

國立臺灣大學生命科學院微生物與生化學研究所

碩士論文

Institute of Microbiology and Biochemistry

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

Ku80 與 EB 病毒 Zta 蛋白質的功能研究

Ku80 and the Functions of Zta of Epstein-Barr Virus

陳建彰

Chien-Chang Chen

指導教授：張麗冠 博士

Advisor: Li-Kwan Chang, Ph.D.

中華民國 98 年 7 月

July, 2009

致謝

感謝指導教授張麗冠老師長久以來對我的栽培，猶記得大二下學期進入到老師的實驗室，從一開始的懵懂無知，到現在可以獨立設計實驗，一切都要感謝老師四年多來的教導與協助，讓我能不斷的成長和啟發。也要感謝熱心的學長姐洲維、永政、小犬、振家和宜君不厭其煩的帶領我做研究。而碩班兩年的生活感謝有雅君、雅筠、炳翰及好璇的陪伴，從實驗的討論到生活的點點滴滴，有你們的日子絕不孤單。感謝建忻跟我一起探討未知的領域，往往能提出不同的看法或點出我的盲點，使得研究能順利往前推進。還要感謝實驗室學弟妹們，讓實驗室充滿歡笑及淚水。另外也感謝劉世東老師、陳美如老師、張堯老師和張世忠老師幫我修改論文，口試時提出的問題和見解讓我獲益良多。此外還要感謝劉世東老師實驗室王文宏學長的協助，讓研究能順利進行。最後還要感謝我的家人，支持我順利完成碩士學位。



中文摘要

EB 病毒 (Epstein-Barr virus ; EBV) 屬於一種人類疱疹病毒，當病毒進入溶裂期會表現出極早期基因 BZLF1 並轉譯出 Zta 蛋白質，Zta 為一個多功能蛋白質，主要負責調控基因轉錄及將 DNA 複製相關的蛋白質聚集到複製起始點。為了探討 Zta 在細胞中是否與其它細胞內蛋白質結合，對 EB 病毒溶裂期機制造成影響，所以本研究利用 His pull-down assay 吸附細胞蛋白質並以 MALDI-TOF 進行蛋白質定序發現人類的 ATP-dependent DNA helicase II Ku80 會與 Zta 結合，接著進一步以共同免疫沉澱分析和 GST-pull down 證實了 Zta 會與 Ku80 在細胞內及細胞外結合並一起結合到 oriLyt 上，並且觀察到 Zta 以 C 端區域與 Ku80 的 N 端區域結合，也在 Ku80 缺陷的 P3HR1 細胞中觀察到 EB 病毒溶裂期 DNA 複製的下降，Ku80 也會與 Zta 和 EA-D 在細胞內結合。此外，利用冷光分析發現 Ku80 會增加 Zta 的轉錄活性。綜合以上，Zta 與 Ku80 結合後會進一步調控 EB 病毒溶裂期複製。

關鍵字：人類疱疹病毒第四型；Zta；Ku80；溶裂期；DNA 複製

Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) expresses immediate-early transcription factor Zta during the lytic cycle. Zta is a multifunctional protein that regulates gene transcription and recruits a replication complex at the lytic viral origin of replication. To identify cellular proteins that associate with Zta, this study performed His-Zta pull down analysis to precipitate cellular proteins and identified by MALDI-TOF a human ATP-dependent DNA helicase II Ku80 that interacts with Zta. Furthermore, Zta interacts with Ku80 *in vivo* and *in vitro*, forming a complex that binds to ZREs at the oriLyt. Furthermore, depleting Ku80 reduces EBV lytic DNA replication, showing the involvement of Ku80 in EBV lytic development. This study shows that the C-terminal domain of Zta interacts with the N- and M-domain of Ku80. Ku80 and Zta also interact with BMRF1 polymerase processivity factor, suggesting that Ku80 facilitates viral lytic DNA replication. In addition, Ku80 enhances the transcriptional activity of Zta. Taken together, this study found Ku80 involves in EBV lytic replication through an interaction with Zta.

Key word : Epstein-barr virus ; Zta ; Ku80 ; Lytic cycle ; DNA replication

目 錄

口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
前言.....	1
一、EB 病毒.....	1
二、EB 病毒的生活史.....	1
三、極早期基因 BRLF1.....	2
四、極早期基因 BZLF1.....	3
五、EB 病毒的潛伏期 DNA 複製.....	4
六、EB 病毒的溶裂期 DNA 複製.....	5
七、Ku 蛋白質.....	7
八、Ku 蛋白參與 DNA 雙股斷裂修補 NHEJ 路徑.....	7
九、Ku 蛋白質與 DNA 轉錄的調控.....	8
十、Ku 蛋白質與 DNA 複製的活化.....	9
研究目的.....	11
實驗方法.....	12
結果.....	20
一、細胞內與 Zta 結合的蛋白質分析.....	20
二、Zta 與 Ku80 在細胞內的結合.....	20
三、Zta 直接與 Ku80 結合.....	21
四、Zta 與 Ku80 的結合區域分析.....	21
五、Ku80 與 Zta 會結合到 EB 病毒的溶裂期複製起始點的 ZRE 序列.....	22
六、Ku80 與 Zta 會結合到 EB 病毒的溶裂期複製起始點 (oriLyt).....	24

七、 Ku80 與 BMRF1 polymerase processivity factor 在細胞內的交互作用...	25
八、 Ku80 缺陷時抑制 EB 病毒溶裂期 DNA 複製.....	25
九、 Ku80 活化 EB 病毒的 DNA 複製起始.....	26
十、 Ku80 強化 Zta 轉錄因子的活性.....	27
討論.....	29
參考文獻.....	50
附錄.....	64
圖目錄.....	35
圖 1: EB 病毒的生活史.....	35
圖 2: EB 病毒的溶裂期.....	36
圖 3: EB 病毒的溶裂期 DNA 複製起始區域的序列.....	37
圖 4: 細胞內與 Zta 結合的蛋白質.....	38
圖 5: Zta 與 Ku80 在細胞內的結合.....	39
圖 6: Zta 與 Ku80 為直接結合.....	40
圖 7: Ku80 與 Zta 的結合區域分析.....	41
圖 8: Ku80 與 Zta 會結合到 oriLyt 的 ZRE 序列上.....	42
圖 9: Ku80 與 Zta 形成複合體結合到 oriLyt 上.....	43
圖 10: Ku80 與 Zta 結合到 oriLyt 上.....	44
圖 11: Ku80 與 Zta 和 BMRF1 在細胞內的結合.....	45
圖 12: Ku80 缺陷的細胞導致 EB 病毒溶裂期 DNA 複製量的下降.....	46
圖 13: Ku80 促進 Zta 活化 EB 病毒溶裂複製的能力.....	47
圖 14: Ku80 促進 Zta 的轉錄活性能力.....	48
圖 15: Ku80 與 Zta 對 pBHLF1 和 pRp-ZRE 的影響.....	49
表目錄.....	64
附表.....	64

前言

一、 EB 病毒

Epstein-Barr virus (EBV)最早被 Anthony Epstein, Yvonne Barr 及 Bert Achong 三位科學家所發現，從 Burkitt's lymphoma 檢體所培養出的 EB3 細胞 (Epstein et al, 1964)，病毒以 Anthony Epstein 和 Yvonne Barr 命名，是人類皰疹病毒 (herpesvirus) gamma-herpesvirus 中的一員。EB 病毒的分佈非常廣泛，全世界大約有 90%的人口感染 (Young & Rickinson, 2004)。EB 病毒為雙股 DNA 病毒，可以轉錄出大約 85 種基因 (de Jesus et al, 2003)，其基因組被正二十面體的 capsid 包裹，外層還有一層 envelope。EB 病毒主要感染人類 B 細胞和口腔上皮細胞，人與人之間的傳染是透過唾液 (Niederman et al, 1976)。EB 病毒的感染和一些疾病像是鼻咽癌 (Nasopharyngeal carcinoma) (Andersson-Anvret et al, 1979)、Burkitt's 淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma) (Epstein et al, 1964)、何杰金氏病 (Hodgkin's disease) (Weiss et al, 1989)及移植後淋巴增生性疾病 (post transplant lymphoproliferative disorder; PTLTD)有關 (Thomas et al, 1990)。被感染的病人在幼年大部分是無症狀的，如果感染的時間是青春期或成年後，則容易引發傳染性單核球過多症 (infectious mononucleosis) (Crawford, 2001)。

二、 EB 病毒的生活史

EB 病毒的生活史可分為潛伏期 (latency)及溶裂期 (lytic cycle) (圖 1)，當 EB 病毒接觸到宿主細胞表面時，能被細胞的表面受器所辨認而結合，病毒的 envelope 與細胞膜融合釋出 capsid，接著 capsid 進入細胞質後，在核膜上會脫掉外層的 capsid 使 DNA 裸露出來，病毒 DNA 會進入核中，以 episome 的形式潛伏在細胞中 (Yates

& Guan, 1991)，但是當病毒受到 12-*O*-tetradecanoylphorbol (TPA) (zur Hausen et al, 1978)、sodium butyrate (SB) (Nutter et al, 1987)、trichostatin A (TSA) (Chang & Liu, 2000)、hypoxia (Jiang et al, 2006)等刺激可以誘導 EB 病毒從潛伏期進入溶裂期，一旦進入溶裂期，EB 病毒的溶裂週期可以分成三個階段，分別為極早期 (immediate early phase)、早期 (early phase)和晚期 (late phase)，BZLF1 和 BRLF1 是兩個病毒的極早期蛋白質，負責活化病毒或是宿主的啟動子 (Countryman et al, 1987; Countryman & Miller, 1985; Flemington et al, 1991; Miller et al, 1984; Rooney et al, 1989)，引發一連串的基因表現。而早期基因 (early gene, E)主要負責病毒的 DNA 複製，晚期基因 (late gene; L)則在 DNA 複製後開始製造病毒的結構蛋白質，組裝成病毒顆粒 (圖 1, 2)。

三、 極早期基因 BRLF1

Rta為605個胺基酸的轉錄因子，Rta的N端包含了DNA結合區域及雙聚化區域 (dimerization domain)，C端則為轉錄活化區域 (transactivation domain) (Manet et al, 1991)。Rta可以透過與Rta responsive element (RRE)序列的結合而活化啟動子 (Gruffat & Sergeant, 1994)。被活化的包括有BHLF1、BHRF1、BMRF1和BMLF1等啟動子 (Chevallier-Greco et al, 1989; Gruffat et al, 1992; Gruffat et al, 1990; Holley-Guthrie et al, 1990)，Rta也會透過MCAF1與Sp1結合到啟動子上的Sp1序列自我調控 (Chang et al, 2005)。此外，Rta會和Zta協同活化BRLF1和BMRF1 (Holley-Guthrie et al, 1990; Liu & Speck, 2003)，Rta活化BALF5則必須透過upstream stimulating factor (USF)和E2F (Liu et al, 1996)。先前本研究室證實Rta會被SUMO-1修飾後會促進轉錄活性，而RanBPM會與Ubc-9結合後，促進Rta的sumoylation因此強化Rta的轉錄活性 (Chang et al, 2008)，此外，在Rta表現的HEK293細胞中發現Rta會誘導細胞衰老 (cellular senescence) (Chen et al, 2009)。

四、 極早期基因 BZLF1

EB病毒極早期基因BZLF1，又稱為EB1、Zta、ZEBRA或Z。當EB病毒進入溶裂期後，Zta是最早表現的蛋白質之一，將Zta轉染到EB病毒潛伏的細胞中會使EB病毒由潛伏期進入溶裂期 (Countryman & Miller, 1985; Takada et al, 1986)。顯示Zta在活化上，扮演重要的角色。Zta為含有245胺基酸的蛋白質，約為35 kDa，包含了專一的區域分別負責基因轉錄活化、DNA結合和蛋白質之間的雙聚體化 (dimerization) (Flemington et al, 1992; Kouzarides et al, 1991)。Zta是basic-leucine zipper (bZIP)家族的一員 (Chang et al, 1990)，與c-Fos和C/EBP具有序列同源性 (Farrell et al, 1989; Kouzarides et al, 1991)，然而Zta不像AP-1家族中其他的蛋白質，Zta的雙聚體化區域缺少了七個重複的leucines，所以無法和其他AP-1家族的蛋白質形成異雙聚體 (heterodimer) (Chang et al, 1990)，Zta的carboxy-terminal domain位置以coiled-coil interaction形成homodimer (Flemington & Speck, 1990c; Kouzarides et al, 1991)，進而專一性的結合到ZRE (Zta responsive elements)序列上，而Zta結合到DNA上需要磷酸化的修飾 (Kolman et al, 1993)。ZRE與AP1結合序列類似，在很多EB病毒早期基因啟動子上皆有ZRE序列而受到Zta的調控 (Chang et al, 1990; Farrell et al, 1989; Lieberman et al, 1989; Quinlivan et al, 1993)。Zta的啟動子 (Zp)包含了Sp1、Sp3、myocyte enhancer factor 2D (MEF2D) (Bryant & Farrell, 2002)、AP1、ATF、CREB binding protein (CBP) (Adamson & Kenney, 1999)、C/EBP (Huang et al, 2006)及Zta的結合位置 (Speck et al, 1997)，而受到這些轉錄因子的調控。而Zta也會結合到自身的啟動子Zp上自我調控 (Flemington & Speck, 1990a; Sinclair et al, 1991)。此外，Zta會與TFIID-associated factors (TAFs)結合形成穩定的轉錄起始複合體 (Lieberman & Berk, 1994)，Zta也會藉由BHLF1上的ZRE序列活化BHLF1啟動子 (Lieberman et al, 1990)。Zta除了會活化病毒的基因，也會透過結合到宿主細胞的AP-1序列活化c-Fos、TGF- β ih3和TGF- β 1 (Cayrol & Flemington, 1995; Farrell et al, 1989; Flemington &

Speck, 1990b)。當Zta會與NF- κ B的次單位p65結合後則會抑制Zta的轉錄活性。另外，retinoic acid receptor (RAR)也會與Zta結合後抑制Zta的轉錄活性 (Sista et al, 1993)，因此Zta表現後會影響宿主細胞生理活性。

Zta除了扮演轉錄因子的角色，在缺乏EB病毒的上皮腫瘤細胞株 (epithelial tumor cell lines)中送入Zta表現會誘導p53、cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p21及p27的基因表現和hypophosphorylated pRb的累積，引發細胞週期G0/G1的停滯以抑制宿主細胞基因組的複製 (Cayrol & Flemington, 1996)。然而在EB病毒潛伏的B95-8 lymphoblastoid cell lines (B LCL)細胞中，當Zta被誘導使EB病毒進入溶裂期，會引發細胞DNA受損反應，DNA受損的感應因子MRN和磷酸化ATM會聚集到EB病毒複製區塊，將新合成出來的病毒DNA視為不正常的DNA，活化ATM-Chk2-p53的訊息傳遞 (Kudoh et al, 2005)，但是與潛伏期相比，溶裂期的p53、p21及p27表現量並沒有顯著改變，所以推測p53下游的訊息無法往下傳遞，並且觀察到屬於S-phase-promoting CDK (S-CDK)的cyclin E/A-CDK2活化，因此細胞週期的終止並不是透過p53和CDK inhibitors。此外又觀察到在溶裂期時細胞內的cyclin E/A表現量提高和hyperphosphorylated Rb累積，使細胞週期停留在late G1時期或early S-arrested時期，所以EB病毒進入溶裂期後，會營造出一個適合EB病毒DNA複製的環境並抑制宿主細胞DNA複製 (Kudoh et al, 2005)。

五、 EB病毒的潛伏期DNA複製

當EB病毒處於潛伏期，其genomic DNA是以封閉環狀質體存在，隨著宿主細胞DNA複製而複製 (Adams, 1987; Yates & Guan, 1991)，並平均的分配到子細胞中 (Kirchmaier & Sugden, 1995)。病毒DNA在宿主胞內的維持需要oriP (Yates et al, 1984)和Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA1) (Yates et al, 1985)，oriP是由兩段

EBNA1 的結合位 family of repeats element (FR)和 dyad symmetry element (DS) (Rawlins et al, 1985)所組成，DNA 複製起始於 FR (Gahn & Schildkraut, 1989)。雖然推測 EBNA1 為 EB 病毒 DNA 複製所必須，但是 EBNA1 並無的 helicase 活性 (Frappier & O'Donnell, 1991)，也沒有 ATPase 的活性 (Middleton & Sugden, 1992)。此外帶有 oriP 或是單獨 FR 或 DS 的質體，在缺乏 EBNA1 的細胞中仍然可以複製 (Aiyar et al, 1998)，因此病毒的複製需要借助宿主細胞的 DNA 複製機制。先前已證實帶有 oriP 質體複製時需要依靠細胞的 DNA 複製起始因子 ORC2 (origin replication complex)和 Cdt1 (Chromatin licensing and DNA replication factor 1) (Dhar et al, 2001)，ORC 會結合到 DS 的附近，EBNA1 與 ORC 在細胞內結合 (Schepers et al, 2001)，MCM replication licensing complex 其中一個次單位 Mcm2 也會與 oriP 結合 (Chaudhuri et al, 2001)。由以上推論，EB 病毒要在潛伏期進行 DNA 的複製，必須藉由病毒的蛋白質與宿主胞內蛋白質的結合，才能開啟 DNA 的複製。

六、 EB 病毒的溶裂期 DNA 複製

EB病毒進入溶裂期後，EBV genomic DNA會增加100~1000倍。EB病毒溶裂期 DNA複製需要複製起始點oriLyt的活化，而oriLyt包含了早期基因BHLF1和BHRF1的啟動子，並且有7個ZRE序列分布於oriLyt上 (Hammerschmidt & Sugden, 1988)，其中oriLyt上游的位置同時也是BHLF1的啟動子，包含ZRE1~4、TATA box和CCAAT box，而oriLyt下游的位置則屬於BHRF1啟動子，包含了ZRE5~7。溶裂期時Zta為最早表現的蛋白質，其功能為負責EB病毒的溶裂期DNA複製 (lytic DNA replication) 的起始，Zta會結合到oriLyt上的ZRE序列，引發EB病毒的溶裂期DNA複製 (Schepers et al, 1993)，ZRE1和ZRE2位於oriLyt的上游，介於TATA box和CCAAT box之間，ZRE3及ZRE4則位於鄰近的位置，ZRE5~7則位於oriLyt的下游 (圖 3)，溶裂期DNA複製的起始主要是依靠Zta結合到oriLyt上游BHLF1上的四個ZRE，而非下游

BHRF1的三個ZRE (Schepers et al, 1996)。除了Zta，已知BALF5、BMRF1、BALF2、BBLF4、BSLF1和BBLF2/3會參與溶裂期DNA複製 (Fixman et al, 1992)，其中BALF5基因轉譯出DNA Pol catalytic subunit (Tsurumi et al, 1993b)，BMRF1轉譯出DNA Polymerase accessory subunit (EA-D) (Tsurumi, 1993)。BALF5 DNA Polymerase catalytic subunit與BMRF1 polymerase processivity factor結合後，BMRF1 polymerase processivity factor會穩定DNA polymerase與primer template的穩定性並增加核苷酸的持續合成能力 (Tsurumi et al, 1993a)，BMRF1 polymerase processivity factor透過與Zta結合活化溶裂期DNA複製 (Zhang et al, 1996)，BALF2轉譯出single-stranded DNA-binding protein (Tsurumi et al, 1998)，BBLF4、BSLF1及BBLF2/3則分別轉譯出helicase、primase及helicase-primase associated proteins，這三個蛋白質會形成複合體 (Yokoyama et al, 1999)，而BALF5 DNA Polymerase catalytic subunit會進一步與BBLF4-BSLF1-BBLF2/3直接結合 (Fujii et al, 2000)，Zta會透過與BBLF4-BSLF1-BBLF2/3結合並聚集到oriLyt上 (Gao et al, 1998)。oriLyt下游的活化則是依靠細胞蛋白質ZBP-89及Sp1這兩個轉錄因子，辨識到oriLyt下游的TD序列並與DNA polymerase和BMRF1 polymerase accessory subunit結合形成DNA複製起始複合體 (Baumann et al, 1999)。此外，oriLyt上的CCAAT序列會被C/EBP蛋白質所辨識，強化EB病毒的DNA複製 (Huang et al, 2006)。Zta還會跟mitochondrial single-stranded DNA binding protein (mtSSB)結合而影響宿主細胞粒線體DNA複製 (Wiedmer et al, 2008)。由以上推論，EB病毒要在溶裂期進行DNA複製，必須藉由病毒的蛋白質跟宿主胞內蛋白質互動，才能開啟溶裂期DNA複製。

