

整合素结合序列 N 端 Gly 错义突变对重组胶原蛋白结构与功能的影响

李斐^{1#}, 侯宇曦^{1,2#}, 饶犇¹, 刘晓艳¹, 王亚平², 邱一敏^{1,2*}

1 湖北省农业科学院湖北省生物农药工程研究中心 湖北省农业科技创新中心生物农药分中心 国家生物农药工程技术研究中心, 湖北 武汉 430064

2 湖北大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430062

李斐, 侯宇曦, 饶犇, 刘晓艳, 王亚平, 邱一敏. 整合素结合序列 N 端 Gly 错义突变对重组胶原蛋白结构与功能的影响[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1573-1587.

LI Fei, HOU Yuxi, RAO Ben, LIU Xiaoyan, WANG Yaping, QIU Yimin. Effects of Gly mutations N-terminal to the integrin-binding sequence on the structure and function of recombinant collagen[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1573-1587.

摘要: 胶原蛋白作为动物体内多种组织和功能的重要基质蛋白, 在生物材料领域应用广泛。而在 I 型胶原蛋白的三螺旋结构中, Gly-Xaa-Yaa 三联体中 Gly 的错义突变是引发成骨不全症(osteogenesis imperfecta, OI)的重要原因。其临床表现具有高度异质性, 涵盖从轻度骨骼脆弱(I 型)到严重肢体畸形(III 型), 乃至致死性围产期型(II 型)的广泛疾病谱。本研究以重组胶原蛋白作为研究模型, 旨在进一步明确发生在整合素结合序列 GFPGER N 端的 Gly→Ala/Val 突变是否会影响胶原蛋白的结构和功能, 探讨错义突变对胶原蛋白生物学功能的影响机制。通过在 GFPGER 序列 N 端的 7 个 Gly 位点分别引入 Ala 和 Val 突变, 系统评估了氨基酸替换对重组胶原蛋白的三螺旋结构、热稳定性、整合素结合能力和细胞黏附能力的影响。研究发现, 所有 Gly 错义突变体均能形成稳定的三螺旋结构, 但热稳定性略有下降。通过胰蛋白酶酶解实验, 发现 Gly→Val 替换导致重组胶原蛋白对胰蛋白酶的敏感性增加, 表明突变位点周围可能存在局部的构象扰动。此外, Gly→Val 突变体的整合素结合能力和 HT1080 细胞黏附能力均显著降低, 且这种效应比 Gly→Ala 突变体更为显著。这表明当 Gly 被更大体积的 Val 替代时, 对胶原蛋白的结构和功能影响更为负面。本研究为理解成骨不全症的分子机制提供了新见解, 同时为胶原蛋白的序列设计和生物材料开发提供了重要的理论参考和实验基础。

资助项目: 国家自然科学基金(32000052); 湖北省技术创新计划(2024BBB064); 湖北省自然科学基金(2020CFB249); 湖北省农业科技创新中心创新团队项目(2024-620-000-001-023)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32000052), the Key Research and Development Program of Hubei Province (2024BBB064), the Hubei Provincial Natural Science Foundation (2020CFB249), and the Innovation Team Program of Hubei Provincial Innovation Center for Agricultural Sciences and Technologies (2024-620-000-001-023).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: qiuyimin@nberc.com

Received: 2024-09-07; Accepted: 2025-01-03; Published online: 2025-01-06

关键词: 重组胶原蛋白; 成骨不全症; 错义突变; 三螺旋结构; 整合素结合能力

Effects of Gly mutations N-terminal to the integrin-binding sequence on the structure and function of recombinant collagen

LI Fei^{1#}, HOU Yuxi^{1,2#}, RAO Ben¹, LIU Xiaoyan¹, WANG Yaping², QIU Yimin^{1,2*}

¹ National Biopesticide Engineering Research Centre, Biopesticide Branch of Hubei Innovation Centre of Agricultural Science and Technology, Hubei Biopesticide Engineering Research Centre, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, Hubei, China

² School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

Abstract: Collagen, a vital matrix protein for various tissue and functions in animals, is widely applied in biomaterials. In type I collagen, missense mutations of glycine (Gly) in the Gly-Xaa-Yaa triplet of the triple helix are a major cause of osteogenesis imperfecta (OI). Clinical manifestations exhibit marked heterogeneity, spanning a broad disease spectrum from mild skeletal fragility (Type I) to severe limb deformities (Type III) and perinatal lethal forms (Type II). This study utilized recombinant collagen as a model to further elucidate whether Gly→Ala/Val mutations at the N-terminus of the integrin-binding sequence GFPGER affect collagen structure and function, and to explore the underlying mechanisms by which missense mutations impact the biological function of collagen. By introducing Ala and Val substitutions at seven Gly positions N-terminal to the GFPGER sequence, we systematically assessed the effects of these amino acid replacements on the triple-helical structure, thermal stability, integrin-binding ability, and cell adhesion of recombinant collagen. All constructs formed a stable triple-helix structure, with slightly compromised thermal stability. Gly→Val substitutions increased the susceptibility of recombinant collagen to trypsin, which suggested local conformational perturbations in the triple helix. In addition, Gly→Val substitutions significantly reduced the integrin-binding affinity and decreased HT1080 cell adhesion, with the effects stronger than Gly→Ala substitutions. Compared with Gly→Ala substitutions, substitution of Gly with the larger residue Val had enhanced negative effects on the structure and function of recombinant collagen. These findings provide new insights into the molecular mechanisms of osteogenesis imperfecta and offer theoretical references and experimental foundations for the design of collagen sequences and the development of collagen-based biomaterials.

Keywords: recombinant collagen; osteogenesis imperfecta; missense mutation; triple-helix; integrin-binding affinity

胶原蛋白是人体中广泛存在的一种结构性蛋白质, 在皮肤、骨骼、肌腱和血管等组织中发挥着重要作用。它不仅构成了组织的主要支架, 还参与了细胞黏附、信号传导以及细胞外

基质的形成和维持等生物学过程^[1-2]。胶原蛋白的典型三螺旋结构由 3 条聚脯氨酸II型螺旋构成, 其中每 3 个氨基酸残基的中间必须为甘氨酸(Gly), 其小侧链能够深入螺旋内部, 使 3 条

肽链紧密缠绕,形成特征性的(Gly-Xaa-Yaa)_n重复序列。通常,Xaa和Yaa位点为脯氨酸(Pro)和羟脯氨酸(Hyp)等,确保了胶原蛋白的稳定性和生物学功能^[3]。

