

文章编号: 1004-7220(2024)01-0046-09

力调控 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 复合物结构稳定性的分子动力学研究

任建芳[#], 罗毅冲[#], 吴建华, 方颖

(华南理工大学 生物科学与工程学院; 生物力学所, 广州 510006)

摘要:目的 探究力对 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 稳定性的影响及调控机制。方法 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 晶体结构取自 PDB 数据库。通过平衡和拉伸分子动力学模拟,分析复合物生理环境下稳定性以及力诱导的解折叠路径和力学稳定性。结果 平衡过程中,FLNa-Ig21 和 α IIb β 3-CT 之间大部分盐桥和氢键的生存率小于 0.5,其结合强度相对较弱;恒速度拉伸过程中,复合物可承受 170~380 pN 的拉力,其力学强度与力诱导的解离路径有关;在 0~60 pN 恒力条件下,复合物呈现“滑移键”趋势,且力的增加有利于 α IIb β 3 近膜端 R995-D723 盐桥的解离和整合素的活化。结论 力诱导的 α IIb β 3-CT 近膜端异构可增强复合物的力学强度和解离时间的后移;突破 20 pN 阈值后,力正向调控整合素的活化。研究结果为深入揭示整合素 α IIb β 3 活化的分子机制及相关靶向药物开发提供参考。

关键词: 血小板整合素; 分子动力学模拟; 解折叠路径; 力学强度; 力学调控机制

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2024.01.007

Structural Stability of Force-Regulated FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT Complexes by Molecular Dynamics Simulation

REN Jianfang[#], LUO Yichong[#], WU Jianhua, FANG Ying

(School of Biological Sciences and Engineering; Institute of Biomechanics, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of force on mechanical stability of FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT complex and the regulation mechanism. **Methods** The FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT crystal structures were taken from the PDB database. The stability of the complexes in a physiological environment as well as the unfolding path and mechanical stability induced by mechanical forces were analyzed using equilibrium and steered molecular dynamics simulations. **Results** During the equilibration, the survival rate of most salt bridge and hydrogen bonds was below 0.5, and the interactions between FLNa-Ig21 and α IIb β 3-CT was relatively weak. During stretching at a constant velocity, the complex could withstand a tensile force of 70–380 pN, and its mechanical strength depended on the force-induced dissociation path. Under a constant force of 0–60 pN, the complexes exhibited a slipping-bond trend, and the force increase facilitated the breakage of the R995-D723 salt bridge and the activation of α IIb β 3 integrin. **Conclusions** The force-induced allostery of α IIb β 3-MP enhanced the complex mechanical strength and delayed FLNa-Ig21 dissociation from α IIb β 3-CT. After

收稿日期: 2023-05-22; 修回日期: 2023-07-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(12172137, 12072117)

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

[#]为共同第一作者

breaking through the 20 pN threshold, force positively regulated the activation of α IIb β 3 integrin. These results provide insights into the molecular mechanism of α IIb β 3 activation and the development of related targeted drugs.

Key words: platelet integrin; molecular dynamics (MD) simulation; unfolding pathway; mechanical strength; mechanical regulation mechanism

异源二聚体 α IIb β 3 作为血小板表面最主要的整合素,存在着低、中、高 3 种亲和力构象,在生理性止血和病理性血栓形成中发挥着重要作用^[1-2]。正常生理环境下,整合素 α IIb β 3 头部弯曲,遮盖了配体结合位点,呈现低亲和力状态以有效避免血栓形成^[3]。当血管受损时,整合素 α IIb β 3 可由内皮下锚定的血管性血友病因子(von Willbrand factor, vWF)及可溶性的血小板激动剂(二磷酸腺苷、血小板活化因子和凝血酶等)通过“由内而外”的信号通路激活至中等亲和力状态,进而结合其胞外配体(纤维原蛋白)通过“由外而内”的信号通路激活至高亲和力状态,实现血小板的稳定黏附和聚集,启动凝血级联反应^[4-5]。

整合素 β 3 亚基的胞质尾(cytoplasmic tail, CT)包含细丝蛋白 A(filamin A, FLNa)、Talin 和 Kindlin 等多个重要胞质分子的结合位点^[6],其近膜端 D723 与 α IIb 亚基上 R995 形成的盐桥已被证明在整合素双向激活通路中扮演关键角色^[7]。此外,有研究表明,FLNa-Ig21 在 β 3-CT 的结合位点为 Y747-T755^[8],这与整合素激活剂 Talin 和 Kindlin 的结合位点 W739-A750 和 S752-Y759 有部分重叠^[9],故 FLNa 与 β 3 的结合在一定程度上可以起到空间位阻的作用,阻断 Talin 和 Kindlin 与 β 3 尾部的结合以抑制 α IIb β 3 活化,这已得到 FLNa-Ig21 敲除与突变实验的验证^[10]。一般认为,当血小板受外部激动剂或凝血酶刺激时,会诱导 FLNa 从 β 3-CT 脱落,Talin 竞争性结合到 β 3-CT 近膜端的 NPxY 基序,解除 α IIb β 3-CT 的 K716-W739 二硫键,从而诱导胞外构象变化至中等亲和力状态^[11]。此外,FLNa 以二聚体形式存在,并通过 N 端的肌动蛋白结合结构域与骨架 F-actin 相连[见图 1(a)],可感受、传递循环血流微环境力学信号和胞内细胞骨架张力等力学信号^[12]。体内外实验均证明,仅病理性的血流剪切力就足以诱导血小板的活化、聚集和血栓形成^[13-14]。Kim 等^[15]在 CHO 细胞上转染 α IIb β 3,通过改变细

