

文章编号: 1004-7220(2022)05-0888-07

# 逆锁键调控野生型和功能增强型 ADAMTS13 与 VWF A2 结构域的相互作用

龙 泉<sup>1</sup>, 杨俊贤<sup>1,2</sup>, 肖波涛<sup>1\*</sup>, 林蒋国<sup>2\*</sup>

(1. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广州 510006; 2. 广东省人民医院(广东省医学科学院) 医学研究部, 广州 510080)

**摘要:**目的 探究瞬时接触时间下野生型(wild-type, WT)和功能增强型(gain-of-function, GOF)金属蛋白酶 ADAMTS13 与 VWF A2 结构域的相互作用, 阐明其动力学调控的分子机制。方法 利用原子力显微镜测量在不同外力作用下 WT 和 GOF ADAMTS13 分子与 VWF A2 的黏附频率、断裂力和分子键寿命, 并利用 Bell-Evans 模型提取相关动力学参数。结果 WT ADAMTS13 与 VWF A2 结合的能障宽度为 0.41 nm, 0 N 力下的解离速率为  $1.50 \text{ s}^{-1}$ ; GOF ADAMTS13 与 VWF A2 结合的能障宽度为 0.29 nm, 0 N 力下的解离速率为  $3.28 \text{ s}^{-1}$ 。进一步利用 AFM clamp 模式测量在不同作用力下 WT/GOF ADAMTS13-VWF A2 复合物的分子键生存寿命和解离速率, 发现两组复合物的结合均呈现“逆锁键”-“滑移键”转换的双相力学依赖特性。结论 WT ADAMTS13-VWF A2 相互作用的机械强度与力学稳定性高于 GOF ADAMTS13-VWF A2, WT/GOF ADAMTS13 与 VWF A2 结构域的相互作用具有“逆锁键”-“滑移键”转换的双相力学响应特性。研究结果有助于深入理解 ADAMTS13 与 VWF 的相互作用, 为抗血栓药物的开发提供新思路。

**关键词:** 血管性血友病因子; 原子力显微镜; 逆锁键; 滑移键

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.05.019

## Catch-Bond Regulates the Interactions of WT and GOF ADAMTS13 with VWF A2 Domain

LONG Quan<sup>1</sup>, YANG Junxian<sup>1,2</sup>, XIAO Botao<sup>1\*</sup>, LIN Jiangguo<sup>2\*</sup>

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. Research Department of Medical Sciences, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract: Objective** To investigate the regulatory mechanism of wild-type (WT) and gain-of-function (GOF) ADAMTS13 interaction with VWF A2. **Methods** The adhesion frequency, rupture force, and bond lifetime between WT or GOF ADAMTS13 and VWF A2 under different external forces were measured by atomic force microscope (AFM). The kinetic parameters were derived by fitting with the Bell-Evans model. **Results** The widths of the potential barrier along the direction of force were 0.41 nm and 0.29 nm, and the dissociation rates under 0 N force were  $1.50 \text{ s}^{-1}$  and  $3.28 \text{ s}^{-1}$  for the WT ADAMTS13-VWF A2 complex and the GOF ADAMTS13-VWF A2 complex, respectively. Furthermore, the lifetime of bond and dissociation rate of the complexes under different applied forces were measured by AFM clamp mode. The result revealed that the interaction between WT or GOF ADAMTS13 and VWF A2 exhibited the characteristics of biphasic force-dependent 'catch-slip' transition

收稿日期: 2021-11-05; 修回日期: 2021-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771012, 32071303, 11372116, 11772133)

通信作者: 林蒋国, 研究员, E-mail: linjiangguo@gdph.org.cn; 肖波涛, 教授, E-mail: xiaob@scut.edu.cn

\* 为共同通信作者

bond. **Conclusions** The mechanical strength and stability of the WT ADAMTS13-VWF A2 complex are higher than those of the GOF ADAMTS13-VWF A2 complex. Both the binding of these two complexes exhibits the mechanical response characteristics of the ‘catch-slip’ transition bond. The research findings contribute to further understanding the interaction between ADAMTS13 and VWF, so as to provide new ideas for the development of antithrombotic drugs.