另外，細胞的核酸錯誤配對修復 (mismatch repair; MMR)中的MSH-2、MSH-6、MLH1及hPSM2會和PCNA一起聚集到EB病毒DNA的複製區塊 (Replication Compartments)並且和BMRF1 polymerase processivity factor結合 (Daikoku et al, 2006)，EB病毒的BKRF3與負責鹼基切除修復 (base-excision repair; BER)的

uracil-DNA glycosylases (UDGs)具有相類似活性，因此可能參與溶裂期 DNA 複製 (Lu et al, 2007b)。在核苷酸切除修復 (nucleotide-excision repair；NER)中負責偵測 DNA 損害的因子 xeroderma pigmentosum 會與 EB 病毒的 BGLF4 kinase 結合並參與 EB 病毒 DNA 複製 (Lu et al, 2007a)。同源性重組修補 (homologous recombination repair；HRR)的 replication protein A (RPA)、Rad51、Rad52 和 MRN 複合體也會參與 EB 病毒的 DNA 複製 (Kudoh et al, 2009)，因此，細胞 DNA 修補機制對於 EB 病毒溶裂期 DNA 複製扮演了重要的角色。

七、 Ku 蛋白質

Ku 最早是在 polymyositis-scleroderma overlap syndrome 病人血清中所發現的自體抗原 (Mimori et al, 1981)。在真核細胞中，Ku 蛋白質是由 Ku70 (X-Ray cross-complementing 6；XRCC 6)及 Ku80 (X-Ray cross-complementing 5；XRCC 5)兩個次單位所組成的異型二聚物 (heterodimer)。Ku70 及 Ku80 必須形成 heterodimer 之後才有 DNA 修復、抗細胞凋亡、調控基因轉錄、端粒 (telomere)的維持和 V(D)J 的重組的功能 (Downs & Jackson, 2004)。Ku70 由 609 個胺基酸組成，分子量為 69581 (Reeves & Stoeber, 1989)，Ku80 由 732 個胺基酸組成，分子量為 81914 (Yaneva et al, 1989)。Ku80 與 Ku70 結構相當類似，主要是由 N 端的 α/β domain，中間的 β -barrel domain 和 C 端的 helical terminal arm 所組成，當 Ku80 與 Ku70 形成 heterodimer 後，其 α/β domain 和 helical terminal arm 會與 DNA 修復相關的蛋白質結合，而 β -barrel domain 則非專一性的與 DNA 的 sugar-phosphate backbone 結合，進行 DNA 的修補 (Walker et al, 2001)。

八、 Ku 蛋白參與 DNA 雙股斷裂修補 NHEJ 路徑

當細胞受到 α -或 γ -放射線照射或是 B 細胞和 T 細胞進行 V(D)J recombination (Smider & Chu, 1997) 之後，會引起 DNA 雙股斷裂 (DNA double-strand break; DSB)。DNA 雙股斷裂會導致基因表現不穩定而引發疾病，為了因應這種狀況，人體的相對應機制就是 DNA 的修補，細胞偵測到 DNA 雙股斷裂後，會啟動 DNA 修補機制，利用非同源性末端接合 (non-homologous end joining; NHEJ) (Lieber et al, 1997) 或同源性重組修補 (homologous recombination repair; HRR) 將斷裂的 DNA 連接。其中 NHEJ 將斷裂的 DNA 末端修補連接時不須序列的同源性，在此機制中 DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) 扮演了重要的角色，而 DNA-PK 是由 Ku70/Ku80、catalytic subunit (DNA-PKcs) 所組成。首先 Ku70/Ku80 會先辨認到雙股 DNA 斷裂處，吸引 DNA-PKcs 與 Ku70/Ku80 連接形成 DNA-PK 複合體，DNA-PK 會將兩段 DNA 的斷裂處連接起來，並與 Xrcc4-ligase IV 組合成複合體。此時 DNA-PKcs 對 Ku70/Ku80、Xrcc4、ligase IV 進行磷酸化，使得兩股 DNA 進行黏合，完成 DNA 的修復 (van Gent et al, 2001)，當 DNA 修補完成後，DNA-PKcs 會進行 autophosphorylation 使其失去 kinase 的活性，接著整個複合體會從 DNA 修補處脫落 (Ding et al, 2003; Merkle et al, 2002; Uematsu et al, 2007)。顯示 Ku80 為 NHEJ DNA 修補路徑中重要的起始因子。

九、 Ku 蛋白質與 DNA 轉錄的調控

Ku 除了可以非專一性的結合到 DNA 末端，Ku 也可以專一性的結合到 DNA 序列上來調控基因的轉錄。在人類 T 細胞白血病病毒 (human T-cell leukemia virus; HTLV) 的長端點重覆序列 (long terminal repeat; LTR) 上的 U5 區域含有一段 27 個核苷酸的 USRE 序列可以被 Ku 蛋白質所辨識，進而抑制 HTLV 的轉錄活性 (Okumura et al, 1994)。另外，在老鼠乳腫瘤病毒 (Mouse mammary tumor virus; MMTV) 發現 Ku 蛋白質可以引發 DNA-PK 的聚集，結合到 MMTV 的 NRE1 (negative regulatory

element 1)序列上，抑制MMTV的轉錄活性 (Giffin et al, 1999; Giffin et al, 1996)。而在人類免疫缺乏病毒 (Human Immunodeficiency Virus; HIV)中則發現其LTR上的NRE序列，得以被Ku辨認而結合，進一步抑制HIV基因的表現 (Jeanson & Mouscadet, 2002)。在第一型單純性皰疹病毒 (Herpes simplex virus I; HSV-1)的晚期基因啟動子會被Ku70所辨識 (Petroski & Wagner, 1998)。在前列腺癌細胞中，雄性素接受體 (androgen receptor; AR)也被發現會與Ku結合，除了會活化prostate-specific antigen promoter，亦會再次循環活化AR自身的啟動子 (Mayeur et al, 2005)。Ku80會結合到Ku80結合位而抑制human xanthine oxidoreductase gene (*hXOR*)的表現 (Xu et al, 2004)。另外，Ku80會與NF90及Ku70動態結合到IL-2的啟動子上，進而活化IL-2 (Shi et al, 2007)。

十、 Ku 蛋白質與 DNA 複製的活化

DNA 重組、修補、複製及轉錄等反應都需要裂解 ATP 來產生化學能量，而 Ku 具有 ssDNA-dependent ATPase 的活性，DNA-PK 會藉由將 Ku 磷酸化使其活化 (Cao et al, 1994; Vishwanatha & Baril, 1990)。DNA helicase 負責將雙股 DNA 解旋成單股 DNA (Matson & Kaiser-Rogers, 1990)以利 DNA 複製的進行，Ku 也具有 ATP-dependent DNA unwinding activity，被分類為 human DNA helicase II (HDH II)。其中 Ku70 具有 helicase 活性而 K80 則無此特性 (Ochem et al, 1997)，相對於 DNA 沒有叉狀結構 (fork structure)或是 hanging tail (突出末端)，Ku 較偏好對 DNA 為類叉狀結構 (fork-like structure)的 DNA 進行解旋 (unwinding) (Tuteja et al, 1994)。當 Ku 進行解旋時必須被 DNA-PKcs 磷酸化 (Ochem et al, 2008)，此外，在進行細胞 DNA 複製時，Ku 也會辨識到複製起始點而結合並帶有解旋活性 (Matheos et al, 2002)。

Ku 會專一性結合到細胞 DNA 複製起始點 B48 (Toth et al, 1993)以及 ors8 上的 A3/4 序列 (Ruiz et al, 1999)。而 Ku 會與 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)一起結合到 DNA 複製起始位置上的 matrix attachment regions (Galande & Kohwi-Shigematsu, 1999)。Ku 也會結合到 Alu 序列上，調節 DNA 的複製 (Tsuchiya et al, 1998)。在 *Saccharomyces cerevisiae* 中，與 Ku 相似的蛋白質 OBF2 會結合到酵母菌的 DNA 複製起始點 ARS121 上 (Shakibai et al, 1996)。此外，當細胞週期進行到 G1/S 時，Ku 結合到 ors8 及 ors12 的量是 G0 的 5 倍，而進入到 S phase 後則下降到 2 倍，最後 G2/M phase 則降到近乎背景值 (Novac et al, 2001)。透過與其他複製相關蛋白質的結合 (Matheos et al, 2002)，並將 ORC 裝載到複製起始位上 (Sibani et al, 2005b)，指出 Ku 與 pre-RC 的形成有關，開啟 DNA 的複製。

Ku 除了與人類細胞的 DNA 複製起始有關外，目前已知在第一型單純性疱疹病毒 (Herpes simplex virus I ; HSV-1)中，其 DNA 複製複合體 (DNA replicative complex)包含了 Ku80、DNA-PKcs 和 RAD50，參與了 HSV-1 的 DNA 複製 (Taylor & Knipe, 2004)。另外，在卡波西氏肉瘤相關疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ; KSHV)的 DNA 複製起始複合物 (replicative initiation complex)中，也發現到 Ku70/80 和 DNA-PK 參與其中，其機制分為三個階段，首先細胞蛋白質 RecQL 及病毒蛋白質 RTA 和 K8 與複製相關蛋白質形成前複製複合物 (pre-replicative complex)聚集到複製起始點 oriLyt 上，並引起 DNA 構型的改變，接著吸引 MSH2/6 和 DNA-PK/Ku70/80 結合到 oriLyt 上形成 DNA 複製起始複合物病毒，以幫助 KSHV 進行溶裂期 DNA 複製 (Wang et al, 2008)。而 Adeno-associated virus 負責 DNA 複製功能的 Rep 也會與 Ku70/80 結合，並發現 Ku70/80 可以取代 MCM 的功能，引起 DNA strand displacement synthesis (Nash et al, 2009)。顯示 Ku 參與了數種病毒的 DNA 複製。

研究目的

病毒必須依賴宿主才得以生存，當 EB 病毒進入溶裂期後，最先表現出的 Zta 為一個多功能性的蛋白質，負責刺激病毒基因開始轉錄、開啟病毒 DNA 複製和抑制宿主的細胞週期。為了進一步了解 Zta 的功能，觀察宿主細胞有哪些蛋白質會與 Zta 結合來調控宿主細胞或病毒自身的生理週期。因此本研究利用 Zta 吸附到 Ku80 蛋白質，接著觀察到 Zta 和 Ku80 在細胞內結合並且形成複合體結合到 EB 病毒 DNA 複製起始點上活化 DNA 的複製，此外也觀察到 Ku80 會促進 Zta 的轉錄活性，所以 Zta 會利用 Ku80 調控 EB 病毒的生理週期。



實驗方法

菌種與細胞株培養

本研究中使用的大腸桿菌為 EPI-300 和 BL21，培養於含有抗生素的 LB 培養液中，37°C 培養箱中培養 12~18 小時。所使用的細胞株為帶有 EB 病毒潛伏的 B 淋巴細胞 P3HR1，以含有 10% 胎牛血清 (FCS) 和 2 mM L-Glutamine 的 RPMI 1640 培養液培養，293T 細胞株以含有 10% 胎牛血清 (FCS) 和 2 mM L-Glutamine 的 DMEM 培養液培養在 37°C，5% 二氧化碳的細胞培養箱中。

EB 病毒溶裂循環的誘導

取培養 20 小時以後的 P3HR1 細胞，加入 30 ng/ml TPA 及 3 mM sodium butyrate (SB) 處理，並於 37°C 培養 24 小時後收集細胞。200 µg/ml Phosphonoacetic acid (PAA) 的添加則抑制 EB 病毒 DNA 聚合酶的功能。



質體建構

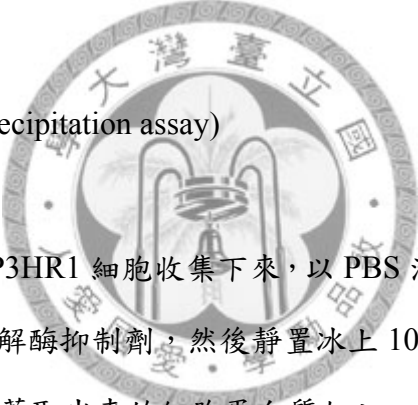
本實驗所使用質體如附表一

His pull down assay

首先以 IPTG 誘導 *E. coli* 表現出 His 融合蛋白質，接著以 buffer C (50 mM sodium phosphate pH 8.0, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM imidazole, 5 mM β -mercaptoethanol) 將菌體打破，接著加入 Ni-NTA agarose 50 µl，在 4°C 反應一小

時後，離心去掉上清液，另外將 1×10^7 的 P3HR1 細胞加入 TPA 及 SB，於 37°C 培養 24 小時後收集細胞，然後加入 mRIPA buffer (50 mM Tris-base pH 7.8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% Triton X-100) (Lin et al, 2004) 打破，接著加入 Ni-NTA agarose 30 μ l，於 4°C 反應一小時，離心取上清細胞萃取液，將已經與 Ni-NTA agarose 結合的 His 蛋白質與細胞萃取液混合在 4°C 反應 1 小時，接著以 mRIPA buffer 清洗 2 次及 mRIPA buffer 外加 0.1% deoxycholic acid 清洗 1 次，將多餘的蛋白質及非專一性結合的蛋白質去除，最後加入定量 2X SDS sample buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 10% β -mercaptoethanol, 20% glycerol, 4 mM EDTP, 0.01% bromophenol blue)，進行蛋白質電泳及 comassive blue G-250 染色分析。

免疫沉澱分析 (Immunoprecipitation assay)



將培養 24 小時後的 P3HR1 細胞收集下來，以 PBS 清洗一次，以 mRIPA buffer 回溶細胞並加入蛋白質水解酶抑制劑，然後靜置冰上 10 分鐘將細胞打破，再以 12000 rpm 離心 10 分鐘，萃取出來的細胞蛋白質加入 protein A/G agarose beads，在 4°C 旋轉 (rotation) 反應 1 小時，另取 protein A/G agarose beads 與特定的抗體 4°C 旋轉反應一小時使其結合，接著將細胞蛋白質與已結合上特定抗體的 protein A/G agarose beads 混合在一起，繼續在 4°C 旋轉反應 1 小時。反應完後，以 4°C，6000 rpm 離心 2 分鐘，去除上清液留下 beads，每次加入 0.5 ml 的 mRIPA buffer 清洗 3 次，每次在 4°C 旋轉反應 10 分鐘，最後加入 2X SDS sample buffer，在 95°C 反應 5 分鐘後，進行蛋白質電泳分析。

Glutathione S-transferase (GST) pull-down assay

首先以 IPTG 誘導 *E. coli* 表現出 GST 融合蛋白質，接著以 Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1% Tween 20, 1 mM DTT) 將菌體打破並加入 Glutathione Sepharose 4B (Amersham Bioscience) 於 4°C 反應一小時，離心後取出上清液，與純化的 GST 融合蛋白質或細胞萃取液在 NETN (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40) 中，4°C 反應 1 小時後，然後加入 30 μ l Glutathione Sepharose beads TM 4B 進行吸附，以 NETN 清洗 3~5 次，將多餘的蛋白質及非專一性結合的蛋白質去除，最後加入定量 2X SDS sample buffer，進行蛋白質電泳及西方點墨法分析。

DNA 親合性沉澱試驗 (DNA affinity precipitation assay)

將 1×10^7 的 P3HR1 細胞，以 TPA 及 SB 處理，並於 37°C 培養 24 小時後收集細胞，加入 mRIPA buffer 100 μ l，利用超音波震盪 10 sec/次，共震盪 3~5 次，然後以 12000 rpm 離心 5 分鐘，接著取出上清液並加入 900 μ l 的 DNA binding buffer (60 mM KCl, 12 mM HEPES pH 7.9, Tris-HCl pH 8.0, 4 mM Tris-HCl pH 8.0, 5% glycerol, 0.5 mM EDTA, 1 mM EDTA)，然後每管加入 Biotin 標定的探針 0.3 μ g，於 4°C 反應一小時，接著加入 streptavidin magnisphere paramagnetic particles (Promega) 在 4°C 反應一小時後去除上清液，將 streptavidin beads 加入 1 ml 的 DNA binding buffer 進行清洗 3 次，每次在 4°C 旋轉反應 10 分鐘，最後加入 2X SDS sample buffer，在 95°C 反應 5 分鐘後，進行西方點墨法分析。

快速核蛋白萃取製備 (Rapid Nuclear Factor preparation)

取培養 20 小時以後的 P3HR1 細胞，加入 TPA 及 sodium butyrate 處理，並於 37°C 培養 24 小時後收集細胞，細胞先以 PBS 清洗一次後，接著以 400 μ l buffer A

(10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT)將細胞輕輕的回溶，於冰上作用 15 分鐘後加入 25 μ l NP-40 並劇烈震盪數次，以 2000 rpm 離心 30 sec，接著去除上清液，剩下的 pellet 以 50 μ l buffer B (20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA 1 mM DTT)回溶並在冰上劇烈震盪 15 分鐘，以 12000 rpm 於 4°C 離心 5 分鐘，最後將萃取出核蛋白保存於-80°C (Schreiber et al, 1989)。

膠體電泳位移分析法 (Gel electrophoretic mobility shift assay ; EMSA)

本實驗參考 Pierce LightShift Chemiluminescent EMSA kit (Pierce, Rockford, IL) 使用手冊。萃取出核蛋白質先與 reaction buffer [1X binding Buffer, 2.5% glycerol, 5 mM MgCl₂, 50 ng Poly (dI•dC), 0.05% Np-40]混勻並加入抗體於冰上作用 15 分鐘，接著分別加入 biotin 標定探針 (hot probe)、未標記探針 (cold probe)與非特異性探針 (non-specific probe)在冰上作用 15 分鐘，然後於室溫反應 10 分鐘後加入 5X DNA loading dye 並進行 DNA 電泳，在電泳結束後，將 native polyacrylamide gel 取下以轉印溶液 (25 mM Tris-base, 183 mM glycine, 20% methanol)將 DNA 探針轉印到 Hybond N membrane 上，於 100 V 作用 1 hr，接著以 UV 燈於 120 mJ/cm² 固定 DNA 與 Hybond N membrane 的鍵結，然後以 blocking buffer 作用 15 分鐘，接著加入 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate 作用 15 分鐘以辨識 biotin 標定探針，並以 wash buffer 清洗 5 分鐘，總共清洗 4 次，接著加入 substrate equilibration buffer 作用 5 分鐘，最後加 chemiluminescent substrate 作用 5 分鐘讓 streptavidin 上的 HRP 和 chemiluminescent substrate 反應發出冷光，並以底片顯影進行分析。

染色質免疫沉澱分析 (Chromatin immunoprecipitation assay)

