

靶向识别新型冠状病毒上刺突蛋白 S1 亚基的嵌合型 E3 泛素连接酶的设计与功能验证

代艳^{1,2#}, 林佳雨^{1,2#}, 张肖雅^{2,3}, 逯浩睿², 饶朗^{2*}

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 国家合成生物技术创新中心 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308

3 吉林大学 药学院, 吉林 长春 130012

代艳, 林佳雨, 张肖雅, 逯浩睿, 饶朗. 靶向识别新型冠状病毒上刺突蛋白 S1 亚基的嵌合型 E3 泛素连接酶的设计与功能验证[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4071-4083.

DAI Yan, LIN Jiayu, ZHANG Xiaoya, LU Haorui, RAO Lang. Design and functional validation of a chimeric E3 ubiquitin ligase targeting the spike protein S1 subunit of SARS-CoV-2[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4071-4083.

摘要: 刺突(spike, S)蛋白在新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)感染宿主的过程中起着至关重要的作用, 其中 S1 亚基的受体结合域(receptor binding domain, RBD)结构域与宿主的血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)受体结合, 介导病毒侵入宿主细胞。因此, 降解 S1 是预防 SARS-CoV-2 感染的可行策略之一。本研究旨在开发一种针对 S1 的靶向降解工具。首先利用三质粒慢病毒系统构建了稳定表达 S1 的 HEK 293 细胞系, 发现在该细胞系中过表达线粒体 E3 泛素连接酶 1 (mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1, MUL1)可以有效促进 S1 的泛素化修饰, 并加速其通过蛋白酶体降解过程。进一步研究显示, MUL1 催化的 S1 的多泛素修饰主要是以 K48 的侧链加成方式进行。此外, 将特异性靶向识别 S1 的小肽 LCB1 与 MUL1 偶联, 构建了嵌合型 E3 泛素连接酶 LCB1-MUL1。研究发现, 该嵌合酶活性依赖于 MUL1, 并且相比于 MUL1, LCB1-MUL1 表现出更高的催化效率, 将胞内 S1 的蛋白质半衰期从 12 h 缩短至 9 h。本研究阐明了 MUL1 通过催化 S1 的泛素化修饰并促进其通过蛋白酶体降解的机制, 初步验证了针对 S1 蛋白设计的靶向降解嵌合酶 LCB1-MUL1 的有效性。

关键词: 新型冠状病毒; 刺突蛋白; E3 泛素连接酶; 蛋白酶体; 蛋白质靶向降解

资助项目: 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-CXRC-048)

This work was supported by the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-CXRC-048).

[#]These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author. E-mail: raolang@tib.cas.cn

Received: 2024-03-05; Accepted: 2024-04-28

Design and functional validation of a chimeric E3 ubiquitin ligase targeting the spike protein S1 subunit of SARS-CoV-2

DAI Yan^{1,2#}, LIN Jiayu^{1,2#}, ZHANG Xiaoya^{2,3}, LU Haorui², RAO Lang^{2*}

1 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, National Innovation Centre for Synthetic Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130012, Jilin, China

Abstract: The spike (S) protein plays a crucial role in the entry of SARS-CoV-2 into host cells. The S protein contains two subunits, S1 and S2. The receptor-binding domain (RBD) of the S1 subunit binds to the receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) to enter the host cells. Therefore, degrading S1 is one of the feasible strategies to inhibit SARS-CoV-2 infection. The purpose of this study is to develop a degradation tool targeting S1. First, we constructed a HEK 293 cell line stably expressing S1 by using a three-plasmid lentivirus system. The overexpression of the mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1 (MUL1) in this cell line promoted the ubiquitination of S1 and accelerated its proteasomal degradation. Further research showed the polyubiquitination of S1 catalyzed by MUL1 mainly occurred *via* the addition of K48-linked chains. Moreover, the specific peptide LCB1, which targets and recognizes S1, was combined with MUL1 to create the chimeric E3 ubiquitin ligase LCB1-MUL1. In comparison to MUL1, this chimeric enzyme demonstrated improved catalytic efficiency, resulting in a reduction of S1's half-life from 12 h to 9 h. In summary, this study elucidated the mechanism by which MUL1 promotes the ubiquitination modification of S1 and facilitates its degradation through the proteasome, and preliminarily validated the effectiveness of targeted degradation of S1 by chimeric enzyme LCB1-MUL1.

Keywords: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); spike; E3 ubiquitin ligase; proteasome; protein-targeted degradation

新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)是一种严重危害公共卫生安全的病原微生物。作为一种冠状病毒, SARS-CoV-2 病毒颗粒主要编码 4 种结构蛋白: 包膜(envelope, E)蛋白、膜(membrane, M)蛋白、核衣壳(nucleocapsid, N)蛋白和刺突(spike, S)蛋白^[1]。其中, S 蛋白在病毒入侵宿主的过程中发挥重要作用^[2]。S 蛋白是高度糖基化的同源三聚体, 其中每个单体均包含两个功能不同的亚基——S1 和 S2^[2]。在病毒侵染过程中, S1 亚基中的受体结合域(receptor binding domain, RBD)与宿主的血管紧张素转化酶 2 (angiotensin-

converting enzyme 2, ACE2)受体结合, 介导病毒进入宿主细胞^[3]。因此, 针对 S1 亚基的抗病毒药物和配体的研发成为了研究的焦点。

泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)是真核细胞内一种重要的蛋白质降解途径, 该途径包括 2 个连续的步骤: 底物泛素化修饰和蛋白酶体降解^[4]。在泛素化修饰过程中, 泛素分子在一系列泛素修饰相关酶(泛素激活酶 E1、泛素结合酶 E2 和泛素连接酶 E3)的协同作用下, 共价结合到目标蛋白质的赖氨酸残基上^[5]。E3 连接酶在泛素化修饰中起着最关键作用, 它负责直接催化泛素链与底物的共价连

接。哺乳动物细胞中有超过 600 种不同的 E3 连接酶, 它们具有不同的底物偏好性, 能够调控各种蛋白质的泛素化修饰。这种多样性和特异性使得 E3 连接酶在细胞内具有广泛的调控功能^[6]。泛素是一种由 76 个氨基酸组成的蛋白, 泛素分子形成不同拓扑结构的同质泛素链, 与底物结合后调节蛋白在生物体内的代谢途径^[7]。之前的研究表明, 通过 K48 泛素链连接的底物蛋白通常进入蛋白酶体降解途径, 而通过 K63 泛素链连接的蛋白则可能进入自噬溶酶体或其他多种途径协同调控^[8]。

UPS 参与了多种重要生理过程, 包括细胞凋亡、抗病毒侵袭的免疫调节等^[9]。蛋白质靶向降解技术是一种建立在细胞内 UPS 基础之上的新型蛋白质降解策略^[10]。该技术利用特定的蛋白质分子来识别和结合目标蛋白, 进而促使其被细胞内蛋白酶体降解^[11]。由于蛋白质靶向降解技术的特异性和高效性, 使得这一技术在药物研发中展现出更大的优势^[12]。

