

A 型流感病毒 NS1 蛋白羧基端 PL 结构域 影响 NS1 在细胞核内的定位*

张丹桂** 李卫中** 王革非 张 衡 曾 俊 陈幼莹 张 驰 曾祥兴 李康生***

(汕头大学医学院微生物学及免疫学教研室, 广东省高校免疫病理学重点实验室, 汕头 515031)

摘要 A 型流感病毒 NS1 蛋白羧基端 4 个氨基酸可以与 PDZ 结构域(the domain of PSD95, Dig and ZO-1)相结合, 称为 PL 结构域(PDZ ligand domain). 对不同亚型或毒株的流感病毒而言, 其 NS1 蛋白 PL 结构域的组成存在比较大的差异. 有研究发现这种差异能够影响 NS1 与宿主细胞蛋白的相互作用进而影响病毒的致病力. 为进一步探讨 PL 结构域对 NS1 蛋白生物学特性的影响, 首先构建出 4 种不同亚型流感病毒(H1N1、H3N2、H5N1、H9N2)来源的 NS1 绿色荧光蛋白表达质粒. 在此基础上, 对野生型 H3N2 病毒 NS1 表达质粒进行人工改造, 将其 PL 结构域缺失或者替换为其他亚型流感病毒的 PL 结构域, 制备出 4 种重组 NS1 蛋白表达质粒. 通过比较上述不同 NS1 蛋白在 HeLa 细胞中的定位情况发现, 只有野生型 H3N2 病毒的 NS1 蛋白可以定位于核仁当中, 而野生型 H1N1、H5N1、H9N2 病毒的 NS1 蛋白以及 PL 结构域缺失或替代的 H3N2 病毒 NS1 蛋白都不能定位于核仁. 而通过比较上述 NS1 蛋白在流感病毒易感的 MDCK 细胞中的定位, 进一步发现所有这些蛋白均不定位于核仁. 上述结果表明: PL 结构域的不同可以明显影响 NS1 蛋白在 HeLa 细胞核内的定位和分布, 这有可能造成其生物学功能的差异. 同时, NS1 蛋白在细胞核内的定位还与宿主细胞的来源有着密切关系.

关键词 A 型流感病毒, NS1 蛋白, PL 结构域, 核仁

学科分类号 Q1, Q93, R392

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00155

A 型流感病毒是一类传染性强、可引起禽类、人类或其他哺乳类动物急性感染的单股负链 RNA 病毒. 根据血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)抗原性的不同, 流感病毒可分为 16 种 HA 亚型和 9 种 NA 亚型^[1], 任何一种 HA 与 NA 的特异性组合即为一种血清亚型. 新的流感病毒亚型的出现或原有亚型的变异, 都可能引起流感的流行. 目前在人群中流行的主要是 H1N1、H3N2 亚型流感病毒, 而在禽类中以 H5N1、H9N2 亚型较为多见.

A 型流感病毒基因组含 8 个分节段 RNA, 编码 11 种蛋白质. 其中, 非结构蛋白 1(NS1)是一种重要的、与病毒的毒力密切相关的调控蛋白. 它可与宿主细胞内多种蛋白质分子相互作用, 产生复杂的生物学效应, 从而有利于病毒的复制和增殖. 例如: 抑制宿主细胞 mRNA 的成熟和蛋白质的合成^[2-3]; 阻断干扰素的产生并拮抗其对流感病毒的杀伤作用^[4-5]; 影响宿主细胞的凋亡过程等^[6-7]. 同一亚型的 A 型流感病毒其 NS1 的氨基酸组成存在很大的同源性, 但不同亚型的毒株, 其 NS1 氨基

酸同源性较低, 在极性和磷酸化方面存在很大差异, 这可能会引发其生物学功能的改变并由此影响到相应病毒亚型的致病性^[8].

近年来发现, A 型流感病毒的 NS1 羧基端 4 个氨基酸可以与 PDZ 结构域(the domain of PSD95, Dig and ZO-1)相结合, 因此被命名为 PL 结构域(PDZ ligand domain)^[9-10]. PDZ 结构域存在于很多接头蛋白分子中, 在介导蛋白质与蛋白质间相互作用以及信号传递过程中发挥了重要作用^[11]. PL 结构域的共有序列通常为 X-S/L-X-V, 而就每一种亚型或毒株的流感病毒而言, 其 NS1 蛋白 PL 结构域的氨基酸组成又有一定的差异. 已经有研究发现,

* 国家自然科学基金(30771988, 30972766, 81001322), 广东省自然科学基金(9451503102003499), 高等学校博士学科点科研基金(20094402110004), 广东高校优秀青年创新人才培育项目(LYM08056), 农业微生物学国家重点实验室开放课题(AML200910)和汕头大学医学院科研基金资助项目.