**Key words:** von Willebrand factor (VWF); atomic force microscope (AFM); catch bond; slip bond

血管性血友病因子 (von Willebrand factor, VWF) 是一种参与凝血与止血过程的力敏感糖蛋白,其活性受血流剪切应力所调控<sup>[1]</sup>。VWF 是一把双刃剑,一方面它能捕获血小板到血管受损处,启动初级止血过程;另一方面,若 VWF 的活性不受调控,则会捕获大量的血小板甚至是血细胞到血管受损处,最终导致血栓的形成<sup>[2-4]</sup>。金属蛋白酶 ADAMTS13 (A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs, member 13) 能特异性酶切 VWF A2 结构域内的 Tyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup> 肽键,调节 VWF 多聚体的大小与活性,从而防止血栓的形成<sup>[5]</sup>。

ADAMTS13 主要由肝星状细胞表达分泌,并进入到血液循环中<sup>[5]</sup>。ADAMTS13 拥有 14 个结构域,其 C 末端的 TSP-CUB 结构域能够与 N 端的 Spacer 结构域相互作用,使蛋白酶形成低活性的“闭合构象”<sup>[6-7]</sup>。VWF D4-CK 区域与 ADAMTS13 远端结构域的结合或突变 Spacer 结构域中的 5 个氨基酸残基 (R568K/F592Y/R660K/Y661F/Y665F),均会解除这种自抑制作用从而使蛋白酶呈现高活性的“开放构象”<sup>[6,8]</sup>。这种突变的 ADAMTS13 被称为功能增强型 (gain-of-function, GOF) ADAMTS13,其酶切活性为野生型的 2.5 倍<sup>[8]</sup>。对于 ADAMTS13 结合及酶切 VWF 的研究,多采用生物化学的方法,需要将 ADAMTS13 与 VWF 共孵育 30 min 或以上<sup>[9-11]</sup>。这一实验条件与真实的生理条件不相符。一方面,随血液循环的 ADAMTS13 分子与血管壁面上的 VWF 分子发生接触的时间非常短暂;另一方面,ADAMTS13 分子与 VWF 分子的结合受到血流微环境的调控。本课题组利用原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM) 探究了 ADAMTS13 与 VWF 间分子键的力学响应特性:二者不同结构域之间的相互作用呈现“逆锁键”-“滑移键”间转换的两相键或“滑移键”-“逆锁键”-“滑移键”间转换的三相键<sup>[12]</sup>。“逆锁

键”的特征为分子键寿命随着作用力的增大而增加;“滑移键”的特征为分子键寿命随作用力的增大而减少。分子间相互作用形成的“逆锁键”会调控细胞的滚动黏附<sup>[13]</sup>、细胞迁移<sup>[14]</sup>和 T 细胞抗原识别<sup>[15]</sup>等过程。

本课题组先前研究已经探明了 ADAMTS13 与 VWF A1A2A3 三联体结合的力学调控特性<sup>[12]</sup>。但是 ADAMTS13 与单个 VWF A 结构域结合的力学特性尚未明晰。本文利用 AFM 技术,测量在瞬时的接触时间内 (0.8 s),WT 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 结构域结合的力学响应特性。结果显示,“逆锁键”调控 WT 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 结构域的解离;WT ADAMTS13-VWF A2 复合物的机械强度与力学稳定性高于 GOF ADAMTS13-VWF A2 复合物。这些相互作用信息有助于深入理解血流环境中 ADAMTS13 结合和酶切 VWF 的过程,为抗血栓药物的开发提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 蛋白与试剂

WT ADAMTS13 重组质粒受赠于美国华盛顿大学董京飞教授。GOF ADAMTS13 重组质粒以 WT ADAMTS13 质粒为模板,进行点突变获得。WT 和 GOF ADAMTS13 蛋白由本实验室进行表达和纯化<sup>[16]</sup>。WT 和 GOF ADAMTS13 通过人胚胎肾细胞 293 T (HEK 293 T) 进行表达,利用镍亲和层析柱和凝胶分子筛纯化后,由 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western Blot 对重组蛋白进行鉴定。VWF A2 单体结构域购买于美国 R&D Systems 公司。

### 1.2 探针与底板功能化

WT 或 GOF ADAMTS13 分子与 VWF A2 分子通过物理吸附方法分别固定在 AFM 探针尖端和培养皿表面 [见图 1(a)]。首先用无水乙醇冲洗培养皿 (NEST, 121118QQ06) 3 遍,用氮气吹干后,将探针 (MLCT K=0.03 N/m, Bruker 公司,德国) 置于洗

