電泳結束後，以 300 mA、90 分鐘，以 transfer buffer (25 mM Tris, 250 mM Glycine, 10% methanol) 轉漬至硝化纖維膜 (Nitrocellulose)。將樣品膜以 Blocking Buffer — 5%脫脂奶粉溶於 TBST (10 mM Tris-HCl pH=7.4, 24 mM NaCl, 0.2% Tween-20) 室溫均勻覆蓋反應 30 分鐘至 60 分鐘，以適當一級抗體濃度的 Blocking Buffer 浸潤樣品膜室溫兩小時或 4°C 16 小時，以 TBST 清洗三次，每次 5 分鐘，再以適當二級抗體濃度的 TBST 浸潤樣品膜室溫一小時，TBST 清洗三次，每次五分鐘，以 Western Lightening™ Western Blot Chemiluminescence Reagent plus (Perkin Elmer) 及 X 光片偵測蛋白質表現情形。偵測病毒蛋白使用實驗室製作的抗體 anti-Rta 467、anti-BMRF1 88A9、anti-BGLF4 2616、anti-Zta 1B4。Anti-BFRF1 R319 由義大利 Faggioni 研究團隊提供。其他蛋白抗體有 anti-GFP(GenTex, GTX113617)、anti-HA.11(Covance)、anti-Flag M2(Sigma)、anti-β-actin(Sigma)。

2.7 共同免疫沉澱(co-immunoprecipitation)

先將該實驗時所需要的磁珠 (Protein A Mag sepharose™ Xtra)，每樣本約須用到 30 μl，以 1x PBS (145 mM NaCl, 4 mM Na₂HPO₄, 1mM KH₂PO₄,

pH=7.5) 潤洗數次取出偵測蛋白質樣本濃度後，以 cell lysis RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH=7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxy cholate, 0.1% SDS) 溶回取出體積 30 μ l /每樣本。

蛋白樣品萃取方法為將細胞於培養皿上刮落收集於 15 ml 離心管，以 4 $^{\circ}$ C、1200 rpm 離心 5 分鐘去除上清液，加入預冷的 PBS 洗掉殘留的細胞培養液，同時將樣品移入 1.5 ml Eppendorf tube，以 4 $^{\circ}$ C、13000 rpm 離心去除上清液，加入 1000 μ l cell lysis RIPA buffer 約略混合後置於 4 $^{\circ}$ C vertical rotator 上，以 3 rpm 轉動兩小時，4 $^{\circ}$ C、13500 rpm、10 分鐘離心。保留上清樣品蛋白液，偵測其確切濃度後，取出適量蛋白濃度 (建議濃度 300-500 μ g)，加入 10 μ l 前處理過的磁珠，於 4 $^{\circ}$ C vertical rotator 上 3 rpm 轉動 40 分鐘，去除非專一性結合。取出上清液 (pre- cleared 細胞萃取液)並加入 1 μ g anti-HA.11 (Covance)，於 4 $^{\circ}$ C vertical rotator 上 3 rpm 轉動 16 小時後，加入 20 μ l 前處理過的磁珠，於 4 $^{\circ}$ C vertical rotator 上 3 rpm 轉動 2 小時。接著以 NP-40 lysis buffer (50 mM Tris pH=8, 150 mM NaCl, 1% NP-40) 清洗磁珠兩次，再以 1X PBS 清洗兩次，每次 1 ml，4 $^{\circ}$ C vertical rotator 上 3 rpm 轉動分鐘，最後將上清液完全清除，加入 15 μ l 2X sample buffer，95 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘使蛋白質變性，再利用西方墨點法進行分析。

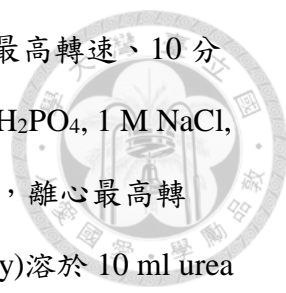
2.8 間接免疫螢光染色(indirect immunofluorescence assay)

將細胞培養於 10-cm 培養皿 (含玻片) 內，進行質體轉染後，在指定時間將玻片取出標記好，以 1X PBS 去除多餘細胞培養液，利用 4% paraformaldehyde (in PBS) 室溫下作用 20 分鐘以固定細胞，再以 PBS 清洗 5 分鐘兩次後，風乾玻片。利用 ImmedgeTM 筆於玻片上劃開欲偵測範圍並置於化學抽風櫃待墨水風乾，將玻片放入 0.1% Triton X-100 (in PBS) 室溫反應 5 分鐘。再以 PBS 清洗 5 分鐘兩次後，以 1% BSA (in PBS) Blocking

30 分鐘至一小時，以 1% BSA (in PBS) blocking buffer 配置適當稀釋的一級抗體，均勻滴於欲偵測範圍的玻璃片上，37 °C 反應 90 分鐘，PBS 清洗 5 分鐘三次後，以 PBS 配置適當稀釋的二級螢光抗體，均勻滴於欲偵測範圍的玻璃片上，37 °C 反應 60 分鐘，PBS 清洗 5 分鐘三次後，將玻片置入 1:1000 稀釋的 Hoechst 33238 (in PBS) 作用反應 5 分鐘，PBS 清洗 5 分鐘三次後，以 1:1 稀釋的 mounting solution 封片，以指甲油封邊，防止樣品接觸空氣，以保持樣品品質，進行螢光顯微鏡觀察，或共軛焦顯微鏡觀察。一級抗體有 anti-HA(GenTex, GTX29110)、anti-Alix 3A9(GenTex, GTX42812)、anti-Emerin (Santacruz, sc-25284)。

2.9 表現及純化 BFRF1 蛋白

送入目標質體 pRSET-6x His- BFRF1 或 pRSET-6x His- BFRF1- Δ TM 至 E.coli BL21，挑選新鮮單一菌落，培養在 37°C TB (1.2% Peptone, 2.4% Yeast extract, 0.4% Glycerol, 0.231% KH₂PO₄, 1.254% K₂HPO₄, pH=7) 培養液 16-18 小時，以 1/500-1/1000 稀釋至 500 ml TB 培養液。37°C 培養至 OD₆₀₀ =0.5，加入 1 mM 乳糖誘導劑 IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)，37°C 誘導 6 小時，離心 6000 rpm、10 分鐘。保留菌體沉澱物，以 1XPBS 清洗轉入 50 ml 離心管，離心 10000 rpm、10 分鐘，去除上清液，測量菌體沉澱物重量，加入每 g 重 10 ml Lysis Buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10mM imidazole, 0.5% Triton x-100, pH=8, 1X protease inhibitor cocktail, 1 mg/ml lysozyme) 混勻後，4 °C、水平搖蕩器 100 rpm、60 分鐘使 lysozyme 完全反應。在 (-80°C 急速冷凍 5 分鐘，37°C 快速解凍) 重複三循環，利用超音波震盪儀(sonicator, Sonica -S4000) 全程於冰上震盪，(40 瓦特震盪 5 分鐘，關閉 5 分鐘)重複循環共 20 分鐘，將細胞壁及細菌染色體打斷，離心最高轉速、10 分鐘，去除上清液。加入 10 ml membrane protein wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10mM



imidazole, 2% Triton x-100, pH=8), 劇烈震盪 30 秒, 離心最高轉速、10 分鐘, 去除上清液。加入 10 ml DNA wash buffer (50 mM NaH₂PO₄, 1 M NaCl, 10mM imidazole, 2% Triton x-100, pH=8), 劇烈震盪 30 秒, 離心最高轉速、10 分鐘, 去除上清液。清洗過的內涵體(inclusion body)溶於 10 ml urea buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH=8), 劇烈震盪 1 分鐘, 室溫水平搖蕩器混合 30 分鐘。以最高轉速、5 分鐘離心, 保留上清液加至 nickle beads, 4 °C、垂直搖蕩器一小時, 以最高轉速、5 分鐘離心, 去除上清液, 加入 10 ml washing buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH=6.3), 4 °C、垂直搖蕩器 10 分鐘, 以最高轉速、5 分鐘離心, 去除上清液, 加入 5 ml elution buffer-1 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH=5.9), 4 °C、垂直搖蕩器 10 分鐘, 以最高轉速、5 分鐘離心, 保留上清液待 SDS-PAGE 確認, 加入 5 ml elution buffer-2 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH=4.5), 4 °C、垂直搖蕩器 10 分鐘, 以最高轉速、5 分鐘離心, 保留上清液待 SDS-PAGE 確認, 加入 5 ml elution buffer-3 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH=4.0), 4 °C、垂直搖蕩器 10 分鐘, 以最高轉速、5 分鐘離心, 保留上清液待 SDS-PAGE 確認, 加入 5 ml elution buffer-4 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH=3.0), 4 °C、垂直搖蕩器 10 分鐘, 以最高轉速、5 分鐘離心, 保留上清液待 SDS-PAGE 確認。



2.10 慢病毒製備 (Lentivirus packaging)

HEK293 細胞計數 3×10^5 顆細胞培養於 6 well 培養皿， 37°C 、5% CO_2 培養 16-18 小時。將包裹慢病毒的材料 — dR8.91 450ng、pMD.G 50ng、shRN A 慢病毒質體 50 ng，加 ddH₂O 至 112.5 μl 備用，再加入 12.5 μl 2.5 M CaCl_2 與 125 μl 2x BBS (50 mM BES pH6.95, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4)，混合後靜置 12 分鐘，將混合製劑加入細胞培養液中，於 37°C 、3% CO_2 培養 18 小時後，更換為含有 1% BSA 新鮮 DMEM 培養液，在培養 24-48 小時後收取上清液備用，以作為慢病毒感染的對照組 shLuc。

2.11 慢病毒感染 (Lentivirus infection)

利用細胞計數器將目標細胞株 (NA 或 HeLa) $2 \times 10^5/\text{ml}$ ，培養於 6 孔盤中，依照實驗設定均勻加入所需要之病毒感染劑量 (Multiplicity of infection, MOI)，使用 MOI 約 4.5~5 之間，本次實驗使用中研院 RNAi core 提供的盤式病毒(表一)，每個欲作用的基因，皆約 3~5 株病毒，MOI 平均分散各株病毒加入的量。例如：欲 knockdown Vps4A 基因，具有五株病毒株，則平均每株病毒株加入 MOI=1 的病毒量。加入慢病毒液後以 2250 rpm, 室溫離心 30 分鐘後再置於 37°C 培養箱中培養 48 小時，然後，用 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycine 篩選感染 (infection) 成功之細胞。

2.12 細胞內 EBV 病毒核酸萃取

將細胞刮落之後以 PBS 清洗， 4°C 、13500 rpm、30 秒離心，去除上清液，取 400 μl Digestion buffer (0.1% SDS, 0.125 mg/ml proteinase K, 50 mM Tris-HCl pH=8, 10 mM EDTA pH=8) 混合細胞，以 55°C 反應 3 小時，加入 RNase A (最終濃度為 0.5 mg/ml)， 55°C 反應 16-18 小時，反應後先置室溫冷卻。加入等體積的 phenol/chloroform/IAA(25:24:1) 劇烈震盪 15 秒，靜置一分鐘後以 4°C 、13500 rpm、10 分鐘離心，將上層(約 350 μl)

移至新的 1.5 ml Eppendorf，再加入 2 倍體積的 100% ethanol 及 0.1 倍體積的 3M NaOAc pH=5.2，混合均勻後置-20°C 冷凍沉澱 16 小時，4°C、13500 rpm、10 分鐘離心，去除上清液，加入 1 ml 70% Ethanol 潤洗 DNA pellet，4°C、13500 rpm、10 分鐘離心，去除上清液，風乾 10 分鐘，加入滅菌水 50 µl，置於 4°C 冰箱待 DNA 溶解完全，之後以 spectrophotometer 測量 DNA 濃度。

2.13 細胞外 EBV 病毒核酸萃取

將細胞培養液取 1 ml 至 1.5 ml Eppendorf，離心 4°C、13500 rpm、30 分鐘，吸取 445 µl 最上層液體，再加入 5 µl DNaseI (1 U/µl) 及 50 µl 10X DNase buffer，混合均勻後室溫反應 15 分鐘，以加入 EDTA (最終濃度=25mM) 並於 65°C 反應 10 分鐘將 DNaseI 酵素反應中止，完成前處理的細胞培養液可先保存於 -80°C。

使用 QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN)，先將 25 µl QIAGEN Protease /每隻樣本，分裝至新的 1.5 ml Eppendorf，再加入 200 µl 前處理的細胞培養液以及 200 µl Buffer AL (含有 28 µl/ml 的 carrier RNA)，劇烈震盪 15 秒後 56 °C 反應 15 分鐘後先置於室溫回溫，加入 250 µl 100% Ethanol 劇烈震盪 15 秒，靜置室溫 5 分鐘，以 1200 rpm 30 秒離心，使管壁殘留液體集中後，將全數液體移入標示好的 QIAamp MinElute column，8000 rpm 1 分鐘離心，去除收集管廢液。在 column 加入 500 µl Buffer AW1，8000 rpm 1 分鐘離心，去除收集管廢液。在 column 加入 500 µl Buffer AW2，8000 rpm 1 分鐘離心，去除收集管廢液。在 column 加入 500 µl 100% Ethanol，8000 rpm 1 分鐘離心，去除收集管廢液。後更換為新的收集管，再以空 column 離心 13200 rpm 3 分鐘使 column 內部結膜乾燥，丟掉收集管，更換為標示好 1.5 ml Eppendorf。置於 60 °C 烘箱 3 分鐘，直接滴加 50 µl 滅菌水於膜上靜置室溫 10 分鐘，離心 13200 rpm 3

分鐘，即取得培養液內的核酸。

2.14 即時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative polymerase chain reaction)

