

研究报告

PIAS1 对 PRRSV N 蛋白 SUMO 化修饰及病毒复制的影响

王聪 曾南方 刘颢雨 苗琦 周磊 盖新娜 杨汉春 郭鑫*

(中国农业大学动物医学院 农业部动物流行病学重点实验室 北京 100193)

摘要:【目的】猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)是一种危害全球养猪业的重要病原。SUMO (Small ubiquitin-like modifier)化修饰作为一种可逆的翻译后修饰在调节病毒复制方面发挥着重要功能。PIAS1 (Protein inhibitor of activated STAT1)是 SUMO E3 连接酶 PIAS 家族的一员,可以促进靶蛋白的 SUMO 化修饰,进而影响靶蛋白的功能,参与基因转录调控过程。探究 PIAS1 与 PRRSV N 蛋白相互作用的机制及其对 N 蛋白 SUMO 化修饰和病毒复制的影响,为进一步阐明 PRRSV 复制调控和致病的分子机制提供科学依据。【方法】利用酵母回复杂交、免疫共沉淀和激光共聚焦技术验证 N 蛋白与 PIAS1 的相互作用;以递增剂量外源性转染 PIAS1 观察其是否介导 N 蛋白 SUMO 化修饰;采用 RNA 干扰和慢病毒转导技术测定 PIAS1 对 PRRSV 复制的影响。【结果】PIAS1 能与 N 蛋白相互作用,而且两者主要共定位于胞浆中;外源转染 PIAS1 并未增加 N 蛋白 SUMO 化修饰水平;在 MARC-145 细胞中,PIAS1 的表达有利于 PRRSV 的复制。【结论】PIAS1 可促进 PRRSV 的复制。

关键词: PRRSV, N 蛋白, PIAS1, 相互作用, SUMO 化修饰, 复制

Effects of PIAS1 on sumoylation of PRRSV N protein and viral replication

WANG Cong ZENG Nan-Fang LIU Si-Yu MIAO Qi ZHOU Lei GE Xin-Na
YANG Han-Chun GUO Xin*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Key Laboratory of Animal Epidemiology of Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

Abstract: [Objective] Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is one of the most economically important pathogens that severely affect pork industry worldwide. As a reversible post-translational modification, sumoylation plays an important role in regulating viral replication. Protein inhibitor of activated STAT1 (PIAS1), as a member of SUMO E3 ligase PIAS family, can promote sumoylation of target protein, which affects the function of target protein and further participates in the transcriptional regulation process. This study was designed to study the mechanism of interaction between PIAS1 and PRRSV N protein, as well as its effect on N protein

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31572549)

*Corresponding author: Tel: 86-10-62732875; E-mail: guoxin@cau.edu.cn

Received: July 02, 2017; **Accepted:** September 04, 2017; **Published online** (www.cnki.net): September 07, 2017

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 31572549)

*通讯作者: Tel: 86-10-62732875; E-mail: guoxin@cau.edu.cn

收稿日期: 2017-07-02; **接受日期:** 2017-09-04; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-09-07

sumoylation and viral replication, to provide a scientific basis for further understanding the replication regulation and pathogenesis of PRRSV. **[Methods]** The interaction between PRRSV N protein and PIAS1 was first verified by yeast two-hybrid, Co-IP and confocal immunofluorescence assay. And then increased dose of PIAS1 were exogenously transfected to observe whether PIAS1 could mediate sumoylation of N protein. The effect of PIAS1 on PRRSV replication was investigated by testing the virus titer in cells with increased/reduced PIAS1 by using lentiviral transduction or RNA interference technology. **[Results]** PIAS1 could interact with the PRRSV N protein, and both of them predominantly located in the cytoplasm. Exogenous transfection of PIAS1 did not increase the sumoylation level of N protein. However, the overexpression of PIAS1 could promote PRRSV replication in MARC-145 cells. **[Conclusion]** PIAS1 has the function of promoting PRRSV replication.

Keywords: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Nucleocapsid protein, Protein inhibitor of activated STAT1 (PIAS1), Interaction, Sumoylation, Replication

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的一种以母猪繁殖障碍和仔猪呼吸道疾病为特征的重要猪病^[1-2]。2006 年,以高热、高发病率和死亡率高及妊娠母猪严重的繁殖障碍为特征的高致病性 PRRS (Highly pathogenic PRRS, HP-PRRS)在我国流行,给养猪业造成巨大经济损失^[3]。PRRSV 属套式病毒目(Nidovirales)动脉炎病毒科(Arteriviridae)动脉炎病毒属(Arterivirus)^[4],分为以 LV (Lelystad virus)为代表的基因 I 型(Type 1)和以 VR-2332 为代表的基因 II 型(Type 2)^[5-6]。PRRSV 基因组为单股正链 RNA,全长约 15 kb,至少包括 12 个开放阅读框^[7-9]。ORF1a 和 ORF1b 编码病毒复制酶多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab,其余 ORFs 编码病毒的结构蛋白^[10-12]。N 蛋白是 PRRSV 感染宿主后表达量最高的结构蛋白,免疫原性强并且对 PRRSV 的生命周期具有重要影响,还可通过自身的共价与非共价相互作用为病毒衣壳的组装提供基础^[13]。

SUMO (Small ubiquitin-like modifier)化修饰作为蛋白类泛素化修饰的一种方式,于 20 世纪 90 年代被发现,在真核细胞的生命进程中发挥着多种重要作用,如 RNA 加工、染色质重塑、细胞分裂、核质转移、转录调控等^[14]。SUMO 化修饰是由 E1 激活酶、E2 结合酶和 E3 连接酶共同参与完