將 1×10^7 P3HR1 細胞，加入 TPA 及 SB 處理，並於 37°C 培養 24 小時後收集

細胞，以 1% formaldehyde 固定 DNA 與蛋白質之間的連接，室溫反應 15 分鐘，接著以 125 μ M glycine 作用 5 分鐘以終止反應，將細胞收取下來，以等體積 PBS 清洗 2 次，然後加入 650 μ l 的 lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1) 打破細胞，於冰上作用 20 分鐘後，加入 glass beads 0.1 g，利用超音波震盪 (Sonic Vibra cell TM, model VCX750) 10 sec/次，共震盪 120 次，使 DNA 斷裂成小於 500 bp 的片段，然後以 12000 rpm 離心 5 分鐘，取上清液，分成每管 100 μ l，各別加入 900 μ l 的 dilution buffer (0.01% SDS, 1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl)，並加入 30 μ l protein A/G agarose beads (20 μ g salmon sperm DNA, 1 mg BSA)，在 4°C 旋轉反應 1 小時，以 6000 rpm 離心 5 分鐘，另外取出 20 μ l 未經過免疫沉澱的 DNA 做為 internal control，接著加入抗體於 4°C 旋轉反應 1 小時或隔夜後，加入 protein A/G agarose beads (20 μ g salmon sperm DNA, 1 mg BSA) 25 μ l 進行免疫沉澱 1 小時，以 6000 rpm 離心 5 分鐘，分別利用 TSE-500 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.1, 500 mM NaCl) 清洗 4 次，LiCl/detergent (0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% DOC, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.1) 及 TE (pH 8.0) 等溶液清洗 2 次，每次 1 ml，在 4°C 旋轉反應 5 分鐘，接著以 250 μ l 的 elute buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃) 洗提 2 次，每次在室溫反應 15 分鐘，最後將 internal control DNA 和經過免疫沉澱的 DNA 在 65°C 靜置 4 小時，接著加入 10 mg/ml protease K，20 μ l 的 1 M Tris-HCl pH 6.8 和 10 μ l 的 0.5 M EDTA，於 45°C 靜置 1 小時，然後以 phenol/chloroform 和酒精沉澱萃取出 DNA 並以二次水 25 μ l 回溶 (Chang et al, 2005)，利用 real-time PCR 分析。

即時聚合酶連鎖分析 (Real-time PCR)

經過免疫沉澱的 DNA (IP DNA) 和 1/50 稀釋的 internal control DNA 以 Real-time PCR 進行定量，利用 SYBR green mix 及 real-time PCR (Life Technologies, model ABI

48-well StepOne Real-Time PCR System)分析樣品的 Ct 值，每組 PCR 皆做 3 重複控制 PCR 的差異，並以相對定量 ΔCt 比較實驗組和控制組，將 3 重複的數值平均後，每組 IP DNA Ct 值減去相對應的 Input DNA Ct 值，計算出 ΔCt 值，接著將實驗組的 ΔCt 值減去控制組的 ΔCt 值，計算出 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 值，並帶入公式 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 計算出倍數差異並定量。

穩定表現細胞株選殖 (stable clone selection)

本實驗所使用 RNAi 試劑及實驗方法參考自 National RNAi Core Facility Institute of Molecular Biology / Genomic Research Center, Academia Sinica (supported by the National Research Program for Genomic Medicine Grants of NSC)。在進行 DNA 轉型作用的前一天，將培養的細胞 293T 種植到 6 孔盤，每個 well 中的細胞數為 8×10^5 ，隔天細胞會長到大約 90-95% 滿，以 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 配製 DNA- Lipofectamine 2000 complex，將 pLKO.1-shRNA、pCMV- $\Delta\text{R8.91}$ 及 pMD.G (接受自台灣大學生命科學院生化科學所張茂山老師) 三個載體共同轉染到 293T 細胞中，培養 16 小時後將培養液置換成含有 1% (w/v) Bovine serum albumin 的 DMEM 培養液，置換培養液後每 24 小時收集含有 lentivirus 的培養液，共收集兩次，收集下來的 lentivirus 保存於 -80°C 。接著以 lentivirus 感染目標細胞 P3HR1，首先將 P3HR1 細胞種植到 6 孔盤每個 well 中的細胞數為，以含有 polybrene (8 $\mu\text{g/ml}$) 的 RPMI 進行培養，接著將 lentivirus 加到 RPMI 培養液中與 P3HR1 細胞混勻進行感染反應，並且於 24 小時後置換成含有 puromycin (4 $\mu\text{g/ml}$) 的 RPMI 進行篩藥，篩選數天後以西方點墨法分析蛋白質表現量。

EB 病毒 DNA 定量分析

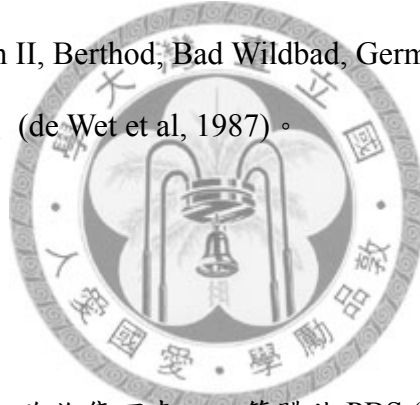
培養後的細胞收集下來後，以 lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂, 1% Tween-20, 1% NP-40, 1 mg/ml proteinase K) (Chang et al, 2002)將細胞打破，並且以超音波震盪數次，於 50%作用 2 小時，接著進行酒精沉澱，最後以 real-time PCR 定量 EB 病毒 oriLyt 片段和細胞 actin DNA 片段 (Wang et al, 2005)。

短暫細胞轉染報導基因分析 (transient transfection reporter assay)

在將 DNA 進行轉型作用的前一天，將培養的細胞 293T 種植到 24 孔盤，每個 well 中的細胞數為 5×10^4 ，隔天細胞會長到大約 60-70%滿，以 Lipofectamine 2000 (invitrogen)配製 DNA- Lipofectamine 2000 complex，進行轉型作用。培養 24 小時後，以冷光分析儀 (Orion II, Berthod, Bad Wildbad, Germany)觀察報導基因的表現以得知啟動子的活化程度 (de Wet et al, 1987)。

西方點墨法分析

將培養 24 小時後的細胞收集下來，以等體積 PBS (phosphate-buffered saline) 清洗，收下細胞後，加 500 μ l mRIPA buffer 並加入蛋白質水解酶抑制劑回溶細胞，置於冰上 10 分鐘將細胞打破，然後以 12000 rpm 離心 5 分鐘後，加入 sample buffer，於 95°C 5 分鐘將蛋白質 denature 並進行 SDS-PAGE 電泳，在電泳結束後，將 gel 取下以轉印溶液 (25 mM Tris-base, 183 mM glycine, 20% methanol)將蛋白質轉印到 Hybond C membrane 上，於 94 V 跑 1 hr，接著加入 5%脫脂奶粉 (安佳脫脂奶粉) blotting 20 分鐘，然後以 TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)清洗 3 分鐘，總共清洗 3 次，接著加入一級抗體作用 50 分鐘以辨識特定的蛋白質後，以 TBST 清洗 3 分鐘，總共清洗 3 次，然後加入二級抗體作用 30 分鐘以辨識一級抗體，以 TBST 清洗 3 分鐘，總共清洗 3 次，最後加入 chemiluminescent



substrate 500 μ l 作用 3 分鐘讓 secondary antibody 上的 HRP 會和 chemiluminescent substrate 反應發出冷光，並以底片顯影進行分析。本研究中所使用的抗體為抗 Zta 抗體 (Argene, Varilhes, France)、抗 Ku80 抗體 (Neomarker, CA, USA)、抗 GFP 抗體 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)、抗 BMRF1 抗體 (ABi, Columbia, MD)及抗 Tubulin 抗體 (Sigma)。

大腸桿菌的轉型作用

將 DNA 加到 competent cell，冰上靜置 30 min，heat shock 1.5 min 後，加入 500 μ l LB incubate 30 min，spin down 12000 rpm 1 min，吸掉多餘的的上清液，回溶菌液，取 150 μ l 菌液塗盤。

萃取質體 DNA

依照 Qiagen plasmid purification Kit，使用方法根據手冊說明。



蛋白質的誘導表現

將欲表現的質體 DNA 送入大腸桿菌 BL21 中，挑出單一菌落培養於含有抗生素的 LB 培養液中，37°C 培養 12~18 小時，取出 500 μ l 菌液加入 50 ml 含有特定抗生素的 LB 培養液中，於 37°C 培養至 OD600 約為 0.5~0.6 時，加入 1 mM 的 Isopropyl-B-D-thiogalactoside (IPTG)，並在 30°C 培養箱繼續培養 3~5 小時，誘導蛋白質表現。

結果

細胞內與 Zta 結合的蛋白質分析

Zta 為 EB 病毒溶裂期重要的極早期蛋白質，為轉錄因子之一，透過與病毒自身或宿主蛋白質的結合，可以調控宿主的生理活性，或是病毒的生活史週期 (Lu & Chen, 2006)。因此，為了探討細胞內有哪些未知的蛋白質會與 Zta 結合，形成複合體，首先將 P3HR1 細胞以 SB/TPA 刺激 EB 病毒進入溶裂期，在此環境下，利用 His-Zta pull down 吸附細胞內的蛋白質 (圖 4, lane 2)，以 His 融合蛋白質吸附細胞內的蛋白質 (圖 4, lane 1)和誘導後表現蛋白質的大腸桿菌萃取液 His-Zta (圖 4, lane 3)做為負控制組，相比較之後。在 80 kDa 的位置發現 His-Zta 吸附到一個蛋白質，將這個位置的蛋白質進行 in gel digestion 分析，再以 MOLT-TOF 蛋白質定序後，結果發現此蛋白質為 Ku80。

Zta 與 Ku80 在細胞內的結合

利用 *in vitro* His-pull down 分析篩選得到的 Ku80 蛋白質之後，接著以共同免疫沉澱法 (*in vivo* co-immunoprecipitation) 進一步證明 Zta 和 Ku80 是否會在細胞內結合。首先將 P3HR1 細胞以 TPA 和 SB 誘導 EB 病毒走向溶裂循環以備製細胞萃取物，然後以抗 Zta 抗體和抗 Ku80 抗體進行免疫沉澱 (圖 5)，再以西方點墨法抗體偵測，結果發現 Zta (圖 5A, lane 4) 可以被抗 Zta 抗體免疫沉澱 (圖 5A, lane 4)，也可以被抗 Ku80 抗體共同免疫沉澱 (圖 5A, lane 3)。此外，抗 IgG 抗體卻無法免疫沉澱 Zta (圖 5A, lane 2)。如果以抗 Ku80 抗體免疫沉澱，結果發現可以免疫沉澱到 Ku80 (圖 5B, lane 4)，而 Ku80 也可以被抗 Zta 抗體免疫沉澱 (圖 5B, lane 3)，抗 IgG 抗體則無法免疫沉澱 Ku80 (圖 5B, lane 2)。顯示 Zta 會和 Ku80 結合。

Zta 直接與 Ku80 結合

觀察到 Zta 與 Ku80 在細胞內的結合後，接著想要探討其中的結合關係是直接結合或是透過其他蛋白質的參與，因此利用 GST-pull down assay 分析。首先以 IPTG 誘導 *E. coli* 表現出蛋白質，然後以 Glutathione-Sepharose beads 將 GST 蛋白質和 GST-Zta 融合蛋白質吸附，接著加入 His-Ku80 蛋白質，清洗數次後，以西方點墨法分析，結果發現 GST-Zta 蛋白質可以吸附到 His-Ku80 蛋白質，而 GST 蛋白質則無法吸附 His-Ku80 蛋白質 (圖 6A)。另外以 Glutathione-Sepharose beads 吸附 GST 蛋白質和 GST-Ku80 蛋白質，接著加入 His-Zta 蛋白質，經過數次清洗後以西方點墨法分析，也發現 GST-Ku80 蛋白質可以吸附到 His-Zta 蛋白質，而 GST 蛋白質則無法吸附 His-Zta 蛋白質 (圖 6B)。因此證實了 Zta 與 Ku80 為直接結合的關係。

Zta 與 Ku80 的結合區域分析

得知 Zta 與 Ku80 為直接的結合關係後，接著欲探討 Zta 是以哪一段序列與 Ku80 結合。因此，首先構築表現三個 Zta 刪除突變株的 pEGFP-ZN、pEGFP-ZM 和 pEGFP-ZC (圖 7A)，然後將這些質體轉染到 P3HR1 細胞株中，並以空的載體 pEGFP-C2 表現 GFP 蛋白質做為負控制組。培養 24 小時後，收取細胞內蛋白質以西方點墨法分析。利用抗 GFP 可以抗體偵測 GFP、GFP-Zta、GFP-ZN、GFP-ZM 和 GFP-ZC 的表現 (圖 7B, lanes 1-5)，並以 Ku80 抗體進行免疫沉澱分析，再利用西方點墨法分析。結果發現 GFP-Zta 與 GFP-ZC 會與 Ku80 結合 (圖 7B, lanes 7, 10)，而 GFP-ZN 和 GFP-ZM 則不被 Ku80 所吸附 (圖 7B, lanes 8, 9)，因此證明 Zta 會以其 C 端的區域與 Ku80 結合。接著進一步探討 Ku80 是以哪一段序列與 Zta 結合，同樣構築三個 Ku80 的刪除突變株，分別為 pEGFP-KN、pEGFP-KM 和 pEGFP-KC (圖 7C)，使其表現出 GFP 融合蛋白質，將這些質體轉染到 P3HR1 細胞株中，同

時加入 SB 和 TPA 誘導 P3HR1 細胞表現 Zta 蛋白質，並以空的載體 pEGFP-C2 表現 GFP 蛋白質做為負控制組。培養 24 小時後，收取細胞內蛋白質以西方點墨法分析，利用抗 GFP 抗體可以偵測到 GFP、GFP-KN、GFP-KM 和 GFP-KC (圖 7D, lanes 1-4) 的表現，並以 Zta 抗體進行免疫沉澱分析，再利用西方點墨法分析，結果發現 GFP-KN 和 GFP-KM 會與 Zta 結合 (圖 7D, lane 6, 7)，而 GFP-KC 則不被 Zta 所吸附 (圖 7D, lanes 8)，所以證明 Ku80 會以 N 端 425 個胺基酸的區域與 Zta 結合。

Ku80 與 Zta 會結合到 EB 病毒的溶裂期複製起始點 (oriLyt) 的 ZRE 序列

Zta 與 EB 病毒溶裂期的 DNA 複製有非常密切的關係 (Schepers et al, 1993)，Zta 會專一性的辨認 ZRE 序列並且結合上去，因此推測 Ku80 與 Zta 結合後，可能會結合到溶裂期複製起始點 oriLyt 上。為了證實此假說，首先利用 DNA 親和性沉澱分析 (DAPA) 觀察 Ku80 是否會結合在 oriLyt 上。將 P3HR1 細胞以 TPA 和 SB 誘導 EB 病毒走向溶裂循環以備製細胞萃取物，接著將含有 Biotin 標定的 BHLF1 探針與細胞萃取物進行結合，其中 BHLF1 探針含有 oriLyt 上的 ZRE1 和 ZRE2 序列 (圖 3, 8A)，結果發現 Ku80 與 Zta 均會結合在 BHLF1 上的 ZRE 序列 (圖 8B)。另外利用將 BHLF1 上兩個 ZRE 序列突變的 mBHLF1 探針 (圖 8A)，進行 DNA 親和性沉澱分析，結果發現當 ZRE 突變後，Zta 與 Ku80 均無法結合到 mBHLF1 上。因此，Ku80 與 Zta 會一起結合到 oriLyt 的 ZRE 序列 (圖 8B)。

由於本研究已經觀察到 Zta 會與 Ku80 直接結合 (圖 6)，因此進一步以 *in vitro* DAPA 探討 Ku80 是否透過與 Zta 的直接結合，形成複合體而結合到 oriLyt 的 ZRE 序列上。首先將 *E. coli* (BL21) 表達的 His-Zta 與 BHLF1 探針進行結合分析，結果發現在 BHLF1 的野生型 ZRE 序列可以吸附到 His-Zta，而 BHLF1 沒有吸附到 His 蛋白質，接著利用 mBHLF1 上突變的 ZRE 序列做為控制組，則觀察到 His-Zta 無

法結合上去，以 His 蛋白質做為負控制組，而 mBHLF1 沒有吸附到 His 蛋白質 (圖 8C)。在觀察到 His-Zta 可以結合到 BHLF1 探針上後，接著同時加入 His-Ku80 和 His-Zta，觀察 Ku80 結合到 BHLF1 探針上是否需要 Zta 的參與，結果發現只有當 His-Zta 存在時，His-Ku80 才能結合到 BHLF1 探針上 (圖 8D)，而與 His-Ku80 一起加入 His 蛋白質，則沒有觀察 His-Ku80 結合到 BHLF1 探針上。此外，mBHLF1 無法吸附到 His-Zta 和 His-Ku80，亦無法吸附到 His 蛋白質和 His-Ku80。因此，Ku80 必須透過與 Zta 的直接結合，一起結合到 oriLyt 上的 ZRE 序列。

另外，本研究進一步以 EMSA 佐證結合到 oriLyt 上的複合體中是否包含 Zta 和 Ku80。首先將 SB/TPA 刺激後的 P3HR1 細胞收集下來並萃取出核蛋白質，然後與 biotin 標定的 BHLF1 探針 (Hot probe) 進行 EMSA 反應，輔以 200 倍和 400 倍的未標定 biotin 探針 (cold probe) (圖 9, lanes 3, 4)、特異性探針 (specific probe; 3ZRE) (圖 9, lanes 5, 6) 與非特異性探針 (non-specific probe; 3SP1) (圖 9, lanes 7, 8) 進行競爭結合來觀察蛋白質複合體結合到探針上。其中未標記探針為沒有 biotin 標定的 BHLF1 探針，特異性探針 3ZRE 為 oriLyt 上的 3 個 ZRE3 (圖 3) 序列所組成的探針，而非特異性探針 3SP1 是由 3 個 SP1 序列所組成的探針。結果發現，沒有加入核蛋白的控制組，探針可以移動到膠層的下方，不會有結合位移的產生 (圖 9, lane 1)。接著加入核蛋白與 biotin 標定 BHLF1 探針進行結合分析則觀察到 3 個結合位移的色帶 Shift 1、Shift 2 及 Shift 3 的產生 (圖 9, lane 2)，推測有三個不同的蛋白質複合體會結合到 BHLF1 上。此外，利用競爭探針進行競爭結合分析，結果發現當加入未標定 biotin 探針後，結合位移的 Shift 1、Shift 2 及 Shift 3 的強度皆有變弱的現象，並且隨著探針濃度增加時色帶變弱的情形亦趨明顯 (圖 9, lanes 3, 4)，證實了結合位移的產生是因為蛋白質複合體與 DNA 探針的結合。接著以特異性探針 3ZRE 進行競爭結合，隨著探針濃度增加時 Shift 1 也跟著變弱，但是 Shift 2 及 Shift 3 則沒有觀察到此現象 (圖 9, lanes 5, 6)。由於特異性探針 3ZRE 是 3 個 ZRE 序列組成，

所以推測蛋白質複合體 Shift 1 與探針的結合必須透過 ZRE 序列，shift 2 及 Shift 3 則否。最後以非特異性探針 3SP1 進行競爭結合分析，隨著探針濃度增加 Shift 1 及 Shift 3 皆不會改變此結合關係，但是 Shift 2 卻有變弱的現象。以上實驗證實了結合到 BHLF1 探針上會有 3 個結合位移，但是只有 Shift 1 會被 3ZRE 所競爭，因此推測蛋白質複合體 Shift 1 必須透過 ZRE 序列才能結合到 BHLF1 探針上。最後為了探討結合到 BHLF1 上的蛋白複合體包含了哪些蛋白質，所以加入抗 Zta 抗體和抗 Ku80 抗體進行 EMSA 反應。結果發現探針與蛋白質的結合位移由 shift 1 上升產生超級位移 (super shift) (圖 9, lanes 9, 10)，證明了結合到 oriLyt 上的蛋白質複合體 shift 1 包含了 Zta 和 Ku80 參與，而且這兩個蛋白質在屬於同一個複合體，而蛋白質複合體 shift 2 及 Shift 3 則沒有觀察到超級位移，因此這個複合體沒有 Zta 或 Ku80 參與其中。