由于 S1 在 SARS-CoV-2 病毒侵染过程中的重要作用, 本研究期望开发一种能够有选择性地降解该蛋白的靶向降解技术。本课题组前期的研究(结果未发表)通过表达不同种类的 E3 泛素连接酶进行筛选, 发现线粒体 E3 泛素连接酶 1 (mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1, MUL1) 能够有效促进 S1 在细胞内的降解。MUL1 作为一种多功能 E3 泛素连接酶, 通过其 RING 指形结构域泛素化底物后, 参与了细胞通讯、免疫应答等多个病理生理调控过程^[13]。

因此, 本文以 MUL1 为切入点, 通过免疫共沉淀、Western blotting、RT-qPCR 等技术开展 MUL1 对 S1 的泛素化修饰以及降解机制进行探索; 并在此基础上, 设计了一个嵌合型 E3 泛素连接酶, 验证其靶向降解 S1 的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用 HEK293 细胞系和慢病毒包装

质粒 psPAX2、pMD2.G 均为本课题组保存。高糖 DMEM 培养基和胎牛血清蛋白均购自北京全式金生物有限公司。胰蛋白酶、青-链霉素、细胞冻存液、细胞裂解液(lysis buffer)、超敏增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)液发光显色液均购自北京索莱宝科技有限公司。细胞转染试剂 Lipo8000TM、线粒体膜电位检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。SDS-PAGE 电泳仪、电泳液、Western blotting 转膜液、SurePAGETM 蛋白预制胶购自金斯瑞生物科技有限公司。逆转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 购自东洋纺生物科技有限公司。SYBR Green 染料、FTSpin Tissue/Cell Fast RNA Extraction Kit for Animal 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。PVDF 膜购自 Milipore 公司。所用抗体兔源 ACTB、兔源 HA、羊抗兔二抗均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。兔源 S1-RBD 抗体购自义翘神州生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代

本研究所用细胞(HEK 293, HEK 293-S1)在含有 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中进行复苏、培养和传代。细胞接种于细胞培养皿中, 待细胞贴壁生长至细胞密度约为 80%时, 用无菌 PBS 冲洗后加入 500 μ L 胰蛋白酶, 37 $^{\circ}$ C 消化 5 min, 500 r/min 离心 3 min, 弃去上清液并加入无菌 PBS 清洗 1 次, 随后加入适量含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 传代后在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。

1.2.2 质粒转染

细胞培养至对数生长期后, 调整细胞浓度为 3×10^5 个/孔, 接种至 6 孔板中过夜培养。次日, 更换不含双抗的 DMEM 高糖培养基, 采用 Lipo8000 转染试剂脂质体法将待转质粒与 Lipo8000 按照 1:1.6 比例混合加入细胞培养液

中, 转染 6 h 后, 更换含有 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 转染 48 h 后收集细胞进行后续实验。

1.2.3 Western blotting 检测

细胞转染结束或药物处理后, 弃掉培养基, 用 4 °C 预冷的 PBS 漂洗 3 次。加入含有 1% 苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 的 lysis buffer 裂解 15 min。4 °C、15 000 r/min 离心 20 min, 上清部分即为总蛋白。二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度, 待测蛋白样品中加入 5×SDS-PAGE loading buffer, 上样至 10%的 SDS-PAGE 蛋白预制胶分离蛋白, 通过半干转法将蛋白转至聚偏氟丙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜。PVDF 膜用 5%脱脂牛奶封闭 2 h; 一抗室温摇床孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 二抗室温摇床孵育 45 min, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入 ECL 发光试剂后显影。

1.2.4 免疫共沉淀

细胞转染结束后加入 MG132 抑制蛋白酶体水解活性, 弃掉培养基, 用 4 °C 预冷的 PBS 漂洗 3 次。加入免疫共沉淀细胞裂解液置于冰上裂解 30 min。4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 分离上清。使用 BeyoMagTM Anti-Flag Magnetic Beads 富集 FLAG 标签的蛋白复合物, 4 °C、

3 r/min 条件下过夜孵育。次日, 使用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱方法分离待测蛋白复合物, 后通过 Western blotting 验证。

1.2.5 四甲基罗丹明乙酯线粒体荧光探针与 S1-GFP 共定位检测

将 3×10⁵ 个 HEK 293 细胞接种至 6 孔板, 转染 S1-GFP 表达质粒, 48 h 后, 根据制造商提供的说明书, 使用四甲基罗丹明乙酯(tetramethylrhodamine ethyl ester, TMRE)探针在线粒体进行染色。在最大激发波长为 550 nm、最大发射波长为 575 nm 的条件下, 利用荧光显微镜观察, 评估 S1-GFP 与 TMRE 在细胞中的共定位情况。

1.2.6 RT-qPCR

将 3×10⁵ 个 HEK 293-S1 细胞接种至 6 孔板中, 转染 MUL1 表达质粒 48 h 后, 采用 RT-PCR 检测 S1 的 mRNA 表达。根据制造商提供的说明书, 使用 AFTSpin Tissue/Cell Fast RNA Extraction Kit for Animal 试剂盒提取总 RNA。通过逆转录试剂盒, 按照说明书方案将 mRNA 反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板采用 SYBR Green I 染料法和 CFX ConnectTM 荧光定量 PCR 检测系统(Bio-Rad)进行实时定量 PCR。以 GAPDH 为内参基因, 采用 2^{-ΔΔC_t} 计算相对基因表达量。引物序列见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
S1-F	GACCTCCATAGAAGATTCTAGAATGGTGAATCTGACCAC
S1-R	CACCGTCATGGTCTTTGTAGTCTCCTGATCCTCCAGGGC
3×FLAG-T2A-EGFP-F	GACTACAAAGACCATGACGGTG
3×FLAG-T2A-EGFP-R	GATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
LCB1-F	CCTCTAGACTCGAGATGGACAAGGAGTGG
LCB1-R	CTCAGAGCCTCCTCCGCCCTTTCCACCTCTTCCA
MUL1-F	GAAAGAGGCGGAGGAGGCTCTGAGAGCGGAGGGCGG
MUL1-R	CTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCTTAAGCGTAATCTGG
MUL1-H319A-F	GTGTGGGGCCGTTTGTTCCTGCACCGAGTGCTAC
MUL1-H319A-R	GAACAAACGGCCCCACACTCCAGAAAGACGCAGGACTTG
qPCR-GAPDH-F	CAATGACCCCTTCATTGACC
qPCR-GAPDH-R	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
qPCR-S1-F	TCCACGGGAAGCAATGTGTT
qPCR-S1-R	AGGGCTATTGGTCTGGGTCT

1.3 Western blotting 条带灰度值分析与统计处理

采用 ImageJ 软件分析 Western blotting 条带灰度值大小,将目的条带灰度值与内参 ACTB 相比较后进行归一化分析。采用 Graphpad Prism 6.0 进行数据分析,两组之间采用 t 检验和多组之间比较采用单因素方差分析。每组实验至少进行独立重复实验 3 次,数据均以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。*代表 $P<0.05$; **代表 $P<0.01$; ***代表 $P<0.001$; ****代表 $P<0.0001$; 无显著性则表示为 ns。

