

文章编号:1004-7220(2013)06-0606-09

# 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新方法

窦甜甜, 吴建华, 刘广建, 方颖

(华南理工大学 生物科学与工程学院, 广州 510006)

**摘要:** **目的** 发展一种识别受体与配体相互作用中关键氨基酸残基的计算机新方法。**方法** GPIb $\alpha$ /vWF-A1 的晶体结构取自 PDB 数据库;利用自由分子动力学模拟,观察 GPIb $\alpha$ /vWF-A1 复合物结合面上的盐桥和氢键的形成和演化;利用分析计算得到的这些盐桥和氢键的生存率的高低,作为度量相互作用残基对之重要性的判据。**结果** 在 GPIb $\alpha$ /vWF-A1 的结合面上,GPIb $\alpha$  的 21 个残基和 vWF-A1 的 21 个残基显著参与了 GPIb $\alpha$  和 vWF-A1 间的相互作用,这些残基中的 20 个已得到突变实验的证实。**结论** 该方法能较好地预报和识别受体-配体相互作用中的关键残基,并可为传统的氨基酸残基突变实验和抗凝血栓药物设计提供指导。

**关键词:** 分子动力学模拟; 关键残基; 受体; 配体

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

## A novel approach for identifying the critical amino acid residues on binding site of GPIb $\alpha$ and vWF-A1 domain through molecular dynamics simulation

DOU Tian-tian, WU Jian-hua, LIU Guang-jian, FANG Ying (*School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China*)

**Abstract: Objective** To develop a novel computer method for identifying the critical amino acid residues in the receptor-ligand interactions. **Methods** GPIb $\alpha$ /vWF-A1 crystal structure was taken from Protein Data Bank (PDB code 1SQ0). Free molecular dynamics simulations were performed to observe the formation and evolution of hydrogen bonding and salt bridge on the binding sites of GPIb $\alpha$  and vWF-A1 by VMD. A residue interaction index, which was scored with the survival ratios of salt bridges and/or hydrogen bonds involved in interaction of a residue to other(s), was used as a criterion of the residue's role in interaction between the receptor and ligand. **Results**

In the interface, 21 residues in GPIb $\alpha$  and 21 residues in vWF-A1 were significantly identified to participate in the interaction between GPIb $\alpha$  and vWF-A1; 20 of these 42 key residues were verified by previous mutagenesis experiments. **Conclusions** This novel approach is useful for computationally identifying the key residues involved in GPIb $\alpha$ -vWF interaction, and has potential in developing new strategy for the traditional mutagenesis experiments and the antithrombotic mAbs drug design.

**Key words:** Molecular dynamics simulation; Key residues; Receptor; Ligand

在正常的生理止血过程和病理的血栓形成过程中,血小板膜上的糖蛋白受体(platelet receptor gly-

coprotein Ib $\alpha$ , GPIb $\alpha$ )与血管内皮细胞上血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)之 A1 结构域

收稿日期:2013-04-01; 修回日期:2013-04-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10972081, 11072080)。

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

的结合是血小板黏附于血管内皮受损部位、并启动下游信号的至关重要的第 1 步<sup>[1]</sup>。在病理条件下, GPIIb $\alpha$  或 vWF 的功能异常会导致血栓形成, 进而可能引发心脏衰竭和脑中风<sup>[2]</sup>。发生于血小板型血管性血友病(von Willebrand disease, vWD)病人身上的 GPIIb $\alpha$  功能增强型突变(例如 M239V)可导致血小板与 vWF 的结合异常增强。这些病人遭受出血紊乱的痛苦, 其典型特征为间歇性血小板减少和大分子量血浆 vWF 的缺失<sup>[3-4]</sup>。

vWF 介导血小板的黏附呈现血流增强型特征, 涉及 vWF-与 GPIIb $\alpha$  相互作用的逆锁键调节机制。已解析的 GPIIb $\alpha$  晶体结构的 N 端结构域由 8 个亮氨酸富集区和 1 个突出的  $\beta$  开关及位于顶端的  $\beta$  发夹所组成<sup>[5]</sup>。在野生型和突变体复合物中, GPIIb $\alpha$  均以  $\beta$  开关和  $\beta$  发夹钳住 vWF-A1 结构域<sup>[6-7]</sup>。在高剪切力条件下, 流体可以把  $\beta$  开关从柔性的链转变为  $\beta$  发夹结构<sup>[8-9]</sup>。同时, 流体可以破坏 vWF-A1 的分子内盐桥, 调整其与 GPIIb $\alpha$  的相对朝向以形成新的分子间相互作用<sup>[10]</sup>。这些血流应力环境诱导的构象改变可以增强 GPIIb $\alpha$  与 vWF 的结合, 使得在一定阈值下增加的力可以延长而非缩短键的生存时间。

基于其在血栓形成中的重要作用, GPIIb $\alpha$  成为

表 1 经突变实验证实的参与 GPIIb $\alpha$  和 A1 反应的关键残基

Tab. 1 Key residues involved in binding of A1 to GPIIb $\alpha$  and indentified through mutation experiments