Ku80 與 Zta 會共同結合到 EB 病毒的溶裂期複製起始點 (oriLyt)

本研究由 DAPA 和 EMSA 證實了 Zta 與 Ku80 會一起結合到複製起始點 oriLyt 的 ZRE 序列上。接著本研究利用 ChIP 佐證在細胞內時，Ku80 是否會與 Zta 一起結合到 EB 病毒 DNA 複製起始點 oriLyt 上。首先將 P3HR1 細胞以 SB/TPA 刺激後，誘導 EB 病毒由潛伏期進入溶裂循環。在 24 小時後，以 formaldehyde 固定蛋白質與 DNA 之間的鍵結，然後以抗 Ku80 抗體和抗 Zta 抗體進行免疫沉澱，並以 real time-PCR 分析蛋白質結合到的 DNA 序列上的量，以引子放大 BHLF1 的片段，並以不加抗體做為免疫沉澱的負控制組，利用相對定量 ΔC_t 進行分析，把免疫沉澱前的 DNA 當作 internal control，比較進行免疫沉澱前和免疫沉澱後的 DNA 量，結果發現與不加抗體的負控制組相比，利用抗 Ku80 抗體吸附下來的 DNA 約增加 5.27 倍，抗 Zta 抗體吸附下來的 DNA 約增加 8.22 倍，因此顯示 Ku80 和 Zta 在細胞內會結合到 oriLyt 上 (圖 10)。

Ku80 與 BMRF1 polymerase processivity factor 在細胞內的交互作用

本研究觀察到當EB病毒進入溶裂複製後，Ku80會與Zta一起結合到oriLyt上，因此Ku80可能參與了EB病毒的DNA複製。負責EB病毒DNA複製的複製複合體 (replication complex)由7個EB病毒的蛋白質所組成 (Fixman et al, 1992)，其中之一為EA-D，推測Ku80與負責EB病毒DNA溶裂DNA複製的BMRF1也會進行交互作用，因此以免疫沉澱法 (immunoprecipitation)探討Ku80是否參與了複製複合體而與EA-D在細胞內的結合。首先將P3HR1細胞以TPA和SB誘導EB病毒走向溶裂循環以備製細胞萃取物，然後以抗Zta抗體和抗Ku80抗體進行免疫沉澱 (圖 5)，再以西方點墨法抗體偵測，結果發現EA-D可以被抗Zta抗體免疫沉澱 (圖 11, lane 4)，也可以被抗Ku80抗體共同免疫沉澱 (圖 11, lane 3)。此外，抗IgG抗體卻無法免疫沉澱EA-D (圖 11, lane 2)。證明Ku80會與Zta及EA-D在細胞內結合。

Ku80 缺陷時抑制 EB 病毒溶裂期 DNA 複製

本研究觀察到 Ku80 參與了 EB 病毒負責 DNA 複製的複製複合體，接著為了探討 Ku80 在 EB 病毒溶裂循環所扮演的角色，進一步利用 lenti-virus 將 Ku80 的干擾性核糖核酸轉染到 P3HR1 細胞中，建立 Ku80 knock down 的穩定細胞表現系統，觀察 Ku80 基因剔除後，對 EB 病毒造成的影響。首先以 pLKO.1-XRCC5 (TRCN0000010467) 建立 Ku80 缺陷的 P3HR1 穩定細胞以及 pLKO.1 建立的 P3HR1 穩定細胞做為控制組，分別以 TPA 和 SB 誘導 EB 病毒走向溶裂期，另外利用沒有加入 TPA 和 SB 只加入 DMSO 做為控制組，以及加入 TPA、SB 和 Phosphonoacetic acid (PAA) 做為另一組控制組，其中 PAA 為疱疹病毒 DNA 聚合酶專一性的抑制劑 (Rickinson et al, 1978)。當加入 PAA 後，可以觀察到 EB 病毒的 DNA 複製下降。因此，將 P3HR1 細胞種植在 24 孔盤，每個孔洞種植 5×10^4 細胞數，加藥誘導 48

小時後將細胞收集下來後打破萃取出 DNA，接著以 real-time PCR 分析 oriLyt 片段和細胞的 actin DNA 相對量來定量 EB 病毒 DNA 的複製量。結果發現，當 pLKO.1 的控制組加入 SB/TPA 後，EB 病毒的 DNA 複製量上升至 25.6 倍。相比之下，Ku80 缺陷的 pLKO.1-XRCC5 穩定細胞加入 SB/TPA 誘導後其 EB 病毒 DNA 複製量下降至 2.4 倍。此外沒有加入 SB/TPA 的控制組則沒有 EB 病毒 DNA 的複製上升，而加入 PAA 的控制組則觀察到 EB 病毒的 DNA 複製受到抑制。因此在 Ku80 缺陷的 P3HR1 細胞中觀察到 EB 病毒溶裂期 DNA 複製會降低 (圖 12)。

Ku80 活化 EB 病毒的 DNA 複製起始

本研究由 ChIP 和 DAPA 得知 Ku80 會透過與 Zta 的結合而結合到 oriLyt 上，同時也觀察到 Ku80 缺陷時 EB 病毒的 DNA 複製大幅的下降 (圖 12)，因此推測 Ku80 參與了 EB 病毒的複製活化。已知晚期基因的活化必須在 EB 病毒溶裂複製之後進行，所以藉由晚期基因 BcLF1 啟動子的活化可以推知 EB 病毒的溶裂複製是否啟動 (Chang et al, 1998)。因此將 BcLF1 的啟動子和 oriLyt 一起建構到 pGEM-luc 載體上構築成 pVCAluc-ori (-) (Chang et al, 1998)，藉由螢光基因的表現觀察 BcLF1 啟動子的活性，來推知 oriLyt 是否活化。因此，藉由短暫細胞轉染報導基因分析的方式同時送入 pCMV-Zta 及 pGFP-Ku80，與單獨送入 pGL3-CMV 的控制組相比，觀察發現 pVCAluc-ori (-) 的活性上升大約 309 倍，隨著 pGFP-Ku80 送入的量上升，則可以上升至 539 倍 (圖 13)，單獨送入 pCMV-Zta 的控制組則上升 97.4 倍，此外只送入 pGFP-Ku80 的控制組則沒有觀察到 pVCAluc-ori (-) 啟動子的活化，以 pGEM-luc 做為負控制組，當送入 pGL3-CMV、pGFP-Ku80 或 pGL3-CMV-Zta 時皆沒有觀察到螢光基因的表現。因此在 Zta 存在時，Ku80 可以促進 Zta 活化 EB 病毒溶裂期的 DNA 複製。

Ku80 強化 Zta 轉錄因子的活性

pBHLF1 啟動子上面的四個 ZRE 序列可以被 Zta 辨識而結合上去，活化 pBHLF1 的表現或是溶裂期 DNA 的複製，所以在觀察到 Ku80 會與 Zta 一起結合到 pBHLF1 上的 ZRE 序列後 (圖 8, 9)，推測 Ku80 可能參與 Zta 調控的轉錄活性。因此，在沒有 EB 病毒感染的 293T 細胞株中，以短暫細胞轉染報導基因分析的方式同時送入 pCMV-Zta 及 pKu80-GFP。與單獨送入 pGL3-CMV 的控制組相比，觀察發現 pCMV-Zta 活化 BHLF1 啟動子的活性上升大約 17.8 倍，隨著 pKu80-GFP 送入的量上升，則可以上升至 91.4 倍 (圖 14 A)。單獨送入 pKu80-GFP 的控制組則沒有觀察到 pBHLF1 啟動子的活化。另外已知 Zta 會藉由結合到 BRLF1 啟動子 (Rp) 上的 ZRE 序列活化 BRLF1 基因 (Le Roux et al, 1996)，本研究觀察到 Ku80 會與 Zta 一起結合到 ZRE 序列上。在活化 Rp 的實驗上發現送入 pCMV-Zta 使 pRp-ZRE 啟動子的活性上升大約 3.9 倍，接著同時送入 pCMV-Zta 及 pKu80-GFP，隨著 pKu80-GFP 送入的量上升，則可以上升至 19 倍 (圖 14 B)，而單獨送入 pGFP-Ku80 的控制組則沒有觀察到 pRp-ZRE 啟動子的活化。此外，Rta 所辨識的 RRE 序列因為不會被 Zta 所辨識，所以質體 pRRE 做為控制組，以短暫細胞轉染報導基因分析的方式同時送入 pCMV-Zta 及 pKu80-GFP，結果發現 pRRE 啟動子的活性沒有明顯上升。因此，證實了 Ku80 可以促進 Zta 的轉錄活性能力。

在 293T 細胞中觀察到 Ku80 會促進 Zta 的轉錄活性之後，接著在沒有 EB 病毒感染淋巴 B 細胞 BJAB 細胞株中，同樣以短暫細胞轉染報導基因分析的方式同時送入 pCMV-Zta 及 pGFP-Ku80，與單獨送入 pGL3-CMV 的控制組相比。觀察發現 pCMV-Zta 活化 BHLF1 啟動子的活性上升大約 48.6 倍，隨著 pGFP-Ku80 送入的量上升，則可以上升至 213 倍 (圖 15 A)，但是只有送入 pGFP-Ku80 的控制組則沒有觀察到 pBHLF1 啟動子的活化。所以在沒有 Zta 的存在下，Ku80 無法活化 pBHLF1。接著以 pRp-ZRE 進行短暫細胞轉染報導基因分析，同時送入 pCMV-Zta

及 pGFP-Ku80，與單獨送入 pGL3-CMV 的控制組相比，觀察發現 CMV-Zta 活化 BHLF1 啟動子的活性上升大約 20.2 倍，隨著 pGFP-Ku80 送入的量上升，則可以上升至 77 倍 (圖 15 B)，所以在 BJAB 細胞中，Ku80 也會促進 Zta 的轉錄活性能力。



討論

由於病毒基因組的大小有其限制，所以病毒無法完全自行製造出足夠種類的蛋白質來應付其生活週期，所以需要藉由宿主細胞蛋白質的幫忙。因此，本研究探討 Zta 與宿主細胞蛋白質結合，並觀察其參與 EB 病毒的生理機制為何。以 His-Zta pull down 和蛋白質體學分析得知 Ku80 會與 Zta 結合，而 Ku80 會與 Zta 形成複體結合到 oriLyt 的 ZRE 序列上 (圖 8-10)，並且觀察到 Ku80 缺陷時會造成 EB 病毒的 DNA 溶裂複製下降 (圖 12)。因此，推測 Ku80 參與了 EB 病毒的溶裂期 DNA 複製與病毒基因的活化。

本研究利用 His-Zta pull down 分析吸附到 Ku80，而已有研究則是利用免疫親和力純化分析 (immuno-affinity purification) 觀察細胞中有哪些蛋白質會與 Zta 結合，因此將 Flag-Zta 轉染到帶有 EB 病毒基因組的 ZKO-293 細胞中，並且以抗 Rta 抗體和抗 EA-D 抗體偵測以西方點墨法分析確認 EB 病毒進入溶裂期後，接著利用 anti-Flag agarose 吸附細胞蛋白質，結果發現 Flag-Zta 吸附到 Ku80 (Wiedmer et al, 2008)，與本研究的實驗結果相符合。而本研究以 Zta 吸附到 Ku80 後，進一步以免疫沉澱分析證明 Zta 會與 Ku80 結合，並且觀察到其之間為直接結合關係，因此推測 Ku80 參與了 Zta 調控 EB 病毒的功能。

Zta 的蛋白質序列包含了負責基因轉錄、DNA 結合和蛋白質之間雙聚體化的區域，本研究建構了 3 個 Zta 的刪除突變株，分別為 N 端的轉錄活化區域、中間的 M 端及包含 DNA 結合和雙聚體化區域的 C 端 (圖 7A)，利用免疫沉澱分析觀察到 Zta 會以其 C 端的區域與 Ku80 結合 (圖 7B)。Ku70 和 Ku80 的結構相似，包含了 N 端的 α/β 區域 (vWA domain)、中間 M 端的 β -barrel 區域及 C 端的 helical arm，Ku70/80 會形成一個類似環狀的結構。因此 Ku 不需要專一性的辨識 DNA 序列而能夠直接結合到

DNA的末端 (Walker et al, 2001)，在本研究中發現Ku80會以N和M端的區域與Zta結合。Ku80需要透過Zta結合到ZRE序列上 (圖 8)，而本研究觀察到Zta是以DNA結合區域和雙聚體化區域跟Ku80結合，但是Ku80在沒有Zta的時候則無法結合到oriLyt上。因此推論Ku80不會佔住Zta的DNA結合區域，而是與Zta的雙聚體化區域結合。Ku70/Ku80的vWA區域會互相結合形成異二聚體 (heterodimer)，而Ku80的 β -barrel區域在結合到DNA末端時會形成環狀，但是Ku80結合到oriLyt上須透過Zta而不是直接結合到DNA上。同時EB病毒尚未開始複製時其DNA為封閉環狀，沒有裸露出DNA末端，因此Ku80以 β -barrel區域與Zta結合的機制需進一步探討。總合以上，Zta和Ku80分別以雙聚體化的區域相互結合。

本研究利用 ChIP 和 EMSA 證實了 Ku80 會透過 Zta 結合到 EB 病毒複製起始點上，然而在進行 ChIP 分析時，必須在進行免疫沉澱前將 DNA 震斷成小於 500 bp 的小片段，此時 DNA 可能為雙股斷裂的狀態。除此之外，當進行 EMSA 分析時所使用的探針雙股 DNA，其末端同樣呈現 DNA 雙股斷裂時的狀態，然而 Ku 會辨識到 DNA 斷裂的末端而結合上去以進行 DNA 的修補，所以若是以 ChIP 和 EMSA 觀察 Ku80 與 DNA 的結合，恐怕會造成實驗上的假象。為了避免此實驗誤差的產生，本研究利用 DAPA 佐證 Ku80 與 DNA 的結合，雖然 DAPA 所使用的探針 BHLF1 與 EMSA 的探針相同，但是當使用探針 mBHLF1 做為負控制組時，觀察到 ZRE 序列突變後 Ku80 就無法結合到探針上 (圖 8)。此外，利用 *in vitro* DAPA 探討在 Ku80 和 Zta 結合後，Ku80 如何結合到複製起始點上，結果發現只有在 Zta 存在時，Ku80 才能結合到 DNA 上，若是只有 Ku80 存在時，即使探針 BHLF1 上的 ZRE 序列是正常的，Ku80 仍然無法結合到 DNA 上，所以 Ku80 必須透過 Zta 的結合，形成複合體結合到複製起始點。此外，DAPA 分析亦排除了 ChIP 和 EMSA 分析可能造成的實驗誤差。

已經發現有許多負責 DNA 斷裂修補的蛋白質參與了 DNA 的複製，MSH-2 及 MSH-6 會參與細胞的核酸錯誤配對修復 (mismatch repair; MMR) (Buermeyer et al, 1999)，而 Ku70/80、DNA-PK 和 PARP-1 則負責 DNA 斷裂的非同源性末端接合 (non-homologous end joining; NHEJ)，這些蛋白質參與了 HSV-1 和 KSHV 的 DNA 複製複合體 (Taylor & Knipe, 2004; Wang et al, 2008)。而同源性重組修補 (homologous recombination repair; HRR) 的 replication protein A (RPA)、Rad51、Rad52 和 MRN 複合體則參與 EB 病毒 DNA 複製 (Kudoh et al, 2009)。已知當 EB 病毒進入溶裂期後，DNA 損傷的感應因子 Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合體和磷酸化的 ATM 會聚集到病毒的複製區塊，並且將病毒新合成的 DNA 基因組視為不正常的 DNA 結構。磷酸化的 p53 也被發現會聚集到病毒的複製區塊以及和 Zta 結合造成 p53 的下游訊息卻封鎖住無法傳遞。但是 S phase 的 CDK 活性卻有活化的現象而營造一個適合 DNA 複製的環境，因此病毒可以技巧性的躲過細胞的防禦機制而進行 DNA 複製 (Kudoh et al, 2005)。本研究觀察到 Ku80 須要透過 Zta 才能結合到病毒複製起始點的 ZRE 序列，因此推論 Ku80 並非將 EB 病毒的基因組視為不正常 DNA 而聚集到到 EB 病毒的 DNA 上。而同樣屬於人類疱疹病毒的 KSHV 也觀察到 Ku80 會與其他複製相關蛋白質一起結合到複製起始點 (Wang et al, 2008)，因此推測 EB 病毒與 KSHV 會有相類似的分子機制調控溶裂複製。

在本研究中觀察到 Ku80 與 Zta 的結合，也以免疫沉澱分析觀察到 Ku80 會與 Zta 及 BMRF1 結合 (圖 11)，BMRF1 為負責病毒 DNA 複製的 7 個蛋白質之一，會與 Zta、BALF5、BALF2、BBLF4、BSLF1 和 BBLF2/3 一起形成複製複合體活化溶裂期 DNA 複製，本研究發現 Zta、Ku80 和 BMRF1 會結合在一起，因此推測 Ku80 可能也參與了複製複合體，而一起結合到複製起始點上 (圖 9)。此外，晚期基因 VCA 啟動子的活化，必須發生在病毒 DNA 複製完成之後，其 DNA polymerase accessory protein 才會開始活化 VCA 啟動子，因此藉由短暫細胞轉染報導基因分析

觀察晚期基因 VCA 的活化推知 EB 病毒溶裂複製是否順利進行，結果發現當轉染到 P3HR1 的 Ku80 越多時，VCA 啟動子的活性也會跟著上升 (圖 13)，因此 Ku80 可能會活化 EB 病毒的溶裂複製。

已知在細胞中 Ku 蛋白質會聚集 DNA 複製相關蛋白質結合到複製起始點，Ku 亦會參與同樣屬於 herpesvirus 家族 KSHV 和 HSV 的溶裂期 DNA 複製。本研究觀察到 EB 病毒必須利用宿主的 Ku80 以活化溶裂期 DNA 複製，而其他會與 Ku80 形成複合體的蛋白質 Ku70 和 DNA-PK 是否亦參與其中，必須進一步探討。已知 Ku70 蛋白質具有 helicase 的活性 (Ochem et al, 1997)，並參與細胞 DNA 複製的解旋作用 (Matheos et al, 2002)。而本研究尚未證實 Zta 是否會與 Ku70 結合，但是已有研究發現在含有 EB 病毒的細胞中利用 Flag-Zta 可以吸附出 Ku70 (Wiedmer et al, 2008)，所以推測 Ku70 跟 Ku80 可能皆會與 Zta 結合。本研究發現 Ku80 會結合到 oriLyt 上，若是 Ku70 也參與 EB 病毒的 DNA 複製複合體，則推測其行使的功能可能對 DNA 進行解旋，但是 EB 病毒已經有自己的 helicase，所以 Ku 與病毒的 BBLF4 helicase 的交互作用則需要進一步的探討。

Ku 蛋白質已被證實會結合到 lamin B2、c-myc 和 B-globin 上的 DNA 複製起始序列上 (Sibani et al, 2005a; Sibani et al, 2005b)，並且吸引 ORC 複合體、cdc6、cdt1 和 MCM 複合體，才能開啟 DNA 複製。在 HeLa 細胞中利用 RNAi 將 Ku80 蛋白質抑制，觀察到細胞生長遲緩、影響細胞 DNA 的複製起始及細胞週期停留在 G1 晚期 (Rampakakis et al, 2008)。當細胞進行 DNA 複製起始時會先形成前複製複合物 (pre-replicative complex; pre-RC)，而最初辨識複合物 (origin recognition complex, ORC) 由 Orc1-Orc6 所組成，為構成 pre-RC 的蛋白質之一。在缺乏 Ku80 的情況下，觀察到 Orc1 和 Orc6 的細胞內表現量降低，而結合到染色質上的 Orc1、Orc4 和 cdc45 皆有減少的現象，使得 DNA 複製的起始受到了抑制 (Rampakakis et al, 2008)。本