净的培养皿中央,取 15  $\mu\text{L}$  30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 WT 或 GOF ADAMTS13 滴加到悬臂梁上,在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下过夜孵育。实验前用 200  $\mu\text{L}$  2% BSA 室温封闭 1 h 以阻断非特异性黏附。培养皿用无水乙醇洗涤 3 次后用氮气吹干,对照组孵育 15  $\mu\text{L}$  2% BSA,实验组孵育 15  $\mu\text{L}$  30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  VWF A2,并标记蛋白孵育的位置,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育。次日用 1 mL PBS 洗涤 3 次,用 2 mL 2% BSA 室温封闭 1 h。

### 1.3 AFM 力学特性探测实验

本实验室对本原 AFM 系统(CSPM5500)进行改造,使其可以进行力学测量<sup>[16]</sup>。利用 AFM 的 ramp 模式测量分子间的黏附频率,利用 clamp 模式测量不同外力条件下分子键的生存寿命。在 1 个测试循环过程中,压电陶瓷驱动样品靠近并接触 AFM 探针,接触后样品回撤 10 nm 以减少 AFM 探针与底板非特异性黏附;此后保持 0.8 s 接触时间以允许分子键的形成;再以 200 nm/s 速度回撤以探测分子间黏附事件的发生。在回撤过程中,如果没有探测到力信号的增加,则表示 AFM 探针与底板间没有发生黏附事件;如果探测到力信号的增加,则表示 AFM 探针与底板间发生了黏附[见图 1(b)]。在分子键生存时间的测量中,当有黏附事件发生且作用力达到所设置力大小时,反馈系统停止样品回撤以维持分子间作用力的大小;当分子键作用力减小后,压电陶瓷控制样品继续回撤,直到没有探测到分子间相互作用的发生。从样品停止回撤到样品重新回撤的这段时间即为分子键的生存寿命。

### 1.4 数据处理

为了得到不同加载率下复合物的最概然断裂力,首先对断裂力分布直方图进行拟合<sup>[17]</sup>:

$$P(f) = \left[ \frac{K_{\text{off}}^0}{r} \exp\left(\frac{K_{\text{B}}TK_{\text{off}}^0}{rd}\right) \right] \times \exp\left\{ \frac{fd}{K_{\text{B}}T} - \frac{K_{\text{B}}TK_{\text{off}}^0}{rd} \exp\left(\frac{fd}{K_{\text{B}}T}\right) \right\} \quad (1)$$

式中: $P(f)$  为断裂力发生概率; $K_{\text{off}}^0$  为 0 N 力下的解离速率; $r$  为加载率; $d$  为复合物在沿着作用力方向上的能障宽度, $d$  越大,代表复合物的结合越稳定; $K_{\text{B}}$  为波尔兹曼常数, $T$  为绝对温度,室温下  $K_{\text{B}}T \approx 4.1 \text{ pN} \cdot \text{nm}$ 。然后,利用 Bell-Evans 模型计算不同加载率下的最概然断裂力  $f^*$ ,即发生概率最大的断裂力<sup>[17-18]</sup>:

$$f^* = \frac{K_{\text{B}}T}{d} \ln\left\{ \frac{rd}{K_{\text{B}}TK_{\text{off}}^0} \right\} \quad (2)$$

为了得到不同外力作用下的复合物解离速率,根据一阶、不可逆近似,小系统概率动力学模型对分子键生存时间进行拟合:

$$\ln(C) = -K_{\text{off}}t \quad (3)$$

式中: $C$  为分子键寿命  $\geq t$  的概率; $K_{\text{off}}$  为外力作用下的解离概率。

### 1.5 统计学分析

为了得到可靠的分析数据,在进行黏附频率实验时每个点重复测量 100 次,每个独立样品至少进行 3 个不同位置的测量。对于分子键寿命实验,每个点设置 250 次重复测量。为了排除实验过程中发生酶切事件的可能性,本文只分析 VWF A2 未发生解折叠的单峰事件。两组数据间的统计学差异采用  $t$  检验分析。检验水准为 0.05,数据以均数  $\pm$  标准差表示。