成的一种动态可逆的修饰过程^[15-16]。PIAS1 属于 SP-RING 结构域 SUMO E3 连接酶家族,该家族主要包括人的 PIAS (Protein inhibitor of activated STAT,有 PIAS1、PIAS3、PIASx α/β 和 PIASy)蛋白^[17]及它们的酵母同系物。PIAS1 是以 STAT1 为诱饵利用酵母双杂交方法筛选发现的^[18]。PIAS1 在转录调控、细胞周期、细胞凋亡及肿瘤发生中发挥着重要的生物学功能。有研究表明,PIAS1 可以与 A 型流感病毒 PB2 蛋白相互作用抑制病毒的复制^[19];PIAS1 还可以与人巨细胞病毒 IE2 蛋白相互作用增强 IE2 的 SUMO 化修饰水平^[20]。研究人员利用酵母双杂交系统筛选出 EB 病毒(Epstein-barr virus, EBV)的即刻早期蛋白 Rta,发现其可与 PIAS1 相互作用,且 PIAS1 可以增强 SUMO1 与 Rta 的结合^[21]。

目前关于 PRRSV 的各结构蛋白及非结构蛋白能否被 SUMO 化修饰的研究还鲜有报道,本实验室前期研究表明 PRRSV N 蛋白可与 Ubc9 发生相互作用,并且已证实 N 蛋白在体外转染和 PRRSV 感染的情况下皆可发生 SUMO 化修饰(另文发表)。2012 年, Wang 等在利用酵母双杂交试验筛选与 PRRSV N 蛋白相互作用的宿主蛋白时发现 PIAS1 是候选宿主蛋白之一^[22],但对其在调控 PRRSV 复制及 N 蛋白 SUMO 化修饰中的作用并未涉及。研究 PIAS1 与 PRRSV N 蛋白的相互作用可为解析 PRRSV 复制调控和致病分子机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

MARC-145、HEK 293T 和 HEK 293FT 细胞由农业部动物流行病学重点实验室(以下简称为本实验室)保存; 原代猪肺泡巨噬细胞(PAMs)由本实验室灌洗、冻存于液氮; 重组质粒 pGBKT7-N 由本实验室构建、保存; PIAS1 siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成; PRRSV N 蛋白单克隆抗体由南京农业大学姜平教授赠送; HA 鼠源单克隆抗体(H3663)和 Myc 兔源多克隆抗体(C3956), Sigma-Aldrich 公司; HA 兔源单克隆抗体(3724S), CST 公司; SUMO2/3 兔源多克隆抗体(ab81371), Abcam 公司; HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (ZB-2305) 和山羊抗兔 IgG (ZB-2301), 北京中杉金桥生物技术有限公司; KOD FX Neo DNA 聚合酶, 东洋纺公司; M-MLV 反转录酶和 FuGENE® HD 转染试剂, Promega 公司; Trizol™ Reagent、DNA 转染试剂(Lipofectamine® LTX and PLUS™ Reagents)和 siRNA 转染试剂(Lipofectamine™ RNAiMax), Invitrogen 公司。2720 Thermal Cycler PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; Nikon Eclipse Ti-U 型倒置荧光显微镜, 日本 Nikon 公司。

1.2 引物设计

根据人 PIAS1 基因序列(GenBank 登录号为 NM_016166)分别设计重组质粒 pCMV-Myc-PIAS1、pGADT7-PIAS1 和 pWPXL-PIAS1 特异性引物, 由北京三博远志生物技术有限责任公司合成, 引物序列见表 1。

1.3 总 RNA 提取和 RT-PCR

总 RNA 的提取: 按照 Trizol™ Reagent 试剂盒说明书操作。

反转录: 参照 M-MLV 反转录步骤。建立 25 μL 反转录体系, 42 °C 反转录 1–2 h 后产物–20 °C 保存备用。

PCR 反应体系: 2×KOD buffer 25 μL, dNTPs (2 mmol/L) 10 μL, 上下游引物(10 pmol/μL) 各 1.5 μL, KOD FX (1.0 U/μL) 1.0 μL, cDNA

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')
pCMV-Myc-PIAS1 F	<i>CGGAATTC</i> ATGGCGGACAGTGCGG AACTAAAGCAAATG
pCMV-Myc-PIAS1 R	<i>GGGGTACCGT</i> CCAATGAAATAATG TCTGGTATGATGCCA
pGADT7-PIAS1 F	<i>CGGAATTC</i> ATGGCGGACAGTGCGG AACTAAAGCAAATG
pGADT7-PIAS1 R	<i>CCCTCGAG</i> AGATGGCGGACAGTG CGGAACTAAAGCAAATG
pWPXL-PIAS1 F	<i>GGGTTTAAAC</i> ATGGCGGACAGTGC GGAAGCTAAAGCAAATG
pWPXL-PIAS1 R	<i>CGACGCGT</i> TTAGATGGCGGACAGT GCGGAACTAAAGCAAATG

注: 斜体代表保护性碱基; 下划线代表限制性酶切位点。

Note: Italics represent protective bases; Underlines represent restriction sites.

