

文章编号:1004-7220(2015)05-0433-07

# 采用分子动力学模拟探究 VWF-A1 突变体 G561S 的亲合力变化机制

李红, 刘文平, 刘广建, 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)突变体 G561S 下调 VWF-A1 与其配体亲和力的分子机制。**方法** 分别构建 2M 型突变体 G561S-A1 (功能减弱型)、WT-A1 (野生型) 和 2B 型突变体 R543Q-A1 (功能增强型) 3 个分子系统。G561S-A1 突变体采用将野生型 A1 结构的 Gly561 替换为 Ser561 的方式构建, WT-A1 与 R543Q-A1 晶体结构取自蛋白质数据库(protein data bank, PDB)。利用自由分子动力学模拟方法对比分析 WT-A1、G561S-A1、R543Q-A1 三者构象的改变、柔性的变化以及氢键/盐桥的形成与演化。**结果** G561S 突变通过降低 A1 结构域  $\alpha 2$  螺旋的柔性, 并增强 N 末端与 body 区的相互作用从而减弱其与配体 GPIIb $\alpha$  的亲合力, R543Q 功能增强型突变体则启动了一条相反的调节路径。**结论** 局部动力学性质的改变是 A1 亲合力调控的潜在机制, 研究结果有助于针对激活的 A1 结构域的变构药物设计以及相关抗血栓药物的研发。

**关键词:** 血管性血友病因子; 亲合力; 分子动力学

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.05.433

## Mechanism of affinity alterations in VWF-A1 domain mutant G561S studied by molecular dynamics simulation

LI Hong, LIU Wen-ping, LIU Guang-jian, WU Jian-hua, FANG Ying (School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the mechanism of affinity down-regulation between Von Willebrand factor mutant G561S and its ligand. **Methods** Three molecular systems were constructed for WT-A1, G561S-A1, and R543Q-A1, respectively. G561S-A1 mutant was constructed by replacing the Gly561 with Ser561 in the wild-type A1 domain. The crystal structures of WT-A1 and R543Q-A1 were downloaded from Protein Data Base (PDB). Free molecular dynamics simulation was performed to observe the changes of conformation, alterations of flexibility, and the formation and evolution of hydrogen bond and/or salt bridge, among the three A1 domains (WT-A1, G561S-A1, and R543Q-A1). **Results** G561S mutation lowered the localized dynamic properties of  $\alpha 2$  helix and increased the interactions between the N-terminal arm and body region in A1 domain, thus leading to the decreased binding affinity with its ligand GPIIb $\alpha$ . However, the Gain-of-function mutation R543Q followed the pathway which was contrary to G561S. **Conclusions** The change of localized dynamic properties of  $\alpha 2$  helix is a potential mechanism in the regulation of the binding affinity of A1, and this research finding is helpful in developing allosteric drugs against the activated A1 domain and relevant anti-thrombus drugs.

**Key words:** von Willebrand factor (VWF); Affinity; Molecular dynamics

收稿日期:2015-04-20; 修回日期:2015-05-20

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

通信作者:方颖, 副教授, Tel:(020)39380608; E-mail:yfang@scut.edu.cn。

血管性血友病因子(von Willebrand factor, VWF)的A1结构域与血小板膜上的糖蛋白受体(platelet glycoprotein Ib $\alpha$ , GPIb $\alpha$ )的结合能够诱发血小板黏附、聚集以及止血栓子的形成<sup>[1-2]</sup>。研究表明,发生于VWF或者GPIb $\alpha$ 分子内的突变会改变VWF与GPIb $\alpha$ 相互作用的亲和力,从而引起血管性血友病(von Willebrand disease, VWD)<sup>[3]</sup>。目前,VWF与GPIb $\alpha$ 之间的相互作用机制尚未完全理解<sup>[4-5]</sup>。然而众多A1晶体结构(野生型或突变体、结合状态或未结合状态)之间构象差异较小的事实为进一步解释这些突变体与其配体间亲和力的差异造成困难<sup>[6]</sup>。Auton等<sup>[7-8]</sup>关于A1-GPIb $\alpha$ 亲和力高低与A1结构域热稳定性相关的研究表明,似乎不能只用静态结构上的观察和分析来研究蛋白质相互作用的亲和力调控机制。