** 共同第一作者. *** 通讯联系人.

Tel: 0754-88900456, E-mail: ksli@stu.edu.cn

收稿日期: 2010-03-26, 接受日期: 2010-06-10

PL 结构域的差异与流感病毒的致病力有明显的关联, 因此 PL 结构域被认为是一种决定流感病毒毒力的重要因子^[9]. 由于蛋白质在细胞内的定位和分布方式可能关系到其生物学功能的正常发挥, 因此为了进一步深入了解 PL 结构域对 NS1 蛋白生物学特性的影响, 我们以绿色荧光蛋白(GFP)载体为骨架, 分别构建了 4 种不同流感病毒亚型来源的 NS1 表达质粒以及 4 种 PL 结构域发生缺失或置换的 NS1 表达质粒. 通过转染 HeLa 和 MDCK 细胞, 比较了上述不同 NS1 蛋白在细胞内的定位和分布情况. 研究表明, PL 结构域的组成尤其是 227 位和 229 位碱性氨基酸的存在可以明显影响 NS1 在 HeLa 细胞核内的定位. 此外, 宿主细胞的种属来源也会影响 NS1 蛋白的分布方式.

1 材料与方法

1.1 病毒与细胞

A 型流感病毒 A/Shantou/169/06 (H1N1),

A/Shantou/602/06(H3N2), A/Chicken/GD/1/05(H5N1), A/Quail/Hong Kong/G1/97 (H9N2)由本室保存, 分别简称为 ST169, ST602, GD05, Qa97; 人宫颈癌细胞系 HeLa 及狗肾细胞系 Madin-Darby canine kidney(MDCK)均用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液在 5% CO₂、37℃ 条件下培养.

1.2 主要试剂

AMV 反转录酶、随机引物、高保真 Taq 酶 Prime-STAR、限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I、*Xba* I、*Hind* III、*Bgl* II、T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; pEGFP-C1 质粒购自 Clontech 公司; 大肠杆菌 DH5 α 、质粒小提试剂盒、超纯质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自北京天根公司; 其他试剂均为国产分析纯产品.

1.3 引物设计

实验中用到的引物及其序列见表 1.

Table 1 Primers employed in PCR

Gene name	Forward primers	Reverse primers
NS11-wt	AAT <u>GGATCC</u> ATGGATTCCCACACTGT	TACGGATCCTCAAACCTTTTGACCTAGC
NS32-wt	TATGGATCCATGGATTCCAACACTGTG	TACGGATCCTCAAACCTTTTGACCTAGC
NS51-wt	ATAGGATCCATGGATTCCAACACTGTG	GACGGATCCTCAAACCTTTTGACTCAATTG
NS92-wt	TCTGGATCCATGGATTCCAACACTGTG	AATGGATCCTCAAACCTTCTGGCTCAAT
NS32-PLDel	CGTGGATCCATGGATTCCAACACTGTG	ATAGGATCCTCAAGCTGTTCTCGCCAT
NS32-PL11	CGTGGATCCATGGATTCCAACACTGTG	ATAGGATCCTCAAACCTTTTGACCTAGCTGTTCTCGCCAT
NS32-PL51	CGTGGATCCATGGATTCCAACACTGTG	ATAGGATCCTCAAACCTTTTGACTCAGCTGTTCTCGCCAT
NS32-PL92	CGTGGATCCATGGATTCCAACACTGTG	ATAGGATCCTCAAACCTTCTGGCTCAGCTGTTCTCGCCAT

The sequences underlined were the *Bam*H I site.

1.4 基因克隆与鉴定

利用 Trizol 从流感病毒感染的 MDCK 细胞中提取总 RNA, 以随机引物和 AMV 反转录酶进行反转录获得 cDNA, 逆转录反应条件为: 30℃ 10 min, 42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 4℃ 2 min. 获得的 cDNA 用于随后的 PCR 扩增. PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 循环 35 次, 最后 72℃ 延伸 7 min. PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 用胶回收试剂盒回收, 行 *Bam*H I 单酶切, 加入经同样酶切的 pEGFP-c1 载体, T4 连接酶 16℃ 连接 16 h. 转化大肠杆菌 DH5 α 后, 挑单菌落至 2 ml LB 培养基中, 过夜培养后提取质粒, 用限制性内切酶方法