胞外剪切力、细胞内外的渗透压、细胞拉伸和增加膜曲率等方式,发现细胞膜的物理变形能在一定程度上激活整合素 α IIb β 3,且该信号通路不依赖 Talin。

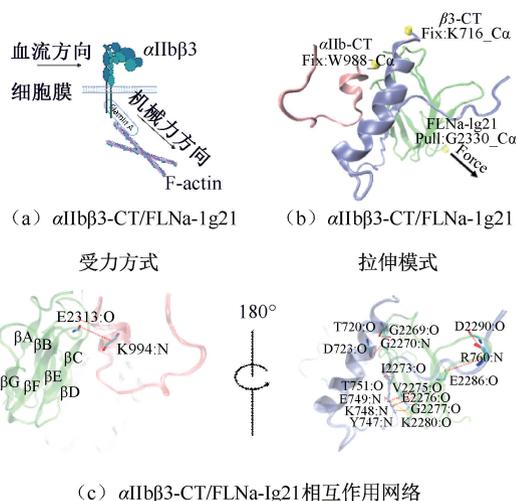


图 1 α IIb β 3-CT/FLNa-Ig21 复合物生理受力情况和晶体结构图

Fig. 1 Schematic diagram of physiological stresses and crystal structure of α IIb β 3-CT/FLNa-Ig21 complex (a) Force modulation of α IIb β 3-CT/FLNa-Ig21, (b) Stretching pattern of α IIb β 3-CT/FLNa-Ig21, (c) Interaction network α IIb β 3-CT/FLNa-Ig21

这些实验结果显示,力可能全面参与调控了 α IIb β 3 与 FLNa 的结合和解离过程,但其调控机制和分子结构基础至今未明。为了深入探究细胞骨架拉力下复合物 α IIb β 3 与 FLNa 相互作用的力学稳定性以及力学调控机制,本文采用分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟手段,通过分析力信号诱导 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 复合物的解离过程、构象变化和结合面残基相互作用网络的演变,深入了解整合素 α IIb β 3 力调控的活化机制和产生该机制的结构基础。研究结果对进一步深入理解血小板凝止血等相关的生理病理过程及相关药物的开发具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 复合物体系搭建

FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 复合物三维结构取自蛋白质结构数据库 (protein data bank, PDB), 代码为 2MTP。该复合物由 α IIb-CT (残基 W988-E1008)、 β 3-CT (残基 K716-T762) 以及 FLNa 的 Ig-21 结构域 (残基 G2336-G2330) 组成。然而, 由于在解析晶体结构时存在溶解度低和谱线拓宽的问题, β 3 亚基上存在两个点突变 (L717K 和 L718K), 因此, 通过可视化分子动力学 (visual molecular dynamics, VMD) 软件的 AUTOPSF 插件将其重新突变回野生型 K717L 和 K718L。使用 VMD 软件在每个亚基的 N 端和 C 端加入电中性补丁, 以消除肽链从 C 端到 N 端的电偶极矩对 MD 模拟所造成的影响; 调用 VMD 中的 solvate 软件包将复合物浸润在距离各边至少 15 nm 的 TIP3P 水框中; 最后加入 0.308 mol/L 的 Na^+ 和 Cl^- 离子以模拟真实生理溶液, 最终原子数为 38 378 个。

1.2 能量最小化与平衡

为获得能量较低且稳定性良好的分子体系, 使用纳米尺度分子动力学 (nanoscale molecular dynamics, NAMD) 软件在 CHRM22 全原子力场条件下, 按文献步骤对模拟体系进行三步能量最小化, 采用周期性边界条件以消除尺寸效应^[16]。随后在恒温 (36.85 °C)、恒压 (1.013 kPa) 条件下对该体系进行 3 次 40 ns 平衡模拟。运算过程中采用埃瓦尔德粒子网格 (particle mesh Ewald, PME) 算法计算静电相互作用, 范德华相互作用截止值设为 1.2 nm。

1.3 拉伸 MD 模拟

为了模拟复合物 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 在力作用下的稳定性和构象变化, 取 3 次平衡中最稳定一次的最后一帧作为初始构象, 进行拉伸 MD 模拟^[17]。为模拟细胞骨架传递的力, 将 α IIb-CT 和 β 3-CT N 端 W988-C α 和 K716-C α 设为固定原子, 将 FLNa-Ig21 C 端 G2330-C α 设为拉伸原子, 沿两个固定原子之间的中点与拉伸原子的连线方向 [见图 1(b)], 先以 0.3 nm/ns 速度进行 3 次恒速度 MD 模拟, 虚拟弹簧常数为 139 pN/nm, 直至 FLNa-Ig21 与 α IIb β 3 完全解离为止。再选取恒速度拉伸过程

