

文章编号: 1004-7220(2020)02-0195-07

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

李圆圆, 宁志龙, 吴建华, 方颖

(华南理工大学 生物科学与工程学院, 广州 510006)

摘要:目的 探究血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF) A1、A3 结构域间的相互作用及 A3 的 2 M 型突变 W1745C 对 A3/A1 热稳定性和机械稳定性的影响。方法 A1、A3 的晶体结构取自 PDB 数据库,首先通过柔性对接获得 WT-A3/A1(野生型)复合物结构;再利用计算机突变技术构建 W1745C-A3/A1 复合物体系;最后采用拉伸分子动力学模拟,观察接触面氢键和盐桥的形成与演化,对比分析 WT-A3/A1 与 W1745C-A3/A1 在复合物构象、解离力和解离时间的差异。结果 WT-A3/A1 接触面之间存在 5 对生存率大于 0.2 的氢键和 1 对生存率大于 0.5 的盐桥;W1745C-A3 突变提高了结合面氢键的生存率并增加 1 对稳定盐桥,从而能够抵抗更大的拉伸力,延缓 A1/A3 的解离。结论 vWF 分子内部 A1 与 A3 的相互作用阻碍 A1 与血小板的结合,而 W1745C-A3 突变则强化这种分子内部的相互作用,降低 A1 对血小板的亲合力。研究结果为深入揭示临床中突变导致的血管性血友病的分子机制及相应药物研制提供参考。

关键词:血管性血友病因子; 分子动力学模拟; 柔性对接; 机械稳定性

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2020.02.011

Molecular Dynamics Study on Docking of A3/A1 and Interdomain Interactions

LI Yuanyuan, NING Zhilong, WU Jianhua, FANG Ying

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To investigate the interaction between von Willebrand factor (vWF) A1 and A3 domain, and type 2 M mutant W1745C-A3 effect on thermal stability and mechanical stability of A3/A1. **Methods** The crystal structures of A1 and A3 were downloaded from Protein Data Base (PDB). The wild-type (WT) A3/A1 structure was obtained by using SwarmDock Server, then W1745C-A3/A1 mutant was constructed by replacing the Trp1745 with Cys1745 in A3/A1. Through steered molecular dynamics simulation, formation and evolution of hydrogen bond and salt bridge between A1 and A3 interfaces were observed, and the differences in conformation, disrupted force and dissociation time between WT-A3/A1 and W1745C-A3/A1 were compared. **Results** There were 5 pairs of hydrogen bonds with survival rate > 0.2 and 1 pair of salt bridge with survival rate > 0.5 between A1 and A2. The W1745C-A3/A1 complex could withstand greater disrupted force and longer dissociation time compared with WT-A3/A1, by improving the stability of hydrogen bonds and increasing 1 pair of stable salt bridge. **Conclusions** The interaction between A1 and A3 would hinder the binding sites of A1 to GPIIb α , and the W1745C-A3 mutation would further reduce the affinity of A1 to platelets. These results provide references for revealing the molecular mechanism of von Willebrand diseases in the clinic and developing the corresponding drugs targeted to hemostasis disorders.

Key words: von Willebrand factor(vWF); molecular dynamics simulation; flexible docking; mechanical stability

收稿日期:2019-03-26; 修回日期:2019-04-24

基金项目:国家自然科学基金项目(11672109,11432006,11272125,31170887)

通信作者:方颖,副教授, E-mail: yfang@scut.edu.cn

血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 介导的血小板黏附于受损血管内壁, 是启动凝血级联反应的关键一步, 受到 vWF-A1/GPIIb α (platelet glycoprotein IIb α chain, GPIIb α) 相互作用亲和力的调控^[1]。成熟 vWF 单体包含重复的 A、B、C 和 D 4 个结构域, D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK [见图 1(a)]^[2]。其中, A 结构域由 3 个亚域 A1、A2 和 A3 构成, 是 vWF 发挥其功能的关键部位^[3]。A1 上含有血小板糖蛋白 GPIIb α 的结合位点; 金属蛋白酶 ADAMTS-13 能结合并酶切 A2 结构域, 以调控 vWF 分子的长度^[4]; A3 分子能够与血管内皮下 I 和 III 型胶原分子结合, 使 vWF 成为连接胞外基质与血小板的桥梁^[5]。