迄今,在人体中已经发现了29种不同类型的胶原蛋白^[1]。其中,I型胶原蛋白最为常见,尤其在骨骼中具有重要作用。I型胶原是由COL1A1和COL1A2基因分别编码的2条α1(I)链和1条α2(I)链组成的异源三聚体;胶原蛋白的基因突变会破坏细胞外基质的正常结构和功能,导致一系列结缔组织疾病,其中最具代表性的就是成骨不全症(osteogenesis imperfecta,OI)^[4]。OI是一种遗传性骨疾病,其临床表现为骨脆性增加和频繁骨折^[5]。目前,约85%的OI病例是由COL1A1和COL1A2基因的常染色体突变引起的,这些突变会影响胶原蛋白的数量或结构;根据临床症状的轻重,Sillence分类法将OI表型分为I-IV型,涵盖I型(轻型)至II型(致死性围产期型)的连续谱系;随着遗传学研究的进展,越来越多的与OI相关的隐性、显性及X连锁基因突变被发现,这些突变涉及I型胶原蛋白的合成、加工、分泌以及成骨细胞的分化和功能调控等过程^[6]。OI的分类方法正从传统的Sillence I-IV型向基于基因-功能的分类转变。前者主要用于描述由COL1A1或COL1A2基因突变引起的经典OI,而后者则能更全面地反映OI疾病的遗传异质性。

在I型胶原蛋白的研究中,错义突变,尤其是Gly-Xaa-Yaa三联体中Gly被体积较大的氨基酸取代,常被认为是导致OI的核心机制^[7]。这种结构上的微小变化对胶原蛋白的稳定性和功能产生了深远的影响,并引发了相应的临床症状。已有研究表明,不同的氨基酸替代会导致不同严重程度的OI^[5]。替代氨基酸包括丝氨酸(Ser)、半胱氨酸(Cys)、精氨酸(Arg)、缬氨酸

(Val)、谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、丙氨酸(Ala)和色氨酸(Trp)。在α1(I)链中,超过1/3的Gly错义突变会导致致死型OI,其致死性依次为Val>Asp>Arg>Cys>Glu>Ser>Ala,而在α2(I)链中的Gly错义突变引发致死型OI的比例不到1/5,致死性为Val>Glu>Asp>Cys>Arg>Ser>Ala^[8-9]。Gly→Ser突变是最常见的错义突变,且其表型范围广泛,包括致命型和非致命型;Gly→Ala的突变则相对温和,导致较轻的临床症状,且观测到的数量少于通过突变率分析预测的数量;相比之下,Gly被Val(体积最大的替换残基之一)取代会导致73%的病例呈现致命表型^[5]。此外,在同一Gly位点发生了不同突变的OI病例中,观察到氨基酸特性对OI表型的影响遵循类似的模式:如Gly844位点的Ala替代与中度OI(I/IV型)相关,Ser替代与更严重的III型OI有关,而Val替代则与致死型的II型OI相关^[10-11]。

尽管目前对I型胶原蛋白中Gly错义突变的研究已取得一定进展,但其如何影响临床表型的具体方式仍不明确。任何较大的氨基酸替代都会扭曲三螺旋构象,导致胶原三螺旋的稳定性下降,延缓胶原折叠,并可能干扰分泌、影响前胶原的加工和组装^[12]。对模型肽的研究显示,在三螺旋短肽(Gly-Pro-Hyp)₈中,去稳定化的程度取决于替代氨基酸,顺序为Trp>Asp>Glu>Val>Arg>Cys>Ser>Ala,这与α1(I)链中特定Gly替换残基引发的OI严重程度高度相关^[13]。另一种OI基因型与表型关系的解释模型认为,一些胶原突变可能干扰胶原与各种细胞受体、伴侣蛋白及其他细胞外基质蛋白的相互作用^[5]。

细菌胶原蛋白系统已被成功应用于研究Gly错义突变对胶原蛋白结构和功能的影响^[10,14-16]。发生在⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷序列N端、距其多达4个三联体的Gly→Ser突变,会导致重组胶原蛋白的整合素结合能力和细胞黏附性下降^[15]。另外,

对⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷序列中的 Gly502、Gly505 及其 C 端 Gly508 和 Gly511 进行 Gly→Ala/Ser/Val 突变后发现, 3/4 的 Gly→Val 突变体对胰蛋白酶敏感; Gly505 处的任何突变都会破坏重组蛋白的整合素结合能力; 而 Gly502 突变体的整合素结合能力则与替代氨基酸相关, 其亲和力为 G502A>G502S>G502V^[10]。至于⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷序列 N 端的 Gly→Ala 或 Gly→Val 的突变是否会影响重组胶原蛋白结构和功能, 目前仍不清楚。因此, 本研究进一步考察了整合素结合序列 N 端 Gly→Ala/Val 突变对重组胶原蛋白结构和功能的影响。通过圆二色谱(circular dichroism, CD)、差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)以及胰蛋白酶敏感性实验, 全面评估重组蛋白的结构和热稳定性变化。此外, 通过固相结合实验和细胞黏附实验, 分析突变体与整合素的结合能力, 探讨了错义突变如何影响胶原蛋白的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3), 质粒 pColdIII-VCL 和 pColdIII-VCL-Int, 以及人纤维肉瘤细胞 HT1080 (human fibrosarcoma cell line HT1080)均为实验室保存。Q5 定点突变试剂盒购自 NEB 公司, PureYield 质粒小提试剂盒购自 Promega 公司, NuPAGE 4%–12%蛋白凝胶、Novex[®] Sharp 蛋白 marker、TMB 底物试剂盒、DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自 ThermoFisher Scientific 公司, 胰蛋白酶(trypsin)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、Anti- GST HRP 抗体、钙黄绿素 AM (calcein-AM)均购自 Sigma-Aldrich 公司, 高结合型 96 孔板购自 Corning 公

司, 10×PBS 缓冲液、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)和氨苄青霉素均购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

UV-Vis 分光光度计, 安捷伦科技(上海)有限公司; 圆二色光谱仪, Sundew Rising LLC 生物技术公司; Microflex LT MALDI-TOF 质谱仪, 布鲁克(北京)科技有限公司; Nano DSC 差示扫描量热仪, 沃特世科技(上海)有限公司; 多功能酶标仪, 美谷分子仪器(上海)有限公司; 显微数码成像装置, 徕卡显微系统(上海)贸易有限公司; 蛋白纯化系统, 通用电气公司; 凝胶成像系统、蛋白电泳系统, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 琼脂糖凝胶电泳仪, 北京六一生物科技有限公司。

1.3 重组质粒的设计与构建

所有 Gly 错义突变的重组质粒均基于前期构建的表达载体 pColdIII-VCL-Int 进行设计与构建。pColdIII-VCL-Int 载体包含 VCL 片段, 该片段由编码三聚体结构域(V domain)和类胶原结构域(CL domain)组成, 其中类胶原结构域包含 79 个 GXY 三联体, 并在 N 端带有 6×His 标签。VCL-Int 片段是在 VCL 序列基础上插入了人 $\alpha 1$ (I)链序列⁴⁹⁶GARGERGFPGERGVQGP⁵¹³所构建的, 其中⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷为整合素结合序列^[15]。利用 Q5 定点突变试剂盒引入 Gly→Ala 和 Gly→Val 的碱基置换突变, 将构建的重组质粒转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 并通过 DNA 测序验证突变的正确性。

