



## 草鱼呼肠孤病毒纤维蛋白 VP56 与草鱼 GRP78 蛋白 互作诱导内质网应激

苏航<sup>1,2</sup>, 苏建国<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋生物与生物技术实验室, 山东 青岛 266237)

**摘要:** 为了阐明草鱼呼肠孤病毒 (GCRV) 的感染机制, 深入探究 VP56 (II 型和 III 型 GCRV 特有的纤维蛋白) 与宿主细胞蛋白的相互作用。实验通过免疫共沉淀 (co-IP) 发现, VP56 与细胞内定位于内质网的分子伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 发生相互作用。而后, VP56 与 GRP78 的互作通过基于远红外红色荧光蛋白 mNeptune 的双分子荧光互补系统 (BiFC) 得到验证。在 VP56 稳定表达的草鱼肾细胞系 (CIK) 中, 相较于 CIK 细胞, 内质网则形态发生巨大变化, 产生肿胀、扩张、脱粒等现象, 说明 VP56 激活内质网应激。通过对内质网应激下游转录因子的 mRNA 水平检测, 发现 VP56 激活活化转录因子 6 (ATF6) 介导的信号转导途径, 激活非折叠蛋白反应。研究表明, GCRV-II 感染过程中破坏了细胞稳态、激活内质网应激。本研究为 GCRV 感染机制和抗 GCRV 病毒研究提供了新思路, 揭示了一种新的病毒逃逸机制, 有助于淡水养殖产业中草鱼出血病的防控。

**关键词:** 草鱼; 草鱼呼肠孤病毒; 纤维蛋白 VP56; 葡萄糖调节蛋白 78; 内质网应激

**中图分类号:** S 941.41

**文献标志码:** A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国重要的淡水养殖经济鱼类, 也是世界上产量最高的淡水养殖鱼类, 2022 年全国草鱼产量达到 590.5 万 t。随着水产养殖产业的快速发展, 无序养殖增加了各种水生动物疾病暴发的风险, 不仅会造成巨大的经济损失, 还会破坏生态环境。病原体从养殖环境至野生环境的传播也可能导致野生鱼类感染、环境污染<sup>[1]</sup>。草鱼呼肠孤病毒 (grass carp reovirus, GCRV) 感染引起的草鱼出血病, 可导致草鱼鱼种出现严重的出血症并死亡, 死亡率高达 90%, 给我国水产养殖业造成巨大损失<sup>[2]</sup>, 对草鱼养殖产业造成严重危害, 同时对其他淡水经济鱼类养殖产业的健康发展也造成一定的威胁。

GCRV 是一种双链 RNA (dsRNA) 病毒, 属于水生呼肠孤病毒属 (*Aquareovirus*), 是水生呼肠孤病毒中毒力最强的病毒之一<sup>[3]</sup>。GCRV 病毒颗粒是一个具有双层衣壳的正二十面体, 其基因组包含 11 个片段, 编码 13 个蛋白 (7 个结构蛋白和 6 个非结构蛋白)<sup>[4-5]</sup>。目前, 在我国已经分离鉴定出草鱼呼肠孤病毒超过 30 株, 其中完成全基因组测序的毒株超过 12 株<sup>[6-7]</sup>。根据不同 VP6 基因序列, GCRV 可分为 GCRV-I、GCRV-II 和 GCRV-III 等 3 种类型, 代表毒株分别为 GCRV-873 (I 型)、GCRV-HZ08 (II 型) 和 GCRV104 (III 型)<sup>[8]</sup>。其中, GCRV-II 是目前我国最具流行性和毒力的类型<sup>[2]</sup>, 与哺乳动物正呼肠孤病毒 (*Orthoreovirus*) 同源性

收稿日期: 2021-07-07 修回日期: 2021-08-24

资助项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项 (2018YFD0900504)

第一作者: 苏航 (照片), 从事鱼类病理与免疫学研究, E-mail: suh\_0210@163.com

通信作者: 苏建国, 从事鱼类病理与免疫学研究, E-mail: sujianguo@mail.hzau.edu.cn



最高<sup>[9]</sup>。正呼肠孤病毒黏附蛋白  $\sigma 1$  以宿主细胞表面连接黏附分子 A (JAMA) 蛋白为受体进行结合, 感染细胞, 诱导 NF- $\kappa$ B 活化和细胞凋亡<sup>[10]</sup>。而对于 GCRV, 感染宿主细胞的机制尚未阐明。由 GCRV-II 的 s7 片段编码的 VP56 蛋白, 分子量约为 56 ku, 是 GCRV-II/III 特有的纤维蛋白, 可能在 GCRV 感染过程中发挥黏附于宿主细胞表面的作用, 在病毒入侵宿主环节起重要作用<sup>[11-12]</sup>。