vWF 黏附血小板的能力受到自身氨基酸突变^[6-7]、ADAMTS-13^[4] 及血流剪切力^[8-9] 等诸多因素的调控。大量临床数据和体外流动腔实验表明, A1、A2 和 A3 上的突变可引起血小板凝血功能异常^[2,10]。研究者采用分子动力学模拟方法发现, A1 突变导致其局部动力学行为改变, 揭示了仅 1 个氨基酸残基突变所致 A1/GPIIb α 亲和力异常的分子结构基础^[11-12]。A2 结构域的突变会导致 vWF 多聚体的过度酶切或酶切不足, 引起出血紊乱^[13]。Ristocetin 和 Bitiscetin 可与 A3 特异性结合, 促进 A1 与 GPIIb α 的相互作用^[14]; 而单克隆抗体 SZ-123、SZ-125 则通过结合 A3 而有效抑制 A1 与 GPIIb α 结合^[15]。目前, 已从病人身上报道有 4 种 A3 结构域基因突变所致的凝血障碍, 源于其与血管下内皮胶原的结合能力存在缺陷^[6]。但 A3 与胶原结合能力的减弱对 A1 与血小板上 GPIIb α 相互作用的影响, 其中机理至今尚未清晰。

研究表明, 3 个结构域 A1、A2 和 A3 之间可能存在相互作用^[14,16-17]。Martin 等^[18] 在底板包被 A1 的流动腔系统中发现, 添加纯化的 A2 单体可有效阻止血小板的黏附, 而添加 A3 则部分抑制了血小板的黏附; Posch 等^[19] 采用原子力显微镜在单分子水平测量 A1 与 A2 之间的相互作用。A1、A2 和 A3 单体的晶体结构显示, 三者结构上具有高度的相似性^[2], 故推断 A1 与 A3 之间也存在相互作用, 这种相互作用可能阻挡 A1 上 GPIIb α 的结合位点, 从而影响黏附血小板的能力。由于缺少 A1/A3 复合物的晶体结构, 本文首先通过柔性对接获得 A1/A3

的三维结构, 再运用分子动力学模拟方法研究复合物热稳定性、机械稳定性及接触面残基的相互作用, 最后以功能减弱型 W1745C-A3 突变为例, 采用计算机突变的方法, 探索 1745 位点突变导致 A1/GPIIb α 亲和力下降的分子结构基础, 为深入了解相关凝血失调疾病的病理机制提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

vWF-A1、vWF-A3 单体的晶体结构均下载自 PDB 数据库 (Protein Data Bank), 其 ID 分别为 1AUQ (1261~1468 号残基) 和 1A03 (1686~1872 号残基)。它们的结构非常相似, 均包含球状的主干 (body) 区域以及二硫键连接起来的 N-末端和 C-末端两个环链 (loop), 主干区域由 6 股的疏水性 β 片层和两边各 3 个两亲性 α 螺旋组成 [见图 1(b)、(c)]。

1.2 分子对接

A1/A3 复合物由于缺乏晶体结构, 本文采用 SwarmDock 对接服务器, 通过提交受体和配体蛋白质的 pdb 文件, 即可进行全盲或指定关键残基条件下的柔性分子对接^[20]。柔性对接过程中分子的构象可以进行充分变化和调整以使受体配体结合的更加可靠, 是一种针对小分子的比刚性对接准确率更高的对接方式。将对接结果按自由能大小进行打分, 并按其结构特征聚类后, 对排名前 10 的对接结果进行人工监测, 挑选最佳构象。

1.3 分子动力学模拟

利用分子动力学模拟软件为 NAMD 2.6^[11], 在周期性边界条件下进行模拟, 积分时间步长设为 2 fs。各个分子的晶体结构被用来作为模拟的起点, 缺失的氢原子通过可视化操作软件 VMD (visual molecular dynamics)^[11] 的 AUTOPSF 插件来添加。用 TIP3 水分子模型给各蛋白添加边长为 1.5 nm 立方体水框, 并添加钠离子和氯离子模拟电中性的生理环境。选用 CHARMM22 全原子力场作为模拟的力场, 静电相互作用通过埃瓦尔德粒子网格算法 (particle mesh Ewald, PME) 来计算。范德华相互作用的截止值被设定为 1.2 nm^[21]。W1745C-A3/A1 突变体复合物因缺乏相应的晶体结构, 故首先采用计算机突变的方式将 A3 上的 Trp1745 替换为

