

抗菌肽 urumin 与甲型流感病毒 H1N1 HA 蛋白的相互作用研究

李红梅¹, 郑伟娟¹, 李家璜^{1,2,3*}, 华子春^{1,2,3*}

(1. 南京大学生命科学学院, 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210023; 2. 中国药科大学生物药物学院, 江苏 南京 211198; 3. 常州南京大学高新技术研究院和江苏靶标生物医药研究所, 江苏 常州 213164)

摘要: 甲型 H1N1 流感严重影响人类的健康和破坏全球经济发展, 抗菌肽 urumin 可特异性结合 H1N1 病毒血凝素 (hemagglutinin, HA) 蛋白的保守茎部, 但其结合位点和作用机制尚不明确。本研究通过分子对接和 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 实验研究 urumin 与 HA 蛋白作用可能的结合位点、关键氨基酸, 提示 HA 残基 His32 (HA1)、Asp19 (HA2) 和 Trp21 (HA2) 是 HA 与 urumin 作用的关键残基。Urumin 的 Arg4、Asn9 和 Cys16 与 HA 蛋白残基 Asp19 (HA2)、Trp21 (HA2)、His32 (HA1) 和 Asn53 (HA2) 形成氢键相互作用, Trp12 与 HA 的 His32 (HA1) 形成芳香 π 堆积作用, 维持 urumin 与 HA 蛋白的结合。在 293T 细胞中表达野生型 HA 及其丙氨酸突变体 [丙氨酸替换 His32 (HA1)、Asp19 (HA2) 和 Trp21 (HA2)], ELISA 实验结果显示, urumin 与野生型 HA 的亲合力显著高于 HA 丙氨酸突变体, 提示 His32 (HA1)、Asp19 (HA2) 和 Trp21 (HA2) 可能是 HA 与 urumin 作用的关键残基。本研究为 urumin 的进一步改造和应用提供了理论和实验基础。

关键词: urumin 多肽; H1N1 病毒; 血凝素; 分子对接模拟; 结合位点

中图分类号: R915 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2553-08

Interaction study of the antibacterial peptide urumin with the H1N1 HA protein of influenza A virus

LI Hong-mei¹, ZHENG Wei-juan¹, LI Jia-huang^{1,2,3*}, HUA Zi-chun^{1,2,3*}

(1. State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China; 2. College of Biopharmaceuticals, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 3. High-tech Research Institute of Nanjing University at Changzhou and Jiangsu Target Pharma Laboratories Inc., Changzhou 213164, China)

Abstract: Influenza A virus (H1N1) seriously affects the health of human and disrupts the development of global economic. The antimicrobial peptide urumin specifically binds to the conserved stem of the hemagglutinin (HA) protein of H1N1 virus, but its binding site and the mechanism of action are not clear. In this study, we investigated the possible binding sites and key amino acids for the interaction of urumin with HA protein by molecular docking and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) experiments, suggesting that HA residues His32 (HA1), Asp19 (HA2), and Trp21 (HA2) are the key residues for the interaction of HA with urumin. Urumin's Arg4, Asn9, and Cys16 were associated with HA protein residues Asp19 (HA2), Trp21 (HA2), His32 (HA1), and Asn53 (HA2) form hydrogen bonding interactions, and Trp12 forms an aromatic π -stacking interaction with His32 (HA1) of HA, these interactions maintain the binding of urumin to HA protein. Wild-type HA and its alanine mutant [alanine substitutions His32 (HA1), Asp19 (HA2), and Trp21 (HA2)] were expressed in 293T cells. ELISA experiments showed that the affinity ability of urumin with HA wild-type was significantly higher than that of HA alanine

收稿日期: 2021-04-06; 修回日期: 2021-05-16.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81630092); 江苏省前沿引领技术基础研究专项 (BK20192005).

*通讯作者 Tel: 86-25-86185986, E-mail: lijh8075@sina.com;

Tel: 86-25-83324605, E-mail: zchua@nju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0483

mutant, suggesting that His32 (HA1), Asp19 (HA2), and Trp21 (HA2) may be the key residues for HA to interact with urumin. This study provides a theoretical and experimental basis for further modification and application of urumin.

Key words: urumin peptide; H1N1 virus; hemagglutinin; molecular docking simulation; binding site

甲型H1N1流感是全世界季节性流感的主要类型^[1],严重影响人类健康,破坏全球经济发展^[2]。血凝素(hemagglutinin, HA)蛋白是甲型流感病毒的表面糖蛋白^[3],是重要的表面抗原,在病毒表面以三聚体形式存在^[4]。HA蛋白在低pH条件下发生构象重排与膜融合^[5],通过病毒膜与细胞内膜的融合帮助病毒基因组进入宿主细胞^[1,6]。HA前体HA0通过蛋白水解酶裂解,形成以二硫键连接的两个亚基:HA1(327个氨基酸)和HA2(222个氨基酸)。HA可分为两个结构域(图1):膜-远端球形结构域(包括HA1的8个β-折叠和暴露的无规卷曲)^[7]和膜-近端茎结构域(包括HA1的部分氨基酸以及全部的HA2),头部为可变区,茎部为保守区^[4,8,9]。