以絕對定量後的 293 TetEZ p2089 細胞含有 5×10^7 EB病毒基因組及 1×10^4 細胞基因組，當作標準線十倍序列稀釋，作為定義 BamHI W 及 β -globin 的基準曲線，將檢體稀釋成 $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ，取 $5 \mu\text{l}$ 檢體與 $0.8 \mu\text{l}$ 核酸引子 ($10 \mu\text{M}$)，和 $10 \mu\text{l}$ 2X SYBR Green 反應混合液 (SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit, BIOLINE) 混合後用滅菌水補至最後體積 $20 \mu\text{l}$ 混合均勻。將標準線稀釋液與檢體加入 96-Well PCR 反應盤，其中還有 NTC (no template control) 組別，每個實驗須有二重複或三重複，進行聚合酶連鎖反應並以 Bio-Rad CFX Manager version 3.0 偵測及分析。

(BamHI W 使用引子為 LMRC366、LMRC367， β -globin 使用引子為 LMRC970、LMRC971 (Junying, et al. 2003)。



3. 實驗結果

3.1 BFRF1 的 ESR 功能區正電胺基酸，對於 BFRF1 和 Alix PRR 功能區的結合是重要的

實驗室之前觀察到 HA-BFRF1 於 HeLa 細胞中表現，可以和內生性 Alix 結合，並吸引 ESCRT 膜剪切模組協助由核膜衍生細胞內液泡的產生。當細胞內的 Alix 表現量受 siRNA 影響而下降，亦會影響 BFRF1 產生衍生液泡 (C. P. Lee, et al. 2012)。之前實驗室劉冠婷曾利用免疫沉澱法發現 BFRF1 wildtype 可能透過兩段功能區與 Alix 結合，當將 BFRF1 EBV specific region (ESR) (270 a.a - 290 a.a) 去除時，會影響 BFRF1 和 Alix PRR 的結合能力，但不影響與 Alix Bro 功能區的結合能力(附錄三)。另外，曾在 HIV 的研究中發現，HIV 的 gag 蛋白的 NC 功能區富含正電，可透過吸引細胞內的核糖核酸 (RNA)，作為 gag 蛋白與 Alix 間結合的媒介。先前劉冠婷曾在免疫沉澱實驗中發現，當細胞萃取液加入 nuclease 會使 BFRF1 與 Alix PRR 結合減弱 (附錄四)，推測 BFRF1 蛋白可能帶有正電胺基酸可以吸引核酸物質作為與 Alix 結合的媒介。於是在本論文中發現 ESR 功能區富含正電胺基酸，將 BFRF1²⁷³RRHRTRETRMR²⁸⁵ 正電核苷酸 (精胺酸 Arginine) 置換為丙氨酸 Alanine，突變後為²⁷³AAHATAETAAMA²⁸⁵ (以下稱為 BFRF1 PCM)。在免疫沉澱實驗中，BFRF1 wildtype 可以和 Alix 的 Bro 及 PRR 功能區結合 (圖一A, lane 8 and 10)，然而，BFRF1 PCM 僅和 Alix 的 Bro 功能區結合 (圖一B, lane 8 and lane 10)。表示 BFRF1 透過 ESR 的正電胺基酸吸引核酸當作媒介與 Alix PRR 功能區結合。

綜合前人與本論文的實驗結果顯示，BFRF1 可透過 N 端的 LD1 與 Alix Bro 功能區結合，C 端的 ESR 與 Alix PRR 結合。因此想利用同時突變 N 端及 C 端的 BFRF1，看是否完全影響 BFRF1 與 Alix 的結合

能力。因此建構了 BFRF1 2LA-PCM 的質體，以作進一步的觀察。

3.2 HA-BFRF1 mutants 使衍生液泡減少並且改變內生性 Alix 於細胞內的分布位置

為了瞭解 BFRF1 HA-BFRF1 mutants 於細胞內的分布變化，以及 BFRF1 mutants 與吸引 Alix 的能力是否和 BFRF1 與產生衍生液泡相關。將 HA-BFRF1 與 HA-BFRF1 mutants 質體轉染於 HeLa 細胞中，並於轉染後24小時進行免疫螢光染色及共軛焦顯微鏡分析 (圖二)， HA-BFRF1 wildtype 於細胞中，可以偵測到許多衍生液泡，LD1_2LA 於細胞中的衍生液泡數量大幅下降， BFRF1 PCM 的於細胞中的衍生液泡則體積變小，並聚集於細胞核周 (perinuclear)，至於 BFRF1 2LA-PCM 表現在細胞質中，幾乎不會產生衍生液泡，而是較均勻散佈在細胞質。在 vector control 及 BFRF1 wildtype 細胞中，Alix 主要均質表現於細胞質，我們認為當 Alix 完成 ESCRT 膜剪切機制後，會再回歸於其原本的位置。但當細胞表現 LD1_2LA、PCM 時，在核膜表面與 Alix 有相對較明顯的共位現象 (colocalization)，但無衍生液泡形成。可能是當 BFRF1 突變後，延遲了 Alix 吸引 ESCRT 蛋白的能力，使 BFRF1 需要 Alix 參與並接續至 ESCRT 的膜剪接機制，一旦原本在細胞內達成動態平衡的 ESCRT machinery 受阻而失控， Alix 的分布位置即改變。

3.3 HA-BFRF1 mutants 減弱核膜塑形能力使核膜衍生液泡減少

為了更直接的觀察 BFRF1 產生核膜衍生液泡的功能，因此偵測主要表現在內核膜的 Emerin 蛋白，以作為內核膜的指標。轉染 HA-BFRF1 與 HA-BFRF1 mutants 質體於 HeLa 細胞中，並於轉染後24小時進行免疫螢光染色及共軛焦顯微鏡分析 (圖三)。觀察到轉染 vector control 的細胞中，Emerin 主要表現在核膜，形成完整平滑的核膜染色型態(圖三A)。在表現 HA-BFRF1 wildtype 的細胞中， Emerin 會因為 BFRF1產生衍生液

泡而被連帶牽引並表現在細胞質，另可觀察到 HA-BFRF1 會在核膜邊緣以及細胞質的液泡結構與 Emerin 形成共位現象。在表現 LD1_2LA 的細胞中發現到產生衍生液泡的數量減少，主要會在核膜邊緣與 Emerin 形成共位現象。至於在表現 BFRF1 PCM 的細胞中發現產生的衍生液泡體積較小，並且集中在細胞核外圍的某一側，較不會與 Emerin 形成共位現象。然而，在表現 BFRF1 2LA-PCM 的細胞中，無法觀察到細胞質的液泡結構，也無法和 Emerin 形成共位現象。在圖三 B 中不同視野的 BFRF1 mutants 與 Emerin 共位現象的觀察中發現，於表現 PCM 及 2LA-PCM 細胞，也較無法觀察到 BFRF1 蛋白表現在核膜上的型態，PCM 及 2LA-PCM 這兩種 BFRF1 mutants 即使產生小泡也不會連帶著 Emerin 到細胞質表現，主要的原因不是因為突變蛋白在細胞內表現量較低而造成的(圖三 C)。HA-BFRF1 PCM 主要產生的液泡可能是由內質網衍生，特徵是聚集在核周 (perinuclear) 較小的液泡(圖三B)，可推測當喪失ESR的正電胺基酸，會影響到 BFRF1與 內核膜及 Emerin 靠近，甚至減少由核膜產生的衍生液泡。


3.4 以免疫沉澱法偵測 BFRF1 mutants 與 Alix 蛋白結合能力無明顯差異

因為在圖二中觀察到 BFRF1 mutants 和 Alix 有較強的共位現象，故利用免疫沉澱法偵測 BFRF1 mutants 與 Alix 蛋白結合能力。在 HeLa 細胞中轉染 BFRF1 wildtype 表現24小時後，以 RIPA buffer收取細胞萃取液，利用 anti-HA.11 (Covance) 進行共同免疫沉澱，並進行 SDS-PAGE 與西方墨點法分析(圖四)。利用 Image J 數值化後，將 BFRF1 wildtype 與免疫沉澱後的 Alix 訊號視為 100% (=1) ， LD1_2LA、BFRF1 PCM、2LA-PCM 和 Alix 的結合能力則稍有的下降，免疫沉澱試驗的結果與先前利用免疫螢光染色所偵測到的結果不相符。推論Alix在細胞中呈動態結合，不適合利用免疫沉澱法探討結合能力。

3.5 pLenti4-GFP-BFRF1 短暫的轉染與篩選為誘導穩定細胞株後的表現形態不同

另外，為了證明 ESCRT 膜剪切機制會影響 BFRF1 產生衍生液泡，利用 BFRF1 誘導細胞搭配 shRNA 使 ESCRT components 表現量下降，觀察是否影響 BFRF1 產生衍生液泡。首先，以 pLenti4-GFP-BFRF1 暫時轉染 (transient) 至 T-Rex HeLa 誘導細胞 (ThermoFisher)，培養16小時後，加入 50 ng/ml Doxycycline 誘導 GFP-BFRF1 表現24小時後收取細胞玻片，以免疫螢光顯微鏡觀察。Flag-GFP vector control 在細胞內均質的表現在細胞的各處，細胞核內的訊號較細胞質強。GFP-BFRF1 表現的細胞，可在細胞膜上觀察到完整的環狀訊號，在細胞質中亦可以觀察到數量較多的衍生液泡 (圖五A)。因為以暫時轉染方式表現的細胞，會因為誘導細胞內的基本基因表現控制不夠嚴謹，使 Tet-repressor 基因表現量較低，即使未添加誘發物即表現蛋白的情形發生，因此不適合用於需要嚴密調控基因表現的用途(圖五A左側)。故通常操作誘導細胞都會以藥物篩選為單純細胞株後，再執行實驗。將 pLenti4-GFP-BFRF1 轉染至 T-Rex HeLa 細胞，培養16小時後以 200 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin 及 12.5 $\mu\text{g/ml}$ Blasticidine 進行抗生素篩選，大約進行兩~三周，可在培養皿中發現的單一細胞群落，將單一群落挑出培養為穩定細胞株。分別有 Flag-GFP control 三株細胞 (clone 2.4.12)與 GFP-BFRF1 四株細胞 (clone 1.2.4.6) (圖五B)。Flag-GFP 穩定細胞株經誘導後，表現形態與暫時轉染細胞 (transient) 相仿(圖五B)。但 GFP-BFRF1 穩定細胞株經誘導後，表現形態與暫時轉染細胞相比，無明顯衍生液泡，主要表現在細胞核膜上(圖五B)。另外，以西方墨點法偵測轉染細胞與穩定細胞株內所含有的 GFP-BFRF1 表現量，發現穩定細胞株的蛋白表現量明顯少了許多(圖五C)，顯示此系統不適合作為探討其它 ESCRT 之 shRNA 對 BFRF1 衍生液泡的影響。

3.6 Knockdown Chmp4B 和 Vps4A 促進 EBV 病毒釋出



在 HIV budding 的研究中發現，主要執行功能的 ESCRT 成員是 Chmp4B 與 Vps4A (Prescher, et al. 2015)。先前實驗室也曾將 dominant negative 的 GFP-Chmp4B 及 Vps4DN 轉染至有 EB 病毒的鼻咽癌上皮細胞株 NA 細胞中，以 real-time PCR 偵測培養液中的病毒量下降，於是認為 ESCRT 的成員 Chmp4B 與 Vps4 是重要的 (Lee, et al. 2012)。首先，利用 shRNA 將 Chmp4B 與 Vps4 A 這兩個 ESCRT component 於 NA 細胞中 knockdown，以 real-time PCR 定量細胞內及釋出細胞外病毒顆粒中的 EBV DNA copy number，觀察 ESCRT component knockdown 對 EB 病毒在細胞核內的複製及成熟殼體的釋出有無影響。NA 細胞利用 shRNA 病毒感染兩天後，以 puromycine 篩選五天，利用 Rta 質體轉染使 EB 病毒進入融裂期，在細胞核內複製並表現病毒蛋白，於西方墨點法分析 (圖六 A)，當 Chmp4B 與 Vps4A knockdown 時並不影響病毒蛋白的表現量。以 real-time PCR 偵測細胞內 EBV DNA copy number，和 shLuc control 相比較，當 Chmp4B 與 Vps4A knockdown 時，細胞內的 copy number 類似 (圖六 B)。至於細胞外培養液純化的核酸以 real-time PCR 偵測，和 shLuc control 相比較，當 Vps4A knockdown 時，細胞外的 copy number 兩者數值相仿，但當 Chmp4B knockdown 時，以 Rta 誘導會使細胞外的 EBV copy number 比 shLuc 上升 2 倍多。雖然目前結果僅初步以 screening test 測試一次，但在這次結果中發現 knockdown Chmp4B 會使病毒釋出量上升，與先前發現以 dominant negative GFP-Chmp4B 使病毒釋出量下降的結果不相符，可能是因為當細胞內的 Chmp4B 表現量下降使，會使其他 Chmp4 蛋白 (如 Chmp4A、Chmp4C) 代償性表現上升，反而促進病毒的釋出量，詳細的機制需要更進一步探討。