内质网 (ER) 是负责胞内蛋白质和脂质合成、外源物质解毒和胞内钙离子稳态的重要细胞器<sup>[13]</sup>。内质网稳态一旦遭到破坏, 细胞内未折叠或错误折叠的蛋白质就会在内质网内腔中累积, 激活内质网应激状态, 发生未折叠蛋白质反应 (UPR)。葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 是一种常驻内质网的分子伴侣, 在内质网应激状态下, UPR 反应激活从内质网到细胞核的级联信号转导, GRP78 表达增强<sup>[14]</sup>。内质网应激状态下, GRP78 与未折叠蛋白结合, 导致从 PERK-eIF2 $\alpha$  途径、IRE1 $\alpha$ -XBP1 途径和活化转录因子 6 (ATF6) 途径的内质网跨膜转分化子解离<sup>[15]</sup>。3 个途径通过对基因的转录调控, 维持应激期间内质网的稳态<sup>[16]</sup>。在哺乳动物中, 内质网应激参与抗病毒反应, 然而在鱼类中, 涉及内质网相关的抗病毒反应研究较为有限<sup>[17-18]</sup>。

GCRV 与细胞表面蛋白的相互作用具有细胞类型特异性和趋向性, 是病毒诱导细胞内信号转导的决定因素。为了探究 GCRV 感染机制, 减少草鱼出血病暴发带来的巨大经济损失, 前期通过内源性 co-IP、蛋白质体外结合实验 (GST pull down) 结合液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 鉴定, 发现 GCRV-II 的 VP56 可能与 GRP78 互作<sup>[9]</sup>。本研究通过经典正向和反向 co-IP 和双分子荧光互作技术证实了 VP56 与 GRP78 互作, 通过透射电镜发现 VP56 使内质网形态发生改变, 激活内质网应激, 通过 ATF6 介导的信号通路激活非折叠蛋白反应。实验探究 GCRV 病毒与宿主蛋白的相互作用及效应, 为研究 GCRV 的致病机理提供了新思路, 有助于草鱼抗病毒免疫研究的发展和草鱼养殖中出血病的防控。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和病毒

实验用细胞系包括草鱼肾细胞系 (*C. idella* kidney cells, CIK cells), 购于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 经本实验室传代扩大培养并保存;

胖头鲤细胞系 (fathead minnow, FHM) 保存于本实验室。CIK 和 FHM 细胞系分别培养于 DMEM 和 M199 培养基 [ 包含 10% FBS (Gibco, 美国)、100 U/L 青霉素 (Sigma, 美国)、100  $\mu$ g/mL 链霉素 ], 28  $^{\circ}$ C 二氧化碳 (5%) 培养箱中培养; VP56 或空载稳定表达的 CIK 细胞系使用 G418 筛选。实验用病毒毒株为 GCRV-097 株 (GCRV-II), 由中国科学院水生生物研究所汪亚平研究员惠赠, 后经本实验室保种富集。

### 1.2 载体构建

实验利用 pCMV-eGFP 载体构建重组质粒 pCMV-VP56、pCMV-VP56-Flag 及 pCMV-GRP78-HA 等; 双分子荧光互补载体 pMN155 和 pMC156 由中国科学院武汉病毒研究所崔宗强研究员惠赠。载体构建所用引物信息见表 1。

### 1.3 细胞转染

将状态良好的细胞传代至 10 cm 细胞培养皿 ( $6 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$  个/皿) 中, 培养 24 h, 使细胞刚好均匀长满整个培养基, 使用转染试剂 FuGENE<sup>®</sup> 6 (Promega, 美国) 进行转染, 每个培养皿转染 4  $\mu$ g 对应质粒; 将培养皿放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。48 h 后观察细胞状态并收集细胞进行下一步实验。

### 1.4 免疫共沉淀

常温收集 FHM 细胞, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF 的 IP 裂解缓冲液 [20 mmol/L Tris (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5  $\mu$ g/mL 亮抑肽酶, 2.5 mmol/L 焦磷酸钠] 1 mL 于冰上裂解细胞 30 min。裂解后取 80  $\mu$ L 上清液, 加入 20  $\mu$ L 的 5  $\times$  SDS 上样缓冲液, 制备全细胞裂解液 (WCL) 备用。剩余 IP 样品加入 1  $\mu$ L 的 IP 级一抗, 置于摇床 4  $^{\circ}$ C 摇晃孵育过夜。吸取 40  $\mu$ L/个样品的 protein A+G 琼脂糖磁珠, 清洗并加入 IP 样品, 4  $^{\circ}$ C 摇晃孵育 6 h。离心取沉淀, 使用 IP 裂解缓冲液洗涤 3~4 次后加入 2  $\times$  SDS-PAGE 上样缓冲液煮样, 免疫印迹 (immunoblotting, IB) 检测 IP 结果或直接将样品保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