## 2 实验结果

### 2.1 ADAMTS13 分子特异性结合 VWF A2 分子

首先分析 AFM 探针与底板间的黏附频率。结果显示,WT 或 GOF ADAMTS13 功能化探针与 VWF A2 功能化底板间的黏附频率分别为 (11.1  $\pm$  1.14)% 和 (14.5  $\pm$  1.97)% [见图 1(c)],均显著高于 WT 或 GOF ADAMTS13 功能化探针与 2% BSA 功能化底板间的黏附频率[WT ADAMTS13 为 (1.83  $\pm$  0.37)%,GOF ADAMTS13 为 (3.8  $\pm$  0.91)%]。该结果表明,实验组测得的大部分黏附事件均由 ADAMTS13 分子与 VWF A2 的特异相互作用所引起。虽然 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 的黏附频率高于 WT ADAMTS13 与 VWF A2 的黏附频率,但两者间的差异没有统计学意义。这一结果与本课题组此前的实验结果一致<sup>[16]</sup>。为了排除实验过程中 ADAMTS13 酶切 VWF A2 的可能性,对 100 次接触过程中的累积黏附频率进行分析。随着接触次数的增多,WT 或 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 的累积黏附频率均趋于平稳,没有发生明显的下降[见图 1(d)]。该结果说明,在实验过程中固定在底板上的 VWF A2 没有被 ADAMTS13 分子所酶切。

### 2.2 WT ADAMTS13 与 VWF A2 的结合呈现更高的分子键强度和稳定性

为了比较 WT 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2

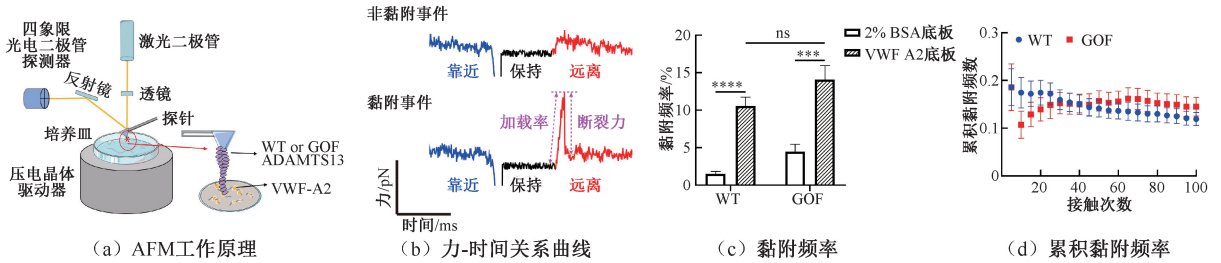


图 1 AFM ramp 模式测量 WT 或 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 间的黏附频率

Fig. 1 Adhesion frequency between WT or GOF ADAMTS13 and VWF A2 measured with the AFM ramp mode (a) AFM experimental setup, (b) Force-time curves, (c) Adhesion frequency, (d) Accumulative adhesion frequency

注: ns, 没有显著性差异; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

相互作用的分子键强度及稳定性,分析不同加载率下的分子键断裂力的分布情况,并作动态力谱(Dynamics Force Spectroscopy)分析<sup>[17]</sup>。WT 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 相互作用的断裂力均随着加载率的升高而增大,不同加载率下的最概然断裂力由式(1)、(2)拟合计算得到[见图 2(a)]。以加载率为  $X$  轴,以对应的最概然断裂力为  $Y$  轴,可以得到加载率与断裂力的关系曲线[见图 2(b)]。利

用 Bell-Evans 模型[式(2)]对加载率-断裂力关系曲线进行拟合,得到 WT/GOF ADAMTS13 与 VWF A2 复合物的解离速率分别为  $1.50/3.28 \text{ s}^{-1}$ ,能障宽度  $d$  分别为  $0.41/0.29 \text{ nm}$ 。与 GOF ADAMTS13-VWF A2 相比,WT ADAMTS13-VWF A2 的能障宽度更长,且复合物解离速率更低,说明 WT ADAMTS13 与 VWF A2 之间的分子键强度更高、结合更稳定。

