

# BRLF1-EBV 的一种立即早期基因的研究进展

任 军 综述,周 玲,曾 毅 审校

(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所,北京 100052)

## A Review Research Progress of BRLF1 One of EBV Immediate-Early Gene

REN Jun, ZHOU Ling, ZENG Yi

**摘 要:** BRLF1 是 EBV 的立即早期基因。作为一种反式激活因子,它可以调节 EBV 早期/晚期基因的表达,并且还可能参与裂解期病毒基因组的复制。它的表达与 EBV 潜伏周期向裂解周期的转换密切相关。BRLF1 的蛋白产物 Rta 包含 CTL 识别的表位,可能在病毒裂解周期的早期成为免疫系统的作用位点。对它研究还可能为某些 EBV 相关肿瘤的筛查和治疗提供线索。

**关键词:** Epstein-Barr 病毒; BRLF1; Rta; 基因

**中图分类号:** R73-3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1004-0242(2005)06-0372-04

Epstein-Barr 病毒(EBV)是疱疹病毒科  $\gamma$  亚科成员,是一种在人群中分布广泛的感染因子,在全世界 90% 以上人感染此病毒。EBV 可引起人类的传染性单核细胞增多症,还与 Burkitt's 淋巴瘤及鼻咽癌的发生密切相关。EBV 的基因组长约 172kb,基因组的末端有多个长约 0.5kb 的末端重复序列,可以使病毒基因组环化成环状游离体(episome),并以此形式持续存在于受感染细胞的细胞核内。EBV 有潜伏周期和裂解周期两种状态。EBV 进入细胞后,通常很快进入潜伏期,病毒基因组持续存在于细胞内。但病毒在受感染细胞的少数细胞中可以进入增殖期,并产生病毒颗粒。佛波酯、钙离子载体、丁酸盐、抗膜免疫球蛋白处理潜伏有 EBV 的 B 淋巴细胞,都可以诱导 EBV 由潜

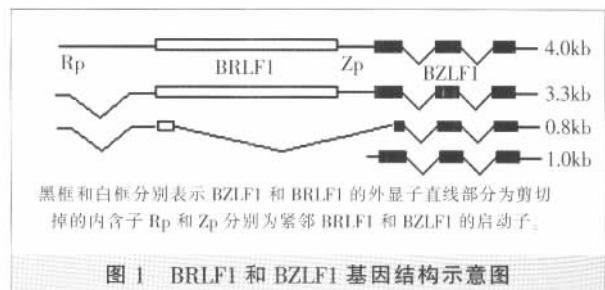
伏状态转换到裂解状态。BZLF1 (BamHI 片段 Z 左向第一读码框)和 BRLF1 (BamHI 片段 R 左向第一读码框)两个基因在病毒的潜伏周期转变为裂解周期的过程中起重要作用。1997 年 Samuel H. Speck 及 2003 年王海都曾经对 BZLF1 的研究做过综述。本文主要对 BRLF1 基因的表达调控及功能做一综述。

### 1 BRLF1 基因结构

BRLF1 和 BZLF1 在 EBV 的基因组中位于相邻的位置。由 Rp 和 Zp 启动,分别转录出 4.0kb 和 1.0kb 的 mRNA。4.0kb 的 mRNA 进一步被剪接成 3.3kb 或 0.8kb 的 mRNA。BRLF1 基

因不含有内含子,由 3.3kb mRNA 翻译出 Rta 蛋白。BZLF1 的蛋白产物 Zta (Z, 也被称为 EB1、ZEBRA) 可以由 3 个重叠的 mRNA (1.0kb, 3.3kb, 4.0kb) 表达,分别由 Rp 和 Zp 启动子控制。1.0kb 的 mRNA 翻译出完整的 Zta 蛋白。3.3kb 的 mRNA 翻译出 Zta 蛋白和 Rta 蛋白。0.8kb 的 mRNA 编码 BRLF1 和 BZLF1 的融合蛋白 RAZ<sup>[1]</sup>。见图 1<sup>[2]</sup>。