1.4 重组胶原蛋白的表达与纯化

重组胶原蛋白均利用 *E. coli* BL21(DE3)进行诱导表达^[10]。首先, 挑取单个菌落接种至含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 于 37 °C、250 r/min 条件下过夜培养。次日, 将培养液转移至新鲜培养基中继续培养, 直至 OD₆₀₀

值达到 0.8。加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 调整培养条件至 20 °C、250 r/min, 过夜培养以诱导蛋白表达。收集菌体后, 超声破碎细胞并离心去除细胞碎片。使用 AKTA pure 蛋白纯化系统对上清液进行亲和层析纯化, 并通过 SDS-PAGE 分析确认蛋白纯度。收集含有目标蛋白的洗脱液后, 利用 1×PBS 缓冲液透析, 并采用 UV-Vis 分光光度计测定蛋白浓度, 使用消光系数 $\epsilon_{280}=9\,970\text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ 进行计算。最后, 通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 分析进一步确认纯化蛋白的分子量。

1.5 圆二色谱分析

采用圆二色谱仪对纯化的重组蛋白进行二级结构表征。将蛋白样品用 1×PBS 缓冲液稀释至 0.2 mg/mL, 并于 4 °C 静置平衡 24 h。使用圆二色谱仪收集样品在 0 °C 下的 CD 信号, 扫描波长范围为 260–190 nm, 扫描步长为 0.5 nm, 扫描速度为 2 s/nm, 带宽为 1.5 nm, 重复扫描 3 次以减少误差。利用升温扫描法检测重组蛋白的热稳定性, 收集样品在 220 nm 处的 CD 信号, 升温速率为 0.1 °C/min, 温度范围为 5–70 °C, 每个温度点平衡 2 min 后进行数据采集。拟合热变曲线并进行一阶求导, 确定蛋白的熔融温度(T_m), 以表征重组胶原蛋白的热稳定性。

将样品在 55 °C 下孵育 20 min 使其变性, 随后立即转移到预先在 0 °C 平衡的比色皿中, 进行胶原蛋白的重折叠分析, 时间常数为 2 s, 间隔时间为 10 s。折叠比值(fraction folded)是指在 0 °C 下重折叠后的 CD 信号与解链前初始 CD 信号的比值, 用来表示蛋白质的折叠程度。重折叠半衰期($t_{1/2}$)是指蛋白质折叠过程达到 50% (即折叠比值为 0.5)所需的时间, 即半数蛋白质完成折叠所需的时间。

1.6 差示扫描量热分析

使用 Nano DSC 差示扫描量热仪分析重组胶原蛋白的热变性过程。样品在测试前用 1×PBS 缓冲液透析过夜, 并稀释至 1.0 mg/mL。以透析缓冲液作为参比液, 扫描范围为 5–70 °C, 升温速率为 1.0 °C/min。样品经 3 次重复检测, 获取平均值并绘制 DSC 曲线。

1.7 胰蛋白酶敏感性测定

在 50 μL 的反应体系中, 将稀释至 0.1 mg/mL 的蛋白样品与胰蛋白酶溶液(终浓度 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)混合, 在 20 °C 下孵育不同时间(2 min、5 min、15 min、1 h、3 h 及过夜)。孵育后, 加入 PMSF 溶液至终浓度 1 mmol/L, 以终止酶解反应。每个处理设置 3 个重复样品。通过 SDS-PAGE 分析酶解产物, 评估蛋白对胰蛋白酶的敏感性。

1.8 固相结合试验

按照文献[17-18]中的方法, 利用重组整合素 $\alpha 2$ 亚基 I 结构域检测重组蛋白与整合素的体外结合能力。在高结合型 96 孔板中, 每孔加入 100 μL 蛋白样品(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 在室温下孵育 1 h。使用 1×PBS 洗涤后, 每孔加入 200 μL BSA 溶液(50 mg/mL), 封闭处理 1 h。使用洗涤缓冲液(含 1 mg/mL BSA 和 2 mmol/L MgCl_2 的 PBS 溶液)洗涤 4 次后, 每孔加入 100 μL 带有 GST 标签的重组整合素 $\alpha 2$ I 结构域(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 再次在室温下孵育 1 h。洗涤 4 次后, 每孔加入 100 μL anti-GST HRP 抗体(1:10 000 稀释), 在室温下孵育 1 h。加入 3 mol/L HCl 中和后, 使用 TMB 底物试剂盒进行比色分析, 并用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度, 以评估蛋白与整合素的结合亲和力。VCL-Int 蛋白作为阳性对照, VCL 蛋白和 PBS 作为阴性对照, 所有实验均设置 3 个重复。

1.9 细胞黏附试验

按照文献[14]中的方法, 利用人纤维肉瘤细胞 HT1080 进行细胞黏附试验。在高结合型 96 孔板中, 每孔加入 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重组蛋白溶液, 在

室温下孵育 1 h。每孔加入 200 μ L BSA 溶液 (50 mg/mL)，在室温下孵育 1 h 以进行封闭处理。用 200 μ L 洗涤缓冲液(含 1 mg/mL BSA 的 PBS 溶液)洗涤 4 次后，每孔加入 100 μ L HT1080 细胞悬液(2×10^4 cells/mL，使用含 10% FBS 和 2 mmol/L $MgCl_2$ 的 DMEM 培养基配制)，在 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育 1 h。用 200 μ L 无 FBS 的 DMEM (含 2 mmol/L $MgCl_2$)洗涤每孔 4 次，去除未黏附的细胞。每孔加入 100 μ L DMEM (含 0.5 μ L calcein-AM)，在 37 $^{\circ}C$ 下孵育 30 min。随后，用 DMEM 洗涤每孔，去除多余的 calcein-AM。所有样品均设置 3 个重复。使用 Leica DFC 340 FX 数码相机成像装置，设置激发波长和发射波长分别为 490 nm、515 nm，拍摄细胞的荧光图像。通过 ImageJ 软件进行附着细胞的定量分析。

2 结果与分析

2.1 重组胶原蛋白的设计与构建

本研究构建了一系列基于重组细菌胶原蛋白

VCL-Int 的突变体(图 1)。在 VCL-Int 的基础上，通过定点突变，将整合素结合序列 $^{502}GFPGER^{507}$ N 端 7 个氨基酸位点上的 Gly 分别替换为 Ala 和 Val，成功获得了 14 个蛋白突变体：G499A、G499V、G496A、G496V、G(-3)A、G(-3)V、G(-6)A、G(-6)V、G(-9)A、G(-9)V、G(-12)A、G(-12)V、G(-15)A、G(-15)V。所有重组蛋白在 SDS-PAGE 中均显示出与胶原蛋白单体相对应的条带(图略)。此外，通过 MALDI-TOF 质谱分析确认，所有重组蛋白的分子量与理论值相符(图 2)。