2 μL, 无菌去离子水补至 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 68 °C 1 min, 35 个循环; 68 °C 7 min。

1.4 酵母回复杂交

将重组表达质粒 pGBKT7-N 和 pGADT7-PIAS1 各 100 ng 共转化到制备好的酵母菌株 Y2HGold 感受态细胞中, 同时设立阳性对照组: pGBKT7-53+ pGADT7-T; 阴性对照组: pGBKT7-N+pGADT7 和 pGBKT7+pGADT7-PIAS1。酵母感受态制备及具体实验操作参见 Clontech 说明书。

1.5 体外转染、激光共聚焦和免疫共沉淀

根据不同试验要求, 采用 Lipofectamine® LTX and PLUS™ Reagents 转染试剂转染, 具体操作按说明书进行, 根据实验要求在转染后不同时间对细胞进行处理。

在长有 HEK 293T 细胞的 24 孔细胞培养板中共转 pCMV-HA-N 和 pCMV-Myc-PIAS1, 同时, 用 PRRSV (MOI=0.01) 感染 MARC-145 细胞和原代 PAMs 细胞。在转染或感染 36 h 后, 用预冷的无水乙醇固定 20 min, 分别孵育相应一抗 2 h, PBS 洗涤 3 次后, 分别用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 和 TRITC 标记的羊抗兔 IgG 于 37 °C 孵育 1 h, DAPI 染核, 激光共聚焦显微镜下观察。

1.6 siRNA 干扰 PIAS1 对病毒增殖的影响

siRNA 设计与合成: 针对 PIAS1 基因的 3 个靶点设计 siRNA。siRNA 由上海吉玛公司设计和合成, 序列见表 2。

siRNA 转染: 将 MARC-145 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待单层细胞长至 70%–80%, 按照 LipofectamineTM RNAiMax 说明书转染 siRNA。用 Western blotting 方法检测 PIAS1 基因的沉默效果, 确定最佳的干扰浓度。随后, 将 MARC-145 细胞接种于 24 孔细胞培养板中, 选择干扰效果最佳的 siRNA 进行干扰, 48 h 后弃掉上清, 无菌 PBS 洗涤 3 遍, 细胞感染 PRRSV (MOI=0.01), 并于感染后 12、24、36、48、60、72 h 收集上清及细胞样品, 置于 -80 °C 反复冻融 3 次, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 进行 TCID₅₀ 测定。

1.7 慢病毒包装及转导 MARC-145 细胞

1.7.1 慢病毒包装质粒转染: 将 FuGENE[®] HD 转染试剂和 Opti-MEM 加入到 2 mL 无菌 EP 管中, 轻吹混匀, 室温静置 15 min。将 3 种质粒(pWPXL-PIAS1 1.18 μg, psPAX2 2.35 μg, pMD2.G 0.47 μg)依次加入到上述混合液中, 轻吹混匀, 室温静置 30 min。静置期间, 对 HEK 293FT 细胞更换 10% DMEM 新鲜培养液, 6 mL/皿。静置后, 将配好的混合液均匀加入至每个细胞皿中, 混匀, 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 逐日观察荧光和细胞病变。转染后根据 GFP 荧光和 CPE 对细胞上清进行收集, 并采用超滤的方式对慢病毒液进行浓缩。

表 2 PIAS1 的 siRNA 序列

Table 2 The sequences of siRNA used for targeting PIAS1

siRNA	序列 Sequence (5'→3')
siRNA-683	CAGCAAUCAGUAGUCCAUGGAUATT UAUCCAUGGAACUACUGAUUUGCUGTT
siRNA-1057	GAAUCCGGAUCAUUCUAGAGCUUUATT UAAAGCUCUAGAAUGAUCCGGAUUCTT
siRNA-1685	GCUGUAGACACAAGCUACAUAUAAUATT UAUUAAGUAGCUUGUGUCUACAGCTT

1.7.2 慢病毒转导 MARC-145 细胞: 取生长状态良好的 MARC-145 细胞接种于 24 孔板, 待细胞长至单层时进行慢病毒转导。转导前更换新鲜的 5% DMEM 培养基, 加入合适比例的慢病毒, 转导时需加入终浓度为 8 μg/mL Polybrene 助转剂, 混匀, 转导后 24 h 更换新鲜的 10% DMEM 培养基。置于 37 °C 温箱中培养, 转导 36 h 后, 在荧光显微镜下观察蛋白表达效率。

1.8 病毒 TCID₅₀ 测定

病毒 TCID₅₀ 测定按照实验室制定的操作程序进行^[23]。根据 Reed-Muench 法计算病毒 TCID₅₀ 值。

1.9 数据统计与分析

试验数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 GraphPad Prism (version 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA)软件中的 Two-way ANOVA 进行差异显著性分析。 $P > 0.05$ (ns)表示差异不显著; $P < 0.05$ (*)表示差异显著; $P < 0.01$ (**)和 $P < 0.001$ (***), 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 PIAS1 的扩增及重组质粒的构建

以 PAMs cDNA 为模板, 扩增得到 PIAS1 PCR 产物, 长度为 1 956 bp, 与预期一致(图 1)。PCR 产物与 pGADT7、pCMV-Myc 和 pWPXL 载体经双酶切, 连接、转化大肠杆菌 Trans10 感受态细胞, 经

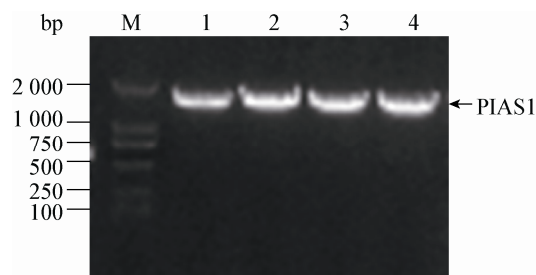


图 1 PIAS1 基因的扩增及其重组质粒的 PCR 鉴定

Figure 1 Amplification of PIAS1 gene and PCR identification of recombinant plasmids

注: M: 分子量标准 DL2000; 1: PIAS1; 2: pCMV-Myc-PIAS1; 3: pGADT7-PIAS1; 4: pWPXL-PIAS1.