3.7 Knockdown ESCRT-III (Chmp4A/Chmp4B/Chmp4C/Chmp6/Chmp7) 對

促進 EBV 病毒的釋出

已知主要扮演膜剪切功能的 ESCRT component 是 ESCRT-III 這群蛋白 (Guizetti, et al. 2011)，於是首先將以 ESCRT-III 蛋白作為 screening test 的候選者，篩選對於EB病毒複製或釋出影響的 component。同時亦可分別 knockdown Chmp4 (A、B、C) 蛋白，以觀察是否有代償性表現上升而促進病毒釋出量的情形。將 NA 細胞用 shRNA 病毒感染兩天後，以 puromycine 篩選五天，利用 Rta 質體轉染使EB病毒進入融裂期，在細胞核內複製並表現病毒蛋白，於西方墨點法分析(圖七A)，當 knockdown Chmp4A、Chmp4B、Chmp4C、Chmp6 或 Chmp7 時，並不影響誘導後病毒蛋白的表現量。以 real-time PCR 偵測細胞內 EBV DNA copy number，和 shLuc control 相比較，當 Chmp4B、Chmp4C 被 knockdown 時，細胞內的 copy number 無明顯差異(圖七B)，至於 knockdown Chmp4A、Chmp6 或 Chmp7 時，會使細胞內的 copy number 略為上升。至於細胞外以培養液純化的核酸，利用 real-time PCR 偵測並且和 shLuc control 相比較(圖七C)，當Chmp6、Chmp7 被 knockdown 時，以 Rta 誘導會使細胞外的 EBV copy number 和 shLuc 無明顯差異，而當 Chmp4A、Chmp4B、Chmp4C knockdown 時，誘導後細胞外的 copy number 比 shLuc 分別高出約2.5倍、1.5倍、2.5倍。由此可以說明 Chmp4 會影響EB病毒的釋出，當分別 knockdown Chmp4 (A、B、C) 蛋白，可能會使其他兩種蛋白代償性表現上升而促進病毒釋出量，需再測試 Chmp4 的 knockdown 效率如何並且是否會使其他兩種蛋白表現量上升，以說明此推論。

3.8 Knockdown ESCRT-III (Vps4A/Chmp1B/Chmp2B/Chmp3) 對於EBV 病毒複製與釋出的影響


此外，亦觀察其他 ESCRT-III 對EB病毒的影響，將knockdown

Vps4A、Chmp1B、Chmp2B 或 Chmp3 的 NA 細胞以 puromycine 篩選五天後，利用 Rta 質體轉染使EB病毒進入融裂期，利用西方墨點法分析病毒蛋白表現量 (圖八A)，當 Vps4A、Chmp1B、Chmp2B 與 Chmp3 knockdown 時，並不影響誘導後病毒蛋白的表現量。以 real-time PCR 偵測細胞內 EBV DNA copy number，和 shLuc control 相比較，當 Chmp1B 與 Chmp2B knockdown 時，細胞內的 copy number 類似(圖八B)，至於 knockdown Vps4A 與 Chmp3 時，會使細胞內的 copy number 略為上升。另外，也去純化細胞外培養液病毒核酸，利用 real-time PCR 偵測並且和 shLuc control 相比較，當 Vps4A、shChmp2B、Chmp3 knockdown時，誘導後細胞外的 copy number 比 shLuc 分別高出約6倍、11倍、2倍，但當 Chmp1B knockdown時，以 Rta 誘導會使細胞外的 EBV copy number 比 shLuc 反而下降2倍多(圖八C)。NA細胞 knockdown Chmp1B 時，對於 Rta 誘導後仍能完成細胞核內複製並表現病毒蛋白，但成熟殼體系出細胞的數量極低， knockdown Chmp1B 後對EB病毒的影響如同預期，Chmp1B 蛋白不會影響EB病毒的複製，僅會影響EB病毒於細胞內外的運輸，使EB病毒釋出量下降。

綜合圖六、圖七、圖八的一次性實驗結果顯示，ESCRT-III蛋白雖不影響EB病毒的複製，一旦 knockdown Chmp2B、Chmp4A、Chmp4B、Chmp4C、及 Vps4A，會促進成熟EB病毒殼體釋出細胞，反觀 Chmp1B 則會使EB病毒釋出量下降，為了更確定本實驗的現象是否確切，後續實驗需再以 RT-PCR 確定 ESCRT 的 mRNA 表現量。

3.9 建立細菌表現重組蛋白His-BFRF1及以變性環境的純化系統

為了後續實驗可能需要探討到 BFRF1 蛋白質晶體結構，或者利用純化蛋白生成特異性高、親和性高的抗體。在研究過程同時亦利用細菌表現重組蛋白的方法，分別將質體 pRSET-6x His-BFRF1/pRSET-6x His-BFRF1-



dTM 轉形 (transform) 至 E.coli BL21 表現，分別測試在加入 IPTG 後以 30°C 及 37°C 不同誘導溫度下，蛋白質的表現量(圖九A)，pRSET-6x His-BFRF1-dTM 在誘導溫度 37°C 下，表現量較高且比較不會有雜蛋白，故後續純化實驗皆以表現 BFRF1-dTM 蛋白的細菌執行實驗。利用 TB 培養液大量表現的 BFRF1-dTM 蛋白主要表現於細菌內涵體，因此以 Lysis Buffer 與超音破震盪儀打破細菌細胞壁及染色體，配合 membrane protein wash buffer 及 DNA wash buffer 潤洗內涵體並去除細菌內的大部分蛋白質。再將內涵體融入含有 8M urea buffer 中，使蛋白質變性融出內涵體，以 nickel beads 進行親和性結合純化。利用 buffer pH 改變，當 pH 低於蛋白質等電點時會使蛋白質帶正電，而使蛋白與鎳離子(帶正電)分開而流出，得以用此原理純化蛋白。在這過程 His-BFRF1 需要pH值=3時，方能得到較為純淨的蛋白質(圖九C)。另外，亦以西方墨點法分析，配合 anti-BFRF1 抗體偵測，能在 urea buffer 中偵測為純化前的 BFRF1 蛋白訊號，接上 nickel beads以buffer 潤洗過程中都沒有 BFRF1 流出，直至 buffer pH 低於蛋白質等電點，Elution buffer 3 (pH=4)、Elution buffer 4 (pH=3) 中偵測到 BFRF1 蛋白訊號，因此得到純化後的 BFRF1 蛋白。利用此純化 BFRF1 病毒蛋白系統，未來可進一步純化大量的病毒蛋白。



4. 討論

4.1 HA-BFRF1 mutants 使衍生液泡減少的可能原因

在圖二結果中顯示，BFRF1 wildtype 與 Alix 蛋白的共位現象不明顯，是因為當 ESCRT 完成功能後即離開作用平面。Sanford M. Simon 研究團隊曾指出 ESCRT 在細胞中是動態的存在，甚至已被報導認為會和 ESCRT 結合的 HIV gag 蛋白，在細胞中要觀察到共位現象也僅有短暫的幾分鐘 (Jouvenet, et al. 2011)，因此要以免疫螢光染色影像觀察 BFRF1 與 Alix 的結合是較不容易的。另外有研究指出，在細胞與細胞間傳遞訊息時，會利用細胞蛋白 Syntenin 與 Alix 結合，Syntenin 會拉近 Alix 與細胞膜脂質間的距離，促進細胞擴展 (cell-cell extension)。同時在 HIV 中發現 gag 蛋白可以模仿 Syntenin 的功能，拉近 Alix 與細胞膜的距離，幫助 HIV 病毒 budding 釋出細胞外 (Sette, et al. 2016)。因此，BFRF1 可能拉近 Alix 與核膜的距離，幫助 BFRF1 產生核膜衍生液泡。一旦 BFRF1 突變後，LD1-2LA、PCM 及 2LA-PCM 可能因為無法拉近 Alix 與內核膜的距離，加上 BFRF1 由核膜將 Emerin 攜帶至細胞質的能力下降，導致 BFRF1 核膜衍生液泡減少或變小 (圖三)。

4.2 透過其他蛋白-蛋白結合試驗偵測 BFRF1 mutants 與 Alix 蛋白結合能力

前人與本論文中曾測試過 BFRF1 各種刪除片段以及突變質體，配合 Alix 三段功能區質體送入 HeLa 細胞中，觀察到 BFRF1 與 Alix Bro 功能區及 PRR 功能區的關係 (圖一、附錄三)，但反而 BFRF1 mutants 無法以免疫沉澱法比較出，和內生性 Alix wildtype 的結合能力為何 (圖四)。因為有鑑於 ESCRT 蛋白間或與其他蛋白質的結合時間是很短暫的，若要觀察動態或是相較之下結合能力較弱的蛋白，可能較不適合使用共同免疫沉澱法，因為共同免疫沉澱適合偵測蛋白間結合能力強且穩定的狀態 (Golemis 2002)。為了偵測動態結合蛋白可能須嘗試使用 Crosslinking Protein

Interaction Analysis，促進蛋白與蛋白間的結合穩定性。又或者是，效法 Fadila 研究團隊證明 HIV gag 功能區與 Alix 結合能力試驗，是利用同組蛋白表現 GST 標籤的 gag mutants，在細胞外以 GST-pull down assay 偵測，就不會受到 Alix 蛋白在細胞內動態結合影響 (Sette, et al. 2012)。


4.3 pLenti4-GFP-BFRF1 轉染初期與篩選為誘導穩定細胞株後的表現形態不同的原因

轉染細胞的特性即質體 DNA 不會遷入宿主染色體，在宿主細胞分裂時即會喪失質體 DNA，故在轉染後的四到六天即有可能無法偵測到目標訊號，但在轉染初期時轉染質體的蛋白表現量高。至於穩定細胞株因為利用化學藥物篩選，使細胞在環境壓力下被篩選為基因調控適當的穩定細胞株，一但篩選過程中有缺陷而失控表現 BFRF1 的細胞，會因為表現 BFRF1 使細胞生長狀態相較不佳，反而有逆篩選(negative selection)的效果，能承受藥物篩選壓力及BFRF1 缺陷表現 (leaky expression) 的情形，有可能使生存下來的穩定細胞株，相對比暫時轉染細胞的 BFRF1 表現量較低 (圖五C)，可能因此造成於細胞內的表現形態不同 (圖五)。

4.4 NA細胞以Rta質體轉染誘導進入融裂期，因誘導時間不同而使 extracellular EBV copy number有所差異

Vps4A-knockdown NA細胞以 Rta 誘導48小時的 extracellular EBV copy number 約 20000 /ml，與 shLuc 相似(圖六)，但當以 Rta 誘導72小時的 extracellular EBV copy number 約150000 /ml，高於 shLuc 將近6倍多 (圖七)，因此發現 Rta 會因為誘導時間而有所差異，回顧之前實驗室楊宗諭曾測試過誘導時間與DNA copy number 的關係，測驗結果顯示NA細胞誘導時間為72小時的 DNA copy number 最容易看出差異，以此考量，後續實驗皆以誘導72小時後觀察。

4.5 ESCRT-III 蛋白對於調控EB病毒殼體釋出的意義



在 knockdown Chmp1B 時，會使EB病毒釋出量下降（圖八），與預期結果相同，雖然目前的 ESCRT knockdown screening test（圖六、七、八）為一次性實驗結果，需再重複試驗以確定再現性。Chmp1p 在 ESCRT 膜剪切機制中屬於晚期活動蛋白，主要的生物性功能是與其他 ESCRT associated 蛋白結合（如 Ist1、Vta1），並吸引 Vps4 蛋白將 ESCRT 蛋白複合體分解，藉此調控Vps4的作用活性。利用 si-RNA 使 Chmp1p 表現量下降，會抑制細胞質分裂（cytokinesis），造成細胞核多分葉現象(Bajorek, et al. 2009)。目前尚不能確定 Chmp1B 原有的生理機制是否直接與調控EB病毒的釋出相關，希望透過統整其他病毒與 ESCRT-III 的關係，或許會有一些規則。在表二統整當 knockdown ESCRT-III 或送入 ESCRT-III dominant negative 後對其他病毒釋出量的影響 (Bartusch and Prange 2016; Pawliczek and Crump 2009; Prescher, et al. 2015; Tandon, et al. 2009; Urata and Yasuda 2012)。綜合以上資料目前僅顯示，對少數 DNA 病毒或是 RNA 病毒，在病毒穿越核膜或細胞膜時，ESCRT 膜剪切機制皆扮演著重要的角色。並且於表三中可以發現，當使部分ESCRT-III蛋白表現量下降，會影響到細胞本身的分裂與核膜修復，於是在這裡無法判定當以 shRNA 使 ESCRT-III 蛋白表現下降時，是影響了細胞的正常或是直接與病毒相關，其中的機制和影響層面還需要更深入的探討。

4.6 總結

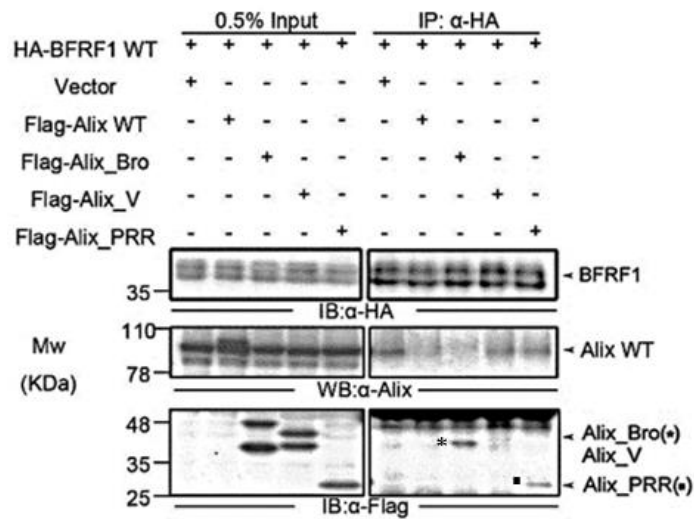
在本研究中證明了 BFRF1 會透過兩個功能區 LD1 與 ESR，跟 Alix 的 Bro 及 PRR 功能區結合。並且 BFRF1 因 ESR 功能區帶有正電胺基酸，以吸引細胞內的核酸，作為與 Alix 結合的媒介。BFRF1 與 Alix 結合後，便能拉近 Alix 與內核膜的距離，並由 ESCRT 膜剪切機制協助 BFRF1 產生衍生液泡。在以上實驗過程中也去探討和分析，在細胞內如何選用蛋白-蛋白結合性試驗，以觀察偵測蛋白動態結合的情形。亦建

