

一种水蛭素类融合蛋白与凝血酶作用的动力学模拟*

范 焱 王 进** 杨 杉 杨 翔 张丽娜 华子春 朱德煦

(医药生物技术国家重点实验室, 南京大学生命科学院生物化学系, 南京 210093)

摘要 通过将凝血酶抑制剂水蛭素的 C 端 20 肽片段嫁接到血小板结合蛋白 Annexin V 上, 可以期望获得既具有抗凝血活性, 同时又具有导向性的新型工程蛋白质分子. 利用计算机辅助分子设计手段模拟了该融合蛋白的分子结构, 并对该融合蛋白对凝血酶的抑制作用进行了分子动力学模拟, 得到了支持上述想法的结果.

关键词 融合蛋白, 分子动力学模拟, 凝血酶

学科分类号 Q71

凝血酶 (thrombin) 是凝血过程中的关键性酶, 它通过特异性水解血纤维蛋白原 (fibrinogen) 为纤维蛋白而发挥凝血作用. 在它的分子表面有一个富含碱性氨基酸的纤维蛋白原识别结合位点 (fibrinogen recognition site, FRS). 迄今已经发现多种蛋白质具有抑制凝血酶的作用^[1], 从医用水蛭中提取的水蛭素 (hirudin) 由 65 个残基组成, 是目前发现的对凝血酶最强的天然抑制物^[2,3]. 水蛭素的 C 端含有较多的酸性氨基酸, 可以结合在 FRS 上, 阻止凝血酶与其底物血纤维蛋白原的相互作用. 对 Hirulog 等水蛭素类似物的研究指出, 水蛭素的 C 端对抑制凝血酶的活性起主要作用^[4-6]. 为了增强水蛭素类抗凝剂的特异性, 我们考虑将水蛭素的 C 端嫁接到对血小板磷脂表面具有特异性结合作用的蛋白 Annexin V^[7] 上, 以获得具有导向性的新型抗凝血蛋白.

对水蛭素-凝血酶复合物结构的研究表明^[4,8], 复合物中水蛭素的结构具有区段特点: Ile1~Thr45 通过三对二硫键折叠成致密的二级结构, C 端 Glu49~Gln65 片段则呈无序结构, 当中的 Pro46-Lys47-Pro48 片段则由于两个脯氨酸的作用, 在结构上衔接了水蛭素的 N 端和 C 端, 并一定程度上限制了 C 端的伸展方向. 基于上述分析, 我们选取了水蛭素 C 端包含 20 个残基的片段, 即 Pro46~Gln65, 将其融合于 Annexin V 的 C 端 (Asp320), 这样构建的融合蛋白包含 340 个残基.

1 方 法

Annexin V 蛋白的结构已经由 X 射线衍射方式测定 (PDB code: 1avr). 将这一结构作能量优化, 作为进一步分子建模的基础.

水蛭素的结构取自它和凝血酶的复合物 (PDB code: htc4). 水蛭素和凝血酶的结构都取出作了单独优化. 水蛭素的 C 端被用于构建融合蛋白, 而凝血酶的结构则在分子对接 (docking) 过程的模拟中使用.

我们使用分子模拟软件 Insight II (MSI 公司) 进行融合蛋白分子的模型构建工作. 对融合蛋白分子作了 40 ps 的模拟退火 (Biosym Technologies. Discover User Guide. 1994 年), 选用的力场为 cvff, 动力学积分的时间步长为 1 fs. 体系先升温至 1 000 K, 保持 1 ps, 然后降温到 300 K, 保持 40 ps. 模拟过程中固定了融合蛋白的 1~316 号残基, 对 331~340 号残基按照模板 (template) 方式约束, 选用的模板是水蛭素-凝血酶复合物中水蛭素的 56~65 号残基所采取的类 3_{10} 结构. 动力学模拟搜索后的结构解除对 1~316 号残基的固定, 先用 500 步最陡下降法, 再用 500 步共轭梯度法作能量优化.

融合蛋白分子与凝血酶作用的动力学模拟: 初始位置以融合蛋白的 331~340 号残基与凝血酶间的位置关系相同于水蛭素-凝血酶天然复合物中水蛭素的 56~65 号残基与凝血酶的位置关系而确定. 对接 (docking) 过程选用如下约束条件: 固定融合蛋白的 1~316 号残基; 凝血酶中的残基根据天然水蛭素-凝血酶复合物结构分为两类: 以水蛭素 46~65 号残基为中心, 在此中心 0.5 nm 范围内

* 国家自然科学基金 (39970184, 79970116)、霍英东青年教师奖励基金和江苏省自然科学基金 (BJ97041) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 025-3592332, E-mail: jwang@nju.edu.cn

收稿日期: 2000-01-24, 接受日期: 2000-02-29

的残基归为 I 类, 其余的归为 II 类. 动力学模拟过程中, II 类残基被固定. 同样选用 cvff 力场, 进行 40 ps 的模拟计算. 然后逐步解除对融合蛋白和凝血酶的约束, 作进一步的能量优化, 步骤也是先用 500 步最陡下降法再用 500 步共轭梯度法优化.