本课题组曾研究过局部动力学驱动的功能增强型A1结构域的亲和力调控机制<sup>[6]</sup>。本文引入A1功能减弱型突变体G561S,以便探明G561S是否也服从同样的亲和力调节机制。采用可以观察蛋白原子具体运动细节的分子动力学模拟方法,通过分析比较2M型突变体G561S-A1(功能减弱型)、WT-A1(野生型)和2B型突变体R543Q-A1(功能增强型)的结构变化和动力学性质,探讨G561S突变导致2M型VWD的分子结构基础,以期对相关抗血栓药物和止血药物的开发提供指导。

## 1 试验方法

### 1.1 初始结构的构建

分别构建3个分子系统。野生型WT-A1采用蛋白质数据库(protein data base, PDB)代码为1AUQ的晶体结构构建。如图1所示,A1结构域采用NewCartoon形式,A1结构N端的第1个残基以粉色小球显示,Glu501、Glu542、Arg578等3个与本文相关的重要残基则以绿色显示,另外用1个绿色小球标记561号残基(G561S-A1的突变位点)。

功能减弱型突变体G561S-A1因缺乏相应的晶体结构,故首先采用计算机突变的方式将WT-A1的Gly561替换为Ser561,然后固定除561位残基之外的其他所有原子,并在真空中能量最小化1000步。构建的G561S-A1结构可能与真实结构有差异,但差异在允许的误差范围内,因为已知的A1诸多突

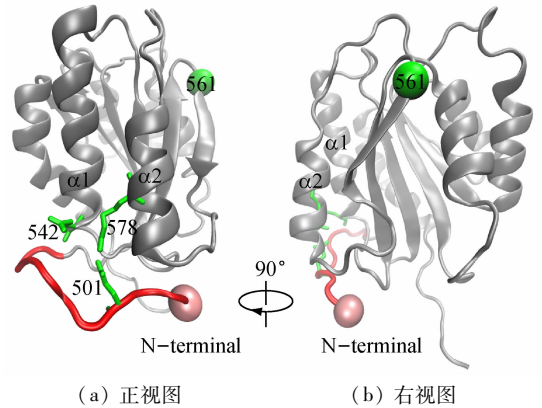


图1 野生型A1结构示意图

Fig. 1 Structure schematic of the wild-type A1 domain

(a) The front view, (b) The right side view

变体晶体结构之间结构差异都较小<sup>[6]</sup>,同时自由分子动力学模拟之前的能量最小化处理有利于G561S-A1进行构象调整以接近其真实构象。

功能增强型R543Q-A1采用PDB码为1M10的晶体结构构建<sup>[9]</sup>。但由于该晶体结构(505~703号残基)的N末端(498~508号残基)信息缺失,采用分子可视化操作软件(visual molecular dynamics, VMD)将WT-A1和R543Q-A1的body区域对齐以保证两者尽可能重叠,然后采用WT-A1的N末端序列(498~508号残基)替换R543Q的N末端序列(505~508号残基)。这样可保证PDB码为1M10的晶体结构中body区与N末端保守的氢键/盐桥相互作用仍然存在于最终构建的R543Q-A1结构中。

以上3个体系中所有缺失的原子一律采用Swiss-PdbViewer软件进行添加。为了消除因人为替换引起的不合理的Tyr508-Cys509肽键键长,构建好的R543Q-A1采用如下步骤进行能量最小化。首先,固定除Tyr508和Cys509残基以外的所有原子,并执行最小化1000步以便优化连接处的结构;然后,固定除N末端以外的所有原子,并执行最小化2000步以优化N末端结构;最后,取消对R543Q-A1所有原子的束缚,并执行最小化5000步来优化整个R543Q-A1结构及其内部相互作用,最终的Tyr508-Cys509肽键键长处于0.133 nm的正常值状态。

