

玫瑰花瓣实验的概率动力学模拟*

陈娟, 黄俊, 龙勉[△]

中国科学院 力学研究所 国家微重力实验室, 北京 100080; [△] E-mail: mlong@imech.ac.cn

玫瑰花瓣实验作为考察细胞间特异性相互作用的简单实验, 已被免疫学家广泛用于评价受体与配体间的功能性作用, 以及区分白细胞亚型^[1-6]。早期实验是将人 T 淋巴细胞和羊红细胞混合而发生粘附现象, 大的淋巴细胞表面会吸附上小的红细胞, 形成玫瑰花瓣结构。由于该实验不能把玫瑰花瓣尺寸分布与分子性质定量地联系起来, 故迄今只是一种定性方法。我们根据已建立的小系统概率动力学模型设计新的玫瑰花瓣实验, 能够把玫瑰花瓣尺寸分布与受体/配体密度及它们的反应亲和性联系起来, 从而为临床免疫检测提供定量依据和方法学基础。

玫瑰花瓣实验需要两类细胞: 一类是小尺寸、大数量细胞(通常是红细胞), 另一类是大尺寸、小数量细胞(目标细胞)。实验采用两组细胞/分子系统: 其一是以表达选择素(Selectin)配体的人前骨髓细胞白血病细胞 HL-60 为目标细胞, 与包被有 Selectin 的人红细胞(HRBC)反应; 其二是以转染表达 CD16b 的中国仓鼠卵巢癌细胞 CHO 为目标细胞, 与包被有 CD16b 配体——免疫球蛋白(IgG)——的 HRBC 反应。抗体或蛋白在 HRBC 上的包被采用 CrCL3 介导方法^[7,8], 并采用流式细胞仪检测其包被有效性及分子密度。HRBC 与目标细胞按 100:1 的比例混匀, 4 °C 孵育 2-3 小时后, 用显微镜检测玫瑰花瓣尺寸分布。

实验结果表明, 由 Selectin/配体或 CD16b/IgG 介导的玫瑰花瓣尺寸分布均满足 Poisson 分布。通过系统改变分子密度, 得到玫瑰花瓣尺寸分布对分子密度的依赖性。采用小系统概率动力学模型拟合实验数据, 得到平均玫瑰花瓣尺寸, 从而确定上述受体/配体作用的反应亲和性^[9]。我们还比较了采用不同 Selectin(E-、P-和 L-Selectin)或不同 IgG(人源、兔源和鼠源)条件下的反应亲和性, 其结果与采用其它实验技术对同一分子系统的测定值一致^[7,8,10,11]。

参考文献:

- [1] Wahlgren W., V. Fernandez, C. Scholander, et al. (1994). Parasitology Today. 10: 73-79.
- [2] Salvaraj P., M. L. Dustin, R. Mitnacht, et al. (1987). J. Immunol. 138: 2690-2695.
- [3] William M., S. Shaw, E. A. Gugel, et al. (1987). J. Immunol. 138: 3587-3589.
- [4] Plunkett M. L., M. E. Sanders, P. Salvaraj, et al. (1987). J. Exp. Med. 138: 3587-3589.
- [5] Salvaraj, P., M. L. Plunkett, M. L. Dustin, et al. (1987). Nature. 326: 400-403.
- [6] Groux H., S. Huet, F. Aubrit, et al. (1989). J. Immunol. 142: 3013-3020.
- [7] Chesla S. E., P. Selvaraj, and C. Zhu. (1998). Biophys. J. 75: 1553-1572.
- [8] Long M., H. Zhao, K. -S. Huang, et al. (2001). Ann. Biomed. Eng. 29: 935-946.
- [9] Long M. and C. Zhu. (1997). In 1997 Advances in Bioengineering. 36: 75-76.
- [10] Long M., H. L. Goldsmith, D. F. Tees, et al. (1999). Biophys. J. 76: 1112-1128.
- [11] Zhu C., M. Long, S. E. Chesla, et al. (2002). Ann. Biomed. Eng. 30: 305-314.

* 本项目得到国家杰出青年基金(30225027)、教育部“青年教师奖”基金资助。

P-selectin 去折叠的分子动力学模拟*

吕守芹, 龙勉[△]

中国科学院 力学研究所 国家微重力实验室, 北京 100080, [△] E-mail: mlong@imech.ac.cn

选择素(selectin)/配体间特异性相互作用介导的细胞粘附在炎症级联反应、肿瘤转移等多种生理或病理过程中具有重要作用^[1]。选择素/配体相互作用与力学环境紧密偶联, 其动力学行为与外力间的依赖关系是影响细胞粘附的主要因素^[2,3]。

P-selectin/PSGL-1(P-选择素糖蛋白配体 1)是考察选择素/配体特异性相互作用的典型分子系统。大量实验已经证实其键寿命与外力间服从“滑移键”规律^[4-6], 并且已有最新报道首次证实了“逆锁键”的存在, 表明力作用下 P-selectin/PSGL-1 解离呈现不同的规律^[7], 但其物理本质仍不清楚。生物大分子功能变化取决于其内部结构^[8]。因此, 运用分子动力学模拟方法从原子水平考察外力作用下 P-selectin/PSGL-1 复合物解离的微观构象变化有助于进一步认识和理解其特异性相互作用, 并且模拟结果与原子力显微镜(AFM)实验数据的比较有可能给出其解离的物理图谱。