2 结 果

2.1 融合蛋白的分子构建及结构优化

首先将水蛭素 C 端 20 肽片段与 Annexin V 的 C 端 (Asp320) 以伸展构象连接, 形成融合蛋白的初始构象. 再对初始构象进行 40 ps 的动力学模拟搜索, 能量逐步收敛, 在 27 ps 附近达到最低. 解除所有的约束, 进行全局能量优化后, 得到融合蛋白的模拟结构.

比较 Annexin V 与融合蛋白中对应部分的构象, 其结果表明, 融合蛋白中的 Annexin V 部分能够保持结构的相对稳定性. 特别是融合蛋白的 1~316 号残基与天然的 Annexin V 的 1~316 号残基的 C_{α} 原子的 RMS 差值为 0.022 nm, 融合蛋白的 1~316 号残基与对应天然 Annexin V 的 C_{α} 的叠合如图 1 所示.

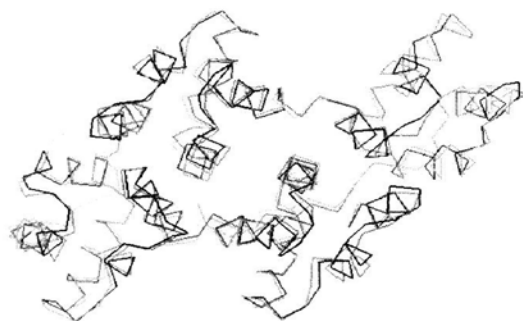


Fig. 1 Superposition of C_{α} of residues 1~316 of fusion protein and Annexin V
Black: Annexin V; Grey: fusion protein.

可见, 在 Annexin V 的末端融合水蛭素的肽段对其折叠结构未产生明显的影响, 特别是 Annexin V 的磷脂膜结合部位位于分子另一面, 远离融合点, 其结构几乎不受影响. 因而结合磷脂膜的功能能够在融合蛋白中得以保持.

2.2 融合蛋白分子与凝血酶相互作用的分子动力学模拟

利用优化的融合蛋白结构, 我们进行了它与凝血酶相互作用的分子对接 (docking) 动力学模拟.

图 2 给出了融合蛋白与凝血酶相互作用的分子

动力学模拟过程中, 在 300 K 温度平衡阶段体系的能量-时间曲线. 从能量上来看, 系统能量逐步收敛, 在 20 ps 附近达到极小值.

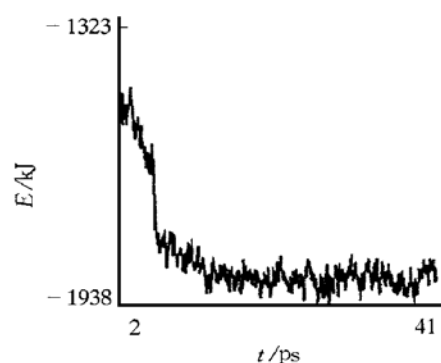


Fig. 2 Energy-time plot of the docking of fusion protein to thrombin equilibrated at 300 K

图 3 是融合蛋白分子和凝血酶复合物的结构示意图. 其中黑色线条代表的是融合蛋白分子的 317~340 号残基的骨架原子, 条带代表凝血酶的走向. 可见, 融合蛋白的 C 端大致取自由伸展构象, 正处在凝血酶分子表面的两个 loop 区之间. 融合蛋白的最后几个残基形成不十分规则的螺旋结构, 嵌入凝血酶分子表面的 FRS 区域, 与此区域内的残基产生相互作用.

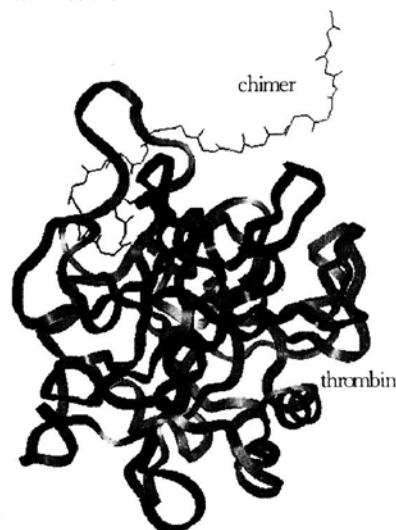


Fig. 3 Structure of fusion protein-thrombin complex
Black line: residues 317~340 of fusion protein; Ribbon: thrombin.