### 1.5 免疫印迹

取细胞蛋白样品分别进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 半干转膜法转移至 NC 膜上, 于 2% 的 BSA 封闭液中室温封闭 2 h; 将标签抗体稀释至适当浓度, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; 选

表 1 载体构建及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 引物信息

Tab. 1 The primers and their designated applications in vector construction and RT-qPCR

基因 genes	应用 application	引物名称 primers name	序列(5'-3') primer sequences (5'-3')
VP56	pVP56-GFP	VF339 VR342	TGAACCGTCAGATCGGGTACCTATGGCCACTCGTGACAGC GGTGGATCCAAGCTTGGGCCACGTAATTACAGCAAATTACCGTCC
	pVP56-Flag	VF339 VR340	TGAACCGTCAGATCGGGTACCTATGGCCACTCGTGACAGC GGTGGATCCAAGCTTGGGCCACCTTATCGTCGCATCCTTGTAATCGTACTTACAGCAA TTACCGTCC
	pMC156-VP56	VF583 VR584	GCATGGACGAGCTGTACAAGGGCGGCGGCTCAGGCGGCGGCTCAGGCGGCGGC GGCTCAATGGCCACTCGTGACAGCC CGCGGTACCGTCGACTGCAGTTACTTATCGTCGCATCCTTGTAATCCTTACAGCAAATTA CCGTCCAA
GRP78	pGRP78-HA	GF510 GR511	TGAACCGTCAGATCGGGTACCATGCGTTTCCTTTGCTATTTT ATGGTGGCGACCGGTGGATCCACAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTACAACCTCGTCC TTTTCGCCC
	pGRP78-MN155	GF577 GR578	TAGGATCTCGAGCTCAAGCTTATGCGTTTCCTTTGCTATTTT GTACCGTCGACTGCAGAATTCAGTCTGAGCCGCGCCGCTGAGCCGCGCCGCTGAGCCG CCGCGCCACGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTACAACCTCGTCTTTTCGCCC
	EF1 $\alpha$	EF125 ER126	CGCCAGTGTTCCTTCGT CGCTCAATCTTCCATCCCTT
GRP78	RT-qPCR	GF81 GR82	TGGGACGACCTACTCTGTGTT GCATCTCCAATGAGACGCTCT
ATF4	RT-qPCR	AF83 AR84	GCTGACTCCATCCACATCG GCTTAGGTGAGGGTGCCGTAT
ATF6	RT-qPCR	AF85 AR86	GCCGCACCTACAATGACTTCT CGGCTGCCTTTGTTGTGATT
TRAF2	RT-qPCR	TF87 TR88	CGAGAAGTGTGTCGGTGTCC CAGGCTTCGAGGGTATGG

择与一抗对应种属的 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h; 每次反应后均用 TBST 洗 3~5 次, 每次 10 min。用 TMB 显色剂显色并观察结果。

### 1.6 基于远红外红色 mNeptune 的双分子荧光互补系统 (BiFC)

基于 mNeptune 的 BiFC 系统可视化检测 CIK 细胞中 VP56 和 GRP78 之间的相互作用。重组质粒 pGRP78-MN155 和 pMC156-VP56 分别在 GRP78 的 C 末端包含 mNeptune 蛋白的 N 末端 (mNeptune amino acid 1-155, MN155), 在 VP56 的 N 末端包含 mNeptune 蛋白的 C 末端 (mNeptune amino acid 156-244, MC156), 末端编码区之间分别通过接头序列 GGGSGGGGS 连接。质粒 pGRP78-MN155 和 pMC156-VP56 分别或共同转染入 CIK 细胞中, 培养后使用激光共聚焦显微镜观察 mNeptune 蛋白是否发光。红色荧光显示 2 种蛋白在空间构象上相互作用, 使 mNeptune 蛋白的 2 个末端相互结合, 使 mNeptune 蛋白在激发后发光。红色荧光的检测波段为 640/20 nm (激发光) 和 685/40 nm (发射光)。

### 1.7 激光共聚焦显微镜观察

将过表达相应 BiFC 载体的 CIK 细胞接种至细胞培养板中, 于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h。细胞

经磷酸钠缓冲溶液 (PBS) 清洗 3 次, 使用 600  $\mu$ L 新鲜配制的 4% 的多聚甲醛溶液固定细胞, 室温孵育 10 min。固定后的细胞用 PBS 清洗 3 次, 加入 DAPI 染液避光孵育 3~5 min。用新鲜 PBS 小心洗涤细胞 3 次后在激光共聚焦显微镜 (SP8, Leica) 下观察并拍照。

### 1.8 透射电子显微镜 (TEM) 观察

将相应的稳转细胞传代至 6 孔细胞培养板, 48 h 后用 PBS 洗 3 次, 胰酶消化, 收集细胞, 用 1 mL 电镜固定液 (2.5% 戊二醛) 轻缓吹散细胞, 室温放置 48 h, 离心弃上清液, 加 1 mL 新的固定液 (不能吹散细胞)。固定后的细胞样品制片后使用透射电子显微镜 (Hitachi, 日本) 观察并拍照。