疫苗是预防流感病毒的有效对策,但由于抗原漂移,不能预防新的大流行毒株^[10]。目前FDA(Food and Drug Administration)批准的临床用药多为神经氨酸酶抑制剂^[11]和基质蛋白抑制剂^[12],但已开始产生耐药问题;HA蛋白是开展流感病毒药物研发的重要靶点^[12]。抗菌肽具有广泛的抗菌性能^[13,14],动物来源的抗菌肽对人类的多种病毒具有新疗效^[15]。Urumin是从印度蛙皮肤中提取的抗菌肽,由27个氨基酸残基构成(氨基酸序列:

1-IPLRGAFINGRWD SQCHRFSNGAIACA-27)^[16]。研究发现,urumin可与甲型H1N1 HA蛋白的茎部保守区作用,有效中和H1N1流感病毒,破坏流感病毒结构,保护小鼠免受致命感染;研究还发现urumin对H1N1流感株的作用明显大于H3N2流感株^[16]。然而,urumin与HA蛋白确切的结合位点和作用机制尚不明确,限制了其进一步的应用和开发。本文利用分子模拟方法预测多肽urumin与HA的作用模式,并在293T细胞中表达HA蛋白,验证了预测的urumin多肽与HA的相互作用和结合位点。本研究为特异性抗流感病毒的药物开发提供一定的理论和实验基础。

材料与方法

计算方法

结构的获得和多肽结构预测 H1N1 HA和H3N2 HA的X-ray结构分别从PDB蛋白质数据库获得,PDB ID分别为1RU7(H1N1 HA)和4WE4(H3N2 HA)。利用在线软件Psipred(<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/CABSdock/>)、SOPMA、Hierarchical Neural Network、DPM、DSC、GOR4、PHD、SIMP A96、SOPMA-GOR4-SIMP A(<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>)和Jpred4([A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 HA:

```

A A D A D T I C I G Y H A N S T D T V D I V L E K N Y T V T H S Y N L L E D S H N G K L C R L E G I A F L Q L G K C N I A G W L L
G N F E C D P L L F Y R S W S Y I V T F N S E N G I C Y P G D F I D Y E E L R R Q L S S V S E E R F E I F F K S S W P N H N Y
N G V T A A C S H E G K S S F Y R N L L W L T E K E G S Y P K L N S Y N K R G K E Y L V L W G I H H P F N S K E Q Q N L Y Q N E
N A Y S V V T S N Y N R R F T F I A E R P K V R D Q A G R M N Y W T L L K F G D T I I F A N G S L I A P M Y A F A L S R G F
G S G I I T S N A S M H E C N Y K C Q T P L G A I N S S L F Y Q N I H P Y T I G E C P K Y R S A K L R M V T G L R N I F E I Q S R
G L F G A I A G Y I E G G W T G M I D G W Y G Y H H Q N E G G S G Y A A D Q K S T Q N A I N G I T N K Y N T V I E K M N I Q F T A V
G K E F N K L E K R M E N L N K K Y D D G F L D I W T Y N A E L L V L L E N E R T L D F H D S N V K N L Y E K V K S Q L K N N A K E
I G N G C F E Y Y H K C D N E K M E S Y R N G Y D Y P K Y S E E S K L N R R K V D G V K L E S M G I Y Q I L A I Y S T V A S S L Y
L L V S L G A I S F W M C S N G S L Q C R I C I
    
```](http://</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

Figure 1 Sequence and schematic structure of H1N1 hemagglutinin (HA) protein (PDB ID: 1RU7)

www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4) 预测 urumin 二级结构, PEP-FOLD 3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>) 预测三级结构。

HA 与 urumin 结合区域的筛选 综合分析已报道的与 HA 茎部作用的药物的结合方式。Ekiert 等^[17]研究发现, 广泛中和抗体 CR6261 可结合 HA1 和 HA2 膜近端茎中高度保守的螺旋区; Fleishman 等^[18]以位于 HA2 上 Asp19 和 Trp21 为结合位点设计的蛋白 HB36 和 HB80 能与 H1 和 H5 结合, 具有良好的亲和力; Kadam 等^[19]根据广泛中和抗体 (FI6v3 和 CR9114) 的互补决定区 (CDR) 环的针对 HA 近膜端茎区而设计得到的多肽 P6 和 P7 表现出对 H1N1、H5N1 等甲型流感病毒的良好中和力。上述研究中的蛋白或多肽都结合在 HA 茎部保守区, 与 urumin 相似, 而这些抗体或多肽的结合位点都包括了 HA2 亚基上的 Asp19 和 Trp21 残基, urumin 是否也可能作用在此区域? 由此, 以 HA 的 Asp19 (HA2) 和 Trp21 (HA2) 所在区域为出发点, 对接 urumin。

分子对接 采用 MOE2019.01 软件进行分子对接, MOE2019.01 和 Discovery studio 2019 Client 软件分析结构。在分子对接前, 删除所有水分子和小分子配体, 修补侧链, 加氢原子, 加电荷, 力场采用 Amber10: EHT。对蛋白结构进行能量优化 (参数默认)。多肽与 HA 的对接采用 Protein-Protein Dock, 最大迭代次数 1 000, 其他参数默认。