Note: M: Marker DL2000; 1: PIAS1; 2: pCMV-Myc-PIAS1; 3: pGADT7-PIAS1; 4: pWPXL-PIAS1.

PCR 鉴定和测序验证, 最终获得 pGADT7-PIAS1、pCMV-Myc-PIAS1 和 pWPXL-PIAS1 重组质粒。

2.2 PIAS1 与 N 蛋白相互作用的验证

将 pGBKT7-N 和 pGADT7-PIAS1 共转化至 Y2HGold 酵母菌株, 酵母回复杂交实验结果显示, PIAS1 与 N 蛋白在酵母细胞中可相互作用(图 2A)。

进一步将真核表达质粒 pCMV-HA-N 和 pCMV-Myc-PIAS1 共转染 HEK 293T 细胞, 并设置与空载体共转对照, 利用 Pierce[®] HA Tag IP/Co-IP Kit 进行 Co-IP 实验, 分别用 HA 和 Myc 抗体进行 Western blotting 检测。结果显示, N 蛋白和 PIAS1 之间存在外源性相互作用(图 2B)。通常情况下

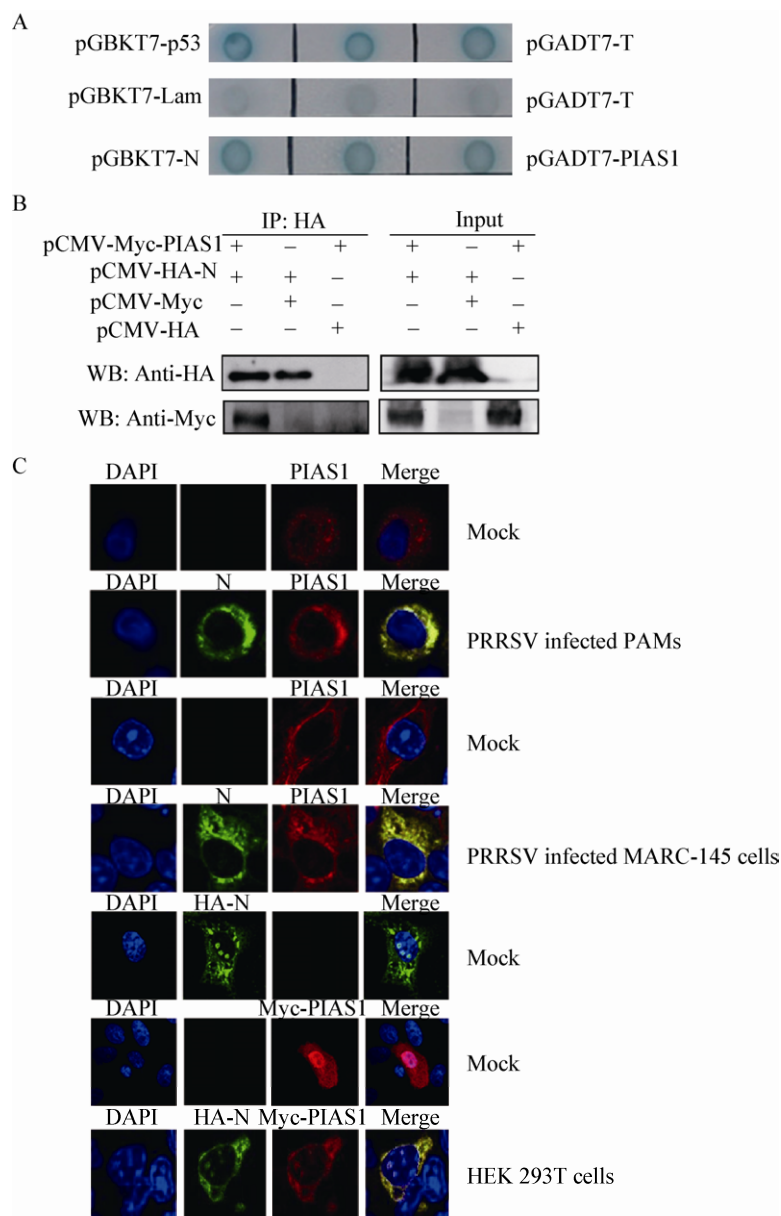


图 2 PIAS1 与 PRRSV N 蛋白相互作用的验证

Figure 2 Confirmation of the interaction of PIAS1 with PRRSV N protein

注: A: 酵母回复杂交验证 PIAS1 与 N 蛋白相互作用; B: 免疫共沉淀验证 PIAS1 与 N 蛋白相互作用; C: 激光共聚焦验证 PIAS1 与 N 蛋白在细胞中共定位。

Note: A: Interaction of PIAS1 with N protein by a yeast two-hybrid assay; B: Interaction of PIAS1 with N protein by Co-IP; C: Co-localization of PIAS1 with N protein in cells.

