

· 基础研究 ·

## gp96蛋白影响HHV-6 gB糖蛋白的成熟

马菁菁<sup>1</sup>,许梦原<sup>1</sup>,李凌云<sup>1</sup>,姚堃<sup>1</sup>,汤华民<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学基础医学院免疫学系,<sup>2</sup>国家卫生健康委员会抗体技术重点实验室,<sup>3</sup>基础医学实验教学示范中心,江苏南京 211166

**[摘要]** 目的:寻找与糖蛋白96(glycoprotein 96, gp96)相互作用的人疱疹病毒6型(human herpesvirus 6, HHV-6)的病毒因子,并研究其相互作用对病毒感染的影响。方法:通过免疫共沉淀、Western blot以及激光共聚焦显微镜寻找并验证gp96和HHV-6糖蛋白B(glycoprotein B, gB)的相互作用;提取外泌体检测gp96过表达对HHV-6 gB成熟的影响。结果:免疫共沉淀实验发现HHV-6 gB和gp96有相互作用;激光共聚焦证实gB和gp96在空间上共定位;Western blot确认gp96过表达会影响gB的成熟。结论:gp96蛋白与HHV-6 gB糖蛋白特异性结合,并且影响HHV-6 gB的成熟。

**[关键词]** 人疱疹病毒6型;gB糖蛋白;gp96蛋白

**[中图分类号]** R392.12

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)09-1309-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20190909

## The gp96 protein affects maturation process of HHV-6 gB

Ma Jingjing<sup>1</sup>, Xu Mengyuan<sup>1</sup>, Li Lingyun<sup>1</sup>, Yao Kun<sup>1</sup>, Tang Huamin<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Immunology Department of Basic Medicine School, <sup>2</sup>Key Laboratory of Antibody Technique of National Health Commission, <sup>3</sup>Demonstration Center for Experimental Teaching of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to identify human herpesvirus 6(HHV-6) binding partner for glycoprotein 96(gp96), and analyze the effect of their interaction on HHV-6 infection. **Methods:** Immunoprecipitation, Western blot and confocal microscopy assays were used to identify and verify the interaction between gp96 and HHV-6 glycoprotein B(gB). Effect of Gp96 on gB maturation was analyzed using exosome samples. **Results:** Immunoprecipitation results showed that HHV-6 gB interacted with gp96; gB and gp96 were colocalized, which was detected by confocal microscopy assays. Western blot results confirmed that overexpression of gp96 affected the maturation of gB. **Conclusion:** The gp96 is a binding partner for HHV-6 gB, and gp96 affects the maturation process of gB.

**[Key words]** human herpesvirus type 6; glycoprotein B; gp96 protein

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(09):1309-1313]

人疱疹病毒6型(human herpesvirus 6, HHV-6)和人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)、人疱疹病毒7型(human herpesvirus 7, HHV-7)同属β疱疹病毒亚科、为嗜T淋巴细胞病毒<sup>[1]</sup>。近年,旧分类中的HHV-6两亚型,因其感染宿主细胞受体等

不同,分为两种不同病毒即HHV-6A和HHV-6B(以下统称为HHV-6)<sup>[2]</sup>。HHV-6主要引起婴幼儿急疹,多数情况下婴幼儿急疹预后良好。原发感染后,HHV-6潜伏感染在宿主体内,成年人人群中HHV-6的阳性率在90%以上<sup>[3]</sup>。潜伏感染的HHV-6在宿主免疫力极其低下时(比如移植手术后)可再次活化而引起疾病<sup>[4]</sup>。

疱疹病毒是带有包膜结构的DNA病毒,包膜上表达来源于病毒的糖蛋白,其中糖蛋白H(glycopro-

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81571979,81273235);江苏省自然科学基金面上项目(BK20171489)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: htang@njmu.edu.cn

tein H, gH)、糖蛋白L(glycoprotein L, gL)、糖蛋白B(glycoprotein B, gB)、糖蛋白M(glycoprotein M, gM)、糖蛋白N(glycoprotein N, gN)是最为保守的5种病毒糖蛋白,在各种疱疹病毒中都有表达。已有大量文献报道了上述糖蛋白在病毒感染过程中的作用<sup>[5-6]</sup>。在疱疹病毒感染过程中, gB主要影响病毒的入侵、成熟与释放,此外, gB的宿主细胞受体也在数种疱疹病毒中被报道。比如,配对免疫球蛋白样2型受体和非肌肉肌球蛋白重链II A被报道为单纯疱疹病毒I型gB蛋白的受体<sup>[7-8]</sup>,表皮生长因子受体、血小板源性生长因子 $\alpha$ 受体和整合素被报道为HCMV的受体(部分结果仍有争议)<sup>[9-10]</sup>。