残基所处位置	GPIIb $\alpha$					A1				
非结合面	His86, Glu125, Glu162, Glu172, Lys189, Asp514, Asp520, Arg524, Lys534, Glu626, Lys642, Lys667 <sup>[14-15]</sup>									
	Gly233 <sup>[11,12]</sup>									
结合面	His12, Glu14, His37, Glu40, Asp83, Asp106, Arg552, Thr594, Gly561, Hsd563, Arg571, Lys572, Glu596, Lys599, Gln604, Ser607, Arg611, Glu613, Arg616, Arg629, Glu128, Asp175, Asp235, Lys237, Met239 <sup>[11,12]</sup>									
						Arg632, Arg636 <sup>[13-15]</sup>				

然而, 确定生物分子间相互作用的关键残基的传统方法是突变实验, 它通常是昂贵、耗时且盲目的<sup>[11]</sup>。最近, 本课题组发展了一种基于分子动力学模拟的方法, 并成功预测了抗血栓单克隆抗体 6B4 的表位残基, 结果和突变实验结果一致<sup>[17]</sup>。对探测那些直接参与了 GPIIb $\alpha$  与 vWF 相互作用的关键残基而言, 分子动力学模拟可能是一种有力工具。事实上, 通过分子动力学模拟, 可以在不同的温度和压力条件下观察蛋白复合物构象的演化和相应原子运

动了抗体设计和抗血栓药物的新靶点, 故确定那些调节 GPIIb $\alpha$ -A1 结合亲和力的关键残基受到人们的广泛重视和长期研究。对于 GPIIb $\alpha$ , Shimizu 等<sup>[11]</sup>发现, HIS<sup>12</sup>、GLU<sup>14</sup>、GLU<sup>128</sup>、ASP<sup>175</sup> 4 个残基的突变会降低瑞斯托霉素和博托霉素诱导的 GPIIb $\alpha$  与 A1 结构域的特异性结合; Peng 等<sup>[12]</sup>研究表明, 将 GPIIb $\alpha$  上的 ASP<sup>83</sup>、GLU<sup>128</sup>、ASP<sup>175</sup> 残基突变为丙氨酸后, 会显著增加 GPIIb $\alpha$  与其抗体 AN51 和 SZ2 间的结合, 而 HIS<sup>37</sup>、GLU<sup>40</sup> 和 GLU<sup>128</sup> 的突变则有效阻止了 GPIIb $\alpha$  与其抗体 Hip1 的结合。对于 vWF 之 A1 结构域而言, Vasudevan 等<sup>[13]</sup>发现, ARG<sup>629</sup>、ARG<sup>632</sup> 和 ARG<sup>636</sup> 这 3 个残基的突变会影响其在流体作用下介导血小板黏附的能力; Cruz 等<sup>[14]</sup>发现, G561S、H563T、T594S/E596A、Q604R、和 S607R 的突变会降低血流依赖的血小板黏附和抑制瑞斯托霉素介导的血小板聚集; Matsushita 等<sup>[15]</sup>发现, LYS<sup>599</sup>、ARG<sup>629</sup> 和 ARG<sup>632</sup> 残基的突变可以改变 GPIIb $\alpha$  与瑞斯托霉素和博托霉素的反应; 而 ARG<sup>571</sup>、LYS<sup>572</sup>、GLU<sup>596</sup>、ARG<sup>616</sup>、ARG<sup>636</sup> 残基的突变可以部分改变 GPIIb $\alpha$  与瑞斯托霉素与博托霉素反应。目前, 经由突变扫描实验, 人们已发现了 40 个影响 A1 与 GPIIb $\alpha$  结合的重要残基(见表 1)。在这些残基中, 27 个分布在 GPIIb $\alpha$ -A1 复合物的结合面上。

动的细节, 从而得到功能性的暗示<sup>[18-19]</sup>。因此, 在本课题组关于理论预报 GPIIb $\alpha$  的单克隆抗体 6B4 表位残基的工作基础上, 本文通过分子动力学模拟, 进一步研究 GPIIb $\alpha$  与 vWFA1 相互作用中的残基对, 并引入了一个新的度量这些残基重要性、不同于氢键或盐桥稳定性指数的指标, 即: 残基相互作用指数(residue interaction index, RII) 来度量残基的重要性。研究结果发现, 这一残基相互作用指数, 可以较好地用以发现和辨识那些在 GPIIb $\alpha$  与 vWFA1 相互

作用过程中的关键残基。本文所提出的这一新的计算机策略,可用于预报和识别其他受体-配体相互作用中的关键残基,还可为传统的氨基酸残基突变实验和单克隆分子药物设计提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 复合物晶体结构

GPIIb $\alpha$ -A1 复合物的晶体结构下载于 PDB Bank (PDB-ID:1SQ0)。如图 1 所示,关键残基以 licorice 形式呈现并以原子类型染色(碳原子为青色,氮原子为蓝色,氧原子为红色),涉及的氢键分别标示为蓝色虚线。A1 在晶体结构中的残基序号为 A 链的 506 号至 703 号,GPIIb $\alpha$  在晶体结构中的残基序号为 B 链的 1 号至 265 号。