立了 ESCRT screening test 實驗系統，目前粗糙的發掘許多 ESCRT-III 的成員，有可能會調控EB病毒的釋出，需要再進一步探討調控位置是在核膜或細胞膜上。對於 BFRF1 於病毒內的作用詳細機制尚待釐清，希望能透過偵測內生性 BFRF1，觀察其在病毒內的移動路徑及作用平面，故此，以細菌重組蛋白純化 BFRF1 蛋白，待未來有機會建構一高專一性的抗體，供更深入的研究。

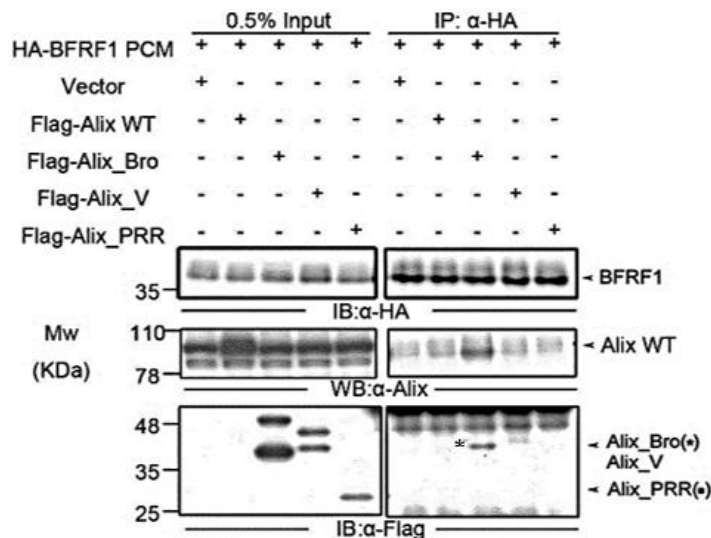
Figure



A



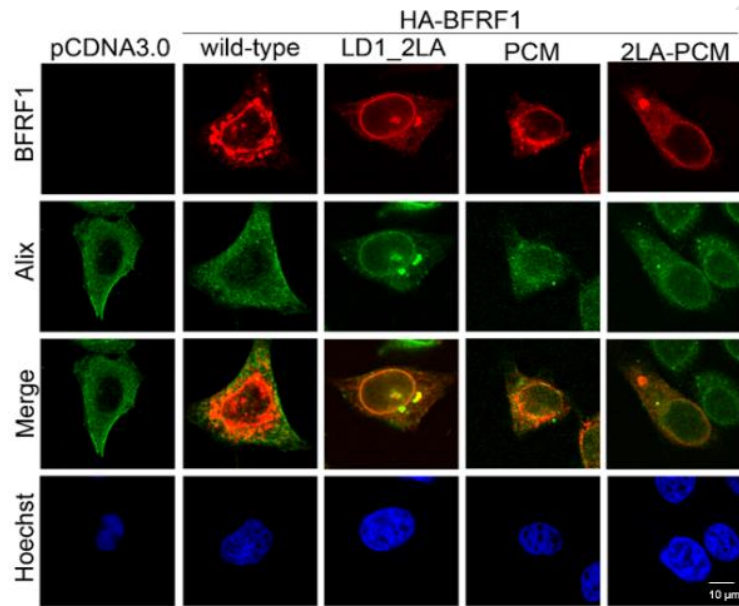
B



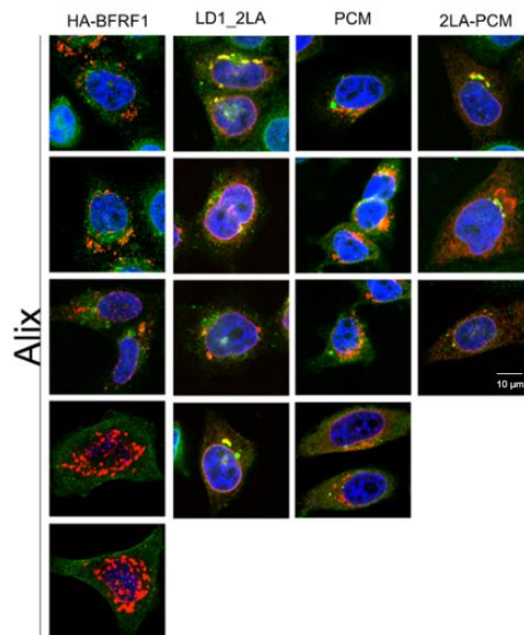
圖一、當 BFRF1 的 ESR 功能區正電胺基酸突變時，會影響 BFRF1 和 Alix PRR 功能區的結合能力

A 圖為在 HeLa 細胞已 Lipofectamine 轉染 HA-BFRF1 wildtype 質體與 Alix 帶有 Flag 標籤的功能區質體，在細胞內表現 24 小時，以 RIPA buffer 收取細胞萃取液。利用 anti-HA.11 (Covance) 抗體和 protein A beads 進行免疫沉澱，搭配西方墨點法分析，抗體使用 mouse anti-HA.11 (Covance, 10000 稀釋)、rabbit anti-Alix (Sigma-aldeich, 500 倍稀釋)、mouse anti-Flag M2 (Sigma, 5000 倍稀釋)。BFRF1 wildtype 會和 Alix 的 Bro、PRR 結合。(B) 然而，當 BFRF1 的 ESR 功能區正電胺基酸突變 (BFRF1 positive charge mutant, BFRF1 PCM) 時，BFRF1 和 Alix PRR 功能區的結合能力下降。

A



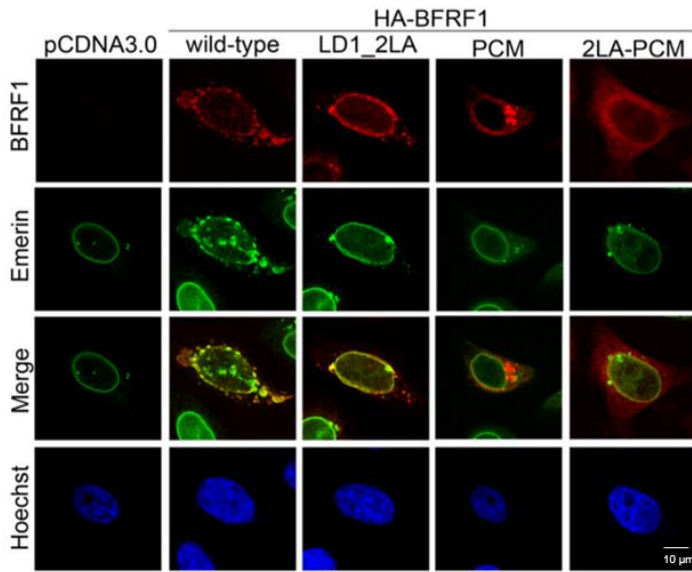
B



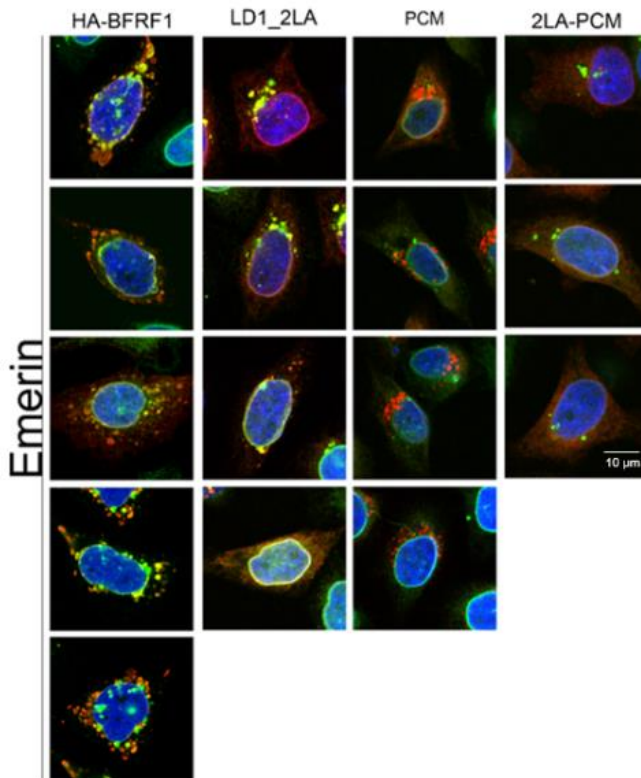
圖二、細胞內生性 Alix 與 HA-BFRF1 mutants 之分布情形

(A)將 HeLa 細胞培養於玻片上，以 Lipofectamine 轉染 HA-BFRF1 wildtype 及 mutants，表現 24 小時後收取玻片，以 4 % paraformaldehyde 固定細胞。以 rabbit anti-HA (Gentex GTX29110; 1000 倍稀釋)與 mouse anti-Alix (Gentex 3A9 ,GTX42812, 200 倍稀釋) 抗體作為一級抗體，anti-rabbit Ig-Rhodamine 及 anti-mouse Ig-FITC 抗體作為二級抗體逕行免疫螢光染色，使用共軛焦顯微鏡觀察細胞內生性 Alix 與 HA-BFRF1 mutants 之分布情形，紅色訊號為 HA-BFRF1 WT/mutants，綠色訊號為 Alix。(B)其他視野下 BFRF1 mutants 與 Alix 的共位現象。

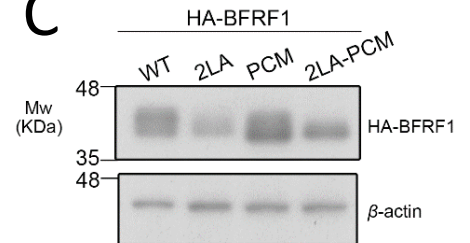
A



B

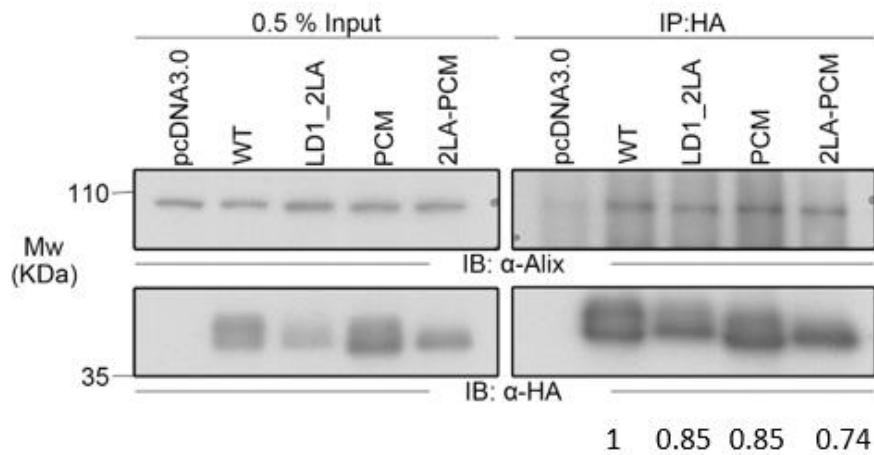


C



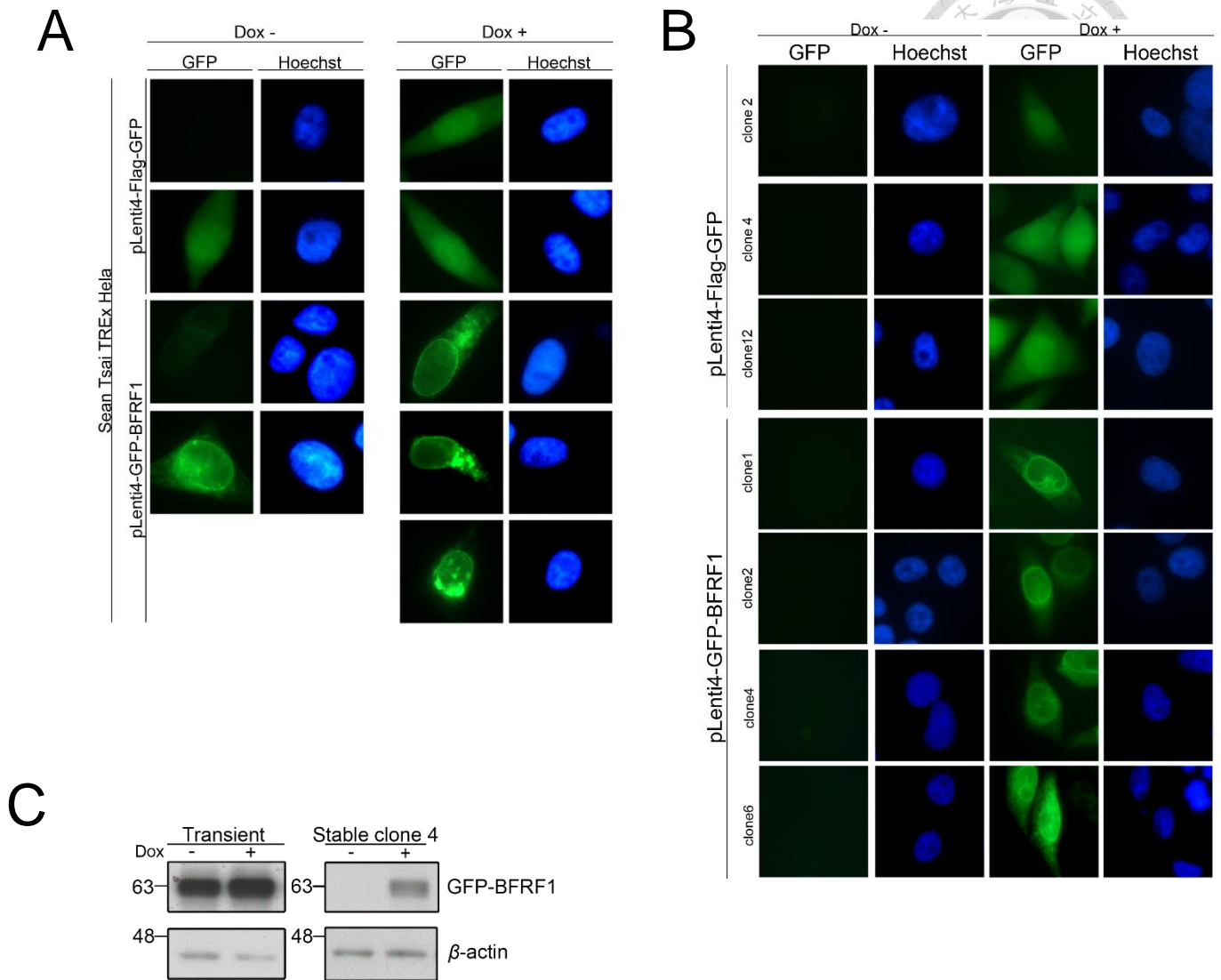
圖三、細胞內生性 Emerin 與 HA-BFRF1 mutants 之分布情形