目前,对HHV-6糖蛋白的研究主要集中于和病毒入侵相关的糖蛋白及其复合物,尤其是gH/gL/gQ1/gQ2复合物。近来,在包括HHV-6的多种人类疱疹病毒中,越来越多的抗gB糖蛋白的中和抗体被报道<sup>[3,11]</sup>。HHV-6 gB糖蛋白在病毒感染过程中的具体功能尚不清楚(如是否存在gB受体、在病毒入侵以外感染过程中的作用)<sup>[3]</sup>。HHV-6 gB糖蛋白在感染细胞内的表达需经历一个成熟过程。gB蛋白序列中含有furin蛋白酶酶切位点,未成熟的HHV-6 gB蛋白约112 kDa,当gB成熟时从内质网转运到高尔基体,并被其中的furin蛋白酶切割成64 kDa和58 kDa两部分<sup>[12]</sup>,形成二聚体, gB是否被切割是gB成熟的一项重要标志<sup>[13]</sup>。

已有文献报道了糖蛋白96(glycoprotein 96, gp96)与HHV-6病毒粒子的结合<sup>[14]</sup>。gp96蛋白属于HSP90热休克蛋白家族(按分子量大小分类),近年来其在免疫调控中的作用也逐渐被关注。gp96蛋白能够特异性与多种蛋白结合并调控其表达,如CD91、TLR1、TLR2、TLR4、integrins<sup>[15-17]</sup>。一个成熟gp96蛋白主要有4个结构域构成:N区、带电区、M区以及C区,N区主要结合和水解ATP,为结合和释放肽分子供能,因此gp96蛋白能够促进抗原提呈;结合抗原肽的gp96可与抗原递呈细胞表面的CD91等分子相互作用,被抗原递呈细胞内吞进入细胞,将外源性抗原通过交叉提呈方式提呈给MHC I类分子,从而诱导细胞毒性T细胞的激活<sup>[18]</sup>。此外也有研究表明,低剂量gp96和高剂量gp96刺激引发的免疫反应有所差异,具体机制仍在探究<sup>[19]</sup>。

与gp96蛋白结合的HHV-6病毒因子尚不明确。本研究发现HHV-6 gB糖蛋白能与gp96相互作用,并且这种相互作用会影响HHV-6 gB糖蛋白的成熟表达,报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

菌株*E.coli*DH5 $\alpha$ ,人肾上皮细胞系(293T)、人急性淋巴细胞白血病细胞(HSB2),HHV-6A GS病毒株均由本实验室保存。重组真核表达质粒pCAGGS-AgB(AgB:HHV-6A gB)、pCAGGS-BgB(BgB:HHV-6B gB)、pCAGGS-gp96-Flag等均由本实验室构建。

质粒提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司),胶回收试剂盒(Thermo公司,美国),高保真酶、T4 DNA Ligases(南京诺维赞生物科技有限公司),各种限制性内切酶(大连TaKaRa生物工程有限公司)。兔抗HHV-6 gB抗体(本实验室自行制备),鼠抗FLAG(M2)的单克隆抗体(Sigma-Aldrich公司,美国),抗gp96的单克隆抗体、HRP标记的羊抗鼠IgG(IgG-HRP)、羊抗兔IgG-HRP(Santa Cruz公司,美国),羊抗鼠IgG-FITC、羊抗兔IgG-Alexa Fluor 555(杭州碧云天生物技术有限公司)。ECL发光检测试剂盒(上海天能科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养与转染

采用细胞培养皿培养293T细胞,12 h后,当细胞密度约80%时,将已构建的质粒与PEI分别与200  $\mu$ L无血清、无抗生素的培养基混匀,再将两者混匀,室温静置20 min后,加于293T细胞中,6 h后换液。

#### 1.2.2 细胞固定、染色与观察

转染48 h后,吸去细胞上清,Hank's液清洗细胞,细胞铺于玻璃板上,自然风干后,70%丙酮和30%甲醇固定细胞30 min,依次加一抗和二抗,最后在载玻片上滴加封片液,盖上玻片完成封片,荧光显微镜或共聚焦荧光显微镜下观察。