### 1.2 分子动力学模拟方法

在模拟中使用VMD软件进行分子视图和建模,采用纳米尺度分子动力学软件(nanoscale

molecular dynamics, NAMD) 进行自由分子动力学模拟。模拟采用的力场是 CHARMM22。模拟的 3 个 A1 结构均采用 TIP3P 水分子模型构建水框。水框的大小可以保证 A1 中每个原子距水框壁面至少 1.5 nm 的距离。3 个体系的水框中均加入 34 个  $\text{Na}^+$  和 37 个  $\text{Cl}^-$  以模拟生理环境并使体系达到电中性。各 A1 结构的 N 端与 C 端分别采用乙酰化氨基端 (ACE) 和 N-甲酰胺羧基端 (CT3) 两个电中性补丁消除由肽链 C 末端指向 N 末端的电偶极矩。采用埃瓦尔德粒子网格算法 (particle mesh Ewald, PME) 计算长程静电相互作用。短程静电相互作用和范德华相互作用的截止值设为 0.12 nm。启用周期性边界条件以消除尺寸效应,并以 2 fs 的迭代步长进行模拟。自由分子动力学模拟之前,先固定体系内的蛋白骨架原子执行能量最小化 5 000 步,然后再放开所有原子,并执行 10 000 步能量最小化以优化整个模拟体系。在最终的生产性运行之前,将能量最小化后的系统在 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 5 ns。最后从每一个平衡体系中随机选取 3 个不同的构象进行自由分子动力学模拟。自由分子动力学模拟采用的是恒体积、恒能量 (constant volume, constant energy) 体系,由于不需对温度和压力进行约束,故可以更好地捕获 A1 结构域的动力学性质以及评估 A1 结构域的稳定性<sup>[10]</sup>。模拟时间为 100 ns,每 2 ps 记录一次原子坐标。所有模拟均在华南理工大学生物科学与工程学院戴尔 PowerEdge M910 超级计算机集群上进行。

### 1.3 数据分析

所有数据分析以及蛋白结构作图均借助 VMD 软件。采用  $\text{C}\alpha$  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。采用  $\text{C}\alpha$  原子均方根波动 (root mean square fluctuation, RMSF) 评估蛋白局部结构柔性。为了简化计算, $\alpha 2$ 、 $\alpha 1$  螺旋间夹角定义为各自螺旋的 N 末端残基 ( $\alpha 2$  螺旋的 575 号残基, $\alpha 1$  螺旋的 528 号残基) 与 C 末端残基 ( $\alpha 2$  螺旋的 582 号残基, $\alpha 1$  螺旋的 542 号残基) 的  $\text{C}\alpha$  原子之间连线的夹角。氢键按如下方式定义:若供体原子与受体原子之间的距离小于 0.35 nm 且键角小于  $30^\circ$ ,则氢键存在。盐桥 (salt bridge) 的形成条件为:酸性残基 (Asp 或

Glu) 侧链的任一氧原子与碱性残基 (Lys 或 Arg) 侧链的任一氮原子之间的距离小于 0.4 nm。氢键或盐桥的生存率 (occupancy) 定义为自由分子动力学模拟过程中键存在时间与总模拟时间的比值。残基水合频率 (hydration frequency) 定义为水合事件的发生比率,即一个疏水残基周围 0.4 nm 内出现至少 1 个水分子的时间长度占总模拟时间的比率。采用残基水合频率评估疏水核心的暴露程度。

## 2 结果

### 2.1 突变调节 A1 结构域 N 末端的稳定性

热力学实验表明,2B 型突变降低了 A1 结构域稳定性,2M 型突变则增加了 A1 结构域稳定性<sup>[8,11]</sup>。为揭示突变诱导的构象改变,对 3 个蛋白体系 G561S-A1、WT-A1 和 R543Q-A1 各自进行 3 次 100 ns 的自由分子动力学模拟。由于 A1 结构域 C 末端序列 (Ala701 ~ Pro705) 游离于水溶液中,故未将其列入观察范围,以免其柔性太大影响观察结果。整个 A1 结构域 (498 ~ 700 号残基) 所有  $\text{C}\alpha$  原子总 RMSD 值随时间的演化如图 2(a) 所示: R543Q-A1 的 RMSD 值显著高于 WT-A1 和 G561S-A1,且变化较为剧烈;后两者的变化相对平稳,同时又以 G561S-A1 的 RMSD 值最低,说明三者中 G561S-A1 的构象稳定性最高。为探明这些差异的具体发生区域,将 A1 结构域细分为 body 区域 (509 ~ 700 号残基) 和 N 末端 (498 ~ 508 号残基) 两部分,分别进行 RMSD 值分析。图 2(b) 表明 WT-A1、G561S-A1、R543Q-A1 三者 body 区域的 RMSD 值在模拟过程中变化平稳且几乎重叠,表明三者 body 区域的构象演化差异并不明显。图 2(c) 则表明 R543Q-A1 的 N 末端发生了较大幅度的波动,而 WT-A1、G561S-A1 的 N 末端表现相对稳定,并且以 G561S-A1 的波动最小,最为稳定。比较图 2(b) 与 (c),不难推断在整个构象演化过程中,N 末端序列的构象变化才是导致 A1 结构域总 RMSD 值差异的原因,R543Q-A1 较高的 RMSD 值源于其 N 末端序列的高度波动,而 G561S-A1 较低的 RMSD 值源于其 N 末端序列的高度稳定。为验证该推测,进一步测定这三者 N 末端与 body 区之间的质心距离 (distance between the mass center, DMC)。如图 2(d) 所示, R543Q-A1 的 N 末端已与 body 区相分离,而 WT-A1、G561S-A1 的