试剂和材料 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、293T 细胞和质粒载体 pCAGGS-Myc tag (南京睿博文生物科技有限公司); pET30a-HA 质粒 (来源于扬州大学^[20]); EcoRI 酶、XhoI 酶、T4 连接酶和引物 (上海生工生物工程股份有限公司); M5 HiPer Site-Directed Mutagenesis Kit 超高效点突变试剂盒 (南京命之源医疗器械有限公司); 琼脂糖 [翌圣生物科技 (上海) 有限公司]; 免疫荧光一抗 Myc-Tag (71D10) Rabbit mAb 和二抗 Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 594 Conjugate) (上海优宁维生物科技股份有限公司); SPECTRAPLATE-96 HB/50C 孔板 (PerkinElmer 6005600); Urumin 多肽及乱序多肽 (disordered peptide) (杭州丹港生物科技有限公司合成); ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 包被液 (1.59 g·L⁻¹ Na₂CO₃、2.94 g·L⁻¹ NaHCO₃, pH 9.6)、封闭液 [3% BSA (bovine serum albumin), PBST (phosphate buffered saline tween)] 和 ELISA 抗体 Myc-Tag (19C2) Antibody (HRP conjugated) (南京沃博生物科技有限公司); TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 南京慧杰诚生物科技有限公司)。

构建质粒 将 pCAGGS-Myc tag 和 pET30a-HA 质粒用 EcoRI 酶、XhoI 酶进行双酶切, 回收 pCAGGS-Myc

载体片段和 HA 片段, 用 T4 连接酶连接, 得到质粒 pCAGGS-HA。设计定点突变引物 (表 1), 以 pCAGGS-HA 质粒为模板, 扩增得到表达 HA 突变体 (D19A-W21A-H32A) 的质粒 pCAGGS-HA-mutate。PCR 程序: 95 °C 30 s, (95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 5 min) × 30 循环, 72 °C 10 min。各取上述 pCAGGS-HA、pCAGGS-HA-mutate 质粒用 EcoRI 酶和 XhoI 酶进行双酶切后, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 验证片段大小, 将质粒转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序进行验证。

Table 1 Primer sequences

| Primer | Sequence (5'-3') |
|------------|---|
| H32-A-F | GAATGTAACAGTAACA <u>gc</u> CTCTGTTAACCTTCT
AGAAGAC |
| H32-A-R | GTCTTCTAGAAGGTTAACAGAG <u>gc</u> TGTTACTGT
TACATTC |
| D19W21-A-F | GTGGACAGGGATGGTAG <u>ca</u> GGA <u>gc</u> GTACGGTTA
TCACCATC |
| D19W21-A-R | GATGGTGATAACCGTAC <u>gc</u> TCC <u>tg</u> CTACCATCCC
TGTCCAC |

免疫荧光检测 HA 蛋白在 293T 细胞中的表达 转染质粒至 293T 细胞, 免疫荧光检测蛋白质表达情况: 12 孔板每孔转染质粒 0.5 μ g, 48 h 后弃培养液, PBS (phosphate buffered saline) 洗 3 次。4% 多聚甲醛室温孵育 1 h 后, 洗 3 次。每孔加入 0.5% TritonX-100 PBS, 室温 45 min, PBS 洗 3 次。加入 3% BSA PBST, 室温 2 h, 弃去孔内液体。3% BSA PBST 配制一抗稀释液 (1:200), 4 °C 过夜。室温 40 min 复温, PBST 洗 3 次。3% BSA PBST 配制二抗稀释液 (1:1 000), 室温避光 1 h, PBST 洗 3 次。加入 DAPI [2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride] 后, 加抗荧光淬灭封片剂制片, 用荧光显微镜 (德国 ZEISS 公司) 检测蛋白质在细胞中的表达。

ELISA 检测 HA 蛋白与多肽结合作用 反复冻融获得细胞裂解上清: 胰酶消化收集转染 48 h 后的细胞悬液, 4 °C、3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, PBS 洗 2 次后, 用含蛋白酶抑制剂的 PBS (10 μ L·mL⁻¹) 重悬细胞。反复冻融 (-80 °C 10 min, 37 °C 5 min), 重复 3 次。4 °C、10 000 \times g 离心 15 min, 收集上清液。

多肽包被效率的测定按照如下方法: urumin 多肽以及乱序多肽均带有 N 端 FITC (fluorescein isothiocyanate) 标记, 两种多肽用包被液稀释成 10 μ g·mL⁻¹, 加入 96 孔板中 (每孔 100 μ L), 每个样品 6 个复孔, 4 °C 过夜包被。次日, 每个样品的前 3 个孔用 PBST 洗 3 次, 每次 5 min, 然后加入 PBST, 后 3 个孔不做处理。在酶标仪上检测清洗后的多肽荧光值与原多肽溶液的荧光值 (激发光 485 nm, 发射光 528 nm), 测定包被效率 (包被效率 =

包被过夜清洗后多肽的荧光值 / 原多肽溶液过夜后荧光值 $\times 100\%$ 。

多肽用包被液稀释成 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 加入 96 孔板中 (每孔 $100 \mu\text{L}$), 4°C 过夜。加入 PBST 洗涤液静置 5 min, 洗 3 次后, 每孔加入封闭液, 在 37°C 下孵育 3 h, 洗 3 次。BSA 法定量细胞裂解液中总蛋白浓度为 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 在 96 孔板第 1 列中加入样品稀释液 (PBS 稀释), 依次进行 2 倍梯度稀释 (每孔总量 $100 \mu\text{L}$), 37°C 下孵育 1.5 h, 洗 3 次后, 加入抗体 ($1:5000$), 37°C 孵育 1 h, 洗 3 次。加入 TMB 溶液, 室温避光静置 10 min。每孔加入 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ 终止液, 酶标仪 (美国 Bio Tek 公司) 测定 450 nm 的吸光度值。

