

文章编号:1004-7220(2023)04-0655-08

·论著·

力依赖的 $\beta 2$ 整合素-FLNa 相互作用与 THR758 磷酸化

邵鑫¹, 姬彦儒¹, 黄文华², 方颖¹, 吴建华¹

(1. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 生物力学研究所, 广州 510006; 2. 南方医科大学 基础医学院, 人体解剖学教研室, 广东省医学生物力学重点实验室, 广东省医学 3D 打印应用转化工程技术研究中心, 广州 510515)

摘要:目的 探究 $\beta 2$ 整合素/FLNa 相互作用的力学调控机制、磷酸化效应与分子结构基础。方法 $\beta 2$ 整合素/FLNa-WT 和 T758P 晶体结构取自蛋白质数据库 (protein data bank, PDB), 进行分子动力学 (molecular dynamics, MD) 模拟, 采用 MM/PBSA 方法计算复合物结合自由能变化, 并分析构象演化与残基相互作用等数据。结果 $\beta 2$ 整合素 THR⁷⁵⁸ 磷酸化修饰后, 复合物的结合自由能下降, 拉力累积降低。单纯的力学信号刺激下, $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物的解离呈现出双相力依赖特性, 而磷酸化后复合物的结合解离过程存在单纯的滑移键机制。结论 磷酸化将通过减弱 M762-G2269 残基相互作用, 下调 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物的结合亲和力, 张力将双向调节复合物的解离。研究结果有助于加深对炎症反应过程的认识, 并为相关药物靶点的发现和抗体设计提供有益参考。

关键词: $\beta 2$ 整合素; 细丝蛋白 A; 分子动力学模拟; 磷酸化; 结合亲和力

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2023.04.003

Force-Dependent $\beta 2$ Integrin-FLNa Interaction with THR758 Phosphorylation

SHAO Xin¹, JI Yanru¹, HUANG Wenhua², FANG Ying¹, WU Jianhua¹

(1. Institute of Biomechanics, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Engineering Research Center for Translation of Medical 3D Printing Application, Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Biomechanics, Department of Human Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanical regulatory mechanisms, phosphorylation effects and molecular structural basis of $\beta 2$ integrin/FLNa interactions. **Methods** The crystal structures of $\beta 2$ integrin/FLNa-WT and T758P complex were taken from PDB, and performed molecular dynamics simulations. The MM/PBSA method was used to calculate the binding free energy changes of the complex, and data on conformational evolution and residue interactions were analyzed. **Results** Following phosphorylation modification of $\beta 2$ integrin THR⁷⁵⁸, the binding free energy of the complex and the pulling force accumulation were significantly decreased. The dissociation of $\beta 2$ integrin/FLNa complex showed a biphasic force-dependent property under the stimulation of mechanical signals. A pure slip-bonding mechanism existed in the binding dissociation process of the complex after phosphorylation modification. **Conclusions** The phosphorylation would down-regulate the binding affinity of $\beta 2$ integrin/FLNa complex by attenuating the M762-G2269 residue interaction, and tension would bidirectionally regulate the dissociation of the complex. This study contributes to deeper understanding of the inflammatory response process, and provides useful references for the discovery of relevant drug targets and antibody design.

Key words: $\beta 2$ integrin; filamin A (FLNa); molecular dynamics simulation; phosphorylation; binding affinity

收稿日期:2022-08-07; 修回日期:2022-11-11

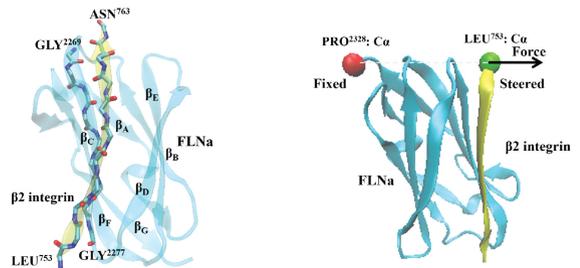
基金项目:国家自然科学基金项目(12072117, 12172137, 31972915)

