



生物化学与生物物理进展  
*Progress in Biochemistry and Biophysics*  
ISSN 1000-3282, CN 11-2161/Q

## 《生物化学与生物物理进展》网络首发论文

题目: 人分泌型磷脂酶A<sub>2</sub>-IIA的功能性动力学特征研究  
作者: 张珊, 巩卫康, 张娜, 李春华  
收稿日期: 2021-03-12  
网络首发日期: 2021-06-03  
引用格式: 张珊, 巩卫康, 张娜, 李春华. 人分泌型磷脂酶A<sub>2</sub>-IIA的功能性动力学特征研究. 生物化学与生物物理进展.  
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2161.q.20210603.1420.002.html>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式 (包括网络呈现版式) 排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊 (光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊 (网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊 (网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物 (ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

## 人分泌型磷脂酶 A<sub>2</sub>-IIA 的功能性动力学特征研究\*

张珊 巩卫康 张娜 李春华\*\*

(北京工业大学环境与生命学部, 北京 100124)

**摘 要** 人分泌型磷脂酶 A<sub>2</sub>-IIA (secretory phospholipase A<sub>2</sub> group IIA, sPLA<sub>2</sub>-IIA) 在调节细胞脂质代谢和信号传导中具有重要作用, 参与了多种急、慢性炎症反应。研究其动力学和变构与功能的关系具有重要意义。利用弹性网络模型 (elastic network model, ENM)、微扰响应扫描 (perturbation-response scanning, PRS) 和蛋白质结构网络 (protein structure network, PSN) 方法对来自人 sPLA<sub>2</sub>-IIA 的 31 个分子的结构动力学和变构效应进行了分析, 并探索了其动力学共性和特异性与功能的关系。结果表明对酶的催化和结构稳定起关键作用的催化残基和参与二硫键形成的半胱氨酸残基具有低运动性, 这是对酶共有功能的要求; 而涉及与钙离子或膜结合的 5 个结构区域具有高运动性, 它们体现了酶成员的特异性。另外, 高运动性区域在 PRS 分析中显示出对外界微扰响应的高敏感性, 表明其在变构调节中起重要作用; 而低敏感性残基则在维持结构稳定方面发挥了重要作用。残基运动相关性分析发现人 sPLA<sub>2</sub> 分子催化位点周围的强相关运动, 这有利于酶催化功能的发挥。本研究有助于深入理解人 sPLA<sub>2</sub>-IIA 成员分子的动力学及功能性变构机制, 可为药物设计和准确设计具有精细调节活性的蛋白提供指导。

**关键词** 人分泌型磷脂酶 A<sub>2</sub>-IIA (sPLA<sub>2</sub>-IIA); 弹性网络模型; 微扰响应扫描; 结构动力学; 变构机制

学科分类号 Q61

---

\*基金项目: 国家自然科学基金 (31971180, 11474013) 资助项目

\*\*联系人: 李春华, Tel.: +86-010-67392001, E-mail: chunhuali@bjut.edu.cn

收稿日期: 2021-03-12, 接受日期: 2021-06-01

# Study on Functionally Dynamic Features of Human Secretory

## Phospholipase A<sub>2</sub>-IIA\*

ZHANG Shan, GONG Weikang, ZHANG Na, LI Chunhua\*\*

Faculty of Environmental and Life Sciences, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

**Abstract** Human secretory phospholipase A<sub>2</sub> group IIA (sPLA<sub>2</sub>-IIA) plays an important role in the regulation of cellular lipid metabolism and signal transmission, and participates in a variety of acute and chronic inflammatory responses. Investigating the relationship between their dynamics, allostery and functions is of important significance. The elastic network model (ENM), perturbation-response scanning (PRS) and protein structure network (PSN) methods are utilized to analyze the structural dynamics and allostery of 31 human sPLA<sub>2</sub>-IIA members, and explore the relationship between their shared/specific dynamics and functions. The results show that the catalytic residues and cysteine residues involved in disulfide bond formation, important for the enzyme's catalysis and structural stability respectively, are of minimal mobility, which are the requirements for the enzyme's shared functions; however, the five regions involved in the association with calcium ion/membrane are of high mobility, which embody the specificity of sPLA<sub>2</sub>-IIA members. Additionally, the PRS analysis reveals that the above five regions have a high sensitivity to external perturbations, suggesting their important roles in allosteric modulation, while those residues with a low sensitivity play an important role in maintaining structural stability. Finally, the ANM analysis indicates that the strong correlation movements around the catalytic sites of sPLA<sub>2</sub>, are helpful for the enzyme's catalytic function exertion. This study is helpful for the deep understanding of the dynamics and functionally allosteric mechanism of human sPLA<sub>2</sub>-IIA, and can provide a guide for drug design and accurate design of proteins with finely tuned activities.

**Keywords:** human secretory phospholipase A<sub>2</sub>-IIA (sPLA<sub>2</sub>-IIA); elastic network model; perturbation-response scanning; structural dynamics, allosteric mechanism

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31971180, 11474013).