2 结果与分析

2.1 慢病毒表达载体与 HEK 293-S1 细胞系构建

本研究采用慢病毒侵染方法建立了稳定表达 S1 的 HEK 293 细胞系(简称 HEK 293-S1)。以全长 *Spike* 基因(GenBank 登录号: MN_908947)为模板,利用特异引物(表 1)进行 PCR 扩增,得到 S1 的 DNA 片段。采用 Gibson 无缝克隆技术将 S1 片段与 pCDH-T2A-EGFP 骨架连接,测序结果与 NCBI 数据库中的序列完全一致,表明成功构建了 pCDH-S1-FLAG-T2A-EGFP 质粒(图 1B、1C)。将构建完成的 S1 表达质粒通过三质粒慢病毒包装系统获得含有 S1 的病毒颗粒,用于感染 HEK 293 细胞。经过嘌呤霉素初筛和流式细胞仪分选,筛选出带有 EGFP 的 HEK 293 细胞。在阳性细胞富集培养后,通过荧光显微镜观察(图 1C)和 Western blotting 验证重组蛋白的表达情况(图 1D),确认成功构建了 HEK 293-S1 稳定细胞系。

2.2 MUL1 促进 S1 的降解

为了探究 E3 泛素连接酶 MUL1 (GenBank 登录号: NM_024544.3)对 S1 的调控机制,在已建立的 HEK 293-S1 稳定细胞系中,分别转染

0.50、0.75、1.00、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 MUL1 表达质粒,48 h 后,通过 Western blotting 检测 S1 蛋白的表达水平。结果显示,随 MUL1 表达水平的增加,HEK 293-S1 细胞中 S1 蛋白质水平呈现逐渐减少的趋势(图 2A)。为了进一步探索 MUL1 对 S1 的调控机制源于转录水平或蛋白水平的影响,本研究分别提取了转染空载体和表达 MUL1 质粒的 HEK 293-S1 细胞的总 RNA,利用 RT-qPCR 荧光定量技术检测 S1 的 mRNA 水平。结果显示,MUL1 的过表达并未对 S1 的 mRNA 水平产生明显影响(图 2B)。其次,本研究采用放线菌酮(cycloheximide, CHX)追踪实验^[14],探究 MUL1 对 S1 蛋白降解速率的影响。在 HEK 293-S1 稳定细胞系中,分别转染了 pCDNA3.1 空载体或 MUL1 表达质粒,36 h 后,加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的放线菌酮以抑制细胞内新生蛋白质合成。Western blotting 结果显示,胞内 S1 蛋白的总含量随 CHX 的处理时间延长而降低,在转染 MUL1 表达质粒的细胞中,S1 的蛋白降解速率明显加快。以上结果表明 MUL1 的过表达加快了 S1 的蛋白质降解过程(图 2C)。

2.3 MUL1 催化 S1 的泛素化修饰

泛素化修饰是蛋白质蛋白酶体降解过程的先决条件^[15]。鉴于先前 MUL1 对 S1 的负调控结果,本研究推测 MUL1 通过直接作用于 S1 蛋白,催化其泛素化修饰,从而促使其通过泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome pathway, UPS)降解。为了验证 MUL1 对 S1 蛋白的降解途径,在 HEK 293 细胞中共表达 S1 和 MUL1,并加入蛋白酶体抑制剂 MG132 以阻断 S1 的降解。利用免疫共沉淀技术验证 MUL1 与 S1 之间的相互作用。结果显示,在 FLAG-S1 蛋白的免疫沉淀复合物中检测到了 MUL1 蛋白的存在(图 3A)。为了直观地反映胞质中游离的 S1 能够与线粒体相互作用,在 HEK 293 细胞中转染

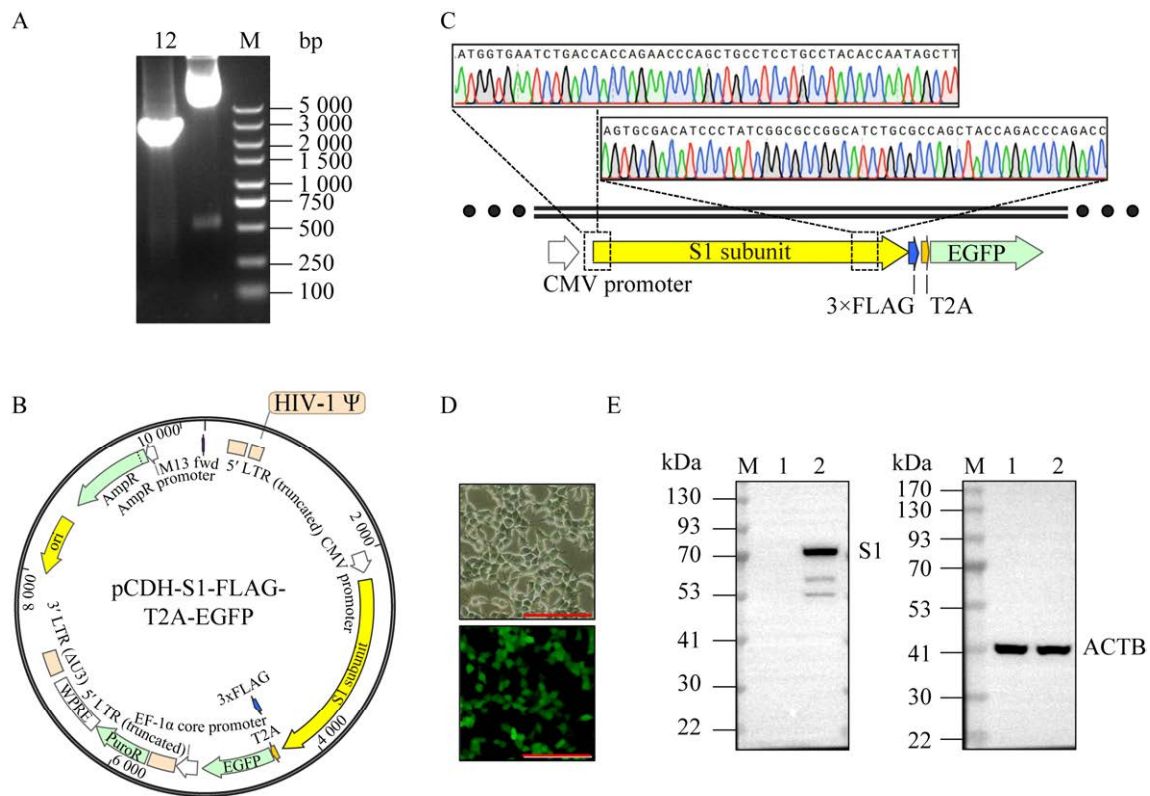


图 1 HEK 293-S1 慢病毒表达载体与细胞系构建结果 A: 核酸电泳图. 泳道 1: PCR 扩增获得的 S1 亚基的 DNA 片段; 泳道 2: pCDH-spike1-FLAG-T2A-EGFP 质粒 DNA. B: pCDH-spike1-FLAG-T2A-EGFP 质粒图谱. C: pCDH-spike1-FLAG-T2A-EGFP 质粒部分测序结果. D: HEK293-S1 荧光表达情况(比例尺为 100 μm). E: Western blotting 验证 HEK293-S1 稳定细胞系中 S1 的表达情况. 泳道 1: HEK 293 细胞总蛋白裂解液; 泳道 2: HEK 293-S1 细胞总蛋白裂解液