### 1.9 RT-qPCR

取稳转 VP56 或空载的 CIK 细胞样品, 根据 NCBI GenBank 基因序列, 使用 Primer Premier 5 软件设计定量引物 (表 1), 以 EF1 $\alpha$  作为内参基因进行 RT-qPCR。反应体系为 15  $\mu$ L: 7.5  $\mu$ L 2 $\times$  SYBR Green BioEasy Master Mix, 2  $\mu$ L cDNA, 5.1  $\mu$ L 灭菌超纯水, 上下游引物各 0.2  $\mu$ L; 反应程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 40 个循环。

## 1.10 数据分析

用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行分析、统计和作图。每组实验数据均由 3 次及以上独立重复数据组成。使用 Student's *t* 检验分析实验数据的差异显著性, 并进行统计学分析。数据以平均值±标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 VP56 与 GRP78 互作

通过经典正向和反向 co-IP 发现 VP56 与 GRP78 发生相互作用。首先通过 GRP78 蛋白融合的 HA 标签, 使用特异性抗体进行 co-IP, 以过表达空载质粒和 IgG 为对照, 结果显示为可检测到阳性 VP56 条带 (图 1-a), 说明 VP56 和 GRP78 蛋白相互作用。通过 VP56 蛋白融合的 Flag 标签, 以过表达空载质粒和 IgG 为对照, 使用 Flag 特异性抗体进行 co-IP 的结果显示出了 GRP78 蛋白阳性条带 (图 1-b)。2 个 co-IP 结果均表明 VP56 与 GRP78 之间存在相互作用。

BiFC 实验进一步验证了 VP56 和 GRP78 之间的相互作用。mNeptune 蛋白是一种红色荧光蛋白, 将其 N 端 (MN155) 和 C 端 (MC156) 分别构建于 GRP78 和 VP56 蛋白分子的 C 端和 N 端。在分别共表达单端融合蛋白和 mNeptune 蛋白另一端时, 在激光共聚焦显微镜下不能观察到红色荧光。将分别融合了 MN155 和 MC156 的 GRP78 和 VP56 蛋白同时表达, 通过激光共聚焦显微镜, 在远

红外波段可观察到 mNeptune 蛋白发出红色荧光 (图版 I)。结果显示, VP56 和 GRP78 蛋白表达后, 在细胞内结合, mNeptune 蛋白的两端靠近发出红色荧光, 表明 VP56 和 GRP78 相互作用。

### 2.2 VP56 导致内质网形态变化

GRP78 是锚定于内质网的分子伴侣。使用电子透射显微镜观察稳定表达 VP56 的 CIK 细胞时, 与稳定表达空载质粒的 CIK 细胞相比, 细胞内质网发生了形态变化, 出现肿胀、扩张和脱粒等现象 (图版 II), 说明 VP56 引起了内质网形态的变化, 激活内质网应激。

### 2.3 VP56 通过 ATF6 激活内质网应激

为探究 VP56 激活内质网应激下游非折叠蛋白反应的途径, 利用相关引物 (表 1), 通过 RT-qPCR 检测内质网应激下游非折叠蛋白反应 3 条不同途径关键分子的 mRNA 表达水平 (图 2)。结果显示, VP56 显著诱导 *atf6* 表达, 对另外 2 条途径关键分子无显著影响, 表明 VP56 激活内质网应激, 诱导 ATF6 信号传导途径, 造成非折叠蛋白反应。

## 3 讨论

草鱼出血病严重危害我国草鱼养殖产业, 不仅造成巨大的经济损失, 还严重威胁着我国水产养殖产业的健康可持续发展。病毒性疾病在水环境中传播性很强。传染性疾病发生的基本条件包括宿主、病原体和环境。为了控制疾病的传播,