\*\* Corresponding author: LI Chunhua. Tel.: +86-010-67392001, E-mail: chunhuali@bjut.edu.cn

Received: March 12, 2021 Accepted: June 1, 2021

人分泌型磷脂酶 A<sub>2</sub>-IIA (secretory phospholipase A<sub>2</sub> group IIA, sPLA<sub>2</sub>-IIA) 是一种脂解酶, 在细胞脂代谢和信号传导中起重要作用<sup>[1]</sup>。sPLA<sub>2</sub>-IIA 通过催化甘油磷脂 sn-2 位酯键水解, 产生众多信号介质前体, 参与了许多炎症性疾病的发生, 如哮喘、关节炎和癌症等<sup>[2]</sup>。研究 sPLA<sub>2</sub>-IIA 的结构动力学和功能之间的关系可更好地理解其相关疾病的分子机制。

到目前为止, 有 16 种亚型的 sPLA<sub>2</sub> 从蛇、人、猪以及植物等生物中纯化出来。它们的结构具有: 6 对以上二硫键和保守的催化二联体 His/Asp 及钙结合环 (Xxx-Cys-Gly-Xxx-Gly-Gly)。大部分的 sPLA<sub>2</sub> 具有相似的折叠结构: 三个  $\alpha$ -helix, 两个  $\beta$ -sheet 和一个保守的 Ca<sup>2+</sup> 结合环 (loop2), 如图 1 所示。在哺乳动物中研究最多的 sPLA<sub>2</sub> 是人 IIA 型的 sPLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>-IIA), 该型酶含有 7 对二硫键, 结构稳定, 还具有防御细菌感染和杀菌的能力<sup>[3]</sup>。sPLA<sub>2</sub>-IIA 催化循环包括四个步骤: 酶通过底物结合区与膜结合, 从膜上提取单个磷脂分子到酶的结合口袋, 水解磷脂的 sn-2 位酯键, 释放水解产物<sup>[4]</sup>。酶与底物结合是催化循环中重要的环节, 其中膜作为变构剂, 它的结合使酶从关闭构象转变为打开构象, 促进酶结合磷脂分子而发生催化反应<sup>[4]</sup>。因此, sPLA<sub>2</sub>-IIA 的结构动力学以及别构过程一直是人们研究的热点。

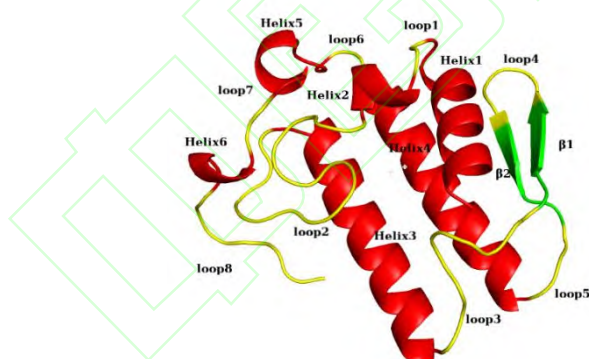


图 1. sPLA<sub>2</sub> (PDB ID: 3u8b) 的三维结构图。 $\alpha$ -helices,  $\beta$ -sheets 和 loops 分别被标注

Fig 1. Structure of sPLA<sub>2</sub> (PDB ID: 3u8b) with  $\alpha$ -helices,  $\beta$ -sheets and loops labelled respectively

2015 年 Mouchlis 等人应用分子动力学 (molecular dynamics, MD) 模拟方法研究了不同类型 sPLA<sub>2</sub> 酶结合口袋的功能差异, 并对其催化循环提出了新的见解<sup>[4]</sup>。2020 年 Manukyan

用 MD 模拟方法研究了人类 sPLA<sub>2</sub> 在有无膜环境下的构象变化<sup>[5]</sup>。众所周知 MD 模拟可以在原子水平探测生物分子的动力学性质，但是它非常耗时，很难对蛋白质大尺度的功能性运动进行采样分析。这样，针对该问题，研究人员提出了一些粗粒化的模型，其中弹性网络模型（elastic network model, ENM）是研究蛋白质功能性运动最为有效的方法之一。两种常用的 ENM 是高斯网络模型（Gaussian network model, GNM）<sup>[6]</sup>和各向异性网络模型（anisotropic network model, ANM）<sup>[7]</sup>。结合 ENM，Atilgan 等人提出了微扰响应扫描（perturbation-response scanning, PRS）<sup>[8]</sup>方法来评价蛋白质残基对外界微扰的响应程度，该方法已被广泛应用于识别蛋白质变构调控中潜在的别构位点<sup>[9]</sup>。另外，蛋白质结构网络（protein structure network, PSN）方法也被广泛应用于蛋白质折叠和关键位点预测的研究。