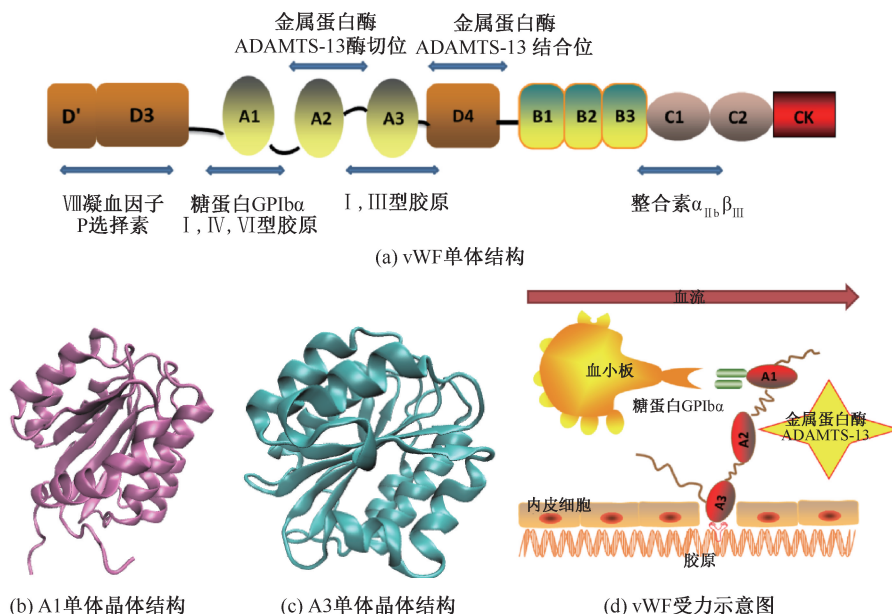


图1 vWF、vWF-A1、vWF-A3结构示意图与vWF-A结构域复合物拉伸方案

Fig.1 Structure of vWF, A1 and A3 and designed scheme to pull the A domain of complex

- (a) Structure of vWF monomer, (b) Crystal structure of A1, (c) Crystal structure of A3, (d) Schematic diagram of vWF in a mechanical environment

Cys1745,再固定除1745位残基之外的其他所有原子,并在真空中能量最小化。

正式模拟运算前,所有分子系统用NAMD模拟软件分3个步骤进行 1.5×10^4 步的最小化,目的在于释放晶体解析得到的构象中不合理的一些结构。最小化后的体系在0.1 ns内从 $-273.15 \text{ }^\circ\text{C}$ 逐步加热至 $36.85 \text{ }^\circ\text{C}$,然后在恒温恒压系综下平衡35 ns。平衡时系统温度用Langevin动力学控制在 $36.85 \text{ }^\circ\text{C}$,压力用Langevin活塞方法稳定在 101.325 kPa 。

1.4 恒速度拉伸分子动力学模拟

待构建的复合物体系达到平衡,取平衡的最后一帧作为初始构象,进行恒速度拉伸分子动力学模拟。根据真实生理环境中vWF的受力情况[见图1(d)],vWF-A3因为与胶原的相互作用而固定于胞外基质,A1则因结合血小板上的糖蛋白GPIIb/IIIa而经受血流的冲刷。因此,选择A3结构域C端的 α 碳原子为固定端,A1结构域的N端为拉伸端,沿固定原子与拉伸原子的连线方向进行恒速度拉伸分子动力学模拟。虚拟弹簧的弹簧系数为 695 pN/nm ;虚拟小球的运动速度为 0.5 nm/ns 。

1.5 数据分析

运用VMD软件分析数据和蛋白结构作图^[11]。

采用重原子位置的均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)表征蛋白构象变化和结构稳定性。氢键和盐桥定义如下: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(Asp和Glu)侧链上任意氧原子与碱性氨基酸(Lys、Arg和His)侧链上的氮原子形成的键长小于 0.4 nm 时,盐桥形成。有了氢键和盐桥的阈值,可以定义氢键或者盐桥的生存率(occupancy)为模拟过程氢键或者盐桥存在时长占整个模拟时长的比值。利用溶剂可及表面积(solvent accessible surface area, SASA)度量特定残基、特定蛋白质片段在溶剂中的暴露程度。通过分析整个拉伸过程中的力谱曲线,可以得到其较为准确的解离力,进而通过解离力的大小表征其分子复合物的亲和力。

2 结果与讨论

2.1 A3/A1分子对接结果及结合面的相互作用

采用盲性柔对接,指定相对分子量大的A3为受体,A1为配体,SwarmDock程序一共得到440个对接构象。所有结构按SwarmDock自主打分程序分成202个簇,分簇的分辨率是 0.3 nm ,各个簇根

