

文章编号:1004-7220(2018)03-0248-07

# 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

谢旭斌, 刘文平, 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  $\text{Ca}^{2+}$  对 VWF-A2 结构域稳定性的影响。方法 A2 和 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  的晶体结构取自 PDB 数据库。通过恒力拉伸分子动力学模拟,比较分析  $\text{Ca}^{2+}$  结合引起的构象变化、解折叠路径的差异以及酶切位点的暴露程度。结果 A2 结构域的解折叠路径和酶切位点的暴露过程是力依赖的。 $\text{Ca}^{2+}$  结合不影响 A2 结构域的前期解折叠,但由于  $\alpha 3\beta 4$ -环链局部构象重排所致柔性降低,约束了  $\beta 1$ - $\beta 4$ - $\beta 5$  片层的运动,导致进一步解折叠受阻而停留在中间稳态,影响酶切位点的充分暴露。结论 力可诱导 A2 结构域中  $\beta 5$  片层的解折叠使酶切位点暴露,而  $\text{Ca}^{2+}$  的结合则通过稳定疏水核心结构,阻碍酶切位点的暴露,最终降低 ADAMTS13 的酶切效率。研究结果有助于加深对 ADAMTS13 酶切 VWF-A2 结构域进而调控 VWF 止血能力过程的理解,并为相关抗血栓药物设计提供指导。

**关键词:**血管性血友病因子; A2 结构域; 钙离子; 分子动力学模拟; 解折叠

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2018.03.010

## Effects of Calcium on the Stability of VWF-A2 Domain by Molecular Dynamics Simulation

XIE Xubin, LIU Wenping, WU Jianhua, FANG Ying

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

**Abstract: Objective** To investigate the effect of calcium on the stability of VWF-A2 domain. **Methods** The crystal structures of A2 (not containing calcium) and A2/ $\text{Ca}^{2+}$  (with calcium bound) were downloaded from protein data bank. For A2 domain, the conformational changes, unfolding pathway differences and the exposure degree variance of cleavage sites caused by calcium binding were observed and analyzed by steered Molecular Dynamics simulations under constant force. **Results** The unfolding pathway of A2 domain and exposure process of cleavage sites were force-dependent. Calcium binding did not affect the unfolding process of A2 in the early stage. As the conformational rearrangement of  $\alpha 3\beta 4$ -loop reduced its localized dynamic properties, the movement among  $\beta 1$ - $\beta 4$ - $\beta 5$  strands was restrained, which suppressed its further unfolding to stay in the intermediate steady state and delayed the cleavage-site exposure. **Conclusions** Stretch force could induce  $\beta 5$  strand of A2 unfolding and the cleavage-site exposure, while calcium binding inhibited ADAMTS13 proteolysis efficiency through stabilizing A2 hydrophobic core and covering its cleavage sites. These results may help to understand how ADAMTS13 cleavages the VWF-A2 domain and regulates the hemostatic potential of VWF, and further provide useful guidance on the design of related anti-thrombus drugs.

**Key words:** Von Willebrand factor; A2 domain; calcium; molecular dynamics simulation; unfolding

收稿日期:2017-06-15; 修回日期:2017-08-08

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

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) 是一种大型血浆糖蛋白,在生理性凝血和病理性血栓形成过程中扮演重要角色。成熟的 VWF 单体由内皮细胞和巨核细胞合成<sup>[1-2]</sup>,包含 A、C 和 D 等多种结构域<sup>[2-3]</sup>,可通过“D’-D3-D’-D3”和“CK-CK”形成二硫键<sup>[3]</sup>,实现二聚化和多聚化,VWF 多聚体的止血潜能与其尺寸呈正相关<sup>[4]</sup>。金属蛋白酶 ADAMTS13 可以通过酶切 A2 结构域内部隐藏的肽键(TYR<sup>1605</sup>-MET<sup>1606</sup>)调控 VWF 多聚体的尺寸,进而调控其止血潜能,这一过程受到流体剪切力的调节<sup>[5-6]</sup>。同时,ADAMTS13 和 VWF 的功能缺失均会对 VWF 的止血功能产生影响。ADAMTS13 功能缺陷时,VWF 多聚体不能被有效酶切而维持较大尺寸,引起血栓性血小板减少性紫癜 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)<sup>[7]</sup>;而 A2 结构域的基因突变则会导致 VWF 多聚体的过度酶切,使血管中较小尺寸的 VWF 分子不能有效发挥止血功能,引起出血素血症<sup>[1,3]</sup>。作为上述调控过程的核心,A2 结构域具有独特的结构特征。野生型 A2 结构域的晶体结构显示,处于  $\beta 4$  片层的酶切位点 TYR<sup>1605</sup> 和 MET<sup>1606</sup> (分别见图 1(a)中黄色和绿色棒状)包埋在结构域的中部核心,不能被 ADAMTS13 直接酶切<sup>[8]</sup>;与同源的 A1 和 A3 结构域相比,A2 结构域缺乏一个  $\alpha 4$  螺旋,取而代之的是一个柔性更高的环链(命名为  $\alpha 4$ -less 环链);同时,A2 结构域缺乏同源 A 结构域中连接 N、C 两端的跨结构域二