统计学分析 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据比较采用学生 t 检验 (student's t test); $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义, 相关分析采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行。

结果

1 Urumin 的结构主要以无规卷曲为主

Urumin 预测的二级结构见表 2。利用 10 种方法预测的结果表明, urumin 的二级结构主要以无规卷曲为主, 在溶液中可能有多变的构象。图 2 显示了 PEP-FOLD 3 预测的 urumin 结构, 结合二级结构的预测, 选择 5 个能量低的结构 (mode 1~model 5) (其中 model 3 中 Cys16-Cys26 形成二硫键) 作为 urumin 结构进行分子对接。

2 Urumin 与 HA 蛋白作用模式

分子对接结果表明: urumin 能较好地结合在 HA 蛋白 HA2 链的 Asp19 和 Trp21 所在的区域 (图 3A)。利用 MOE 软件的 PLIF 分析功能, 统计对接得到的能量较低的前 100 个复合物中的与 urumin 形成相互作用的 HA 氨基酸的频率。结果显示, HA1 链中 His32 残基是 HA 上与 urumin 作用频率最高的氨基酸, 占 17%, 可能是 HA 与 urumin 作用的关键氨基酸。HA 蛋白质的残基 His32 (HA1) 与 Asp19 (HA2) 和 Trp21 (HA2) 空间上相互接近, 推测这 3 个氨基酸所在的位置是 HA 与

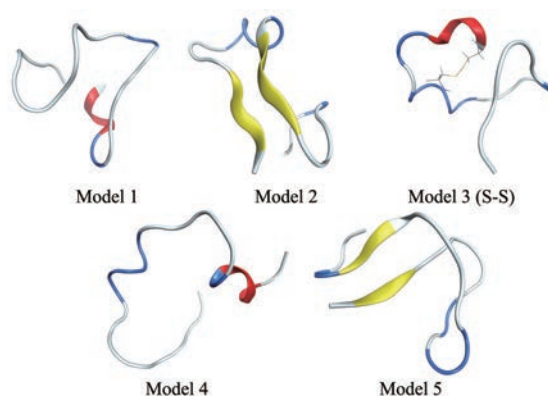


Figure 2 The 5 lowest energy 3D structures of urumin obtained by prediction

urumin 作用的关键位点。

结果还显示, urumin 与 H1N1 HA 的结合亲和力高于 H3N2 HA, 即 urumin 与 H1N1 HA 对接结合能的负绝对值显著高于 H3N2 HA (图 3B), 这与已报道的实验结果相一致^[16]。

图 4 展示了 urumin 与 HA 的能量最优的结合模式。Urumin 结合于 HA 茎部的一段疏水区域 (图 4A, 绿色区域)。抗菌肽 urumin 的 Arg4 和 Arg11 可分别与 HA 蛋白氨基酸 Asp19 (HA2) 和 Asp18 (HA1) 形成盐键; urumin 残基上的多个残基能够与 H1N1 HA 氨基酸残基形成氢键相互作用, 包括 Asn9-Trp21 (HA2)、Gly10-Thr31 (HA1)、Arg11-Ser33 (HA1)、ASP13-Val34 (HA1)、Cys16-His32 (HA1)、Cys16-Asn53 (HA2)、His17-Asn53 (HA2)、Ser20-Thr49 (HA2) 和 Ser20-Asn53 (HA2) 之间。这些作用维持了 urumin 与 HA 蛋白的结合。此外, 观察到 urumin 的 Trp12 与 His32 (HA1) 侧链环之间形成芳香 π 堆积作用, 可能是 urumin 与 HA 结合的关键作用 (图 4B)。

3 质粒构建与成功表达 HA 蛋白

为了确定 HA 蛋白的氨基酸 His32 (HA1)、Asp19 (HA2) 和 Trp21 (HA2) 是否是 urumin 结合位点的关键氨基酸。首先分别构建了野生型 HA (pCAGGS-HA) 和上述 3 个氨基酸的丙氨酸突变体的 HA 表达质粒

Table 2 Predicted secondary structure of urumin. C: Coil; E: Sheet; T: Turn; H: Helix

| Number | Method | Prediction result |
|--------|-----------------------------|----------------------------|
| 1 | Psipred | CCCCEEECCCCCCCCCCCEEEEC |
| 2 | SOPMA | CCCCEEEETTCCCCCCCCCTCEHH |
| 3 | Hierarchical Neural Network | CCCCEEECCCCCCCCCCCEEEEC |
| 4 | SOPMA-GOR4-SIMPA | CCCCEEECCCCCCCCCCCEEEEC |
| 5 | DPM | CCHHCHEETCCCTCHHTCHTCHHHCC |
| 6 | DSC | CCCCEEECCCCCCCHHCCCCCCCC |
| 7 | GOR4 | CCCCEEECCCCCCCEEECEEEEC |
| 8 | PHD | CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEC |
| 9 | SIMPA96 | CCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEC |
| 10 | Jpred4 | CCCCEECCCCCCCEEECCCEEEEC |