2.2 重组胶原蛋白的结构、稳定性与折叠特性分析

与 VCL-Int 蛋白相似，所有重组蛋白的 CD 扫描均显示出三螺旋结构的典型光谱特征，即在 220 nm 和 198 nm 处分别出现正、负吸收峰(图 3A)。这表明重组蛋白均正确折叠，形成完整的三螺旋结构。该结果与 Yu 等的研究结果一致^[19]。

为探讨 Gly 错义突变对重组胶原蛋白热稳定性的影响，采用圆二色谱分析了各重组蛋白

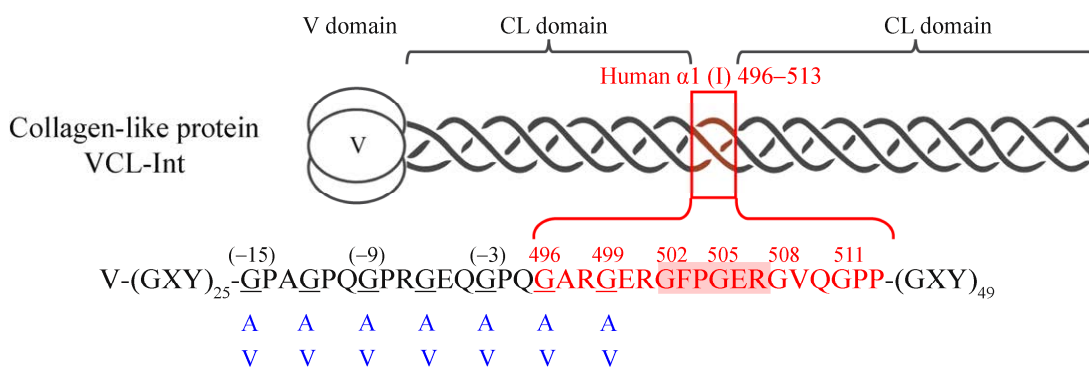


图 1 重组类胶原蛋白 VCL-Int 及系列 Gly 错义突变体的示意图 黑色：细菌胶原蛋白 VCL 序列；红色：插入片段，来源于人 I 型胶原 $\alpha 1$ (I) 链的 6 个三联体 $^{496}GARGERGFPGERGVQGP^{513}$ ；红色高亮部分：整合素结合位点 GFPGER；蓝色：替代氨基酸残基；下划线：Gly 错义突变的目标位点。

Figure 1 Schematic diagram of the recombinant collagen-like protein VCL-Int and Gly missense mutants. Black: Bacterial collagen VCL sequence; Red: Inserted fragment derived from six triplets ($^{496}GARGERGFPGERGVQGP^{513}$) of the human type I collagen $\alpha 1$ (I) chain; Red-highlighted region: Integrin-binding site GFPGER; Blue: Substituted amino acid residues; Underlined Gly residues: Target sites for missense mutations.

在 220 nm 处的热变性曲线(图 3B、3C), 并计算其熔融温度(T_m)。结果显示, 对照蛋白 VCL-Int 的 T_m 值为 35.38 °C, 而在不同位点引入 Gly→Ala 或 Gly→Val 突变均导致重组蛋白的热稳定性略有下降。例如, G499A 的 T_m 值为 33.28 °C, G499V 的 T_m 值为 32.69 °C。整体而言, 系列重组蛋白的 T_m 变化范围在 1.50–2.50 °C 之间, 与既往研究一致^[20]。

进一步利用 DSC 表征重组蛋白的热稳定性, 发现 VCL-Int、G499A 和 G499V 的热变性趋势一致(图 3D), 对应 T_m 值分别为 37.27 °C、35.93 °C 和 35.31 °C。值得注意的是, DSC 测

得的 T_m 值普遍略高于 CD 测量值, 这可能归因于 DSC 实验中较快的升温速率, 此现象也与前期观察一致^[10,15-16]。

此外, 为解析 Gly 突变对三螺旋折叠的影响, 分析了各蛋白的折叠动力学。尽管 G499A 和 G499V 突变体的总体折叠行为与 VCL-Int 类似, 其折叠时间显著延长(图 4)。具体而言, Gly 突变显著增加了折叠半衰期($t_{1/2}$): VCL-Int 的 $t_{1/2}$ 为 5.5 min, G499A 和 G499V 分别延长至 11.0 min 和 14.4 min。上述结果表明, Gly 突变不仅影响重组蛋白的热稳定性, 还显著降低了三螺旋的折叠速率。

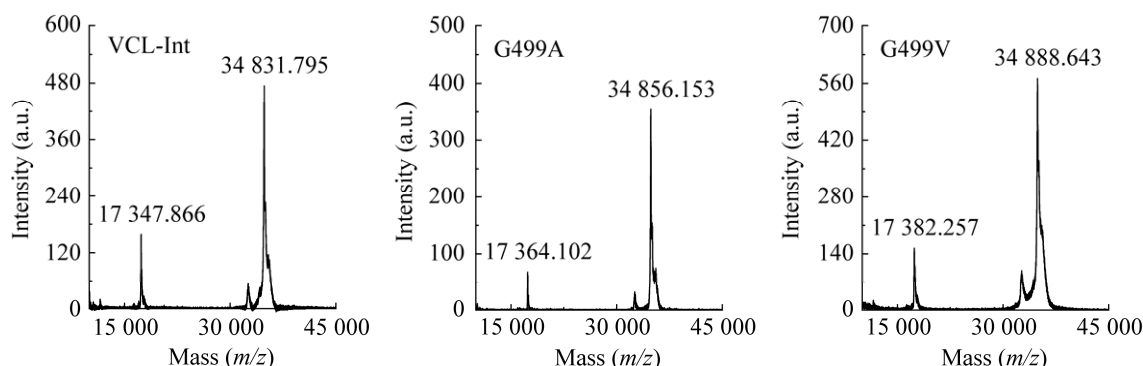


图 2 重组胶原蛋白 VCL-Int、G499A 和 G499V 的 MALDI-TOF 质谱结果

Figure 2 MALDI-TOF spectrometry results of recombinant collagen proteins VCL-Int, G499A and G499V.

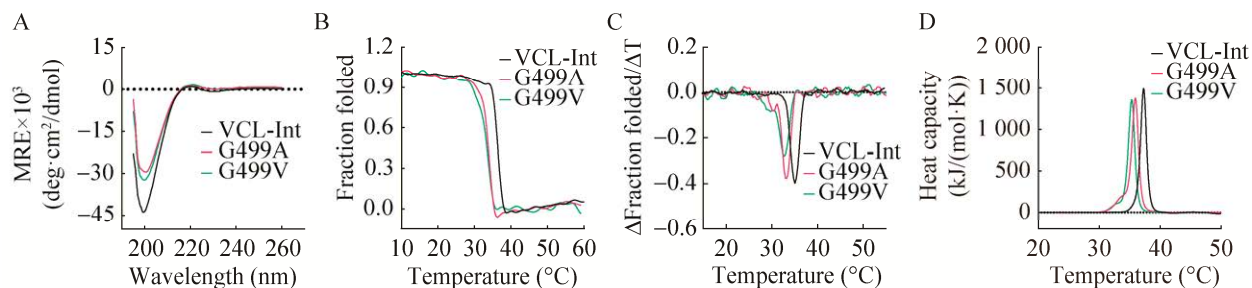


图 3 重组胶原蛋白 VCL-Int 及代表性 Gly499 突变体的特性分析 A: 重组蛋白在 0 °C 下的 CD 扫描图谱; B: 重组蛋白在 220 nm 处的 CD 热变性曲线; C: CD 热变性曲线一阶求导后的熔融温度曲线; D: 重组蛋白的 DSC 扫描图谱。

Figure 3 Characterization of the recombinant collagen proteins VCL-Int and representative Gly499 substitution mutants. A: CD spectra of the recombinant proteins at 0 °C showing triple helix formation; B: CD thermal unfolding curves at 220 nm; C: First derivative of CD melting curves showing the melting temperature; D: DSC curves of recombinant proteins.