在本研究中，我们使用基于结构的模型和方法，包括 ENM、PRS 和 PSN 分析了人 sPLA<sub>2</sub>-IIA 型结构的共享和特异性和动力学与其功能的关系，并识别了关键残基，加深了对酶催化机制的理解。

## 1 研究方法

### 1.1 数据集的建立

从 Protein Data Bank（PDB）数据库中下载来自人分泌型磷脂酶（sPLA<sub>2</sub>）IIA 型的 31 个 X-ray 结构作为研究对象，如表 1 所示。

表 1. 31 个人 sPLA<sub>2</sub>-IIA 型的结构

Table 1. 31 human sPLA<sub>2</sub>-IIA structures used in this study

PDB ID									
1ayp-A	1ayp-B	1ayp-C	1ayp-D	1ayp-E	1ayp-F	1db4-A	1db5-A	1dcy-A	1j1a-A
1j1a-B	1kqu-A	1kvo-A	1kvo-B	1kvo-C	1kvo-D	1kvo-E	1kvo-F	1n28-A	
1n28-B	1n29-A	1pod-A	1poe-A	1poe-B	3u8b-A	3u8d-A	3u8d-B	3u8h-A	
3u8h-B	5g3n-A	5g3n-B							

### 1.2 弹性网络模型

弹性网络模型（ENM）将蛋白质的三维结构简化为粗粒化的弹性网络，每个残基简化为网络中的一个节点，用 C <sub>$\alpha$</sub>  原子表示；如果两个 C <sub>$\alpha$</sub>  原子间的距离小于某一截断半径，则认

为它们之间存在相互作用，用倔强系数相同的弹簧相连。在本工作中，选取 7.0 Å 为截断半径。这样，该弹性网络的总势能为：

$$V_{\text{GNM}} = \frac{1}{2} \gamma [\Delta \mathbf{R}^T (\mathbf{\Gamma} \otimes \mathbf{E}) \Delta \mathbf{R}], \quad (1)$$

其中， $\gamma$  是弹簧的弹性系数， $\Delta \mathbf{R}$  ( $3N$  维的列向量) 代表  $N$  个  $\text{C}_\alpha$  原子偏离平衡位置的位移， $\mathbf{E}$  是单位矩阵， $\otimes$  为矩阵的直积， $\mathbf{\Gamma}$  为  $N \times N$  阶的 Kirchhoff 矩阵，其元素为：

$$\Gamma_{ij} = \begin{cases} -1 & \text{if } i \neq j, R_{ij} \leq r_c \\ 0 & \text{if } i \neq j, R_{ij} > r_c \\ -\sum_{j, j \neq i}^N \Gamma_{ij} & \text{if } i = j \end{cases}, \quad (2)$$

其中， $R_{ij}$  是第  $i$  个和第  $j$  个  $\text{C}_\alpha$  原子之间的距离， $r_c$  为截断半径。每个残基的均方涨落以及不同残基间涨落的交叉相关性分别表示为：

$$\langle \Delta \mathbf{R}_i \cdot \Delta \mathbf{R}_i \rangle = \frac{3k_B T}{\gamma} [\mathbf{\Gamma}^{-1}]_{ii} \quad (3)$$

$$\langle \Delta \mathbf{R}_i \cdot \Delta \mathbf{R}_j \rangle = \frac{3k_B T}{\gamma} [\mathbf{\Gamma}^{-1}]_{ij}, \quad (4)$$

其中  $k_B$  为 Boltzmann 常数， $T$  为绝对温度。

GNM 模型可以提供残基运动的幅度，但不包括方向信息，而 ANM 模型可以提供该信息。在 ANM 中，选取 14.0 Å 为截断半径，网络的总势能为：

$$V_{\text{ANM}} = \frac{1}{2} \gamma \sum_{i,j}^N (R_{ij} - R_{ij}^0)^2, \quad (5)$$

其中， $R_{ij}$  和  $R_{ij}^0$  分别为节点  $i$  和  $j$  之间的瞬时距离以及处于平衡位置时的距离。蛋白质的运动模式由一个 Hessian 矩阵  $\mathbf{H}$  决定，它的元素是大小为  $3 \times 3$  的子矩阵。子矩阵的元素  $\mathbf{h}_{ij}$  为体系势能函数 (5) 对位置的二阶偏导数，当  $i \neq j$  时， $\mathbf{h}_{ij}$  为：

$$\mathbf{h}_{ij} = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 V}{\partial X_i \partial X_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial X_i \partial Y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial X_i \partial Z_j} \\ \frac{\partial^2 V}{\partial Y_i \partial X_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial Y_i \partial Y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial Y_i \partial Z_j} \\ \frac{\partial^2 V}{\partial Z_i \partial X_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial Z_i \partial Y_j} & \frac{\partial^2 V}{\partial Z_i \partial Z_j} \end{pmatrix}. \quad (6)$$