据能量最低原则由低到高排序。分簇过后进一步利用马尔科夫链理论进行构象的过滤,除去各簇中结构差异较大的构象,以提高前10位构象的准确率,最后得到60个构象,排名前10的结果分别为26a.pdb、33b.pdb、61a.pdb、85a.pdb、24c.pdb、1a.pdb、58d.pdb、3d.pdb、79d.pdb、70c.pdb(见图2)。已有A3/collagen晶体结构及位点突变实验表明,A3结构域通过 $\alpha 2$ 螺旋、 $\alpha 3$ 螺旋、 $\beta 3$ 折叠上的残基与胶原结合^[22],A3与胶原的结合位点应当暴露在外不被屏蔽,故可排除26a.pdb、61a.pdb、85a.pdb、24c.pdb、1a.pdb、70c.pdb。剩下4个构象中,3d.pdb与33b.pdb、79d.pdb与58d.pdb结构十分相近,兼顾对接构象的分子自由能和排名,最终选取得分排位第2(4个候选对象中排位第1)的对接结果33b.pdb。

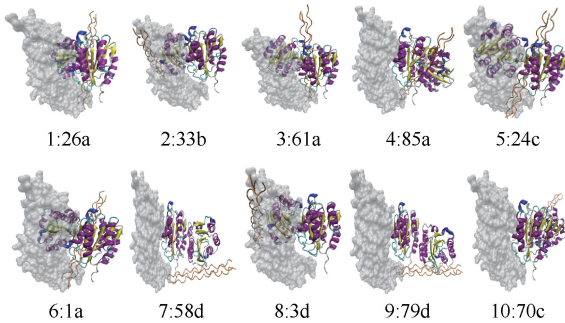


图2 对接结果前10的构象

Fig.2 Top 10 conformations of SwarmDock

对于对接构象33b.pdb,进一步采用PSAIA(Protein Structure and Interaction Analyzer)^[23]软件分析静态构象中接触面的相互作用,共发现103对弱的范德华相互作用和3对疏水相互作用,没有发现极性相互作用(见表1)。虽然静态相互作用被分析出来,但该对接复合物构象的合理性和稳定性仍有待探明。

表1 A3/A1对接复合物静态相互作用

Tab.1 Static interactions in docking A3/A1 complex

编号	疏水相互作用残基	
	vWF-A1	vWF-A3
1	PHE ¹³⁶⁶	PRO ¹⁶⁸⁹
2	ALA ¹³⁵⁰	ALA ¹⁸⁴³
3	ALA ¹³²⁷	LEU ¹⁸⁷¹

2.2 平衡过程中A3/A1复合物的稳定性

为进一步考察对接复合物A3/A1在生理环境

中的热稳定性,对构建的WT-A3/A1分子系统进行3次35ns平衡分子动力学模拟。通过对A3/A1复合物重原子的RMSD分析可以看出,10ns后第1、3次平衡模拟实验中分子系统已经平衡,复合物构象已基本稳定,第2次模拟实验则是在后期趋于平衡[见图3(a)]。

同时,分析平衡过程中复合物接触面上残基的相互作用。由平衡过程中氢键数目随时间的变化可知,系统平衡后,结合面氢键数目基本稳定,平均值保持在10左右,说明氢键在维系复合物的稳定中发挥重要作用[见图3(b)]。

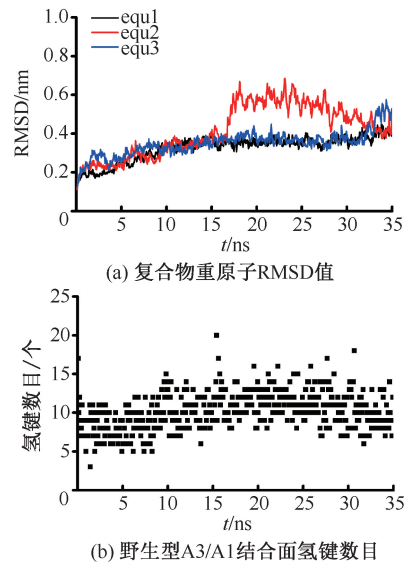


图3 平衡模拟中A3/A1重原子RMSD和结合面氢键数目
Fig.3 RMSD of heavy atoms and numbers of hydrogen bonds on the binding surface of WT-A3/A1 during equilibrium simulation