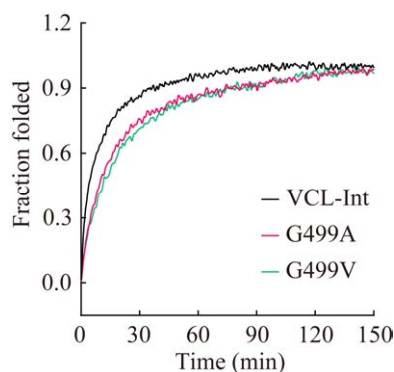


图4 重组胶原蛋白 VCL-Int 及代表性 Gly499 突变体的重折叠分析

Figure 4 Refolding of the recombinant collagen proteins VCL-Int and representative Gly499 mutants. The collagen domains of all constructs was denatured by heating to 55 °C for 20 min, then rapidly cooled to 0 °C, and monitored by CD spectroscopy at 220 nm. The half-time of refolding ($t_{1/2}$) is defined as the time required for the fraction folded to reach 0.5.

2.3 重组胶原蛋白的蛋白酶敏感性分析

为评估重组蛋白的三螺旋结构稳定性,使用胰蛋白酶酶解实验在 20 °C 条件下进行检测。实验结果显示,与对照蛋白 VCL-Int 相似,Gly→Ala 突变体经胰蛋白酶处理 15 min 后,仍表现出良好的抗性(图 5A、5B),表明这些突变体保留了紧密的三螺旋结构。相比之下,Gly→Val 突变体的胰蛋白酶敏感性呈现明显差异(图 5C、5D)。位于整合素结合序列 N 端较远处的 G(-15)V 和 G(-12)V 突变体仍具有一定的抗性,而其他位点的 Gly→Val 突变显著增强了对胰蛋白酶的敏感性。其中,G(-9)V 突变体经胰蛋白酶处理仅 2 min 即可观察到明显的条带变化。

为进一步研究胰蛋白酶抗性与突变的关系,选择胰蛋白酶抗性较强的突变体[G(-15)A 和 G(-15)V]及胰蛋白酶敏感性突变体(G496A、G496V、G499A、G499V)进行长时间的酶解反应。结果显示,经胰蛋白酶过夜处理后,所有突变体均被降解,表明三螺旋结构的完整性不

依赖于突变位置或替换氨基酸类型。然而,相比 Gly→Ala 突变,Gly→Val 突变体对胰蛋白酶的敏感性更高,尤其是 G499V 和 G(-15)V,经胰蛋白酶处理 1 h 后即出现明显降解(图 6)。与通过 CD/DSC 热变性曲线评估的整体稳定性不同,胰蛋白酶消化更灵敏地反映了三螺旋中可能存在的局部破坏。这些结果表明,尽管 Gly 错义突变未显著改变三螺旋的整体结构,但替代氨基酸会影响局部结构的稳定性,且 Val 的扰动作用大于 Ala。

2.4 重组胶原蛋白与整合素的体外结合能力分析

整合素作为一类膜结合受体,在细胞黏附和信号传导中扮演着重要角色。它与胶原蛋白的相互作用是细胞黏附和细胞外基质相互作用的关键环节,帮助细胞感知并响应细胞外基质的结构和力学特性。已有研究通过合成胶原模型肽鉴定出整合素结合序列,包括 GFPGER 和 GLPGER,整合素亲和力为 GFPGER>GLPGER^[21-22]。其中,GFPGER 已在重组胶原蛋白中被证明具有强整合素结合能力^[23]。结合 COL1A1 成骨不全突变体数据库中 Gly 错义突变相关数据^[8-9],发现在¹²⁷GLPGER¹³²区域及附近报告了多种 OI 突变(图 7)。延展至其 N 端的 5 个三联体和 C 端的 3 个三联体内,所有 Gly 错义突变均引发非致死型 OI(图 7A)。在 $\alpha 2(I)$ 链中还存在 2 个 GLPGER 序列,分别为¹²⁷GLPGER¹³²和⁵⁵⁰GLPGER⁵⁵⁵。因此,GLPGER 序列多位点的存在可能减轻了 Gly 突变造成的功能性损失,或因为 GLPGER 并不位于主要的配体结合区域(major ligand binding regions),从而减少了突变的致命影响。在⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷周围,数据库记录了 Gly505 位点上的 1 个非致死型 Gly→Ser 错义突变(IV 型 OI)。在其 C 端的 4 个三联体中也报告了 Gly 突变,但在 Gly502 及其 N 端的 3 个三联体中未