通信作者:吴建华,教授,E-mail:wujianhua@scut.edu.cn

白细胞在感染或损伤部位的募集,需经历滚动、黏附、稳定黏附、爬行和迁移过程^[1]。其中,内皮细胞表面的细胞间黏附分子-1与白细胞表面的 $\beta 2$ 整合素相互作用,介导白细胞的稳定黏附和跨内皮迁移^[2]。 $\beta 2$ 整合素的激活,是白细胞炎症反应过程的关键事件^[3]。细丝蛋白A(filamin A, FLNa)是整合素激活的主要负调节剂,可以与 $\beta 2$ 整合素结合,并抑制白细胞的黏附和迁移^[4-5]。FLNa由两条约280 kDa的多肽链组成,每个单体都由其N末端的1个肌动蛋白结合结构域(actin binding domain, ABD)和24个免疫球蛋白样重复序列(Ig)构成的杆状结构组成,每个Ig序列中约包含96个氨基酸残基^[6]。FLNa第21个Ig重复序列(IgFLNa21)通过占据重叠的结合位点,从而直接竞争性抑制整合素激动剂 talin、kindlin 与 $\beta 2$ 胞质尾部的结合^[7-8]。亲和层析和 Western blotting 实验研究表明, $\beta 2$ 整合素胞质尾部 THR⁷⁵⁸磷酸化后, $\beta 2$ 整合素/FLNa复合物亲和力减弱,进而诱导 $\beta 2$ 整合素从FLNa中解离出来^[9-10]。因此,THR⁷⁵⁸是调控 $\beta 2$ 整合素/FLNa结合解离的磷酸化开关^[11]。同时,整合素是重要的力敏感蛋白,可以感受并传递胞外血流剪应力以及周围组织的挤压牵引,通过自身的变形来影响和激活下游信号^[12]。然而,由于 $\beta 2$ 整合素胞质尾部与FLNa的结合与解离发生在胞内,目前尚缺少有效的实验观察手段获取它们的反应动力学信息,力学信号与THR⁷⁵⁸磷酸化究竟如何调控 $\beta 2$ 整合素/FLNa的亲和力更不清晰。

分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟在分子力场的基础上,能够从原子层面给出体系的微观演变过程,揭示蛋白之间的相互作用和分子的构象变化,对于机制研究具有重要作用。近年来,随着各种新计算策略的发展和应用,蛋白分子构效关系和调控机制方面的研究取得了长足进步。Liu等^[13]采用自由MD模拟,揭示了局部动力学驱动的功能增强型血管性血友病因子A1结构域的亲和力调控机制;本课题组发展了“恒力拉伸(force-clamp)”、“恒速拉伸(force-ramp)”等拉伸MD模拟手段,成功探索了力对胞内信号通路力学稳定性和强度的调控,发现胞内分子相互作用的“逆锁键(catch-bond)”现象^[14-16],即随着外力的增加,分子键呈现增强后减弱的特征。晶体结构表明IgFLNa21结构域由7个 β 片层以及连接片

层的 β -转角结构和环链(loop)所组成(见图1), β_C 和 β_D 片层之间形成了配体的结合口袋;而 $\beta 2$ 整合素胞内域远膜端基序(⁷⁵³LFKSATITVMN⁷⁶³)主要由 β 片层结构组成^[17],该结构以规范的方式交叉插入到IgFLNa21结构域的 β_C 和 β_D 片层之间的结合口袋中。本研究采用MD模拟技术,将已解析出来的 $\beta 2$ 整合素/FLNa复合物晶体结构作为研究对象,探究磷酸化修饰和力学信号刺激单独或协同作用对复合物结合亲和力的调控机制,寻找接触面上发挥重要作用的残基对,期望为以 $\beta 2$ 整合素/FLNa为靶标的疗法提供思路。



(a) $\beta 2$ 整合素/FLNa晶体结构 (b) 复合物拉伸方案

图1 $\beta 2$ 整合素/FLNa复合物结构示意图与拉伸方案

Fig.1 Schematic structure and stretching scheme of the $\beta 2$ integrin/FLNa complex (a) Structure of $\beta 2$ integrin/FLNa, (b) Stretching scheme of the complex

1 材料与方法

1.1 体系搭建

使用可视化分子模拟软件VMD1.9.2^[18]分别构建两个 $\beta 2$ 整合素/FLNa复合物分子系统:未磷酸化修饰的复合物晶体结构取自蛋白质数据库(protein data bank, PDB),代码为2JF1,FLNa残基号为2237-2328, $\beta 2$ 整合素残基号为753-763,命名为 $\beta 2$ 整合素/FLNa-WT。使用charmm补丁THP2将 $\beta 2$ 整合素/FLNa-WT复合物中带有-OH基的THR758残基转变为磷酸苏氨酸,命名为 $\beta 2$ 整合素/FLNa-T758P。确定初始构象后,通过VMD软件对各个复合物体系进行溶质化和离子化处理,使系统更接近真实的生理环境。调用SOLVATE程序包使复合物沉浸在距离边框至少1.5 nm的TIP3水分子环境中,通过AUTOIONIZE程序包添加生理盐水浓度的氯化钠,使体系总电荷数为0。最终水框尺寸为7.242 nm \times 6.012 nm \times 6.028 nm, $\beta 2$ 整合素/FLNa-WT和 $\beta 2$ 整合素/FLNa-T758P体系原子总数

分别为 24 256 和 24 255。

1.2 MD 模拟

1.2.1 能量最小化和平衡 MD 模拟 利用 MD 模拟软件 NAMD2.14^[19] 在 CHARMM27 全原子力场下进行能量最小化和平衡运算, 使用 VMD 进行数据分析。表面效应通过周期性边界条件 (periodic boundary conditions, PBC) 避免, 积分时间步长为 2 fs。短程静电相互作用和范德华相互作用的阈值设置为 1.2 nm, 长程静电相互作用采用埃瓦尔德粒子网格算法 (particle mesh Ewald, PME) 运算^[20-21]。能量最小化后, 恒温 (36.85 °C)、恒压 (101 kPa) 条件下对体系各进行 3 次 40 ns 的平衡 MD 模拟。