(a) RMSD of heavy atoms in the complex, (b) Number of hydrogen bonds of WT-A3/A1

为了确定复合物接触面上的重要残基,分析计算整个平衡过程中氢键与盐桥的生存率,表2列出了生存率排名前10的氢键和仅有的2对盐桥。其中,A1上排名第2、4、6和8的氨基酸残基GLU¹³⁵⁹、GLN¹³⁶⁷、HSD¹³²⁶和LYS¹³³⁵是经突变实验证实的参与GP1b α 和A1反应的关键残基^[1,24-25],提示A1A2A3三联体可能因为A3与A1的相互作用,遮盖了A1上结合GP1b α 的位点,降低A1结合血小板的能力,也间接证明所选择对接复合物构象的合理性。

表 2 平衡过程中 A3/A1 结合面排名前 10 的氢键与重要盐桥

Tab.2 Top ten hydrogen bonds and important salt bridges of A3/A1 binding surface during the equilibrium

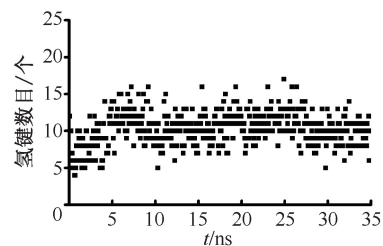
排名	类型	A3 残基	A1 残基	生存率			平均
				equ1	equ2	equ3	生存率
1	H	CYS ¹⁶⁸⁶	ASP ¹³³³	0.73	0.74	0.49	0.65
2	H	ARG ¹⁸¹⁹	GLU ¹³⁵⁹	0.37	0.99	0.40	0.59
3	H	SER ¹⁸⁴⁶	GLU ¹³²⁰	0.00	0.09	0.78	0.29
4	H	ARG ¹⁸¹⁹	GLN ¹³⁶⁷	0.02	0.71	0.00	0.24
5	H	ASP ¹⁸⁴⁵	LYS ¹³⁴⁸	0.02	0.58	0.07	0.22
6	H	ASN ¹⁸⁴⁷	HSD ¹³²⁶	0.09	0.31	0.15	0.19
7	H	SER ¹⁶⁸⁷	LYS ¹³³²	0.07	0.39	0.06	0.17
8	H	CYS ¹⁸⁷²	LYS ¹³³⁵	0.00	0.02	0.48	0.17
9	H	HSD ¹⁸⁶⁹	LYS ¹³³⁵	0.17	0.22	0.04	0.14
10	H	PRO ¹⁸⁴²	GLY ¹³⁵¹	0.00	0.41	0.00	0.14
11	S	ARG ¹⁸¹⁹	GLU ¹³⁵⁹	0.37	0.93	0.37	0.56
12	S	LYS ¹⁸⁷⁰	GLU ¹³²⁰	0.21	0.00	0.00	0.07

2.3 突变体 W1745C-A3/A1 的构建及热稳定性

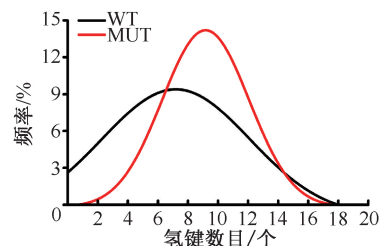
本文结果表明,对接构建的野生型 A3/A1 复合物构象是稳定和可行的。因此,在此基础上进行单氨基酸突变,将复合物 A3 上的 TRP¹⁷⁴⁵ 替换为 CYS¹⁷⁴⁵,进而观察突变体 W1745C-A3/A1 在生理环境中的平衡过程,探讨功能减弱性突变 W1745C-A3 对复合物稳定性的影响。

同样进行 3 次 35 ns 平衡模拟, W1745C-A3/A1 骨架重原子 RMSD 随模拟时间的波动与变化曲线与野生型非常接近。接触面氢键数的时间历程如图 4(a) 所示。另外,对平衡过程中 WT-A3/A1 与 W1745C-A3/A1 氢键的频数分布进行高斯拟合[见图 4(b)]。3 次平衡野生型与突变体的氢键平均数分别为 7.19 ± 0.35 、 9.17 ± 0.18 。进一步分析 W1745C-A3/A1 结合面的氢键、盐桥形成和生存率,发现 W1745C 单氨基酸突变对复合物结合面内的氢键、盐桥互作网络均有影响。突变体平衡过程中不仅氢键的数量有所上升,强度也有提高,生存率在 0.2 以上的氢键由原来的 5 个增加到 10 个。相比野生型 A3/A1,突变也增高了部分氨基酸(A3-ARG¹⁸¹⁹/A1-GLU¹³⁵⁹、A3-SER¹⁸⁴⁶/A1-GLU¹³²⁰、A3-ASN¹⁸⁴⁷/A1-HSD¹³²⁶)的氢键生存率,排名前 10 的氨基酸氢键稳定性整体也要更高。