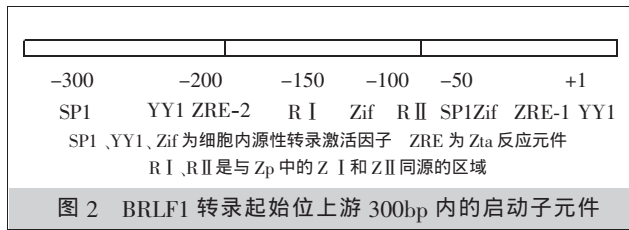
实验表明 BRLF1 的框移突变和删除突变可以减少双顺反子 Zp 下游基因的翻译,并且 BRLF1 的顺式位置对于拯救这种突变的



收稿日期:2004-11-26

影响是重要的<sup>[3]</sup>。第 86~125bp 与 18S rRNA (1489~1524 碱基) 部分互补, 并且这段序列的突变能显著减少下游顺反子的翻译。推测 40S 核蛋白体可以与此段序列结合, Zta 蛋白翻译的起始会因此而增加效率<sup>[2]</sup>。

BRLF1 转录起始位点上游 300bp 之内的启动子元件如图 2:



-279~-286 和 -45~-50 之间的 SP1 位点, 与 Rta 的自激活作用密切相关<sup>[4]</sup>。-44~-39、-575~-379 两个区域可能也含有 SP1 结合位点。细胞的转录激活因子 SP1 能够很强烈地激活 Rp。实验证明, 在上皮细胞中 Rp 可以组成性地被激活, 而 B 细胞中则不能<sup>[5]</sup>。-197~-191 和 -37~-31 为 ZRE 位点。-153~-142 和 -80~-72 的 R I、R II 是与 Zp 中的 Z I 和 Z II 同源的区域。-131~-123 和 -49~-40 为 Zif 位点。-214~-225 和 -8~+5 为 YY1 位点<sup>[6]</sup>。-206~-227 之间可能存在与 YY1 相作用的负调控元件, 这段序列的突变可以在 HeLa 和 Raji 细胞中增加 Rp 所调控的报道基因的表达<sup>[7]</sup>。另外, 在 -422~-398 处存在 ZEB 的结合位点<sup>[8]</sup>。

在淋巴瘤细胞系 DG75 和上皮细胞系 293 中, TPA 和钙离子通道对 Rp 的诱导激活作用很弱, 并且 Rta 和 Zta 对 Rp 的激活具有协同效应。近端的 ZRE-1 位点在这种协同效应中起关键作用。

而近端的 SP1 位点在缺少 Zta 的情况下似乎更重要<sup>[9]</sup>。

## 2 BRLF1 基因表达产物的结构和功能

### 2.1 Rta 蛋白的功能结构域

Rta 蛋白由 605 个氨基酸组成, N 端的 232 个氨基酸为 DNA 结合区域。其中 N 端的 230 个氨基酸与二聚体形成有关。对于与

DNA 的结合, 二聚体的形成是必需的。与转录激活相关的区域位于 C 末端, 这段区域又可进一步划分成两个结构域: 结构域 1, 352~515 的富含脯氨酸区域; 结构域 2, 515~605 位的酸性区域。删除这两个结构域的任何一個都会使转录激活活性显著减弱。把 GAL4 的 DNA 结合序列与 Rta 的 416~519 位氨基酸融合表达, 只显示出很弱的转录激活活性, 而 GAL4-Rta (520~605) 却表现出很强的活性。并且根据突变分析的结果推测, 结构域 2 中可能包含具有协同作用的 3 个亚结构域<sup>[10]</sup>。说明结构域 2 可能在转录激活作用中更为重要。

### 2.2 对病毒编码基因的作用和 EBV 裂解周期 DNA 复制的影响

#### 2.2.1 基因表达产物对病毒基因的反式激活作用

Rta 是一种具有序列特异性的 DNA 结合蛋白<sup>[11]</sup>。它可以与 BMLF1 启动子 -400~-356bp 的区域直接相互作用, 促进 BMLF1 的表达<sup>[12]</sup>。此外, Rta 可以通过非直