当  $i = j$  时， $\mathbf{h}_{ij}$  为：

$$h_{ii} = -\sum_{i \neq j} h_{ij}. \quad (7)$$

在 ANM 中, 残基的均方涨落以及残基间涨落的交叉相关性为:

$$\langle \Delta \mathbf{R}_i \cdot \Delta \mathbf{R}_i \rangle = \frac{k_B T}{\gamma} (\mathbf{H}_{3i-2, 3i-2}^{-1} + \mathbf{H}_{3i-1, 3i-1}^{-1} + \mathbf{H}_{3i, 3i}^{-1}) \quad (8)$$

$$\langle \Delta \mathbf{R}_i \cdot \Delta \mathbf{R}_j \rangle = \frac{k_B T}{\gamma} (\mathbf{H}_{3i-2, 3j-2}^{-1} + \mathbf{H}_{3i-1, 3j-1}^{-1} + \mathbf{H}_{3i, 3j}^{-1}). \quad (9)$$

归一化的交叉相关性为:

$$C_{ij} = \frac{\langle \Delta \mathbf{R}_i \cdot \Delta \mathbf{R}_j \rangle}{\left[ \langle (\Delta \mathbf{R}_i^2) \rangle \times \langle (\Delta \mathbf{R}_j^2) \rangle \right]^{1/2}}. \quad (10)$$

交叉相关性的取值范围为-1 到 1, 正值表示残基的运动方向相同, 负值表示它们的运动方向相反。该值的绝对值越大表示两个残基间的运动相关性越强。

### 1.3 微扰响应扫描模型

微扰响应扫描 (PRS) [8] 是基于线性响应理论 (linear response theory, LRT) [10] 发展的模型。PRS 可以计算扰动某个残基时所有残基的响应, 从而来推断蛋白质的变构特性。由胡克定律  $\mathbf{F} = \mathbf{H} \Delta \mathbf{R}$ , 可以计算在受到外力扰动时所有残基位置的改变量  $\Delta \mathbf{R}$ , 其中  $\mathbf{H}$  是 ANM 中  $3N \times 3N$  的 Hessian 矩阵 (截断半径仍为 14.0 Å)。在 PRS 中, 每次对网络中的一个节点施加外力, 观测其他所有残基的响应。以对残基  $i$  施加外力为例:

$$\mathbf{F}^i = (000 \dots \Delta F_x^i \Delta F_y^i \Delta F_z^i \dots 000)^T, \quad (11)$$

得到的响应为:

$$\Delta \mathbf{R}^i = \mathbf{H}^{-1} \mathbf{F}^i, \quad (12)$$

其中,  $\Delta \mathbf{R}^i$  是在外力对残基  $i$  扰动后所有残基位置的改变量。对于力的方向, 有研究表明外力的方向对于结构的扰动不是非常重要 [8], 因此在本文中, 施加在  $i$  残基三个方向上的力为 (1, 1, 1)。

依次扰动所有残基可以得到一个  $N \times N$  阶的响应矩阵  $\mathbf{P}$ , 其第  $j$  列代表扰动残基  $j$  其他残基的响应。将  $\mathbf{P}$  矩阵进行归一化后, 每一列的平均值代表了该列对应残基的敏感性, 如第  $j$  列的平均值即为残基  $j$  的敏感性, 所有残基的敏感性就组成了残基敏感性特征曲线。该曲线峰值对应的残基被认为是敏感残基, 在蛋白质变构中起关键作用 [11]。

### 1.4 蛋白质结构网络方法

蛋白质结构的形成和功能的发挥在一定程度上依赖于残基间复杂的相互作用网络。在传



统的蛋白质结构网络 (PSN) 方法中, 蛋白质被简化成一个无权的图, 图中的节点是残基, 边是残基间的相互作用。这里, 当残基间的距离小于截断半径  $8.0 \text{ \AA}$  时, 认为他们有相互作用。这样, 蛋白质的 PSN 可以用邻接矩阵来描述, 其元素为:

$$A_{ij} = \begin{cases} H(r_c - r_{ij}) & i \neq j \\ 0 & i = j \end{cases} \quad (13)$$

其中  $r_{ij}$  表示节点  $i$  和  $j$  之间的距离。 $H(x)$  是 Heaviside 函数, 当  $x > 0$  时,  $H(x) = 1$ , 当  $x \leq 0$  时,  $H(x) = 0$ 。节点  $i$  的度 (degree) 是与该节点连接的其他节点的数量。