1.2.2 恒速度拉伸 MD 模拟 选择 $\beta 2$ 整合素/FLNa-WT 和 $\beta 2$ 整合素/FLNa-T758P 体系能量平衡过程后期最稳定构象作为初始构象。固定 FLNa 分子上 C 末端 PRO²³²⁸ 残基 C α 原子, $\beta 2$ 整合素 N 末端 LEU⁷⁵³ 残基 C α 原子为拉伸端, 虚拟弹簧的弹性系数为 139 pN/nm, 拉伸速度为 0.3 nm/ns, 拉伸方向为固定原子和拉伸原子连线方向。每个体系的恒速拉伸平行重复 3 次, 模拟时间以拉伸过程中复合物解离为止。

1.2.3 恒力拉伸 MD 模拟 恒速拉伸模式下 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物受力达到 25、50 pN 时调整为恒力拉伸模式, 撤去虚拟弹簧, 沿袭恒速拉伸体系时的固定点、拉伸点和拉伸方向, 保持力大小不变。每个体系各个力条件均进行 40 ns 的 3 次重复模拟计算, 平衡模拟过程视为 0 N 力拉伸。

1.3 数据分析

采用重原子位置的均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD)、旋转半径表征蛋白构象变化和结构稳定性。氢键和盐桥定义如下^[13,16]: 若供体原子与受体原子间的距离小于 0.35 nm 且键角小于 30°, 则氢键存在; 当酸性氨基酸侧链上任意氧原子与碱性氨基酸侧链上的氮原子形成的键长小于 0.4 nm 时, 盐桥形成。氢键或盐桥的生存率 p 定义为 MD 模拟过程中键存在时间与总模拟时间的比值。复合物的结合自由能计算公式为:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{MM}} + (\Delta G_{\text{solv,polar}} + \Delta G_{\text{solv,nonpolar}}) - T\Delta S \quad (1)$$

式中: ΔE_{MM} 为复合物在真空中的结合自由能; $\Delta G_{\text{solv,polar}}$ 为极性溶剂化能; $\Delta G_{\text{solv,nonpolar}}$ 为非极性溶剂化能; $T\Delta S$ 为构象熵变能。

溶剂可及表面积 (solvent accessible surface area, SASA) 是指生物分子可被溶剂接触到的表面积, 而溶剂不可及表面积 (buried SASA) 用于表征复合物接触面面积, 由受配体单体以及复合物的 SASA 进行差值计算而得出。

2 结果

2.1 平衡过程中 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物各体系的稳定性

两个复合物体系 3 次 40 ns 平衡 MD 模拟过程中, RMSD、旋转半径随模拟时间的波动如图 2 所示。

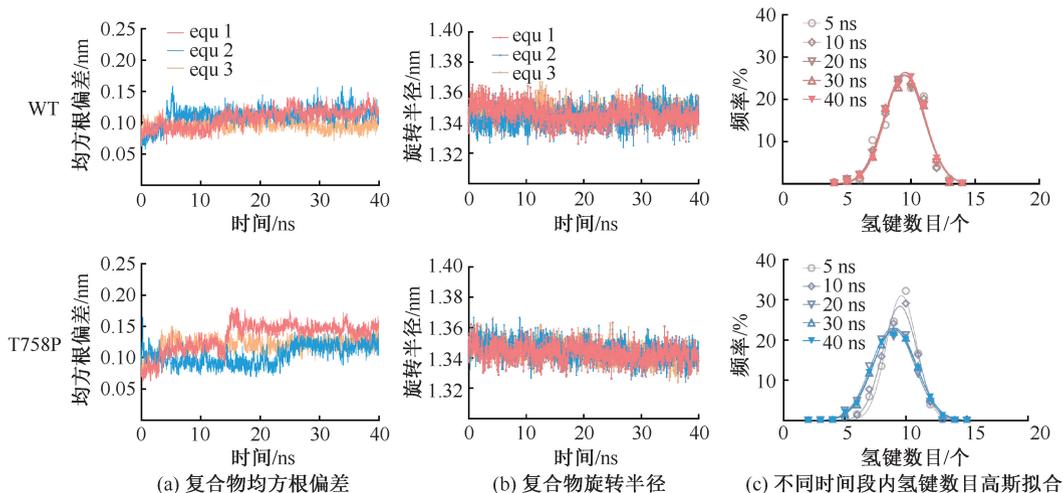


图 2 平衡过程中 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物的结构稳定性

Fig. 2 Structural stability of $\beta 2$ integrin/FLNa complex during equilibrium (a) RMSD of the complex, (b) Radius of rotation of the complex, (c) Gaussian fitting of the number of H-bonds in different time periods

结果表明,两个体系 RMSD 没有明显爬坡现象,而且模拟后期的 RMSD 波动在 0.1 nm 以内;旋转半径的时间历程曲线较为平稳,表明两个系统已达到稳态。 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物结合面间的氢键数目符合正态分布,且随着模拟时长的增加拟合优度越好,说明构象取样空间趋向完备,可以为后续的拉伸 MD 模拟提供稳定初始构象。