硫键,而在 C 末端由两个半胱氨酸形成一个相邻二硫键(CYS<sup>1669</sup>-CYS<sup>1670</sup>,见图 1(a)中绿色小球)。进一步的研究发现,A2 上该相邻二硫键及 2 个 N-糖基化位点(ASN<sup>1515</sup> 和 ASN<sup>1574</sup>,见图 1(a)中绿色小球),前者增强了 A2 结构域的热稳定性<sup>[9-10]</sup>,而后者则提高其结构域稳定性<sup>[11-12]</sup>,均能够抑制 ADAMTS13 的酶切效率。

另外, A2 结构域内部有一个  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点<sup>[13-14]</sup>,晶体结构显示与  $\text{Ca}^{2+}$  配位的残基或位于  $\alpha 3\beta 4$  环链(ASP<sup>1596</sup>、ARG<sup>1597</sup>、ALA<sup>1600</sup> 和 ASN<sup>1602</sup>),或指向  $\beta 1$  片层(ASP<sup>1498</sup>),详见图 1(c)中紫色( $\text{Ca}^{2+}$ )和绿色小球。虽然目前学术界已有共识: $\text{Ca}^{2+}$  结合可以稳定 A2 结构域<sup>[3,10,13-16]</sup>,但是与之相关的稳定机制尚未清晰。将包含  $\text{Ca}^{2+}$  的 A2 晶体结构<sup>[13-14]</sup>与不含  $\text{Ca}^{2+}$  的 A2 晶体结构<sup>[8]</sup>进行比对,未发现显著的构象差异,这可能是因为 A2 的功能受到流体剪切力的调节,力学信号可以介导 A2 结构域的解折叠以及酶切位点的暴露<sup>[3-6,8,17-18]</sup>,而  $\text{Ca}^{2+}$  可能在上述动态过程中扮演重要角色。A2 结构域存在一个解折叠中间态<sup>[6,13]</sup>,但是该中间态的具体构象尚不明晰。因此,本研究借助恒力拉伸分子动力学模拟技术,对比分析 A2 和 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  两个分子的解折叠路径,以期从原子水平阐述  $\text{Ca}^{2+}$  对 A2 结构域稳定性的调节机制,加深对 ADAMTS13 酶切调控 VWF 止血潜能过程的理解,为相关抗血栓药物设计提供指导。

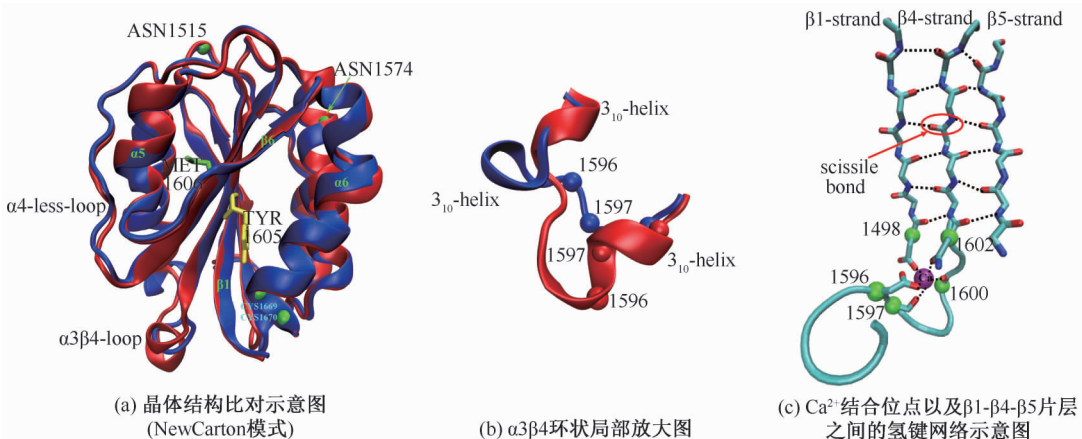


图 1 A2 (红色) 和 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  (蓝色) 的静态晶体结构分析

Fig. 1 Analyses of the static crystal structures of A2 (red) and A2/ $\text{Ca}^{2+}$  (blue) (a) Schematic of the crystal structures alignment (shown as NewCarton), (b) Local enlarged drawings of the two  $\alpha 3\beta 4$ -loops, (c) Schematic of calcium binding site and the hydrogen network among  $\beta 1$ - $\beta 4$ - $\beta 5$  strands

## 1 材料与方法

### 1.1 系统的搭建

采用可视化分子动力学软件 VMD 1.9.2<sup>[19]</sup> 构建两个 A2(单链残基序列 1495 ~ 1671) 分子系统: 不含  $\text{Ca}^{2+}$  的晶体结构取自蛋白质数据库 (protein data bank, PDB), 代码为 3GXB<sup>[8]</sup>, 记为 A2; 结合了  $\text{Ca}^{2+}$  (序号 4675) 的 PDB 代码为 3ZQK<sup>[14]</sup>, 记为 A2/ $\text{Ca}^{2+}$ 。将蛋白分子浸入充满 TIP3 水分子的长方体水框中, 添加钠离子和氯离子以中和系统以模拟生理条件。