所构建的融合蛋白与凝血酶相互作用的分子动力学模拟过程中重要残基 C_{α} 的 RMSD 示于图 4, 其中图 4a 是融合蛋白 317~340 号残基 C_{α} 的 RMSD 值, 而图 4b 为凝血酶的 I 类残基的变化情况. 从图 4 中可见, 这些残基在动力学模拟过程中的运动范围

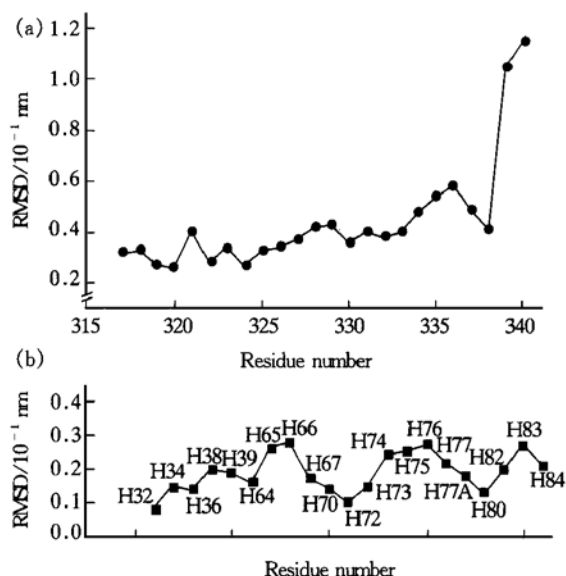


Fig. 4 Root mean square deviation (RMSD) of C_α of the interface residues from fusion protein and thrombin during the docking simulation
(a) RMSD of C_α of residues 317~340 of fusion protein; (b) RMSD of C_α of class I residues of thrombin. Residue numbers were annotated on the plot.

Table 1 The interactive residue pairs in the thrombin-inhibitory protein interface within 0.4 nm radius

C-Terminus residue ¹⁾	Hirudin-thrombin complex	Fusion protein-thrombin complex
Phe 56	<u>Phe H34</u> ^{2),3)} , Arg H73, Thr H74	Phe H34, Leu H40, Arg H67, Thr H74, <u>Leu H154</u>
Glu 57	Thr H74, Arg H75, Tyr H76	Ser H72, Arg H73, Thr H74, Arg H75, Ser H153
Ile 59	<u>Leu H65</u> , Arg H67	Phe H34, Gln H38, Arg H67, Glu H86, Ile H88, Ile H90
Pro 60	<u>Phe H34</u> , Gln H38, <u>Leu H65</u> , Arg H67	<u>Phe H34</u> , Gln H38, <u>Leu H65</u> , Arg H67
Glu 61	N/A	Arg H67, Tyr H76, Ile H82

¹⁾Residues of C-terminus polypeptide from different proteins are numbered the same way as that for hirudin.

²⁾L and H denote respectively the light chain and heavy chain of thrombin.

³⁾Underlined residues have distinct non-bond interaction with C-terminus residues of hirudin.

3 讨 论

水蛭素在水溶液中, 其 C 端不能形成规则的二级结构而显得高度无序. 至今尚未见有在游离状态下的水蛭素 C 端的晶体结构数据或是 NMR 数据, 水蛭素-凝血酶复合物中水蛭素的 C 端结构可以看成是以凝血酶的 FRS 为模板而形成的. 同时, C 端没有规则的二级结构, 也说明在 C 端的残基之间没有强的长程相互作用, 因此, 限制 C 端最后 10 个残基的构象, 对融合蛋白核心部分的结构计算不会产生明显影响. 我们曾计算不加 C 端结构限制的融合蛋白构象, 结果与上述分析相符. 融合蛋白中对应水蛭素 Glu61 的残基在我们模拟结果中

都在 0.06 nm 内, 只有融合蛋白 C 端的最后几个残基偏离比较大.

为分析融合蛋白与凝血酶 FRS 相互作用的细节, 我们对模拟的融合蛋白-凝血酶复合物与天然水蛭素-凝血酶复合物的结构作一比较, 表 1 分别列出了两复合物中凝血酶分子表面和抑制性蛋白质分子 C 端几对距离小于 0.4 nm 的重要残基, 这些残基对之间的相互作用反映了水蛭素与融合蛋白 C 端肽段与凝血酶表面裂隙的结合能力.