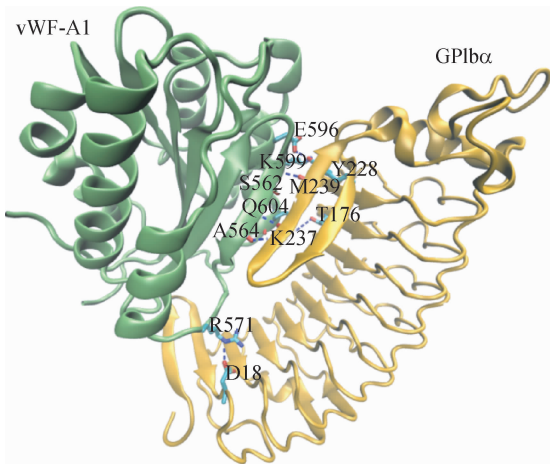


图1 从 GPIIb $\alpha$ /vWF-A1 复合物晶体结构(PDB 代码:1SQ0)中发现的氢键

Fig.1 Hydrogen bonds detected from the crystal structure of GPIIb $\alpha$ /vWF-A1

### 1.2 分子动力学模拟

模拟过程中使用两个软件包,分别为用于建模和分析数据的生物分子可视化软件 VMD<sup>[20]</sup> 和用于系统平衡和自由分子动力学的 NAMD 2.9<sup>[16]</sup>。将 GPIIb $\alpha$ -A1 复合物置于 16.0 nm × 9.3 nm × 8.5 nm 充满 TIP3P 水分子的矩形水框中,加入 108 个 Na<sup>+</sup> 和 107 个 Cl<sup>-</sup> 以模拟生理环境并使系统中和。所有模拟均采用 CHARMM22 力场,使用 PME (particle mesh Ewald) 算法计算长程静电相互作用,涉及短程静电相互作用和范德华力作用的相应原子的距离阈

值均采用 1.3 nm。模拟采用周期性边界条件,以 2 fs 作为积分步长。

最小化时,首先固定所有重原子运行  $1.5 \times 10^4$  步,接着释放所有原子后再运行  $1.5 \times 10^4$  步。随后,对体系分别进行 2 次 10 ns 的平衡。平衡时,温度保持为 36.85 °C,压力保持为 101.3 kPa。通过观察温度、总能量和重原子的均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 的时间曲线 (见图 2),在 10 ns 时系统已相当稳定,达到平衡状态。选取两次平衡后的最后一帧复合物结构,分别作为后续自由分子动力学模拟的初始构象。

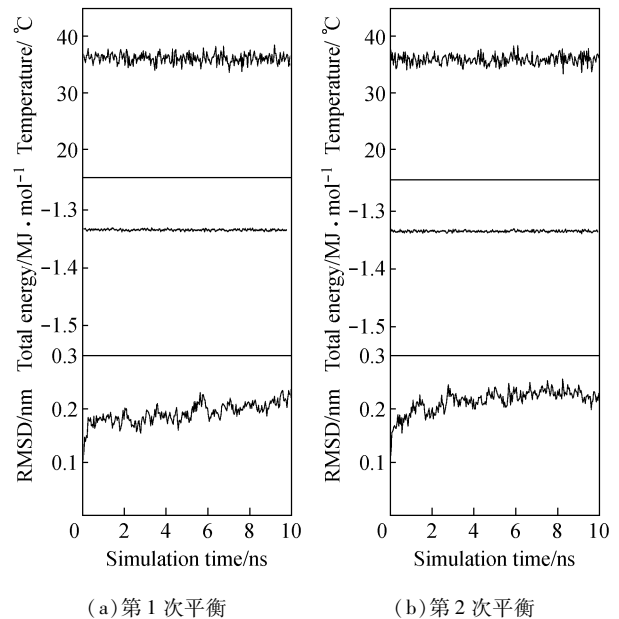


图2 GPIIb $\alpha$ -A1 复合物在模拟时间内两次平衡过程中的温度、总能量和重原子 RMSD 的变化曲线

Fig.2 Variation of the temperature, total energy and RMSD of heavy atoms of GPIIb $\alpha$ /vWF-A1 complex versus simulation time

(a) The first independent system equilibrium processes, (b) The second independent system equilibrium processes

### 1.3 氢键和盐桥的生存率

在不控制温度和压力的条件下,分别对每个初始构象进行 3 次 10 ns 的自由分子动力学模拟。使用 VMD 跟踪分析模拟过程中出现的结合键,当盐桥的距离大于 0.35 nm、氢键的距离大于 0.35 nm 或键角小于 150° 即鉴定为盐桥和氢键的断裂。图 3 所示为自由分子动力学模拟过程中 2 号氢键即 ASP235 上的 OD1 氧原子与 ARG579 上 NH1 氮原子之间的距离随模拟时间的变化曲线,虚线代表

0.35 nm的阈值。阈值下方时间段氢键是存在的,而阈值之上的时间段氢键是断裂的,蓝色、绿色和红色的线分别代表3次独立的自由分子动力学模拟的时间历程。将每次模拟阈值下的时间叠加起来,即得到此次模拟中键的生存时间,而键的生存率(survival ratio)则为生存时间( $t_{\text{survival}}$ )与模拟时间( $t_{\text{simulation}}$ )之比,即:

$$r = t_{\text{survival}}/t_{\text{simulation}} \quad (1)$$

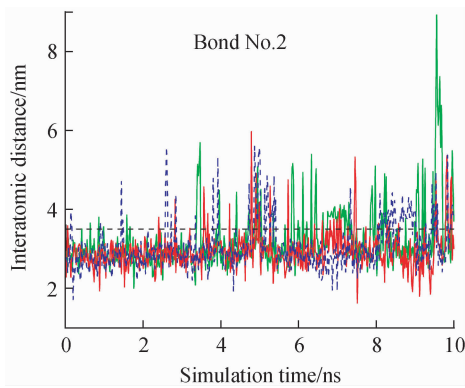


图3 GPIb $\alpha$ /vWF-A1 复合物在自由分子动力学模拟时结合面上2号氢键原子间距离随时间的变化图

Fig.3 Time courses of interatomic distances of the 2nd H-bond in binding site of GPIb $\alpha$ /vWF-A1 complex