中受力与设定拉力 (20、40 和 60 pN) 大小相当的构象为初始构象, 对各构象分别进行 3 次 40 ns 恒力拉伸 MD 模拟。

1.4 数据分析

所有分析都在 VMD 软件中进行。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, 结合面溶剂不可及表面积 (buried solvent-accessible surface area, buried SASA) 表征复合物结合面面积。氢键和盐桥定义如下: 若供体原子与受体原子间的距离 $d > 0.35$ nm 且键角大于 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 $d > 0.4$ nm 时, 盐桥形成。氢键或者盐桥的生存率定义为模拟过程其存在时长占整个模拟时长的比值; 结合面残基与残基之间的结合概率计算公式参照本课题组以前的工作^[18-20]。

本文所有数据都来自于 3 组独立实验, 以 (平均值 \pm 标准误) 表示。对于多组数据, 当数据符合正态分布时, 采用单因素方差分析和多重比较来检验组间差异性; 当数据不符合正态分布时, 采用 Kruskal-Wallis H 检验及 Nemenyi 事后检验来比较组间差异。

2 结果

2.1 平衡过程复合物 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 的稳定性及关键氢键

从核磁共振获得的 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 的静态三维结构来看, α IIb β 3-CT 与 FLNa-Ig21 的结合主要在 2 个区域 [见图 1(c)]: α IIb 与 β 3 亚基的近膜区 (membrane-proximal region, MP), 残基序列号分别为 W988-L1000 和 K716-W739; β 3 亚基的 C 端 (C-terminal integrin β 3-CT, β 3-C), 残基序列号为 D740-T762, 主要通过 Y747-F754 片层与 FLNa-Ig21C 和 D 片层形成的凹槽相结合。为了评估复合物在生理环境中的稳定性, 并为后续拉伸模拟提供稳定的初始构象, 本文基于能量最小化构象, 对其进行 3 次 40 ns 平衡模拟 (见图 2)。结果显示, 在 20 ns 后, 复合物的 RMSD 和结合能均在某一水平小幅波动, 但 3 次重复的差异较大, 推断是由于 α IIb β 3 C 端柔软的 loop 波动导致。在去除整合素 L1000-

E1008 和 N756-T762 2 小段 loop 结构后, 3 次平衡的 RMSD 曲线基本重合, 在 10 ns 后就基本稳定在 0.4 nm, 这证明了本研究的猜想, 并表明该系统已达到平衡[见图 2(a)]. 通过对平衡过程中复合物结合面氢键与盐桥数目的统计, 3 次平衡模拟的平

均氢键和盐桥数在 16~19 之间, 且均符合正态分布, 这意味着取样空间完备。综合 3 次平衡模拟数据, 第 2 次模拟具有较低 RMSD、较高的结合能和平均氢键(和盐桥)数, 复合物的稳定性更好。因此, 将其最后一帧构象作为后续生产性模拟的初始构象。

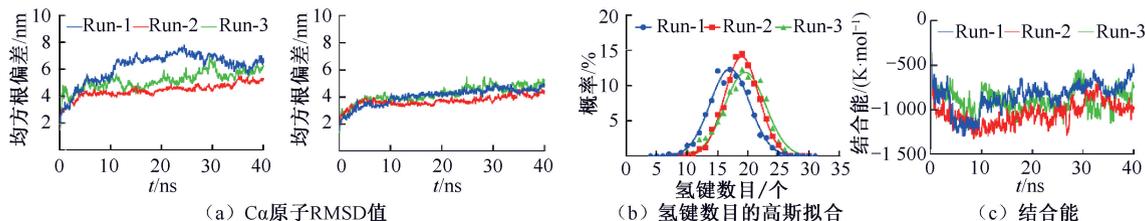


图 2 平衡过程中复合物 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 的稳定性

Fig. 2 Stability of complex FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT during equilibrium (a) RMSD of the C α atom, (b) Gaussian fit for hydrogen bonds, (c) Binding energy