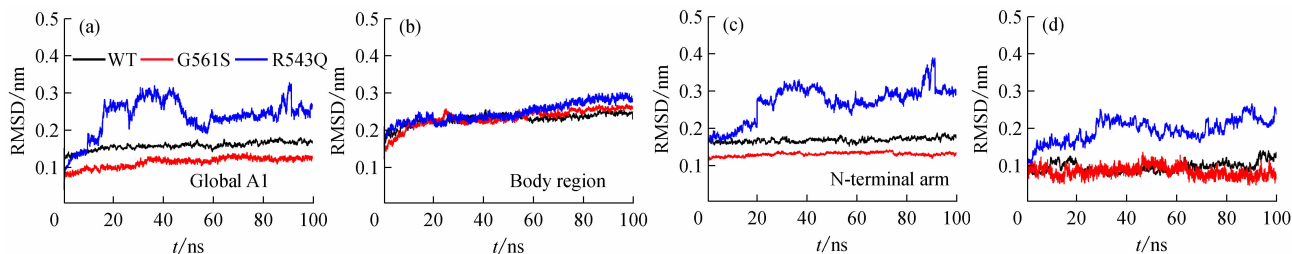


图2 WT-A1、G561S-A1、R543Q-A1 体系结构稳定性的差异 (a) A1 结构域 RMSD 曲线, (b) A1 的 body 区域 RMSD 曲线, (c) A1 的 N 末端 RMSD 曲线, (d) A1 的 N 末端与 body 区域之间 DMC 曲线

Fig.2 Differences in the stability of the WT-A1, G561S-A1, R543Q-A1 systems (a) Variation of RMSD of A1 global region with time, (b) Variation of RMSD of A1 body region with time, (c) Variation of RMSD of A1 N-terminal arm with time, (d) Variation of DMC of the N-terminal arm and A1 body region with time

N 末端在模拟过程中变动较小。综合以上数据判定, G561S-A1 结构的 N 末端稳定性最高, 其 N 末端与 body 区的结合也最紧密。

## 2.2 G561S 突变体降低 A1 结构 body 区的动力学性质

3 个 A1 结构域的 body 区(509 ~ 695)在整个模拟期间 C $\alpha$  的 RMSD 值都小于 0.2 nm [见图 2(b)]。并且, WT-A1、G561S-A1、R543Q-A1 的 body 区构象变化也不像 N 末端序列那样显著, 这与各个 A1 晶体结构(野生型或突变体、结合状态或未结合状态)构象几近重叠的事实相一致<sup>[4,6]</sup>。由于这些功能获得性突变并未导致 A1 结构的明显变化, 很难找到明显的构象差异来解释不同 A1 与 GPIIb $\alpha$  之间亲和力的差异。目前存在的一种解释是 A1 亲和力调控机制可能在于突变诱导的动力学性质变化<sup>[6]</sup>。为检验这一可能性, 分析 A1 上每一残基的 C $\alpha$  的 RMSF。通过测量整个 A1 结构(498 ~ 700 号残基)的 RMSF 值, 发现功能获得性突变的确可以改变 A1 骨架的柔性(flexibility)和可移动性(mobility), 尽管发生于 A1 结构 body 区的变化不够明显。图 3(a)所示为 G561S-A1、WT-A1、R543Q-A1 各自残基的 C $\alpha$  原子在整个模拟期间的 RMSF 值, 结果表明三者的  $\alpha$ 2 螺旋(574 ~ 582 号残基)及部分  $\beta$ -环链区域(569 ~ 573 号残基)的 RMSF 值差异较为明显。R543Q-A1 该区域(569 ~ 582 号残基)的柔性最高, G561S-A1 的柔性最低, WT-A1 的柔性则介于两者之间。这 3 个 A1 结构与 GPIIb $\alpha$  结合亲和力的高低正好与它们在这一区域(569 ~ 582 号残基)的柔性正相关。晶体结构研究表明, 这一区域是 GPIIb $\alpha$  结