### 1.2 分子动力学模拟

在 CHARMM27 全氢原子力场中采用纳米尺度分子动力学软件 NAMD 2.11<sup>[20]</sup>, 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 1.2 nm。采用周期性边界条件以消除尺寸效应, 迭代步长为 2 fs。

在生产性分子动力学模拟运行之前, 先对分子系统进行 3 步能量最小化, 方法同文献<sup>[21-22]</sup>。

**1.2.1 体温下的系统平衡** 能量最小化后, 对两个分子系统各进行 3 次 50 ns 的系统平衡, 控制温度为 37 °C (约为 310 K), 压强为 101 kPa (即 1 atm)。当蛋白整体  $\text{C}\alpha$  原子位置的均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 趋于稳定, 意味系统已平衡。

**1.2.2 恒力拉伸模拟** 将平衡后的蛋白分子重新浸入长轴为 10 nm 左右的长方体水框中, 对 A2 和 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  两个分子系统各进行 3 次恒力拉伸模拟, 拉力分别为 100、150 和 200 pN, 每次拉伸 80 ns。拉伸过程中即时跟踪轨迹, 当  $\alpha$  螺旋被拉直或环链、 $\beta$  片层被拉离蛋白主体时, 及时截断这些严重解折叠并离开主体的 2 级结构, 以节省计算资源并削弱这些高柔性结构无序运动对解折叠路径的影响。由于 VWF 的酶切往往发生在其进入血液前, 血流剪切力可沿 VWF 分子长度方向传递并作用于各结构域<sup>[3]</sup>, 因此, 在模拟中固定 A2 结构域 N 端 MET<sup>1495</sup> 的  $\text{C}\alpha$  原子, 而拉伸原子则视阶段分别设定为 SER<sup>1671</sup>、GLN<sup>1652</sup> 以及 GLY<sup>1631</sup> 的  $\text{C}\alpha$  原子, 拉伸方向取固定原子和拉伸原子的连线方向, 温度保持为 37 °C, 每 1 ps 记录一次轨迹。

## 2 结果与分析

### 2.1 A2 结构域静态构象分析

比对 A2 和 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  的静态晶体结构, 发现两个分子的整体构象保持较高一致性, 两者的  $\text{C}\alpha$ -RMSD 值仅为 0.149 nm, 酶切位点均包埋于中部疏水核心区 [见图 1(a)]。  $\text{Ca}^{2+}$  介入引起的构象差异仅体现在  $\alpha 3\beta 4$  环链: A2 中有 2 个  $3_{10}$  螺旋, 位于环的两端, 而 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  中只有 1 个  $3_{10}$  螺旋, 且“转移”到环链中部 [见图 1(b)、(c)]。另外,  $\text{Ca}^{2+}$  介入并未显著改变静态分子结构内部的相互作用: A2 内部包含 5 对盐桥和 100 对氢键, A2/ $\text{Ca}^{2+}$  则包含 5 对盐桥和 97 对氢键, 两者共享了近 85% 的氢键; 氢键主要由  $\beta$  片层之间形成的致密氢键网络贡献 [见图 1(c) 中黑色虚线], 而盐桥则主要由  $\alpha$  螺旋参与形成。

### 2.2 平衡过程中 A2 结构域的结构稳定性和构象变化

不同于其静态晶体结构, 生理条件下分子的构象是动态变化的, 而分子动力学模拟则是动态展示这种构象演变的最好工具<sup>[21-25]</sup>。因此, 将 A2 和 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  分子系统放入模拟生理条件的水框中, 观察平衡过程中  $\text{Ca}^{2+}$  对 A2 结构域稳定性的影响。

对两个系统各进行 3 次 40 ns 的平衡模拟 (结果取 3 次平衡的均值), 分子整体的  $\text{C}\alpha$ -RMSD 时间曲线显示: A2 和 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  分别在 10 ns 和 3 ns 后达到稳定, A2 的波动 [(0.220 ± 0.013) nm] 略高于 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  [(0.136 ± 0.009) nm], 但两者均未有剧烈构象变化 [见图 2(a)]。同时, 对 A2 和 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  分子系统各残基  $\text{C}\alpha$ -RMSD 的均值分析表明: 两者在  $\alpha 3\beta 4$  环链区域存在较大差异, A2 要远高于 A2/ $\text{Ca}^{2+}$ , 而其他部分未见明显区别 [见图 2(b)]。将  $\alpha 3\beta 4$  环链单独取出进行 RMSD 值分析, 其随时间的演化过程证实 A2 之  $\alpha 3\beta 4$  环链的波动远高于 A2/ $\text{Ca}^{2+}$ , 前者为 (0.556 ± 0.017) nm, 后者为 (0.231 ± 0.046) nm, 两者差异具有统计学意义。尽管  $\text{Ca}^{2+}$  的结合降低了  $\alpha 3\beta 4$  环链的柔性, 但两者其余部分的 RMSD 值在平衡过程中变化平稳且几乎重叠 [见图 2(c)]。