发现任何突变(图 7B)。有研究提出,这种“静默区(silent zone)”可能代表着不可存活的突变区域,因为该序列位于主要配体结合区域内,突变可能

会严重干扰配体的结合^[5]。随着越来越多的突变被报道,连续未发生突变的三联体区域极为罕见,这种“静默区”可能具有重要的生物学意义。

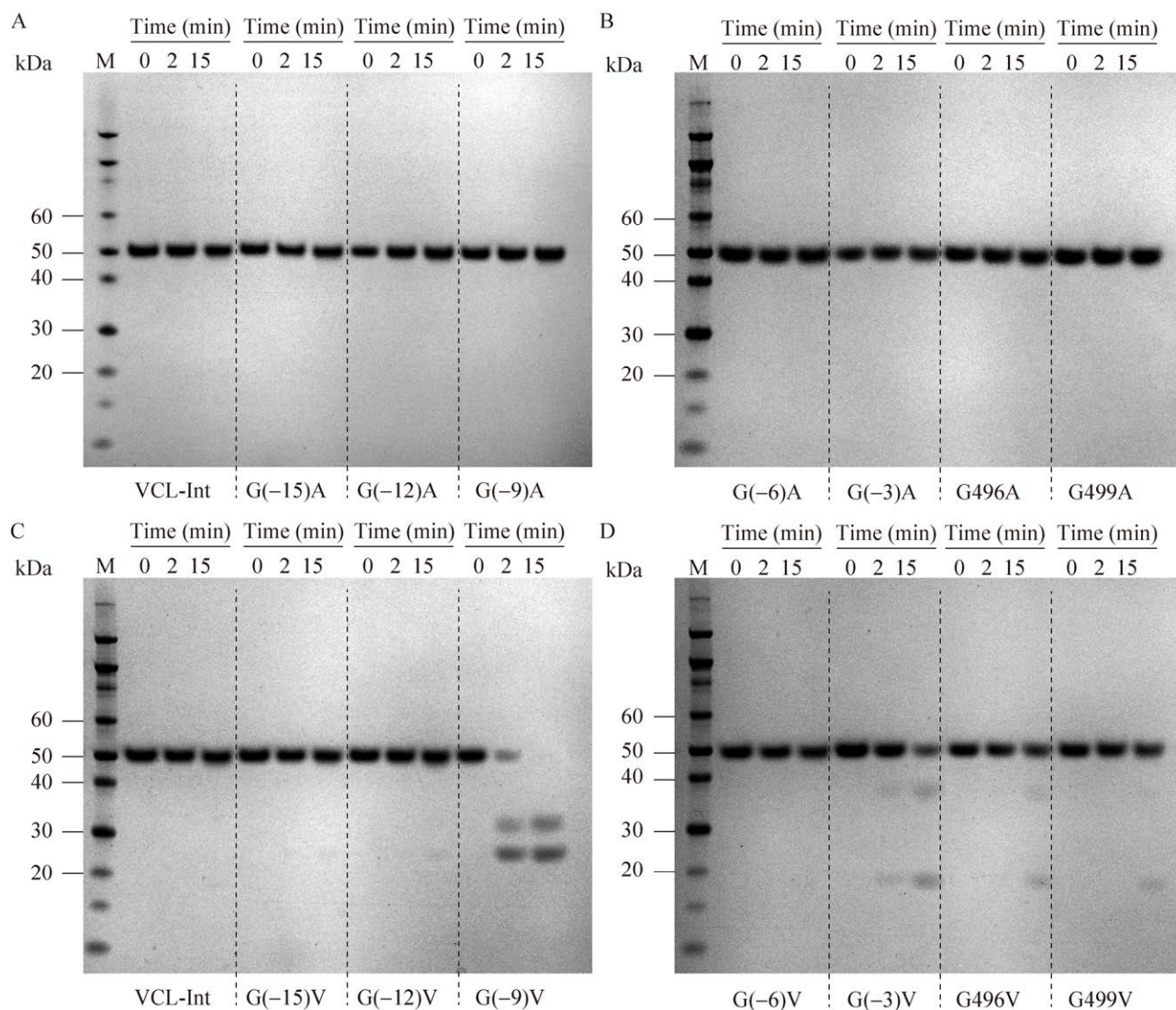


图 5 重组胶原蛋白 VCL-Int 及 Gly 突变体经胰蛋白酶酶解的 SDS-PAGE 分析 A: VCL-Int 及 G(-15)A、G(-12)A、G(-9)A 的酶解稳定性; B: G(-6)A、G(-3)A、G496A 和 G499A 的酶解稳定性; C: VCL-Int 及 G(-15)V、G(-12)V、G(-9)V 的酶解稳定性; D: G(-6)V、G(-3)V、G496V 和 G499V 的酶解稳定性。胰蛋白酶处理时间为 0、2 和 15 min。M 为蛋白 marker。胶原单体链迁移率较慢,与既往报道一致。

Figure 5 SDS-PAGE analysis of trypsin-digested recombinant collagen VCL-Int and Gly mutants. A: Stability of VCL-Int and mutants G(-15)A, G(-12)A, and G(-9)A; B: Stability of mutants G(-6)A, G(-3)A, G496A, and G499A; C: Stability of VCL-Int and mutants G(-15)V, G(-12)V, and G(-9)V; D: Stability of mutants G(-6)V, G(-3)V, G496V, and G499V. Trypsin digestion was performed for 0, 2, and 15 min. Lane M: Novex® Sharp Protein Standard. Collagen monomer chains migrate slower than expected, as reported previously.

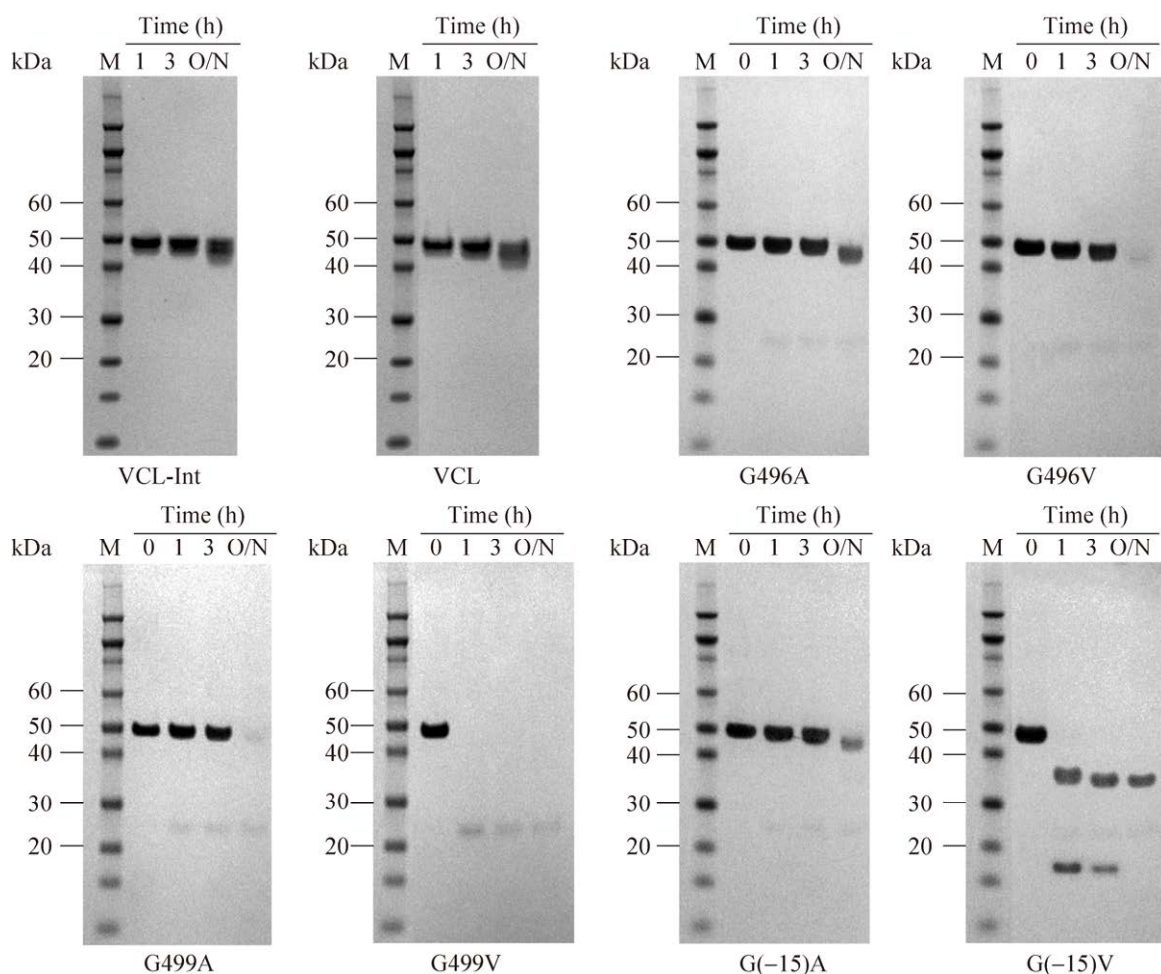


图 6 重组胶原蛋白 VCL-Int 及 Gly 突变体经胰蛋白酶处理不同时间后的 SDS-PAGE 检测 胰蛋白酶消化时间分别为 1 h、3 h 和过夜(O/N)。M 为蛋白 marker。胶原单体链的迁移率较慢，与既往报道一致。