合位点的重要组成部分<sup>[4-5]</sup>, 本课题组前期研究也表明许多 2B 型突变体该区域动力学性质的增强可以增加 A1 与 GPIIb $\alpha$  之间的结合亲和力<sup>[6]</sup>。本研究发现, 2M 型突变体 G561S-A1 的  $\alpha$ 2 螺旋及部分  $\beta$ -环链区域的柔性极低, 即在水分子环境中具有较强的稳定性, 当与配体分子相遇时这种过强的刚性或许不利于分子间的诱导契合, 从而影响其亲和力。此外, 热力学实验表明, 2B 型突变降低 A1 结构稳定性而 2M 型突变增加 A1 结构稳定性的事实, 在一定程度上印证了本研究的计算结果。

## 2.3 G561S 突变降低 A1 内部疏水区域的暴露程度

除了突变诱导的局部柔性降低之外, 在模拟过程中可以观察到 R543Q-A1 的  $\alpha$  螺旋像一个“钟摆”一样, 以其 C 端为支点相对于 A1 的 body 区域不断地摆入摆出, 这一运动引起  $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2 螺旋间夹角的变化, 并且图 3(a)数据表明 G561S-A1、WT-A1 和 R543Q-A1 三者的  $\alpha$ 2 螺旋(图中右边的黄色显示区域)的柔性显著高于各自的  $\alpha$ 1(图中左边的黄色显示区域)螺旋,  $\alpha$ 2 螺旋柔性在三者之间有显著差异, 可以认为  $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2 螺旋间夹角的变化主要是由  $\alpha$ 2 螺旋的摆动引起的。测定整个模拟时间段内的  $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2 螺旋间夹角, 得到 G561S-A1、WT-A1 和 R543Q-A1 的  $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2 螺旋间夹角平均值分别为 20°、23°和 28°, 三者之间存在显著的统计学差异。G561S-A1 的夹角最小, R543Q-A1 的夹角最大, WT-A1 介于两者之间[见图 3(b)]。此外,  $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2 螺旋间夹角的频率分布表明, G561S-A1 的分布最为集中, R543Q-A1 的分布最为离散, WT-A1 则居中, 故 2M 型突变体

G561S-A1 的  $\alpha$  螺旋摆动幅度最小[见图 3(c)]。

由于  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  螺旋间夹角的变化可以改变 A1 结构疏水核心的暴露程度,为此计算疏水核心  $\beta$  片层从 Val553 至 Val556 的水合频率。结果表明, G561S-A1 和 R543Q-A1 中疏水区域的暴露程度分别是 3 个 A1 结构中最低和最高的, WT-A1 则介于两者之间[见图 3(d)]。这一观察也与 A1 的部分

解折叠构象与其配体的结合亲和力更高的事实相吻合<sup>[4,8,11]</sup>。为此,可推断在真实的液体环境中,  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  螺旋很可能以不同幅度和频率持续地张张合合。R543Q-A1 的螺旋间夹角增大,疏水核心得以充分暴露或许是调节 R543Q-A1 与其配体亲和力的一种重要手段,而 G561S-A1 相反的变化则降低了其与配体之间的亲和力。