### 1.3 残基相互作用指数 RII

在模拟过程中,受体中的某个氨基酸残基可能与配体中的几个氨基酸残基依次产生氢键或盐桥,它们具有不同的热稳定性和生存率。若某残基在模拟过程中可与配体上  $n$  个残基产生氢键或盐桥,该残基与第  $i$  个残基间形成第  $j$  个氢键或盐桥的生存率为  $p_{i,j}$  ( $i=1,2,\dots,n; j=1,2,\dots,m$ ), 则该残基成键的概率为

$$\text{RII} = 1 - \prod_{i=1}^n \prod_{j=1}^m (1 - p_{i,j}) \quad (2)$$

显然,大的 RII 值对应于成键比率高的氨基酸残基,即 RII 值反映残基在受体配体相互作用过程中的重要性。将 RII 称为残基相互作用指数。当  $\text{RII} > 0.2$  时,认为该残基是形成 GPIb $\alpha$ -A1 复合物的关键残基。

## 2 结果

### 2.1 GPIb $\alpha$ -A1 复合物晶体结构之结合面上的氢键

GPIb $\alpha$ -A1 复合物的形成,经由结合面上的静

电、疏水与范德华相互作用等介导。作为静电相互作用的一种度量,复合物结合面上的氢键和盐桥的数目及其稳定性,对 GPIb $\alpha$  和 A1 的结合亲和力具有重要影响。通过这些氢键和盐桥相连的残基对,应含有决定受体配体结合亲和力的关键残基的信息。通过观测如图 1 所示的 GPIb $\alpha$ -A1 复合物晶体结构(PDB-ID:1SQ0),发现了7个氢键(见表2),涉及到 GPIb $\alpha$  结合面上6个残基(其中 Met239 和 Lys237 是得到突变实验验证的2个残基),A1 结合面上的7个残基(其中, Glu596、Lys599 和 Gln604 是得到突变实验验证的3个残基)。然而,大量已识别的残基(见表1)被遗漏了,这一结果与推测相距甚远。也许在 GPIb $\alpha$ -A1 复合物结晶化的过程中,可能使复合物的构象大大偏离了其生理条件下的最小能量构象,导致大量氢键和/或盐桥信息的遗失。

表2 晶体结构中发现的氢键

Tab.2 H-bonds detected from crystal structure

序号	GPIb $\alpha$ 残基	原子	A1 残基	原子
1	ASP18	OD2	ARG571	NE
2	THR176	OG1	<b>GLN604</b>	NE2
3	TYR228	OH	<b>LYS599</b>	NZ
4	<b>LYS237</b>	O	ALA564	N
5	<b>MET239</b>	O	SER562	N
6	TYR228	OH	<b>GLU596</b>	OE1
7	LYS237	N	ALA564	O

注:粗体表示经突变实验验证的残基

### 2.2 平衡的复合物构象可能含有更多氢键和盐桥与相互作用残基的信息

可以推测,在正常生理条件下,复合物的平衡或最小能量构象之结合面含有大量的残基相互作用信息。为此,按照 1.2 节所述的分子动力学模拟方法,将复合物晶体结构置于模拟的生理溶液中,对初始复合物的晶体结构进行两次能量最小化运算。模拟实验表明,当模拟时间为 10 ns 时,系统的温度、总能量、重原子 RMSD 时间曲线均已达到相对稳定的水平(见图2),系统基本已处平衡状态。取2次(经历 10 ns)平衡运算后得到的构象作为 GPIb $\alpha$ -A1 复合物的两个平衡构象,观察复合物结合面上的氢键和盐桥及其相关的残基对,所得结果列于表3之中。

表3 不同平衡 GPIIb $\alpha$ /A1 复合物构象之结合面内的氢键和盐桥  
Tab.3 H-bonds and salt bridges in binding sites of GPIIb $\alpha$ /A1 complex in two equilibrium states

	GPIIb $\alpha$ 残基 I	A1 残基 I	GPIIb $\alpha$ 残基 II	A1 残基 II
1	GLU128	LYS608	GLU14	LYS549
2	GLU128	SER607	VAL9	LYS549
3	GLU14	ARG552	ASP63	ARG571
4	GLU14	ARG611	GLU40	ARG571
5	GLU225	ARG632	LYS237	ASP570
6	ASP235	ARG579	ASP235	ARG579
7	HIS12	GLU613	GLU225	ARG629
8	ALA10	GLU613	LEU197	ARG629
9	TYR228	GLU596		
10	LYS237	ALA564		
11	MET239	SER562		