由动态平衡过程中酶切位点残基的 SASA 值随时间的变化可知, 无论 A2 还是 A2/ $\text{Ca}^{2+}$ , 残基

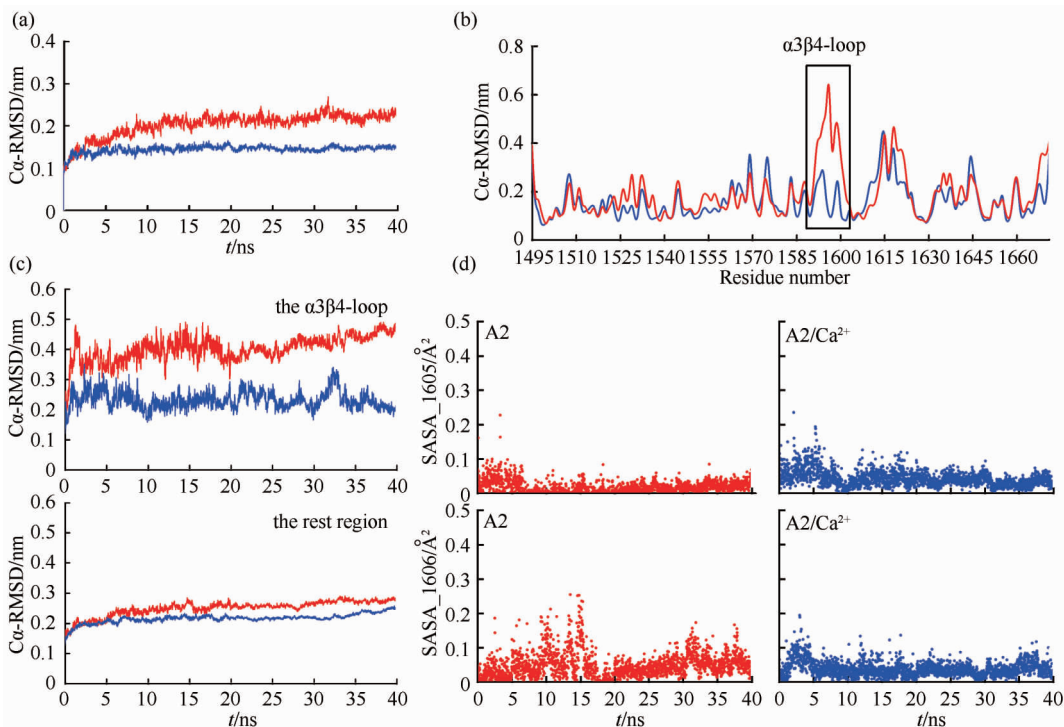


图2 平衡过程中 A2(红色)和 A2/Ca<sup>2+</sup>(蓝色)的构象变化 (a)整个蛋白 C $\alpha$ -RMSD 值时间曲线,(b)残基 C $\alpha$  原子的 RMSD 曲线,(c)  $\alpha 3\beta 4$  环链和其他区域的 C $\alpha$ -RMSD 值时间曲线,(d)酶切位点的 SASA 值时间历程

Fig. 2 Conformational changes of A2 (the red lines or dots) and A2/Ca<sup>2+</sup> (the blue lines or dots) during the equilibration

(a) Time-courses of C $\alpha$ -RMSD of the whole protein, (b) RMSD of C $\alpha$  atoms of the residues, (c) Time-courses of ( $\alpha$ -RMSD) of the  $\alpha 3\beta 4$ -loop and the rest region of the protein, (d) Time-courses of SASAs of the cleavage sites

TYR<sup>1605</sup> 和 MET<sup>1606</sup> 的 SASA 值均在一个很小范围内上下波动(远低于 0.5 nm<sup>2</sup>) [见图 2(d)]。该结果表明,虽然平衡过程中蛋白分子及周围环境分子得以充分运动,但不足以引起剧烈的构象变化,蛋白分子依旧保持构象完整性,酶切位点仍处于包埋状态。分析比较平衡过程中两个分子内部相互作用的差异,尽管由于热运动,蛋白内部的氢键盐桥一直处于断裂和重生的演化中,但总体的盐桥和稳定氢键数目基本恒定,两者无显著差异。A2/Ca<sup>2+</sup> 分子系统中,因为 Ca<sup>2+</sup> 的介入,ASP<sup>1498</sup> 和 ARG<sup>1597</sup> 要参与 Ca<sup>2+</sup> 配位而少了两者形成的稳定盐桥,但 Ca<sup>2+</sup> 也将  $\beta 1$ - $\beta 4$ - $\beta 5$  等片层的一端“锚定”,约束了中间  $\beta$  片层的运动,片层之间形成更多的稳定氢键。

动态平衡数据表明, Ca<sup>2+</sup> 的介入没有引起 VWF-A2 结构域整体构象的较大改变,但是降低了  $\alpha 3\beta 4$  环链局部柔性,进而约束  $\beta 1$ - $\beta 4$ - $\beta 5$  等中间片层的运动,促使片层间形成更多的氢键,稳定结构域内部核心。