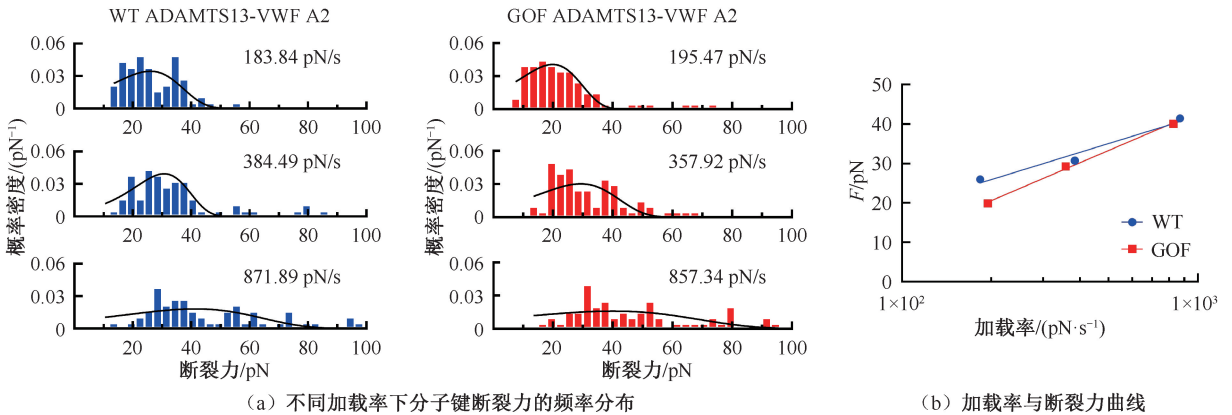


图 2 WT 或 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 结合的动力学力谱分析

Fig. 2 Dynamics force spectra for WT or GOF ADAMTS13-VWF A2 binding (a) Distributions of rupture force at different loading rates, (b) Rupture force-loading rate curves

### 2.3 WT/GOF ADAMTS13 与 VWF A2 相互作用的力依赖特性

为了进一步研究机械力对 ADAMTS13 分子与 VWF A2 相互作用的调控特性,利用 AFM 的 clamp 模式测量不同作用力下复合物分子键的生存寿命[见图 3(a)]。同样地,为了排除在样品回撤及保持恒力的过程中 ADAMTS13 分子酶切 VWF A2 的可能性,一方面,只选取回撤过程中仅有一次力下

降的事件进行分析,因为这样的事件中 VWF A2 没有发生构象变化,其被酶切的可能性较小<sup>[9]</sup>;另一方面,分析在 clamp 模式测量过程中的累积黏附频率。结果表明,WT 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 间的累积黏附频率曲线最终均趋向平稳,说明在实验过程中没有发生酶切事件[见图 3(b)]。

复合物分子键生存寿命结果显示,WT ADAMTS13 与 VWF A2 结合的分子键平均生存寿

命为 $(0.51 \pm 0.04)$  s,显著高于 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 结合的分子键平均生存寿命 $(0.36 \pm 0.03)$  s[见图 3(c)]。分析不同外力作用下复合物分子键的平均生存寿命的结果显示,WT 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 的相互作用均受“逆锁键”-“滑移键”转换的调控,即随着外力的增加分子键的平均生存寿命先增大,受“逆锁键”调控;在分子键的平均生存寿命达到最大值后,随着外力的进一步增加分子键平均生存寿命随之减小,受“滑移键”调控[见图 3(d)]。该结果与本课题组先前报道的 ADAMTS13 与 VWF A1A2A3 三联体相互作用受“逆锁键”-“滑移键”调控的结论一致<sup>[12]</sup>,提示外力调

控 ADAMTS13 与 VWF A1A2A3 三联体的相互作用主要通过调控 ADAMTS13 与 VWF A2 结构域的相互作用实现。虽然两个复合物的受力调控呈现相同的趋势,但它们受力调节的临界点有所不同:WT ADAMTS13-VWF A2 复合物的临界点约为 40 pN,而 GOF ADAMTS13-VWF A2 复合物的临界点约为 54 pN。值得注意的是,在加载力小于 40 pN 的范围内,WT ADAMTS13-VWF A2 分子键的生存寿命均高于 GOF ADAMTS13-VWF A2 分子键的生存寿命。以上结果表明,相较于 GOF ADAMTS13,WT ADAMTS13 与 VWF A2 的结合具有更高的力学稳定性。