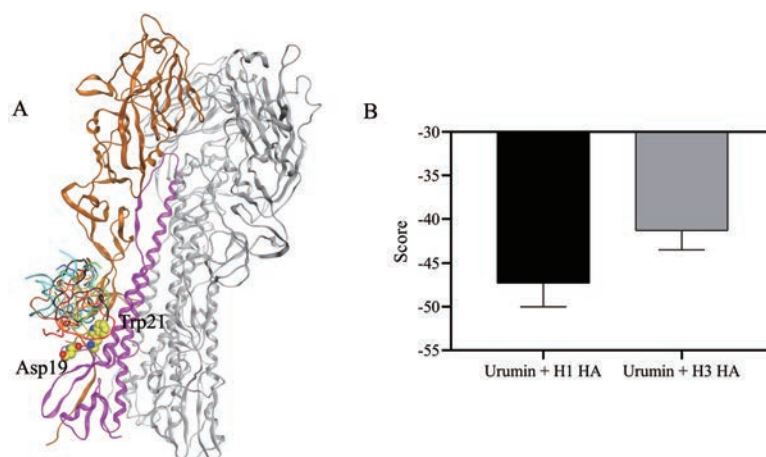


Figure 3 Molecular docking results of urumin and H1N1 HA protein (more negative score value means better docking match). A: Urumin binds to the region of the HA protein HA2 chain where Asp19 and Trp21 are located; B: Docking results of urumin and H1 HA/H3 HA at the sites of HA2 (Asp19 and Trp21)

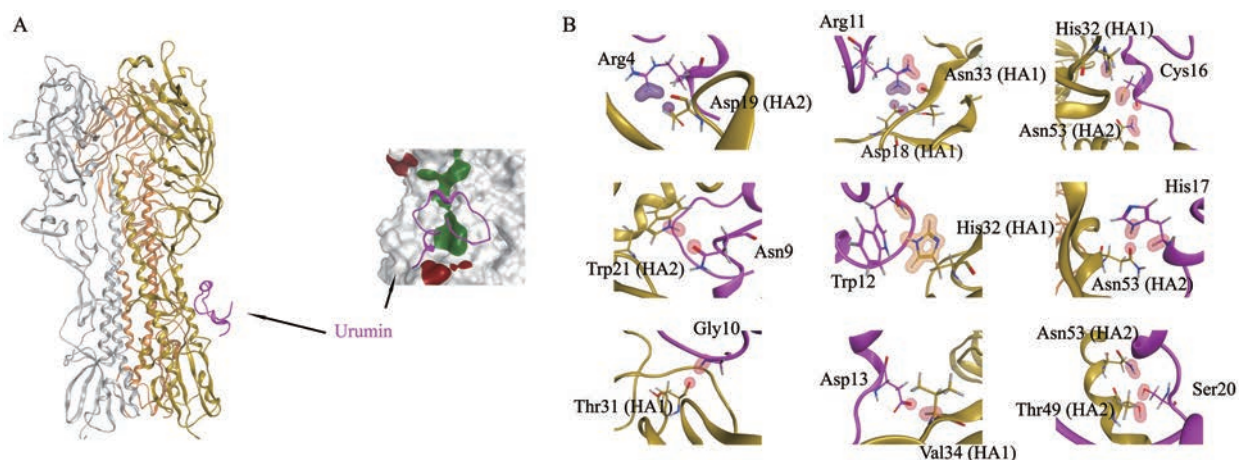


Figure 4 Optimized model for the interaction of urumin with HA. A: Binding site between urumin and H1N1 HA. The green area indicates the hydrophobic region on the surface of HA protein, the red area is the negatively charged region on the surface of HA protein, the purple band is the urumin; B: Interaction of urumin with H1N1 HA. The red, purple, or orange translucent cylinder indicates the hydrogen bonding interaction, the coexistence of hydrogen bonding and charge interaction, or the directional π -stacking interaction, respectively

(pCAGGS-HA-mutant)。质粒经 EcoRI 酶和 XhoI 酶双酶切后的电泳图显示了 pCAGGS 载体片段条带, 以及 HA 和 HA-mutate 片段条带, 条带大小正确 (图 5A), 且测序得到的序列比对结果显示 3 个氨基酸都已成功突变为丙氨酸, 表明突变体质粒构建成功 (图 5B)。将质粒转染至 293T 细胞中, 免疫荧光结果表明, 相比较空载质粒 (pCAGGS), 野生型 HA 蛋白以及丙氨酸突变体 HA-mutate 蛋白都有明显表达, 且表达水平相当 (图 6)。

4 Urumin 能与 HA 结合且亲和力显著高于 HA 丙氨酸突变体

为了验证 HA 蛋白与 urumin 的结合作用以及结合位点的关键氨基酸是否正确, 采用 ELISA 方法检测 urumin 与 HA 蛋白 (细胞裂解上清) 的结合。

乱序多肽 (利用 www.novopro.cn/tools/shuffle_

protein 获取 urumin 的随机打乱序列: PSRAQCAIFD-SIAGNAHGCIRRNLGWF) 作为阴性对照, 探究 HA 和 urumin 的结合作用。多肽的包被效率的测定结果显示: urumin 多肽以及乱序多肽两种多肽的包被效率基本一致, 两组的包被效率没有统计学差异 ($P < 0.05$) (图 7A)。ELISA 实验结果表明, urumin 与 HA 组的作用明显高于乱序多肽组 ($P < 0.05$), 结果证明细胞裂解上清中的 HA 与 urumin 之间具有特异性结合作用 (图 7B)。