鉴定阳性重组子. 共获得 8 个重组质粒, 其中 NS11-wt、NS32-wt、NS51-wt、NS92-wt 分别表示包含野生型 ST169(H1N1)、ST602 (H3N2)、GD05 (H5N1)、Qa97(H9N2)病毒 NS1 编码序列的绿色荧光蛋白质粒, NS32-PLDel、NS32-PL11、NS32-PL51、NS32-PL92 分别表示在 NS32-wt 质粒基础上, 将其 PL 结构域缺失或者替换为其他亚型流感病毒(ST169(H1N1), GD05(H5N1), Qa97(H9N2))的 PL 结构域以后而制备出的重组 NS1 蛋白表达质粒. 这些重组蛋白羧基端的序列特征见表 2. 所构建的重组质粒均由北京三博远志公司进行测序验证. 测序正确的克隆用超纯质粒提取试剂盒提取质粒, 并用分光光度计进行定量.

Table 2 The characters of C-terminal sequence of different NS1 proteins

NS1 protein	Origin	C-terminal amino acids (219~230)	
NS11-wt	NS1 protein of ST169(H1N1) strain	KRKMAGTI	RSEV
NS51-wt	NS1 protein of GD05(H5N1) strain	KRKMARTI	ESKV
NS92-wt	NS1 protein of HK97(H9N2) strain	KRKVERTI	EPEV
NS32-wt	NS1 protein of ST602(H3N2) strain	ERKMARTA	RSKV
NS32-PLDel	Deletion of PL domain in NS32-wt	-----	
NS32-PL11	PL domain replacement of NS32-wt by NS11-wt	-----	RSEV
NS32-PL51	PL domain replacement of NS32-wt by NS51-wt	-----	ESKV
NS32-PL92	PL domain replacement of NS32-wt by NS92-wt	-----	EPEV

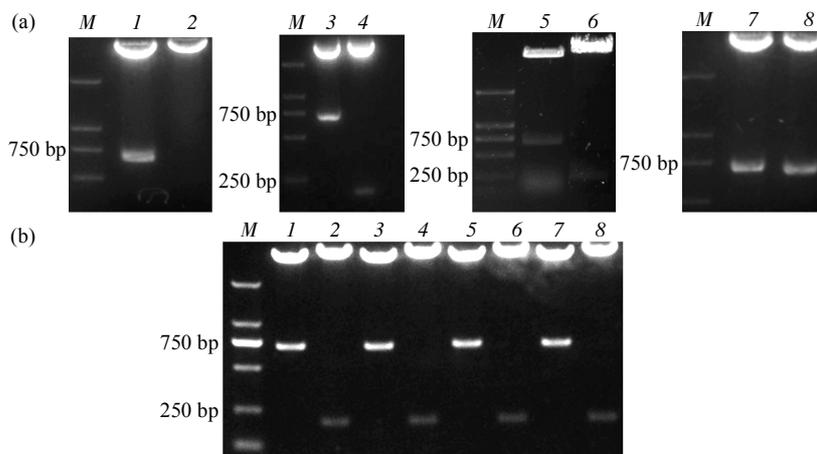
1.5 转染及荧光定位分析

6 孔板中的 HeLa 细胞或 MDCK 细胞长至 60% 以上汇片, 利用 Lipofectamine 2000 分别转染不同的 NS1 绿色荧光蛋白表达质粒. 每孔细胞按照重组质粒 3 μ g、Lipofectamine 2000 6 μ l 的量进行转染. 转染步骤如下, 重组质粒和 Lipofectamine 2000 中分别加入不包含血清的 Opti-MEM 稀释, 室温下孵育 5 min. 将稀释好的重组质粒与 Lipofectamine 2000 再混合, 室温下孵育 20 min, 加入至细胞中, 转染后 6 h 换用含血清的 DMEM 培养基. 转染不同时间点(8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 72 h)利用倒置荧光显微镜(Olympus IX70)动态观察绿色荧光蛋白的表达和分布情况.