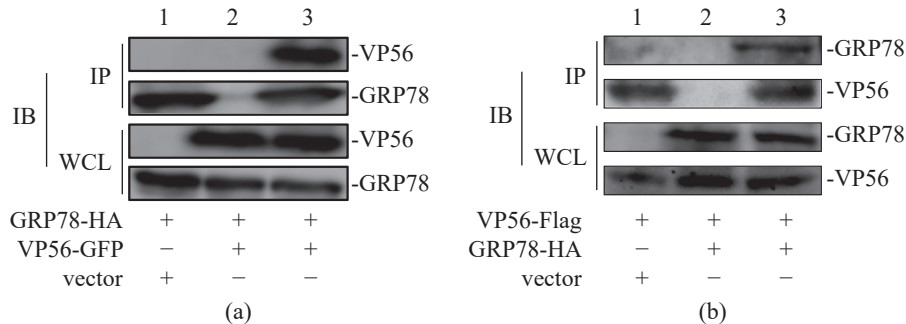
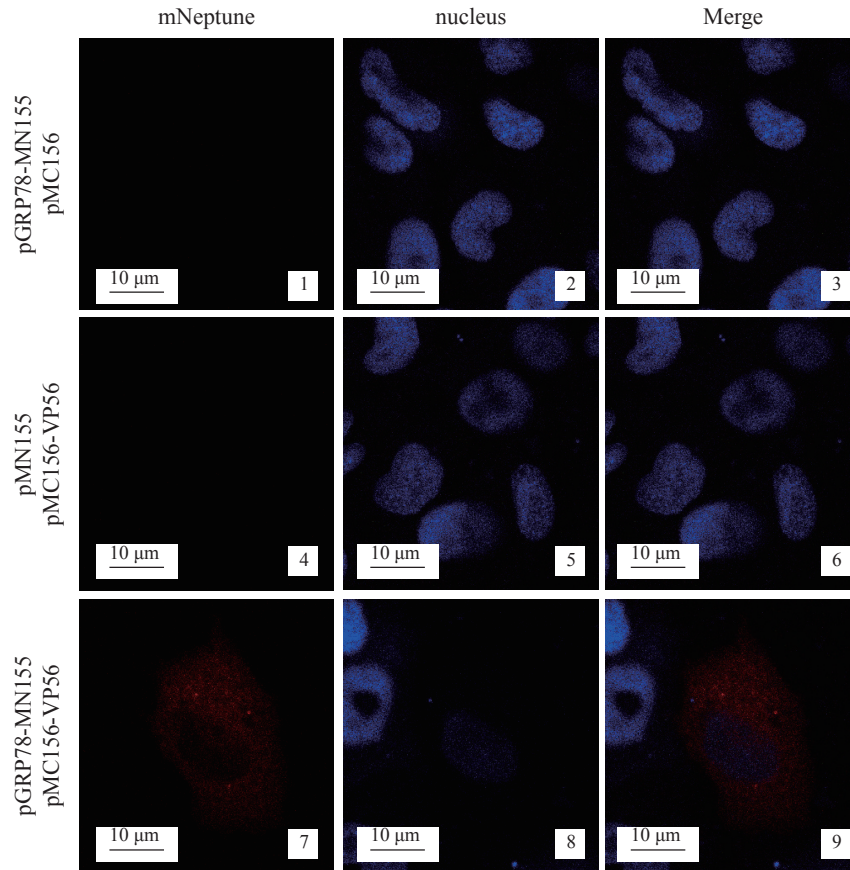


图 1 co-IP 检测 VP56 与 GRP78 互作

(a) FHM 细胞共转染 VP56-GFP/空载质粒和 GRP78-HA, 48 h 后使用 HA 标签抗体或小鼠 IgG (对照) 进行 co-IP, 然后使用相应抗体进行 IB 鉴定, (b) FHM 细胞共转染 GRP78-HA/空载质粒和 VP56-Flag, 48 h 后使用 Flag 标签抗体或小鼠 IgG (对照) 进行 co-IP, 然后使用相应抗体进行 IB 鉴定; 1. IP: HA, 2. IP: IgG, 3. IP: HA, vector. pCMV-GFP。

Fig. 1 Interaction between VP56 and GRP78 by co-IP

(a) FHM cells were co-transfected with VP56-GFP/vector and GRP78-HA for 48 h, co-IP was performed with anti-HA monoclonal Ab and mouse IgG (control), and IB with the respective Abs, (b) FHM cells were co-transfected with GRP78-HA/vector and VP56-Flag for 48 h. co-IP was performed with anti-Flag monoclonal Ab and mouse IgG (control) and IB with the respective Abs; 1. IP: HA, 2. IP: IgG, 3. IP: HA, vector. pCMV-GFP.

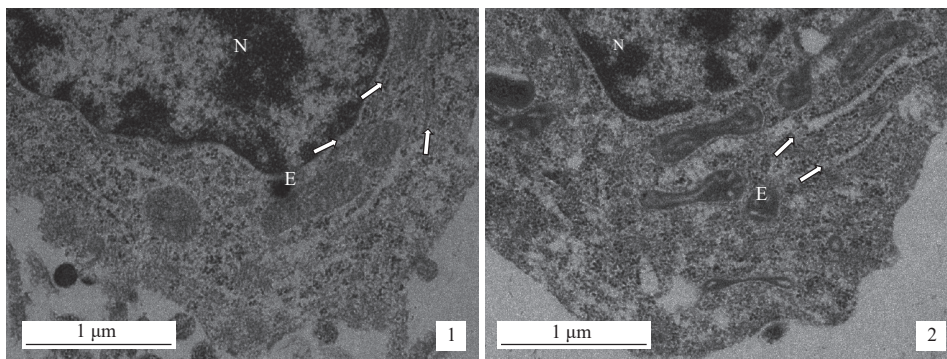


图版 I BiFC 检测 VP56 与 GRP78 互作

CIK 细胞共转染或单独转染 pGRP78-MN155 和/或 pMC156-VP56 质粒 48 h, DAPI 染核后, 根据 BiFC 系统, 使用激光共聚焦显微镜观察、拍照; 红色荧光代表蛋白互作阳性。