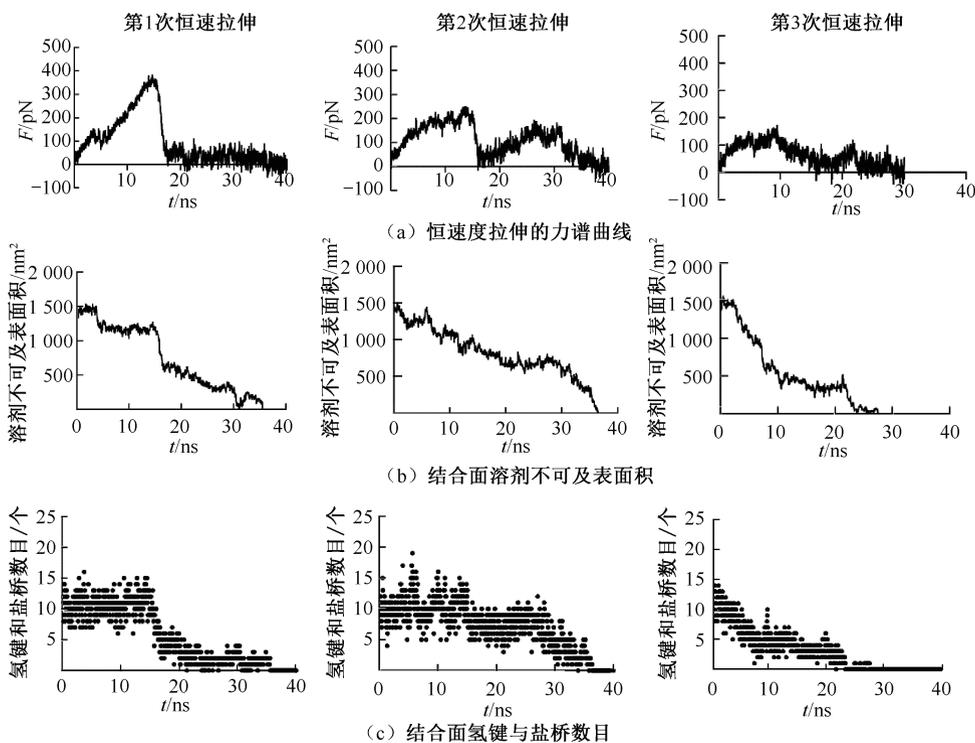


图 3 复合物 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 恒速度拉伸模拟

Fig. 3 Constant velocity SDM of the FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT complex (a) Force spectrum in three constant velocity stretches, (b) Buried SASA, (c) Number of hydrogen bonds and salt bridges

同时, 本文追踪了复合物接触面残基相互作用的动态变化, 并用氢键和盐桥的生存率来度量残基相互作用的强度以及它们对复合物结构稳定性的贡献, 平均生存率高于 0.30 的氢键和盐桥列于表 1。可以发现, FLNa-Ig21 与 α IIb β 3-CT

的相互作用主要集中在 β 3 亚基, 尤其 Y747-F754 片层对维持复合物结构稳定性发挥关键作用, 主要通过 E749-V2275、T751-I2273 之间的强氢键; K748-E2276、E749-K2280 之间兼有较强的盐桥和相对较弱的氢键。此外, FLNa-Ig21 与

α IIb β 3-MP 的相互作用较弱,与 β 3-MP 形成了 3 对较弱的氢键,与 α IIb-MP 则通过 K994-E2323 之间较强的盐桥和较弱的氢键。Liu 等^[10]采用表面等离子体共振技术测量 FLNa-Ig21 与 α IIb-CT、 β 3-MP 以及 β 3-C 的结合亲和力,发现 FLNa-

Ig21 与 β 3-C 的结合亲和力比其与 α IIb-CT 或 β 3-MP 的亲和力高数 10 倍,而 K994 和 E2276 的突变则会终止和减弱 FLNa-Ig21 与 α IIb-CT、 β 3-C 的相互作用。该研究结果也从实验方面证实了本文模拟结果的可靠性。

表 1 平衡过程中 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 结合面重要的氢键和盐桥(生存率 ≥ 0.30)

Tab. 1 Important hydrogen bonds and salt bridges at the FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT binding surface during equilibrium (survival rate ≥ 0.30)

排名	类型	整合素亚基	α IIb β 3-CT 残基	FLNa-Ig21 残基	生存率			平均生存率
					equ 1	equ 2	equ 3	
1	H	β 3-CT	E749	V2275	0.95	0.75	0.98	0.89
2	H		T751	I2273	0.94	0.76	0.93	0.88
3	H		R760	E2286	0.42	0.77	0.00	0.40
4	H		D723	G2270	0.77	0.31	0.12	0.39
5	H		K748	E2276	0.45	0.46	0.13	0.34
6	H		R724	D2287	0.20	0.80	0.00	0.33
7	H		T751	Y2297	0.52	0.47	0.00	0.33
8	H		T720	G2269	0.39	0.21	0.34	0.31
9	H		Y747	G2277	0.05	0.00	0.89	0.31
10	H		E749	K2280	0.06	0.34	0.54	0.31
11	H		R760	D2290	0.00	0.00	0.93	0.31
1	H	α IIb-CT	K994	E2313	0.20	0.39	0.51	0.37
1	S	β 3-CT	K748	E2276	0.78	0.71	0.17	0.55
2	S		E749	K2280	0.08	0.44	0.69	0.41
1	S	α IIb-CT	K994	E2313	0.25	0.55	0.81	0.54