2 结 果

2.1 不同 NS1 绿色荧光蛋白表达载体的构建

通过 RT-PCR 的方法, 扩增得到不同亚型流感病毒的 NS1 全长编码序列, 用 *Bam*H I 单酶切后插入经同样酶切的绿色荧光蛋白表达载体 pEGFP-C1. 由于是单酶切插入, 因此, 进一步利用其他限制性内切酶进行正反向测定. 最终成功构建包含不同亚型 NS1 编码序列的真核表达质粒 NS11-wt、NS32-wt、NS51-wt、NS92-wt(酶切结果见图 1a). 在获得的 NS32-wt 质粒基础上, 通过设计不同的引物进行基因克隆, 还制备了 PL 结构域缺失或者替换为其他亚型流感病毒(ST169(H1N1)、GD05(H5N1)、Qa97(H9N2))PL 结构域的重组 NS1 蛋白表达质粒 NS32-PLDel、NS32-PL11、NS32-PL51、

**Fig. 1** Restriction-analysis of recombinant plasmids

(a) Restriction-analysis of wild type NS1-expressing plasmids. *M*: Marker, DL2000 (Takara); 1, 3, 5, 7: Single digestion of NS11-wt, NS32-wt, NS51-wt and NS92-wt plasmids with *Bam*H I; 2, 4, 6, 8: Double digestion of NS11-wt, NS32-wt, NS51-wt and NS92-wt plasmids with *Bam*H I/*Hind*III, *Xba*I/*Eco*R I, *Bam*H I/*Eco*R I and *Bam*H I/*Bgl*II, respectively. (b) Restriction-analysis of mutant NS1-expressing plasmids. *M*: Marker, DL2 000 (Takara); 1, 3, 5, 7: Single digestion of NS32-PLDel, NS32-PL11, NS32-PL51 and NS32-PL92 plasmids with *Bam*H I; 2, 4, 6, 8: Double digestion of NS32-PLDel, NS32-PL11, NS32-PL51 and NS32-PL92 plasmids with *Xba*I/*Eco*R I.

NS32-PL92, 其酶切结果见图 1b. 上述所有质粒均进行了测序验证.

2.2 不同亚型 NS1 蛋白在 HeLa 细胞内的定位情况

不同 NS1 表达质粒转染 HeLa 细胞后, 通过不同时间点(8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 72 h)的动态观察发现, 对于某一个特定的 NS1 蛋白而言, 它在细胞内的定位和分布方式并没有随着时间的延长而发生改变. 考虑到 24 h 绿色荧光强度已达到高峰, 因此我们只选用 24 h 时间点的图片. 从图 2 可以

看出, NS11-wt 和 NS51-wt 主要弥散分布于细胞核内, 在胞浆内只有很少量分布. NS92-wt 虽然也主要分散存在于胞核内, 但与 NS11-wt 和 NS51-wt 不同的是, 它在胞浆内的分布和表达情况要强于后两者. 上述 3 种 NS1 蛋白所共有的一个重要特征是: 它们均不定位于核仁当中. 与此形成鲜明对比的是, NS32-wt 最主要定位于核仁, 其信号强度远远超过胞核内的其他部位. 作为对照的 GFP 蛋白则弥漫性分布于胞浆和胞核中.

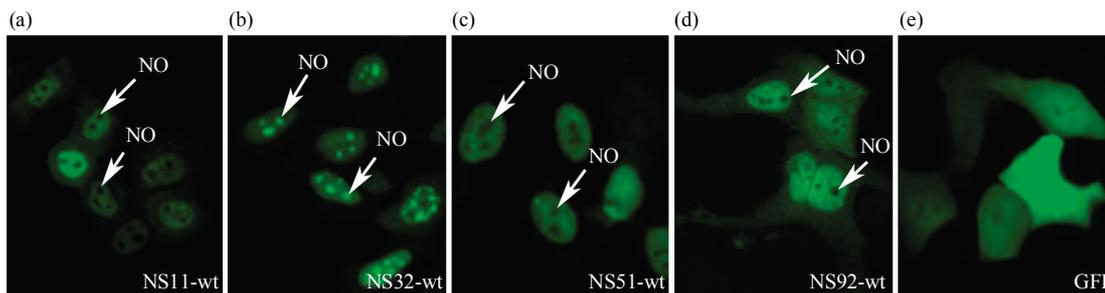


Fig. 2 Localization of wild type NS1 proteins in HeLa cells at 24 h post-transfection

(a) NS11-wt: NS1 protein of ST169 (H1N1) strain. (b) NS32-wt: NS1 protein of ST602 (H3N2) strain. (c) NS51-wt: NS1 protein of GD05 (H5N1) strain. (d) NS92-wt: NS1 protein of HK97(H9N2) strain. (e)GFP: GFP protein used for control. NO: Nucleolus.