研究利用 lenti-virus 將 Ku80 的干擾性核糖核酸轉染到 P3HR1 細胞中，亦觀察到 P3HR1 細胞生長遲緩的現象，同時觀察到 EB 病毒溶裂期 DNA 複製的下降，而本研究已證實 Ku80 會結合到病毒 DNA 複製起始點上，所以當 Ku80 缺陷時，推測結合到病毒複製起始點的 Ku80 也會減少，所以這可能是造成 EB 病毒 DNA 複製量降低的原因之一。此外，在 HeLa 細胞中以 RNAi 將 Ku80 蛋白質抑制，觀察到 DNA 複製延遲的發生，造成 Cdk2 的活性降低、p21 表現量上升、Cdc25A 和 Cdk2 表現量降低，cyclin A 與 cyclin D1 的表現降低，cyclin E 的含量則有累積的情形產生，證實了 Ku80 的抑制使細胞停留在 G1 時期晚期，無法進入 S 時期 (Rampakakis et al, 2008)。而 EB 病毒進入溶裂期後會造成 cyclin E/A 表現量提高和 hyperphosphorylated Rb 累積，使細胞週期停留在 late G1 時期或 early S-arrested 時期，營造出一個適合 EB 病毒 DNA 複製的環境並抑制宿主細胞 DNA 複製 (Kudoh et al, 2005)。本研究使用 Ku80 缺陷的 P3HR1 穩定細胞尚未探討其細胞週期是否受到影響。此外當 Ku80 缺陷的 P3HR1 穩定細胞以 SB 和 TPA 誘導使 EB 病毒進入溶裂期後，EB 病毒在 Ku80 缺陷時是否仍然會營造一個類似 S 時期的環境，需要更深一步的探討。如果是因為 Ku80 的缺陷使 P3HR1 細胞停留在 G1 時期而不利於 EB 病毒溶裂期複製，則 Ku80 結合到複製起始點上的現象可能與促進 Zta 的轉錄活性有關，而與 EB 病毒的複製起始沒有直接關係。

在細胞中 Ku70/80 會結合到啟動子上調控基因的表現 (Mayeur et al, 2005; Xu et al, 2004)。而在人類 T 細胞白血病病毒、人類免疫缺乏病毒及老鼠乳腫瘤病毒也發現 Ku 蛋白質會抑制病毒的轉錄活性 (Giffin et al, 1999; Giffin et al, 1996; Jeanson & Mouscadet, 2002; Okumura et al, 1994)。目前 Ku 蛋白質參與轉錄調控的功能主要是依靠 Ku80 專一性結合到啟動子的序列上，但是在本研究發現 Ku80 在 Zta 不存在時則 Ku80 無法結合到 oriLyt，而 oriLyt 為複製起始點同時又是 BHLF1 基因的啟動子，本研究發現 Ku80 會活化 Zta 的轉錄活性，使得 pBHLF1 和 pRp-ZRE 的活

性上升，所以推測 Ku80 是透過 Zta 結合到 EB 病毒的啟動子上所引發的。Zta 和 Ku80 的結合是負責調控 EB 病毒溶裂期的轉錄活性或起使 DNA 的複製或是同時參與這兩個生理活性，須要更進一步探討其機制。

總結以上，本研究發現 Zta 與 Ku80 結合，並進一步結合到 oriLyt 上的 ZRE 序列藉以調控 EB 病毒的轉錄活性和 DNA 複製，當 Ku80 被抑制後觀察到 EB 病毒的 DNA 複製下降，暗示了 Ku80 參與 EB 病毒溶裂期複製。未來將進一步探討 Ku80 與 EB 病毒溶裂期複製的關係，以期有更完整的了解。



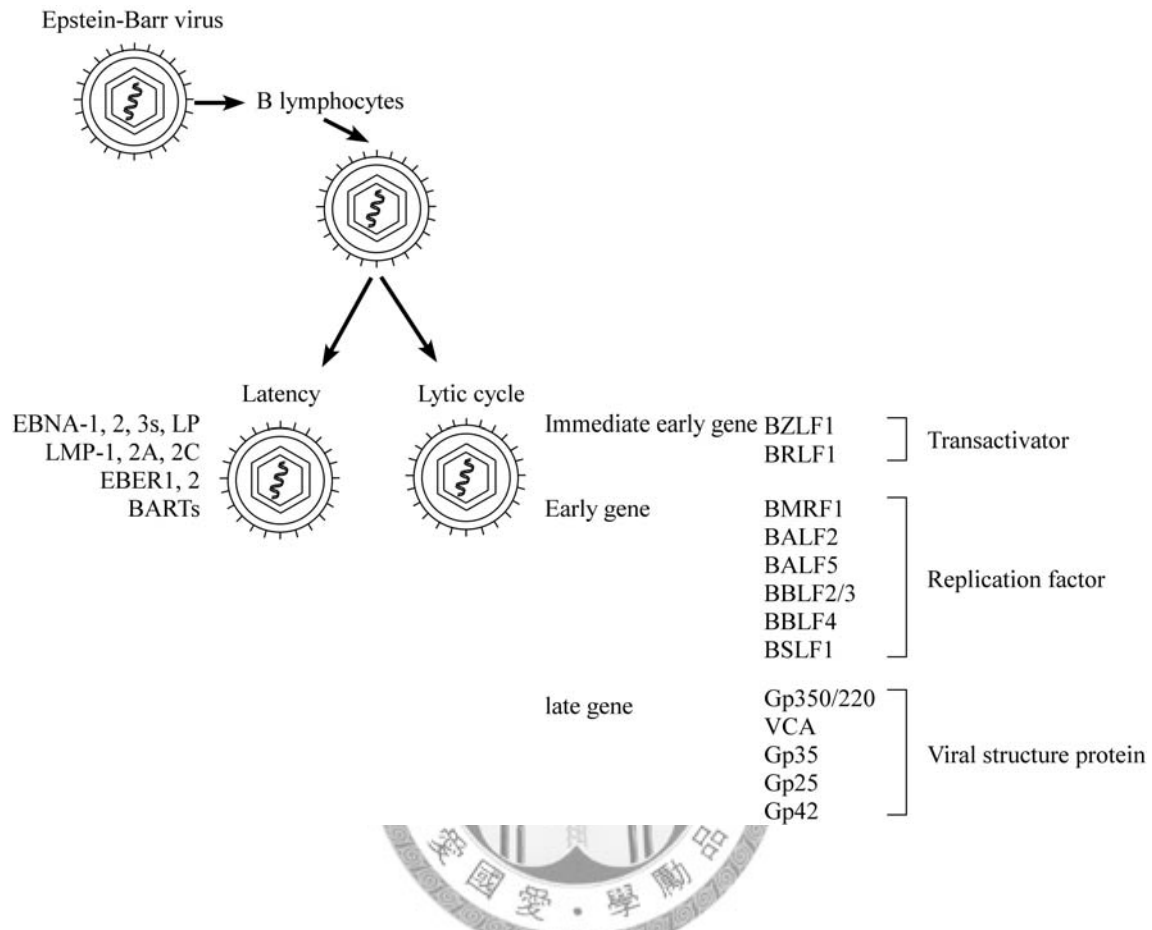


圖 1：EB 病毒的生活史。EB 病毒的生活週期分為潛伏期和溶裂期，當病毒感染淋巴B細胞後，若是進入潛伏期則會表現6個核蛋白 (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C 和 EBNA-LP)、三個膜蛋白 (LMP-1, LMP-2A and LMP-2B) 及 2 個 small RNA (EBER1 and EBER2)以維持宿主細胞的持續增殖和避免細胞凋亡。如果受到外界的刺激則病毒會轉而走向溶裂期，2 個關鍵的極早期基因 BZLF1 和 BRLF1 開始表現，負責活化病毒自身和細胞的基因而開啟一連串的訊息傳遞，接著早期基因會開始表現使病毒 DNA 大量的複製，晚期基因則負責製造病毒結構蛋白，最後組裝成病毒顆粒完成溶裂循環。

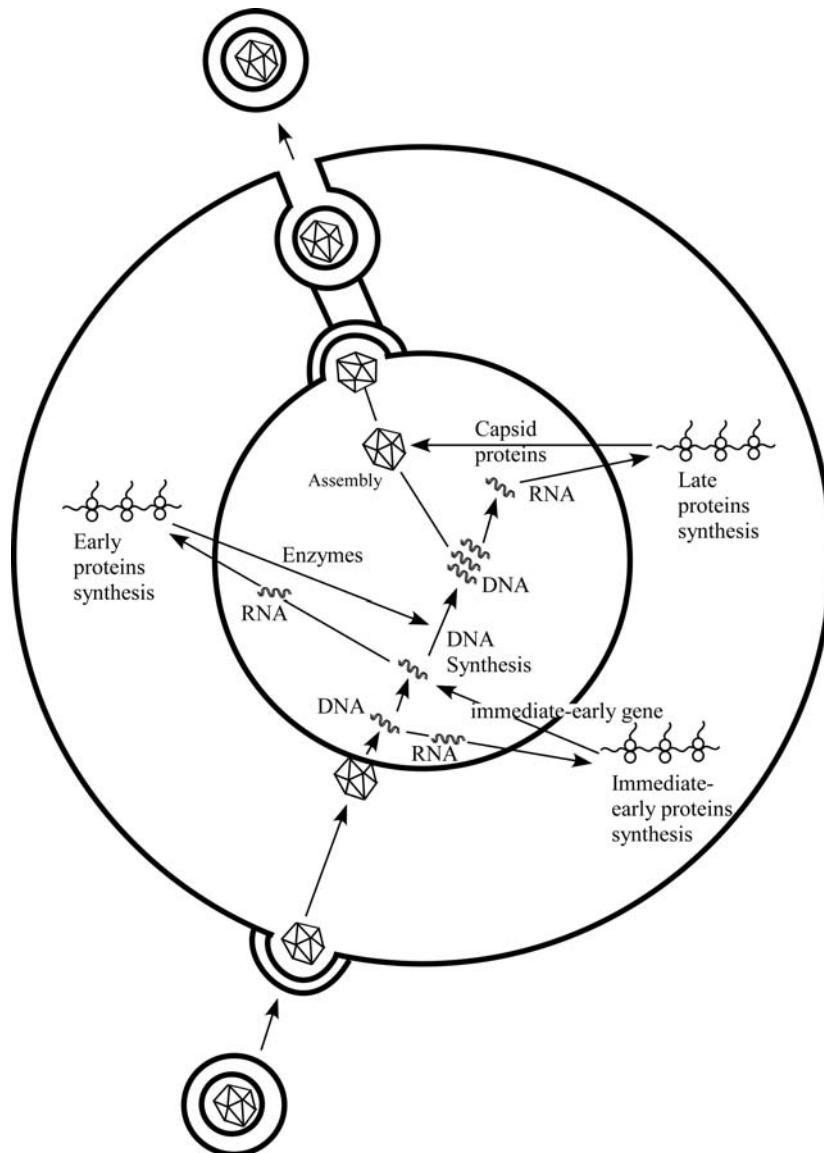


圖 2：EB 病毒的溶裂期。EB 病毒會以 envelope 上專一性的蛋白質辨識宿主細胞的膜上受器，envelop 會和細胞膜融合並釋出 capsid，接著病毒的 capsid 會與核孔接觸，將病毒 DNA 送入到細胞核內並開始轉錄出 mRNA，mRNA 會被送到細胞質表現出極早期蛋白質，然後極早期蛋白質會回到核內進一步活化早期基因轉錄出 mRNA，mRNA 會被送出到核外開始表現早期蛋白質，接著早期蛋白質回到核內後參與病毒 DNA 的複製，病毒的 DNA 緊接著表現晚期 mRNA 並轉譯成晚期蛋白質，晚期蛋白質會在核內將病毒 DNA 包裝成病毒顆粒，最後從宿主細胞釋出完成病毒的溶裂期。

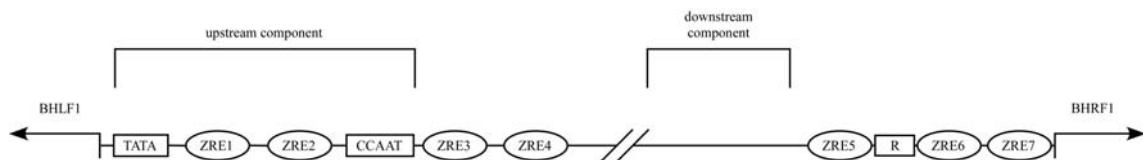


圖 3：EB 病毒的溶裂期 DNA 複製起始區域的序列。oriLyt 的上游 (upstream component) 包含了 BHLF1 啟動子，有 4 個 Zta 的結合位 (ZRE1-4)、TATA box 及 CCAAT box 位於其上。oriLyt 的下游 (downstream component) 則包含了 BHRF1 啟動子，上面有 3 個 ZRE 序列 (ZRE5-7) 及 Rta 的結合位 (R)。

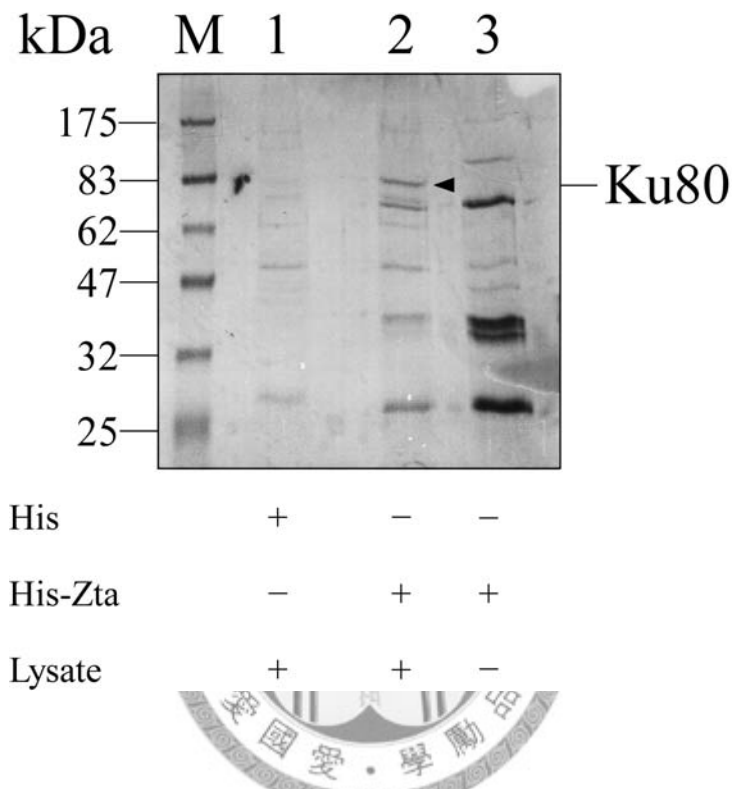


圖 4：細胞內與 Zta 結合的蛋白質。將大腸桿菌所表現的 His-Zta (lane 2, 3) 和控制組 His (lane 1) 以 Ni-NTA agarose 吸附 His 融合蛋白質，接著加入經過 SB 和 TPA 誘導的 P3HR1 細胞萃取液進行 His-pull down 分析，然後將被吸附下來的蛋白質以 SDS-PAGE 分析，將箭頭標示的 polypeptide 進行 in gel digestion，最後利用 MALDI-TOF 蛋白質定序分析。M：molecular weight marker。

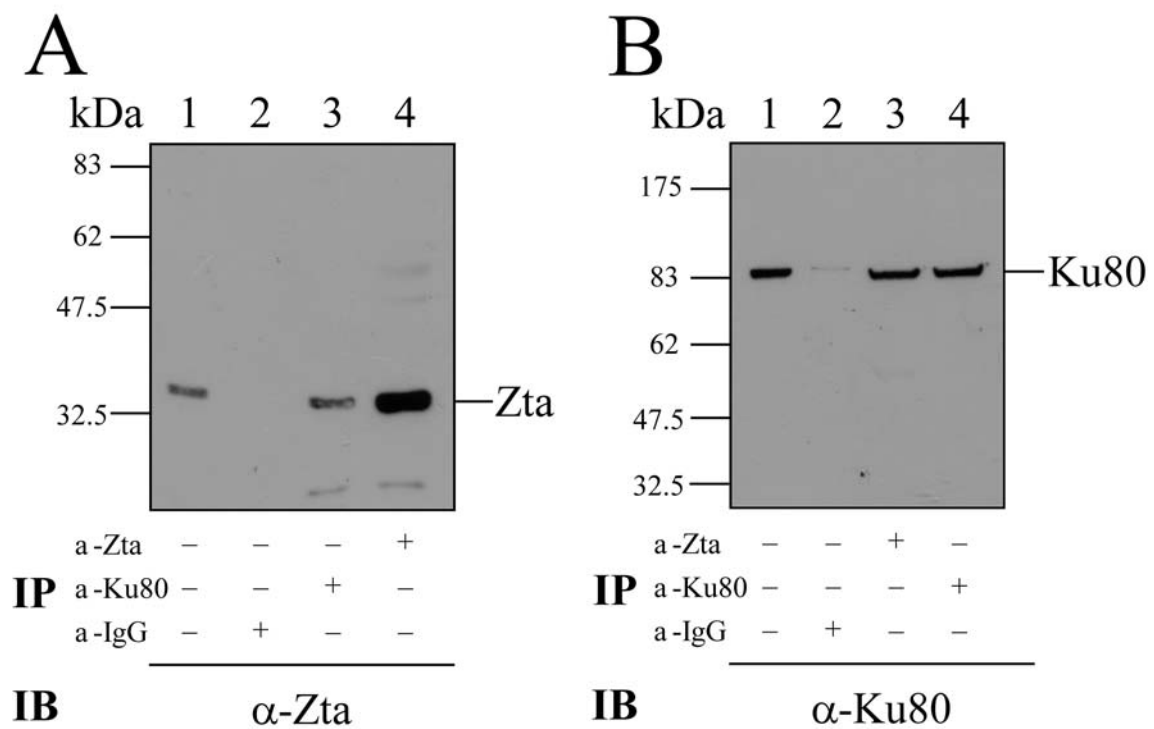


圖 5：Zta 與 Ku80 在細胞內的結合。將 P3HR1 細胞以 SB 和 TPA 處理 24 小時後利用共同免疫沉澱法進行結合分析，以抗 Zta 抗體、抗 Ku80 抗體和負控制組抗 IgG 抗體進行免疫沉澱 (IP)，利用西方點墨法 (IB)偵測。IP：immunoprecipitation；IB：immunoblotting。