注:H,S 分别代表氢键和盐桥, equ1、equ2、equ3 分别代表 3 次平衡模拟。

2.2 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 的力学强度及力诱导的解离

从平衡模拟中可以发现,FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 复合物结合面的氢键(和盐桥)平均生存率均低于 90%,且大多数都低于 50%,这意味着其结合亲和力并不是很强。为探究该复合物的力学强度及细胞骨架力诱导的解离过程,基于平衡构象,本文对该复合物进行 3 次恒速度 SMD 模拟,每次拉伸时间不做限定,直到 FLNa-Ig21 与 α IIb β 3-CT 完全解离为止。拉伸过程中的力谱曲线、结合面溶剂不可及表面积和氢键数目随时间的变化如图 3 所示。在前 4 ns,拉力经历稳定增加至 150 pN,且 3 次的爬坡曲线高度重合,随后 3 次模拟则呈现很大的差异。第 1 次恒速拉伸,约 4 ns 后拉力有轻微下降,伴随结合面面积的略微减少;接着拉力又继续上升,约 15 ns 达到最大峰值约 380 pN,期间结合面面积和氢键数目基本稳定;最后,拉力陡然下降至 0 附近波动,结合面面积和结合面氢键(和盐桥)数目均呈现先断崖式下降再逐渐下降的过程,约 35 ns 时复合物完全解离。第 2 次恒速拉伸,在 4 ns 急速爬坡

后,拉力继续波动上升,约 15 ns 达到最高峰约 250 pN,期间结合面面积持续下降,而氢键数目则在 10 ns 附近大幅波动;随后拉力急剧下降接近 0,但很快又上升,约 28 ns 时到达第 2 峰值 150 pN,这个阶段结合面面积和氢键数目基本维持在一个较低水平波动;最后,随拉力下降,结合面面积和氢键数目进一步减少,36 ns 时复合物完全解离。第 3 次恒速拉伸的力谱曲线与第 2 次恒速拉伸较为类似,但最大峰值仅为 170 pN,时间提前到 9 ns;第 2 峰约为 100 pN,时间为 21 ns;27 ns 时复合物已完全解离。

假如将恒速拉伸过程中复合物力谱的最大峰值定义为断裂力,即复合物所能承受的最大力,反映其力学强度。3 次拉伸模拟所得的断裂力在 170~380 pN 之间,三者存在有较大差异。结合相应的溶剂不可及表面积、氢键和盐桥数目随时间的变化,可以发现复合物的力学强度与解离时间存在一定的相关性:当力学强度高于 250 pN 时,解离时间大约在 35 ns;而力学强度低于 200 pN 时,解离时间则小于 30 ns。该结果提示,在复杂的力学微环境中,复合物可能拥有多种解离路径。

2.3 力诱导的 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 的解离路径和构象变化

为进一步探明复合物力学强度与解离路径的关系,本文跟踪了每次恒速度拉伸过程中复合物结合面残基相互作用随时间的演化以及复合物构象的变化(见图4)。从接触面氢键与盐桥的动态变化来看,3次模拟均以 FLNa-Ig21 与 α IIb β 3-MP 之间残基对的断裂为开端,接着与 β 3 之 Y747-F754 片层、C 端 loop 之间的氢键和盐桥也依次断裂,复合物解离。第1次和第3次恒速拉伸中,最大力峰均发生在 α IIb-MP 与 FLNa-Ig21 之间 K994-E2313 氢键和盐桥断裂时,但前者 β 3-MP 与 FLNa-Ig21 之间的3对氢键和盐桥稍后断裂,而后者则断裂在先;结合最大断裂力时的结构快照,可以发现前者的 β 3-MP α 螺旋发生了部分解折叠,而后者保持完好,这意味着该力诱导的 β 3-MP 的异构有利于维持其与配体的相互作用,导致断裂

力的上升和断裂时间的后移。第2次恒速拉伸中, α IIb β 3-MP 与 FLNa-Ig21 的5对氢键和盐桥的断裂均发生在最大力峰前,但几乎同时新增了 R760-2287 残基对之间的氢键和盐桥,以防止复合物失稳;最大力峰时, β 3-MP α 螺旋已经完全解折叠且离开 FLNa-Ig21,但 β 3 后面的 Y747-F754 片层与配体的凹槽结合面维持完好,依然具有一定的力学强度以避免外力的破坏。比较第1次和第2次恒速拉伸最大峰值时的快照, β 3-MP α 螺旋的部分解折叠维持了 α IIb β 3-MP 与配体残基对之间的相互作用,极大提高了断裂力,但过大的断裂力将 Y747-F754 片层部分拉离了结合凹槽,导致拉力的快速下降直至复合物解离。另外,在第1次和第2次恒速拉伸中均发现 FLNa-Ig21 的 β G 片层拉出;第3次恒速拉伸由于断裂力过低, α IIb β 3-CT 和 FLNa-Ig21 均未发生明显的异构。