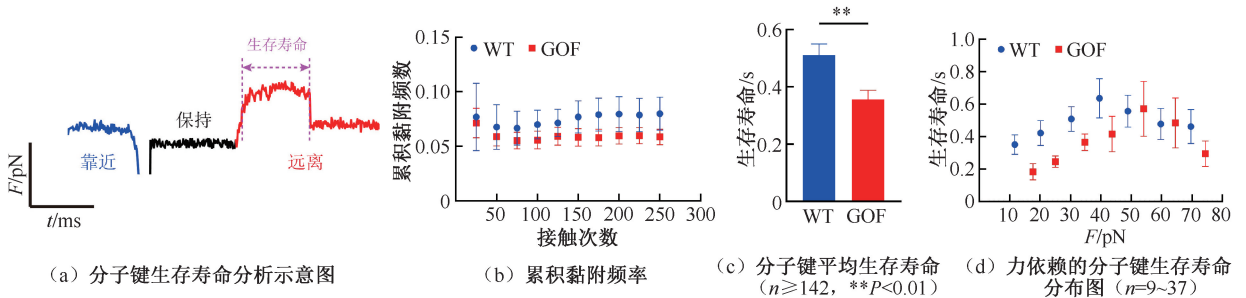


图 3 WT 或 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 的相互作用受“逆锁键”-“滑移键”调控

Fig. 3 Interaction of WT or GOF ADAMTS13 and VWF A2 was regulated by catch-slip bond (a) Diagram of bond lifetime in the force-time curve, (b) Accumulative adhesion frequency, (c) Average bond lifetimes, (d) Distributions of force-dependent bond lifetime ( $n=9-37$ )

接着,对不同作用力下的分子键生存寿命进行生存概率 vs 分子键生存寿命作图,并根据一阶、不可逆近似,小系统概率动力学理论,利用式(3)对数据进行拟合[见图 4(a)],得到不同作用力条件下分子键的理论解离速率(见表 1)。结果显示,WT ADAMTS13 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 的解离

速率总体上均随着加载力的增加,呈现先减少后增加的趋势。根据分子键生存寿命 $t = 1/K_{off}$ ,绘制不同外力作用下分子键生存寿命图[见图 4(b)]。结果表明,WT ADAMTS13 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 相互作用同样呈现“逆锁键”到“滑移键”转化的双相力学调控特征。该结果进一步表明,WT

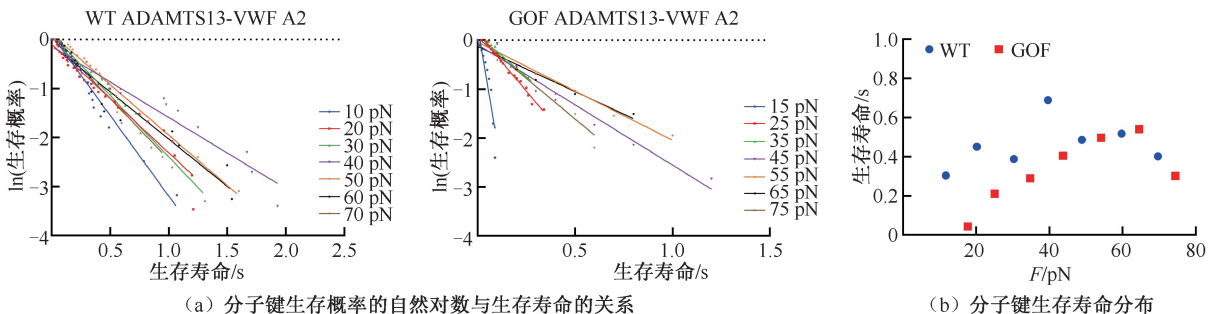


图 4 WT 或 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 结合的力依赖动力学特性

Fig. 4 Force-dependent kinetics of WT or GOF ADAMTS13 interacting with VWF A2 (a) Relationship between the natural logarithm of the survival probability of bond lifetime and bond lifetime, (b) Distribution of bond lifetime

ADAMTS13 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 相互作用均受双相力依赖的机制调控。

表 1 不同作用力下 WT 或 GOF ADAMTS13-VWF A2 复合物的解离速率

Tab. 1 Dissociation rates of WT or GOF ADAMTS13-VWF A2 complex under different applied forces