Figure 1 Construction results of HEK 293-S1 lentiviral expression vector and cell line. A: Agarose gel electrophoresis. Lane 1: S1 subunit DNA fragment amplified by PCR; Lane 2: pCDH-Spike1-FLAG-T2A-EGFP plasmid DNA. B: Map of the pCDH-Spike1-FLAG-T2A-EGFP plasmid. C: Partial sequencing results of pCDH-Spike1-FLAG-T2A-EGFP plasmid. D: Fluorescence expression of HEK293-S1 (scale bar=100 μm). E: Western blotting detecting the expression level of S1 in HEK293-S1. ACTB antibody was used to detect ACTB protein levels, while S1-RBD was used to detect S1 protein levels. Lane 1: HEK 293 total protein lysis buffer; Lane 2: HEK293-S1 total protein lysis buffer.

S1-GFP 质粒, 24 h 后通过 TMRE 红色荧光探针标记线粒体^[16]。结果显示, S1-GFP 与线粒体部分呈现共定位(图 3B)。

蛋白质泛素化是一种动态且多步骤的翻译后修饰过程^[17]。为了确认 MUL1 对 S1 蛋白的泛素化方式, 将泛素 K48R、K63R 突变体质粒与 MUL1 质粒共转染至 HEK 293-S1 细胞, 用

MG132 处理后再通过免疫共沉淀富集带有 FLAG 标签的 S1 及蛋白复合物。结果显示, 与正常转染泛素质粒的对照组相比, 泛素 K48R、K63R 突变导致 S1 的泛素化修饰分别下降了 47%和 22%; 其中泛素 K48 残基突变对 S1 泛素化结果的影响更为显著(图 3C)。这一结果表明, MUL1 对 S1 的泛素化方式主要通过泛素

K48 连接, 提示 MUL1 对 S1 的负调控主要通过蛋白酶体降解途径实现。

2.4 嵌合型 E3 泛素连接酶 LCB1-MUL1 表达质粒构建

LCB1 是由 David Baker 团队通过计算生物化学方法设计的一种长度为 56 个氨基酸的小肽, 具有与 S1 蛋白中的受体结合域(RBD)结合的能力, 因而表现出高效的抗病毒活性^[18]。本研究利用 LCB1 对 S1 中 RBD 的靶向结合能

力以及 MUL1 对 S1 的泛素催化活性, 构建嵌合型 E3 泛素连接酶 LCB1-MUL1 (图 4A)。通过 PCR 扩增获得 *LCB1* 和 *MUL1* 基因片段, 随后应用 Gibson 无缝克隆技术将 *LCB1* 与 *MUL1* 连接。*LCB1* 位于 *MUL1* 基因的转录起始位点上游。成功将 *LCB1* 与 *MUL1* 基因片段连接后, 再连接至 pCDNA3.1 骨架载体, 通过凝胶电泳(图 4B)和 DNA 测序验证(图 4C)连接的准确性。

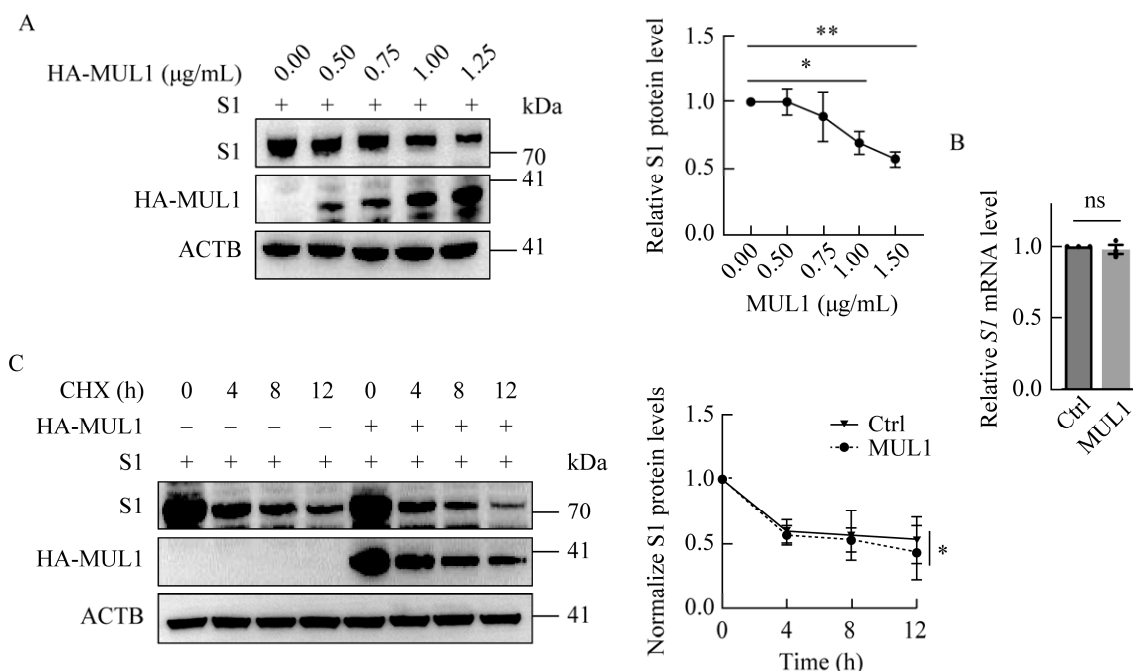


图 2 MUL1 加快 S1 的蛋白质降解 A: 不同浓度 MUL1 的表达对 S1 蛋白浓度的影响. B: MUL1 过表达对 *S1* 的 mRNA 水平的影响. C: MUL1 介导的 S1 蛋白质降解曲线图. Western blotting 中使用 HA 抗体检测泛素及 MUL1 蛋白水平, RBD 抗体检测 S1 蛋白水平. ACTB 作为内参蛋白. 三组独立实验结果采用双尾 Student's *t* 检验确定统计学意义. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: 无显著性

Figure 2 MUL1 promotes the degradation of S1. A: The effect of different concentrations of MUL1 expression on the concentration of S1 protein. B: The effect of MUL1 overexpression on the mRNA level of *S1*. C: Graph of MUL1-mediated degradation of S1 protein. HA antibody was used to detect ubiquitin and MUL1 protein levels in Western blotting, while RBD antibody was used to detect S1 protein levels. ACTB served as the internal reference protein. Each group of data was independently repeated three times for statistical analysis. Statistical significance was determined using two-tailed Student's *t*-test. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: No significance.