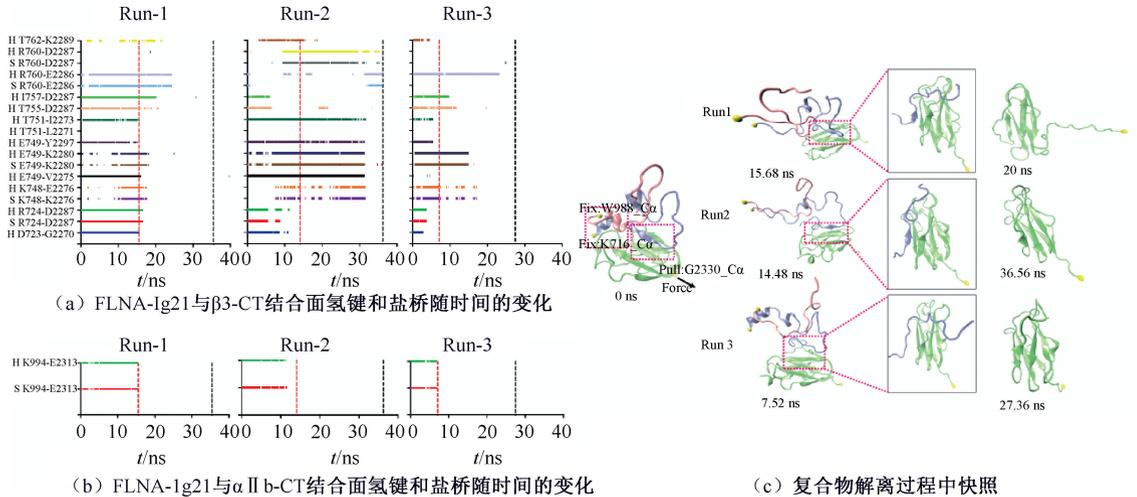


图4 FLNa-Ig21 与 α IIb β 3-CT 的解离过程和构象变化

Fig. 4 Dissociation of the FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT complex and conformation change (a) Variation of hydrogen bonds and salt bridges at the binding surface of FLNa-Ig21 with β 3-CT, (b) Variation of hydrogen bonds and salt bridges at the binding surface of FLNa-Ig21 with α IIb-CT, (c) Snapshots for dissociation process of the complex

注:图4(b)中红色虚线代表恒速度拉伸力谱曲线第1个峰值的时间点,黑色虚线代表恒速度拉伸过程中复合物完全解离的时间点;H代表氢键,S代表盐桥。

综上所述,本文模拟结果表明,复合物 α IIb β 3-CT/FLNa-Ig21 的力学强度确实与解离路径密切相关,力诱导的 β 3-MP α 螺旋的部分或完全解折叠有利于增加复合物的力学强度以抵抗外力的破坏,避免整合素不必要的激活。

2.4 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 复合物的力学稳定性

在正常生理条件下, α IIb β 3-CT/FLNa-Ig21 可能承受的力远小于其断裂力,且拉力过快增加会遮蔽细微的结构变化。因此,在恒速拉伸的基础上又进行了恒力拉伸模拟。在 0、20、40 和 60 pN 拉力条件

下,探究力对复合物稳定性的影响。

不同恒力下,平均的 C α -RMSD 时间历程表明,30 ns 后复合物已基本达到稳定,而且施加力有利于增强复合物的整体稳定性[见图 5(a)]。但追踪结合面氢键与盐桥的数目、结合面面积和相互作用能,发现三者之间的数据并不互相支持:氢键与盐

桥的数目随力的增加,呈现先减少、后增大的趋势,40 pN 时达到最小值;结合面溶剂不可及表面积则随力的增加呈现单向下降的趋势;结合能未呈现规律变化,0 pN 时数值最高,20 pN 时数值最低[见图 5(b)~(d)]。通过观察模拟轨迹动画,未发现明显的变构行为,说明复合物内部相互作用相对稳定。

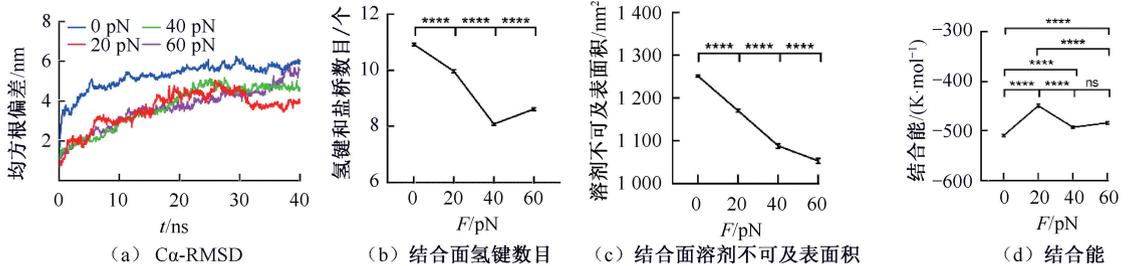


图5 恒力拉伸过程中 FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT 稳定性 (***) $P < 0.001$; ns, $P > 0.05$)

Fig. 5 Stability of FLNa-Ig21/ α IIb β 3-CT during constant force stretching (a) C α -RMSD, (b) Number of hydrogen bonds and salt bridges, (c) Buried SASA, (d) Binding energy

接着,分析并计算不同恒力模拟过程中复合物接触面残基对相互作用的生存率,并制成热图,发现 α IIb-MP 及 β 3 Y747-F754 片层与 FLNa-Ig21 之间的 4 对残基: K994-E2313、K748-E2276、E749-V2275 和 E749-K2280 对复合物的力学稳定性起着关键作用。同时, β 3-MP 与 FLNa-Ig21 之间的 6 对残基相互作用,有 5 对与力的增加呈现负相关关系[见图 6(a)]。