### 2.3 力依赖的 A2 结构域解折叠

超大 VWF 进入血液前, A2 发生解折叠暴露出酶切位点是实现酶切的前提,而 A2 解折叠通常依赖于机械力、高温以及变性剂等外部条件<sup>[3-6, 9-10, 17-18]</sup>。生理环境中的血液细胞及分子往往承受着血流的冲刷,故进一步探究外力对 A2 结构域稳定性的影响十分必要。取动态平衡最后一帧构象,对 A2 和 A2/Ca<sup>2+</sup> 两个分子系统分别进行 3 个拉力(100、150 和 200 pN)各 80 ns 的恒力拉伸分子动力学模拟,观察分析 Ca<sup>2+</sup> 对 A2 结构域解折叠路径的影响。

对于 A2 分子系统,在 80 ns 的有限拉伸模拟时间内,只有 200 pN 作用下观察到相对完整解折叠过程——酶切位点所在的  $\beta 4$ -片层发生解离。如图 3 所示,其解折叠路径始于 C 末端,可分为 3 个阶段:第 1 阶段为 0 ~ 8 ns,拉力作用下  $\alpha 6$  螺旋、 $\beta 6$  片层以及  $\alpha 5$  螺旋等 2 级结构依次从蛋白主体解离;第 2 阶段为 8 ~ 76.4 ns,该阶段没有 2 级结构从蛋



白主体解离,主体构象保持相对稳定;第3阶段为76.4~77.8 ns,β5片层、α4-less环链、β4片层以及α3螺旋等2级结构依次解离,位于β4片层上的酶切位点残基 TYR<sup>1605</sup> 和 MET<sup>1606</sup> 完全暴露。β5片层从主体结构拉离出来是区分第2与第3阶段的分水岭。相比外围的α螺旋,β1、β4、β5片层之间致密的氢键网络是保障其疏水核心稳定的基础,一旦克服β5片层与其他片层N末端的联结,该疏水核心便开始瓦解,从而暴露酶切位点。

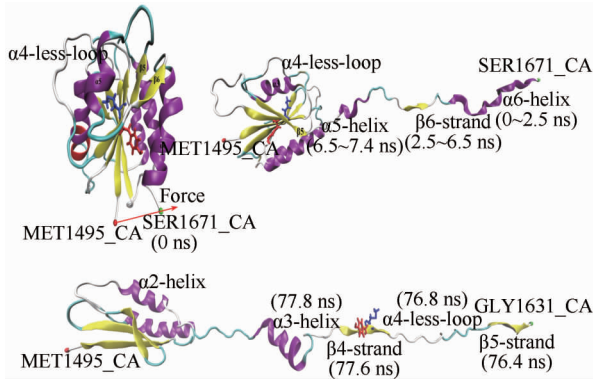


图3 200 pN作用下A2的解折叠快照

Fig. 3 Snapshots of the unfolding process under constant force (200 pN) for A2

150 pN和100 pN拉力作用下(此处未列出相关数据),虽然也观察到了类似的解折叠趋势,但是解折叠仅限于C末端区域且进程缓慢,酶切位点也没有达到完全暴露水平。这意味着A2结构域的解折叠一定程度上是力依赖的,中间稳态的解折叠可能存在一个拉力阈值。

对于A2/Ca<sup>2+</sup>分子系统,3个拉力各80 ns的拉伸模拟时间内均未观察到完整的解折叠过程,图4显示200 pN作用下的解折叠路径。不同于A2分子系统,A2/Ca<sup>2+</sup>仅呈现相似的前2个阶段:第1阶段为0~7 ns,α6螺旋、β6片层和α5螺旋等C端2级结构依次从蛋白主体解离,且解离发生的时间点与A2的相近;之后一直到模拟结束,主体结构一直保持小幅度波动的相对稳定状态,疏水核心保持完整,再无2级结构解折叠或被拉离主体,即一直停留在第2阶段。由于整个模拟过程中β5片层始终未从蛋白主体解离,两个酶切位点残基未见明显暴露。通过分析分子内部残基相互作用网络发现,由于Ca<sup>2+</sup>的介入和配位,β5-β4片层之间(7对)、β4-

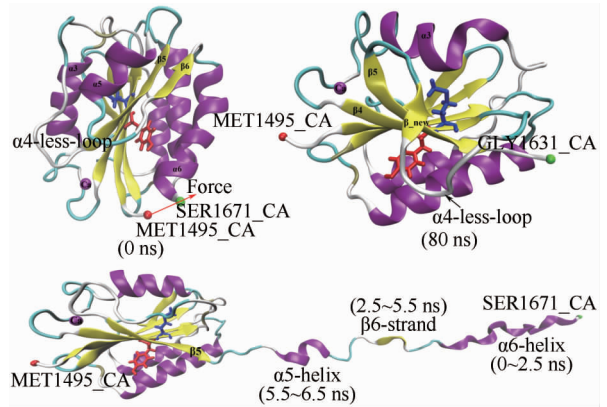


图4 200 pN作用下A2/Ca<sup>2+</sup>的解折叠快照

Fig. 4 Snapshots of the unfolding process under constant force (200 pN) for A2/Ca<sup>2+</sup>