氢键与盐桥在维持复合物稳定构象中发挥重要作用,故本文对平衡过程中氢键与盐桥的生存率进行分析计算,以确定复合物接触面上的重要残基。结果表明,排名前 10 的氢键和仅有的 2 对盐桥生存率存在差异(见表 1)。磷酸化修饰后, $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物结合面上氢键和盐桥相互作用网络发生变化。相比于 WT 型体系,磷酸化后原来排名第 1 的氢键 MET⁷⁶²-GLY²²⁶⁹ 生存率下降,而 PHE⁷⁵⁴-GLY²²⁷⁷ 氢键相互作用增强。磷酸化后,存在于接触面上的 LYS⁷⁵⁵-GLU²²⁷⁶ 和 LYS⁷⁵⁵-GLU²³⁰⁶ 这两对盐桥的生存率略有下降。本文认为,磷酸化修饰可以改变 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物的结合状态,尤其体现在结合面上重要氢键和盐桥的差异中。

表 1 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物结合面上排名靠前的氢键和盐桥
Tab. 1 Top H-bonds and salt bridges on binding surface of $\beta 2$ integrin/FLNa

序号	类型	$\beta 2$ 整合素残基	FLNa 残基	生存率	
				WT	T758P
1	H	MET ⁷⁶²	GLY ²²⁶⁹	0.97±0.00	0.85±0.19
2	H	THR ⁷⁵⁸	ILE ²²⁷³	0.97±0.01	0.98±0.01
3	H	SER ⁷⁵⁶	VAL ²²⁷⁵	0.97±0.01	0.98±0.00
4	H	THR ⁷⁶⁰	LEU ²²⁷¹	0.96±0.01	0.95±0.02
5	H	PHE ⁷⁵⁴	GLY ²²⁷⁷	0.75±0.37	0.97±0.01
6	H	SER ⁷⁵⁶	ALA ²²⁸¹	0.70±0.09	0.71±0.04
7	H	LYS ⁷⁵⁵	GLU ²²⁷⁶	0.38±0.11	0.36±0.05
8	H	LEU ⁷⁵³	GLY ²²⁷⁷	0.07±0.07	0.07±0.02
9	H	LYS ⁷⁵⁵	LYS ²²⁸⁰	0.05±0.01	0.05±0.01
10	H	SER ⁷⁵⁶	LYS ²²⁸⁰	0.04±0.03	0.02±0.01
11	S	LYS ⁷⁵⁵	GLU ²²⁷⁶	0.58±0.17	0.54±0.07
12	S	LYS ⁷⁵⁵	GLU ²³⁰⁶	0.02±0.01	0.01±0.01

将 WT 型和 T758P 型的 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物结构对齐后进行比较,发现修饰后的 $\beta 2$ 整合素 C 末端向外侧偏转远离接触面,而 N 末端则向接触面靠近(见图 3)。 $\beta 2$ 整合素构象的偏转很可能导致氢键 MET⁷⁶²-GLY²²⁶⁹ 生存率的下降和 PHE⁷⁵⁴-GLY²²⁷⁷ 的增强,从而与其与 FLNa 的相互作用。

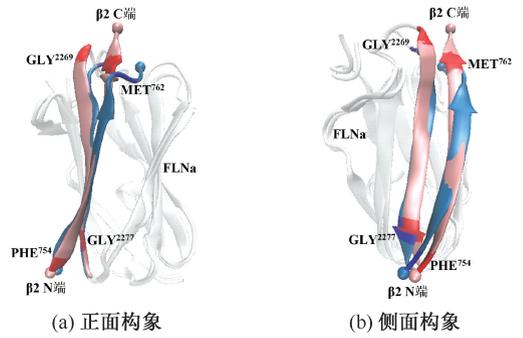


图 3 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物结构对比
Fig. 3 Comparison of $\beta 2$ integrin/FLNa structures

(a) Front conformation, (b) Lateral conformation
注:粉红色表示 WT 体系中的 $\beta 2$ 整合素,浅蓝色表示 T758P 体系中的 $\beta 2$ 整合素。

2.2 磷酸化修饰减弱复合物结合亲和力的动力学机制

从平衡模拟中每间隔 40 ps 提取 1 个构象,共 1 000 帧构象用于计算 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物的结合自由能。结合自由能绝对值越大,意味着复合物间的相互作用越强。与已往的实验研究一致^[9],THR⁷⁵⁸ 磷酸化修饰降低了 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物的结合自由能,使复合物的亲和力下降(见表 2)。

表 2 用 MM/PBSA 方法计算的 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物结合自由能
Tab. 2 Binding free energies for $\beta 2$ integrin/FLNa complex computed by the MM/PBSA method 单位:(kcal·mol⁻¹)

体系	ΔE_{MM}	ΔG_{polar}	$\Delta G_{nonpolar}$	ΔG_{bind}^f
WT	-273.14±15.59	83.93±2.79	-8.45±0.18	-197.66±12.87
T758P	-128.59±13.01	76.20±9.11	-8.62±0.09	-61.01±3.96