因此,本文推测,力的增加有利于 β 3-MP 从 FLNa-Ig21 中解离。同时,求证 β 3-MP 与 FLNa-Ig21 之间的质心距离,它们之间的质心距离越短,则结合越牢固,反之越松散。结果表明:随着力的增加,质心距离确实单调上升[见图 6(b)]。该结果提示,20~60 pN 力对 β 3-MP 与配体结合的影响显著,进而可能影响 β 3-MP 与 α IIb-MP 的相互作用。

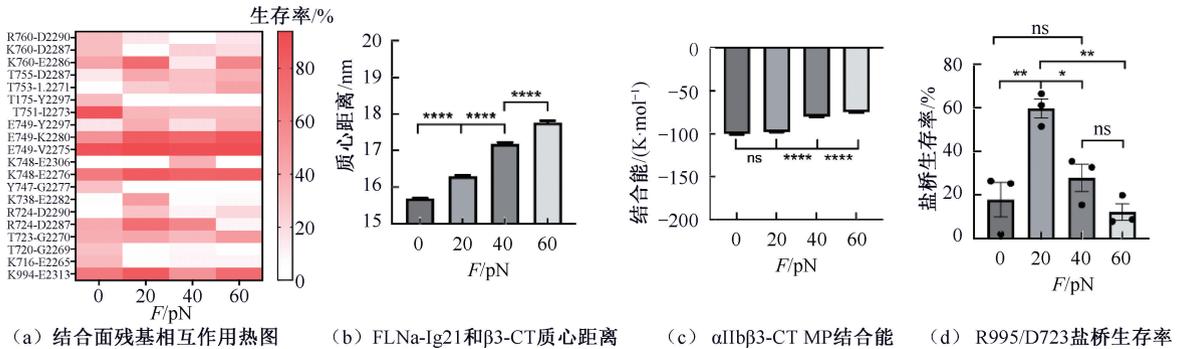


图6 恒力诱导的复合物结合面相互作用的变化 (* $P < 0.5$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; ns, $P > 0.05$)

Fig. 6 Constant force-induced changes of interfacial interactions (a) Heat map of interactions between interfacial residues, (b) Mass center distance between FLNa-Ig21 and β 3-CT, (c) Binding energy of α IIb β 3-MP, (d) Survival rate of R995/D723 salt bridge

有研究表明, α IIb β 3-MP 一对盐桥 R995-D723 的解离在 α IIb β 3 由内而外的活化通路中发挥关键作用^[7]。因此,本文分析计算了不同恒力下该盐桥的生存率以及 α IIb β 3-MP 的结合能。结果显示,随着力的增加, α IIb β 3-MP 的结合能数值单调下降,即

随着 β 3-MP 与 FLNa-Ig21 之间的质心距离的增大, β 3-MP 与 α IIb-MP 的相互作用也随之减弱;同时,R995-D723 盐桥生存率呈现先上升后下降的趋势,20 pN 时达到最大值[见图 6(c)、(d)]。

综上所述,尽管本模拟数据之间不能完全统一

或充分地相互支持,但呈现的力学调控机制基本一致:即随力从 20 pN 增大,FLNa-Ig21 与 α IIb β 3-CT 的接触面面积减少,主要归因于 β 3-MP 与 FLNa-Ig21 之间残基对相互作用的减弱和两者质心距离的增大;进而削弱 β 3-MP 与 α IIb-MP 的相互作用,使关键 R995-D723 盐桥的生存率下降,从而有利于血小板整合素的活化。

3 讨论与展望

体内外实验及临床病例均证明 FLNa 对血小板整合素 α IIb β 3 激活有负调控作用^[21],关于 FLNa 究竟如何从整合素 α IIb β 3 胞质域脱落和激活整合素,有研究提出“配体竞争性结合诱导解离模型”和“力诱导的复合物构象改变解离模型”两种假说^[22],但由于体内及细胞内环境的复杂性,一直未能证实。

基于 Liu 等^[10]采用核磁共振技术解析得到的 α IIb β 3-CT/FLNa-Ig21 复合物三维结构,采用恒速度拉伸和系列恒力拉伸的 MD 模拟,本文系统探索了复合物的力学强度、解离路径以及力诱导的整合素活化。结果发现, β 3-MP 之 α 螺旋的部分或完全解折叠分别有助 β 3-MP 或 Y747-F754 片层与 FLNa-Ig21 的结合,导致断裂力的增加和解离时间的延迟,这种力诱导的异构可提高复合物的力学强度以抵抗外力破坏的现象,已广泛发现于 β 3/Talin-F3、 β 1/Talin-F3 及 CD44/HA 等分子系统^[18-19,23]。但是与这些分子系统不同的是:在恒力拉伸模拟过程中,随着拉力的增加, α IIb β 3-CT 与 FLNa-Ig21 之间没有发现“逆锁键”现象,更多呈现“滑移键”趋势,即力的增加减弱了 FLNa-Ig21 与 α IIb β 3-CT 之间的相互作用,尤其是与 β 3-MP 之间的结合,进而影响 α IIb-MP 与 β 3-MP 的结合强度。同时,被认为是整合素激活开关的 R995-D723 之间的盐桥,表现出力调控“逆锁键”机制,最佳阈值出现在 20 pN,远低于同等拉伸模拟条件下 β 3/Talin-F3 的阈值 60 pN^[18]。系列恒力拉伸的模拟结果表明, β 3-MP/FLNa-Ig21 力学稳定性较差,容易导致 R995-D723 盐桥的断裂和 β 3 整合素的激活,比较 Talin 与 β 3-CT 结合表现的良好力学稳定性,从一定程度上证明 Talin 与 β 3-CT 结合的竞争力要优于 FLNa-Ig21。