2.3 PL 结构域缺失或替代对 NS32 蛋白在 HeLa 细胞中定位的影响

考虑到不同亚型 NS1 蛋白在细胞内的定位方式存在显著差异, 而同时它们 PL 结构域的氨基酸组成也明显不同. 因此, 一种可能的情况是 PL 结构域会影响相应蛋白质的分布方式. 为验证这一假

设, 我们将 NS32-wt 蛋白的 PL 结构域进行缺失或用其他病毒来源的 PL 结构域置换. 经过转染细胞后发现, 上述 PL 结构域的改变使得 NS32 的定位方式发生了很大变化: 它们不再分布于核仁, 但仍旧主要存在于细胞核内(图 3).

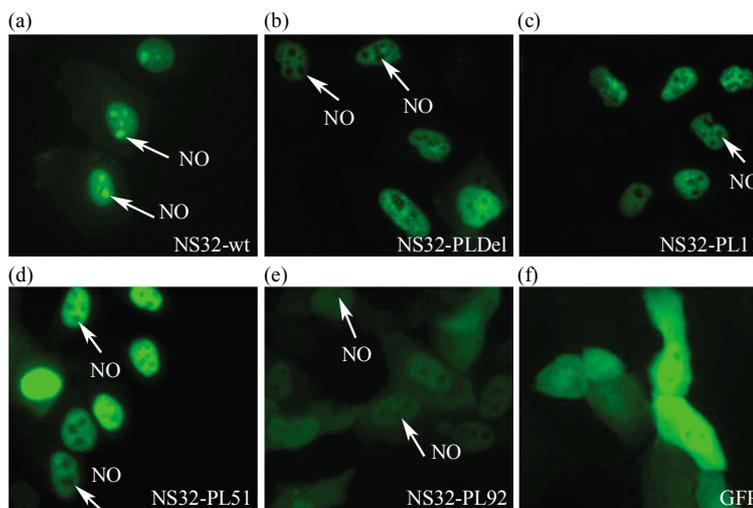


Fig. 3 Localization of mutant NS1 proteins in HeLa cells at 24 h post-transfection

(a) NS32-wt: NS1 protein of ST602 (H3N2) strain. (b) NS32-PLDel: Deletion of PL domain in NS32-wt. (c) NS32-PL11: PL domain replacement of NS32-wt by NS11-wt. (d) NS32-PL51: PL domain replacement of NS32-wt by NS51-wt. (e) NS32-PL92: PL domain replacement of NS32-wt by NS92-wt. (f) GFP: GFP protein used for control. NO: Nucleolus.

2.4 不同亚型 NS1 蛋白及其突变体在 MDCK 细胞内的定位

我们进一步利用狗肾来源的 MDCK 细胞(一种常见的、对流感病毒高度敏感的细胞)来检测上述 NS1 蛋白的分布情况. 结果显示: 与在 HeLa 细胞中相似, NS11-wt, NS51-wt 和 NS92-wt 3 种蛋白均不定位 MDCK 细胞的核仁(图 4a, 4d, 4e). 但与 HeLa 细胞中情况不同的是, 只有极少数的

NS32-wt (< 0.1%)能够定位于 MDCK 细胞的核仁(图 4b), 而绝大部分 NS32-wt 没有定位于 MDCK 细胞的核仁(图 4c). 此外, PL 结构域缺失或置换后的 NS32 蛋白也都没有分布于核仁, 而主要弥散存在于细胞核内(图 4g~j).

经过归纳后, 各种不同 NS1 蛋白在两种细胞内的定位情况可以用表 3 和表 4 综合表示.

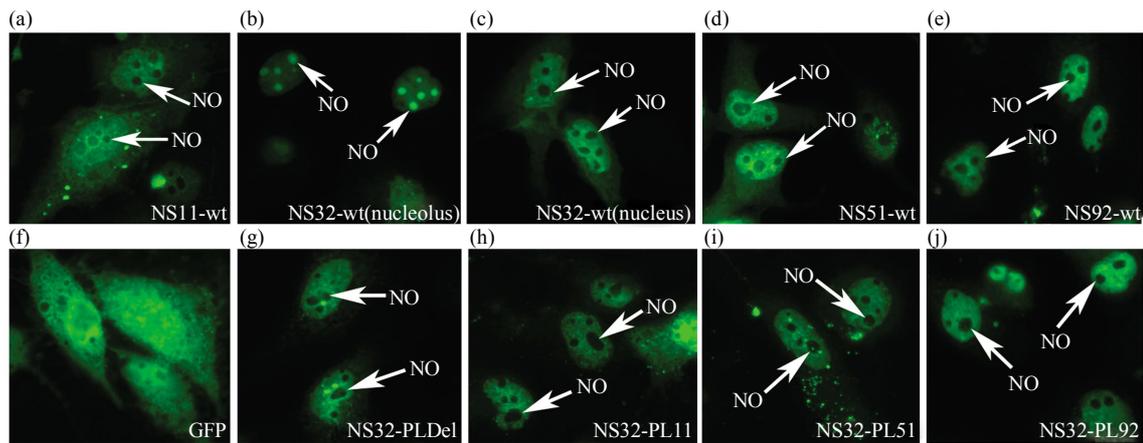


Fig. 4 Localization of wild type NS1 proteins and their mutants in MDCK cells at 24 h post-transfection