PIAS1 在胞浆和胞核中均有分布。将 pCMV-HA-N 和 pCMV-Myc-PIAS1 共转染 HEK 293T 细胞, 分别用 HA 单抗和 Myc 多抗进行孵育; 同时用 PRRSV 感染 MARC-145 细胞和原代 PAMs, 分别用 N 单抗和 PIAS1 多抗进行孵育。激光共聚焦结果显示, PIAS1 和 N 在外源转染 HEK 293T 细胞中以及在 PRRSV 感染原代 PAMs 和 MARC-145 细胞的情况下均可定位于胞浆中(图 2C)。

2.3 PIAS1 对 N 蛋白 SUMO 化修饰的影响

为验证 PIAS1 是否介导 N 蛋白的 SUMO 化修饰, 将 pCMV-HA-N 和 pCMV-Myc-PIAS1 共转染 HEK 293T 细胞, 其中 PIAS1 设置转染浓度梯度(依次为 2.0、1.0、0.5、0 μg), 并设置与空载体共转

对照, 转染 30 h 后收取蛋白, 用 N 蛋白单克隆抗体进行 IP 试验, 分别利用 HA 和 N 单克隆抗体及 Myc 多克隆抗体进行 Western blotting 检测。结果表明, 外源转染 PIAS1 不影响 N 蛋白的 SUMO 化修饰水平(图 3)。同时, 利用 siRNA 干扰 HEK 293T 细胞中的 PIAS1 基因, 然后转染 pCMV-HA-N, 同时设置对照组, 结果表明, 干扰 PIAS1 后并不影响 N 蛋白的 SUMO 化修饰(图 3B)。

2.4 干扰 PIAS1 对 PRRSV 增殖的影响

利用 RNA 干扰技术分析了干扰 MARC-145 细胞中 PIAS1 基因后对 PRRSV 增殖的影响。结果表明, si-PIAS1-1685 能很好地干扰 PIAS1 基因(图 4A), 选取 si-PIAS1-1685 进行下一步试验。用该

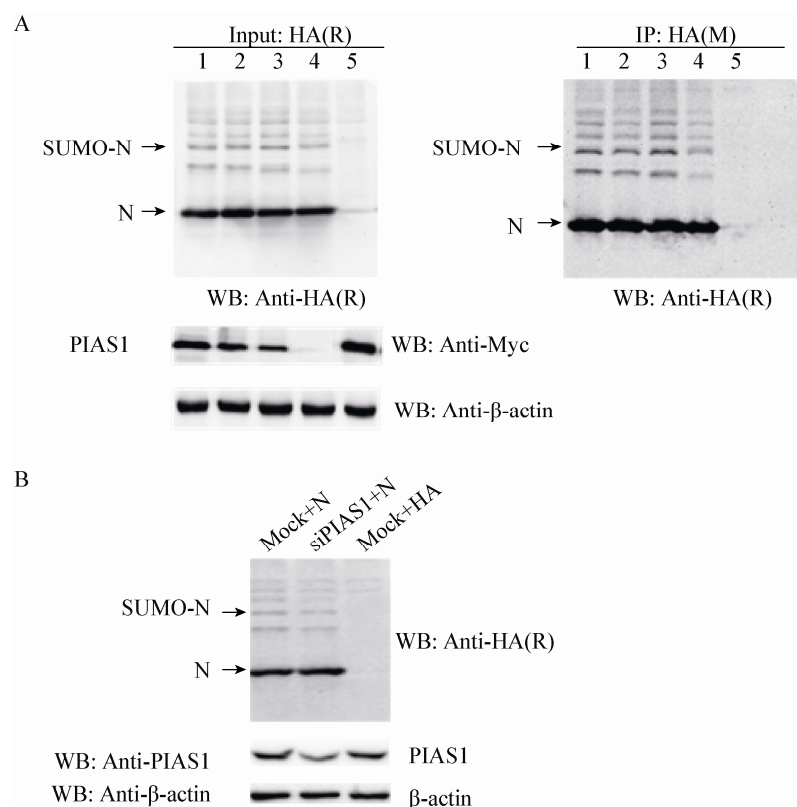


图 3 外源转染 PIAS1 对 N 蛋白 SUMO 化修饰的影响

Figure 3 Effect of sumoylation of N protein by exogenous transfection PIAS1

Note: A: 1: Myc-PIAS1 (2.0 μg)+HA-N (2.0 μg); 2: Myc-PIAS1 (1.0 μg)+HA-N (2.0 μg)+Myc (1.0 μg); 3: Myc-PIAS1 (0.5 μg)+HA-N (2.0 μg)+Myc (1.5 μg); 4: HA-N (2.0 μg)+Myc (2.0 μg); 5: Myc-PIAS1 (2.0 μg)+HA (2.0 μg). B: No effect on sumoylation of N protein by silencing PIAS1.