在 P-selectin/PSGL-1 复合物解离过程中, P-selectin 有一定程度的去折叠。我们运用 SMD(Steered molecular dy-

namics)方法^[9-16]和NAMD程序^[10-17]对选择素 P-selectin 在经验势场 CHARMM22^[18]作用下的去折叠过程进行了模拟。基本步骤如下:(1)初始构象建立:以蛋白质数据库中 P-selectin 的晶体结构(1G1Q)为起点,保留四聚体中的一个单体,然后用 PSFGEN^[18]加氢,VMD 加球形水边界^[19],得到包括氢原子坐标在内的系统初始构象;(2)系统弛豫(relaxation):在系统能量极小化后使系统升温至室温,然后自由弛豫至系统温度和位移均方根(RMSD)相对稳定状态(对应涨落足够小);(3)动态模拟:固定 P-selectin EGF 区(上皮样生长因子区)C 末端 α -碳原子,在 P-selectin/PSGL-1 相互作用的结合位点上施加线性力^[20],使得分子在外力作用下去折叠。

我们比较了不同作用位点、不同拉伸速度等条件下 P-selectin 的去折叠过程。通过对模拟得到的微观构象变化和对应力谱、位谱、能谱的分析,可得到 P-selectin 去折叠过程中非共价相互作用的影响和势垒分布,以及 P-selectin 去折叠受作用位点和/或拉伸速度的影响。作为考察 P-selectin/PSGL-1 复合物解离的第一步,P-selectin 去折叠过程的构象变化将为应用 SMD 模拟 P-selectin/PSGL-1 复合物解离提供物理方法和计算基础,同时,其结果还可与应用 AFM 实验测定 P-selectin 去折叠和 P-selectin/PSGL-1 复合物解离的结果相对照。

参考文献:

- [1] Vestweber D., and J. E. Blanks. (1999). *Physiological Reviews*. 79: 181 - 213.
- [2] Bell G. I. (1978). *Science*. 200: 618 - 627.
- [3] Dembo M., D. C. Torney, K. Saxman, et al. (1988). *Proc. R. Soc. Lond. B* 234: 55 - 83.
- [4] Alon R., D. A. Hammer, and T. A. Springer. (1995). *Nature*. 374: 539 - 542.
- [5] Chen S., and T. A. Springer. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 950 - 955.
- [6] Chen S., and T. A. Springer. (1999). *J Cell Biol*. 144: 185 - 200.
- [7] Marshall B. T., M. Long, J. W. Piper, et al. (2003). *Nature*. in press.
- [8] Viola V., W. E. Thomas, D. W. Craig, et al. (2001). *TREND in Biotechnology*. 19: 416 - 423.
- [9] Grubmuller H., B. Heymann., and P. Tavan. (1996). *Science*. 271: 997 - 999.
- [10] Izrailev S., S. Stepaniants, M. Balsera, et al. (1997). *Biophys J*. 72: 1566 - 1581.
- [11] Isralewitz B., S. Izrailev, and K. Schulten. (1997). *Biophys J*. 73: 2972 - 2979.
- [12] Wriggers W., and K. Schulten. (1999). *Proteins: Struc, Func, and Gene*. 35: 262 - 273.
- [13] Stepaniants S., S. Izrailev, and K. Schulten. (1997). *J. Mol. Model*. 3: 473 - 475.
- [14] Kosztin D., S. Izrailev, and K. Schulten. (1999). *Biophys J*. 76: 188 - 197.
- [15] Lu H., B. Isralewitz, A. Krammer, et al. (1998). *Biophys J*, 75: 662 - 671.
- [16] Krammer A., H. Lu, B. Isralewitz, et al. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 1352 - 1356.
- [17] Kale L., R. Skeel, M. Bhandarkar, et al. (1999). *J. Comp. Phys*. 151: 283 - 312.
- [18] Brooks B. R., R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, et al. (1983). *J. Comp. Chem*. 4: 187 - 217.
- [19] Humphrey W., A. Dalke, and K. Schulten. (1996). *J Mol. Graph*. 14: 33 - 38.
- [20] Somers W. S., Tang J., Shaw G. D., et al. (2000). *Cell*. 103: 467 - 479.

* 本项目得到国家杰出青年基金 A 类(30225027)、B 类(10128205)资助。

Effects of Surface Microtopology and Membrane Stiffness on Kinetics of Selectin/Ligand Interactions by a Modified BFP

Botao shaw^{1,2}, Mian long^{2*}

1. College of Bioengineering, Chongqing University, Chingqing, China, 400044;

2. NMLC, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China, 100080;

* Correspondence to Dr. Mian Long: mlong@imech.ac.cn

More and more evidences come out to support that the functionality of adhesion molecules are influenced by the surface microtopology of cell carrier or substrate. Adhesive molecules usually express on the microvilli of a cell, providing a well-defined spatial configuration to mediate the adhesions to the counterpart molecules on the apposed surface. In a pioneering work, comparisons were done by using immunoglobulin (IgG) binding to their counterpart receptors CD16 expressed onto the membrane of transfected K562 cells (rough surfaces) and coated onto the surface of human red blood cells (smooth surfaces), respectively^[1]. Here we extended this idea by developing a biomembrane force probe to elucidate the effect of surface microtopology and membrane stiffness on the kinetics of selectin/ligand binding.

A modified protocol was employed to develop a biomembrane force probe^[2-4]. Briefly, commercial polystyrene microsphere (with a radius of 0.56 - 5.6 μm) cross-linked with streptavidin were incubated with biotinylated human red blood cells, and then incubated with biotinylated proteins (P-selectin or P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1). This resulted in forming a modified Biomembrane Force Probe (mBFP) with relatively smooth surface and enhanced membrane stiffness.