另外,不仅 WT-A3/A1 中出现的概率、生存率极低的盐桥 A1-GLU¹³²⁰/A3-LYS¹⁸⁷⁰ 在其突变体复合物中成为 1 对较稳定的盐桥,还提高了原有稳定性



(a) 突变型 W1745C-A3/A1 结合面氢键数目



(b) 野生型与突变型 A3/A1 氢键频数分布

图 4 平衡模拟中复合物结合面氢键数目

Fig.4 Number of hydrogen bonds on the binding surface of complex during equilibrium simulation

(a) Number of hydrogen bonds of W1745C-A3/A1,

(b) Frequency distribution of hydrogen bonds for wild type and mutant A3/A1

较高盐桥 A1-GLU¹³⁵⁹/A3-LYS¹⁸¹⁹ 的生存率(见表 3)。这一结果表明, A3-W1745C 突变通过提高接触面残基的氢键和盐桥相互作用,使复合物的热稳定性有所增强。

表 3 突变型 A3/A1 结合面生成的氢键与盐桥

Tab.3 Hydrogen bonds and salt bridges on binding surface of W1745C-A3/A1

序号	类型	A3 残基	A1 残基	平均生存率	
				野生型	突变型
1	H	ARG ¹⁸¹⁹	GLU ¹³⁵⁹	0.59	0.91
2	H	SER ¹⁸⁴⁶	GLU ¹³²⁰	0.29	0.40
3	H	ASN ¹⁸⁴⁷	HSD ¹³²⁶	0.19	0.28
4	S	ARG ¹⁸¹⁹	GLU ¹³⁵⁹	0.56	0.76
5	S	LYS ¹⁸⁷⁰	GLU ¹³²⁰	0.07	0.52

2.4 W1745C 型突变增强 A3/A1 复合物机械稳定性

为研究外力作用下野生型及 W1745C 突变型 A3/A1 复合物的构象变化和解离过程,选取系统平衡的最后一帧作为起始构象,各进行 3 次 15 ns 恒速度拉伸分子动力学模拟,分析拉伸过程中拉力,接触面氢键数目、盐桥以及结合面暴露程度。拉伸过程中,无论野生型还是突变型 A3/A1 复合

物,它们的力谱均与其氢键变化呈现相似的趋势。在拉伸前期,野生型和突变型 A3/A1 承受的外力在 0~100 pN 振荡,氢键数目相对稳定,但参与配对的残基却在不断变化,表明该阶段处在构象调整期,这与原子力显微镜分子拉伸实验出现的“死区”(dead zone)十分相似。随后拉力逐渐提高,氢键不断解离,氢键数下降。最后,当 WT-A3/A1 的 A1-GLU¹³⁵⁹/A3-LYS¹⁸¹⁹ 盐桥约在 10 ns 时断裂, W1745C-A3/A1 的盐桥 A1-GLU¹³²⁰/A3-LYS¹⁸⁷⁰ 于 12 ns 断裂,力谱曲线迅速下降为 0,复合物解离。

原来被包埋起来的 A1、A3 接触面完全暴露在水分子中。WT-A3/A1、W1745C-A3/A1 氮端拉伸的 3 次平均解离力分别为 (314±40)、(399±32) pN,两者具有统计学差异 ($P<0.05$); 平均解离时间为 (8.4±2.16)、(10.83±0.91) ns (见图 5)。综上所述,A3 结构域 W1745C 单氨基酸突变,通过加强与 A1 结构域之间盐桥与氢键的连接,可以抵抗更大的外力,延迟复合物的解离,阻止 A1 接触面的暴露,即 W1745C-A3/A1 具有更强的机械稳定性。