空载质粒 (pCAGGS) 不表达 HA 蛋白, ELISA 检测结果发现, pCAGGS-HA 组与 urumin 的作用显著高于空载组 ($P < 0.05$), 表明 urumin 与 HA 蛋白具有较好的亲和力。pCAGGS-HA-mutate 组表达的 HA-mutate 蛋白的 3 个关键氨基酸突变成了丙氨酸。ELISA 检测

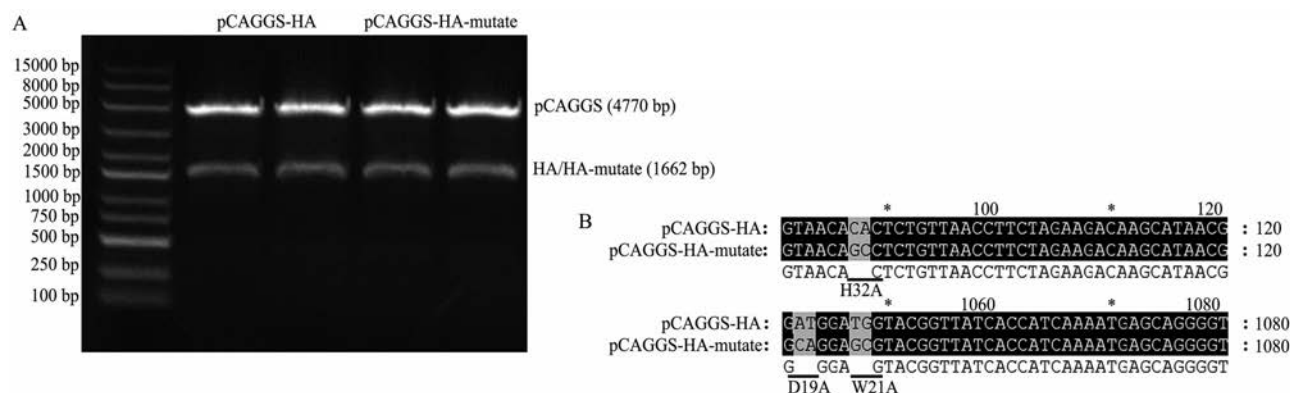


Figure 5 Construction and confirmation of pCAGGS-HA and pCAGGS-HA-mutate recombinant plasmids. A: Agarose gel electrophoresis of pCAGGS-HA and pCAGGS-HA-mutate recombinant plasmids after double digestion by EcoRI and XhoI restriction endonucleases; B: Comparison of sequencing results of pCAGGS-HA and pCAGGS-HA-mutate recombinant plasmids, the results showed that the mutant plasmid was successfully constructed

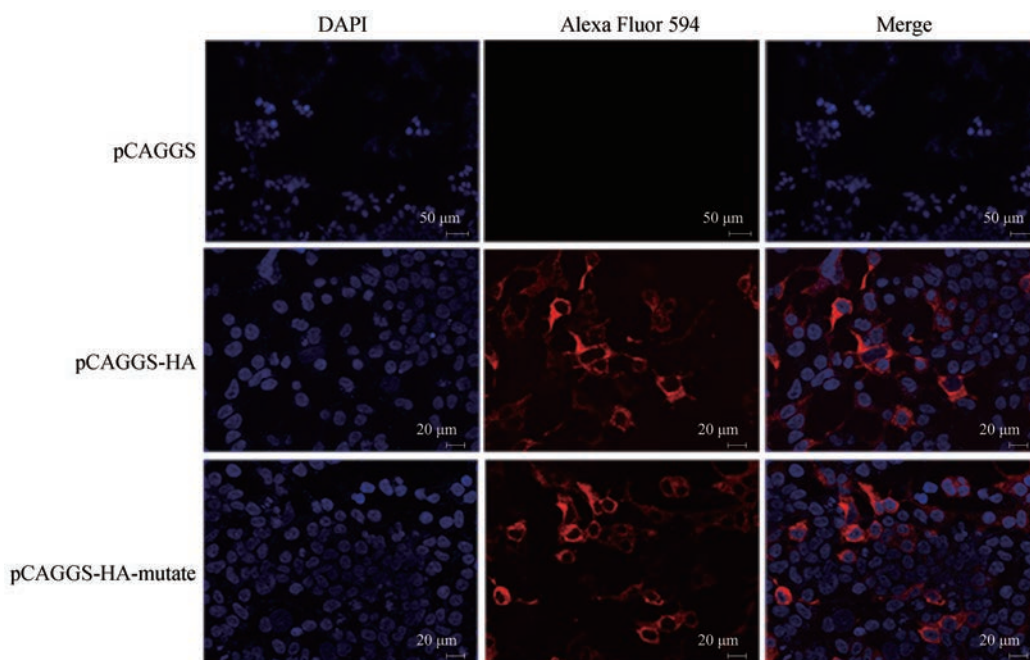


Figure 6 Immunofluorescent detection of HA protein expression in 293T cells, the expression levels of wild-type HA proteins as well as HA-mutate proteins were comparable. Scale bar: 20 or 50 μm. DAPI: 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride