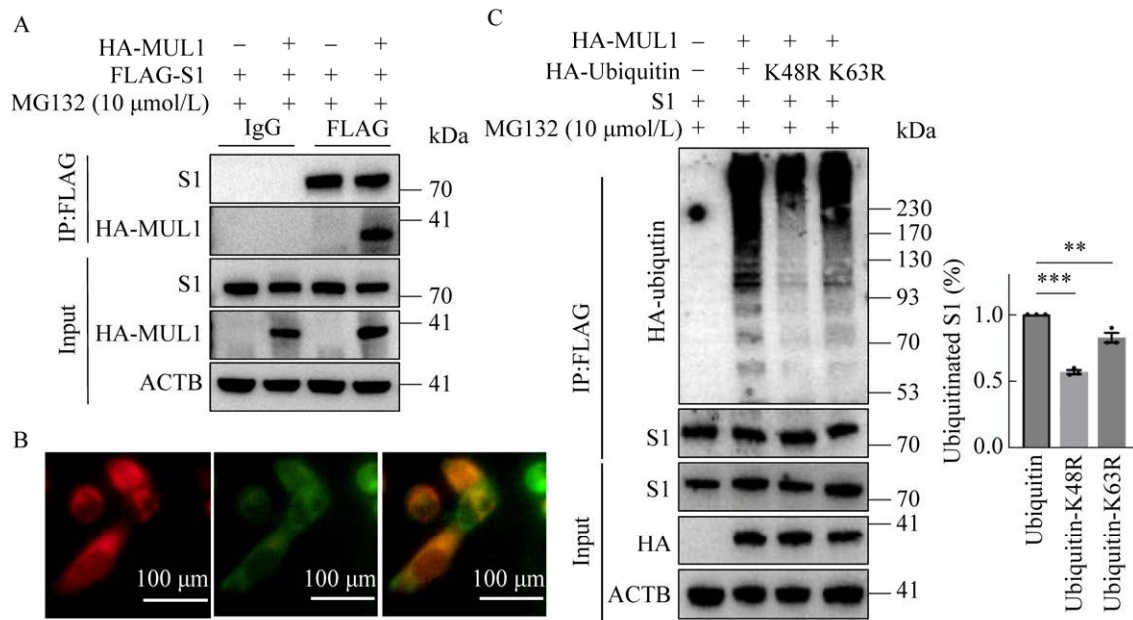


图 3 泛素对 S1 的修饰结果 A: 免疫共沉淀验证 MUL1 与 Spike1 的相互作用. IP-FLAG: FLAG-S1 及蛋白复合物; Input: 全细胞裂解液. B: HEK 293 细胞中 S1-GFP 与 TMRE 线粒体标记物共定位信号(比例尺=100 μm). C: 泛素 K48、K63 对 S1 泛素化影响. Western blotting 中使用 HA 抗体检测泛素及 MUL1 蛋白水平, S1-RBD 检测 S1 蛋白水平. 三组独立实验结果采用双尾 Student's *t* 检验确定统计学意义. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Figure 3 Modification of S1 by ubiquitin. A: Immunoprecipitation was performed to validate the interaction between MUL1 and Spike1. IP-FLAG: FLAG-S1 and protein complexes; Input: Whole-cell lysates. B: Co-localization signal of S1-GFP and TMRE mitochondrial probe in HEK 293 cells (scale bar=100 μm). C: The impact of ubiquitin K48 and K63 on S1 ubiquitination was examined. Western blotting was conducted using HA antibody to assess the levels of ubiquitin and MUL1 proteins, while S1-RBD was utilized to evaluate S1 protein levels. Each experiment was independently repeated three times for statistical analysis. Statistical significance was determined using a two-tailed Student's *t*-test. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

2.5 LCB1 融合表达增强了 MUL1 对 S1 的降解

为了验证 LCB1-MUL1 对 S1 的降解效果, 在 HEK293-S1 细胞中分别过表达 LCB1-MUL1 和 MUL1。通过进一步的 CHX 追踪实验发现 LCB1-MUL1 表达质粒后, S1 的蛋白质半衰期从 12 h 缩短至 9 h, 表示 LCB1-MUL1 能明显加快 S1 的蛋白质降解速率(图 5A)。结果显示, 相同浓度 MUL1 和 LCB1-MUL1 的表达都能够促进 S1 蛋白水平的下降, 且 LCB1-MUL1 导致 S1

蛋白的降解更加明显(图 5B)。

这一结果表明, LCB1 与 MUL1 融合表达增强了 MUL1 对 S1 的降解效果。推测 LCB1-MUL1 相较于 MUL1 而言对 S1 降解速率加快的主要原因为 LCB1 能够更快速地引导 MUL1 对 S1 进行泛素化修饰。为了验证这一观点, 本研究检测相同转染条件下 MUL1 和 LCB1-MUL1 对 S1 泛素化修饰程度。结果如图 5C 所示, LCB1 与 MUL1 融合表达后明显提升了对 S1 的泛素化效率。