(a) NS11-wt: NS1 protein of ST169 (H1N1) strain. (b) NS32-wt(nucleolus): NS1 protein of ST602 (H3N2) strain. (c) NS32-wt(nucleus): NS1 protein of ST602 (H3N2) strain. (d) NS51-wt: NS1 protein of GD05 (H5N1) strain. (e) NS92-wt: NS1 protein of HK97(H9N2) strain. (f) GFP: GFP protein used for control. (g) NS32-PLDel: Deletion of PL domain in NS32-wt. (h) NS32-PL11: PL domain replacement of NS32-wt by NS11-wt. (i) NS32-PL51: PL domain replacement of NS32-wt by NS51-wt. (j) NS32-PL92: PL domain replacement of NS32-wt by NS92-wt. NO: Nucleolus.

Table 3 Localization analysis of different NS1 proteins in HeLa cells

NS1 protein	PL domain	Nucleus localization	Cytoplasm localization	Nucleolus localization (percentage of cells)
NS11-wt	<u>R</u> SEV	++++	+	0
NS32-wt	<u>R</u> <u>S</u> <u>K</u> V	++++	+	> 98%
NS51-wt	<u>E</u> <u>S</u> <u>K</u> V	++++	+	0
NS92-wt	EPEV	++++	++	< 1%
NS32-PLDel	/	++++	+	0
NS32-PL11	<u>R</u> SEV	++++	+	< 1%
NS32-PL51	<u>E</u> <u>S</u> <u>K</u> V	++++	+	< 1%
NS32-PL92	EPEV	++++	++	0

The underlined amino acids indicate the alkaline amino acids within PL domain.

Table 4 Localization analysis of different NS1 proteins in MDCK cells

NS1 protein	PL domain	Nucleus localization	Cytoplasm localization	Nucleolus localization (percentage of cells)
NS11-wt	<u>R</u> SEV	++++	+	0
NS32-wt	<u>R</u> <u>S</u> <u>K</u> V	++++	+	< 0.1%
NS51-wt	<u>E</u> <u>S</u> <u>K</u> V	++++	+	0
NS92-wt	EPEV	++++	+	0
NS32-PLDel	/	++++	+	0
NS32-PL11	<u>R</u> SEV	++++	+	0
NS32-PL51	<u>E</u> <u>S</u> <u>K</u> V	++++	+	0
NS32-PL92	EPEV	++++	+	0

The underlined amino acids indicate the alkaline amino acids within PL domain.

3 讨 论

从我们的实验结果来看,可以发现一个有趣的现象:与 H1N1、H5N1、H9N2 亚型流感病毒的 NS1 蛋白不同, H3N2 亚型流感病毒的 NS1 可以定位于 HeLa 细胞的核仁. 除了实验中采用的 ST602(H3N2)毒株外, 目前文献报道可以定位于核仁的主要见于 H3N2 亚型流感病毒的 NS1 蛋白, 如 A/Udorn/72 (H3N2)、A/Victoria/3/75 (H3N2)、A/Sydney/5/97 (H3N2)、A/Alaska/6/77 (H3N2)、A/Finland/229/92、A/Beijing/353/89、A/Moscow/10/99 等^[8, 12-14], 这说明核仁定位可能是 H3N2 亚型流感病毒 NS1 蛋白一个有别于其他亚型流感病毒的、相对保守的特征.