结果发现, Urumin 与 pCAGGS-HA 组的作用明显高于 pCAGGS-HA-mutate 组 ($P < 0.05$), 即表明 HA 蛋白突变后与 urumin 的结合作用明显减弱 (图 7C)。以上结果表明, His32 (HA1)、Asp19 (HA2) 和 Trp21 (HA2) 是 HA 与 urumin 结合位点中的关键氨基酸。

讨论

抗菌肽是天然存在的、高度保守的天然免疫肽, 对革兰阴性和革兰阳性细菌、病毒和真菌具有广泛的抗菌活性^[14]。抗菌肽的分子结构、生物活性和作用机制以及它们之间的相互关系是目前抗菌肽研究的热点^[21]。

抗流感病毒肽的作用机制通常分为 3 类: ① 通过干扰病毒聚合酶抑制病毒复制的肽, 如一种设计用于结合和阻止蛋白质相互作用的抑制性肽^[22]; ② 利用静电相互作用破坏膜的肽, 如人类 cathelicidin LL-37^[23]; ③ 与 HA 相互作用以阻断病毒融合和进入的多肽, 如来源于成纤维细胞生长因子 4 的信号序列^[24]。Urumin 对 H1N1 甲型流感病毒具有杀灭作用, 能够特异性地作用于 H1 HA 保守茎部^[16]。但是具体结合位点以及作用机制不明。与 urumin 作用类似, Fleishman 等^[18]设计的 HB80 也能作用在 HA 蛋白茎部保守区域, HB80 能够抑制低 pH 条件诱导的 HA 融合构象变化; Kadam 等^[19]

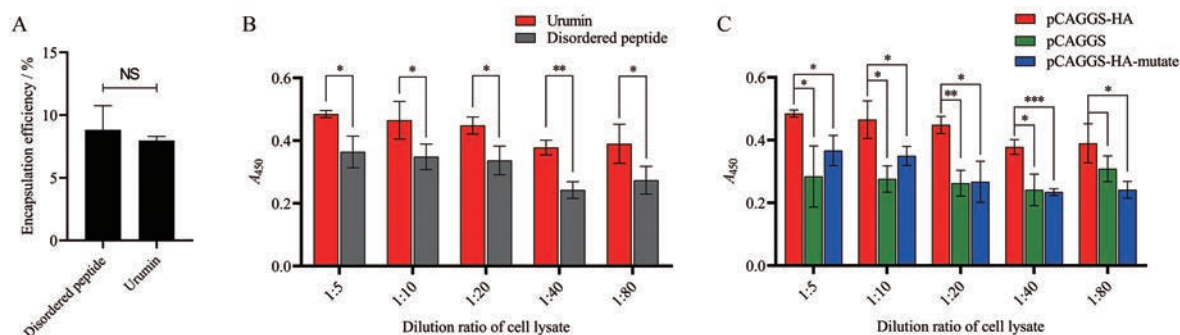


Figure 7 The binding of the peptide to the lysate supernatant of 293T cells transfected with plasmids (pCAGGS, pCAGGS-HA, and pCAGGS-HA-mutate) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A: Determination of the encapsulation efficiency of urumin and disordered peptide; B: Determination of the binding of urumin and disordered peptide to lysate supernatants of 293T cells transfected with pCAGGS-HA plasmid; C: Determination of the binding of cell lysate supernatants of 293T cells transfected with plasmid (pCAGGS, pCAGGS-HA, and pCAGGS-HA-mutate) to urumin, respectively. $n=3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. NS: No significance

设计得到的肽 P6 和 P7 同样作用在 HA 茎部区域, 表现出甲型流感病毒的良好中和力, 这两种流感病毒肽抑制剂能够抑制 HA 蛋白质在酸性条件下的构象重排, 从而中和病毒。HA2 的 N 端 1~23 个氨基酸构成了融合肽, 由几个较大的疏水性残基和几个甘氨酸残基组成。在 pH 值为中性时, 埋藏在分子内部, 酸性条件下构象重排, 促进病毒融合^[25]。HA1 的 His32 靠近 HA 的切割位点, 切割位点附近的 His 具有 pH 敏感特性, 被认为会破坏 HA 界面的稳定性, 促进融合肽的暴露^[26]。

本研究结果表明, urumin 结合在 HA 的茎部区域, 能够同时与 HA1 链的 His32 所在的肽段 (Thr31~Val34)、HA2 链上 Asp19 和 Trp21 所在的区域以及 Thr49 和 Asn53 所在的七肽螺旋 (heptad repeat) 相互作用, 且 Asp19 和 Trp21 位于 HA2 的 N 端的融合肽上。推测 urumin 通过特异性作用于上述氨基酸, 稳定了 HA1 和 HA2 界面的相对构象, 抑制 HA 构象重排, 从而产生抗病毒效应。

Holthausen 等^[16]实验发现 urumin 能够破坏病毒粒子的物理结构。本研究结果显示, urumin 中含有 4 个带有正电荷的碱性氨基酸: Arg4、Arg11、His17 和 Arg18, urumin 的碱性氨基酸能与 HA 蛋白茎部酸性氨基酸 [如 Asp18 (HA1) 和 Asp19 (HA2)] 形成离子键, 在稳定 HA1 和 HA2 相对构象时起重要作用, 并且带正电荷的 urumin 与病毒膜负电荷的磷脂相互作用可能可破坏病毒粒子, 因此 urumin 上的碱性氨基酸可能是其发挥效应的关键氨基酸。