从表 1 可见, 天然水蛭素-凝血酶复合物中存在界面上的相互作用, 在融合蛋白-凝血酶中基本上都得到了保留. 因此, 所构建的融合蛋白不仅具有相对稳定的构象, 同时还具备和凝血酶表面 FRS 的结合能力. 但是, 对融合蛋白与凝血酶的结构分析也显示, 在凝血酶活性位点 Asp^{H102}-His^{H57}-Ser^{H195}附近 0.6 nm 范围内没有融合蛋白的残基, 表明融合蛋白不能象水蛭素一样, 对凝血酶的活性位点也产生直接的抑制作用, 而是可能通过空间位阻对活性位点与底物的结合产生一定的影响.

所表现出的与凝血酶的相互作用, 应与真空模拟近似有关. 在计算时如果引入水分子, 会使表面的计算结果和真实情况更加接近.

对融合蛋白的结构模拟研究表明, 水蛭素 20 肽片段在 Annexin V 上的嫁接对其核心部分影响较小, 因而使得 Annexin V 结合磷脂膜的功能在融合蛋白中依然得以保存; 同时, 通过对融合蛋白-凝血酶复合物的动力学模拟和结构分析, 我们认为, 尽管融合蛋白不能象水蛭素那样同时抑制凝血酶的底物结合位点和活性中心, 但是它与凝血酶的底物结合位点 FRS 有较强的相互作用, 因此, 融合蛋白可以通过抑制凝血酶的底物结合位点来抑制凝血酶的功能. 从而, 可以从理论上预见: 我们构建的

融合蛋白拥有导向与抗凝双重功能. 目前, 这一蛋白质已经在自行设计的 pNJUTRX-1 体系中表达, 并且通过 Chromozym 法测得了融合蛋白对凝血酶的抑制活性, 证实了设计的合理性. 进一步的工作将是选取更合适的连接肽, 提高融合蛋白与凝血酶的亲和力, 以获得性能更优良的抗凝血融合蛋白.

参 考 文 献

- Marciniak E. Coagulation inhibitor elicited by thrombin. *Science*, 1970, **170** (956): 452~ 453
- Chang J Y. The functional domain of hirudin, a thrombin-specific inhibitor. *FEBS Lett*, 1983, **164** (2): 307~ 313
- Leadley R J, Kasiewski C J Jr, Bostwick J S, *et al.* Comparison of enoxaparin, hirulog, and heparin as adjunctive antithrombotic therapy during thrombolysis with rtPA in the stenosed canine coronary artery. *Thromb Haemost*, 1997, **78** (4): 1278~ 1285
- Rydel T J, Ravichandran K G, Tulinsky A, *et al.* The structure of a complex of recombinant hirudin and human α -thrombin. *Science*, 1990, **249** (4966): 277~ 280
- Maraganore J M, Bourdon P, Jablonski J, *et al.* Design and characterization of Hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry*, 1990, **29** (30): 7095~ 7101
- Braun P B, Dennis S, Hofsteenge J, *et al.* Use of site-directed mutagenesis to investigate the basis for the specificity of hirudin. *Biochemistry*, 1988, **27** (17): 6517~ 6522
- Huber R, Berendes R, Burger A, *et al.* Crystal and molecular structure of human Annexin V after refinement. *J Mol Biol*, 1992, **223** (3): 683~ 704
- Rydel T J, Tulinsky A, Bode W, *et al.* Refined structure of the hirudin-thrombin complex. *J Mol Biol*, 1991, **221** (2): 583~ 601

Molecular Dynamics Simulation of Docking a Novel Hirudin-like Anti-coagulant Protein to Thrombin

FAN Yao, WANG Jin, YANG Shan, YANG Xiang, ZHANG Li-Na, HUA Zi-Chun, ZHU De-Xu

(The State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Department of Biochemistry,
School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract Hirudin is one of the most potent anti-coagulant protein ever found, and its C-terminus is a key domain for inhibiting thrombin. In order to enhance its specificity, a novel anti-coagulant protein was constructed via fusing the C-terminus of hirudin to Annexin V, which was expected to sustain both anti-coagulant activity and phospholipid affinity. The structure of the designed protein was predicted with both molecular mechanics and dynamics. Molecular dynamics was adopted to simulate the docking interaction between the fusion protein and thrombin. The results showed the inhibitory activity of the fusion protein to thrombin.

Key words fusion protein, molecular dynamics simulation, thrombin

* This work was supported by a grant by National Natural Sciences Foundation of China (39970184, 79970116), Young Teacher Award from Huo Ying-Dong Foundation and Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BJ97041).

** Corresponding author. Tel: 86-25-3592332, E-mail: jwang@nju.edu.cn

Received: January 24, 2000 Accepted: February 29, 2000