#### 1.2.3 免疫共沉淀试验

将pCAGGS-AgB或pCAGGS-BgB和pCAGGS-gp96-FLAG质粒共转染至293T细胞,同时设立pCAGGS-AgB、pCAGGS-BgB、pCAGGS-gp96-Flag单独转染293T细胞作为对照。质粒转染293T细胞48 h后收集细胞样品,用含1%NP40细胞裂解液裂解细胞并收集细胞裂解物,取少量样品进行Western blot检测。其余样品进行免疫共沉淀试验:protein G与Flag抗体,4  $^{\circ}$ C旋转孵育12 h;0.15 mol/L硼酸洗3次,20 mmol/L DMP室温孵育30 min;0.2 mol/L乙醇胺室温孵育30 min;4  $^{\circ}$ C预冷的0.1 mol/L Glycine洗涤3次,PBS缓冲液洗涤3次;将上述蛋白样品加

入 protein G-anti-Flag 中,4 ℃ 旋转孵育 12 h;0.1 mol/L Glycine 洗脱蛋白;加入 5×loading buffer,100 ℃ 煮沸 5 min,样品经 SDS-PAGE 电泳转膜后用鼠抗 Flag 抗体、兔抗 gB 多克隆抗体对免疫沉淀复合物中的组分进行检测。

#### 1.2.4 激光共聚焦显微镜检测内源 gB 和 gp96 共定位

使用 HHV-6 GS 病毒株感染 HSB2 细胞 48 h,细胞使用上述方法固定,然后以鼠抗 gp96 抗体(1:50)、兔抗 gB 抗体(1:500)为一抗,羊抗鼠 IgG-FITC(1:500)、羊抗兔 IgG-Alexa Fluor 555(1:500)为二抗进行孵育,DAPI(1:1000)染核,封片后,最后利用 Zeiss LSM-710 激光共聚焦显微镜观察 gp96 和 gB 定位情况,并拍照取像。

#### 1.2.5 外泌体的提取

将细胞培养液加入 50 mL 的离心管,4 ℃ 4 000 g 离心 10 min,去除细胞碎片;随后 4 ℃ 100 000 g 离心 2 h。离心后,外泌体沉淀位于试管底部,呈浅褐

色或乳白色(有时肉眼不可见沉淀);弃上清液,保存管底沉淀液,-70 ℃ 长期保存。

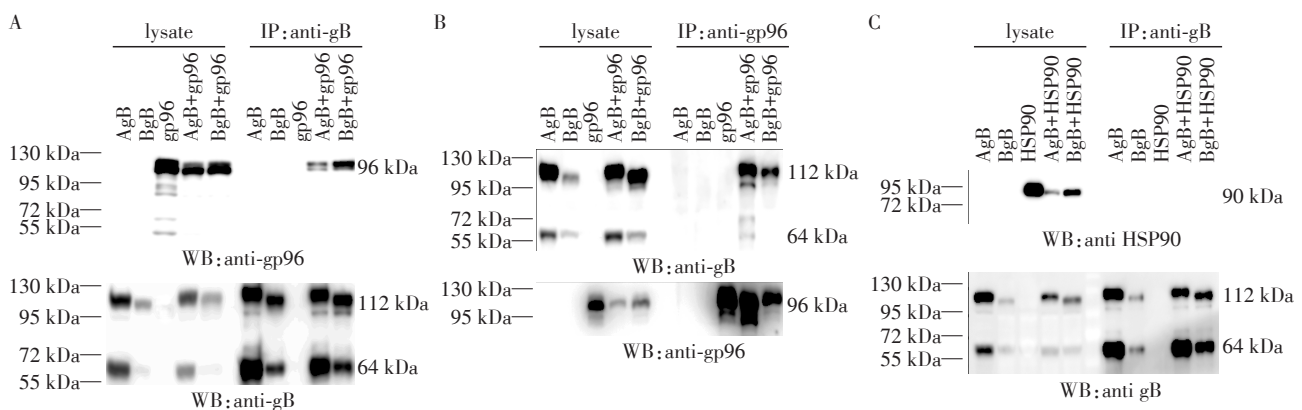
## 2 结果

### 2.1 验证 gB 和 gp96 特异性结合

已有文献报道,HHV-6 病毒粒子与 gp96 相互作用<sup>[14]</sup>。我们通过质粒共转的方式,寻找与 gp96 相互作用的病毒蛋白。当 gp96 表达质粒与 AgB 或 BgB 共转时,通过免疫共沉淀和蛋白质印迹发现,gp96 与 HHV-6A 和 HHV-6B 的 gB 相互作用(如图 1A、B 所示);而 HSP90(gp96 蛋白的细胞质同源物)与 gB 不能相互作用(如图 1C 所示),进一步证实了 gB 和 gp96 的相互作用是特异性的。