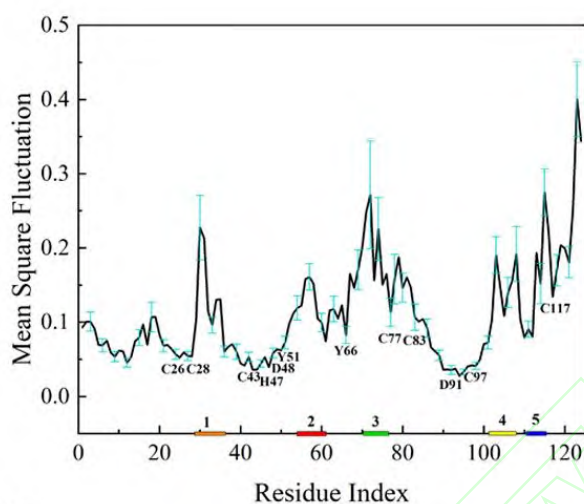
## 2 结果与讨论

### 2.1 高斯网络模型的慢运动模式分析

在 ENM 中, 蛋白质的低频运动模式提供了分子大幅度的集合运动信息, 与功能运动有关。为了解 sPLA<sub>2</sub> 的功能性动力学特征, 我们对人 sPLA<sub>2</sub>-IIA 型 31 个结构分别构建了 GNM 模型, 计算了前 12 个最慢运动模式 (对涨落的贡献大于 50%) 的均方涨落, 以及其平均值和标准差, 结果如图 2a 所示。



(a)



(b)

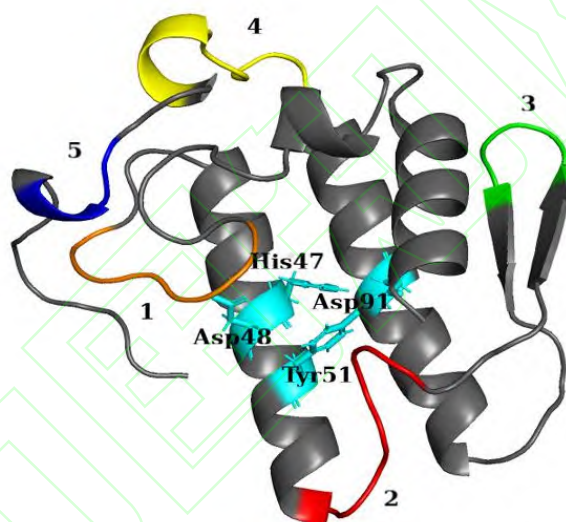


图 2. (a) 31 个人 sPLA<sub>2</sub>-IIA 型结构的残基平均涨落图，5 个高柔性区域被标注 1-5。(b) 区域 1-5 和催化残基在结构 (PDB ID:3u8b) 中的位置

**Fig 2.** (a) Mean residue fluctuation curve for the 31 human sPLA<sub>2</sub>-IIA enzyme structures. The regions with high flexibility are labeled 1-5. (b) Regions 1-5 and catalytic residues are mapped on the structure (PDB ID:3u8b).

图 2a 中的残基涨落与前人 MD 模拟<sup>[5]</sup>得到的涨落曲线相似，说明 GNM 是获得蛋白质柔性的有效方法。从图 2a 发现处于涨落极小值的残基，包括 Cys26、Cys28、Cys43、Cys44、His47、Asp48、Cys49、Tyr51、Tyr66、Cys77、Cys83、Cys90、Asp91、Cys97 和 Cys117，也具有较小的标准差，说明它们在不同的结构中都具有低运动性，是这些结构的动力学的共

同特征。其中, His47、Asp48、Tyr51 和 Asp91 构成了催化网络 (图 2b), 其通过与水分子发生相互作用稳定了催化反应所必需的氧离子中间体<sup>[12]</sup>。保守的催化二联体 His47-Asp91 占据涨落的极小值, 这符合催化残基精确定位的要求<sup>[13]</sup>。另外, 上述 10 个高度保守的半胱氨酸也处于极小值处, 参与了二硫键的形成, 起到了维持结构稳定的作用。残基 Tyr66 也高保守, 有低运动性, 参与了与 68 位 Tyr/Phe/Trp 的芳香环堆叠相互作用, 起到了稳定酶结构的作用<sup>[14]</sup>。

sPLA<sub>2</sub> 的 C 端是 loop 区, 这可能是其具有较大涨落的原因。目前尚未发现它有重要的生物学功能, 因此在分析涨落峰值的区域时没有考虑 C 端。我们将涨落中峰值的区域标记为 1-5 (图 2a), 并将其展示在结构 (PDB ID:3u8b) 中 (图 2b)。区域 1 (Gly29-Ser35) 属于 Ca<sup>2+</sup> 结合环, 主要负责 Ca<sup>2+</sup> 的结合。钙离子通过与区域 1 中残基的氧原子、催化残基 Asp48 以及水分子的相互作用, 得以稳定在催化位点附近, 为实现催化功能提供条件<sup>[5]</sup>。区域 2 (Gly58-Phe63)、区域 4 (Lys102-Tyr109) 和区域 5 (Ser113-Lys115) 主要参与了酶与膜的相互作用, 特别是残基 Thr61、Phe63、Lys102、Lys107、Asn114 和 Lys115 通过疏水或静电相互作用与膜结合, 其突变会影响酶的活性<sup>[15]</sup>。区域 3 (Ser71-Arg74) 属于连接两个  $\beta$ -sheets 的 loop4, 其功能还不是很明确。以前的 MD 模拟工作也显示此区域的柔性较大, 并且在有无膜的环境下, 其残基涨落的差异较为明显<sup>[5]</sup>, 因此我们推测该区域可能参与了膜的识别。另外, 我们看到这些区域的涨落标准差较大, 这是由于不同的结构结合的配体有所不同导致的, 体现了结构对配体识别的特异性, 这也说明了这些区域对不同配体结合的调控。