接结合的机制发挥其激活作用。在 EBV 阴性的淋巴瘤细胞系 DG75 中, 单独表达 Rta 就可以启动 EBV 的 pol 启动子所控制基因的表达。在 pol 启动子中没有找到与已发现的 RRE (R response element) 同源的序列, 也没有检测到与原核表达的 Rta 结合的序列。并且 Pol 启动子中 E2F 和 USF 结合位点的突变会减弱 Rta 激活作用。推测 Rta 是以一种由细胞蛋白介导的方式激活 pol 启动子<sup>[13]</sup>。在 HeLa 细胞内, Rta 可以与 CBP 直接相互作用, 并且这种相互作用对于 Rta 激活 EBV 早期基因 SM 是十分重要的<sup>[14]</sup>。在正常的人成纤维细胞中, 以腺病毒载体表达 BRLF1, 激活了 PI3 激酶信号途径。同时, PI3 抑制剂可以在 EBV 阳性的 D98/HE-R-1 细胞中有效抑制 Rta 对 BMLF1 的诱导, 但不能抑制 Rta 对 SM 基因的激活。这些结果提示, PI3 激酶途径在 Rta 的转录激活作用中具有启动子依赖性, 并且 Rta 对下游基因的激活也是通过不同机制实现的<sup>[15]</sup>。

Rta 可能以某种上皮细胞特异的方式激活 EBV 由潜伏状态到裂解状态的转变。在潜伏有 EBV 的上皮细胞中, Rta 的表达就足够引起 EAD (D 型 EBV 早期抗原) 的产生, 也可以激活 BZLF1 和 BMLF1 的表达<sup>[16]</sup>。以重组痘病毒为载体分别在 EBV 阳性的类淋巴母细胞系 (LCLs) 及 Burkitt 淋巴瘤 (BL) 细胞中表达 BRLF1 和 BZLF1, 观察早期蛋白 MStA 及 BALF2 编码的 p138 的表达情况, 发现 BRLF1 在 LCLs 中起较为重要的作用, 而 BZLF1 在 BL 细胞中

显示出更为重要的作用<sup>[17]</sup>。

在 EBV 阳性的 B 淋巴细胞 HH514-16 细胞中, 表达 Rta 可以激活 EBV 晚期基因的表达和病毒裂解周期 DNA 的复制, 并且 Zta 可以有效地激活 Rp, Rta 也可以激活 Rp 和 Zp<sup>[18]</sup>。由于这种交叉的激活作用, 难以单独观察到 Zta 和 Rta 对 EBV 早晚期基因表达和病毒 DNA 复制的影响。R. Feederle 等<sup>[19]</sup>通过建立 BZLF1 或 BRLF1 基因突变的 EBV 基因组, 单独分析这两个基因的功能, 发现它们在 EBV 早晚期基因表达和病毒 DNA 的复制过程中都是必需的, 并可能分别执行各自独特的功能。

此外微阵列分析表明, 在 HeLa 和 TIK 细胞中以腺病毒为载体表达 BRLF1 可以诱导激活脂肪合成酶(FAS)基因的表达<sup>[20]</sup>。这可能会改变细胞膜的成分。

#### 2.2.2 基因表达产物与 OriLyt 作用

与裂解周期复制相关的原点为 OriLyt。OriLyt 区域内有可以与 Rta 作用的双歧启动子序列(一个约 1000bp 的区域), 右向调控 BHRF1 基因, 左向调控 BHLF1 基因。Rta 在不包含其他 EBV 组分的细胞中就可以增强受此段序列调控的报道基因的表达<sup>[21]</sup>。在 Vero 细胞中的共转染实验表明, 缺少 Zta 或 Rta 都会使 OriLyt 的复制效率降低<sup>[22]</sup>。这些实验结果表明, 在 EBV 裂解周期的病毒基因组复制的过程中, Rta 也起着重要的作用。

#### 2.3 与细胞内蛋白质分子的作用

Rta 可以与 CBP 直接地相互作用, 增强激活的某些 EBV 早期基因启动子调控的报道基因的表

达<sup>[14]</sup>。此外, Rta 可以增加 p38 激酶和 JNK 的活性, 从而增加 ATF2 的磷酸化水平, 这在 Rta 诱导 EBV 由潜伏状态向裂解状态转换过程中起关键作用<sup>[23]</sup>。交联的表面免疫球蛋白诱导激活 Akata 细胞 6h 和 12h 后, 用免疫共沉淀法可以检测到 Rta 和 Rb 的相互作用, 同时与 Rb 结合的 E2F1 被释放出来<sup>[24]</sup>。以腺病毒载体在正常的人成纤维细胞 (NHF) 表达 BRLF1 基因, 可以减少 Rb 的水平 and 增加 E2F1 的水平, 并使细胞进入 S 期<sup>[25]</sup>。由此, Rta 可以通过多种途径对宿主细胞产生影响。