注:正、斜体分别表示从两个平衡构象(I和II)中发现的氢键和盐桥

从第1个复合物平衡构象中,探测到了9个氢键和2个盐桥,参与相互作用的残基共有19个。在这些残基中,9个位于GPIIb $\alpha$ 结合面上,其中6个(Glu128, Glu14, Asp235, His12, Lys237和Met239)得到了突变实验的证实;10个位于A1结合面内的残基也有6个得到了突变实验的证实,它们是Ser607, Arg552, Arg611, Arg632, Glu613和Glu596(见表1和3)。通过观察第2个复合物平衡构象,发现复合物结合面上仅有5个氢键和3个盐桥,参与相互作用的残基共有13个。在这13个残基中,8个位于GPIIb $\alpha$ 结合面,其中4个(Glu14, Glu40, Lys237和Asp235)得到突变实验的证实;5个位于A1结合面,得到突变实验证实的残基是Arg571和Arg629(见表1和3)。

与表2的数据相比,复合物平衡构象的结合面上含有更多氢键和盐桥及可能关键残基的信息。然而,这尚不足以探测所有可能的关键残基。事实上,除了数目大小的差异外,不同平衡构象中参与相互作用的残基也是不同的,仅有表3中的第6号氢键及其残基对Asp235-Arg579均出现于这2个平衡构象。提示在不同的复合物平衡构象中所蕴含的氢键信息,具有显著的随机差异性。事实上,溶于溶液中的GPIIb $\alpha$ -A1复合物,将在环境水分子的布朗运动

作用下,发生构象的改变。在热运动诱导的GPIIb $\alpha$ -A1复合物构象演化过程中,复合物结合面上旧的盐桥和/或氢键将随机性地发生断裂,并伴随着新的盐桥和/或氢键的形成,导致GPIIb $\alpha$ -A1复合物构象空间中的任一构象,其结合面上的氢键和盐桥的数量及相关的残基对均具有随机的特征,使得无法从单一GPIIb $\alpha$ -A1复合物晶体结构中获得足够丰富的、关于残基在复合物结合过程中的作用信息。

### 2.3 结合面内氢键和盐桥的生存率及其相关残基

可以推测,对GPIIb $\alpha$ /vWF-A1复合物的稳定结构而言,形成于GPIIb $\alpha$ 和vWF-A1的关键残基之间的氢键和/或盐桥应具有较高的热稳定性或生存率。为此,取GPIIb $\alpha$ /vWF-A1复合物的二个平衡构象,以每一平衡构象为初始构象,均重复执行3次时长为10 ns的自由分子动力学模拟运算,实时观察氢键和盐桥的生成和断裂,并利用式(1)计算3次自由分子动力学模拟结果的生存率平均值I和II(见表4)。为简单起见,仅列出了生存率排名前30位的氢键和盐桥。

本研究发现,在GPIIb $\alpha$ /vWF-A1复合物的结合面内有144个氢键和盐桥,其中有些键仅出现在某一初始构象的自由分子动力学模拟过程中,具有显著的初始构象依赖性,而且不同的氢键和盐桥具有不同的生存率(见表4)。此外,在GPIIb $\alpha$ 上的残基(如Glu14)可和A1上的1个以上残基(如Lys549, Arg611和Arg552)发生相互作用,反之亦然,导致仅有19个GPIIb $\alpha$ 上的残基和18个A1上的残基可参与形成表4中的30个氢键和盐桥。这提示复合物在水分子布朗运动环境中的结构演化将伴随著氢键和盐桥的生成和断裂过程,这将提供丰富的结合面上残基相互作用及其重要性的信息。事实上,11个GPIIb $\alpha$ 上已验证的关键残基(见表1)中的9个残基(His12, Glu14, Lys237, Glu40, Asp83, Glu128, Asp235, Lys237, Met239)以及16个A1上已验证的关键残基(见表1)中的7个残基(Arg571, Glu596, Gln604, Arg611, Glu613, Arg629, Arg632)已被探测出来(见表4)。

### 2.4 残基相互作用指数(RII)与关键残基

基于1.3节的定义,残基相互作用指数RII度量了不同残基在维持复合物的结构稳定性中的贡献。为此,针对2个初始平衡构象,分别计算结合面

表 4 自由分子动力学模拟中发现的氢键和盐桥及其生存率与关联残基

Tab. 4 H-bonds and salt bridges and their survival ratios and involved residues detected via free MD simulation