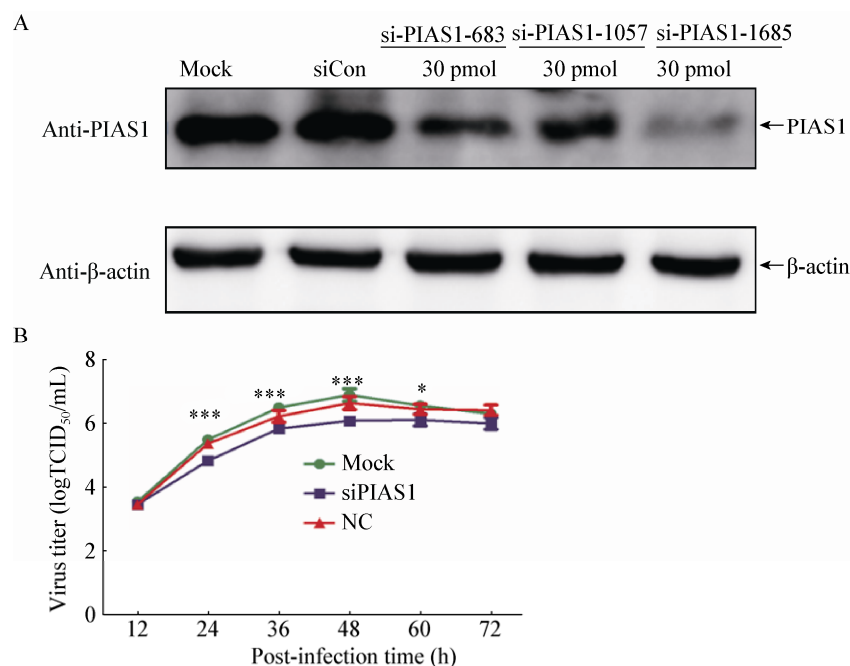


图4 干扰 PIAS1 基因的表达抑制病毒的复制

Figure 4 Inhibition of PRRSV replication by silencing PIAS1 gene in MARC-145 cells

注: A: 3 种 siRNA 转染对 PIAS1 表达的影响; B: siPIAS1 转染对 PRRSV 增殖的影响。

Notes: A: Silencing efficiency of PIAS1 gene of three siRNAs; B: The effect of siPIAS1 on PRRSV growth.

siRNA 干扰 MARC-145 细胞中 PIAS1 基因后, 接种 PRRSV (MOI=0.01) 绘制病毒的生长曲线。结果表明, 与对照相比, 干扰 PIAS1 基因的表达可抑制 PRRSV 复制(图 4B)。

2.5 过表达 PIAS1 对 PRRSV 增殖的影响

为了分析 PIAS1 过表达对 PRRSV 增殖的影响, 用表达 PIAS1-GFP 的慢病毒转导 MARC-145 细胞, 利用免疫荧光和 Western blotting 检测 MARC-145 细胞中 PIAS1 的表达。结果显示, GFP-PIAS1 可在转导的 MARC-145 细胞中表达(图 5A 和图 5B)。转导 MARC-145 细胞 24 h 后, 以 MOI=0.01 的剂量感染 PRRSV 进行病毒生长曲线的绘制, 分析在 MARC-145 细胞中过表达 PIAS1 对 PRRSV 增殖的影响。结果表明, 与对照相比, 过表达 PIAS1 可促进 PRRSV 的复制(图 5C)。

3 讨论

病毒蛋白与宿主细胞蛋白相互作用及蛋白定位的改变, 在调节病毒生命周期甚至病毒复制方

面起到重要的作用^[24]。本实验室前期的研究表明 N 蛋白在体外转染和 PRRSV 感染的情况下皆可发生 SUMO 化修饰, 由此推测属于 SP-RING 结构域 SUMO E3 连接酶家族的 PIAS1 与 N 蛋白可能存在潜在的相互作用。如同其他 RNA 病毒一样, PRRSV 的复制发生在胞浆中, 但在 PRRSV 的感染过程中 N 蛋白在胞浆和细胞核中皆有分布^[25], N 蛋白在 10–13 aa 和 41–47 aa 处存在 2 个核定位信号, 分别称为 NLS1 和 NLS2^[26]。N 蛋白的核定位可能参与多种宿主细胞过程的调节, 包括调节细胞周期、细胞凋亡和诱导抗病毒反应。值得注意的是, 与野生型病毒相比, 具有 NLS-2 突变的 PRRSV 可以诱导较低滴度的病毒血症和较高滴度的中和抗体产生^[27–29]。此外, N 蛋白含有核仁定位序列(NLS)和核输出信号(NES), 所有这些结构域决定了 PRRSV N 蛋白的核-质穿梭特性^[26,30]。基于以上研究及科学推测, 本研究利用酵母回复杂交、免疫共沉淀和激光共聚焦等技术证实了 PIAS1 与 N 蛋白

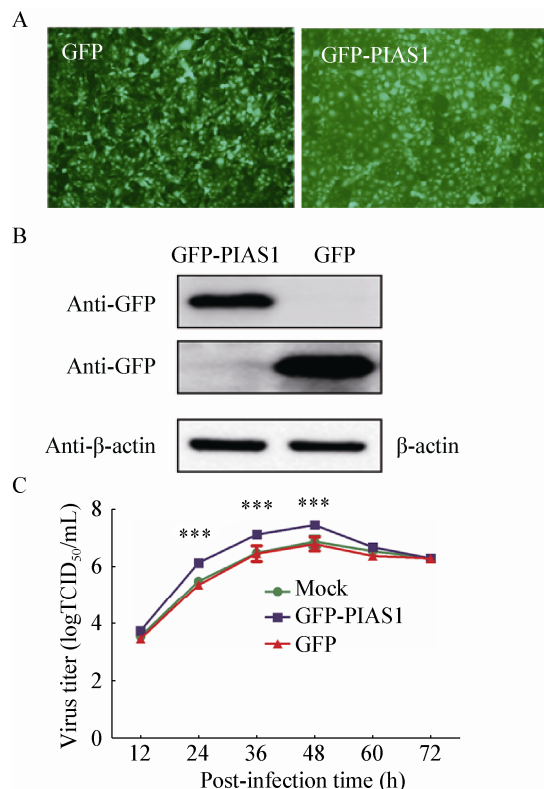


图5 过表达 PIAS1 促进病毒的复制

Figure 5 Enhancement of PRRSV replication by PIAS1 over-expression in MARC-145 cells

注: A: 表达 GFP-PIAS1 的慢病毒在转导 MARC-145 细胞中的鉴定; B: Western blotting 检测 GFP-PIAS1 的表达; C: 过表达 PIAS1 对 PRRSV 在 MARC-145 细胞中滴度的影响。

注: A: The identification of GFP-PIAS1 expression in MARC-145 cells transduced with GFP-PIAS1-expressing lentiviruses; B: Detection of GFP-PIAS1 expression in MARC-145 cells by Western blotting; C: PRRSV titers in MARC-145 cells with PIAS1 over-expression.