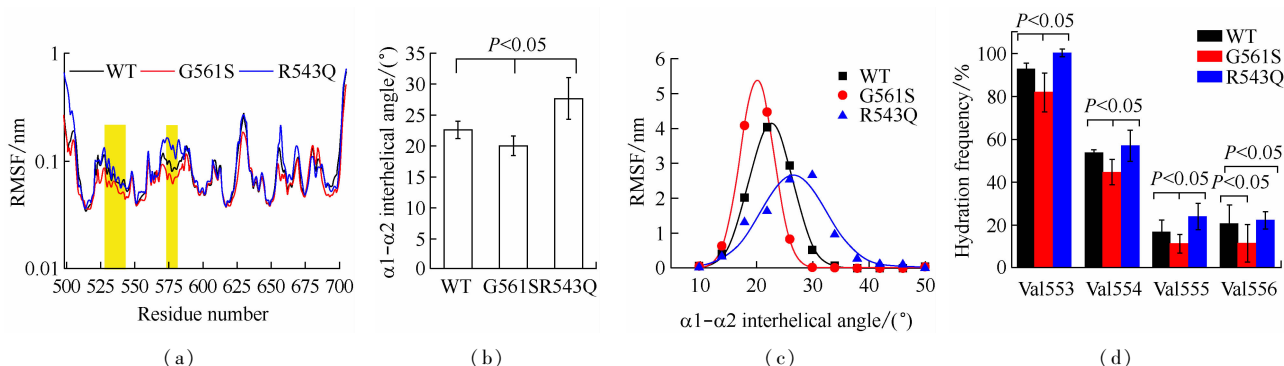


图 3 WT-A1、G561S-A1、R543Q-A1 的动力学性质及其疏水核心的暴露 (a) A1 结构域 C $\alpha$  的 RMSF 曲线, (b) A1 结构域  $\alpha 1$  与  $\alpha 2$  螺旋间夹角的平均值, (c)  $\alpha 1$  与  $\alpha 2$  螺旋间夹角分布的高斯拟合曲线, (d) A1 的  $\beta 2$  片层上的疏水残基(553~556 号残基)的残基水合频率

Fig. 3 Dynamic properties of the WT-A1, G561S-A1 and R543Q-A1, and exposure of its hydrophobic core

(a) C $\alpha$ RMSF of WT-A1, G561S-A1 and R543Q-A1, (b) Average  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  interhelical angle, (c) Distribution of the  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  interhelical angle, (d) The residue hydration frequency of the hydrophobic residues (553-556) located at the  $\beta 2$  strand in A1 domain

## 2.4 G561S 中 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 螺旋间夹角的变化调节 N 末端的稳定性

上述分析表明,降低 G561S 突变体  $\alpha 2$  螺旋的动力学性质可以降低其与配体的结合亲和力,然而这些分析仅仅局限于 A1 结构的 body 区域。分析 PDB 代码为 1AUQ 的 A1 的晶体结构,结果表明,  $\alpha 2$  螺旋上的残基 Arg578 与 N 末端序列上的残基 Glu501 之间存在一个比较稳定的盐桥,提示  $\alpha 2$  螺旋动力学性质的变化可以通过 Arg578-Glu501 盐桥间接影响 N 末端的稳定性。分析 G561S-A1、R543Q-A1、WT-A1 三者自由分子动力学模拟过程中的氢键/盐桥相互作用,结果表明这 3 个 A1 结构域的 N 末端与 body 区之间的相互作用存在差异。如图 4 所示,在 WT-A1 中,Arg578 与 Glu501 可以形成一个比较稳定的盐桥,生存率平均值为 95.71%,而另一个盐桥 Arg578-Glu542 的生存率仅为 2.10%;在 G561S-A1 中,Arg578-Glu501 盐桥更加稳定,生存率接近 100%,但 Arg578-Glu542 盐桥的生存率则几乎

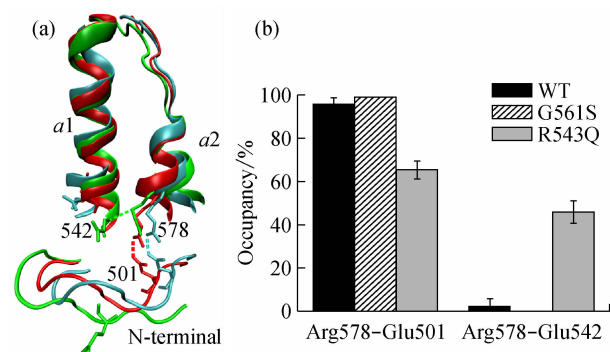


图 4 A1 结构中 Arg578 与 Glu501、Glu542 之间的盐桥

(a) WT-A1(靛色)、G561S-A1(红色)和 R543Q-A1(绿色)中的盐桥(Arg578-Glu501 与 Arg578-Glu542)相互作用, (b) WT-A1、G561S-A1、R543Q-A1 的两个盐桥在模拟过程中的生存率

Fig. 4 The two salt bridges between Arg578 and its two partners (Glu501, Glu542) in A1 domain (a) The graphical description of salt bridge (Arg578-Glu501 and Arg578-Glu542) interactions in WT-A1 (colored in cyan), G561S-A1 (colored in red) and R543Q-A1 (colored in green), (b) The occupancies of the above mentioned two salt bridges in WT-A1, G561S-A1 and R543Q-A1