序号	GPIb $\alpha$ 上的残基	原子	A1 上的残基	原子	生存率 I	生存率 II	生存率 M
1	GLU128	O	LYS608	N	89.60	45.07	89.60
2	ASP235	OD1	ARG579	NH1	89.33	84.27	89.33
3	ASP235	OD2	ARG579	NH2	80.27	77.87	80.27
4	LYS237	N	ALA564	O	85.60	80.80	85.60
5	LYS237	O	ASP570	N	63.33	72.80	72.80
6	LYS237	O	ALA564	N	64.80	45.20	64.80
7	HIS12	N	GLU613	OE2	85.20	—	85.20
8	ALA10	N	GLU613	OE2	68.53	—	68.53
9	SER11	N	GLU613	OE1	38.67	1.20	38.67
10	SER11	N	GLU613	OE2	38.13	3.60	38.13
11	SER11	OG	GLU613	OE1	30.93	—	30.93
12	ASP63	O	ARG571	N	—	77.33	77.33
13	GLU40	OE1	ARG571	NH2	—	41.33	41.33
14	GLU40	O	ARG573	N	60.00	4.80	60.00
15	ASP18	OD1	ARG573	NH2	52.80	26.40	52.80
16	GLU14	OE1	LYS549	NZ	77.20	32.27	77.20
17	GLU14	OE1	ARG611	NH2	52.27	—	52.27
18	GLU14	OE2	ARG552	NH2	26.67	14.80	26.67
19	MET239	N	SER562	O	68.13	55.73	68.13
20	THR176	OG1	GLN604	NE2	64.13	66.40	66.40
21	LYS152	NZ	PHE603	O	62.27	58.80	62.27
22	GLU225	O	ARG632	N	58.00	—	58.00
23	GLU225	O	ARG629	N	—	55.20	55.20
24	TYR228	OH	GLU596	OE2	49.33	25.07	49.33
25	TYR228	OH	GLU596	OE1	43.33	39.73	43.33
26	TYR228	OH	LYS599	NZ	5.06	26.40	26.40
27	ASP106	OD2	LYS569	NZ	49.20	—	49.20
28	ASP83	O	LYS569	N	49.20	13.60	49.20
29	GLU5	O	LYS549	N	38.80	6.40	38.80
30	ARG64	O	ASP570	N	27.60	—	27.60

注：“—”表示未出现氢键，盐桥用斜体字母标注，生存率 I 和 II 分别表示从初始构象 I 和 II 出发探测到的氢键或盐桥的生存率，生存率 M 为生存率 I 和 II 两者的最大值

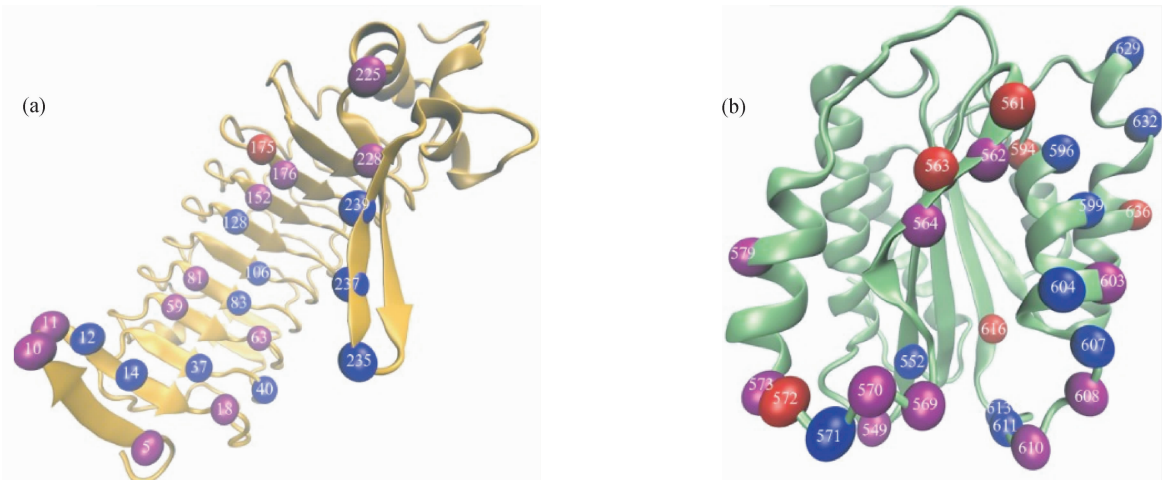
上不同残基的相互作用指数  $R_{II_1}$  和  $R_{II_2}$ ，这里下标“1”和“2”分别表示第 1 和第 2 个初始构象。为简单起见，取  $R_{II}$  为 2 次实验之残基相互作用指数  $R_{II_1}$  和  $R_{II_2}$  的最大值，即： $R_{II} = \text{Max}(R_{II_1}, R_{II_2})$ ，并以  $R_{II}$  作为度量残基重要性的指标。将 GPIb $\alpha$  和 A1 中  $R_{II}$  值大于 0.2 的残基按从高到低的顺序排

列(见表 5)。在表 5 中，假定  $R_{II} > 0.2$  时，残基间的相互作用是显著的。通过观察表 5 列出的排名前 21 位的 GPIb $\alpha$  和 A1 上的残基发现，在 GPIb $\alpha$  和 A1 结合面上各有 10 个已证实的关键残基被识别出来，另外的 22 个残基也可能在复合物的形成和稳定构象的维持中具有重要作用(见图 4)。

表5 按 RII 大小排名的前 21 位 GPIb $\alpha$  和 A1 结合面上的残基Tab.5 Ranking of residues on GPIb $\alpha$  and A1 in top 21 of RII values