间的确存在相互作用, 而且无论在瞬时转染的 HEK 293T 细胞, 还是 PRRSV 感染的 MARC-145 细胞、原代 PAMs 细胞, 与 N 蛋白相互作用的 PIAS1 均从胞核转移到胞浆中, 这与 Kang 等^[31]报道的 CP2c 可以通过与 PIAS1 相互作用使其亚细胞定位由胞浆转移到核内的研究结果吻合。

SUMO 化修饰作为蛋白类泛素化修饰的一种方式, 在真核细胞的生命进程中发挥着多种重要作用。SUMO 共价结合或非共价相互作用可以改变底物稳定性、核定位和功能, 此外, 一些底物的核定位信号也受 SUMO 化修饰调节^[32-35], 因此研

究 N 蛋白 SUMO 化修饰对深入理解 N 蛋白生物学功能有着重要意义。有研究表明, 宿主蛋白及病毒蛋白均可作为 SUMO 修饰的靶蛋白受 SUMO 化修饰系统的调节, 此过程对病毒本身的生命周期具有非常重要的作用^[36-38]。例如, 埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV) 的基质蛋白 VP40 可被 SUMO 化修饰, 不仅能维持 VP40 的稳定性, 而且还参与病毒样颗粒 (VLPs) 的形成^[39]; 甲型流感病毒 (Influenza A virus, IAV) NS1 的 SUMO 化增强了 NS1 的稳定性, 最终提高了甲型流感病毒的增殖速度^[40]; IAV 基质蛋白 M1 的 SUMO 化有利于形成 M1-vRNP 复合物, 进一步影响病毒的组装和形态发生, 而 SUMO 化修饰的核蛋白对其细胞内运输和病毒生长是必需的^[32]。除了 Ubc9 介导的靶蛋白 SUMO 化修饰途径外, 通过 SIM 位点介导的病毒蛋白 SUMO 化修饰也有相关报道, 如痘苗病毒 (Vaccinia virus, VV) 的 E3 蛋白^[41]和人巨细胞病毒 (Human cytomegalovirus, HCMV) IE2 蛋白^[42]的 SIMs 位点对其本身 SUMO 化修饰水平是必需的。除了上述两种修饰途径外, 有学者报道 SUMO E3 连接酶同样可以介导靶蛋白的 SUMO 化修饰过程, 如 E3 连接酶 Siz1 对 PCNA 的 SUMO 化修饰起着至关重要的作用^[43]。本研究在外源转染 PIAS1 时, PRRSV N 蛋白的 SUMO 化修饰水平并没有发生改变, 表明 PIAS1 并不参与 N 蛋白的 SUMO 化修饰。关于 N 蛋白 SUMO 化修饰途径目前可排除通过 SCM 途径或 SIM 途径介导, 推测 N 蛋白 SUMO 化修饰可能由其他 SUMO E3 连接酶介导完成。

此外, 我们分析了 PIAS1 与 N 蛋白的相互作用对 PRRSV 复制的影响。在 MARC-145 细胞中, 沉默 PIAS1 的表达可以抑制 PRRSV 的复制, 而过表达 PIAS1 则能促进 PRRSV 的复制, 这表明 PIAS1 作为一种细胞辅助因子可以正调节病毒的复制。Liu 等的研究表明, PIAS1 作为一种干扰素信号通路负调节因子, 敲除 PIAS1 可以显著提高机体对病毒或微生物入侵的免疫反应^[44], 这也与 PIAS1 促进 PRRSV 复制的结果相符。

综上,本研究首次证实宿主蛋白 PIAS1 与 PRRSV N 蛋白相互作用且共定位于胞浆中; PIAS1 可以正调控 PRRSV 的复制,但不影响 PRRSV N 蛋白 SUMO 化修饰。