总之, 从 GNM 对慢运动模式分析的结果可发现, 处于涨落极小值处的残基是对结构稳定或催化功能至关重要的残基, 这些残基的低涨落是该酶成员共享的动力学特征; 而位于涨落峰值处的残基可能与底物的结合有关, 不同的结构间存在显著差异。

## 2.2 运动相关性分析

为了理解蛋白质结构中残基运动的关联性, 通过 (10) 式用 ANM 模型计算了所有残基涨落间的交叉相关系数的平均, 如图 3 所示。由于慢运动模式对应着功能性运动, 所以我们选取前 21 个慢运动模式进行计算 (对涨落的贡献大于 50%)。

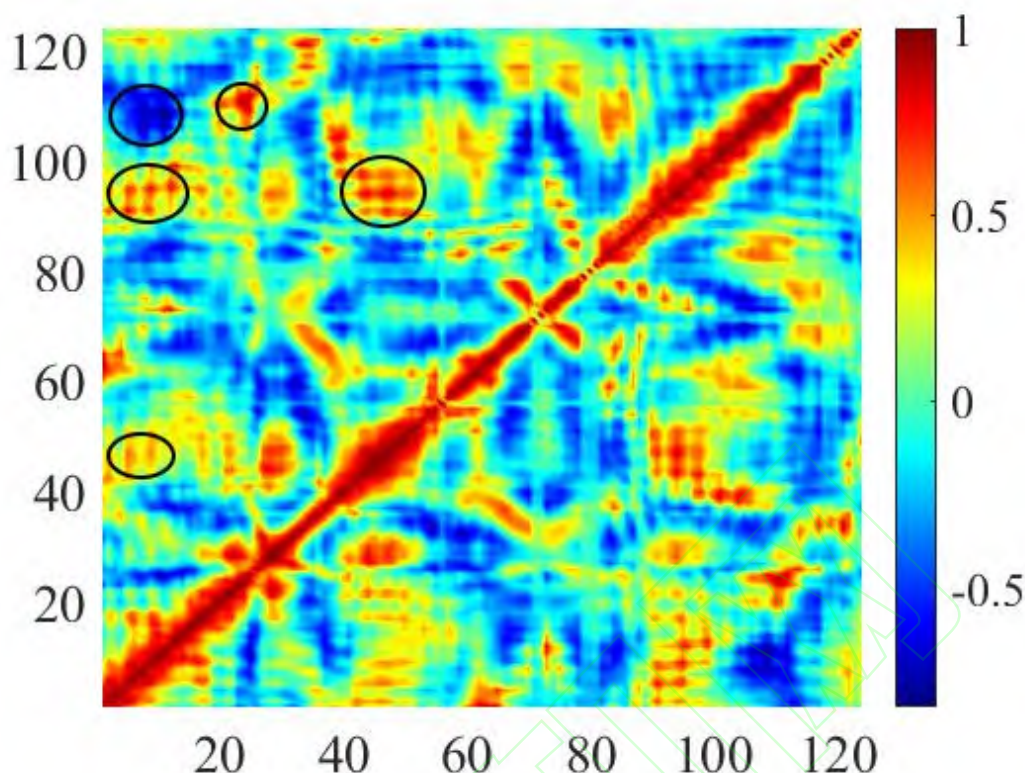


图 3. 31 个人 sPLA<sub>2</sub>-IIA 型结构的平均残基运动相关性

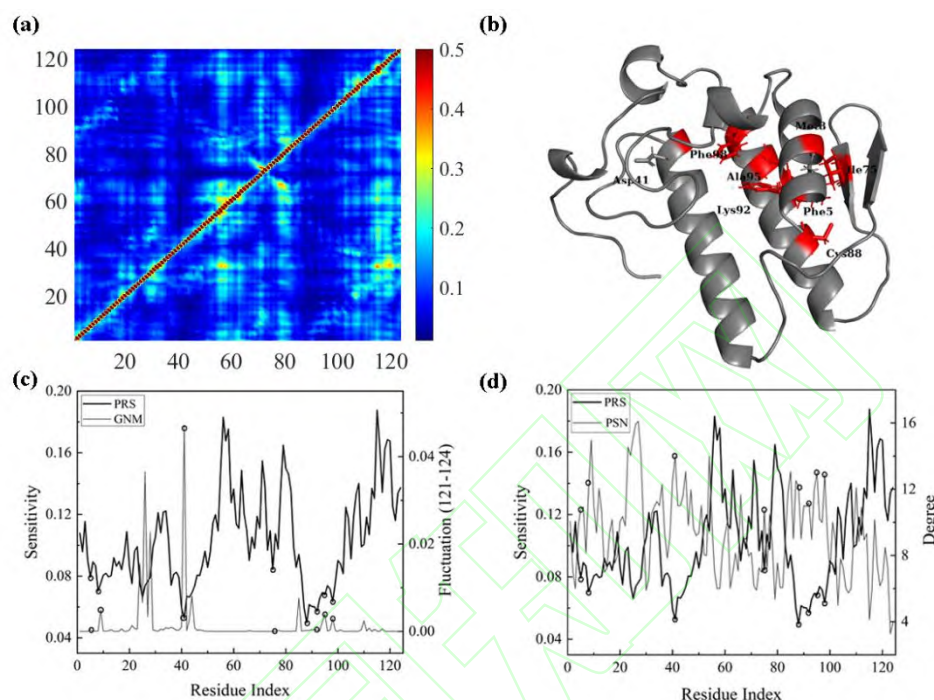
Fig 3. Average residue cross-correlations for human 31 sPLA<sub>2</sub>-IIA members.

从图 3 可见, 残基 Thr104-Asn114 (位于 helix5 和 loop6 上) 与残基 Asn1-Thr13 (位于 helix1 上) 呈较强负相关, 而与残基 Tyr21-His27 (位于 loop2 上) 呈正相关。这些残基在催化位点周围, 这种强相关运动有助于酶催化残基的暴露及催化反应的发生。此外, 残基 Ala39-Arg53 和残基 Cys88-Asn100 之间存在较强的同向运动, 它们分别位于承担催化作用的 helix3 和 helix4 上, 其中 His47、Asp48、Tyr51 和 Asp91 构成了催化网络。这些残基的同向运动保证了催化功能的稳定发挥。另外还发现残基 Asn1-Thr13 (helix1)、残基 Ala39-Arg53 (helix3) 和残基 Cys88-Asn100 (helix4) 呈现同向运动。helix1 和 4 的同向运动部分是由于形成了疏水三联体 (Phe5-Ala94-Phe98) 而形成的。该三联体在空间上彼此接近, 参与了高度保守的底物结合疏水通道的形成, 促进了磷脂与催化位点的结合<sup>[16]</sup>。总之, 酶在催化位点周围的强相关运动有助于酶与膜和磷脂的结合, 促进催化反应的发生。

### 2.3 微扰响应扫描分析

微扰响应扫描 (PRS) 方法将 ENM 与 LRT 相结合, 用来评估在蛋白质上施加微扰对其构象的影响。计算了 31 个结构的平均 PRS 热图 (图 4a), 及其各列元素平均后得到的残基