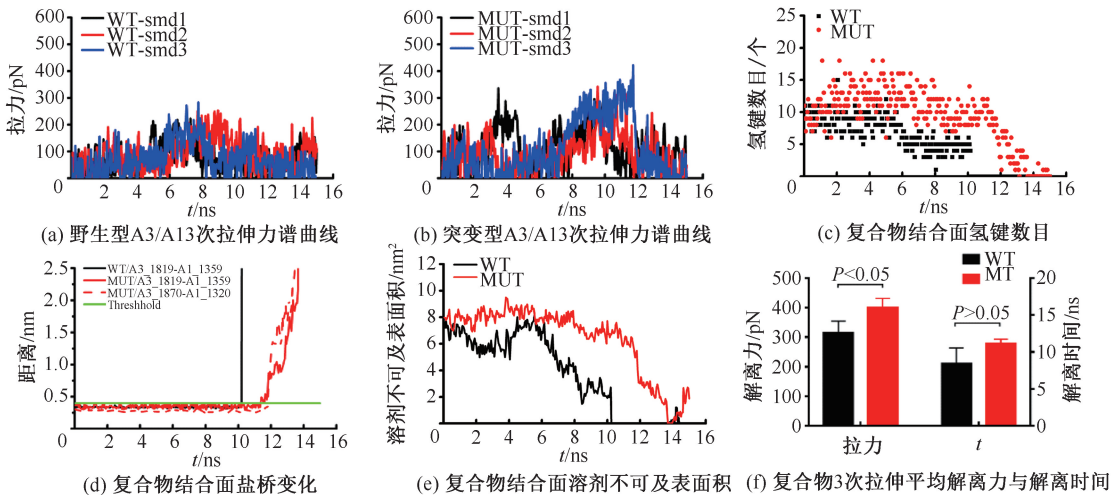


图5 复合物恒速度拉伸模拟

Fig.5 Constant velocity stretching dynamics simulation of complex (a) Three tensile force spectrum curves in simulation process of WT-A3/A1, (b) Three tensile force spectrum curves in simulation process of W1745C-A3/A1, (c) Number of hydrogen bonds on the binding surface of complex, (d) Salt bridge changes on the bonding surface of complex, (e) Surface area of solvent which cannot reach on bonding surface of complex, (f) Average stretching force and dissociation time of complex

3 讨论与展望

在高剪切力血流环境下, GPIIb α -vWF-Collagen 相互作用链是生理性止血和病理性血栓形成过程中的关键,也是生命科学、临床医学和药物开发领域的研究热点^[2-3]。关于 GPIIb α -vWF-A1、A2、A3 以及 ADAMTS-13 突变导致的出血及病理性血栓的研究已经很普遍^[26]。细胞及单分子水平的实验数据表明,vWF 分子内 A1 与 A2 的相互作用会抑制 A1 结合 GPIIb α ^[17]。但是由于技术手段的限制,目前尚未能够获得有效的 A1A2A3 三联体的分子影像和晶体结构。这一关键信息的缺失,阻碍了人们在分子结构基础上的深入探讨。鉴于本课题组先前成

功刚性对接了 GPIIb α /6B4 复合物^[27]、柔性对接了 A2- α 6/ADAMTS13-spacer^[28] 复合物,本文采用 SwarmDock 对接软件与人工检测相结合的方法,首次构建了 A3/A1 复合物体系。生理条件下的平衡模拟实验表明,该复合物是稳定的。通过深入细致的接触面残基相互作用分析发现,A1 结合 GPIIb α 的重要位点 GLU¹³⁵⁹、GLN¹³⁶⁷、HSD¹³²⁶ 和 LYS¹³³⁵ 同样在维持 A3/A1 接触面的氢键中发挥重要作用,提示 vWF 分子内部 A1 与 A3 结构域之间的相互作用会部分遮盖 A1 结合 GPIIb α 的位点,从而抑制 vWF 黏附血小板。

为进一步探索流体剪切力及突变对 A1A2A3 构象的协同调控,针对 A3 突变导致的 2 M 型血管

性血友病,以临床发现的 W1745C-A3 突变为例,利用计算机定点突变技术,分析比较突变导致的 A3/A1 稳定性及构象差异。本文结果显示,突变体相比野生型不仅部分氢键稳定性得到加强,而且还产生了额外的 1 对盐桥 A1-GLU¹³²⁰/A3-LYS¹⁸⁷⁰。这对增加的盐桥在 A3/A1 抵抗外力拉伸时发挥重要作用,不仅提高了原盐桥 A1-GLU¹³⁵⁹/A3-ARG¹⁸¹⁹ 的生存时间,还大大增加了 A3/A1 解离需要克服的势垒,延缓了 A3/A1 的解离时间。上述结果提示,生理流体环境下 A3-W1745C 突变病人,除因 A3/Collagen 亲和力下降使 vWF 分子失去“桥梁”的连接作用外,还可能缘于 vWF 分子内 A3、A1 结合的机械稳定性加强,使 A1 上 GPIIb α 的结合位点能抵御一定的血流作用力而不轻易暴露,导致凝血功能缺陷。