在试图寻找造成上述 NS1 蛋白差异性定位的原因时, 我们发现不同亚型流感病毒 NS1 蛋白羧基端 PL 结构域在氨基酸组成方面有着明显变化. ST169(H1N1)的 PL 结构域氨基酸序列(即 227~230 位)为 RSEV(精丝谷缬), GD05(H5N1)的 PL 结构域为 ESKV(谷丝赖缬), Qa97(H9N2)的 PL 结构域为 EPEV(谷脯谷缬), 而 ST602(H3N2)NS32 的 PL 结构域序列为 RSKV(精丝赖缬). 通过 PL 结构域的缺失或置换, 我们进一步发现, 只有当 PL 结构域是 H3N2 来源时, 相应的 NS1 才能定位于核仁. 由于 PL 结构域中第 228 和第 230 位氨基酸比较保守, 因此一个可能的解释是: 227 和 229 位的氨基酸会影响 NS1 的分布方式. NS32-wt 的 227 和 229 位点两个氨基酸均为碱性氨基酸(R 和 K), NS32-PL11 和 NS32-PL51 在 227 和 229 位各自只有一个碱性氨基酸(分别为 R,K), 而 NS32-PL92 在 227 和 229 位点则没有一个碱性氨基酸. 考虑到只有 NS32-wt 能够定位于核仁, NS32-PL11、NS32-PL51 和 NS32-PL92 均不能定位于核仁, 由此可以推断, PL 结构域 227 和 229 位的碱性氨基酸可能与 NS1 蛋白的核定位方式有关.

先前的研究发现, A 型流感病毒的 NS1 蛋白含有两个核定位信号(NLS)^[13, 15], 一个位于氨基端第 35~41 位氨基酸, 另一个位于羧基端第 219~230 位氨基酸(个别流感病毒株 NS1 蛋白有 237 个氨基酸, 此时其第 2 个 NLS 在 219~232 位氨基酸)^[13]. 此外人们还发现, 第 2 个 NLS 中包含了一个功能性的核仁定位信号(NoLS), 其中 224 位及 229 位的碱性氨基酸对于 NS1 定位于核仁是必需的^[13]. 但本文的研究发现, 224 位及 229 位碱性氨

基酸的同时存在并不一定会促使 NS1 定位于核仁. 例如, NS51-wt 的 224 和 229 位氨基酸分别为 R 和 K, 它们都是碱性氨基酸, 但 NS51 并未分布于核仁. 据此我们认为: 227 位的碱性氨基酸对于 NS1 的核仁定位也是必不可少的. 通过对多种已被证明能够在核仁内定位的 H3N2 亚型流感病毒 NS1 蛋白的羧基端氨基酸序列进行比对, 我们发现, 无一例外, 这些 NS1 蛋白的 224、227、229 位氨基酸均为碱性氨基酸. 此外我们还发现, 由于 NS92 及 NS32-PL92 的 PL 结构域没有一个碱性氨基酸的存在, 所以导致它们与其他 NS1 比较起来, 存在更多的胞浆内分布(表 3), 这也间接说明 NLS 中碱性氨基酸的数量会影响到 NS1 在细胞内的定位.

NS1 靶向定位于核仁, 可能对于流感病毒的复制和致病性有着特定的意义. 有报道称, NS1 蛋白定位于核仁有利于抑制宿主细胞 rRNA 的合成^[16]. 此外, Udorn72(H3N2)病毒的 NS1 能够定位于核仁并与核仁素(nucleoin)相互作用^[14], 这可能会影响 rRNA 的成熟或核糖体的组装从而影响细胞的凋亡. 同时由于并非所有亚型或毒株流感病毒的 NS1 都能够定位于核仁, 因此 NS1 的核仁定位在流感病毒致病过程中的确切意义还有待于进一步的研究.

本研究发现的另外一个有意思的现象是, 虽然在 HeLa 细胞中 NS32-wt 绝大部分存在于核仁, 但在 MDCK 细胞中, 它们很少定位于核仁, 其原因尚不十分清楚, 但这表明宿主细胞的种属来源可能会显著影响 NS1 蛋白的定位. 例如, 最新的一项研究发现, 虽然多种亚型流感病毒(如 PR8(H1N1)、A/Turkey/Italy/977/V99 (H7N1) 以及 A/Turkey/Italy/4426/00(H7N1))的 NS1 不能定位于哺乳动物细胞的核仁中, 它们却都可以定位于禽类细胞的核仁中^[17]. 这说明 NS1 蛋白在细胞内的定位不仅受病毒亚型和来源的影响, 而且与宿主细胞的种属来源有着密切关系.

综上所述, PL 结构域的不同能够明显影响流感病毒 NS1 在细胞内的分布方式, 它甚至还可以改变病毒的致病能力^[9], 这体现了 PL 结构域的特异性在不同亚型 / 毒株流感病毒与宿主细胞相互作用中有重要作用.