### 2.2 gB 和 gp96 在感染细胞中共定位

在 HHV-6 感染的 HSB2 细胞,激光共聚焦显微镜观察发现 gB 和 gp96 这两种蛋白在感染细胞中存在共定位现象(图 2),并且 gB 和 gp96 聚集于细胞表



A: 使用抗 gB 抗体进行免疫共沉淀实验,验证 gB 和 gp96 相互作用;B: 使用抗 gp96 抗体进行免疫共沉淀实验,验证 gB 和 gp96 相互作用;C: 使用抗 gB 抗体进行免疫共沉淀验证 HSP90 和 gp96 没有相互作用。

图 1 通过免疫共沉淀确认 HHV-6 gB 与 gp96 特异性结合

Figure 1 The interaction between HHV-6 gB and gp96 confirmed by immunoprecipitation assay

面的某个点上,这一现象可能与 gB 蛋白的成熟和释放相关,为此随后检测 gp96 是否会影响 gB 蛋白的成熟。

### 2.3 gp96 影响 gB 成熟

HHV-6 gB 糖蛋白带有 furin 蛋白酶切割位点,其成熟是伴随着在高尔基体中被 furin 蛋白酶剪切。有文献表明,在 293T 细胞中过表达 gB 蛋白时,gB 蛋白会分泌到外泌体中<sup>[20]</sup>。本研究也发现 293T 细胞仅表达 HHV-6 gB 时,gB 能够被分泌到细胞外泌体中;而当共转 gB 和 gp96 时,细胞中 64 kDa 左右的 gB(即从内质网转运至高尔基体内,并被 furin 剪切的 gB)含量减少,可以初步认为 gp96 影响了 gB

的成熟;随后在检测外泌体中的 gB 时,也发现了相同的现象(图 3)。综合上述实验,认为 gp96 蛋白会影响 gB 蛋白的成熟。

## 3 讨论

HHV-6 与多种临床疾患相关,最近研究亦表明其与阿尔茨海默病相关<sup>[21]</sup>,近年来越来越被重视。在病毒入侵宿主过程中,病毒因子和宿主蛋白发生广泛且复杂的相互作用,研究病毒蛋白和宿主蛋白的相互作用对于揭示病毒在宿主体内的复制及调控机制具有重要意义,并且其研究结果还将对病毒感染的治疗有一定指导意义。