Plate I Interaction between VP56 and GRP78 detected by BiFC

pGRP78-MN155 and pMC156-VP56 were transfected alone or co-transfected into CIK cells under normal conditions; in the BiFC system, the nucleus was stained with DAPI, and the images were acquired using confocal microscopy under a 40 × objective lens; appearance of red fluorescence represents positive interaction.



图版 II VP56 过表达影响内质网形态变化

1. 对照, 2. VP56, N. 细胞核, E. 内质网 (白色箭头)。

Plate II Effect of VP56 overexpression on ER morphology

1. control, 2. VP56, N. nucleus, E. endoplasmic reticulum (white arrows indicate).

从病原体出发, 对病毒蛋白的分子功能, 及其与宿主关系的阐释, 有利于病毒性疾病的控制。因此, 在草鱼出血病防控及 GCRV 感染机制研究中,

病毒蛋白的功能亟待研究。GCRV 目前分成 3 个基因型, 对于 GRCV-I 研究的较为深入, 而对流行基因型 GCRV-II 的研究相对较少。本实验从

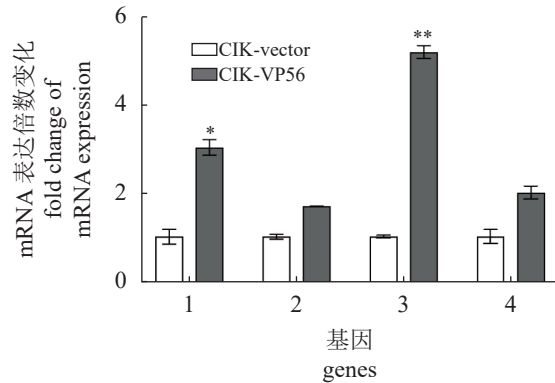


图2 VP56 通过 ATF6 诱导 UPR

1. *grp78*, 2. *atf4*, 3. *atf6*, 4. *traf2*; \*.  $P < 0.05$ , \*\*.  $P < 0.01$ ; 转录表达水平以 *EF1 $\alpha$*  基因表达水平为标准, 以对照组为 1。

Fig. 2 VP56 activates UPR through ATF6

1. *grp78*, 2. *atf4*, 3. *atf6*, 4. *traf2*; \*.  $P < 0.05$ , \*\*.  $P < 0.01$ ; the relative transcription levels were normalized to the transcription level of *EF1 $\alpha$*  gene and are represented as fold induction relative to the transcription level in control cells, which was set to 1.

GCRV-II 纤维蛋白 VP56 与宿主蛋白互作方面着手, 发现 VP56 与内质网标识蛋白 GRP78 互作, 激活内质网应激。

病毒感染过程中, 病毒一般通过吞噬作用、巨胞饮、网格蛋白、包膜窖依赖的内吞作用以及其他不依赖于网格蛋白和包膜窖的内吞途径进入宿主细胞, 而 GCRV 进入细胞的途径有可能与网格蛋白与窖蛋白介导的内吞作用有关<sup>[20-21]</sup>。感染哺乳动物的正呼肠孤病毒利用宿主细胞表面的 JAMA 为受体, 通过黏附蛋白  $\sigma 1$  与其结合, 从而进入细胞<sup>[22-23]</sup>。在水生呼肠孤病毒中, 已知多种有可能与病毒蛋白互作的分子, 如 Fibulin-4、Ubc9、LITAF、LamR 和 TIA1 等<sup>[24-28]</sup>。根据同源比对分析, VP56 与正呼肠孤病毒的黏附蛋白  $\sigma 1$  同源性很高, 极有可能行使黏附功能。在 GCRV 感染宿主细胞过程中, 嵌于 GCRV 病毒颗粒表面的纤维蛋白 VP56 黏附并固定于宿主细胞表面, 进而完成后续进入细胞的生物过程<sup>[11]</sup>。

利用 co-IP 和 BiFC 实验证实了 VP56 与 GRP78 之间的相互作用。使用传统的研究蛋白分子互作的方法 co-IP, 根据抗原-抗体结合原理, 并且辅以空载质粒对照和免疫球蛋白抗体对照, 使用融合在 2 个蛋白分子上的不同标签抗体进行 co-IP, 使本研究中发现的 VP56 和 GRP78 的互作结果更加可靠。同时使用新兴的研究分子间互作的基于远红外红色 mNeptune 蛋白的双分子荧光互补系统<sup>[19, 29]</sup>, 通过激光共聚焦显微镜, 直观地观察到