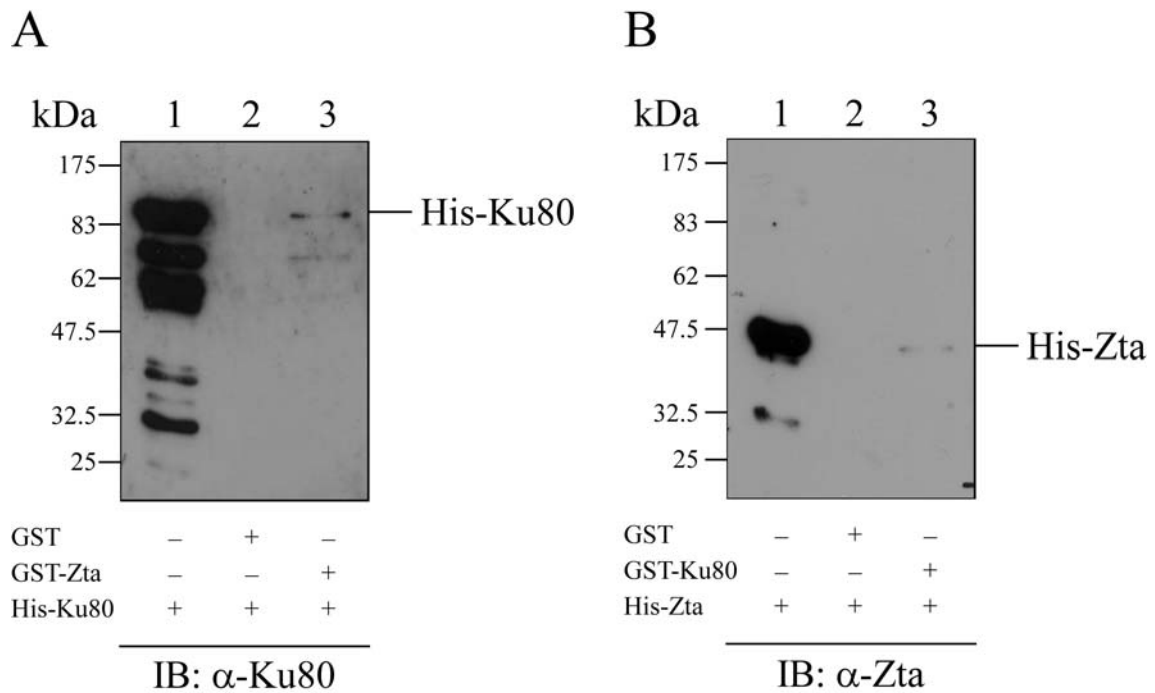


圖 6：Zta 與 Ku80 為直接結合。將 *E. coli* (BL21) DE3 表現的 GST 與 GST-Zta 融合蛋白質以 Glutathione-Sepharose beads 吸附下來，然後加入 His-Ku80 融合蛋白質進行 GST-pull down 分析，接著利用西方點墨法 (IB) 以抗 Ku80 抗體偵測 (A)。將 GST 與 GST-Ku80 融合蛋白質以 Glutathione-Sepharose beads 吸附下來，然後加入 His-Zta 融合蛋白質進行 GST-pull down 分析，接著利用西方點墨法 (IB) 以抗 Zta 抗體偵測 (B)。IB：immunoblotting。

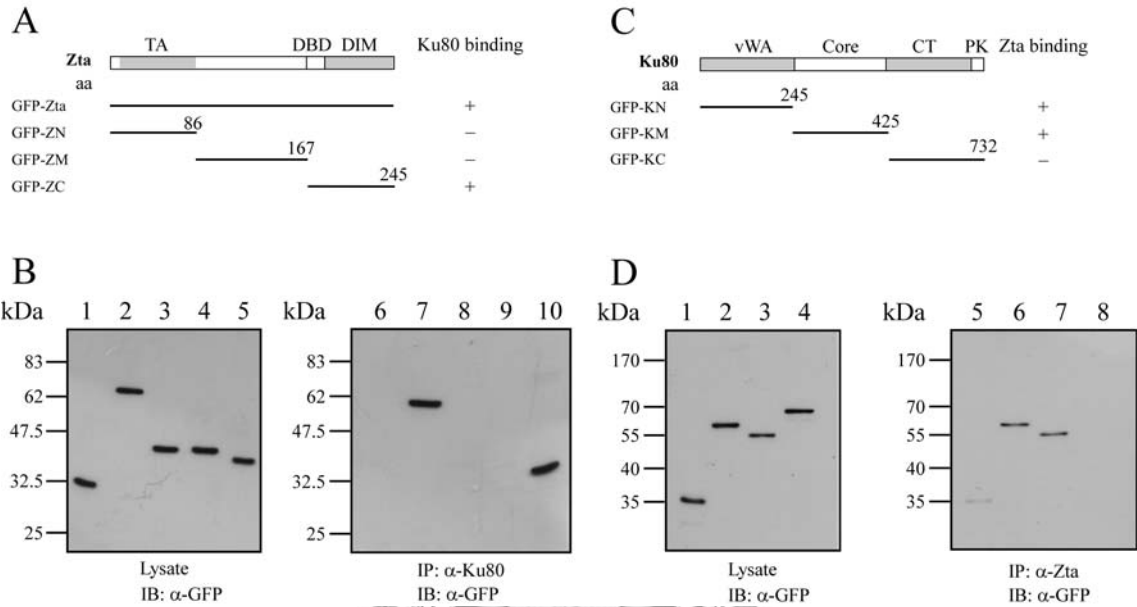


圖 7: Ku80 與 Zta 的結合區域分析。將能表現出 GFP-Zta 與其刪除突變株的質體，以電穿孔方試轉染到 P3HR1 細胞株中，以抗 GFP 抗體進行西方點墨法分析 P3HR1 細胞表現的 GFP (lane 1)、GFP-Zta (lane 2)、GFP-ZN (lane 3)、GFP-ZM (lane 4)和 GFP-ZC (lane 5)等蛋白質 (A)。將這些蛋白質以抗 Ku80 抗體進行免疫沉澱分析 (IP)，並以抗 GFP 抗體進行西方點墨法 (IB)分析 (B)。將 GFP-Ku80 的刪除突變株質體，以電穿孔方試轉染到 P3HR1 細胞株中，以抗 GFP 抗體進行西方點墨法分析 P3HR1 細胞表現的 GFP (lane 1)、GFP-KN (lane 2)、GFP-KM (lane 3)和 GFP-KC (lane 4) (C)。將這些蛋白質以抗 Zta 抗體進行免疫沉澱分析，並以抗 GFP 抗體進行西方點墨法分析 (D)。IP：immunoprecipitation；IB：immunoblotting。

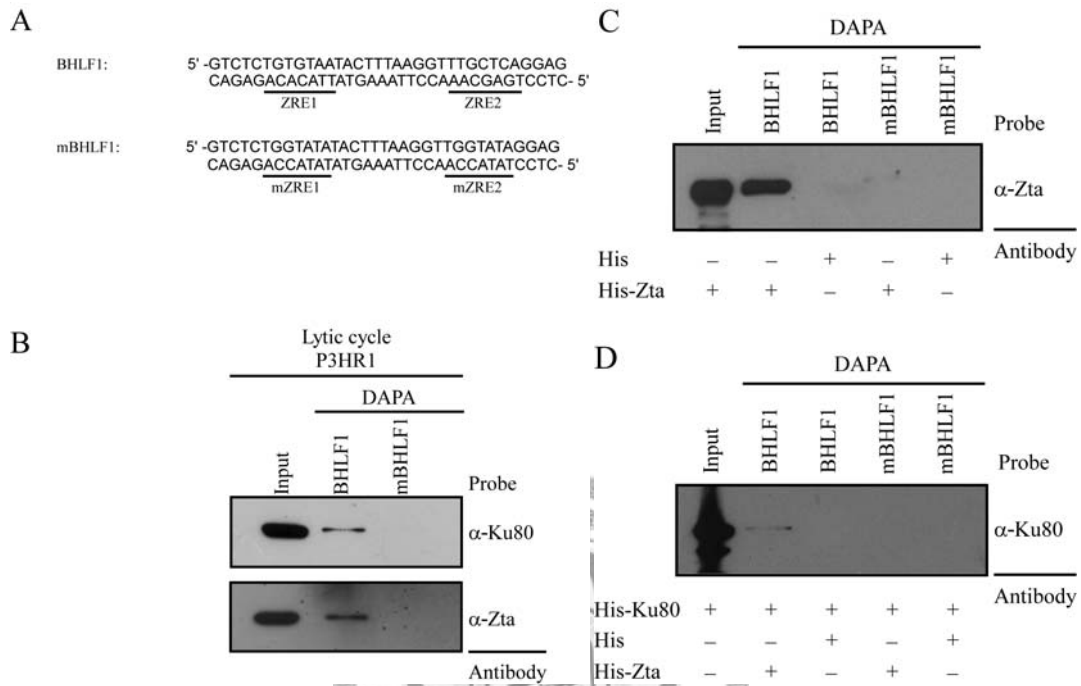


圖 8：Ku80 與 Zta 會結合到 oriLyt 的 ZRE 序列上。(A) biotin 標定的 BHLF1 探針包含 oriLyt 上游的 ZRE1 及 ZRE2 序列，mBHLF1 探針則包含突變的 ZRE1 和 ZRE2 序列，ZRE 序列和 mZRE 序列分別以底線標示。(B)將 BHLF1 和 mBHLF1 探針加入以 SB 和 TPA 處理過的 P3HR1 細胞萃取液，以 DAPA 分析會結合到 BHLF1 和 mBHLF1 探針的蛋白質，然後以抗 Zta 抗體或抗 Ku80 抗體進行西方點墨法分析。(C)以 biotin 標定的 BHLF1 探針及 mBHLF1 探針，與大腸桿菌所表現的 His-Zta 或 His 作用，則結合到探針上的蛋白質會一起被 streptoavidin 磁珠吸附下來，再以抗 Zta 抗體西方點墨法偵測。(D)BHLF1 探針及 mBHLF1 探針，與 His-Zta 或 His 作用並同時加入 His-Ku80，接著加入 streptavidin 磁珠將探針吸附下來，以抗 Ku80 抗體進行西方點墨法分析。DAPA：DNA affinity precipitation assay。

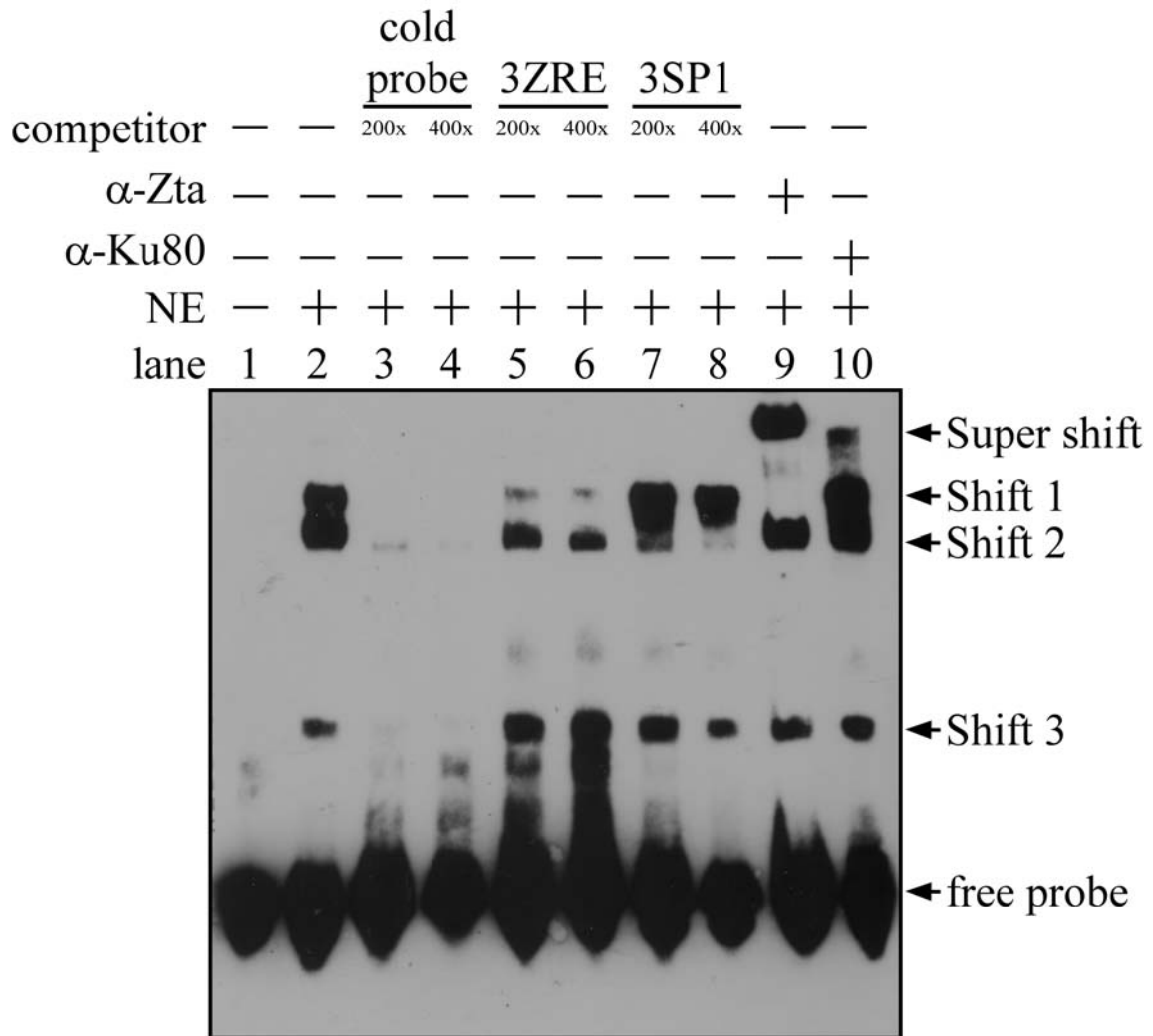


圖 9：Ku80 與 Zta 形成複合體結合到 oriLyt 上。利用 EMSA 分析會結合到 BHLF1 探針的蛋白質複合體，首先以 SB 和 TPA 處理過 P3HR1 的細胞萃取出核蛋白並加入 BHLF1 探針進行結合反應 (lanes, 2-10)，沒有加入核蛋白質的 BHLF1 探針做為控制組 (lane 1)，未標記探針 (lanes, 3-4)、特異性探針 3ZRE (lane, 5-6)與非特異性探針 3SP1 (lanes, 7-8)作為競爭結合分析，抗 Zta 抗體和抗 Ku80 抗體的加入為 super shift 的分析。NE：nuclear extract。

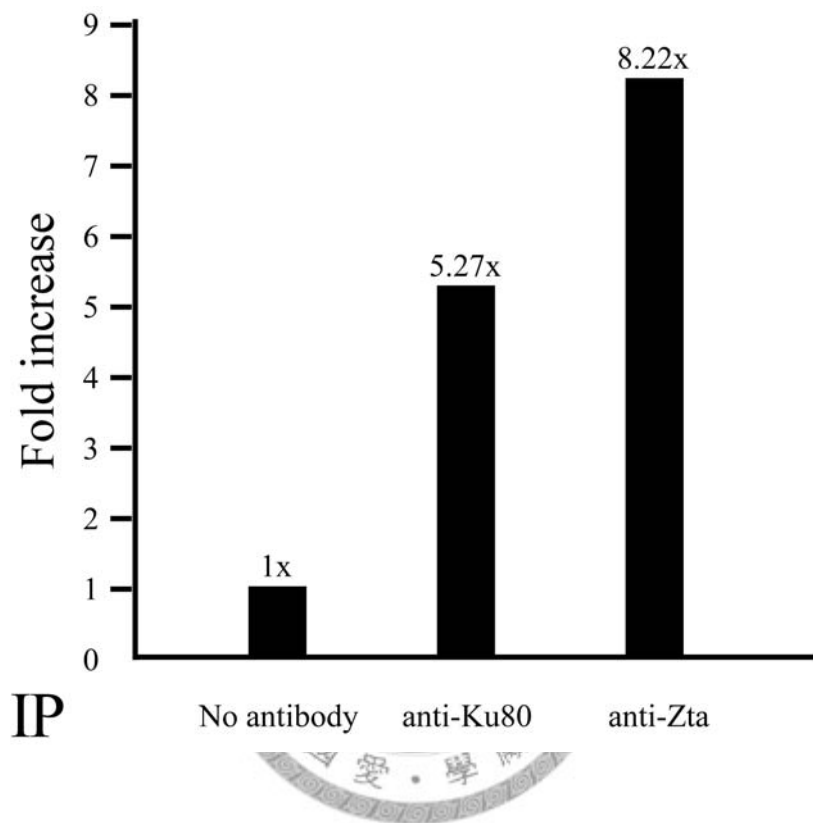


圖 10:Ku80 與 Zta 結合到 oriLyt 上。將 P3HR1 細胞以 SB 和 TPA 處理 24 小時後，以抗 Zta 抗體、抗 Ku80 抗體和不加入抗體的負控制組進行免疫沉澱 (IP)，接著以 real time-PCR 分析被吸附下來的 DNA 序列，以引子 BHLF1-F 和 BHLF1-R 放大 BHLF1 序列。IP：immunoprecipitation。

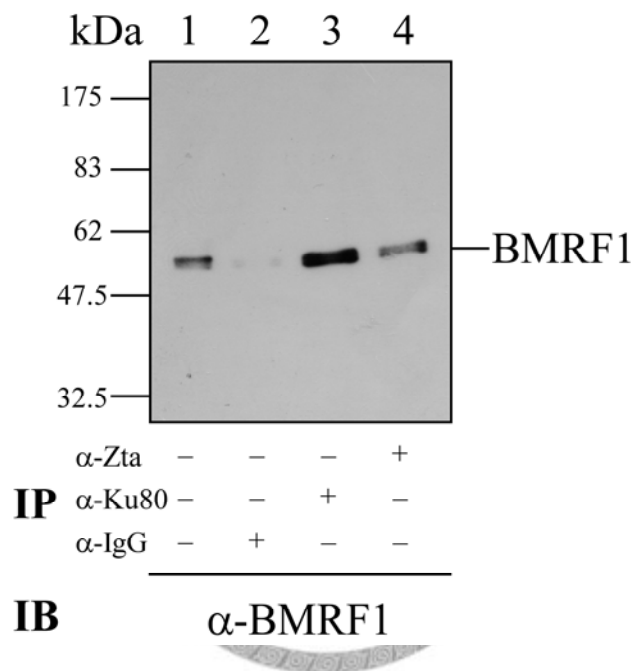


圖 11：Ku80 與 Zta 和 BMRF1 在細胞內的結合。利用共同免疫沉澱法進行結合分析，將 P3HR1 細胞以 SB 和 TPA 刺激 24 小時後，以抗 Zta 抗體、抗 Ku80 抗體和負控制組抗 IgG 抗體進行免疫沉澱 (IP)，利用西方點墨法偵測 (IB)。IP：immunoprecipitation；IB：immunoblotting

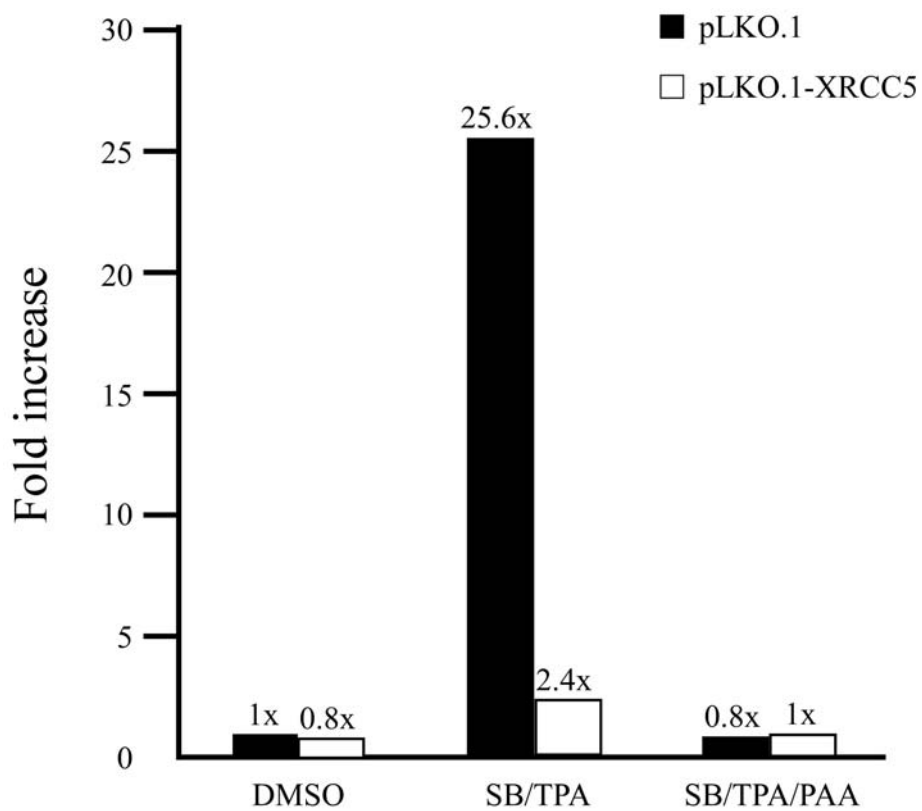


圖 12: Ku80 缺陷的細胞導致 EB 病毒溶裂期 DNA 複製量的下降。pLKO.1-XRCC5 Ku80 缺陷的 P3HR1 穩定細胞以及 pLKO.1 的 P3HR1 穩定細胞分別以 DMSO、SB/TPA 和 SB/TPA/PAA 刺激，培養 48 小時後以 real-time PCR 定量分析。SB: Sodium butyrate ; TPA : 12-*O*-tetradecanoylphorbol ; PAA : Phosphonoacetic acid 。