(A)將 HeLa 細胞培養於玻片上，以 Lipofectamine 轉染 HA-BFRF1 wildtype 及 mutants，表現 24 小時後收取玻片，以 4 % paraformaldehyde 固定細胞。以 rabbit anti-HA (Gentex GTX29110; 1000 倍稀釋) 與 mouse anti-Emerin (Santacruz sc-25284; 100 倍稀釋) 抗體作為一級抗體，anti-rabbit Ig-Rhodamine 及 anti-mouse Ig-FITC 抗體作為二級抗體進行免疫螢光染色，使用共軛焦顯微鏡觀察細胞內生性 Emerin 與 HA-BFRF1 mutants 之分布情形，紅色訊號為 HA-BFRF1 WT/mutants，綠色訊號為 Emerin。(B)其他視野下 BFRF1 mutants 與 Emerin 的共位現象。(C)以西方墨點法確認 HA-BFRF1 WT/ mutants 在細胞內的表現量。



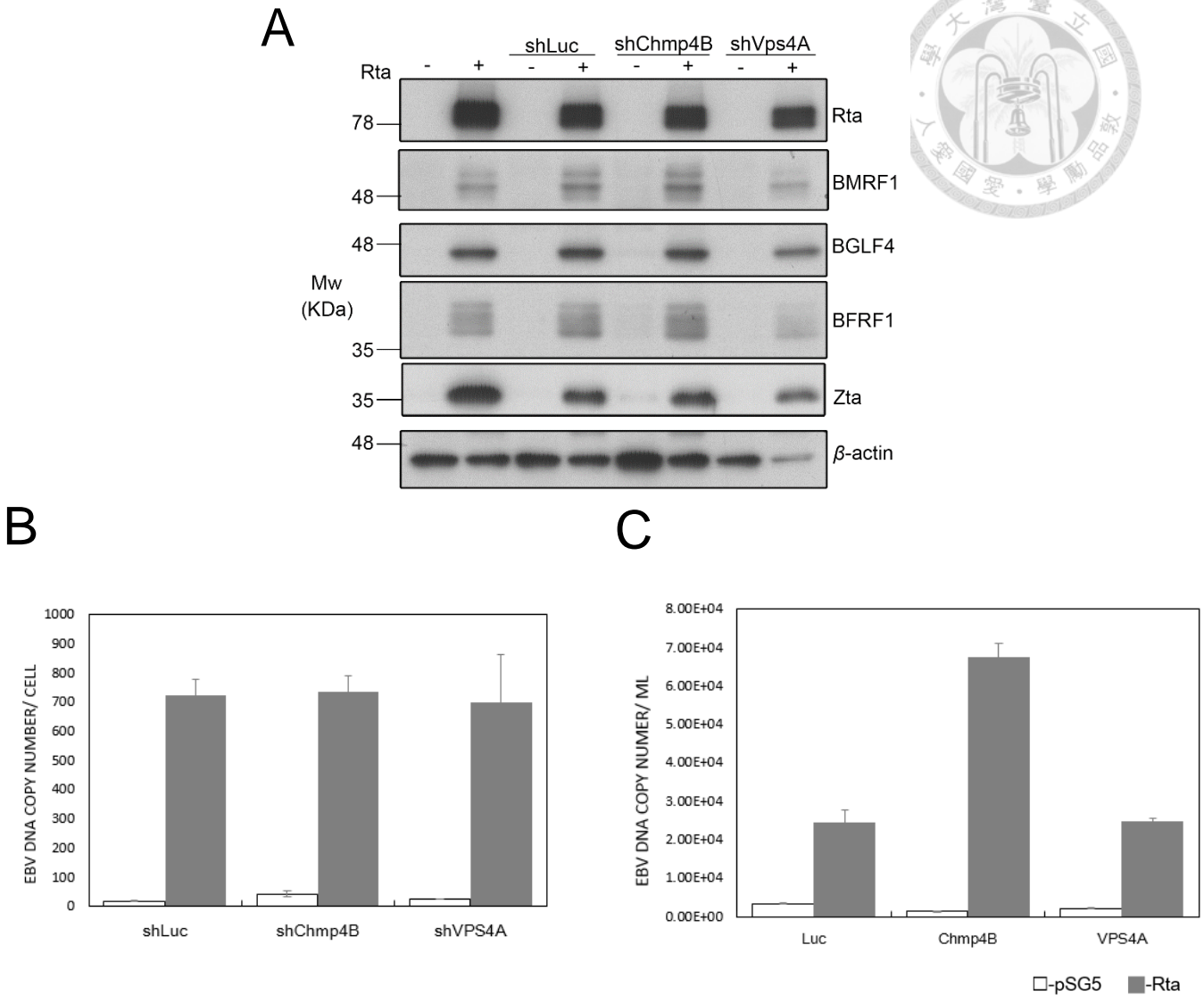
圖四、以免疫沉澱法偵測 BFRF1 mutants 與 Alix 蛋白結合能力

轉染 HA-BFRF1 及 BFRF1 mutants 於 HeLa 細胞中，培養 24 小時後以 RIPA buffer 取得細胞萃取液，讓細胞萃取液先與磁珠 (Protein A Mag sepharose™ Xtra) 混合 40 分鐘，去除非親和性結合，將萃取液取出後加入 1 μ g 的 anti-HA.11 (Covance)，4°C 混合 16 小時後，加入磁珠後反應 2 小時，以 NP40 及 1xPBS 潤洗磁珠，去除上清液後，加入 15 μ l 2x sample buffer，95°C 10 分鐘，使蛋白質變性。一級抗體為 mouse anti-HA.11 (Covance, 10000 倍稀釋)、rabbit anti-Alix (Sigma-aldeich, 500 倍稀釋) 執行西方墨點法。



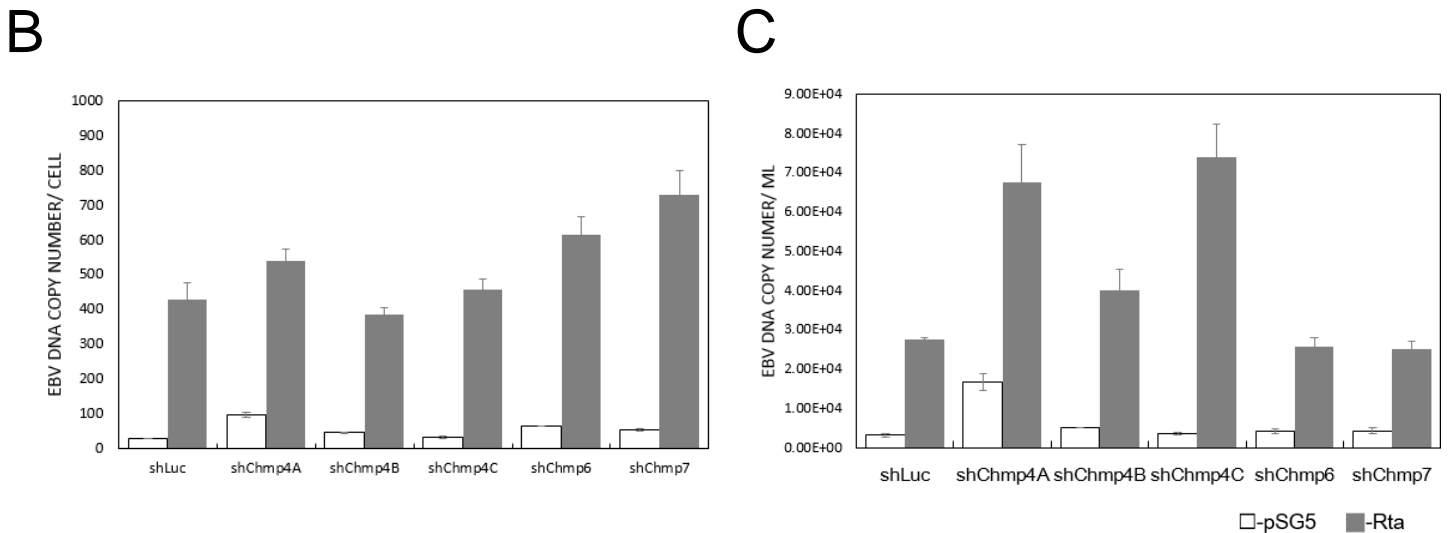
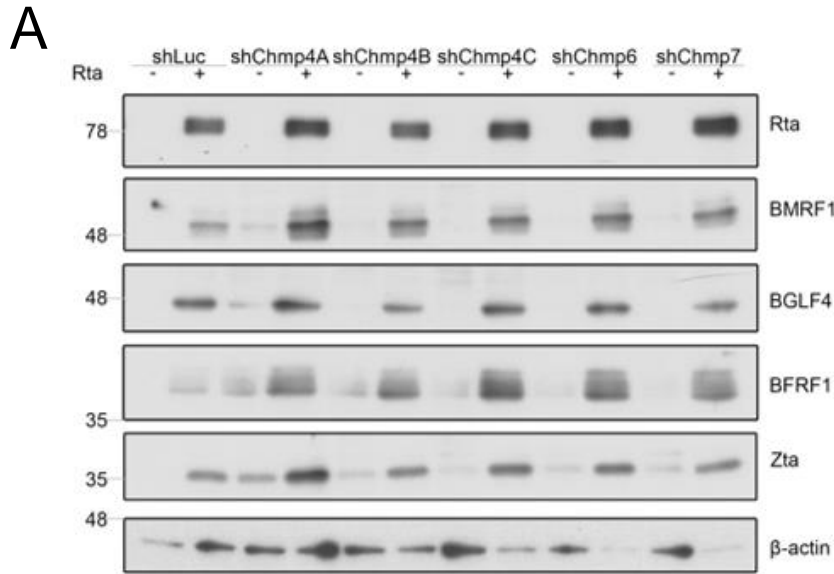
圖五、BFRF1 inducible plasmid 轉染至 T-REx HeLa 細胞，與藥物篩選後穩定細胞株的表現型態差異

(A) 將 T-REx HeLa 細胞培養於玻片上，以 Lipofectamine 轉染 GFP vector control 和 BFRF1 inducible plasmid，培養 6 個小時後，加入或不加 doxycycline 於培養液中，培養 24 小時後收取玻片，以 4% paraformaldehyde 固定，以 Hoechst 33238 (1000 倍稀釋) 染細胞核酸偵測細胞核。(B) 將 T-REx HeLa 細胞培養 10 cm 培養皿中，以 Lipofectamine 轉染 GFP vector control 和 BFRF1 inducible plasmid，培養 24 個小時後，以 Blasticidine 與 Zeocin 藥物篩選，挑出穩定單株群落細胞。將穩定單株群落細胞培養於玻片上，培養 16 個小時後，加入 doxycycline 藥物於培養液中，培養 24 小時後收取玻片，以 4% paraformaldehyde 固定，以 Hoechst 33238 (1000 倍稀釋) 染細胞核酸偵測細胞核。(C) 以西方墨點法確認 GFP-BFRF1 在轉染細胞及穩定細胞的表現量，收取細胞萃取液及執行西方墨點法的時間點不同，但以相同抗體 anti-GFP 稀釋倍數及曝光時間作比較。