排名	GPIb $\alpha$	RII <sub>I</sub>	RII <sub>II</sub>	RII	A1	RII <sub>I</sub>	RII <sub>II</sub>	RII
1	<b>GLU14</b>	0.99002	0.58767	0.99002	ARG579	0.99436	0.98858	0.99436
2	<b>ASP235</b>	0.98361	0.98990	0.98990	<b>GLU613</b>	0.99356	0.09852	0.99356
3	<b>LYS237</b>	0.97272	0.97138	0.97272	ALA564	0.94931	0.89478	0.94931
4	<b>HSD12</b>	0.92193	0.01200	0.92193	<b>ARG571</b>	0.49988	0.90256	0.90256
5	GLU225	0.87988	0.59441	0.87988	LYS608	0.89933	0.45067	0.89933
6	<b>GLU40</b>	0.86997	0.58075	0.86997	LYS549	0.89595	0.46616	0.89595
7	<b>GLU128</b>	0.77803	0.61508	0.77803	ARG573	0.86981	0.41693	0.86981
8	ASP63	—	0.77333	0.77333	LYS569	0.79045	0.13600	0.79045
9	<b>MET239</b>	0.75696	0.59511	0.75696	SER562	0.75696	0.59511	0.75696
10	SER11	0.73793	0.08757	0.73793	ASP570	0.73453	0.72800	0.73453
11	TYR228	0.72744	0.66762	0.72744	<b>GLU596</b>	0.71863	0.58092	0.71863
12	ALA10	0.68533	—	0.68533	<b>GLN604</b>	0.64133	0.66400	0.66400
13	THR176	0.64133	0.66400	0.66400	PHE603	0.62267	0.58800	0.62267
14	ASP18	0.66250	0.26400	0.66250	<b>ARG552</b>	0.61538	0.39124	0.61538
15	LYS152	0.62267	0.58800	0.62267	<b>ARG632</b>	0.58000	—	0.58000
16	<b>ASP83</b>	0.51933	0.13600	0.51933	<b>ARG629</b>	—	0.56096	0.56096
17	GLU5	0.51618	0.22110	0.51618	<b>ARG611</b>	0.52839	—	0.52839
18	<b>ASP106</b>	0.49200	—	0.49200	<b>LYS599</b>	0.37049	0.44146	0.44146
19	GLN59	0.45309	0.02800	0.45309	ASP610	0.42699	0.02800	0.42699
20	ARG64	0.44227	—	0.44227	<b>SER607</b>	0.37629	0.29930	0.37629
21	<b>HSD37</b>	0.22952	0.11870	0.22952	ASP560	—	0.24643	0.24643

注:粗体表示突变实验证实了的重要残基

图4 GPIb $\alpha$  (a) 和 vWF-A1 (b) 结合面上的关键残基Fig.4 Key residues on the interface of GPIb $\alpha$  (a) and vWF-A1 (b)

蓝色小球表示计算方法和突变实验均证实的残基,紫色小球表示计算方法探测到但尚未有突变实验证实的残基,红色小球表示突变实验证实但计算方法未探测到的残基

### 3 讨论

作为传统突变扫描实验的一种有益补充,分子动力学模拟实验在揭示血管性血友病因子 vWF 与血小板膜糖蛋白受体 GPIIb $\alpha$  相互作用的分子结构基础、查清调节 GPIIb $\alpha$ /vWF-A1 结合亲和力的关键残基、发现抗血栓药物的新靶点等的研究中,受到人们的日益重视<sup>[9-10,17,19]</sup>。因为传统的突变扫描方法通常是耗时和低效的,而且难以直观地了解突变发生后空间构象变异细节<sup>[17-20]</sup>。与之不同,随着超级计算机技术的发展,分子动力学模拟实验可以实时观察突变部位及其邻近构象的改变,分析残基相互作用网络及其演化,从而辨识重要的相互作用残基。

本研究在本课题组最近发展的、基于分子动力学模拟、利用氢键或盐桥生存率来辨识关键表位残基的方法基础上<sup>[17]</sup>,引入残基相互作用指数 RII,作为辨识结合面内重要残基的指标。采用残基相互作用指数 RII,通过分子动力学模拟研究了 GPIIb $\alpha$ /vWF-A1 结合面上的残基及其相互作用,发现 GPIIb $\alpha$  结合面上的 21 个残基和 A1 结合面上的 21 个残基可能显著参与了 GPIIb $\alpha$  和 A1 间的相互作用。在这些残基中,共有 20 个残基(10 个位于 GPIIb $\alpha$ ,10 个位于 A1)已被突变实验所证实,占有已证实残基数的 74%,另有 22 个可能的重要残基是新发现的,它们尚需突变实验的检验<sup>[12-15]</sup>。尽管如此,这依然提示本文提出的计算机策略,具有较强的预报复合物结合面上关键残基的潜力。

这一预报复合物结合面上关键残基的计算机策略,是基于如下生物物理过程<sup>[17]</sup>:在环境水分子热运动的作用下,处于生理溶液环境中的 GPIIb $\alpha$ /A1 复合物的构象演化,受到结合面上的静电、疏水与范德华相互作用的介导,伴随着氢键和盐桥的不规则地断裂和生成过程。可以猜想,结合面上残基相互作用的强弱与结合面上的氢键和盐桥的稳定性密切相关,即由稳定的氢键或盐桥连接的残基对,它们之间具有强的相互作用。然而,复合物平衡构象空间中的不同姿态,所提供的氢键或盐桥数目的信息是不同的,而且从有限的几个构象中,不足以了解结合面上氢键和盐桥的稳定性和强度的知识,这是由于氢键和盐桥的大部分信息遗失。因此,无论利用 GPIIb $\alpha$ /A1 复合物的晶体结构还是其有限的几个平