VP56 和 GRP78 蛋白分子在 CIK 细胞中的结合, 进一步证实了两个分子间的相互作用。

本研究发现 VP56 与 GRP78 相互作用。分别检测 3 个 UPR 分支的关键分子后, VP56 激活了 ATF6 途径中的关键转录因子 ATF6, 而未激活另外 2 个分支中的关键转录因子 ATF4 和 TRAF2, 表明了 VP56 与 GRP78 结合触发 ATF6 途径, 即 VP56 引起的内质网应激和 UPR, 表明 GCRV-II 感染导致细胞内稳态破坏。VP56 破坏胞内稳态, 引起 ER 应激和 UPR 反应, 对内质网的形态造成巨大损伤, 影响其功能。GCRV 攻击宿主时, 破坏宿主细胞稳态, 内质网应激参与胞内抗病毒反应, VP56 对内质网的损伤有利于 GCRV 病毒逃逸。

综上所述, 本研究通过 co-IP 和 BiFC 实验证实了 GCRV-II 纤维蛋白 VP56 和内质网分子伴侣 GRP78 的相互作用, 进而发现 VP56 可引起内质网的形态变化, 激活内质网应激, 诱导 ATF6 介导的非折叠蛋白反应。研究表明, GCRV 感染过程中, VP56 激活内质网应激, 打破细胞稳态。本研究从病毒与宿主蛋白互作的角度阐释了 VP56 在 GCRV 感染过程中的功能, 为 GCRV 感染机制的研究提供新思路。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] Clarke J L, Waheed M T, Lössl A G, *et al.* How can plant genetic engineering contribute to cost-effective fish vaccine development for promoting sustainable aquaculture?[J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 83(1): 33-40.
- [2] Su H, Su J G. Cyprinid viral diseases and vaccine development[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 83: 84-95.
- [3] Jaafar F M, Goodwin A E, Belhouchet M, *et al.* Complete characterisation of the American grass carp reovirus genome (genus *Aquareovirus*: family *Reoviridae*) reveals an evolutionary link between aquareoviruses and coltivirus[J]. *Virology*, 2008, 373(2): 310-321.
- [4] Cheng L P, Zhu J, Hui W H, *et al.* Backbone model of an aquareovirus virion by cryo-electron microscopy and bioinformatics[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 397(3): 852-863.

- [5] Yu F, Wang L L, Li W J, *et al.* Identification of a novel membrane-associated protein from the S7 segment of grass carp reovirus[J]. *Journal of General Virology*, 2019, 100(3): 369-379.
- [6] Rao Y L, Su J G. Insights into the antiviral immunity against grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV) in grass carp[J]. *Journal of Immunology Research*, 2015, 2015: 670437.
- [7] Ye X, Tian Y Y, Deng G C, *et al.* Complete genomic sequence of a reovirus isolated from grass carp in China[J]. *Virus Research*, 2012, 163(1): 275-283.
- [8] Wang Q, Zeng W, Liu C, *et al.* Complete genome sequence of a reovirus isolated from grass carp, indicating different genotypes of GCRV in China[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(22): 12466.
- [9] Nibert M L, Duncan R. Bioinformatics of recent aqua- and orthoreovirus isolates from fish: evolutionary gain or loss of FAST and fiber proteins and taxonomic implications[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68607.
- [10] Chappell J D, Prota A E, Dermody T S, *et al.* Crystal structure of reovirus attachment protein  $\sigma 1$  reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber[J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(1-2): 1-11.
- [11] Zhang A D, He L B, Wang Y P. Prediction of GCRV virus-host protein interactome based on structural motif-domain interactions[J]. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18(1): 145.
- [12] Zhang C, Lu L F, Li Z C, *et al.* Grass carp reovirus VP56 represses interferon production by degrading phosphorylated IRF7[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 99: 99-106.
- [13] Borgese N, Francolini M, Snapp E. Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2006, 18(4): 358-364.
- [14] Biagioli M, Pifferi S, Raggiamenti M, *et al.* Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis[J]. *Cell Calcium*, 2008, 43(2): 184-195.
- [15] Oikawa D, Kimata Y, Kohno K, *et al.* Activation of mammalian IRE1 $\alpha$  upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins[J]. *Experimental Cell Research*, 2009, 315(15): 2496-2504.
- [16] Wang S Y, Kaufman R J. The impact of the unfolded protein response on human disease[J]. *Journal of Cell Biology*, 2012, 197(7): 857-867.
- [17] Komoike Y, Matsuoka M. Exposure to tributyltin induces endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in zebrafish[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 142-143: 221-229.
- [18] Zhu Y J, Fan Q D, Mao H L, *et al.* GRP78 from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) provides cytoplasm protection against thermal and Pb<sup>2+</sup> stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 617-622.
- [19] Su H, Fan C J, Liao Z W, *et al.* Grass carp reovirus major outer capsid protein VP4 interacts with RNA sensor RIG-I to suppress interferon response[J]. *Bio-molecules*, 2020, 10(4): 560.
- [20] Zhang F X, Guo H, Zhang J, *et al.* Identification of the caveolae/raft-mediated endocytosis as the primary entry pathway for aquareovirus[J]. *Virology*, 2018, 513: 195-207.
- [21] Wang H, Liu W S, Yu F, *et al.* Disruption of clathrin-dependent trafficking results in the failure of grass carp reovirus cellular entry[J]. *Virology Journal*, 2016, 13(1): 25.
- [22] Barton E S, Forrest J C, Connolly J L, *et al.* Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus[J]. *Cell*, 2001, 104(3): 441-451.
- [23] Antar A A R, Konopka J L, Campbell J A, *et al.* Junctional adhesion molecule-A is required for hematogenous dissemination of reovirus[J]. *Cell Host & Microbe*, 2009, 5(1): 59-71.
- [24] Yu F, Wang H, Liu W S, *et al.* Grass carp *Ctenopharyngodon idella* fibulin-4 as a potential interacting partner for grass carp reovirus outer capsid proteins[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 48: 169-174.
- [25] Yu F, Wang H, Wang L L, *et al.* Orthoreovirus outer-fiber proteins are substrates for SUMO-conjugating enzyme Ubc9[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 79814-79827.
- [26] Lu J F, Wang H, Zhang Y N, *et al.* Grass carp reovirus NS26 interacts with cellular lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  factor, LITAF[J]. *Virus Genes*, 2016, 52(6): 789-796.
- [27] Wang H, Yu F, Li J L, *et al.* Laminin receptor is an interacting partner for viral outer capsid protein VP5 in grass carp reovirus infection[J]. *Virology*, 2016, 490: 59-68.
- [28] Song L, Wang H, Wang T, *et al.* Sequestration of RNA