β1片层之间(6对)、β3-α2之间以及β2片层与周围区域共计25对氢键保持很高的生存率和生存时间,使该中间稳态呈现出更高的稳定性。

## 2.4 Ca<sup>2+</sup>对酶切位点暴露的影响

在对A2和A2/Ca<sup>2+</sup>的晶体结构和动态平衡的构象分析中发现,位于β4片层上的酶切位点残基TYR<sup>1605</sup>和MET<sup>1606</sup>始终包埋于疏水核心区。而在恒力拉伸模拟实验中,通过解折叠路径分析发现,Ca<sup>2+</sup>结合并不阻碍A2结构域第1阶段的解折叠,但影响β5-片层从主体结构的解离,从而限制酶切位点的暴露。由于残基的溶剂可及表面积(solvent-accessible surface area, SASA)可以很好表征该残基是否暴露,故跟踪分析了200 pN恒力拉伸模拟过程中TYR<sup>1605</sup>和MET<sup>1606</sup>的SASA值的演变,并与其平衡过程进行比较,探明力和Ca<sup>2+</sup>介入对它们暴露程度的影响。

200 pN恒力作用下TYR<sup>1605</sup>和MET<sup>1606</sup>的SASA值的时间历程如图5(a)所示。对于A2/Ca<sup>2+</sup>(图中黑色圆点)中的TYR<sup>1605</sup>,SASA值在拉伸不久即升高至0.5 nm<sup>2</sup>,处于暴露的临界值状态(图中红色实线),其后一直在该值上下小范围波动;A2(图中浅灰色圆点)中的TYR<sup>1605</sup>前60 ns的SASA值变化几乎与A2/Ca<sup>2+</sup>中的重叠,但60 ns后开始升高,最终跃升至2 nm<sup>2</sup>,位点完全暴露。对于A2/Ca<sup>2+</sup>中的MET<sup>1606</sup>,前40 ns的SASA值均低于0.2 nm<sup>2</sup>,40 ns后开始升高并突破0.5 nm<sup>2</sup>,但很快回落至0.4 nm<sup>2</sup>左右浮动,而A2中的MET<sup>1606</sup>,10 ns时SASA值就开始上升趋势近0.5 nm<sup>2</sup>,之后基本在0.5 nm<sup>2</sup>下方小

幅波动, 最终突破至  $2 \text{ nm}^2$ 。结合分子解折叠路径可以判定: 残基  $\text{TYR}^{1605}$  先于  $\text{MET}^{1606}$  暴露, 可能发生于解折叠第 1 阶段; 而  $\text{MET}^{1606}$  的暴露可能发生于解折叠的第 2 阶段。从晶体结构上解释, 尽管相邻残基  $\text{TYR}^{1605}$  和  $\text{MET}^{1606}$  均位于  $\beta 4$ -片层, 但它们的朝向不同, 残基  $\text{TYR}^{1605}$  的侧链指向疏水核心的外侧, A2 外部 C 末端的解折叠即可引起该残基侧链的暴露; 与之相反, 残基  $\text{MET}^{1606}$  的大部分侧链包埋于疏水核心内侧, 只有剧烈的构象变化才能促使其暴露。

同时, 对平衡过程 (各 3 次) 及拉伸过程 (各 1 次) 中  $\text{TYR}^{1605}$  和  $\text{MET}^{1606}$  的 SASA 值进行统计分析, 以平均数  $\pm$  标准误表示, 结果表明: 它们拉伸过程的 SASA 值均远高于平衡过程, 具有极显著性差异; 拉伸过程中, A2 分子系统的 SASA 值又高于 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  分子系统, 两者差异具有统计学意义 [见图 5 (b)]。这些结果表明,  $\text{Ca}^{2+}$  结合延缓并阻碍酶切位点的暴露, 而力则有利于酶切位点的暴露, 促进 ADAMTS13 的酶切。

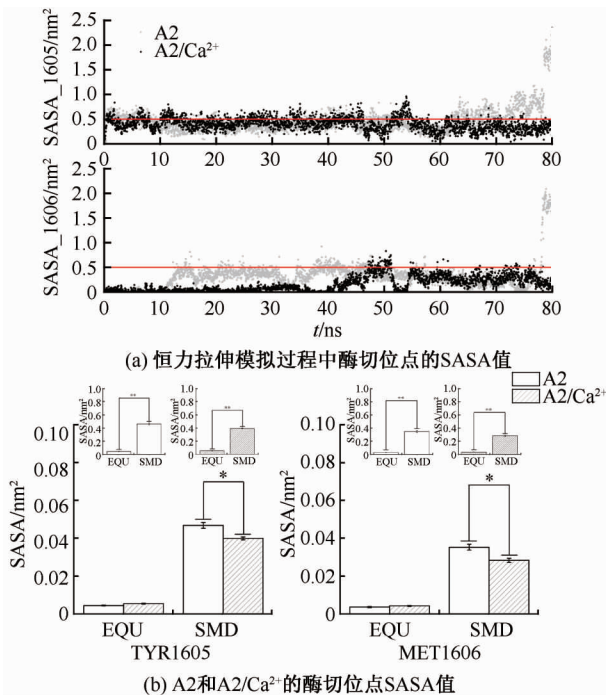


图 5 力和  $\text{Ca}^{2+}$  协同调控酶切位点的暴露过程 (\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ )

Fig. 5 Force and calcium synergistically regulate the exposure of the cleavage sites (a) SASAs of the cleavage sites during the steered molecular dynamics simulations under constant forces, (b) SASAs of the cleavage sites for A2 and A2/ $\text{Ca}^{2+}$

### 3 讨论

A2 结构域酶切位点 ( $\text{TYR}^{1605}$ - $\text{MET}^{1606}$ ) 的暴露是金属蛋白酶 ADAMTS13 切割 VWF 多聚体进而调控凝血止血功能的关键。目前尽管有热失活实验、酶切实验以及单分子光镊实验等实验数据表明,  $\text{Ca}^{2+}$  的介入可以提高 VWF-A2 结构域的稳定性, 降低 ADAMTS13 的酶切效率<sup>[3,10,13-16]</sup>, 但与之相关的稳定机制至今尚不清晰。本文采用分子动力学模拟方法, 对照研究 A2 和 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  两个分子系统, 从静态晶体结构、动态平衡中的构象演化以及力诱导的解折叠路径等角度出发, 试图从原子水平阐释  $\text{Ca}^{2+}$  对 VWF-A2 结构域稳定性的影响。

晶体结构分析表明,  $\text{Ca}^{2+}$  结合只引起  $\alpha 3\beta 4$  环链局部构象重排, 其余部分的构象基本重叠。而动态平衡过程中, 同样发现  $\text{Ca}^{2+}$  结合仅降低了  $\alpha 3\beta 4$  环链的柔性, 其余部分的构象未有显著性差异, 两个酶切位点残基始终包埋于疏水核心。由于 A2 结构域并非单独存在, 其结构及功能与相邻的 A1、A3 结构域紧密相关, 当 A3 与血管内皮下胶原结合时, 血流剪切力便通过 A3 及 A1 结构域传递至较为柔软的 A2, 故 ADAMTS13 酶切 VWF-A2 过程受到流体剪切力的调控<sup>[3]</sup>。根据已有 A2 结构域的单分子实验数据<sup>[5-6]</sup> 和恒速度拉伸模拟结果<sup>[17]</sup>, 采用更符合生理环境的恒力拉伸分子动力学模拟方法, 跟踪观察 100、150 和 200 pN 3 个不同拉力作用下 A2 和 A2/ $\text{Ca}^{2+}$  分子系统的原子轨迹。仅在拉力为 200 pN 时观测到 A2 分子 3 个阶段的完整解折叠过程, 而  $\text{Ca}^{2+}$  的结合使解折叠停留在第 2 阶段——一个较为稳定的中间态构象, 减缓了酶切位点的暴露过程。其余两个较低拉力时, 只观察到了 C 末端区域的解折叠趋势, 酶切位点没有达到完全暴露水平。这意味 A2 结构域的解折叠一定程度上是力依赖的, 突破中间的稳态构象需要克服较大的能障。

综上所述,  $\text{Ca}^{2+}$  对 A2 结构域稳定性的调控和可能的分子结构基础在于:  $\text{Ca}^{2+}$  结合虽然不会影响 A2 分子的整体构象, 但是可以引起  $\alpha 3\beta 4$  环链局部构象的重排, 造成该区域局部柔性的下降; 拉力作用下 A2 分子的解折叠始于 C 末端, 该区域远离  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点, 故其前期解折叠进程不受  $\text{Ca}^{2+}$  结合影响; 但是解折叠进入到中后期时, 由于  $\text{Ca}^{2+}$  介入

引起的  $\alpha 3\beta 4$  环链局部柔性降低约束了  $\beta 1-\beta 4-\beta 5$ -片层的运动,导致进一步解折叠受阻,酶切位点暴露随之减缓,最终导致 ADAMTS-13 的酶切效率降低。本课题组前期基于 A1-GPIb $\alpha$  相互作用机制的研究发现,局部动力学性质改变可调控两者的结合亲和力<sup>[22-23]</sup>。本文也得到相似的结论:Ca<sup>2+</sup>介入引起的 A2 结构域的  $\alpha 3\beta 4$  环链局部柔性改变是外力调控酶切位点的暴露和酶切效率的分子结构基础。

本研究从原子水平阐述了 Ca<sup>2+</sup>对 A2 结构域稳定性的影响,有助于深入理解循环血流环境对 ADAMTS13酶切 VWF 进而调控止血潜能的影响。根据晶体结构中参与 Ca<sup>2+</sup>配位的关键残基数据,结合突变实验,有望为 2A 型 VWD 症的治疗及其相关抗血栓药物设计提供指导。