为0;R543Q-A1则表现出完全相反的趋势,其Arg578-Glu501之间的盐桥生存率跌至65.30%,而原先微弱的盐桥Arg578-Glu542的生存率则从2.10%增加至45.9%。这些结果表明Arg578在调控A1的N末端的稳定性中发挥着重要作用。本课题组前期研究结果证明,较强的Arg578-Glu501盐桥的作用力是保证N端序列稳定性的基础,当受外力作用解离后,Arg578会退而求其次地寻求与Glu542结合,但Arg578-Glu542盐桥较弱,很容易被外力破坏<sup>[6]</sup>。综上所述,可以得到如下结论:在G561S-A1中, $\alpha 2$ 螺旋运动幅度的降低有利于稳定Arg578-Glu501盐桥,从而使N末端紧密地包裹在A1底面,阻止与GPIIb $\alpha$ 结合位点的暴露;WT-A1的 $\alpha 2$ 螺旋虽然运动幅度有所提高,但高稳定性的盐桥Arg578-Glu501仍然可以阻止N末端脱离body区;而R543Q-A1中,由于 $\alpha 2$ 螺旋大幅度的摆动大大削弱了Arg578-Glu501盐桥的稳定性,Arg578-Glu542盐桥又不足以阻止N末端从A1底面脱离,最终暴露出与血小板上糖蛋白受体的作用位点。

### 3 讨论

VWF A1结构域众多突变体之间构象差异不明显,是其亲和力变化机制未能揭示的重要原因。通过纳秒时间尺度的自由分子动力学模拟发现,功能减弱型突变G561S可以诱使A1局部构象从不稳定态向稳定态转变,即突变导致的 $\alpha 2$ 螺旋柔性降低可能是功能减弱型突变下调A1亲和力的潜在机制。在先前对VWF A1突变体的分子动力学模拟研究中,大多局限于其与配体结合面上残基的突变、插入或缺失,认为接触面的构象变化对亲和力的影响才是重要的<sup>[9]</sup>。但许多发生于非接触面上的突变往往也造成了蛋白分子性质的极大变化,其调控途径和调控机制却鲜有研究,故本文试图通过分析A1结构的局部动力学性质和氢键/盐桥相互作用一探究竟。虽然A1结构整体构象差异不明显,但功能减弱型突变G561S-A1主要通过降低 $\alpha 2$ 螺旋的柔性,限制其摆动幅度,从而使N末端始终遮挡body区底部,导致结合位点难以暴露,最终阻碍其与配体GPIIb $\alpha$ 之间的相互作用。相反,R543Q-A1则通过提高 $\alpha 2$ 螺旋的柔性进而增强其与配体的亲和力。本研究结果表明,非结合面上的突变虽不能直接改变

结合面的构象,但可通过改变蛋白的局部动力学性质来调控该蛋白与其配体的亲和力。

在正常生理条件下,野生型VWF的自身抑制作用可以阻止血小板的聚集,但血流剪切力会促使A1发生部分解折叠,从而触发野生型A1的激活。在这个过程中,A1对于GPIIb $\alpha$ 的结合亲和力随流体剪切力发生变化<sup>[12]</sup>,A1-GPIIb $\alpha$ 之间逆锁键现象也由此产生<sup>[8,11,13]</sup>。有研究表明,2B型A1突变体的逆锁键阈值前移,而2M型A1突变体的逆锁键阈值则发生后移<sup>[14]</sup>,即无论2B型还是2M型突变均能使力的调控机制失常,从而导致出血或止血异常即血管性血友病。本文探明的调节路径可很好解释突变所造成的力调控失常现象:R543Q-A1由于 $\alpha 2$ 螺旋的柔性提高,低剪切力即可使其摆动增大,Arg578-Glu501盐桥解离,N末端侧臂脱离body区底部,暴露其与GPIIb $\alpha$ 的结合位点,从而提高与配体的亲和力;而G561S-A1中 $\alpha 2$ 螺旋的柔性降低、刚度提高,需要很大的外力才能使其摆动增大以解离Arg578-Glu501盐桥,使body区底部与GPIIb $\alpha$ 的结合位点摆脱N末端侧臂的遮挡而暴露出来,从而增加与配体结合的可能性。确实,也有文献报道A1的N末端可以屏蔽GPIIb $\alpha$ 结合位点,N末端脱离body区有可能解除后续序列D'D3对GPIIb $\alpha$ 结合位点的屏蔽作用<sup>[15]</sup>。