参 考 文 献

- [1] Fouchier R A, Munster V, Wallensten A, *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, 2005, **79**(5): 2814-2822

- [2] Fortes P, Beloso A, Ortin J. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *Embo J*, 1994, **13**(3): 704-712
- [3] Lu Y, Qian X Y, Krug R M. The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev*, 1994, **8**(15): 1817-1828
- [4] Min J Y, Krug R M. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(18): 7100-7105
- [5] Wang X, Li M, Zheng H, *et al.* Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol*, 2000, **74**(24): 11566-11573
- [6] Stacey S C, Naomi D S, Gabriele N, *et al.* Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol*, 2001, **75**(17): 7875-7881
- [7] Zhirmov O P, Konakova T E, Wolff T, *et al.* NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J Virol*, 2002, **76**(4): 1617-1625
- [8] Hayman A, Comely S, Lackenby A, *et al.* Variation in the ability of human influenza A viruses to induce and inhibit the IFN-beta pathway. *Virology*, 2006, **347**(1): 52-64
- [9] Jackson D, Hossain M J, Hickman D, *et al.* A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(11): 4381-4386
- [10] Obenauer J C, Denson J, Mehta P K, *et al.* Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*, 2006, **311** (5767): 1576-1580
- [11] Fan J S, Zhang M. Signaling complex organization by PDZ domain proteins. *Neurosignals*, 2002, **11**(6): 315-321
- [12] Buonagurio D A, Krystal M, Palese P, *et al.* Analysis of an influenza A virus mutant with a deletion in the NS segment. *J Virol*, 1984, **49**(2): 418-425
- [13] Melen K, Kinnunen L, Fagerlund R, *et al.* Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J Virol*, 2007, **81**(11): 5995-6006
- [14] Murayama R, Harada Y, Shibata T, *et al.* Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **362**(4): 880-885
- [15] Greenspan D, Palese P, Krystal M. Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J Virol*, 1988, **62**(8): 3020-3026
- [16] Kim M J, Latham A G, Krug R M. Human influenza viruses activate an interferon-independent transcription of cellular antiviral genes: outcome with influenza A virus is unique. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(15): 10096-10101
- [17] Volmer R, Mazel-Sanchez B, Volmer C, *et al.* Nucleolar localization of influenza A NS1: striking differences between mammalian and avian cells. *Viol J*, 2010, **7**(1): 63

PL Domain at the Carboxyl Terminus of Influenza A Virus NS1 Protein Influences The Nuclear Localization of NS1*

ZHANG Dan-Gui**, LI Wei-Zhong**, WANG Ge-Fei, ZHANG Heng, ZENG Jun,
CHEN You-Ying, ZHANG Chi, ZENG Xiang-Xing, LI Kang-Sheng***

(Department of Microbiology and Immunology, Key Immunopathology Laboratory of Guangdong Province,
Shantou University Medical College, Shantou 515041, China)

Abstract The C-terminal four residues of influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) comprise the binding site for PDZ (the domain of PSD95, Dig and ZO-1) and is named PL domain (PDZ ligand domain). Previous study showed that NS1 proteins from different subtypes/strains of influenza A virus varied in their amino acids sequence of PL domain, which may affect the interaction between NS1 and cellular proteins and is closely associated with the pathogenicity of influenza A virus. To further explore the role of PL domain in the biological properties of NS1 protein, four wild type NS1-expressing plasmids harboring the NS1 encoding sequence from different influenza A virus subtypes (H1N1, H3N2, H5N1 and H9N2) were constructed firstly, based on pEGFP-c1 vector. The mutant NS1 (H3N2)-expressing plasmids were subsequently generated by either deletion or replacement of PL domain from other influenza A virus subtypes. Comparative analysis of the localization of these NS1 proteins in HeLa cells showed that wild type NS1 protein from H3N2 virus mainly localized in the nucleoli, whereas wild type NS1 proteins from H1N1, H5N1 and H9N2 viruses or mutant NS1 proteins from H3N2 virus mainly localized in the nuclei (but not nucleoli). In MDCK cells, none of the above NS1 proteins located in the nucleoli. The results indicated that PL domain can significantly influence the nuclear localizing pattern of NS1 protein in HeLa cells, which may be responsible for the variation of NS1 protein in its biological function; the distributed pattern of NS1 protein is closely associated with the origin of host cells.

Key words influenza A virus, NS1 protein, PL domain, nucleolus

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00155

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30771988, 30972766, 81001322), Guangdong Natural Science Foundation (9451503102003499), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20094402110004), Outstanding Young Scientists Foundation of Guangdong Province Education Department (LYM08056), State Key Lab of Agriculture Microbiology Open Foundation (AML200910) and Shantou University Medical College Research Foundation.

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-754-88900456, E-mail: ksli@stu.edu.cn

Received: March 26, 2010 Accepted: June 10, 2010