#### 参考文献:

- [ 1 ] FRANCHINI M, LIPPI G. Von Willebrand factor and thrombosis [J]. *Ann Hematol*, 2006, 85(7): 415-423.
- [ 2 ] LENTING PJ, CHRISTOPHE OD, DENIS CV. Von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: Connecting the far ends [J]. *Blood*, 2015, 125(13): 2019-2028.
- [ 3 ] SPRINGER TA. Von Willebrand factor, Jedi knight of the blood stream [J]. *Blood*, 2014, 124(9): 1412-1425.
- [ 4 ] CRAWLEY JTB, GROOT R, XIANG Y, *et al.* Unraveling the scissile bond: How ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor [J]. *Blood*, 2011, 118(12): 3212-3221.
- [ 5 ] WU T, LIN JG, CRUZ MA, *et al.* Force-induced cleavage of single VWFA1A2A3 tri-domains by ADAMTS13 [J]. *Blood*, 2010, 115(2): 370-378.
- [ 6 ] 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.
- [ 7 ] TSAI HM. Is severe deficiency of ADAMTS13 specific for thrombotic thrombocytopenic purpura? Yes [J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1(4): 625-631.
- [ 8 ] ZHANG Q, ZHOU YF, ZHANG CZ, *et al.* Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(23): 9226-9231.
- [ 9 ] LUKEN BM, WINN LYN, EMSLEY J, *et al.* The importance of vicinal cysteines, C1669 and C1670, for von Willebrand factor A2 domain function [J]. *Blood*, 2010, 115(23): 4910-4913.
- [ 10 ] LYNCH CJ, LANE DA, LUKEN BM. Control of VWF A2 domain stability and ADAMTS13 access to the scissile bond of full-length VWF [J]. *Blood*, 2014, 123(16): 2585-2592.
- [ 11 ] MCKINNON TA, CHION AC, MILLINGTON AJ, *et al.* N-linked glycosylation of VWF modulates its interaction with ADAMTS13 [J]. *Blood*, 2008, 111(6): 3042-3049.
- [ 12 ] LYNCH CJ, LANE DA. N-linked glycan stabilization of the VWF A2 domain [J]. *Blood*, 2016, 127(13): 1711-1718.
- [ 13 ] ZHOU M, DONG X, BALDAUF C, *et al.* A novel calcium-binding site of von Willebrand factor A2 domain regulates its cleavage by ADAMTS13 [J]. *Blood*, 2011, 117(17): 4623-4631.
- [ 14 ] JAKOBI AJ, MASHAGHI A, TANS SJ, *et al.* Calcium modulates force sensing by the von Willebrand factor A2 domain [J]. *Nat Commun*, 2011, 2: 385.
- [ 15 ] XU AJ, SPRINGER TA. Mechanisms by which von Willebrand disease mutations destabilize the A2 domain [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(9): 6317-6324.
- [ 16 ] XU AJ, SPRINGER TA. Calcium stabilizes the von Willebrand factor A2 domain by promoting refolding [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(10): 3742-3747.
- [ 17 ] CHEN W, LOU JZ, ZHU C. Molecular dynamics simulated unfolding of von Willebrand factor A domains by force [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2009, 2(1): 75-86.
- [ 18 ] SVENJA L, MATTHIAS R, TOBIAS O, *et al.* Shear-induced unfolding and enzymatic cleavage of full-length VWF multimers [J]. *Biophys J*, 2016, 110(3): 545-554.
- [ 19 ] HUMPHREY W, DALKE A, SCHULTEN K. VMD-Visual molecular dynamics [J]. *J Molec Graphics*, 1996, 14(1): 33-38.
- [ 20 ] PHILLIPS JC, BRAUN R, WANG W, *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD [J]. *J Comput Chem*, 2005, 26(16): 1781-1802.
- [ 21 ] 窦甜甜, 吴建华, 刘广建, 等. 一种基于分子动力学模拟来识别 GPIb $\alpha$  与 VWF-A1 结合面上重要残基的方法 [J]. *医用生物力学*, 2013, 28(6): 606-614.
- [ 22 ] DOU TT, WU JH, LIU GJ, *et al.* novel approach for identifying the critical amino acid residues on binding site of GPIb $\alpha$  and vWF-A1 domain through molecular dynamics simulation [J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(6): 606-614.
- [ 23 ] 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.
- [ 24 ] LI H, LIU GP, 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.
- [ 25 ] LIU GJ, FANG Y, WU JH. A mechanism for localized dynamics-driven affinity regulation of the binding of von Willebrand factor to platelet glycoprotein Ib $\alpha$  [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(37): 26658-26667.
- [ 26 ] 方翔. 抗血栓抗体 6B4、假性血友病因子及其蛋白酶 ADAMTS13 的分子动力学模拟 [D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2012.
- [ 27 ] 宁志龙, 刘文平, 代春月, 等. 采用分子动力学模拟研究胶原激活 VWF 机制 [J]. *医用生物力学*, 2015, 30(S): 139.