尽管柔性对接得到的 A3/A1 复合物构象可能与真实 vWF 中 A3/A1 的构象有异,本文通过采用合理的能量最小化步骤及平衡过程,使对接复合物在水环境中充分弛豫和构象调整,以尽可能接近自然状态。另外,受限于计算资源,整个平衡过程中的时间跨度为纳秒级别,相比生理情况时间过短,样本空间的不完备可能会导致结果偏差。但是,在缺少完整膜蛋白结构及有效观察手段的情况下,本文采用的计算策略和方法,不仅在原子层面探索了 A3 的 2 M 型突变导致的功能和构象差异,有助于深刻理解各类血管性血友病的病理机制,也为深入研究复杂膜分子亲和力构象调整及相关药物开发提供新的方法和有益启发。

参考文献:

- [1] VASUDEVAN S, ROBERTS JR, MCCLINTOCK RA, et al. Modeling and functional analysis of the interaction between von Willebrand factor A1 domain and glycoprotein Iba α [J]. J Biol Chem, 2000, 275(17): 12763-12768.
- [2] SPRINGER TA. Von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream [J]. Blood, 2014, 124(9): 1412-1425.
- [3] GOGIA S, NEELAMEGHAM S. Role of fluid shear stress in regulating vWF structure, function and related blood disorders [J]. Biorheology, 2016, 52(5-6): 319-335.
- [4] LYNCH CJ, CAWTE AD, MILLAR CM, et al. A common mechanism by which type 2A von Willebrand disease mutations enhance ADAMTS13 proteolysis revealed with a von Willebrand factor A2 domain FRET construct [J]. PLoS One, 2017, doi: 10.1063/1.5007313.
- [5] POSCH S, OBSER T, KONIG G, et al. Interaction of von Willebrand factor domains with collagen investigated by single molecule force spectroscopy [J]. J Chem Phys, 2018, doi: 10.1063/1.5007313.
- [6] LEGENDRE P, NAVARRETE AM, RAYES J, et al. Mutations in the A3 domain of von Willebrand factor inducing combined qualitative and quantitative defects in the protein [J]. Blood, 2013, 121(11): 2135-2143.
- [7] RIDDELL AF, GOMEZ K, MILLAR CM, et al. Characterization of W1745C and S1783A: 2 novel mutations causing defective collagen binding in the A3 domain of von Willebrand factor [J]. Blood, 2009, 114(16): 3489-3496.
- [8] 高绪强, 刘晓玲, 吴建华, 等. 剪切流下 vWF-A1 介导的血小板钙响应[J]. 医用生物力学, 2019, 34(1): 83-90.
GAO XQ, LIU XL, WU JH, et al. vWF-A1-mediated calcium response of platelets under shear flow [J]. J Med Biomech, 2019, 34(1): 83-90.
- [9] 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.
- [10] ITZHAR-BAIKIAN N, VEYRADIER A, DILLINGER JG, et al. Von Willebrand disease in the elderly [J]. Rev Prat, 2018, 68(10): 1125-1131.
- [11] 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.
- [12] 李红, 刘文平, 刘广建, 等. 采用分子动力学模拟探究 vWF-A1 突变体 G561S 的亲和力变化机制[J]. 医用生物力学, 2015, 30(5): 433-439.
LI H, LIU WP, LIU GJ, et al. Mechanism of affinity alterations in vWF-A1 domain mutant G561S studied by molecular dynamics simulation [J]. J Med Biomech, 2015, 30(5): 433-439.
- [13] APONTE-SANTAMARIA C, LIPPOK S, MITTAG JJ, et al. Mutation G1629E Increases von Willebrand factor cleavage via a cooperative destabilization mechanism [J]. Biophys J, 2017, 112(1): 57-65.
- [14] OBERT B, ROMIJN RA, HOULLIER A, et al. Characterization of bitiscetin-2, a second form of bitiscetin from the venom of Bitis arietans: Comparison of its binding site with the collagen-binding site on the von Willebrand factor A3-domain [J]. J Thromb Haemost, 2006, 4(7): 1596-1601.