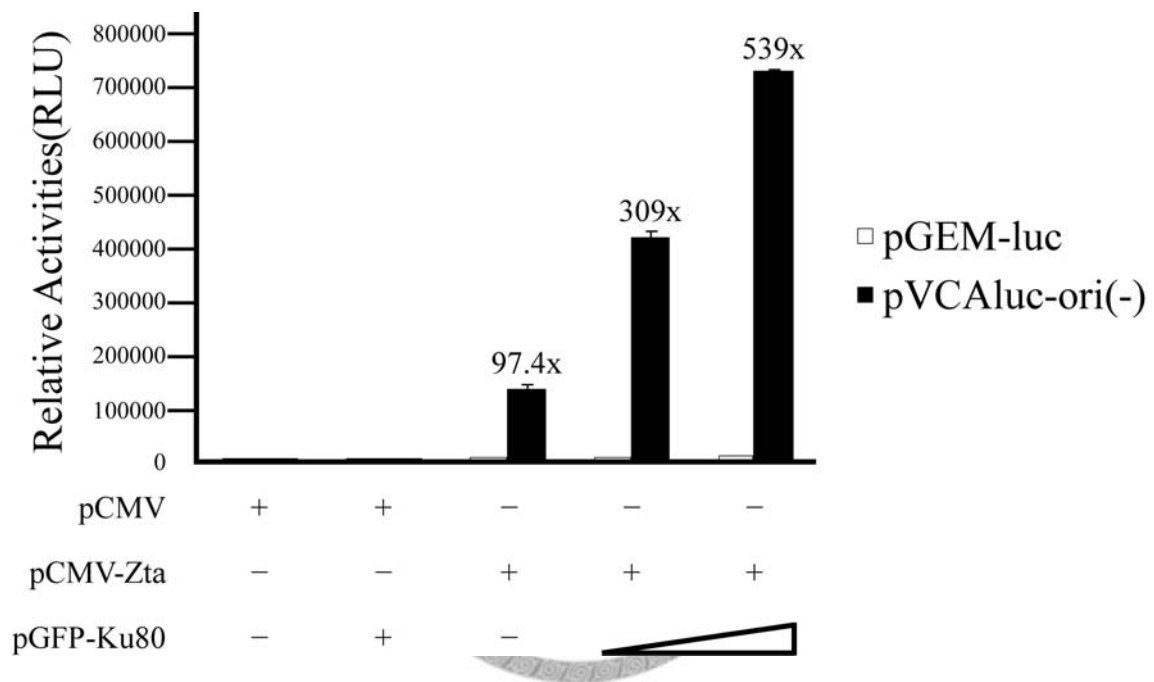


圖 13：Ku80 促進 Zta 活化 EB 病毒溶裂複製的能力。將 pGL3-CMV、pGFP-Ku80 或 pGL3-CMV-Zta 與啟動子 pGEM-luc 及 pVCA luc-ori (-) 一起與轉染到 EB 病毒感染 的淋巴 B 細胞 P3HR1 細胞株中，培養 48 小時後偵測冷光活性。每個細胞轉染 實驗進行三重複，每個樣品以二重複觀測。RLU: relative light units。

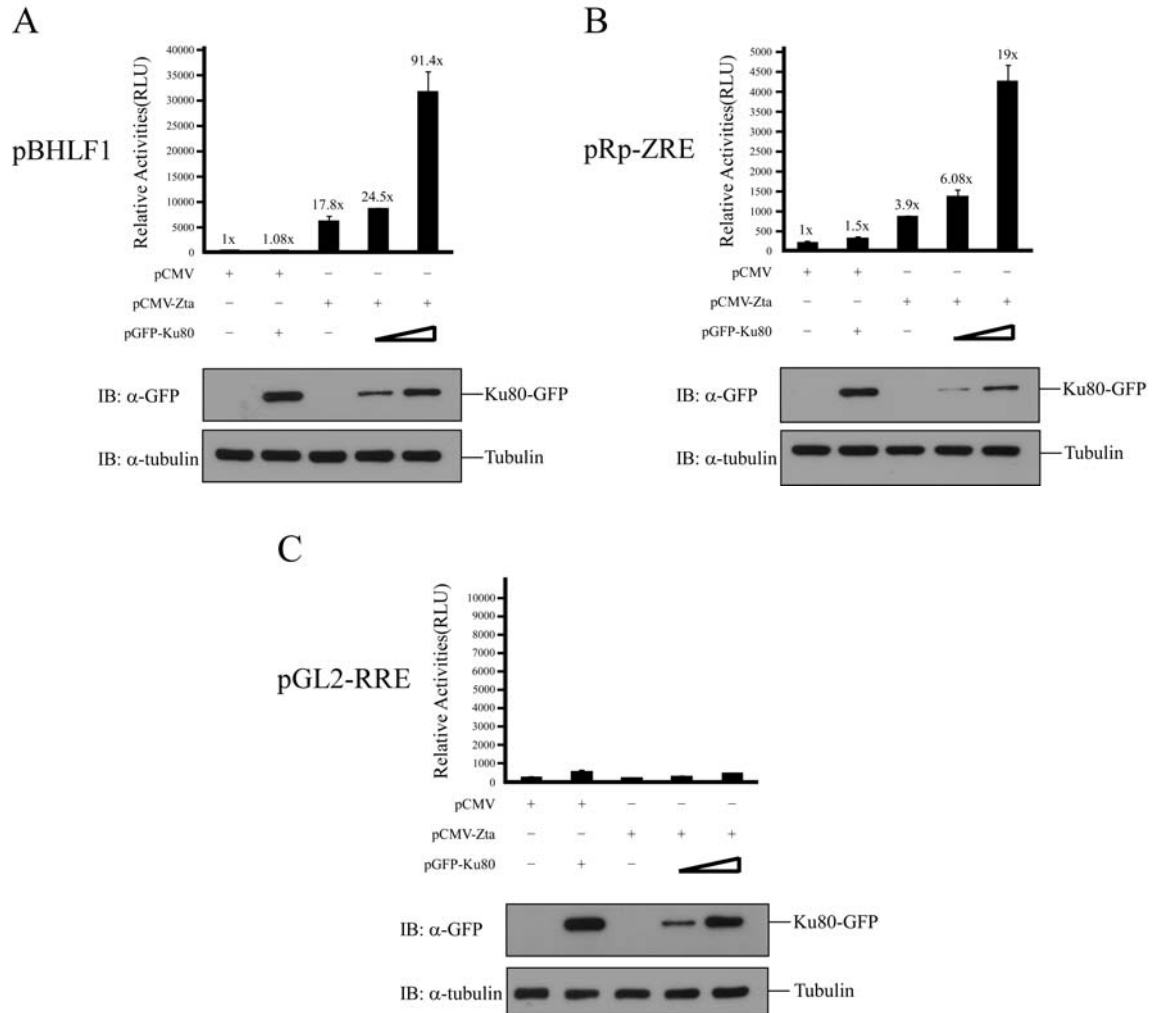


圖 14: Ku80 促進 Zta 的轉錄活性能力。將質體 pBHLF1 (A)、pRp-ZRE (B)及 pRRE (C)一起與 pGL3-CMV、pKu80-GFP 或 pGL3-CMV-Zta 共同轉染到 293T 細胞中，培養 24 小時後偵測冷光活性。每個細胞轉染實驗進行三重複，每個樣品以二重複觀測，pKu80-GFP 和 Tubulin 的表現量以抗 GFP 抗體及抗 tubulin 抗體進行西方點墨法偵測 (IB)。RLU：relative light units；IB：immunoblotting。

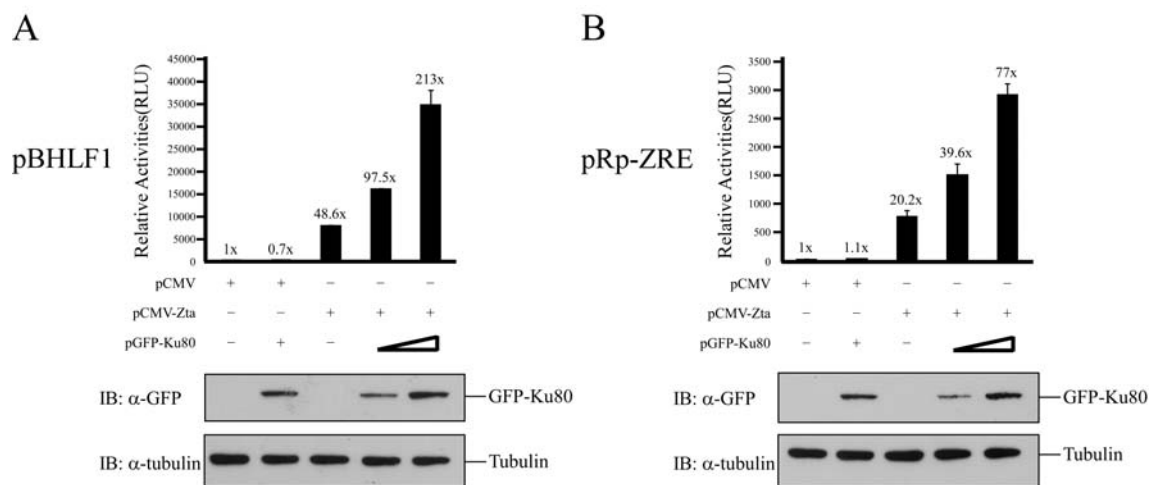


圖 15: Ku80 與 Zta 對 pBHLF1 和 pRp-ZRE 的影響。質體 pBHLF1 (A) 及 pRp-ZRE (B) 一起與 pGL3-CMV、pKu80-GFP 或 pGL3-CMV-Zta 共同轉染到無 EB 病毒感染的淋巴 B 細胞 BJAB 細胞株中，培養 24 小時後偵測冷光活性。每個細胞轉染實驗進行三重複，每個樣品以二重複觀測，pKu80-GFP 和 Tubulin 的表現量以抗 GFP 抗體及抗 tubulin 抗體進行西方點墨法偵測 (IB)。RLU: relative light units; IB: immunoblotting。

參考文獻

- Adams A (1987) Replication of latent Epstein-Barr virus genomes in Raji cells. *J Virol* **61**(5): 1743-1746
- Adamson AL, Kenney S (1999) The Epstein-Barr virus BZLF1 protein interacts physically and functionally with the histone acetylase CREB-binding protein. *J Virol* **73**(8): 6551-6558
- Aiyar A, Tyree C, Sugden B (1998) The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *EMBO J* **17**(21): 6394-6403
- Andersson-Anvret M, Forsby N, Klein G, Henle W, Biorklund A (1979) Relationship between the Epstein-Barr virus genome and nasopharyngeal carcinoma in Caucasian patients. *Int J Cancer* **23**(6): 762-767
- Baumann M, Feederle R, Kremmer E, Hammerschmidt W (1999) Cellular transcription factors recruit viral replication proteins to activate the Epstein-Barr virus origin of lytic DNA replication, oriLyt. *EMBO J* **18**(21): 6095-6105
- Bryant H, Farrell PJ (2002) Signal Transduction and Transcription Factor Modification during Reactivation of Epstein-Barr Virus from Latency. *J Virol* **76**(20): 10290-10298
- Buermeyer AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM (1999) Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* **33**: 533-564
- Cao QP, Pitt S, Leszyk J, Baril EF (1994) DNA-dependent ATPase from HeLa cells is related to human Ku autoantigen. *Biochemistry* **33**(28): 8548-8557
- Cayrol C, Flemington EK (1995) Identification of cellular target genes of the Epstein-Barr virus transactivator Zta: activation of transforming growth factor beta igh3 (TGF-beta igh3) and TGF-beta 1. *J Virol* **69**(7): 4206-4212
- Cayrol C, Flemington EK (1996) The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G0/G1 cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors. *EMBO J* **15**(11): 2748-2759

Chang LK, Chung JY, Hong YR, Ichimura T, Nakao M, Liu ST (2005) Activation of Sp1-mediated transcription by Rta of Epstein-Barr virus via an interaction with MCAF1. *Nucleic Acids Res* **33**(20): 6528-6539

Chang LK, Liu ST (2000) Activation of the BRLF1 promoter and lytic cycle of Epstein-Barr virus by histone acetylation. *Nucleic Acids Res* **28**(20): 3918-3925

Chang LK, Liu ST, Kuo CW, Wang WH, Chuang JY, Bianchi E, Hong YR (2008) Enhancement of transactivation activity of Rta of Epstein-Barr virus by RanBPM. *J Mol Biol* **379**(2): 231-242

Chang PJ, Chang YS, Liu ST (1998) Characterization of the BcLF1 promoter in Epstein-Barr virus. *J Gen Virol* **79** (Pt 8): 2003-2006

Chang Y, Cheng SD, Tsai CH (2002) Chromosomal integration of Epstein-Barr virus genomes in nasopharyngeal carcinoma cells. *Head Neck* **24**(2): 143-150

Chang YN, Dong DL, Hayward GS, Hayward SD (1990) The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J Virol* **64**(7): 3358-3369

Chaudhuri B, Xu H, Todorov I, Dutta A, Yates JL (2001) Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18): 10085-10089

Chen YL, Chen YJ, Tsai WH, Ko YC, Chen JY, Lin SF (2009) The Epstein-Barr virus replication and transcription activator, Rta/BRLF1, induces cellular senescence in epithelial cells. *Cell Cycle* **8**(1): 58-65

Chevallier-Greco A, Gruffat H, Manet E, Calender A, Sergeant A (1989) The Epstein-Barr virus (EBV) DR enhancer contains two functionally different domains: domain A is constitutive and cell specific, domain B is transactivated by the EBV early protein R. *J Virol* **63**(2): 615-623

Countryman J, Jenson H, Seibl R, Wolf H, Miller G (1987) Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt

latency. *J Virol* **61**(12): 3672-3679

Countryman J, Miller G (1985) Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(12): 4085-4089

Crawford DH (2001) Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1408): 461-473

Daikoku T, Kudoh A, Sugaya Y, Iwahori S, Shirata N, Isomura H, Tsurumi T (2006) Postreplicative mismatch repair factors are recruited to Epstein-Barr virus replication compartments. *J Biol Chem* **281**(16): 11422-11430

de Jesus O, Smith PR, Spender LC, Elgueta Karstegl C, Niller HH, Huang D, Farrell PJ (2003) Updated Epstein-Barr virus (EBV) DNA sequence and analysis of a promoter for the BART (CST, BARF0) RNAs of EBV. *J Gen Virol* **84**(Pt 6): 1443-1450

de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7**(2): 725-737

Dhar SK, Yoshida K, Machida Y, Khaira P, Chaudhuri B, Wohlschlegel JA, Leffak M, Yates J, Dutta A (2001) Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell* **106**(3): 287-296

Ding Q, Reddy YV, Wang W, Woods T, Douglas P, Ramsden DA, Lees-Miller SP, Meek K (2003) Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **23**(16): 5836-5848

Downs JA, Jackson SP (2004) A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5): 367-378

Epstein MA, Achong BG, Barr YM (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **1**(7335): 702-703

Farrell PJ, Rowe DT, Rooney CM, Kouzarides T (1989) Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *EMBO J* **8**(1): 127-132

- Fixman ED, Hayward GS, Hayward SD (1992) trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. *J Virol* **66**(8): 5030-5039
- Flemington E, Speck SH (1990a) Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virol* **64**(3): 1227-1232
- Flemington E, Speck SH (1990b) Epstein-Barr virus BZLF1 trans activator induces the promoter of a cellular cognate gene, c-fos. *J Virol* **64**(9): 4549-4552
- Flemington E, Speck SH (1990c) Evidence for coiled-coil dimer formation by an Epstein-Barr virus transactivator that lacks a heptad repeat of leucine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(23): 9459-9463
- Flemington EK, Borrás AM, Lytle JP, Speck SH (1992) Characterization of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein transactivation domain. *J Virol* **66**(2): 922-929
- Flemington EK, Goldfeld AE, Speck SH (1991) Efficient transcription of the Epstein-Barr virus immediate-early BZLF1 and BRLF1 genes requires protein synthesis. *J Virol* **65**(12): 7073-7077
- Frappier L, O'Donnell M (1991) Overproduction, purification, and characterization of EBNA1, the origin binding protein of Epstein-Barr virus. *J Biol Chem* **266**(12): 7819-7826
- Fujii K, Yokoyama N, Kiyono T, Kuzushima K, Homma M, Nishiyama Y, Fujita M, Tsurumi T (2000) The Epstein-Barr virus pol catalytic subunit physically interacts with the BBLF4-BRLF1-BBLF2/3 complex. *J Virol* **74**(6): 2550-2557
- Gahn TA, Schildkraut CL (1989) The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell* **58**(3): 527-535
- Galante S, Kohwi-Shigematsu T (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase and Ku autoantigen form a complex and synergistically bind to matrix attachment sequences. *J Biol Chem* **274**(29): 20521-20528
- Gao Z, Krithivas A, Finan JE, Semmes OJ, Zhou S, Wang Y, Hayward SD (1998) The

Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta interacts with the helicase-primase replication proteins. *J Virol* **72**(11): 8559-8567

Giffin W, Gong W, Schild-Poulter C, Hache RJ (1999) Ku antigen-DNA conformation determines the activation of DNA-dependent protein kinase and DNA sequence-directed repression of mouse mammary tumor virus transcription. *Mol Cell Biol* **19**(6): 4065-4078

Giffin W, Torrance H, Rodda DJ, Prefontaine GG, Pope L, Hache RJ (1996) Sequence-specific DNA binding by Ku autoantigen and its effects on transcription. *Nature* **380**(6571): 265-268

Gruffat H, Duran N, Buisson M, Wild F, Buckland R, Sergeant A (1992) Characterization of an R-binding site mediating the R-induced activation of the Epstein-Barr virus BMLF1 promoter. *J Virol* **66**(1): 46-52

Gruffat H, Manet E, Rigolet A, Sergeant A (1990) The enhancer factor R of Epstein-Barr virus (EBV) is a sequence-specific DNA binding protein. *Nucleic Acids Res* **18**(23): 6835-6843

Gruffat H, Sergeant A (1994) Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R. *Nucleic Acids Res* **22**(7): 1172-1178

Hammerschmidt W, Sugden B (1988) Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* **55**(3): 427-433

Holley-Guthrie EA, Quinlivan EB, Mar EC, Kenney S (1990) The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner. *J Virol* **64**(8): 3753-3759

Huang J, Liao G, Chen H, Wu FY, Hutt-Fletcher L, Hayward GS, Hayward SD (2006) Contribution of C/EBP proteins to Epstein-Barr virus lytic gene expression and replication in epithelial cells. *J Virol* **80**(3): 1098-1109

Jeanson L, Mouscadet JF (2002) Ku represses the HIV-1 transcription: identification of a putative Ku binding site homologous to the mouse mammary

tumor virus NRE1 sequence in the HIV-1 long terminal repeat. *J Biol Chem* **277**(7): 4918-4924

Jiang JH, Wang N, Li A, Liao WT, Pan ZG, Mai SJ, Li DJ, Zeng MS, Wen JM, Zeng YX (2006) Hypoxia can contribute to the induction of the Epstein-Barr virus (EBV) lytic cycle. *J Clin Virol* **37**(2): 98-103

Kirchmaier AL, Sugden B (1995) Plasmid maintenance of derivatives of oriP of Epstein-Barr virus. *J Virol* **69**(2): 1280-1283

Kolman JL, Taylor N, Marshak DR, Miller G (1993) Serine-173 of the Epstein-Barr virus ZEBRA protein is required for DNA binding and is a target for casein kinase II phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(21): 10115-10119

Kouzarides T, Packham G, Cook A, Farrell PJ (1991) The BZLF1 protein of EBV has a coiled coil dimerisation domain without a heptad leucine repeat but with homology to the C/EBP leucine zipper. *Oncogene* **6**(2): 195-204

Kudoh A, Fujita M, Zhang L, Shirata N, Daikoku T, Sugaya Y, Isomura H, Nishiyama Y, Tsurumi T (2005) Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *J Biol Chem* **280**(9): 8156-8163

Kudoh A, Iwahori S, Sato Y, Nakayama S, Isomura H, Murata T, Tsurumi T (2009) Homologous recombinational repair factors are recruited and loaded onto the viral DNA genome in Epstein-Barr virus replication compartments. *J Virol* **83**(13): 6641-6651

Le Roux F, Sergeant A, Corbo L (1996) Epstein-Barr virus (EBV) EB1/Zta protein provided in trans and competent for the activation of productive cycle genes does not activate the BZLF1 gene in the EBV genome. *J Gen Virol* **77** (Pt 3): 501-509

Lieber MR, Grawunder U, Wu X, Yaneva M (1997) Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. *Curr Opin Genet Dev* **7**(1): 99-104

Lieberman PM, Berk AJ (1994) A mechanism for TAFs in transcriptional activation: activation domain enhancement of TFIID-TFIIA--promoter DNA complex formation.