本研究在原子层面对A1突变体功能差异背后的分子结构基础进行探索,并做出合理推断,即突变可以通过该结构域局部动力学性质的改变进而影响A1与其配体的亲和力。这一结论在3个分子体系——野生型WT-A1、功能获得型R543Q-A1和功能减弱型G561S-A1上得到了验证,进而探明 $\alpha 2$ 螺旋对于A1功能的发挥起着重要作用。研究结果为凝血及血栓类疾病的基础研究以及抗血栓药物的研发提供有益启发。

### 参考文献:

- [1] Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: Connecting the far ends [J]. *Blood*, 2015, 125(13): 2019-2028.
- [2] 杨小芳,丁孝茹,吴建华,等.vWF-A1A2A3介导的循环血小板的翻滚运动[J]. *医用生物力学*, 2013, 28(5): 567-573.  
Yang XF, Ding XR, Wu JH, et al. vWF-A1A2A3-mediated

- rolling of circulating platelets in flows [J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(5): 567-573.
- [3] Springer TA. von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream [J]. *Blood*, 2014, 124(9): 1412-1425.
- [4] Dumas JJ, Kumar R, McDonagh T, *et al.* Crystal structure of the wild-type von Willebrand factor A1-glycoprotein I $\text{b}\alpha$  complex reveals conformation differences with a complex bearing von Willebrand disease mutations [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(22): 23327-23334.
- [5] Emsley J, Cruz M, Handin R, *et al.* Crystal structure of the von Willebrand Factor A1 domain and implications for the binding of platelet glycoprotein Ib [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(17): 10396-10401.
- [6] Liu GJ, Fang Y, Wu JH. A mechanism for localized dynamics-driven affinity regulation of the binding of von Willebrand factor to platelet glycoprotein I $\text{b}\alpha$  [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(37): 26658-26667.
- [7] Auton M, Sedláč E, Marek J, *et al.* Changes in thermodynamic stability of von Willebrand Factor differentially affect the force-dependent binding to platelet GPI $\text{b}\alpha$  [J]. *Biophys J*, 2009, 97(2): 618-627.
- [8] Auton M, Cruz MA, Moake J. Conformational stability and domain unfolding of the Von Willebrand factor A domains [J]. *J Mol Biol*, 2007, 366(3): 986-1000.
- [9] Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, *et al.* Structures of glycoprotein I $\text{b}\alpha$  and its complex with von Willebrand factor A1 domain [J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1176-1179.
- [10] Nurisso A, Daina A, Walker RC. A practical introduction to molecular dynamics simulations: Applications to homology modeling [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 857: 137-173.
- [11] Auton M, Zhu C, Cruz MA. The mechanism of VWF-mediated platelet GPI $\text{b}\alpha$  binding [J]. *Biophys J*, 2010, 99(4): 1192-201.
- [12] Kim J, Zhang CZ, Zhang XH, *et al.* A mechanically stabilized receptor-ligand flex-bond important in the vasculature [J]. *Nature*, 2010, 466(7309): 992-995.
- [13] 窦甜甜, 吴建华, 刘广建, 等. 一种基于分子动力学模拟来识别 GPI $\text{b}\alpha$  与 vWF-A1 结合面上重要残基的新方法 [J]. *医用生物力学*, 2013, 28(6): 606-614.
- Dou TT, Wu JH, Liu GJ, *et al.* A novel approach for identifying the critical amino acid residues on binding site of GPI $\text{b}\alpha$  and vWF-A1 domain through molecular dynamics simulation [J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(6): 606-614.
- [14] Coburn L, Damaraju V, Dozic S, *et al.* GPI $\text{b}\alpha$ -vWF rolling under shear stress shows differences between Type 2B and 2M von Willebrand disease [J]. *Biophys J*, 2011, 100(2): 304-312.
- [15] Auton M, Sowa KE, Behymer M, *et al.* N-terminal flanking region of A1 domain in von Willebrand factor stabilizes structure of A1A2A3 complex and modulates platelet activation under shear stress [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(18): 14579-14585.