参考文献

- [1] Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers[J]. *Journal of Swine Health and Production*, 2013, 21(2): 72-84
- [2] Pejsak Z, Stadejek T, Markowska-Daniel I. Clinical signs and economic losses caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large breeding farm[J]. *Veterinary Microbiology*, 1997, 55(1/4): 317-322
- [3] Tian KG, Yu XL, Zhao TZ, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e526
- [4] Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae[J]. *Archives of Virology*, 1997, 142(3): 629-633
- [5] Magar R, Robinson Y, Dubuc C, et al. Evaluation of the persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig carcasses[J]. *Veterinary Record*, 1995, 137(22): 559-561
- [6] Murtaugh MP, Elam MR, Kakach LT. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus[J]. *Archives of Virology*, 1995, 140(8): 1451-1460
- [7] Conzelmann KK, Visser N, van Woensel P, et al. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group[J]. *Virology*, 1993, 193(1): 329-339
- [8] Li YH, Tas A, Sun Z, et al. Proteolytic processing of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicase[J]. *Virus Research*, 2015, 202: 48-59
- [9] Bautista EM, Meulenberg JJM, Choi CS, et al. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Archives of Virology*, 1996, 141(7): 1357-1365
- [10] Johnson CR, Griggs TF, Gnanandarajah J, et al. Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses[J]. *The Journal of General Virology*, 2011, 92(Pt 5): 1107-1116
- [11] Meulenberg JJM, Petersen-Den BA, de Kluyver EP, et al. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus[J]. *Virology*, 1995, 206(1): 155-163
- [12] Kappes MA, Miller CL, Faaborg KS. Highly divergent strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus incorporate multiple isoforms of nonstructural protein 2 into virions[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(24): 13456-13465
- [13] Wootton SK, Yoo D. Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(8): 4546-4557
- [14] Flotho A, Melchior F. Sumoylation: A regulatory protein modification in health and disease[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2013, 82(1): 357-385
- [15] Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2006, 22(1): 159-180
- [16] Capili AD, Lima CD. Taking it step by step: mechanistic insights from structural studies of ubiquitin/ubiquitin-like protein modification pathways[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2007, 17(6): 726-735
- [17] Schmidt D, Müller S. Members of the PIAS family Act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(5): 2872-2877
- [18] Liu B, Liao JY, Rao XP, et al. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(18): 10626-10631
- [19] Tsai JS. The interaction between Influenza A viral PB2 protein and cellular PIAS1 protein[D]. Taiwan, China: Master's Thesis of Taiwan University, 2012 (in Chinese)
蔡季书. A 型流行性感冒病毒 PB2 蛋白质与细胞蛋白质 PIAS1 之间的交互作用[D]. 中国台湾: 台湾大学硕士学位论文, 2012
- [20] Lee JM, Kang HJ, Lee HR, et al. PIAS1 enhances SUMO-1 modification and the transactivation activity of the major immediate-early IE2 protein of human cytomegalovirus[J]. *FEBS Letters*, 2003, 555(2): 322-328
- [21] Chang L, Lee Y, Cheng T, et al. Post-translational modification of Rta of Epstein-Barr Virus by SUMO-1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(37): 38803-38812
- [22] Wang XY, Bai J, Zhang LL, et al. Poly(A)-binding protein interacts with the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and participates in viral replication[J]. *Antiviral Research*, 2012, 96(3): 315-323
- [23] Zhao SC, Ge XN, Wang XL, et al. The DEAD-box RNA helicase 5 positively regulates the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by interacting with viral Nsp9 *in vitro*[J]. *Virus Research*, 2015, 195: 217-224
- [24] Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen[J]. *Science*, 2008, 319(5865): 921-926
- [25] Rowland RR, Kervin R, Kuckleburg C, et al. The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence[J]. *Virus Research*, 1999, 64(1): 1-12
- [26] Rowland RRR, Schneider P, Fang Y, et al. Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus[J]. *Virology*, 2003, 316(1): 135-145
- [27] Lee C, Hodgins D, Calvert JG, et al. Mutations within the nuclear localization signal of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein attenuate virus replication[J]. *Virology*, 2006, 346(1): 238-250
- [28] Lee C, Hodgins DC, Calvert JG, et al. The nuclear localization signal of the PRRS virus nucleocapsid protein modulates viral replication *in vitro* and antibody response *in vivo*[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2006, 581: 145-148

- [29] Pei YL, Hodgins DC, Lee C, et al. Functional mapping of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus capsid protein nuclear localization signal and its pathogenic association[J]. *Virus Research*, 2008, 135(1): 107-114
- [30] Rowland RRR, Yoo D. Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences[J]. *Virus Research*, 2003, 95(1/2): 23-33
- [31] Kang HC, Chae JH, Jeon J, et al. PIAS1 regulates CP2c localization and active promoter complex formation in erythroid cell-specific α -globin expression[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(16): 5456-5471
- [32] Han QL, Chang C, Li L, et al. Sumoylation of influenza A virus nucleoprotein is essential for intracellular trafficking and virus growth[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(16): 9379-9390
- [33] Mahajan R, Delphin C, Guan TL, et al. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2[J]. *Cell*, 1997, 88(1): 97-107
- [34] Müller S, Matunis MJ, Dejean A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus[J]. *The EMBO Journal*, 1998, 17(1): 61-70
- [35] Salinas S, Briançon-Marjollet A, Bossis G, et al. SUMOylation regulates nucleo-cytoplasmic shuttling of Elk-1[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2004, 165(6): 767-773
- [36] Everett RD, Boutell C, Hale BG. Interplay between viruses and host sumoylation pathways[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(6): 400-411
- [37] Mattoscio D, Segré CV, Chiocca S. Viral manipulation of cellular protein conjugation pathways: the SUMO lesson[J]. *World Journal of Virology*, 2013, 2(2): 79-90
- [38] Wimmer P, Schreiner S, Dobner T. Human pathogens and the host cell SUMOylation system[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(2): 642-654
- [39] Baz-Martínez M, El Motiam A, Ruibal P, et al. Regulation of Ebola virus VP40 matrix protein by SUMO[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37258
- [40] Xu K, Klenk C, Liu B, et al. Modification of nonstructural protein 1 of influenza A virus by SUMO1[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(2): 1086-1098
- [41] González-Santamaría J, Campagna M, García MA, et al. Regulation of vaccinia virus E3 protein by small ubiquitin-like modifier proteins[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(24): 12890-12900
- [42] Berndt A, Hofmann-Winkler H, Tavalai N, et al. Importance of covalent and noncovalent SUMO interactions with the major human cytomegalovirus transactivator IE2p86 for viral infection[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(24): 12881-12894
- [43] Yunus AA, Lima CD. Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 Ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA[J]. *Molecular Cell*, 2009, 35(5): 669-682
- [44] Liu B, Mink S, Wong KA, et al. PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity[J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(9): 891-898