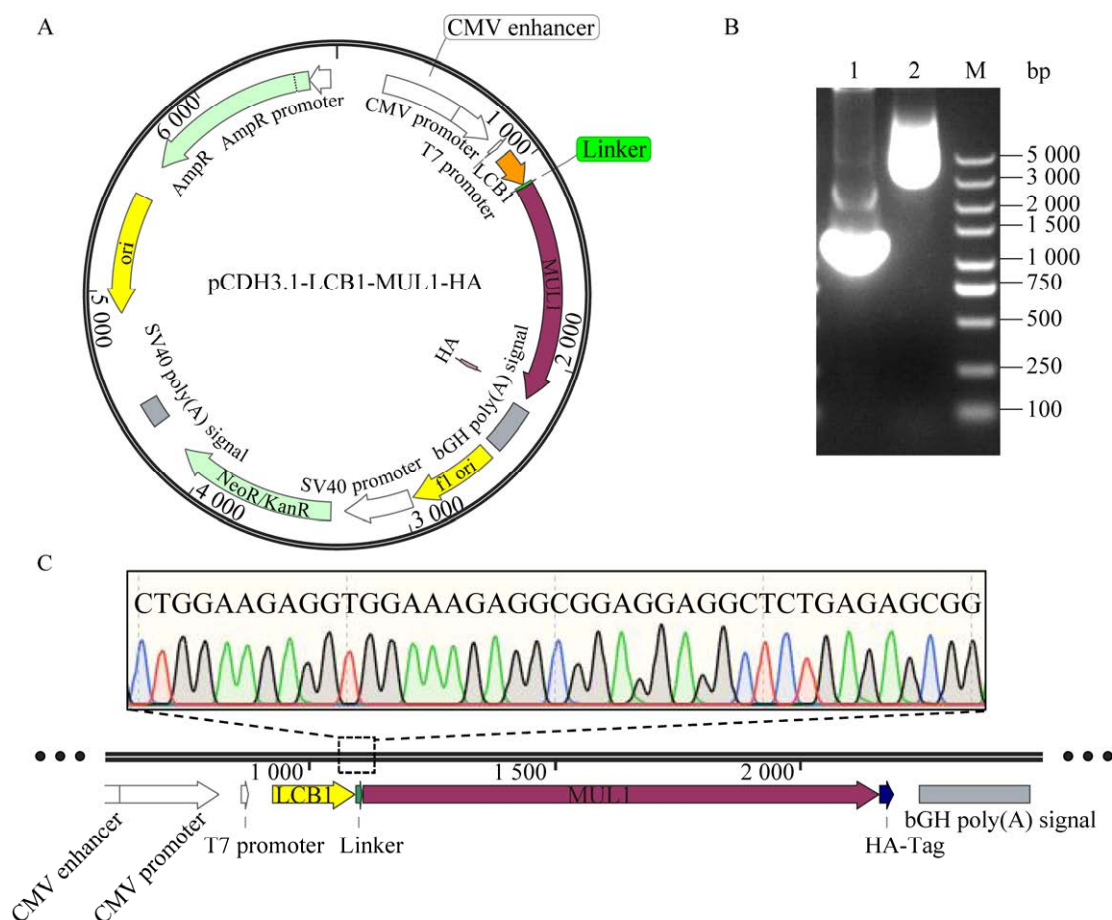


图 4 嵌合型 E3 泛素连接酶 LCB1-MUL1 表达质粒的构建 A: 编码 LCB1-MUL1 基因的重组质粒 pCDH3.1-LCB1-MUL1-HA 图谱. B: 核酸电泳图. 泳道 1: LCB1-MUL1 DNA 片段; 泳道 2: pCDNA3.1-LCB1-MUL1-HA 质粒. C: pCDNA3.1-LCB1-MUL1-HA 的部分测序结果

Figure 4 Construction of chimeric E3 ubiquitin ligase LCB1-MUL1. A: pCDH3.1-LCB1-MUL1-HA plasmid map. B: Nucleic acid electropherogram. Lane 1: LCB1-MUL1 DNA fragment; Lane 2: pCDNA3.1-LCB1-MUL1-HA plasmid. C: Partial sequencing results of pCDNA3.1-LCB1-MUL1-HA.

2.6 嵌合型 E3 泛素连接酶对 S1 降解依赖 MUL1 的催化结构域

在催化过程中 MUL1 通过 RING 指形结构域负责将泛素化长链加成至底物蛋白上, 其中 MUL1 上第 319 位组氨酸决定对底物泛素催化活性, 对该位点突变不影响 MUL1 的其他功能. 为了确认 LCB1-MUL1 对 S1 的催化功能, 本研究对该位点进行突变(图 6A). 将野生型和 H319A 突变的 LCB1-MUL1 表达质粒转染至 HEK 293-S1 稳定细胞系中, 48 h 后检测 S1 蛋白水平. 结果显示, LCB1-MUL1 (His319Ala) 的过表达未能影响 S1 蛋

白的含量(图 6B), 这表明 MUL1 的泛素催化活性决定了嵌合酶对底物的降解能力.

此外, 本研究还通过蛋白酶体抑制剂 MG132 来阻断蛋白酶体水解, 直观地反映了 LCB1-MUL1 介导 S1 降解的途径. 如图 6B 所示, 在 LCB1-MUL1 过表达条件下添加蛋白酶体抑制剂 MG132 抑制了嵌合酶对 S1 的降解作用. 值得注意的是, MG132 的处理并不能完全阻断 LCB1-MUL1 对 S1 的降解, 这一结果表明 LCB1-MUL1 对 S1 的降解依赖于泛素蛋白酶体途径, 同时还受其他信号通路调节.

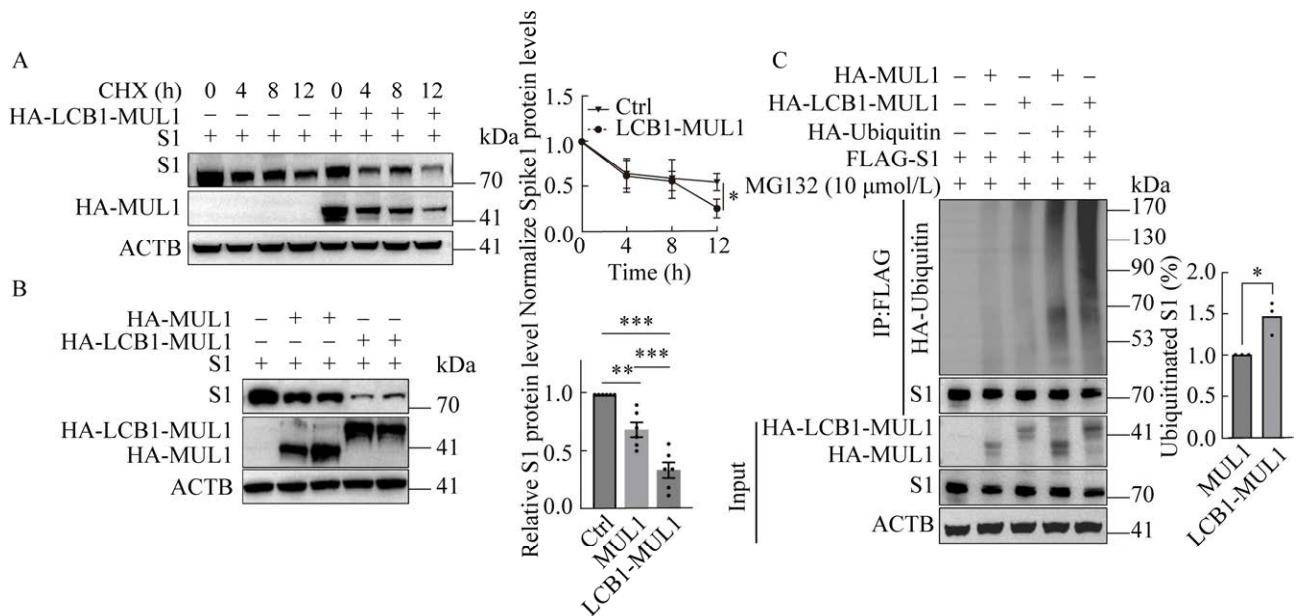


图 5 LCB1-MUL1 对 S1 的降解 A: LCB1-MUL1 介导的 S1 蛋白质降解曲线图. B: LCB1-MUL1 与 MUL1 对 S1 的降解效果比较. C: LCB1-MUL1 和 MUL1 对 S1 的泛素修饰结果. Western blotting 中使用 HA 抗体检测泛素及 MUL1、LCB1-MUL1 蛋白水平, S1-RBD 检测 S1 蛋白水平. 三组独立实验结果采用单因素方差分析确定统计学意义. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Figure 5 Degradation of S1 by LCB1-MUL1. A: Curve of S1 protein degradation mediated by LCB1-MUL1. B: Comparison of the degradation effects of LCB1-MUL1 and MUL1 on S1. C: Results of ubiquitination mediated by LCB1-MUL1 and MUL1 on S1. Western blotting analysis was conducted using HA antibodies to detect the levels of ubiquitin, MUL1, and LCB1-MUL1 proteins, while S1-RBD was utilized to detect the level of S1 protein. Each experiment was independently repeated three times, and one-way ANOVA was used to determine statistical significance. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