研究表明,蛋白质功能与空间构象有着密切关联^[15]。 $\beta 2$ 整合素 THR⁷⁵⁸ 磷酸化到底引起怎样的构象改变?分析各体系 $\beta 2$ 整合素单体内部的氢键相互作用,结果表明,与 WT 型相比,T758P 型 $\beta 2$ 分子内部氢键相互作用增强,平均氢键数目增加了 0.65 个[见图 4(a)]。同时,T758P 型旋转半径小于 WT 型[见图 4(b)],磷酸化修饰后 $\beta 2$ 整合素的结构要更为紧密。跟踪平衡过程中 IgFLNa21 氨基酸残基 C α 原子均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF)发现:与 WT 型相比,T758P 体系 β_B 与 β_C 、 β_D 与 β_F 间的 loop 结构 RMSF 值略有增加,而 β_C 与 β_D 片层间的 loop 波动较小或保持不变[见图 4(c)]。 β_C 、 β_D 片层以及之间的 loop 组成了

FLNa 的结合口袋,其结构相对稳定。因此,本文推断 THR⁷⁵⁸ 磷酸化修饰增强了 $\beta 2$ 整合素的内部氢键作

用,并使其空间结构更加致密,更容易从 FLNa 的结合口袋中脱落出来,从而减弱复合物的结合亲和力。

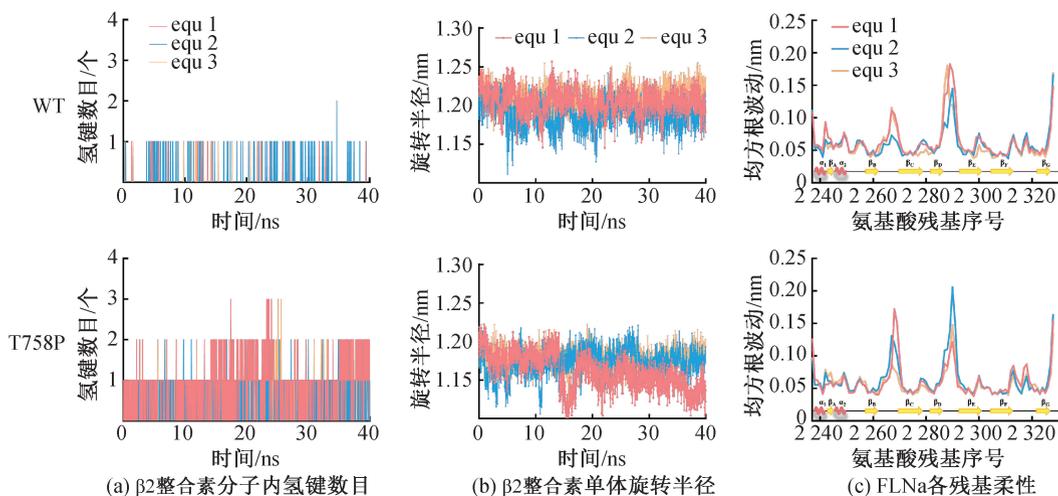


图4 磷酸化修饰诱导的复合物结构改变

Fig. 4 Structural alterations of the complex induced by phosphorylation modification (a) Number of H-bonds within the $\beta 2$ molecule, (b) Radius of rotation of the $\beta 2$ monomer, (c) Residues in the FLNa monomer

2.3 磷酸化修饰弱化复合物的机械强度

选取各体系平衡后期的稳定构象进行恒速拉伸,以研究 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物在力学信号刺激下的应变和解离过程。拉伸过程中的力谱曲线和接触面面积(即溶剂不可及表面积)的时间历程如图 5 所示。

在 WT 体系中,前 7 ns 内力谱曲线逐渐上升,

接触面面积保持在 6.5 nm^2 左右,之后的 1 ns 中力谱曲线达到最大值,随后拉力迅速下降,最终在 $(24.9 \pm 4.2) \text{ ns}$ 复合物完全解离开来。将恒速拉伸过程中力谱曲线的最大峰值定义为解离力,即复合物解离需要克服的最大内部阻力,可评价复合物的力学强度。然而,在 T758P 体系中,3 次模拟过程出现了若干峰值,且后面的峰值与第 1 个峰值基本相