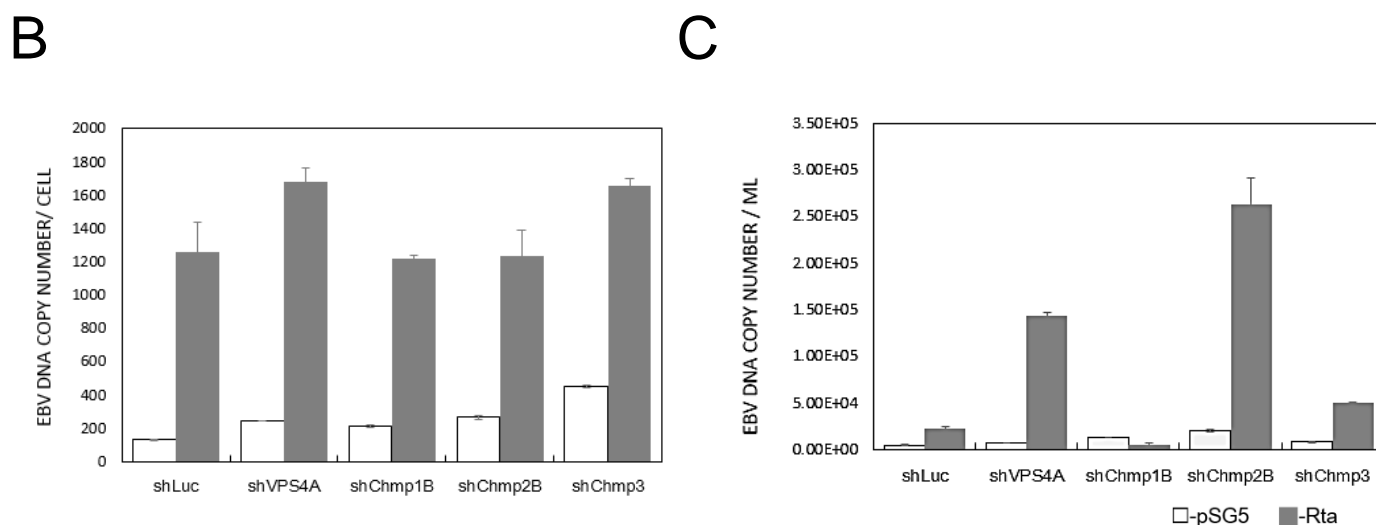
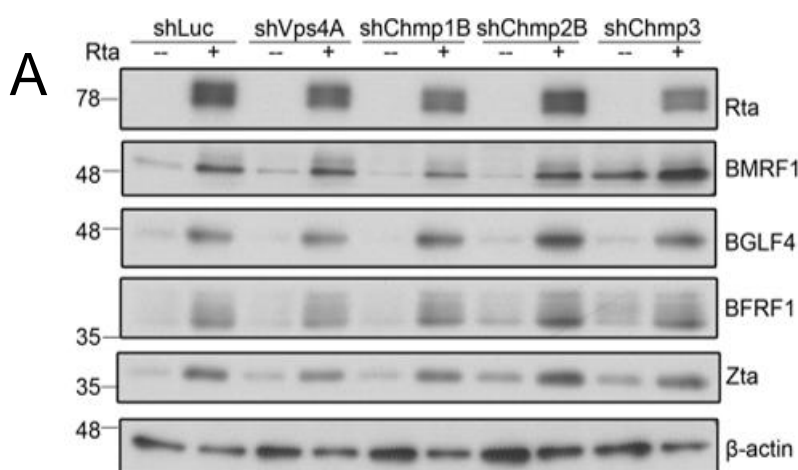
圖六、當 knockdown Chmp4B 和 Vps4A 對於 EBV 病毒複製與釋出的影響

此為一次性實驗結果。NA 細胞利用 shRNA 病毒感染兩天後，以 puromycine 篩選五天，於 6 well 培養皿中計數細胞 2×10^5 ，培養 16 小時後以 Lipofectamine 轉染 psg5 或 Rta，培養 48 小時後，收取細胞及培養液，(A)細胞利用 RIPA buffer 收取細胞蛋白萃取液，以西方墨點法偵測 NA 細胞被 Rta 活化後病毒蛋白的表現量。(B)細胞利用 Digestion buffer 裂解細胞，搭配使用 phenol/chloroform/IAA 將 genome DNA 沉澱純化後，以即時定量聚合酶連鎖反應(Quantitative polymerase chain reaction)，定量細胞內含有的 EBV DNA copy number。(C)收取培養液後先以 DNase I 去除破裂細胞所釋出的核酸，利用 QIAmp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN)純化 DNA，以即時定量聚合酶連鎖反應(Quantitative polymerase chain reaction)，定量每 ml 培養液內含有的 EBV DNA copy number。



圖七、當 knockdown Chmp4A、Chmp4B、Chmp4C、Chmp6 和 Chmp7 對於 EBV 病毒複製與釋出的影響

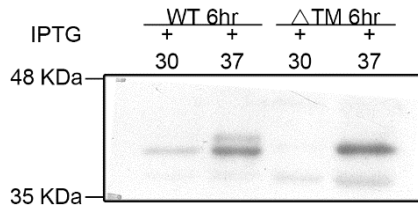
此為一次性實驗結果。Knockdown 的 NA 細胞以 puromycine 篩選五天後，計數相同細胞量，以 psg5 或 Rta 轉染並培養 72 小時，收取細胞及培養液，(A)細胞利用 RIPA buffer 收取細胞蛋白萃取液，以西方墨點法偵測 NA 細胞被 Rta 活化後病毒蛋白的表現量。(B)細胞利用 Digestion buffer 裂解細胞純化病毒 DNA，以即時定量聚合酶連鎖反應，定量細胞內 DNA copy number。(C)培養液以 DNase I 處理後 QIAmp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN) 純化 DNA，再以即時定量聚合酶連鎖反應定量每 ml 培養液內含有的 EBV DNA copy number。



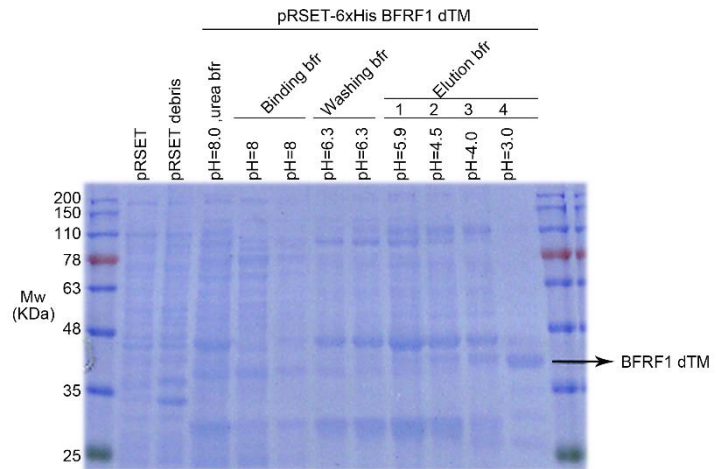
圖八、當 knockdown Vps4A、Chmp1B、Chmp2B 和 Chmp3 對於 EBV 病毒複製與釋出的影響

此為一次性實驗結果。NA 細胞利用 shRNA 病毒 knockdown Vps4A、Chmp1B、Chmp2B 或 Chmp3，以 puromycine 篩選五天後轉染 psg5 或 Rta，培養 72 小時後，收取細胞及培養液，收集樣本的方法與圖六、七相同(A)以 RIPA buffer 收取細胞蛋白萃取液，配合西方墨點法偵測活化後病毒蛋白的表現量。(B)細胞利用 Digestion buffer 進行沉澱純化 DNA，再由即時定量聚合酶連鎖反應細胞內 DNA copy number。(C)培養液先以 DNase I 處理，去利用 QIAmp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN) 純化 DNA，再以即時定量聚合酶連鎖反應定量每 ml 培養液內含有的 EBV DNA copy number。

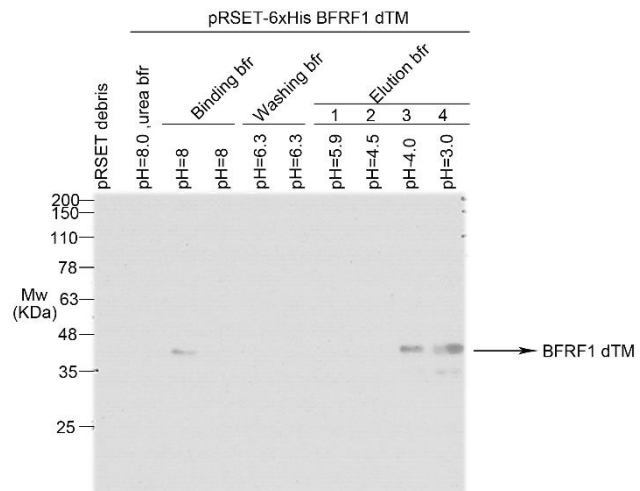
A



B



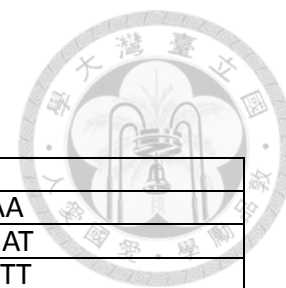
C



圖九、於 *E. coli* BL21 中可表現 His-BFRF1 蛋白，以尿素變性環境下純化 His-BFRF1 蛋白

(A) 將 pRSET-6x His-BFRF1 / dTM 轉形至 *E. coli* BL21，挑選新鮮單一菌落培養至 $OD_{600}=0.5$ ，加入 IPTG 分別以 30°C 或 37°C 誘導 BFRF1 蛋白表現 6 小時，離心去除上清液，以 Lysis Buffer 打破細菌細胞壁，配合超音波震盪儀。離心保留沉渣，protein sample buffer 溶解沉渣後，以西方墨點法分析蛋白於細菌內的表現量。(B) 將 pRSET-6x His-BFRF1 / dTM 轉形至 *E. coli* BL21，加入 IPTG 於 37°C 誘導 6 個小時，離心去除上清液，以 Lysis Buffer 打破細菌細胞壁，配合超音波震盪儀。離心保留沉渣，再以 membrane protein wash buffer、DNA wash buffer 潤洗細菌內涵體。將內涵體溶於 8M urea buffer 中，再混入 nickel beads，待鎳離子與 histidine 反應，透過調降 buffer pH 值，去除非親和性雜蛋白，再調降 buffer pH 值，至低於目標蛋白質等電點，將過程中潤洗過樣本的 buffer 收集後，利用 10% SDS-PAGE 及 coomassie blue 染色法觀察。(C) 利用西方墨點法分析純化蛋白是否為 BFRF1，以 BFRF1 antibody (500 倍稀釋) 做為一級抗體，可在溶解內涵體的 urea buffer 和 Elution buffer 3、4 中，偵測到 BFRF1 的訊號。

Table



Gene	Clone ID	Target seque
Chmp1B	TRCN0000158735	GATTTCTGCTTTGATGGACAA
	TRCN0000160848	GACCATGAATCTGGAGAAGAT
	TRCN0000160950	GACAAATTCGAGCACCAGTTT
	TRCN0000161212	GCACTCTTAGCTGGATTCTAA
	TRCN0000159294	GCTGGATTCTAAAGTTCTGTA
Chmp2A	TRCN0000139373	CCAGACACTCAAGTCCAACAA
	TRCN0000143522	GAAGATGAAGAGGAGAGTGAT
	TRCN0000138966	CTAGAGACCCAGGAGAAGAAA
	TRCN0000140662	CCTCAAGATCCAGACACTCAA
	TRCN0000142935	CCAGATCCAGAAGATCATGAT
Chmp2B	TRCN0000131086	GCTTACCATCTGCCTCTACTT
	TRCN0000130815	GCCTTAAATAGCACAGACCTA
	TRCN0000129922	GCAGCTTTAGAGAAACAAGAA
	TRCN0000130897	GCTTGACACCTGCCTTAAATA
	TRCN0000128433	GCAGTTAACAAGAAGATGGAT
Chmp3	TRCN0000379649	TCGCAAAGGGATTGTTCTTAT
	TRCN0000148119	GTGAAACGATCTGTGAAAGAT
	TRCN0000150106	CAAAGTCTTGTGAAGATTCCA
	TRCN0000149440	GATCAGGAAGAAATGGAGGAA
	TRCN0000381532	TGATGAAGGCTGGGATCATAG
Chmp4A	TRCN0000148217	GACAGAGAAGATACTGATCAA
	TRCN0000148454	CACAAACTGACGGGACATTAT
	TRCN0000319265	GACAGAGAAGATACTGATCAA
	TRCN0000319266	CACAAACTGACGGGACATTAT
	TRCN0000150154	GAGCTAAAGGAGGATAACTTT
Chmp4B	TRCN0000180330	CGGCACATTATCAACCATCGA
	TRCN0000147769	GTTAAGCAAGAAACAGGAGTT
	TRCN0000148126	GATGAGTTAATGCAGGACATT
Chmp4C	TRCN0000147799	GCGATGAAATCTGTTTCATGAA
	TRCN0000146312	CCAAGAAATCTCAGAAGCATT
	TRCN0000180929	GCAGAATAAGCGAGCTGCATT
	TRCN0000179242	GACAAATATCCGCCTTCCAAA
	TRCN0000179569	GATGGCACACTTTCTACCATT
Chmp6	TRCN0000155650	CACCAGGTGATGTCCATTGAA
	TRCN0000155830	CAAATAGAGCTGCCAGAGGTT
	TRCN0000153287	GCAGTTTGGAAATGAGTGTCT
	TRCN0000152314	CATGGTTCAGAGTATTGAGTT
	TRCN0000152980	GAGTATTGAGTTCACCCAGAT
Chmp7	TRCN0000156944	GAGGACCTTCTACTTGGTGTT
	TRCN0000153882	CCAGTCAATGACGTAGATGTT
	TRCN0000157929	CAGGAAGCAGAGAGGTGTAAG
	TRCN0000154211	CTTCAGGATACCACCAAAGAA
	TRCN0000156361	CTTCCTGTTCTCCGCTTTCAA

表一、RNAi core盤式病毒詳細資訊

Virus \ ESCRT-III	methods	1A	1B	2A	2B	3	4A	4B	4C	6	7	Vps4A	Vps4B	ref
HIV	siRNA			↓		↓		↓				↓	↓	Prescher, J. 2015
HCMV	Dominant negative	↓ (~0%)										↓ (10%)		Tandon, R. 2009
Arenaviridae	-						↓	↓	↓	↓		↓	↓	Urata, S. 2012
Murine Leukemia virus	siRNA	↓ (80%)		↓ (30%)				↓ (20%)				↓	↓	Bartusch, C. 2016
HSV	Dominant negative	↓ (2%)	↓ (2%)	↓ (2%)	↓ (2%)	↓ (2%)	↓ (10%)	↓ (2%)	↓ (10%)	↓ (16%)	↓ (10%)	↓ (2%)		Pawliczek, T. 2009
EBV	shRNA		↓ (50%)		↑	↑	↑	↑	↑			↑		