衡构象,均只能观察到少量氢键和盐桥及其相关的几个被证实了的关键残基(见表 1~3)。以氢键或盐桥生存率为判据的计算机策略,由于统计考虑了模拟时间历程中复合物构象空间的所有可能元素,使得可以探测到更多的关键残基。然而在该预报策略中,某一残基的重要性仅由该残基与其他残基间的所有氢键与盐桥的生存率之最大值来度量,忽略了那些相对较弱的氢键和盐桥对残基间相互作用的贡献,从而低估了某些残基的重要性,导致某些关键残基被遗漏了(见表 4)。与之不同,基于残基相互作用指数 RII 这一判据的计算机策略,不但充分利用了复合物构象空间所提供的信息,而且计及了结合面上任一受体残基与别的配体残基间的所有可能的静电相互作用,使得本研究成功预报了大部分已证实了的关键残基(见表 5 和图 4)。

尽管如此,利用基于残基相互作用指数 RII > 0.2 这一判据的计算机策略,依然有 26% 的已证实了的 GPIIb $\alpha$ /A1 复合物结合面上的关键残基没有探测到(见表 1)<sup>[12-15]</sup>,而且,在探测到的那些已被证实残基中,有相当部分的 RII 值要小于那些未经突变实验检验、新发现的关键残基(见表 5)。这也许和模拟时间过短、复合物的取样构象空间太小有关。同时,对 GPIIb $\alpha$ /A1 复合物而言,除了热稳定性之外,氢键和盐桥的力学稳定性可能是度量结合面内残基相互作用强弱的一个重要指标<sup>[17]</sup>。本文提出的计算机策略,具有较强的预报复合物结合面上关键残基的潜力。无疑,这一计算机策略将有助于生物大分子相互作用的分子结构基础的研究,并可应用于抗体药物的理论设计与药物靶点的预测之中。

### 参考文献:

- [1] Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor [J]. Cell, 1996, 84(2): 289-297.
- [2] Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis [J]. Nat Med, 2002, 8(11): 1227-1234.
- [3] Russell SD, Roth GJ. Pseudo-von Willebrand disease: A mutation in the platelet glycoprotein Ib alpha gene associated with a hyperactive surface receptor [J]. Blood, 1993, 81(7): 1787-1791.
- [4] Sadler JE. New concepts in von Willebrand disease [J]. Annu Rev Med, 2005, 56: 173-191.



- [5] Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, *et al.* Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain [J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1176-1179.
- [6] Sadler JE. Contact—How platelets touch von Willebrand factor [J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1128-1129.
- [7] Dumas JJ, Kumar R, Mcdonagh T, *et al.* Crystal structure of the wild-type von Willebrand factor A1-glycoprotein Ibalpha complex reveals conformation differences with a complex bearing von Willebrand disease mutations [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(22): 23327-23334.
- [8] Chen Z, Lou J, Zhu C, *et al.* Flow-induced structural transition in the beta-switch region of glycoprotein Ib [J]. *Biophys J*, 2008, 95(3): 1303-1313.
- [9] Lou J, Zhu C. Flow induces loop-to-beta-hairpin transition on the beta-switch of platelet glycoprotein Ib alpha [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(37): 13847-13852.
- [10] Yago T, Lou J, Wu T, *et al.* Platelet glycoprotein Ibalpha 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.
- [11] Shimizu A, Matsushita T, Kondo T, *et al.* Identification of the amino acid residues of the platelet glycoprotein Ib (GPIb) essential for the von Willebrand factor binding by clustered charged-to-alanine scanning mutagenesis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(16): 16285-16294.
- [12] Peng Y, Shrimpton CN, Dong JF, *et al.* Gain of von Willebrand factor-binding function by mutagenesis of a species-conserved residue within the leucine-rich repeat region of platelet glycoprotein Ib $\alpha$  [J]. *Blood*, 2005, 106(6): 1982-1987.
- [13] Vasudevan S, Roberts JR, McClintock RA, *et al.* Modeling and functional analysis of the interaction between von Willebrand factor A1 domain and glycoprotein Ib $\alpha$  [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(17): 12763-12768.
- [14] Cruz MA, Diacovo TG, Emsley J, *et al.* Mapping the glycoprotein Ib-binding site in the von willebrand factor A1 domain [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(25): 19098-19105.
- [15] Matsushita T, Meyer D, Sadler JE. Localization of von willebrand factor-binding sites for platelet glycoprotein Ib and botrocetin by charged-to-alanine scanning mutagenesis [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(15): 11044-11049.
- [16] Phillips JC, Braun R, Wang W, *et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD [J]. *J Comput Chem*, 2005, 26(16): 1781-1802.
- [17] Fang X, Fang Y, Liu L, *et al.* Mapping paratope on anti-thrombotic antibody 6B4 to epitope on platelet glycoprotein Ibalpha via molecular dynamic simulations [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e42263.
- [18] Adcock SA, Mccammon JA. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins [J]. *Chem Rev*, 2006, 106(5): 1589-1615.
- [19] Long M, Sato M, Lim CT, *et al.* Advances in experiments and modeling in micro-and nano-biomechanics: A mini review [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2011, 4(3): 327-339.
- [20] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. Cellular and molecular bioengineering [J]. *J Mol Graph*, 1996, 14: 33-38.