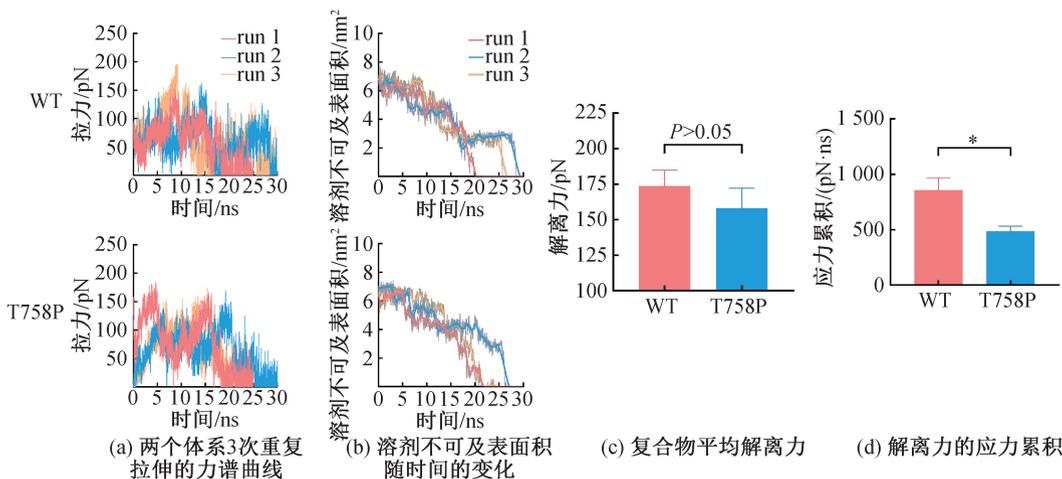


图5 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物拉伸解离

Fig. 5 Steered dissociation of the $\beta 2$ integrin/FLNa complex (a) Force spectra curves for three repeated stretches of both systems, (b) Variation of buried SASA with time, (c) Rupture forces of the complex, (d) Stress accumulation of the rupture forces

注:数据以 3 次重复模拟的平均值 \pm 标准差表示, * $P < 0.05$ 。

当,这意味着复合物内部有解折叠发生,且平均解离时间提前为(23.0±2.8) ns。为了更好地度量复合物解离需要克服的能障,本文引入应力累积(stress accumulation, SSA)概念^[22],即对力谱曲线中力与时间进行积分运算,以评估复合物的机械稳定性。T758P 体系中第1个最大力峰的时间提前至5 ns左右,意味着磷酸化修饰后复合物抵抗外力拉伸的能力下降;平均解离力由(173.7±19.4) pN降为(158.2±23.9) pN,解离力的应力累积显著减小,由(855.3±193.0) pN·ns降至(487.0±77.8) pN·ns,磷酸化减弱复合物的机械强度。

2.4 恒力拉伸模拟中 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物亲和力改变

接着,采用25、50 pN恒力进行40 ns拉伸模拟,并与平衡过程(0 pN)进行比较,分析 $\beta 2$ 整合素/FLNa复合物接触面平均氢键数目以及接触面面积的变化,以探究力对 $\beta 2$ 整合素/FLNa亲和力的调控。结果发现,WT体系中,随着作用力的增大, $\beta 2$ 整合素和FLNa之间的平均氢键数目和接触面面积先增加后减少,呈现出双相力依赖的调控特征(见图6)。该结果表明,25 pN以下的力会诱导复合物亲和力的提高,而25 pN以上的力则会降低复合物的亲和力。T758P体系中 $\beta 2$ 整合素与

FLNa之间的平均氢键数目和接触面面积均随力的增加而减少,呈现出滑移键的特征,即较小的力就足以诱导磷酸化修饰后的复合物亲和力降低。当复合物接触面所有的氢键与盐桥全部断裂时,复合物发生解离。因此,根据模拟过程中氢键(或盐桥)生存率,可以计算出 $\beta 2$ 整合素/FLNa间的解离概率:

$$P_D = \prod_{i=1}^M (1 - P_i) \quad (2)$$

式中: M 为接触面间氢键数目; P_i 为第*i*个氢键的生存率。引入机械调节因子 f_D 以进一步验证机械力调控的 $\beta 2$ 整合素/FLNa复合物结合亲和力的改变^[16]。 f_D 为归一化的解离概率,即不同恒定拉力条件下的 P_D 与拉力为0 N条件下的 P_D 之比:

$$f_D = \frac{P_D \big|_{f=f_0}}{P_D \big|_{f=0}} \quad (3)$$

式中: f 为施加在复合物上的恒力; $f_0=0, 25, 50$ pN。 f_D 与复合物的亲和力之间呈负相关, f_D 越大,复合物结合亲和力越弱,越容易发生解离。WT体系 f_D 和结合自由能呈现出先减小后增大的变化趋势,这同样表明复合物结合亲和力具有先增大后减小的双相调节机制。T758P体系 f_D 和结合自由能呈现出逐渐增大的变化趋势,磷酸化修饰后随着外力增大复合物越容易发生解离。

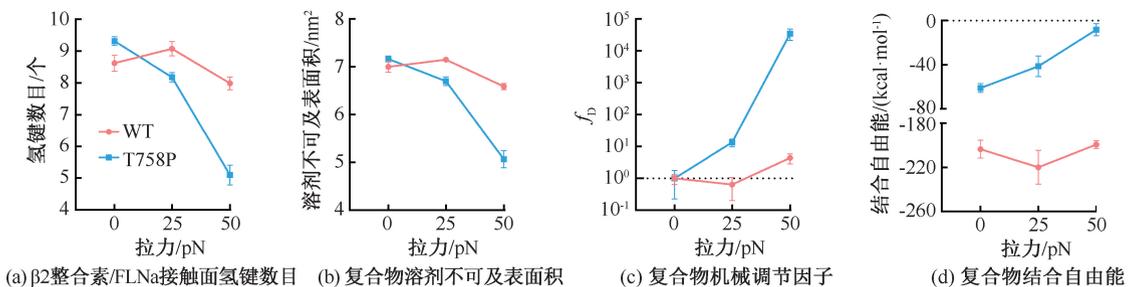


图6 恒力拉伸模拟过程中 $\beta 2$ 整合素/FLNa结合亲和力的力-化学依赖性($n=3$)