3 讨论与结论

S1 是组成 S 蛋白单聚体的重要亚基, 其中受体结合域(RBD)与宿主细胞表面受体(ACE2)的结合决定了病毒对宿主的侵染能力^[2]。之前的研究通过各种方法筛选小分子配体和相关药物, 竞争占用 S1 的 RBD 结构域, 使其无法与 ACE2 结合, 从而阻断 SARS-CoV-2 对宿主的侵染^[19]。此外, 有研究指出干扰 S 蛋白中 S1 亚基的蛋白质稳定性^[20]或阻断 S1 与宿主受体的结合^[21], 可有效抑制病毒的复制和传播。SARS-CoV-2 的病毒复制与装载需要依赖细胞的合成体系,

而细胞内丰富的蛋白质降解体系为 S1 的降解提供了有效途径。

线粒体作为细胞能量生产的主要供给体也参与蛋白质稳态调控过程^[22], MUL1 是线粒体定位的多功能 E3 泛素连接酶对多个胞质蛋白泛素催化, 参与多种细胞信号调控功能^[23]。值得注意的是, MUL1 对底物泛素催化的 RING 指形结构域暴露在细胞质中能与细胞质内多种蛋白进行结合^[24]。其中 MUL1 序列上第 319 位组氨酸(His)决定 RING 指形结构对底物泛素催化活性^[25], 本研究通过对该位点突变证明嵌合型 E3 泛素连接酶 LCB1-MUL1 对 S1 的降解能力与该催

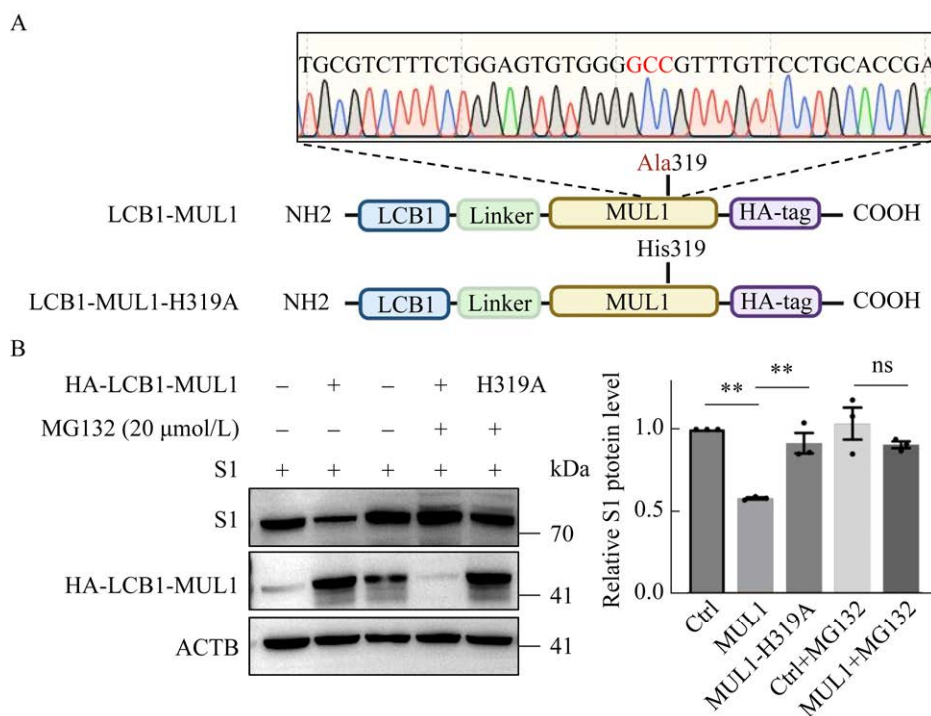


图 6 LCB1-MUL1 对 S1 降解通路的确认 A: LCB1-MUL1-H319A 表达质粒的部分测序结果. B: LCB1-MUL1 活性位点缺失及蛋白酶体抑制剂 MG132 对 S1 降解的影响. HA 抗体用于检测泛素、MUL1 和 LCB1-MUL1 蛋白水平, S1-RBD 用于检测 S1 蛋白水平. 三组独立实验结果采用单因素方差分析确定统计学意义, **: $P < 0.01$; ns: 无显著性

Figure 6 Confirmation of the S1 degradation pathway by LCB1-MUL1. A: Partial sequencing results of LCB1-MUL1-H319A expression plasmid. B: Deletion of LCB1-MUL1 active site and effect of proteasome inhibitor MG132 on S1 degradation. HA antibody was used to detect ubiquitin, MUL1 and LCB1-MUL1 protein levels, and S1-RBD was used to detect S1 protein levels. Independent biostatistical analyses were repeated three times for each set of data. Statistical significance was determined by one-way ANOVA. **: $P < 0.01$; ns: No significance.

化活性中心相关(图 6B)。尽管在 S 蛋白的翻译和病毒粒子组装过程中,其本身信号肽会被识别并转移至内质网,理论上不应与位于线粒体外膜上的 E3 泛素连接酶 MUL1 发生相互作用。然而,本研究结果显示, MUL1 的过表达能够对 S1 进行泛素化修饰并促进其降解。推测这可能与搭建的 S1 过表达体系有关。S1 在细胞内的过量表达导致该蛋白的累积不完全在内质网中,在细胞质内也有部分 S1 能与线粒体相互作用(图 3B)。但是,本研究构建的嵌合型 E3 泛

素连接酶中包含了对 S1 上 RBD 具有高亲和力的小肽——LCB1,该序列可有效地引导 MUL1 催化 S1 的泛素化修饰(图 5C)。

底物泛素化修饰是重要的蛋白质翻译后修饰过程^[17],在泛素修饰中,不同的多聚泛素链与底物结合将底物蛋白导向不同的降解途径。其中泛素与底物的 K48^[7]和 K63 连接^[8]最为常见。本研究验证了在 MUL1 催化过程中泛素与 S1 主要通过 K48 连接(图 3B),并且通过 MG132 阻断蛋白酶体水解活性(图 6B),证明了

S1 通过蛋白酶体途径降解。蛋白质的泛素修饰通常发生在底物的赖氨酸(Lys)残基上^[26]。S1 亚基的氨基酸序列中包含多个赖氨酸位点,本研究对该蛋白泛素位点进行预测发现了多个可能作用位点,但未能对 S1 的泛素位点进行鉴定,之后的工作中将会对这些潜在位点进行逐个验证。

蛋白质靶向降解是一种利用细胞内源降解体系选择性对致病蛋白进行降解的技术^[10]。该技术的核心是寻找能够与目标蛋白特异性结合的配体分子^[11]。截至目前,多个研究团队已尝试将蛋白质靶向降解技术应用于 SARS-CoV-2 的防治。2020 年 Chatterjee 等^[27]设计了一种靶向识别 S1 亚基上 RBD 结构域的靶向小肽——23 mer,通过融合表达方式将 E3 泛素连接酶——STIP1 同源和 U 型盒结构蛋白 1 (STIP1 homology and U-box containing protein 1, STUB1)与 23 mer 相互连接,成功实现了 S 蛋白的泛素化修饰和靶向降解。其中,特异性目标蛋白配体的筛选与优化是靶向降解技术的核心之一。截至目前,2021 年 David Baker^[18]团队设计的 LCB1 被认为是对 S1 最有效的靶向小肽。在本研究发现 MUL1 对 S1 具有一定降解效果的基础上,为了设计和优化其成为更有效的 S1 降解工具酶,将 LCB1 与 MUL1 相偶联构建嵌合型 E3 泛素连接酶——LCB1-MUL1。该嵌合酶利用 LCB1 对 S1 的靶向识别能力,加速 E3 泛素连接酶 MUL1 对 S1 的泛素催化,初步探索了基于 MUL1 开发 S1 靶向降解工具酶的可行性。