由于整合素胞内结构的特殊性以及构建合理

细胞膜的困难性,本文的模拟数据不能得到直接实验数据的支持;另外,由于计算资源的限制和尺度效应,计算模拟条件包括拉伸速度和拉力是远高于生理条件。但本模拟结果不仅在原子水平展示了“力诱导的复合物构象改变解离模型”,而且从一定程度上解释了“配体竞争性结合诱导解离模型”,使两个假设达到了很好的统一。此外,本文还细致分析了力对复合物内部残基相互作用对的影响,这对于全方位深入理解力诱导的血小板整合素的活化机制以及抗血栓靶向药物的开发具有启发和参考价值。

利益冲突声明:无。

作者贡献声明:任建芳负责选题和研究实施、数据的采集与分析、整理和排版论文图片,并协助论文撰写和修改;罗毅冲负责论文撰写及协助数据分析;吴建华负责研究设计;方颖负责研究和数据分析指导以及论文指导与修改。

参考文献:

- [1] CHOI WS, RICE WJ, STOKES DL, et al. Thrombosis and hemostasis: Three-dimensional reconstruction of intact human integrin α IIb β 1: New implications for activation-dependent ligand binding [J]. *Blood*, 2013, 122: 4165-4171.
- [2] LI J, TIMOTHY AS. Energy landscape differences among integrins establish the framework for understanding activation [J]. *J Cell Biol*, 2017, 217(1): 397-412.
- [3] VINOGRADOVA O, HAAS T, PLOW EF, et al. A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the α IIb-subunit [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(4): 1450-1455.
- [4] LI Z, DELANEY MK, O' BRIEN KA, et al. Signaling during platelet adhesion and activation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2341-2349.
- [5] ESTEVEZ B, DU X. New concepts and mechanisms of platelet activation signaling [J]. *Physiology*, 2017, 32: 162-177.
- [6] KADRY YA, CALDERWOOD DA. Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2020, 1862(5): 183206.
- [7] HUGHES PE, DIAZ-GONZALEZ F, LEONG L, et al. A Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling [J]. *J Biochem*, 1996, 271(12): 6571-6574.
- [8] ITHYCHANDA SS, DAS M, MA YQ, et al. Migfilin, a molecular switch in regulation of integrin activation [J]. *J*

- Biol Chem, 2009, 284: 4713-4722.
- [9] 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: 337-347.
- [10] LIU J, DAS M, YANG J, *et al.* Structural mechanism of integrin inactivation by filamin [J]. Nat Struct Mol Biol 2015, 22(5): 383-389.
- [11] ITHYCHANDA SS, HSU D, LI H, *et al.* Identification and characterization of multiple similar ligand-binding repeats in filamin [J]. J Biol Chem, 2009, 284(50): 35113-35121.
- [12] KIM H, MCCULLOCH CA. Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion [J]. FEBS Lett, 2011, 585: 18-22.
- [13] 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.
- [14] CHEN Y, JU L A, ZHOU F, *et al.* An integrin α (IIb) β (3) intermediate affinity state mediates biomechanical platelet aggregation [J]. Nat Mater, 2019, 18(7): 760-769.
- [15] KIM J, LEE J, JANG J, *et al.* Topological adaptation of transmembrane domains to the force-modulated lipid bilayer is a basis of sensing mechanical force [J]. Curr Biol, 2020, 30: 1614-1625.
- [16] 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 JL, *et al.* Molecular dynamics study on docking of A3/A1 and interdomain interactions [J]. J Med Biomech, 2020, 35(2): 195-201.
- [17] JI Y, FANG Y, WU J, *et al.* Tension enhances the binding affinity of β 1 integrin by clamping talin tightly: An insight from steered molecular dynamics simulations [J]. J Chem Inf Model, 2022, 62(22): 5688-5698.
- [18] 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): 1-11.
- [19] 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.
- [20] 窦甜甜, 吴建华, 刘广建, 等. 一种基于分子动力学模拟来识别 GPIIb α 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 GPIIb α and vWF-A1 domain through molecular dynamics simulation [J]. J Med Biomech, 2013, 28(6): 606-614.
- [21] BERROU E, ADAM F, LEBRET M, *et al.* Gain-of-function mutation in filamin A potentiates platelet integrin α β activation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37: 1087-1097.
- [22] ROSA JP, RASLOVA H, BRYCKAERT M. Filamin A: Key actor in platelet biology [J]. Blood, 2019, 134(16): 1279-1288.
- [23] YAO Z, WU J, FANG Y. Moderate constraint facilitates association and force-dependent dissociation of HA-CD44 complex [J], Int J Mol Sci, 2023, 24(3): 2243.