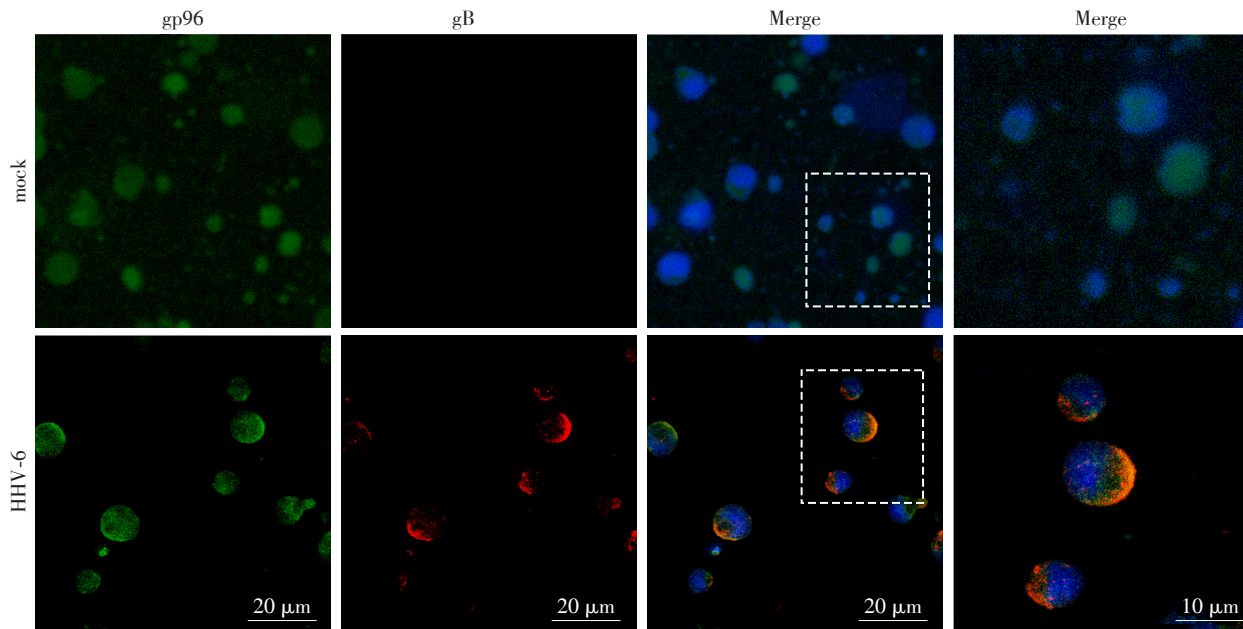


图2 gp96与HHV-6 gB在感染细胞中的共定位

Figure 2 Co-localization of HHV-6 gB and gp96 in HHV-6 infected cells

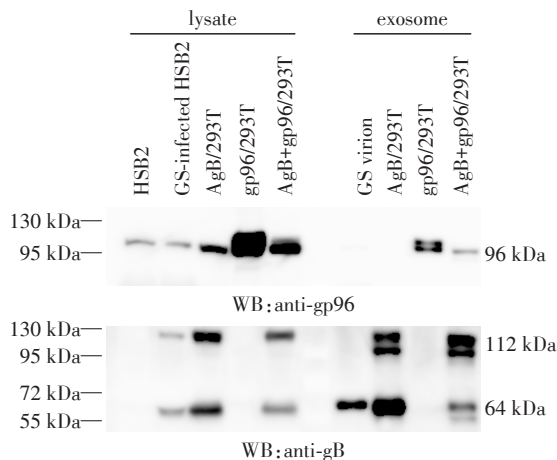


图3 Gp96影响HHV-6 gB的成熟

Figure 3 gp96 affects maturation of HHV-6 gB

已有文献报道 gp96 可以和 HHV-6 病毒粒子结合,但具体和哪一种蛋白结合并未被阐明。本研究免疫共沉淀技术发现 gB 和 gp96 特异性结合,但不能与 gp96 的细胞质同源物 HSP90 相互作用。HHV-6 gB 糖蛋白在感染过程中至关重要,至今仍未有其受体被报道。尽管 gp96 蛋白主要限制表达于内质网中,但其亦表达于 HHV-6 易感细胞表面。gp96 很可能在病毒入侵和(或)病毒复制过程中起作用。本研究重点关注了其在病毒复制过程中的作用,发现 gp96 蛋白的高表达会影响 HHV-6 gB 蛋白的成熟, gp96 蛋白很可能为细胞的抗病毒感染因子。

本研究证明了 gB 和 gp96 两种蛋白间存在相互

作用,但其具体结合机制及其在 HHV-6 病毒入侵细胞过程中的详细作用有待进一步研究。此外,已有研究表明 HHV-6 gB 糖蛋白是该病毒疫苗的候选抗原<sup>[22]</sup>,而 gp96 蛋白能促进诱导细胞免疫,故联合 HHV-6 gB 抗原/gp96 蛋白佐剂研发 HHV-6 疫苗,具有研究意义和价值。

[参考文献]

- [1] 王金凤,顾 斌,李 猛,等. 稳定表达人类疱疹病毒6型U94基因血管内皮细胞株的建立及U94对内皮细胞增殖和血管生成能力的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2013,33(8):1027-1033
- [2] Nagamata S, Nagasaka M, Kawabata A, et al. Human CD134(OX40) expressed on T cells plays a key role for human herpesvirus 6B replication after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. J Clin Virol, 2018, 102:50-55
- [3] Wakata A, Kanemoto S, Tang H, et al. The neutralizing linear epitope of human herpesvirus 6A glycoprotein B does not affect virus infectivity [J]. J Virol, 2018, 92 (5) : e02017-e02074
- [4] Ongradi J, Ablashi DV, Yoshikawa TA, et al. Roseolovirus-associated encephalitis in immunocompetent and immunocompromised individuals [J]. J Neurovirol, 2017, 23 (1):1-19
- [5] Azab W, Osterrieder K. Initial contact: the first steps in herpesvirus entry [J]. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2017, 223:1-27