Figure 6 SDS-PAGE analysis of VCL-Int and Gly mutants after different digestion times with trypsin. Trypsin digestion was performed for 1 h, 3 h, and overnight (O/N). Lane M: Novex® Sharp Protein Standard (Invitrogen). Collagen monomer chains migrate slower than expected, as reported previously.

因此，本研究通过固相结合试验评估 Gly 错义突变对重组蛋白与整合素结合能力的影响。与先前研究一致，未插入 GFPGER 序列的 VCL 蛋白对整合素 $\alpha 2$ I 结构域无结合活性，而包含源自人 I 型胶原 $\alpha 1$ (I) 链 GARGERGFPGERGVQGPP 序列的阳性对照 VCL-Int 则表现出与整合素 $\alpha 2$ I 结构域的强结合力(图 8)^[15]。实验结果显示，⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷ 序列 N 端的 Gly→Ala 突变体相比 VCL-Int，其整合素结合活性有所下降，且下降

程度与突变位点的具体位置密切相关(图 8)。从 G(-15)至 G(-6)位点，Gly→Ala 突变体的结合活性呈现持续下降的趋势，而 G(-3)A 的结合活性与 G(-6)A 相近。在 G496 和 G499 位点，Gly→Ala 突变体的结合活性有所回升，接近 VCL-Int 的水平。相比之下，⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷ 序列 N 端的 Gly→Val 突变体，整体上表现出显著低于 VCL-Int 和 Gly→Ala 突变体的结合活性，表明 Gly→Val 突变对整合素结合能力具有更显著

的抑制作用。尤其是在较远的 G(-15)位点, Gly→Val 突变体的结合能力显著下降。这可能是因为在 Val 相比 Ala 具有更大的体积, 导致局部三螺旋构象的扭曲程度更大, 从而干扰整合素的识别和结合。尽管如此, G(-15)V 突变体并未完全丧失与整合素的结合活性。这表明,

即使是在较远的 Gly 位置发生体积较大的 Val 置换, 三螺旋结构的整体稳定性仍然足以支持部分结合能力。与此相对应, 靠近⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷序列的 Gly→Val 突变体, 如 Gly496 和 Gly499, 虽然整合素结合活性低于 Gly→Ala 突变体, 但仍显示出一定的结合能力。

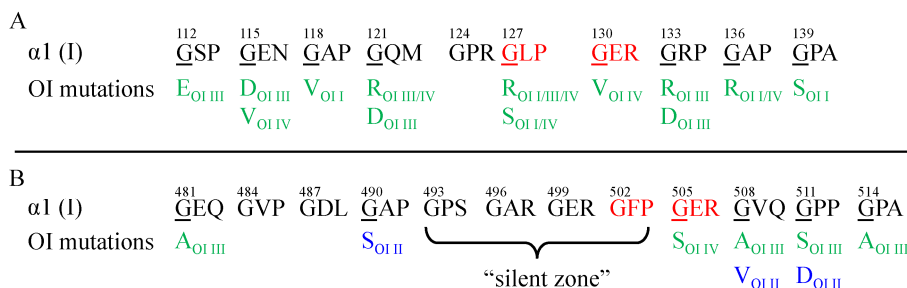


图7 OI 数据库中已知的胶原蛋白 $\alpha 1$ (I) 链中整合素结合区域及邻近区域的 OI 突变^[8-9] 替代 Gly 的氨基酸残基显示在下方, 并标注了根据 Sillence 分类法对 OI 表型严重程度的分类(OI II: 围产期致死; OI III: 严重; OI IV: 中度; OI I: 轻度)^[6]; 黑色: $\alpha 1$ (I) 链中整合素结合区域及邻近区域序列; 红色: 整合素结合序列; 下划线: Gly 错义突变的目标位点; 绿色: 非致死型 OI; 蓝色: 致死型 OI。

Figure 7 Known OI mutations within and adjacent to the essential integrin binding sequences as reported in the OI database^[8-9]. The residues replacing Gly are shown below, together with the classification of OI phenotypic severity according to the Sillence classification (OI II: Perinatal lethal; OI III: Severe; OI IV: Moderate; OI I: Mild)^[6]. Black: Sequence of the integrin binding region and adjacent areas in the $\alpha 1$ (I) chain; Red: Integrin binding sequences; Underlined: Target sites of Gly missense mutations; Green: Non-lethal OI; Blue: Lethal OI.

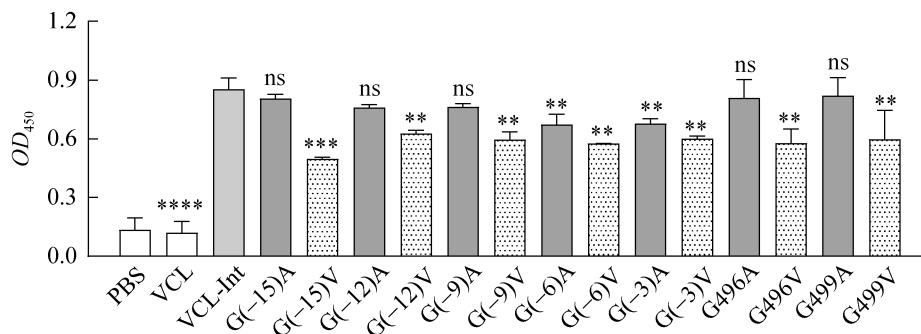


图8 Gly 错义突变对重组胶原蛋白与整合素结合能力的影响 通过固相结合实验测定重组胶原蛋白与整合素 $\alpha 2$ I 结构域的结合能力。采用 t 检验比较 VCL-Int 与各 Gly 突变体的差异显著性。*: $P \leq 0.01$; **: $P \leq 0.001$; ***: $P \leq 0.0001$; ns: 不显著。

Figure 8 Effects of Gly missense mutations on integrin binding capacity of recombinant collagen proteins. Solid-state binding assay of integrin $\alpha 2$ I domain to recombinant bacterial collagens were carried out in triplicates, with averages and standard deviations shown as error bars. Significance levels were determined by paired Student's t -test between VCL-Int control and mutant samples. *: $P \leq 0.01$; **: $P \leq 0.001$; ***: $P \leq 0.0001$; ns: Non-significant.