分组	$F/\text{pN}$	解离速率/ $(\text{s}^{-1})$	生存寿命/s
WT ADAMTS13	11	3.30	0.30
	20	2.22	0.45
	30	2.51	0.40
	40	1.45	0.69
	48	2.06	0.49
	60	1.93	0.52
	70	2.49	0.40
	GOF ADAMTS13	17	23.31
	25	4.64	0.22
	34	3.32	0.30
	43	2.47	0.41
	54	2.01	0.50
	64	1.85	0.54
	74	3.32	0.30

### 3 讨论与展望

本文研究在短暂接触时间(0.8 s)内,WT 或 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 相互作用的力依赖特性。结果发现,在外力作用下,“逆锁键”-“滑移键”转换的机制调控 WT 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 的相互作用,这与本课题组先前研究中发现的 ADAMTS13 与 VWF A1A2A3 相互作用呈现双相力依赖特性一致,说明这一调控机制主要通过调控 VWF A2 结构域与 ADAMTS13 的相互作用实现。本研究中的断裂力和分子键寿命结果表明,WT ADAMTS13 与 VWF A2 间分子键的机械强度和力学稳定性均高于 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 间的分子键。这一结果与文献[8]中报道的 GOF ADAMTS13 酶切 VWF 效率高于 WT ADAMTS13 不一致,推测不一致可能来自以下两方面:① 在传统的酶切反应生化实验中,往往需要将两个分子进行长时间孵育(30 min 或更长),而本研究中,ADAMTS13 分子与 VWF A2 分子接触的时间非常短暂,仅 0.8 s。② 文献[8]中报道的酶切实验使用的是 VWF73 肽段。VWF73 上 ADAMTS13 各个结构域的结合位点均处于暴露状态,而本文使用的是全长的 VWF A2 分子。固定在底板上的 VWF A2

分子的构象很可能没有完全解折叠,ADAMTS13 的结合位点也未完全暴露。

通过拟合 Bell-Evans 模型,获得了 WT ADAMTS13 与 VWF A2 相互作用的动力学参数为能障宽度  $d = 0.41 \text{ nm}$ ,生存寿命  $t = 0.67 \text{ s}$ ;GOF ADAMTS13 与 VWF A2 相互作用的动力学参数为能障宽度  $d = 0.29 \text{ nm}$ ,生存寿命  $t = 0.30 \text{ s}$ 。因此,0 N 力状态下 WT 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 的分子键寿命均高于本研究所测得的 10 pN 左右分子键的平均寿命。该结果提示,在小力条件下(如 10 pN 以下),ADAMTS13 与 VWF A2 相互作用可能受“滑移键”调控;当外力增大后,该相互作用从“滑移键”转变为“逆锁键”;随着外力进一步增加并大于临界值后,“逆锁键”转变为“滑移键”,即在整个受力范围内存在着“滑移键”-“逆锁键”-“滑移键”三相力调控机制。有趣的是,在 VWF A1A2A3 三联体与 ADAMTS13 的短截体 Mp-TSP6 的相互作用中,也发现了三相力依赖的调控机制<sup>[12]</sup>。此外,在先前的报道中也存在着类似的三相力调控机制。利用生物膜力探针技术,Wayman 等<sup>[19]</sup>观察到 E 选择素与其配体的相互作用受“滑移键”-“逆锁键”-“滑移键”三相力调节机制的调控。同样是利用生物膜力探针技术,Ju 等<sup>[20]</sup>研究 GPIIb $\alpha$  与 VWF 相互作用的过程发现该相互作用受“逆锁键”-“滑移键”转换的双相力依赖调控;然而 VWF 1238-A1(包含 N 末端侧翼序列 Gln1238-Gln1260)与 GPIIb $\alpha$  的相互作用受三相力依赖调控。在小力条件下,ADAMTS13 与 VWF A2 的相互作用是否受“滑移键”调控,还需进一步的实验证实。

本文利用 AFM 技术,在单分子水平上展现了 WT 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 短暂接触后成键的力学响应特性。相较于 GOF ADAMTS13,WT ADAMTS13 与 VWF A2 相互作用形成的分子键具有更高的机械强度和稳定性。WT 和 GOF ADAMTS13 与 VWF A2 的相互作用呈现了“逆锁键”-“滑移键”转换的力学响应特性。

### 参考文献:

- [1] 谢旭斌,刘文平,吴建华,等. 采用分子动力学模拟方法探究  $\text{Ca}^{2+}$  对 VWF-A2 结构域稳定性的影响[J]. 医用生物力学, 2018, 33(3): 248-254.