Genes Dev **8**(9): 995-1006

Lieberman PM, Hardwick JM, Hayward SD (1989) Responsiveness of the Epstein-Barr virus NotI repeat promoter to the Z transactivator is mediated in a cell-type-specific manner by two independent signal regions. *J Virol* **63**(7): 3040-3050

Lieberman PM, Hardwick JM, Sample J, Hayward GS, Hayward SD (1990) The zta transactivator involved in induction of lytic cycle gene expression in Epstein-Barr virus-infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions. *J Virol* **64**(3): 1143-1155

Lin DY, Fang HI, Ma AH, Huang YS, Pu YS, Jenster G, Kung HJ, Shih HM (2004) Negative modulation of androgen receptor transcriptional activity by Daxx. *Mol Cell Biol* **24**(24): 10529-10541

Liu C, Sista ND, Pagano JS (1996) Activation of the Epstein-Barr virus DNA polymerase promoter by the BRLF1 immediate-early protein is mediated through USF and E2F. *J Virol* **70**(4): 2545-2555

Liu P, Speck SH (2003) Synergistic autoactivation of the Epstein-Barr virus immediate-early BRLF1 promoter by Rta and Zta. *Virology* **310**(2): 199-206

Lu CC, Chen YC, Wang JT, Yang PW, Chen MR (2007a) Xeroderma pigmentosum C is involved in Epstein Barr virus DNA replication. *J Gen Virol* **88**(Pt 12): 3234-3243

Lu CC, Huang HT, Wang JT, Slupphaug G, Li TK, Wu MC, Chen YC, Lee CP, Chen MR (2007b) Characterization of the uracil-DNA glycosylase activity of Epstein-Barr virus BKRF3 and its role in lytic viral DNA replication. *J Virol* **81**(3): 1195-1208

Lu., Chen. (2006) Lytic replication of Epstein-Barr virus. *Future Medicine* **1**

Manet E, Rigolet A, Gruffat H, Giot JF, Sergeant A (1991) Domains of the Epstein-Barr virus (EBV) transcription factor R required for dimerization, DNA binding and activation. *Nucleic Acids Res* **19**(10): 2661-2667

Matheos D, Ruiz MT, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M (2002) Ku antigen, an origin-specific binding protein that associates with replication proteins, is required

for mammalian DNA replication. *Biochim Biophys Acta* **1578**(1-3): 59-72

Matson SW, Kaiser-Rogers KA (1990) DNA helicases. *Annu Rev Biochem* **59**: 289-329

Mayeur GL, Kung WJ, Martinez A, Izumiya C, Chen DJ, Kung HJ (2005) Ku is a novel transcriptional recycling coactivator of the androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem* **280**(11): 10827-10833

Merkle D, Douglas P, Moorhead GB, Leonenko Z, Yu Y, Cramb D, Bazett-Jones DP, Lees-Miller SP (2002) The DNA-dependent protein kinase interacts with DNA to form a protein-DNA complex that is disrupted by phosphorylation. *Biochemistry* **41**(42): 12706-12714

Middleton T, Sugden B (1992) EBNA1 can link the enhancer element to the initiator element of the Epstein-Barr virus plasmid origin of DNA replication. *J Virol* **66**(1): 489-495

Miller G, Rabson M, Heston L (1984) Epstein-Barr virus with heterogeneous DNA disrupts latency. *J Virol* **50**(1): 174-182

Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, Inada S, Yoshida S, Homma M (1981) Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest* **68**(3): 611-620

Nash K, Chen W, Salganik M, Muzyczka N (2009) Identification of cellular proteins that interact with the adeno-associated virus rep protein. *J Virol* **83**(1): 454-469

Niederman JC, Miller G, Pearson HA, Pagano JS, Dowaliby JM (1976) Infectious mononucleosis. Epstein-Barr-virus shedding in saliva and the oropharynx. *N Engl J Med* **294**(25): 1355-1359

Novac O, Matheos D, Araujo FD, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M (2001) In vivo association of Ku with mammalian origins of DNA replication. *Mol Biol Cell* **12**(11): 3386-3401

Nutter LM, Grill SP, Li JS, Tan RS, Cheng YC (1987) Induction of virus enzymes by

phorbol esters and n-butyrate in Epstein-Barr virus genome-carrying Raji cells. *Cancer Res* **47**(16): 4407-4412

Ochem AE, Rechreche H, Skopac D, Falaschi A (2008) Stimulation of the DNA unwinding activity of human DNA helicase II/Ku by phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* **470**(1): 1-7

Ochem AE, Skopac D, Costa M, Rabilloud T, Vuillard L, Simoncsits A, Giacca M, Falaschi A (1997) Functional properties of the separate subunits of human DNA helicase II/Ku autoantigen. *J Biol Chem* **272**(47): 29919-29926

Okumura K, Takagi S, Sakaguchi G, Naito K, Minoura-Tada N, Kobayashi H, Mimori T, Hinuma Y, Igarashi H (1994) Autoantigen Ku protein is involved in DNA binding proteins which recognize the U5 repressive element of human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *FEBS Lett* **356**(1): 94-100

Petroski MD, Wagner EK (1998) Purification and characterization of a cellular protein that binds to the downstream activation sequence of the strict late UL38 promoter of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **72**(10): 8181-8190

Quinlivan EB, Holley-Guthrie EA, Norris M, Gutsch D, Bachenheimer SL, Kenney SC (1993) Direct BRLF1 binding is required for cooperative BZLF1/BRLF1 activation of the Epstein-Barr virus early promoter, BMRF1. *Nucleic Acids Res* **21**(14): 1999-2007

Rampakakis E, Di Paola D, Zannis-Hadjopoulos M (2008) Ku is involved in cell growth, DNA replication and G1-S transition. *J Cell Sci* **121**(Pt 5): 590-600

Rawlins DR, Milman G, Hayward SD, Hayward GS (1985) Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* **42**(3): 859-868

Reeves WH, Stoecker ZM (1989) Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J Biol Chem* **264**(9): 5047-5052

Rickinson AB, Finerty S, Epstein MA (1978) Inhibition by phosphonoacetate of the in vitro outgrowth of Epstein-Barr virus genome-containing cell lines from the blood of infectious mononucleosis patients. *IARC Sci Publ*(24 Pt 2): 721-728

Rooney CM, Rowe DT, Ragot T, Farrell PJ (1989) The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle. *J Virol* **63**(7): 3109-3116

Ruiz MT, Matheos D, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M (1999) OBA/Ku86: DNA binding specificity and involvement in mammalian DNA replication. *Mol Biol Cell* **10**(3): 567-580

Schepers A, Pich D, Hammerschmidt W (1993) A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *EMBO J* **12**(10): 3921-3929

Schepers A, Pich D, Hammerschmidt W (1996) Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus, by BZLF1. *Virology* **220**(2): 367-376

Schepers A, Ritzi M, Bousset K, Kremmer E, Yates JL, Harwood J, Diffley JF, Hammerschmidt W (2001) Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J* **20**(16): 4588-4602

Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* **17**(15): 6419

Shakibai N, Kumar V, Eisenberg S (1996) The Ku-like protein from *Saccharomyces cerevisiae* is required in vitro for the assembly of a stable multiprotein complex at a eukaryotic origin of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11569-11574

Shi L, Qiu D, Zhao G, Corthesy B, Lees-Miller S, Reeves WH, Kao PN (2007) Dynamic binding of Ku80, Ku70 and NF90 to the IL-2 promoter in vivo in activated T-cells. *Nucleic Acids Res* **35**(7): 2302-2310

Sibani S, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M (2005a) Decreased origin usage and initiation of DNA replication in haploinsufficient HCT116 Ku80^{+/-} cells. *J Cell Sci* **118**(Pt 15): 3247-3261

Sibani S, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M (2005b) Ku80 binds to human replication

origins prior to the assembly of the ORC complex. *Biochemistry* **44**(21): 7885-7896

Sinclair AJ, Brimmell M, Shanahan F, Farrell PJ (1991) Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *J Virol* **65**(5): 2237-2244

Sista ND, Pagano JS, Liao W, Kenney S (1993) Retinoic acid is a negative regulator of the Epstein-Barr virus protein (BZLF1) that mediates disruption of latent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9): 3894-3898

Smider V, Chu G (1997) The end-joining reaction in V(D)J recombination. *Semin Immunol* **9**(3): 189-197

Speck SH, Chatila T, Flemington E (1997) Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol* **5**(10): 399-405

Takada K, Shimizu N, Sakuma S, Ono Y (1986) trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *J Virol* **57**(3): 1016-1022

Taylor TJ, Knipe DM (2004) Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. *J Virol* **78**(11): 5856-5866

Thomas JA, Hotchin NA, Allday MJ, Amlot P, Rose M, Yacoub M, Crawford DH (1990) Immunohistology of Epstein-Barr virus-associated antigens in B cell disorders from immunocompromised individuals. *Transplantation* **49**(5): 944-953

Toth EC, Marusic L, Ochem A, Patthy A, Pongor S, Giacca M, Falaschi A (1993) Interactions of USF and Ku antigen with a human DNA region containing a replication origin. *Nucleic Acids Res* **21**(14): 3257-3263

Tsuchiya T, Saegusa Y, Taira T, Mimori T, Iguchi-Arigo SM, Ariga H (1998) Ku antigen binds to Alu family DNA. *J Biochem* **123**(1): 120-127

Tsurumi T (1993) Purification and characterization of the DNA-binding activity of the Epstein-Barr virus DNA polymerase accessory protein BMRF1 gene products, as expressed in insect cells by using the baculovirus system. *J Virol* **67**(3): 1681-1687

Tsurumi T, Daikoku T, Kurachi R, Nishiyama Y (1993a) Functional interaction between Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and its accessory subunit in vitro. *J Virol* **67**(12): 7648-7653

Tsurumi T, Kishore J, Yokoyama N, Fujita M, Daikoku T, Yamada H, Yamashita Y, Nishiyama Y (1998) Overexpression, purification and helix-destabilizing properties of Epstein-Barr virus ssDNA-binding protein. *J Gen Virol* **79** (Pt 5): 1257-1264

Tsurumi T, Kobayashi A, Tamai K, Daikoku T, Kurachi R, Nishiyama Y (1993b) Functional expression and characterization of the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit. *J Virol* **67**(8): 4651-4658

Tuteja N, Tuteja R, Ochem A, Taneja P, Huang NW, Simoncsits A, Susic S, Rahman K, Marusic L, Chen J, et al. (1994) Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J* **13**(20): 4991-5001

Uematsu N, Weterings E, Yano K, Morotomi-Yano K, Jakob B, Taucher-Scholz G, Mari PO, van Gent DC, Chen BP, Chen DJ (2007) Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* **177**(2): 219-229

van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* **2**(3): 196-206

Vishwanatha JK, Baril EF (1990) Single-stranded-DNA-dependent ATPase from HeLa cells that stimulates DNA polymerase alpha-primase activity: purification and characterization of the ATPase. *Biochemistry* **29**(37): 8753-8759

Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**(6847): 607-614

Wang P, Day L, Dheekollu J, Lieberman PM (2005) A redox-sensitive cysteine in Zta is required for Epstein-Barr virus lytic cycle DNA replication. *J Virol* **79**(21): 13298-13309

Wang Y, Li H, Tang Q, Maul GG, Yuan Y (2008) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ori-Lyt-dependent DNA replication: involvement of host cellular

factors. *J Virol* **82**(6): 2867-2882

Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J (1989) Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* **320**(8): 502-506

Wiedmer A, Wang P, Zhou J, Rennekamp AJ, Tiranti V, Zeviani M, Lieberman PM (2008) Epstein-Barr virus immediate-early protein Zta co-opts mitochondrial single-stranded DNA binding protein to promote viral and inhibit mitochondrial DNA replication. *J Virol* **82**(9): 4647-4655

Xu P, LaVallee PA, Lin JJ, Hoidal JR (2004) Characterization of proteins binding to E-box/Ku86 sites and function of Ku86 in transcriptional regulation of the human xanthine oxidoreductase gene. *J Biol Chem* **279**(16): 16057-16063

Yaneva M, Wen J, Ayala A, Cook R (1989) cDNA-derived amino acid sequence of the 86-kDa subunit of the Ku antigen. *J Biol Chem* **264**(23): 13407-13411

Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B (1984) A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(12): 3806-3810

Yates JL, Guan N (1991) Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J Virol* **65**(1): 483-488

Yates JL, Warren N, Sugden B (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* **313**(6005): 812-815

Yokoyama N, Fujii K, Hirata M, Tamai K, Kiyono T, Kuzushima K, Nishiyama Y, Fujita M, Tsurumi T (1999) Assembly of the Epstein-Barr virus BBLF4, BSLF1 and BBLF2/3 proteins and their interactive properties. *J Gen Virol* **80** (Pt 11): 2879-2887

Young LS, Rickinson AB (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* **4**(10): 757-768

Zhang Q, Hong Y, Dorsky D, Holley-Guthrie E, Zalani S, Elshiekh NA, Kiehl A, Le T, Kenney S (1996) Functional and physical interactions between the Epstein-Barr virus (EBV) proteins BZLF1 and BMRF1: Effects on EBV transcription and lytic

replication. *J Virol* **70**(8): 5131-5142

zur Hausen H, O'Neill FJ, Freese UK, Hecker E (1978) Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Nature* **272**(5651): 373-375



附表

Name	Characteristic	Primer	Source
pET28a-cZta	6.1 kb, 利用引子 GST-Z5 和 GST-Z3 進行 PCR, PCR 產物以 EcoR I 和 XhoI I 切後, 接入 pET28a 的 <i>EcoR</i> I 和 <i>Sal</i> I 切位	GST-Z5 : 5'-CCGGAATTCATGATGGACCCAAACTCG GST-Z3 : 5'-ACGCGTCGACTAGAAATTTAAGAGATCC	This study
pGEX-4T1-cZta	5.6 kb, 利用引子 GST-Z5 和 GST-Z3 進行 PCR, PCR 產物以 EcoR I 和 XhoI I 切後, 接入 pGEX-4T1 的 <i>EcoR</i> I 和 <i>Sal</i> I 切位	GST-Z5 : 5'-CCGGAATTCATGATGGACCCAAACTCG GST-Z3 : 5'-ACGCGTCGACTAGAAATTTAAGAGATCC	This study
pEGFP-C2-cZta	5.4 kb, 利用引子 GST-Z5 和 GST-Z3 進行 PCR, PCR 產物以 EcoRI 和 Sal I 切後, 接入 pEGFP-C2 的 <i>EcoRI</i> 和 <i>Sal</i> I 切位	GST-Z5 : 5'-CCGGAATTCATGATGGACCCAAACTCG GST-Z3 : 5'-ACGCGTCGACTAGAAATTTAAGAGATCC	This study
pEGFP-C2-cZta-N	4.9 kb, 利用引子 GST-Z5 和 GST-Z3 進行 PCR, PCR 產物以 EcoR I 和 XhoI I 切後, 接入 pEGFP-C2 的 <i>EcoR</i> I 和 <i>Sal</i> I 切位	GST-Z5 : 5'-CCGGAATTCATGATGGACCCAAACTCG Z86-R : 5'-ACGCGTCGACATAAGCATTCTCAGGAGC	This study
pEGFP-C2-cZta-M	4.9 kb, 利用引子 GST-Z5 和 GST-Z3 進行 PCR, PCR	Z86-F : 5'-CCGGAATTCCAAGCTTATGCAGCACCT	This study

	產物以 <i>EcoR</i> I 和 <i>Xho</i> I 切後，接入 pEGFP-C2 的 <i>EcoR</i> I 和 <i>Sal</i> I 切位	Z167-R : 5'-ACGCGTCGACCGATTCTGGCTGTTGTGG T	
pEGFP-C2-cZta-C	4.9 kb, 利用引子 GST-Z5 和 GST-Z3 進行 PCR, PCR 產物以 <i>EcoR</i> I 和 <i>Xho</i> I 切後，接入 pEGFP-C2 的 <i>EcoR</i> I 和 <i>Sal</i> I 切位	Z168-F : 5'-CCGGAATTCCTGGAGGAATGCGATTCTG GST-Z3 : 5'-ACGCGTCGACTAGAAATTTAAGAGATCC	This study
pEGFP-C2-Ku80			
pEGFP-C2-Ku80-N	5.4 kb, 利用引子 Ku80-5 和 Ku80-244-R 進行 PCR, PCR 產物以 <i>EcoR</i> I 和 <i>Sal</i> I 切後，接入 pEGFP-C2 的 <i>EcoR</i> I 和 <i>Sal</i> I 切位	Ku80-5 : 5'-CCggAATTCATggTgCggTCggggAAT Ku80-244-R : 5'-ACgCgTCgACggAATgCCTCTCAATTT	This study
pEGFP-C2-Ku80-M	5.2 kb, 利用引子 Ku80-245-F 和 Ku80-424-R 進行 PCR, PCR 產物以 <i>EcoR</i> I 和 <i>Sal</i> I 切後，接入 pEGFP-C2 的 <i>EcoR</i> I 和 <i>Sal</i> I 切位	Ku80-245-F : 5'-CCggAATTCATTCACCTggCCCTgCCgA Ku80-424-R : 5'-ACgCgTCgACCAgCTgCACATACTAA	This study
pEGFP-C2-Ku80-C	5.6 kb, 利用引子 Ku80-425-F 和 Ku80-3 進行 PCR, PCR 產物以 <i>EcoR</i> I 和 <i>Sal</i> I 切後，接入	Ku80-425-F : 5'-CCggAATTCCTTTTCATggAAgACTTg Ku80-3 : 5'-ACgCgTCgACCTATATCATgTCCAATAA	This study

	pEGFP-C2 的 <i>EcoRI</i> 和 <i>Sal I</i> 切位		
--	--	--	--