Fig. 6 Force-chemical dependence of $\beta 2$ integrin/FLNa binding affinity during simulation of constant force stretching

(a) Number of H-bonds at the $\beta 2$ integrin/FLNa contact surface, (b) Buried SASA of the complex, (c) Mechanical regulatory factor of the complex, (d) Binding free energy of the complex

3 讨论

白细胞 $\beta 2$ 整合素在炎症部位的募集过程中发挥重要作用,只有活化的整合素才能介导白细胞在血管内皮细胞上的稳定黏附和跨内皮迁移。FLNa从 $\beta 2$ 整合素胞质尾的解离,是整合素活化的前置

事件和前提条件^[23]。本文通过MD模拟手段,试图在原子水平上探究磷酸化修饰减弱 $\beta 2$ 整合素/FLNa复合物亲和力的分子结构基础和动力学机制,并采用恒速和恒力拉伸模拟方式,探究磷酸化修饰对复合物机械稳定性的影响。

结果表明, $\beta 2$ 整合素THR⁷⁵⁸磷酸化修饰后,复

合物的结合自由能下降。磷酸基团可与邻近氨基酸残基形成新的氢键,使 $\beta 2$ 整合素分子结构更加紧凑,与 FLNa 的结合面面积缩小,从而更容易从结构相对稳固的 FLNa 结合口袋中脱落出来。磷酸化降低复合物结合面上氢键 MET⁷⁶²-GLY²²⁶⁹ 和盐桥 LYS⁷⁵⁵-GLU²²⁷⁶、LYS⁷⁵⁵-GLU²³⁰⁶ 的生存率,导致 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物结合亲和力的下降。磷酸化修饰后复合物解离力的应力累积下降,表明磷酸化减弱复合物机械稳定性。单纯的力学信号刺激下, $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物的解离呈现出双相力依赖特性,这一特性很可能起到防止白细胞过度激活和炎症反应过激的作用;而磷酸化修饰后复合物解离仅存在单一的滑移键机制,力促进 $\beta 2$ 与 FLNa 的解离,进而调控 $\beta 2$ 整合素的快速活化。

本文使用 MD 模拟技术拓展了 $\beta 2$ 整合素/FLNa 晶体结构的样本空间,定量描述了磷酸化和力在 $\beta 2$ 整合素与 FLNa 相互作用中发挥的功能。黏附分子间的逆锁键现象最早由朱承等^[24] 通过流动腔和原子力显微镜实验发现,此后许多分子对的单分子实验中都观测到逆锁键调控机制^[25-27]。Zhang 等^[16] 采用拉伸 MD 模拟观测到 $\beta 3$ 整合素和 kindlin2 的结合亲和力受到逆锁-滑移键机制调控。本研究发现的 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物相互作用双相力依赖关系中拐点尽管为 25 pN,但由于拉伸 MD 模拟应用于 ns 级别的运算,相较于细胞内受体配体实际相互作用存在着巨大的时间尺度效应,很可能真实生理情况下更小的力会增强 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物结合亲和力。目前由于单分子实验技术的限制,难以对细胞内受配体相互作用进行实验研究, $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物双相力依赖特性的阈值有待于进一步确证。

4 结论

本文通过 MD 模拟手段预测了 $\beta 2$ 整合素/FLNa 复合物结合亲和力的力-化学偶联调控机制,研究结果为细丝蛋白介导的整合素去活化调节提供新的分子见解,有助于加深对炎症反应过程的认识。在模拟中观察到的关键残基相互作用,可为相关药物靶点的发现和抗体设计提供有益的参考和指导。

参考文献:

- [1] MITROULIS I, ALEXAKI VI, KOURTZELIS I, *et al.* Leukocyte integrins: Role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 147: 123-135.
- [2] GORINA R, LYCK R, VESTWEBER D, *et al.* $\beta 2$ integrin-mediated crawling on endothelial ICAM-1 and ICAM-2 is a prerequisite for transcellular neutrophil diapedesis across the inflamed blood-brain barrier [J]. *J Immunol*, 2014, 192(1): 324-337.
- [3] 胡兵, 吴建华, 凌颖琛, 等. 流体剪切力下趋化因子 CXCL12 诱导 Jurkat T 细胞的钙响应机制 [J]. *医用生物力学*, 2020, 35(3): 331-337.
- [4] HU B, WU JH, LING YC, *et al.* Chemokine CXCL12-induced calcium response of Jurkat T cells under fluid shear stress [J]. *J Med Biomech*, 2020, 35(3): 331-337.
- [5] SHARMA CP, EZZELL RM, ARNAOUT MA. Direct interaction of filamin (ABP-280) with the $\beta 2$ -integrin subunit CD18 [J]. *J Immunol*, 1995, 154(7): 3461-3470.
- [6] CALDERWOOD DA, HUTTENLOCHER A, KIOSSES WB, *et al.* Increased filamin binding to β -integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(12): 1060-1068.
- [7] ZHOU J, KANG X, AN H, *et al.* The function and pathogenic mechanism of filamin A [J]. *Gene*, 2021, 784: 145575.
- [8] KIEMA T, LAD Y, JIANG P, *et al.* The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin [J]. *Mol Cell*, 2006, 21(3): 337-347.
- [9] ITHYCHANDA SS, HSU D, LI H, *et al.* Identification and characterization of multiple similar ligand-binding repeats in filamin: Implication on filamin-mediated receptor clustering and cross-talk [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(50): 35113-35121.
- [10] TAKALA H, NURMINEN E, NURMI SM, *et al.* $\beta 2$ integrin phosphorylation on Thr758 acts as a molecular switch to regulate 14-3-3 and filamin binding [J]. *Blood*, 2008, 112(5): 1853-1862.
- [11] FAGERHOLM SC, HILDEN TJ, NURMI SM, *et al.* Specific integrin α and β chain phosphorylations regulate LFA-1 activation through affinity-dependent and -independent mechanisms [J]. *J Cell Biol*, 2005, 171(4): 705-715.
- [12] JAHAN F, MADHAVAN S, ROLOVA T, *et al.* Phosphorylation of the α -chain in the integrin LFA-1 enables $\beta 2$ -chain phosphorylation and α -actinin binding required for cell adhesion [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293

- (32): 12318-12330.
- [12] 杨少雄, 龚晓波. 血管细胞在体力学微环境简析 [J]. 医用生物力学, 2020, 35(4): 502-507.
YANG SX, GONG XB. In vivo mechanical niches of vascular cells [J]. J Med Biomech, 2020, 35(4): 502-507.
- [13] LIU G, FANG Y, WU J. A mechanism for localized dynamics-driven affinity regulation of the binding of von Willebrand factor to platelet glycoprotein Iba α [J]. J Biol Chem, 2013, 288(37): 26658-26667.
- [14] SU S, LING Y, FANG Y, *et al.* Force-enhanced biophysical connectivity of platelet β 3 integrin signaling through talin is predicted by steered molecular dynamics simulations [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 4605.
- [15] FENG J, ZHANG Y, LI Q, *et al.* Biphasic force-regulated phosphorylation site exposure and unligation of ERM bound with PSGL-1: A novel insight into PSGL-1 signaling via steered molecular dynamics simulations [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19): 7064.
- [16] ZHANG Y, LIN Z, FANG Y, *et al.* Prediction of catch-slip bond transition of Kindlin2/ β 3 integrin via steered molecular dynamics simulation [J]. J Chem Inf Model, 2020, 60(10): 5132-5141.
- [17] CHATTERJEE D, ZHIPING LL, TAN SM, *et al.* NMR structure, dynamics and interactions of the integrin β 2 cytoplasmic tail with filamin domain IgFLNa21 [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 5490.
- [18] HUMPHREY W, DALKE A, SCHULTEN K. VMD: Visual molecular dynamics [J]. J Mol Graph, 1996, 14(1): 33-38.
- [19] PHILLIPS JC, BRAUN R, WANG W, *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD [J]. J Comput Chem, 2005, 26(16): 1781-1802.
- [20] 谢旭斌, 刘文平, 吴建华, 等. 采用分子动力学模拟方法探究 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 WP, 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.
- [21] 李圆圆, 宁志龙, 吴建华, 等. A3/A1 复合物对接及结构域之间相互作用的分子动力学研究 [J]. 医用生物力学, 2020, 35(2): 195-201.
LI YY, NING ZL, WU JH, *et al.* Molecular dynamics study on docking of A3/A1 and interdomain interactions [J]. J Med Biomech, 2020, 35(2): 195-201.
- [22] FANG J, SUN X, LIU S, *et al.* Shear stress accumulation enhances von Willebrand factor-induced platelet P-selectin translocation in a PI3K/Akt pathway-dependent manner [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 642108.
- [23] GAHMBERG CG, GRONHOLM M. How integrin phosphorylations regulate cell adhesion and signaling [J]. Trends Biochem Sci, 2022, 47(3): 265-278.
- [24] MARSHALL BT, LONG M, PIPER JW, *et al.* Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules [J]. Nature, 2003, 423(6936): 190-193.
- [25] YAGO T, LOU J, WU T, *et al.* Platelet glycoprotein Iba α forms catch bonds with human WT vWF but not with type 2B von Willebrand disease vWF [J]. J Clin Invest, 2008, 118(9): 3195-3207.
- [26] KONG F, GARCÍA AJ, MOULD AP, *et al.* Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand [J]. J Cell Biol, 2009, 185(7): 1275-1284.
- [27] CHEN W, LOU J, EVANS EA, *et al.* Observing force-regulated conformational changes and ligand dissociation from a single integrin on cells [J]. J Cell Biol, 2012, 199(3): 497-512.