- XIE XB, LIU TP, WU JH, *et al.* Effects of calcium on the stability of VWF-A2 domain by molecular dynamics simulation [J]. *J Med Biomech*, 2018, 33(3): 248-254.
- [ 2 ] 刘思璐, 刘晓玲, 吴建华, 等. 流体剪应力作用下 VWF-A1A2A3 介导的血小板 P-选择素的原位表达 [J]. *医用生物力学*, 2017, 32(2): 188-193.
- LIU SL, LIU XL, WU JH, *et al.* VWF-A1A2A3-mediated expression of P-selectin in platelets under flow shear stress [J]. *J Med Biomech*, 2017, 32(2): 188-193.
- [ 3 ] ZHOU YF, ENG ET, ZHU J, *et al.* Sequence and structure relationships within von Willebrand factor [J]. *Blood*, 2012, 120(2): 449-458.
- [ 4 ] BREHM MA. Von Willebrand factor processing [J]. *Hamostaseologie*, 2017, 37(1): 59-72.
- [ 5 ] ZHENG XL. Structure-function and regulation of ADAMTS-13 protease [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(Suppl. 1): 11-23.
- [ 6 ] SOUTH K, FREITAS M O, LANE D A. A model for the conformational activation of the structurally quiescent metalloprotease ADAMTS13 by von willebrand factor [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(14): 5760-5769.
- [ 7 ] ZHU J, MUIA J, GUPTA G, *et al.* Exploring the “minimal” structure of a functional ADAMTS13 by mutagenesis and small-angle X-ray scattering [J]. *Blood*, 2019, 133(17): 1909-1918.
- [ 8 ] JIAN C, XIAO J, GONG L, *et al.* Gain-of-function ADAMTS13 variants that are resistant to autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. *Blood*, 2012, 119(16): 3836-3843.
- [ 9 ] ZHANG X, HALVORSEN K, ZHANG CZ, *et al.* Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von willebrand factor [J]. *Science*, 2009, 324(5932): 1330-1334.
- [ 10 ] ZANARDELLI S, CHION ACK, GROOT E, *et al.* A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF [J]. *Blood*, 2009, 114(13): 2819-2828.
- [ 11 ] ZHENG X, NISHIO K, MAJERUS EM, *et al.* Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(32): 30136-30141.
- [ 12 ] LI Z, LIN J, SULCHEK T, *et al.* Domain-specific mechanical modulation of VWF-ADAMTS13 interaction [J]. *Mol Biol Cell*, 2019, 30(16): 1920-1929.
- [ 13 ] MCEVER RP, ZHU C. Rolling Cell Adhesion [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010, 26(1): 363-396.
- [ 14 ] MORIKIS VA, CHASE S, WUN T, *et al.* Selectin catch-E bonds mechanotransduce integrin activation and neutrophil arrest on inflamed endothelium under shear flow [J]. *Blood*, 2017, 130(19): 2101-2110.
- [ 15 ] ZHU C, CHEN W, LOU J, *et al.* Mechanosensing through immunoreceptors [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(10): 1269-1278.
- [ 16 ] YU S, LIU W, FANG J, *et al.* AFM imaging reveals multiple conformational states of ADAMTS13 [J]. *J Biol Eng*, 2019, 13(1): 1-11.
- [ 17 ] KOCH SJ, WANG MD. Dynamic force spectroscopy of protein-DNA interactions by unzipping DNA [J]. *Phys Rev Lett*, 2003, 91(2): 028103.
- [ 18 ] EVANS E. Looking inside molecular bonds at biological interfaces with dynamic force spectroscopy [J]. *Biophys Chem*, 1999, 82(2-3): 83-97.
- [ 19 ] WAYMAN AM, CHEN W, MCEVER RP, *et al.* Triphasic force dependence of E-selectin/ligand dissociation governs cell rolling under flow [J]. *Biophys J*, 2010, 99(4): 1166-1174.
- [ 20 ] JU L, DONG JF, CRUZ MA, *et al.* The N-terminal flanking region of the A1 domain regulates the force-dependent binding of von Willebrand factor to platelet glycoprotein Iba $\alpha$  [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(45): 32289-32301.