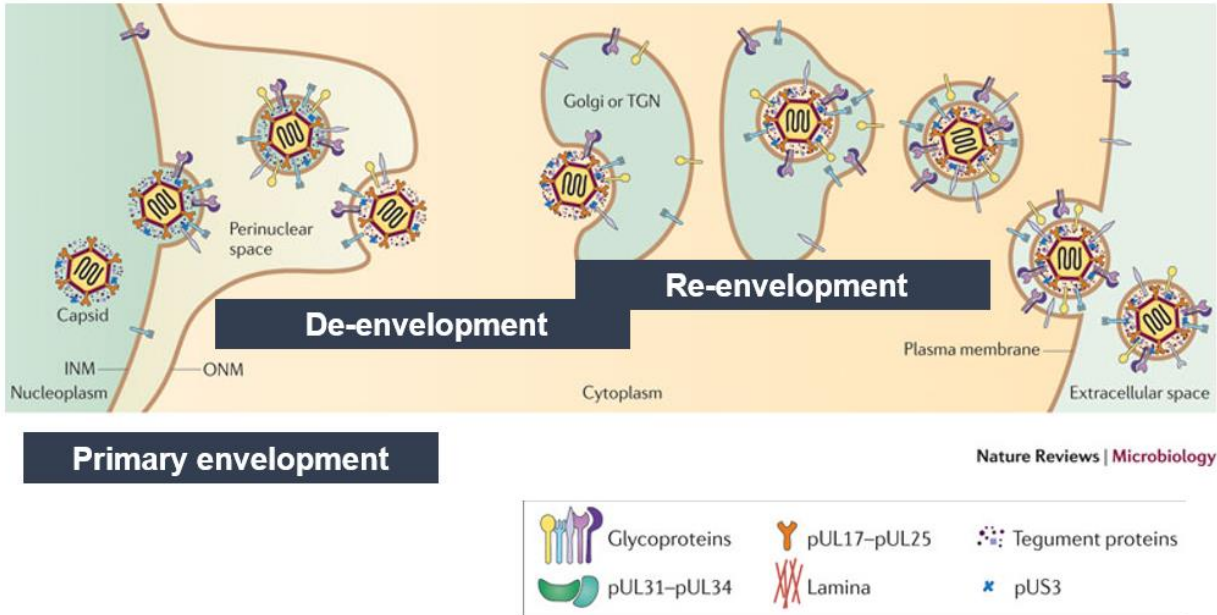
表二、ESCRT-III 利用siRNA使表現量下降或以dominant negative ESCRT-

III 使功能異常時對各類病毒釋出量的影響

cell \ ESCRT-III	1A	1B	2A	2B	3	4A	4B	4C	6	7	Vps4	ref
Nuclear envelope sealing			✓				✓			✓	✓	Marina, V.2015
DNA damage cluster			✓								✓	Marina, V.2015
Cell membrane repair							✓				✓	Scheffer LL, 2014

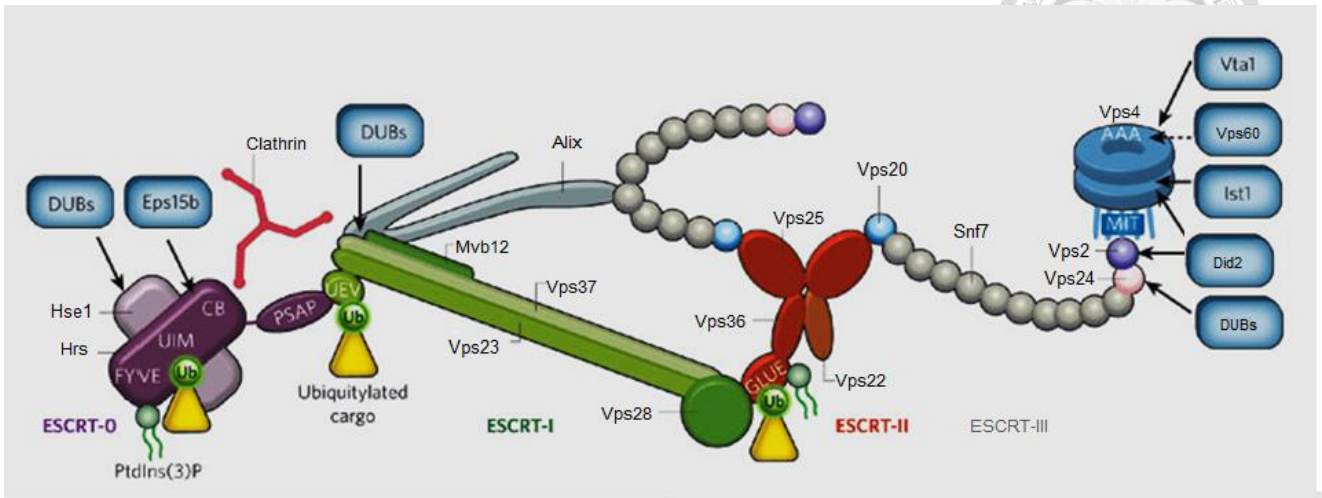
表三、ESCRT-III 利用siRNA使表現量下降時對細胞功能有影響的功能異常時
對各類病毒釋出量的影響

5. 附錄



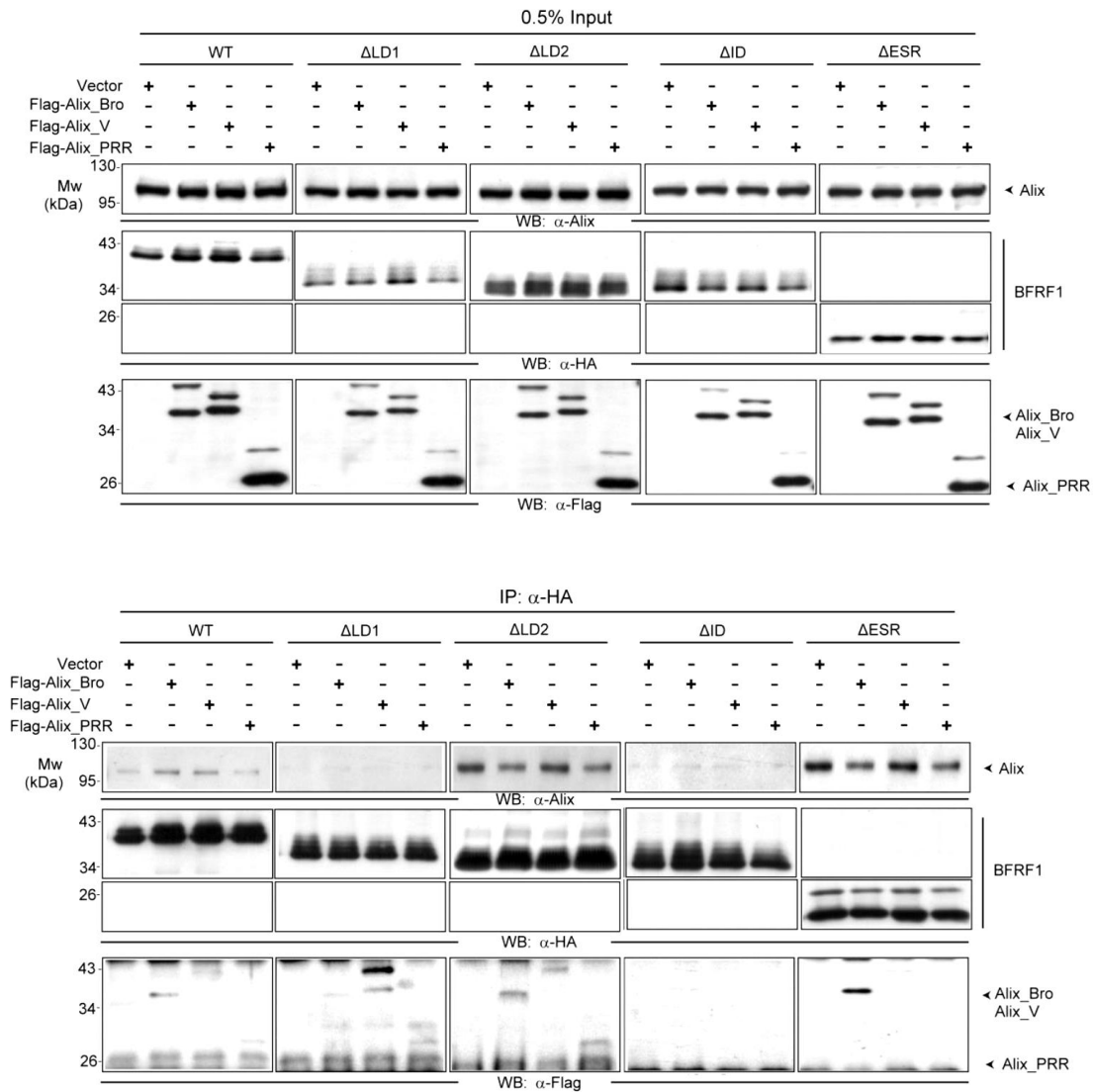
附錄一、人類單純皰疹病毒 HSV 進行出核的假說模型圖

單純皰疹病毒會藉由出核複合體 UL31/UL34 病毒蛋白協助，病毒殼體在宿主細胞內核膜做初次套膜化，宿主細胞外核膜做去套膜化，於宿主細胞的細胞質，利用細胞胞器膜(如 trans-Golgi network)替殼體做二次套膜化，包裹成成熟病毒顆粒，離開宿主細胞(Johnson and Baines 2011)。



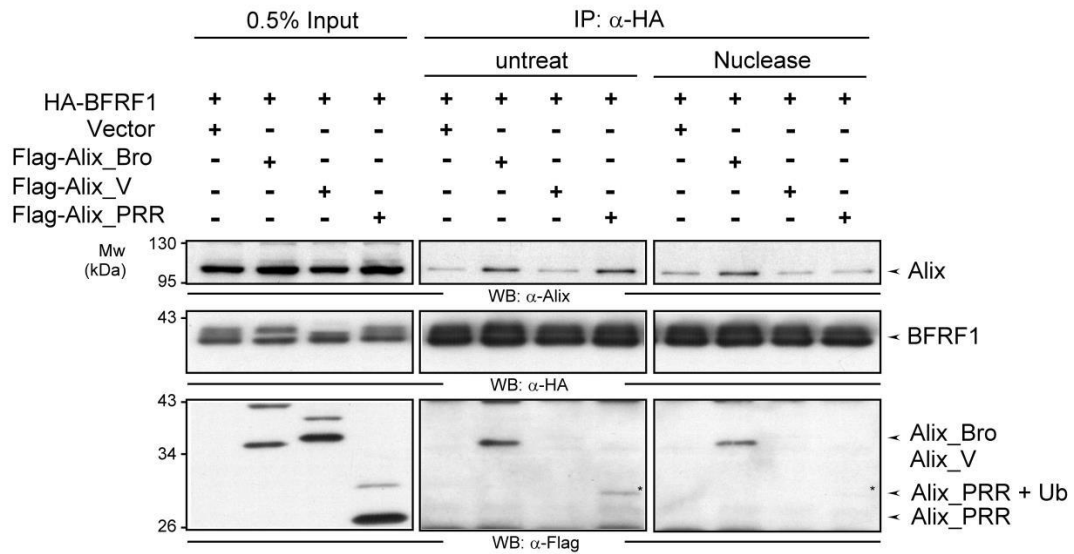
附錄二、ESCRT 模組中個別蛋白的結合方式與組成示意圖

ESCRT 蛋白主要分為五大群，有 ESCRT-0、ESCRT-I、ESCRT-II、ESCRT-III 以及 associated protein Vps4 等等，另外有 Alix 蛋白負責連接 ESCRT-I 與 ESCRT-III 蛋白，作為橋接蛋白質 (linkage protein) (Raiborg and Stenmark 2009)。



附錄三、HA-BFRF1 WT 及 deletion mutants 和 Alix 三個功能區的結合能力

在 HeLa 細胞中送入 BFRF1 分別去除功能區 LD1/LD2/ID/ESR 的質體與 Alix 的三個功能區 Bro/V/PRR 組合，表現 24 小時後，以 RIPA buffer 取得細胞萃取液，並以 anti-HA antibody 執行免疫沉澱試驗，在西方墨點法中以 anti-Alix，anti-HA 及 anti-Flag 偵測訊號(Liu 2014)。



附錄四、BFRF1 與 Alix PRR 功能區結合需要仰賴 nucleic acid

HeLa 細胞轉染 HA-BFRF1 及 Alix 三個功能區 Flag-Bro/ Flag-V/ Flag-PRR，表現 24 小時後以 RIPA buffer 收取細胞萃取液，利用 anti-HA antibody 執行免疫沉澱試驗，當磁珠上含有蛋白免疫沉澱複合體時，於 37 °C 環境下加入或不加入 200 U benzonase/ nuclease 反應 30 分鐘，再以 anti-Alix、anti-HA 和 anti-Flag 進行西方墨點法分析(Liu 2014)。



6. 參考文獻

Aubry, V., et al.

2014 Epstein-Barr virus late gene transcription depends on the assembly of a virus-specific preinitiation complex. *J Virol* 88(21):12825-38.

Baer, R., et al.

1984 DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310(5974):207-211.

Bajorek, M., et al.

2009 Biochemical analyses of human IST1 and its function in cytokinesis. *Mol Biol Cell* 20(5):1360-73.

Bartusch, C., and R. Prange

2016 ESCRT Requirements for Murine Leukemia Virus Release. *Viruses* 8(4).

Bigalke, J. M., and E. E. Heldwein

2015 Structural basis of membrane budding by the nuclear egress complex of herpesviruses. *EMBO J* 34(23):2921-36.

Biggar, R. J., et al.

1978 Primary Epstein-Barr virus infections in African infants. I. Decline of maternal antibodies and time of infection. *Int J Cancer* 22(3):239-43.

Blossom Damania, James Pipas

2009 DNA Tumor Viruses: Springer Science+Business Media.

Burke, A. P., et al.

1990 Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 3(3):377-80.