#### 2.4 Rta 的 CTL 表位

Sandra Pepperl 等<sup>[26]</sup>用合成肽与 EBV 阳性个体的外周血淋巴细胞相作用, 分析 Zta 蛋白的 CTL 表位, 结果表明, Rta 蛋白至少有 8 个位点可以被 EBV 特异的 CTL 细胞识别, 并且有 7 个相关的 HLA 型别已确定。以上的结果说明, 在裂解周期中 Rta 可能是宿主免疫系统识别和作用的靶, 在早期阻止子代病毒的产生。

### 3 BRLF1 与 EBV 相关肿瘤

体外及体内实验均表明, 以腺病毒为载体表达 BRLF1 基因可以在 EBV 阳性的肿瘤细胞中诱导向裂解周期的转换; 同时体外实验证明在加入药物 GCV 的情况下, 可以有效地抑制 EBV 复制的同时使携带 EBV 的 Jijoye 肿瘤细胞死亡<sup>[27]</sup>。FENG WH 等<sup>[28]</sup>的实验也表明, 以腺病毒载体表达 BRLF1 可以有效导致 EBV 阳性的 NPC-KT 和 AGS-EBV 细胞死亡, 也可以有效抑制 C18 NPC 肿

瘤细胞在裸鼠体内的生长。提示 BRLF1 可以成为一个治疗 EBV 相关肿瘤的研究方向。

用大肠杆菌表达的 Rta 蛋白, 通过 ELISA 方法检测到鼻咽癌(NPC)患者血清中具有 Rta 的 IgG 抗体, 敏感性可达 82.3%, 特异性达到 85.2%<sup>[29]</sup>。Yoshizaki 的研究表明, ELISA 法检测 Rta 和 Zta 的抗体可以用于 NPC 的筛查<sup>[30]</sup>。

## 4 小结

BRLF1 是 EBV 裂解周期的立即早期基因, 与打断病毒的潜伏周期、诱导早/晚期基因的表达和基因组的复制密切相关。对它的研究有助于对基因表达调控和蛋白质相互作用的了解, 尤其其与宿主细胞之间的关系在这一过程中的变化。这些都有利于揭开 EBV 的致病和免疫机制, 为预防和治疗 EBV 的相关疾病提供基础。并且有研究数据表明, EBV 的裂解周期与某些恶性病变密切相关。对于 BRLF1 基因的研究可能对相关疾病的检测和治疗有所帮助。

## 参考文献:

- [1] Furnari FB, Zaccy V, Quinlivan EB, et al. RAZ, an Epstein-Barr virus transdominant repressor that modulates the viral reactivation mechanism [J]. J Virol, 1994, 68: 1827-1836.
- [2] Chang PJ, Liu ST. Function of the intercistronic region of BRLF1 - BZLF1 bicistronic mRNA in translating the Zta protein of Epstein-Barr virus [J]. J Virol, 2001, 75: 1142-1151.
- [3] Chang PJ, Chang YS, Liu ST. Role of Rta in the translation of bi