本研究结果还显示, urumin 的结构以无规卷曲为主, 多个残基与 HA 作用才能稳定其在 HA 上的结合。Urumin 的结构多变可能不利于进一步的应用开发, 提示在对 urumin 改造时, 应充分考虑改善多肽稳定性以

及进一步提升多肽和 HA 结合力。

目前世界迫切需要具有新的靶点和作用机制的流感治疗药物, 以对抗潜在的大流行病、新出现和流通中不断变异的病毒株。多肽分子大多为天然的内源性配体, 与受体的亲和力强, 较容易成为先导化合物及药物^[27], 本研究报告了抗 H1N1 HA 多肽抑制剂 urumin 的结合位点以及可能的作用机制, 对抗流感病毒具有重要意义。

作者贡献: 华子春负责项目的总体思路和实验设计; 李家璜指导实验研究、尤其是分子对接部分; 郑伟娟指导 ELISA 实验部分; 李红梅完成了分子对接部分、实验验证部分和论文初稿; 李家璜、华子春完成了论文修改。该论文的最后版本通过了所有作者认可。

利益冲突: 本文所有作者均声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Prachanronarong KL, Canale AS, Liu P, et al. Mutations in influenza A virus neuraminidase and hemagglutinin confer resistance against a broadly neutralizing hemagglutinin stem antibody [J]. *J Virol*, 2019, 93: e01639-18.
- [2] William WT. Influenza-associated hospitalizations in the United States [J]. *JAMA*, 2004, 292: 1333-1340.
- [3] Szewczyk B, Bieńkowska-Szewczyk K, Król E. Introduction to molecular biology of influenza a viruses [J]. *Acta Biochim Pol*, 2014, 61: 397-401.
- [4] Shi Y, Wu Y, Zhang W, et al. Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 822-831.
- [5] Harrison S. Viral membrane fusion [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15: 690-698.
- [6] Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, et al. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin

- [J]. Science, 2004, 303: 1838-1842.
- [7] Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution [J]. Nature, 1981, 289: 366-373.
- [8] Tan HX, Jegaskanda S, Juno JA, et al. Subdominance and poor intrinsic immunogenicity limit humoral immunity targeting influenza HA stem [J]. J Clin Invest, 2019, 129: 850-862.
- [9] Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus [J]. Annu Rev Biochem, 1987, 56: 365-394.
- [10] Krammer F, Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines [J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14: 167-182.
- [11] McKimm-Breschkin JL. Management of influenza virus infections with neuraminidase inhibitors: detection, incidence, and implications of drug resistance [J]. Treat Respir Med, 2005, 4: 107-116.
- [12] Lee PS, Wilson IA. Structural characterization of viral epitopes recognized by broadly cross-reactive antibodies [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2015, 386: 323-341.
- [13] Lee AC, Harris JL, Khanna KK, et al. A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 2383.
- [14] Pachón-Ibáñez ME, Smani Y, Pachón J, et al. Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides [J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41: 323-342.
- [15] Shartouny JR, Jacob J. Mining the tree of life: host defense peptides as antiviral therapeutics [J]. Semin Cell Dev Biol, 2019, 88: 147-155.
- [16] Holthausen DJ, Lee SH, Kumar VT, et al. An amphibian host defense peptide is virucidal for human H1 hemagglutinin-bearing influenza viruses [J]. Immunity, 2017, 46: 587-595.
- [17] Ekiert DC, Bhabha G, Elsliger MA, et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope [J]. Science, 2009, 324: 246-251.
- [18] Fleishman SJ, Whitehead TA, Ekiert DC, et al. Computational design of proteins targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin [J]. Science, 2011, 332: 816-821.
- [19] Kadam RU, Juraszek J, Brandenburg B, et al. Potent peptidic fusion inhibitors of influenza virus [J]. Science, 2017, 358: 496-502.
- [20] Ma QG, Pan ZM, You M, et al. Prokaryotic expression on hemagglutinin gene of influenza A virus subtype H1N1 and analysis of its immunoreactivity [J]. Chin J Zoonoses (中国人兽共患病学报), 2010, 10: 923-925.
- [21] Zhang H, Niu HT, Li GR, et al. The influence of molecular structure on antimicrobial peptides' activity [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2010, 35: 892-897.
- [22] Ghanem A, Mayer D, Chase G, et al. Peptide-mediated interference with influenza A virus polymerase [J]. J Virol, 2007, 81: 7801-7804.
- [23] Tripathi S, Teclé T, Verma A, et al. The human cathelicidin LL-37 inhibits influenza A viruses through a mechanism distinct from that of surfactant protein D or defensins [J]. J Gen Virol, 2013, 94: 40-49.
- [24] Jones JC, Turpin EA, Bultmann H, et al. Inhibition of influenza virus infection by a novel antiviral peptide that targets viral attachment to cells [J]. J Virol, 2006, 80: 11960-11967.
- [25] Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus [J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2012, 88: 226-249.
- [26] Kampmann T, Mueller DS, Mark AE, et al. The role of histidine residues in low-pH-mediated viral membrane fusion [J]. Structure, 2006, 14: 1481-1487.
- [27] Peng JJ, Wang J, Dai WH, et al. Lead compound optimization strategy (7) – modification strategies for peptides [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 427-445.