Burkitt, D

1958 A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* 46(197):218-223.

C. P. Lee, et al.

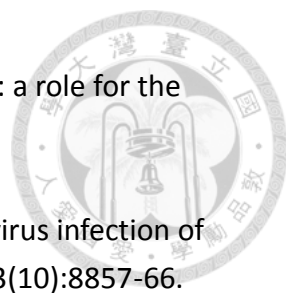
2007 Epstein-Barr virus BGLF4 kinase induces premature chromosome condensation through activation of condensin and topoisomerase II. *J Virol* 81(10):5166-80.

C. P. Lee, et al.

2012 The ESCRT machinery is recruited by the viral BFRF1 protein to the nucleus-associated membrane for the maturation of Epstein-Barr Virus. *PLoS Pathog* 8(9):e1002904.

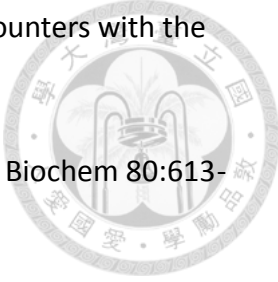
C. P. Lee, and M. R. Chen

2010 Escape of herpesviruses from the nucleus. *Rev Med Virol* 20(4):214-30.

- 
- Carlton, J. G., and J. Martin-Serrano
2007 Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316(5833):1908-12.
- Chang, Y., et al.
1999 Requirement for cell-to-cell contact in Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal carcinoma cells and keratinocytes. *J Virol* 73(10):8857-66.
- Chen, Y. J., et al.
2011 Epstein-Barr virus (EBV) Rta-mediated EBV and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic reactivations in 293 cells. *PLoS One* 6(3):e17809.
- Chesnokova, L. S., and L. M. Hutt-Fletcher
2014 Epstein-Barr virus infection mechanisms. *Chin J Cancer* 33(11):545-8.
- Demirov, D. G., et al.
2002 Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2):955-60.
- Dolyniuk, M., R. Pritchett, and E. Kieff
1976 Proteins of Epstein-Barr virus. I. Analysis of the polypeptides of purified enveloped Epstein-Barr virus. *J Virol* 17(3):935-49.
- El-Guindy, A., et al.
2014 A locus encompassing the Epstein-Barr virus bglf4 kinase regulates expression of genes encoding viral structural proteins. *PLoS Pathog* 10(8):e1004307.
- Epstein, M. A., B. G. Achong, and Y. M. Barr
1964 Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1(7335):702-3.
- Farina, A., et al.
2004 Intracellular localization of the Epstein-Barr virus BFRF1 gene product in lymphoid cell lines and oral hairy leukoplakia lesions. *J Med Virol* 72(1):102-11.
- Farina, A., et al.
2005 BFRF1 of Epstein-Barr virus is essential for efficient primary viral envelopment and egress. *J Virol* 79(6):3703-12.
- Fuchs, W., et al.
2002 The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *J Virol* 76(1):364-78.
- Garrus, J. E., et al.
2001 Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-

- 1 budding. *Cell* 107(1):55-65.
- Golemis, Erica
2002 *Protein-protein interactions: A molecular cloning manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gong, M., and E. Kieff
1990 Intracellular trafficking of two major Epstein-Barr virus glycoproteins, gp350/220 and gp110. *J Virol* 64(4):1507-16.
- Gonnella, R., et al.
2005 Characterization and intracellular localization of the Epstein-Barr virus protein BFLF2: interactions with BFRF1 and with the nuclear lamina. *J Virol* 79(6):3713-27.
- Granzow, H., et al.
2001 Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* 75(8):3675-84.
- Guizetti, J., et al.
2011 Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* 331(6024):1616-20.
- H. H. Lee, et al.
2008 Midbody targeting of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55. *Science* 322(5901):576-80.
- Hamirally, S., et al.
2009 Viral mimicry of Cdc2/cyclin-dependent kinase 1 mediates disruption of nuclear lamina during human cytomegalovirus nuclear egress. *PLoS Pathog* 5(1):e1000275.
- Hanson, P. I., and A. Cashikar
2012 Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28:337-62.
- Harley, C. A., A. Dasgupta, and D. W. Wilson
2001 Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles. *J Virol* 75(3):1236-51.
- Hatch, E., and M. Hetzer
2014 Breaching the nuclear envelope in development and disease. *J Cell Biol* 205(2):133-41.
- Henle, G., W. Henle, and V. Diehl
1968 Relation of Burkitt's tumor-associated herpes- γ type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59(1):94-101.
- Hertel, L.



- 
- 2011 Herpesviruses and intermediate filaments: close encounters with the third type. *Viruses* 3(7):1015-40.
- Hoelz, A., E. W. Debler, and G. Blobel
2011 The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem* 80:613-43.
- Johnson, D. C., and J. D. Baines
2011 Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol* 9(5):382-94.
- Jones, J. F., et al.
1988 T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 318(12):733-41.
- Jouvenet, N., et al.
2011 Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat Cell Biol* 13(4):394-401.
- Junying, J., et al.
2003 Absence of Epstein-Barr virus DNA in the tumor cells of European hepatocellular carcinoma. *Virology* 306(2):236-43.
- Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr
2001 Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106(2):145-55.
- Klupp, B. G., et al.
2007 Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(17):7241-6.
- Kuppers, R.
2003 B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 3(10):801-12.
- Lee, C. P., et al.
2008 Epstein-Barr virus BGLF4 kinase induces disassembly of the nuclear lamina to facilitate virion production. *J Virol* 82(23):11913-26.
- Lee, C. P., et al.
2012 The ESCRT machinery is recruited by the viral BFRF1 protein to the nucleus-associated membrane for the maturation of Epstein-Barr Virus. *PLoS Pathog* 8(9):e1002904.
- Lee, S. K., and R. Longnecker
1997 The Epstein-Barr virus glycoprotein 110 carboxy-terminal tail domain is essential for lytic virus replication. *J Virol* 71(5):4092-7.

Liu, Guan-Ting

2014 The mechanism of EBV BFRF1 induced nuclear envelope-associated vesicle formation and its regulatory role on nucleocytoplasmic transport, Graduate Institute of Microbiology Colloge of Medicine National Taiwan University Master Thesis, National Taiwan University.



Longnecker, E. Kieff, J. I. Cohen

2013 Chapter 61- Epstein-Barr virus. Volume 2.

Luitweiler, E. M., et al.

2013 Interactions of the Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus nuclear egress complex: ORF69 is a potent factor for remodeling cellular membranes. *J Virol* 87(7):3915-29.

Münz, Christian

2015 Current Topics in Microbiology and Immunology-Epstein Barr Virus. Volume 2: Springer International Publishing.

Makarova, O., E. Kamberov, and B. Margolis

2000 Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning step. *Biotechniques* 29(5):970-2.

Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz

2001 HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 7(12):1313-9.

Mauser, A., et al.

2002 The Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 induces expression of E2F-1 and other proteins involved in cell cycle progression in primary keratinocytes and gastric carcinoma cells. *J Virol* 76(24):12543-52.

McGeoch, D. J., F. J. Rixon, and A. J. Davison

2006 Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res* 117(1):90-104.

Mettenleiter, T. C.

2002 Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* 76(4):1537-47.

Mettenleiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow

2009 Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* 143(2):222-34.

Mettenleiter, T. C., et al.

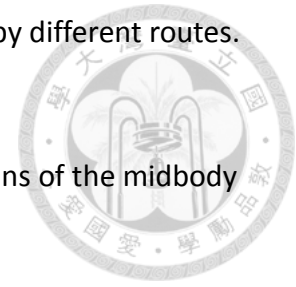
2013 The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. *Cell Microbiol* 15(2):170-8.

Miller, G., et al.

2007 Lytic cycle switches of oncogenic human gammaherpesviruses. *Adv Cancer Res* 97:81-109.

Miller, N., and L. M. Hutt-Fletcher

- 1992 Epstein-Barr virus enters B cells and epithelial cells by different routes. *J Virol* 66(6):3409-14.
- Morita, E., et al.
2007 Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J* 26(19):4215-27.
- Munoz-Alarcon, A., et al.
2007 Characterization of lamin mutation phenotypes in *Drosophila* and comparison to human laminopathies. *PLoS One* 2(6):e532.
- Muranyi, W., et al.
2002 Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* 297(5582):854-7.
- Old, L. J., et al.
1966 Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56(6):1699-704.
- Olmos, Y., et al.
2015 ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature* 522(7555):236-9.
- Park, J., et al.
2000 Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) open reading frame 36 protein is a serine protein kinase. *J Gen Virol* 81(Pt 4):1067-71.
- Park, J., et al.
2007 A novel protein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 36 inhibits cell spreading and focal adhesion kinase activation. *Intervirology* 50(6):426-32.
- Pawliczek, T., and C. M. Crump
2009 Herpes simplex virus type 1 production requires a functional ESCRT-III complex but is independent of TSG101 and ALIX expression. *J Virol* 83(21):11254-64.
- Prescher, J., et al.
2015 Super-resolution imaging of ESCRT-proteins at HIV-1 assembly sites. *PLoS Pathog* 11(2):e1004677.
- Q. Li, et al.
1997 Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* 71(6):4657-62.
- Raiborg, C., et al.
2001 Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J* 20(17):5008-21.
- Raiborg, C., and H. Stenmark



- 2009 The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458(7237):445-52.
-
- 2011 Cell biology. A helix for the final cut. *Science* 331(6024):1533-4.
- Reynolds, A. E., et al.
- 2002 Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol* 76(17):8939-52.
- Sachse, M., et al.
- 2002 Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell* 13(4):1313-28.
- Samson, R. Y., and S. D. Bell
- 2009 Ancient ESCRTs and the evolution of binary fission. *Trends Microbiol* 17(11):507-13.
- Sarisky, R. T., and G. S. Hayward
- 1996 Evidence that the UL84 gene product of human cytomegalovirus is essential for promoting oriLyt-dependent DNA replication and formation of replication compartments in cotransfection assays. *J Virol* 70(11):7398-413.
- Seigneurin, J. M., et al.
- 1977 Replication of Epstein-Barr virus: ultrastructural and immunofluorescent studies of P3HR1-superinfected Raji cells. *J Virol* 24(3):836-45.
- Sette, P., V. Dussupt, and F. Bouamr
- 2012 Identification of the HIV-1 NC binding interface in Alix Bro1 reveals a role for RNA. *J Virol* 86(21):11608-15.
- Sette, P., et al.
- 2016 HIV-1 Nucleocapsid Mimics the Membrane Adaptor Syntenin PDZ to Gain Access to ESCRTs and Promote Virus Budding. *Cell Host Microbe* 19(3):336-48.
- Shannon-Lowe, C., et al.
- 2009 Features distinguishing Epstein-Barr virus infections of epithelial cells and B cells: viral genome expression, genome maintenance, and genome amplification. *J Virol* 83(15):7749-60.
- Shtanko, O., et al.
- 2011 ALIX/AIP1 is required for NP incorporation into Mopeia virus Z-induced virus-like particles. *J Virol* 85(7):3631-41.
- Sixbey, J. W., et al.
- 1983 Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in



- vitro. *Nature* 306(5942):480-3.
- Sorem, J., and R. Longnecker
2009 Cleavage of Epstein-Barr virus glycoprotein B is required for full function in cell-cell fusion with both epithelial and B cells. *J Gen Virol* 90(Pt 3):591-5.
- Sundquist, W. I., and K. S. Ullman
2015 CELL BIOLOGY. An ESCRT to seal the envelope. *Science* 348(6241):1314-5.
- Suntharalingam, M., and S. R. Wentz
2003 Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev Cell* 4(6):775-89.
- Tandon, R., D. P. AuCoin, and E. S. Mocarski
2009 Human cytomegalovirus exploits ESCRT machinery in the process of virion maturation. *J Virol* 83(20):10797-807.
- Tovey, M. G., G. Lenoir, and J. Begon-Lours
1978 Activation of latent Epstein-Barr virus by antibody to human IgM. *Nature* 276(5685):270-2.
- Tugizov, S. M., R. Herrera, and J. M. Palefsky
2013 Epstein-Barr virus transcytosis through polarized oral epithelial cells. *J Virol* 87(14):8179-94.
- Urata, S., and J. Yasuda
2012 Molecular mechanism of arenavirus assembly and budding. *Viruses* 4(10):2049-79.
- Valencia, S. M., and L. M. Hutt-Fletcher
2012 Important but differential roles for actin in trafficking of Epstein-Barr virus in B cells and epithelial cells. *J Virol* 86(1):2-10.
- van Gent, M., et al.
2014 Epstein-Barr virus large tegument protein BPLF1 contributes to innate immune evasion through interference with toll-like receptor signaling. *PLoS Pathog* 10(2):e1003960.
- Vietri, M., et al.
2015 Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature* 522(7555):231-5.
- W. S. Tsai, et al.
1989 Seroepidemiological study of Epstein-Barr virus infection in children in Taipei. *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi* 30(2):81-6.
- Wang, W. H., L. K. Chang, and S. T. Liu
2011 Molecular interactions of Epstein-Barr virus capsid proteins. *J Virol*



- 85(4):1615-24.
- Weiss, L. M., et al.
1989 Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 320(8):502-6.
- Wideman, J. G., et al.
2014 The cell biology of the endocytic system from an evolutionary perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(4):a016998.
- Wisner, T. W., and D. C. Johnson
2004 Redistribution of cellular and herpes simplex virus proteins from the trans-golgi network to cell junctions without enveloped capsids. *J Virol* 78(21):11519-35.
- Y. E. Chang, and B. Roizman
1993 The product of the UL31 gene of herpes simplex virus 1 is a nuclear phosphoprotein which partitions with the nuclear matrix. *J Virol* 67(11):6348-56.
- Yates, J. L., N. Warren, and B. Sugden
1985 Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313(6005):812-5.
- Young, L. S., and A. B. Rickinson
2004 Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4(10):757-68.
- Yuan, J., et al.
2006 Virus and cell RNAs expressed during Epstein-Barr virus replication. *J Virol* 80(5):2548-65.
- zur Hausen, H., et al.
1978 Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Nature* 272(5651):373-5.