- cistronic BZLF1 of Epstein-Barr virus [J]. *J Virol*,1998,72:5128–5136.
- [4] Ragoczy T, Miller G. Autostimulation of the Epstein-Barr virus BRLF1 promoter is mediated through consensus Sp1 and Sp3 binding sites [J]. *J Virol*,2001,75: 5240–5251.
- [5] Zalani S, Holley-Guthrie E, Gutsch D, et al. The Epstein-Barr virus immediate-early promoter BRLF1 can be activated by the cellular Sp1 transcription factor [J]. *J Virol*, 1992,66:7282–7292.
- [6] Zalani S, Holley-Guthrie E, Kenney S. The Zif268 cellular transcription factor activates expression of the Epstein-Barr virus immediate-early BRLF1 promoter [J]. *J Virol*,1995, 69:3816–3823.
- [7] Zalani S, Coppage A, Holley-Guthrie E, et al. The cellular YY1 transcription factor binds a cis-acting, negatively regulating element in the Epstein-Barr virus BRLF1 promoter [J]. *J Virol*,1997,71:3268–3274.
- [8] Kraus R, Perrigou J, Mertz J. ZEB negatively regulates the lytic-switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus [J]. *J Virol*,2003,77:199–207.
- [9] Liu PF, Speck SH. Synergistic autoactivation of the Epstein-Barr virus immediate-early BRLF1 promoter by Rta and Zta [J]. *Virology*, 2003,310:199–206.
- [10] Hardwick JM, Tse L, Applegren N, et al. The Epstein-Barr virus R transactivator (Rta) contains a complex, potent activation domain with properties different from those of VP16 [J]. *J Virol*,1992,66:5500–5508.
- [11] Gruffat H, Sergeant A. Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R [J]. *Nucleic Acids Research*, 1994,22:1172–1178.
- [12] Gruffat H, Duran N, Buisson M, et al. Characterization of an R-binding site mediating the R-induced activation of the Epstein-Barr virus BMLF1 promoter [J]. *J Virol*, 1992,66:46–52.
- [13] Liu C, Sista ND, Pagano JS. Activation of the Epstein-Barr virus DNA polymerase promoter by the BRLF1 immediate-early protein is mediated through USF and E2F [J]. *J Virol*, 1996,70:2545–2555.
- [14] Swenson JJ, Holley-Guthrie E, Kenney S. Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 interacts with CBP, promoting enhanced BRLF1 transactivation [J]. *J Virol*,2001,75:6228–6234.
- [15] Darr CD, Mauser A, Kenney S. Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 induces the lytic form of viral replication through a mechanism involving phosphatidylinositol-3 kinase activation [J]. *J Virol*,2001,75:6135–6142.
- [16] Zalani S, Holley-Guthrie E, Kenney S. Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1996,93:9194–9199.
- [17] Bogedain C, Alliger P, Schwarzmann F, et al. Different activation of Epstein-Barr virus immediate-early and early genes in Burkitt lymphoma cells and lymphoblastoid cell lines [J]. *J Virol*,1994,68:1200–1203.
- [18] Ragoczy T, Heston L, Miller G. The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes [J]. *J Virol*,1998,72: 7978–7984.
- [19] Feederle R, Kost M, Baumann M, et al. The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the cooperative functions of two transactivators [J]. *J EMBO*,2000,19:3080–3089.
- [20] Li YL, Webster-Cyriaque J, Tomlinson CC, et al. Fatty acid synthase expression is induced by the Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 and is required for lytic viral gene expression [J]. *J Virol*,2004,78:4197–4206.
- [21] Cox MA, Leahy J, Hardwick JM. An enhancer within the divergent promoter of Epstein-Barr virus responds synergically to the R and Z transactivators [J]. *J Virol*,1990,64: 313–321.
- [22] Fixman ED, Hayward GS, Hayward SD. Replication of Epstein-Barr virus oriLyf: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays [J]. *J Virol*,1995,69: 2998–3006.
- [23] Adamson AL, Darr D, Holley-Guthrie E, et al. Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases [J]. *J Virol*, 2000, 74:1224–1233.
- [24] Zacny VL, Wilson J, Pagano JS. The Epstein-Barr virus immediate-early gene product, BRLF1, interacts with the retinoblastoma protein during the viral lytic cycle [J]. *J Virol*, 1998,72:8043–8051.
- [25] Swenson JJ, Mauser AE, Kaufmann WK, et al. The Epstein-Barr virus protein BRLF1 activates S phase entry through E2F1 induction [J]. *J Virol*,1999,73:6540–6550.
- [26] Pepperl S, Benninger-Doring G, Modrow S, et al. Immediate-early transactivator Rta of Epstein-Barr virus (EBV) shows multiple epitopes recognized by EBV-specific cytotoxic T lymphocytes [J]. *J Virol*, 1998,72:8644–8649.
- [27] Westphal EM, Mauser A, Swenson J, et al. Induction of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection in EBV-associated malignancies using adenovirus vectors in vitro and in vivo [J]. *Cancer Res*,1999,59: 1485–1491.
- [28] Feng WH, Westphal E, Mauser A, et al. Use of adenovirus vectors expressing Epstein-Barr virus (EBV) immediate-early protein BZLF1 or BRLF1 to treat EBV-positive tumors [J]. *J Virol*, 2002, 76: 10951–10959.
- [29] Deng P, Chan SH, Rachel Soo MY, et al. Antibody response to Epstein-Barr virus Rta protein in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer*,2001,92:1872–1880.
- [30] Yoshizaki T, Miwa H, Takeshita H, et al. Elevation of antibody against Epstein-Barr virus genes BRLF1 and BZLF1 in nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, 126(2):69–73.