敏感性曲线（图 4c）。发现敏感性较高的残基恰好对应于从 GNM 慢运动模式分析识别到的 5 个区域。区域 1 负责钙离子结合，敏感性较高，这是酶实现催化功能的要求。区域 2、4 和 5 均参与了酶与膜的相互作用，膜作为变构剂调控酶的构象。也就是说，这些区域在酶的变构中起到了重要作用。总之，PRS 是识别蛋白质变构过程中起关键作用残基的有效方法。



**图 4.** (a) 31 个 sPLA<sub>2</sub> 结构的平均 PRS 热图 (b) 低敏感性的残基 (c) 残基敏感性曲线和残基在最快的 3 个运动模式上涨落的平均值 (d) 残基敏感性曲线和残基度的平均值

**Fig 4.** (a) Average PRS heat map for the 31 sPLA<sub>2</sub> members (b) Residues with minimal sensitivity (c) Curve of residue sensitivities and average fluctuations contributed by the fastest three motion modes (d) Curve of residue sensitivities and average degree values.

除此之外，关注到一些具有较低敏感性的残基 Phe5、Met8（位于 helix1 上）、Asp41（位于 helix3 上）、Ile75（位于  $\beta$ -sheets 上）、Cys88、Lys92、Ala95、Phe98（位于 helix4 上），它们包埋在结构中（图 4b）。有意思的是，这些低敏感残基几乎占据了快运动模式下（最快的 3 个 121-124）涨落极大值的位置（图 4c）。GNM 的快运动模式反映了蛋白质局部结构的几何不规则性，在蛋白质折叠中，相较于慢运动模式下涨落，快运动模式下的涨落伴随着更大的熵减<sup>[17]</sup>。同以往的研究结果一致，本研究发现快运动模式下活跃的残基往往处于蛋白质折叠核区域，并且这些残基对结构稳定起重要作用<sup>[17, 18]</sup>。同时也发现它们在蛋白质结构



网络中具有高的平均度值（图 4d）。残基度值（degree）反映了残基在局部网络中的连通性，也反映了残基对结构稳定的作用<sup>[19]</sup>。因此，这些残基在结构上的紧密堆积（高的连通性）以及在快运动模式下的高活动性表明它们在稳定结构方面具有重要作用。