综上所述,本研究阐述了 MUL1 催化 S1 的泛素化修饰机理及降解通路。通过融合表达 LCB1 与 MUL1 构建了 E3 泛素连接酶嵌合体成功地实现了对 S1 的靶向降解,为 SARS-CoV-2 的抗病毒研究及靶向药物开发提供了新的方法和视角。

REFERENCES

- [1] WANG MY, ZHAO R, GAO LJ, GAO XF, WANG DP, CAO JM. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 587269.
- [2] JACKSON CB, FARZAN M, CHEN B, CHOE H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2022, 23: 3-20.
- [3] LIU HL, WEI PC, KAPPLER JW, MARRACK P, ZHANG GY. SARS-CoV-2 variants of concern and variants of interest receptor binding domain mutations and virus infectivity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 825256.
- [4] POHL C, DIKIC I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy[J]. *Science*, 2019, 366(6467): 818-822.
- [5] CLAGUE MJ, HERIDE C, URBÉ S. The demographics of the ubiquitin system[J]. *Trends in Cell Biology*, 2015, 25(7): 417-426.
- [6] NAKAMURA N. Ubiquitin system[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 1080.
- [7] KWON YT, CIECHANOVER A. The ubiquitin code in the ubiquitin-proteasome system and autophagy[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2017, 42(11): 873-886.
- [8] TRACZ M, BIALEK W. Beyond K48 and K63: non-canonical protein ubiquitination[J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2021, 26(1): 1.
- [9] PÉREZ-BENAVENTE B, NASRESFAHANI AF, FARRÀS R. Ubiquitin-regulated cell proliferation and cancer[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020, 1233: 3-28.
- [10] NEKLESA TK, WINKLER JD, CREWS CM. Targeted protein degradation by PROTACs[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2017, 174: 138-144.
- [11] BONDESON DP, SMITH BE, BURSLEM GM, BUHIMSCHI AD, HINES J, JAIME-FIGUEROA S, WANG J, HAMMAN BD, ISHCENKO A, CREWS CM. Lessons in PROTAC design from selective degradation with a promiscuous warhead[J]. *Cell Chemical Biology*, 2018, 25(1): 78-87.e5.
- [12] REBOUD-RAVAUX M. Induced degradation of proteins by PROTACs and other strategies: towards promising drugs[J]. *Biologie Aujourd'hui*, 2021, 215(1/2): 25-43.
- [13] CALLE X, GARRIDO-MORENO V, LOPEZ-GALLARDO E, NORAMBUENA-SOTO I, MARTÍNEZ D, PEÑALOZA-OTÁROLA A,

- TRONCOSSI A, GUERRERO-MONCAYO A, ORTEGA A, MARACAJA-COUTINHO V, PARRA V, CHIONG M, LAVANDERO S. Mitochondrial E3 ubiquitin ligase 1 (MUL1) as a novel therapeutic target for diseases associated with mitochondrial dysfunction[J]. *IUBMB Life*, 2022, 74(9): 850-865.
- [14] MIAO Y, DU Q, ZHANG HG, YUAN YK, ZUO YB, ZHENG H. Cycloheximide (CHX) chase assay to examine protein half-life[J]. *Bio-protocol*, 2023, 13(11): e4690.
- [15] NANDI D, TAHILIANI P, KUMAR A, CHANDU D. The ubiquitin-proteasome system[J]. *Journal of Biosciences*, 2006, 31(1): 137-155.
- [16] CHAZOTTE B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011, 2011(8): 990-992.
- [17] SHAID S, BRANDTS CH, SERVE H, DIKIC I. Ubiquitination and selective autophagy[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2013, 20(1): 21-30.
- [18] CAO LX, GORESHNIK I, COVENTRY B, CASE JB, MILLER L, KOZODOY L, CHEN RE, CARTER L, WALLS L, PARK YJ, STEWART L, DIAMOND M, VEESLER D, BAKER D. *De novo* design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors[J]. *BioRxiv: the Preprint Server for Biology*, 2020: 2020.08.03.234914.
- [19] MURALIDAR S, AMBI SV, SEKARAN S, KRISHNAN UM. The emergence of COVID-19 as a global pandemic: understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2[J]. *Biochimie*, 2020, 179: 85-100.
- [20] HUANG HC, LAI YJ, LIAO CC, YANG WF, HUANG KB, LEE IJ, CHOU WC, WANG SH, WANG LH, HSU JM, SUN CP, KUO CT, WANG J, HSIAO TC, YANG PJ, LEE TA, HUANG W, LI FA, SHEN CY, LIN YL, et al. Targeting conserved N-glycosylation blocks SARS-CoV-2 variant infection *in vitro*[J]. *EBioMedicine*, 2021, 74: 103712.
- [21] KAMEL NA, EL WAKEEL LM, ABOSHANAB KM. Exploring SARS-CoV-2 spikes glycoproteins for designing potential antiviral targets[J]. *Viral Immunology*, 2021, 34(8): 510-521.
- [22] RUAN LH, ZHOU CK, JIN EL, KUCHARAVY A, ZHANG Y, WEN ZH, FLORENS L, LI R. Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria[J]. *Nature*, 2017, 543: 443-446.
- [23] LI J, QI W, CHEN G, FENG D, LIU JH, MA B, ZHOU CQ, MU CL, ZHANG WL, CHEN Q, ZHU YS. Mitochondrial outer-membrane E3 ligase MUL1 ubiquitinates ULK1 and regulates selenite-induced mitophagy[J]. *Autophagy*, 2015, 11(8): 1216-1229.
- [24] LEE SO, LEE CK, RYU KS, CHI SW. The RING domain of mitochondrial E3 ubiquitin ligase 1 and its complex with Ube2D2: crystallization and X-ray diffraction[J]. *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology Communications*, 2020, 76(Pt 1): 1-7.
- [25] PURI R, CHENG XT, LIN MY, HUANG N, SHENG ZH. Mulf1 restrains Parkin-mediated mitophagy in mature neurons by maintaining ER-mitochondrial contacts[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3645.
- [26] DIKIC I, SCHULMAN BA. An expanded lexicon for the ubiquitin code[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24: 273-287.
- [27] CHATTERJEE P, PONNAPATI M, KRAMME C, PLESA AM, CHURCH GM, JACOBSON JM. Targeted intracellular degradation of SARS-CoV-2 *via* computationally optimized peptide fusions[J]. *Communications Biology*, 2020, 3: 715.

(本文责编 陈宏宇)