- [6] Sathiyamoorthy K, Chen J, Longnecker RA. The complexity in herpesvirus entry [J]. *Curr Opin Virol*, 2017, 24: 97-104
- [7] Arii J, Goto H, Suenaga T, et al. Non-muscle myosin II A is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1 [J]. *Nature*, 2010, 467(7317): 859-862
- [8] Satoh T, Arii J, Suenaga T, et al. PILR alpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B [J]. *Cell*, 2008, 132(6): 935-944
- [9] Isaacson MK, Feire AL, Compton T. Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling [J]. *J Virol*, 2007, 81(12): 6241-6247
- [10] Soroceanu L, Akhavan A, Cobbs CS. Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection [J]. *Nature*, 2008, 455(7211): 391-395
- [11] Cairns TM, Fontana J, Huang ZY, et al. Mechanism of neutralization of herpes simplex virus by antibodies directed at the fusion domain of glycoprotein B [J]. *J Virol*, 2014, 88(5): 2677-2689
- [12] Chou S, Marousek GI. Homology of the envelope glycoprotein B of human herpesvirus-6 and cytomegalovirus [J]. *Virology*, 1992, 191(1): 523-528
- [13] Stangherlin LM, De Paula FN, Icimoto MY, et al. Positively selected sites at HCMV gB furin processing region and their effects in cleavage efficiency [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 934
- [14] Prusty BK, Siegl C, Gulve N, et al. GP96 interacts with HHV-6 during viral entry and directs it for cellular degradation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e113962
- [15] Sedlacek AL, Kinner-Bibeau LB, Binder RJ. Phenotypically distinct helper NK cells are required for gp96-mediated anti-tumor immunity [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29889
- [16] Cosin-Roger J, Spalinger MR, Ruiz PA, et al. Gp96 deficiency affects TLR4 functionality and impairs ERK and p38 phosphorylation [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0193003
- [17] Wu B X, Hong F, Zhang Y, et al. GRP94/gp96 in cancer: biology, structure, immunology, and drug development [J]. *Adv Cancer Res*, 2016, 129: 165-190
- [18] Tanaka T, Okuya K, Kutomi G, et al. Heat shock protein 90 targets a chaperoned peptide to the static early endosome for efficient cross-presentation by human dendritic cells [J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(1): 18-24
- [19] Kinner-Bibeau LB, Sedlacek AL, Messmer MN, et al. HSPs drive dichotomous T-cell immune responses via DNA methylome remodelling in antigen presenting cells [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15648
- [20] Zeev-Ben-Mordehai T, Vasishtan D, Duran AH, et al. Two distinct trimeric conformations of natively membrane-anchored full-length herpes simplex virus 1 glycoprotein B [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(15): 4176-4181
- [21] Readhead B, Haure-Mirande JV, Funk CC, et al. Multi-scale analysis of independent Alzheimer's cohorts finds disruption of molecular, genetic, and clinical networks by human herpesvirus [J]. *Neuron*, 2018, 99(1): 64
- [22] Mahmoud NF, Jasirwan C, Kanemoto S, et al. Cytoplasmic tail domain of glycoprotein B is essential for HHV-6 infection [J]. *Virology*, 2016, 490: 1-5

[收稿日期] 2018-10-16

(上接第 1308 页)

- with inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(7): 1620-1632
- [20] Fitton JH. Therapies from fucoidan: multifunctional marine polymers [J]. *Mar Drugs*, 2011, 9(10): 1731-1760
- [21] Koetzner L, Grover G, Boulet J, et al. Plant-derived polysaccharide supplements inhibit dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat [J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(5): 1278-1285
- [22] Ehrenpreis ED, Habib I, Mazulis A, et al. Cytokines and chemokines in mucosal homeostasis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21(7): E12
- [23] 王希, 廖吕钊, 江荣林. 肠上皮细胞紧密连接蛋白的结构功能及其调节 [J]. *浙江医学*, 2018, 40(8): 895-898
- [24] Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(27): 4280-4288
- [25] Park J, Cha JD, Choi KM, et al. Fucoidan inhibits LPS-induced inflammation *in vitro* and during the acute response *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 43: 91-98
- [26] Shi H, Chang Y, Gao Y. Dietary fucoidan of *Acaudina molpadioides* alters gut microbiota and mitigates intestinal mucosal injury induced by cyclophosphamide [J]. *Food Funct*, 2017, 8(9): 3383-3393

[收稿日期] 2019-01-05