### 3 结论

本工作探索了人分泌型磷脂酶 A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) 中 IIA 型结构动力学和变构特性，探索了其动力学共性和特异性与功能的关系。根据 GNM 分析，发现结构中动力学高度受限的残基，即催化残基和半胱氨酸残基，与酶的共有功能有关，它们分别对酶的催化和结构稳定至关重要，在不同成员之间共享。另外，识别到柔性较大的 5 个区域，它们参与了保证酶催化活性的钙离子的结合，以及与别构剂膜的结合。这些区域的涨落在不同成员中差异较为显著，体现出了成员的特异性。ANM 分析结果暗示了酶催化位点周围的强相关运动，这有利于配体的结合及酶催化功能的实现。最后 PRS 方法对酶变构特性的分析表明，对扰动高度敏感的残基对应上述柔性较大的 5 个区域，说明这些残基作为传感器在变构通信中发挥重要作用；而低敏感性残基在快运动模式下较为活跃，对酶的结构稳定有大的贡献。本工作有助于深入理解 sPLA<sub>2</sub> 酶共有和特异性功能背后动力学的机制，对同系物设计和药物设计有一定的指导意义。

### References

- [1] Dennis E A. Introduction to thematic review series: Phospholipases: Central role in lipid signaling and disease. *J Lipid Res*, 2015, 56(7): 1245-1247
- [2] Quach N D, Arnold R D, Cummings B S. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochem. Pharmacol*, 2014, 90(4): 338-348
- [3] Ichiro, Kudo, And, et al. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2002, 68-69:3-58
- [4] Mouchlis V D, Bucher D, Mccammon J A, et al. Membranes serve as allosteric activators of phospholipase A2, enabling it to extract, bind, and hydrolyze phospholipid substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(6): 516-525
- [5] Manukyan A K. Structural aspects and activation mechanism of human secretory group IIA phospholipase. *Eur Biophys J*, 2020, 49(6): 511-531
- [6] Bahar I, Atilgan A R, Erman B. Direct evaluation of thermal fluctuations in proteins using a single-parameter harmonic potential. *Fold Des*, 1997, 2(3): 173-181
- [7] Atilgan A R, Durell S R, Jernigan R L, et al. Anisotropy of fluctuation dynamics of proteins with an elastic network model. *Biophys J*, 2001, 80(1): 505-515
- [8] Atilgan C, Atilgan A R. Perturbation-response scanning reveals ligand entry-exit mechanisms of ferric binding protein. *PLoS Comput Biol*, 2009, 5(10): e1000544
- [9] Di Paola L, Hadi-Alijanvand H, Song X Y, et al. The discovery of a putative allosteric site in the SARS-CoV-2 spike protein using an integrated structural/dynamic approach. *J Proteome Res*, 2020, 19(11): 4576-4586
- [10] Ikeguchi M, Ueno J, Sato M, et al. Protein structural change upon ligand binding: Linear response

theory. Phys Rev Lett, 2005, 94(7): 078102

[11] Dutta A, Krieger J, Lee J Y, et al. Cooperative dynamics of intact AMPA and NMDA glutamate receptors: Similarities and subfamily-specific differences. Structure, 2015, 23(9): 1692-1704

[12] Ramakrishnan C, Subramanian V, Velmurugan D. Molecular dynamics study of secretory phospholipase A2 of Russell's viper and bovine pancreatic sources. J Phys Chem B, 2010, 114(42): 13463-13472

[13] Yang L W, Bahar I. Coupling between catalytic site and collective dynamics: A requirement for mechanochemical activity of enzymes. Structure, 2005, 13(6): 893-904

[14] Dupureur C M, Yu B Z, Jain M K, et al. Phospholipase A2 engineering. Structural and functional roles of highly conserved active site residues tyrosine-52 and tyrosine-73. Biochemistry, 1992, 31(28): 6402-6413

[15] Jian, Cao, John, et al. Using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry to define the specific interactions of the phospholipase A2 superfamily with lipid substrates, inhibitors, and membranes. 2012, 288(3): 1806-1813

[16] Oliveira, Alberto, Bleicher, et al. Conservation analysis and decomposition of residue correlation networks in the phospholipase A2 superfamily (PLA2s): Insights into the structure-function relationships of snake venom toxins. 2018, 146: 50-60

[17] Su J G, Jiao X, Sun T G, et al. Analysis of domain movements in glutamine-binding protein with simple models. Biophys J, 2007, 92(4): 1326-1335

[18] Yang L, Song G, Carriquiry A, et al. Close correspondence between the motions from principal component analysis of multiple HIV-1 protease structures and elastic network modes. Structure, 2008, 16(2): 321-330

[19] Vishveshwara S, Ghosh A, Hansia P. Intra and inter-molecular communications through protein structure network. Curr Protein Pept Sc, 2009, 10(2): 146-160