by grass carp *Ctenopharyngodon idella* TIA1 is associated with its positive role in facilitating grass carp reovirus infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 442-448.

[29] Han Y, Wang S F, Zhang Z P, *et al.* *In vivo* imaging of protein-protein and RNA-protein interactions using novel far-red fluorescence complementation systems[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(13): e103.

## Grass carp reovirus (GCRV) fibrin VP56 interacts with grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) GRP78 for inducing endoplasmic reticulum stress

SU Hang<sup>1,2</sup>, SU Jianguo<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology,

Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

**Abstract:** Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is one of the most important aquaculture fish species in China. *C. idella* hemorrhagic disease caused by grass carp reovirus (GCRV) results in severe outbreaks annually. It causes great losses to aquaculture industry and a threat to food safety. GCRV is the most virulent in aquareovirus. VP56 is a fibrin which is specific to type II/III. It attaches the surface of host cells during GCRV infection. In order to clarify the infection mechanism of GCRV, this study delved into the interaction between VP56 and host cell proteins. First, co-immunoprecipitation (co-IP) was performed. The specific antibodies to different tags respectively fused on the two molecules were used. Empty vectors and negative immunoglobulin G were used as control. It was found that VP56 interacts with the molecular chaperone protein glucose regulated protein 78 ku (GRP78) located in the endoplasmic reticulum. Then, the interaction between VP56 and GRP78 was verified by the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) based on the far-red fluorescent protein mNeptune. According to the BiFC results, red fluorescence of mNeptune was observed in CIK cells transfected with both VP56 and GRP78 respectively linked with each terminal of the mNeptune protein, showing that these two fusion proteins presented closely and sent out red fluorescence signal. In VP56 stably expressed *C. idella* kidney (CIK) cells, the endoplasmic reticulum morphology underwent tremendous changes, compared with empty vector stably expressed CIK cells resulting in swelling, expansion, and degranulation, indicating that VP56 activates endoplasmic reticulum stress. mRNA levels of transcription factors downstream of endoplasmic reticulum stress were detected, which revealed that VP56 activates the signal transduction pathway regulated by activating transcription factor 6 (ATF6) and triggers the unfolded protein response. The above results indicate that during GCRV-II infection, cell homeostasis is destroyed, and endoplasmic reticulum stress is activated. This study provides new ideas for the study of GCRV infection mechanism and anti-GCRV research, reveals a new virus escape strategy, provides in-depth antiviral research in *C. idella*, and contributes to the prevention and control of *C. idella* hemorrhagic disease in the freshwater aquaculture industry.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; grass carp reovirus (GCRV); fibrin VP56; glucose-regulated protein 78; endoplasmic reticulum stress

**Corresponding author:** SU Jianguo. E-mail: sujianguo@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900504)