2.5 重组胶原蛋白的细胞黏附性分析

为了进一步评估重组胶原蛋白的细胞学功能, 利用人纤维肉瘤细胞 HT1080 作为模型, 检测其对重组蛋白的黏附能力。HT1080 细胞能够表达整合素 $\alpha 2 \beta 1$ 作为唯一的胶原蛋白结合受体, 因此其对重组蛋白的黏附性可反映胶原蛋白的生物学功能。选择突变位点远离整合素结合序列的 G(-15)A 和 G(-15)V, 以及靠近整合素结合序列的 G499A 和 G499V 作为代表性突变体。通过细胞染色观察 HT1080 细胞的黏附情况, 并通过活体成像和细胞计数比较重组胶原蛋白的细胞黏附能力。结果显示, HT1080 细胞对阴性对照 VCL 蛋白的黏附性极低, 几乎无明显黏附, 而对阳性对照 VCL-Int 蛋白显示出强黏附性, 这与先前研究结果一致^[14-15](图 9A)。G(-15)A、G(-15)V、G499A 和 G499V 突变体的细胞黏附能力均较 VCL-Int 有所下

降, 表明 Gly 的错义突变对胶原蛋白的生物学功能有负面影响(图 9B)。此外, G(-15)V 的黏附能力下降幅度大于 G(-15)A, 类似地, G499V 突变体的黏附能力显著低于 G499A。

3 讨论与结论

在 I 型胶原蛋白三螺旋结构中, Gly-Xaa-Yaa 重复序列的 Gly 若被体积较大的氨基酸替代, 可能会引发成骨不全症。此类 Gly 错义突变可能通过促进蛋白质错误折叠、激活自噬途径, 或干扰胶原分子间的相互作用, 从而导致病理性变化。本研究以重组细菌源类胶原蛋白为模型, 重点探究了整合素结合序列⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷ N 端 7 个氨基酸位点上的 Gly→Ala 和 Gly→Val 突变对重组胶原蛋白结构特征、热稳定性、胰蛋白酶敏感性及其整合素结合能力的影响。

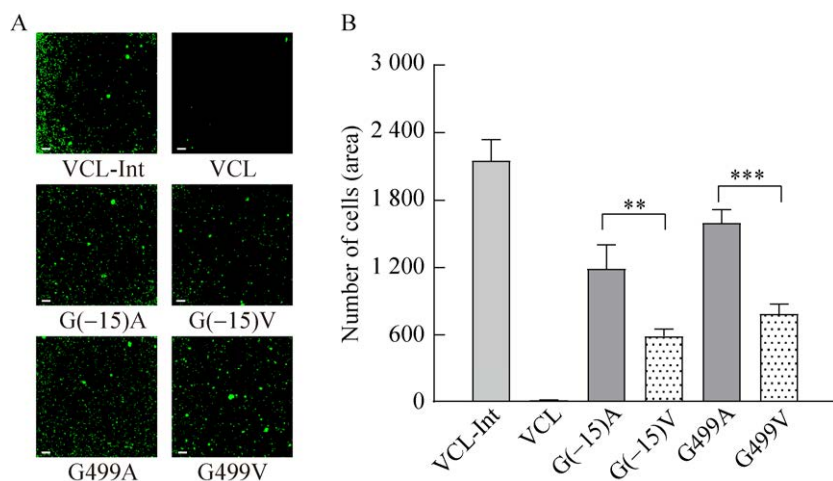


图 9 重组胶原蛋白对 HT1080 细胞的黏附能力测定 A: 黏附细胞经 calcein-AM 染色后的活细胞成像。比例尺=100 μm 。B: 通过 ImageJ 对附着细胞进行计数。

Figure 9 HT1080 cell adhesion assay assessing the binding ability of VCL-Int recombinant proteins with or without Gly missense mutations. A: Live imaging was performed after calcein-AM staining of bound cells. Scale bars=100 μm . B: Quantification of adhered cells using ImageJ. Experiments were performed in triplicate, with averages and standard deviations presented as error bars. **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$.

VCL 类胶原蛋白源自化脓链球菌 Scl2, 在大肠杆菌表达系统中虽无法形成羟脯氨酸, 但仍能形成稳定的同源三聚体三螺旋结构, 并表现出与人类胶原蛋白相似的热稳定性(T_m : 36–37 °C)^[24]。基于 VCL 构建的含有人 I 型胶原 $\alpha 1$ (I) 链序列 GFPGER 的 VCL-Int 蛋白, 能够特异性与整合素 $\alpha 2$ I 结构域结合^[15]。本研究利用 VCL-Int 作为对照, 发现所有突变型重组蛋白均能形成稳定的三螺旋结构, 但 T_m 较对照组略有下降(约 2 °C)。这一结果与既往关于 OI 突变的研究结果相符, 即胶原纤维中的突变通常导致轻微的热稳定性下降, 而更显著的影响可能源于折叠延迟及其他后续过程^[5,12]。此外, 本研究发现, Gly→Val 突变对重组蛋白重折叠的延迟影响显著大于 Gly→Ala 突变。

胶原分子生物合成过程中, 脯氨酸向羟脯氨酸(Hyp)、赖氨酸向羟基赖氨酸(Hyl)的修饰以及 Hyl 的糖基化仅发生在未折叠的胶原单链上。在含有 OI 突变的胶原分子 N 端通常观察到大量的翻译后修饰, 这表明突变可能通过延迟折叠过程增加了翻译后修饰的发生。此外, OI 突变还可能干扰前胶原 N 端前肽的加工, 进而影响原纤维的正确组装。这些现象提示, Gly 突变可能通过干扰折叠过程, 最终改变胶原纤维的力学性能、纤维矿化以及骨骼形成等与 OI 相关的病理生理过程。已有研究表明, 胶原三螺旋的折叠是一个从 C 端到 N 端的过程, 依赖于包含 3 个稳定氢键的成核事件; 在胶原模型肽(POG)₁₀ 的研究中发现, Gly 突变需要一个重新成核的过程才能继续完成折叠^[25]。与 [(POG)₁₀]₃ 相比, [(POG)₄POA(POG)₅]₃ 的突变位点附近形成了松散扭曲的螺旋, 导致规则氢键网络被破坏, 其 T_m 降低了 34 °C^[26], 折叠速率下降了近 70%^[27]。类似地, 细菌源胶原蛋白 VCL 的三螺旋体外重折叠依赖于 N 端球状 V 结构域

的三聚化。当在三螺旋的中部或靠近 N 端的位置引入 Gly→Arg/Ser 突变时, Gly→Arg 突变比 Gly→Ser 突变表现出更明显的折叠延迟; 当突变位点靠近 V 结构域时, 则会导致严重的折叠延迟^[20]。这些研究结果有力地证明, Gly 突变不仅影响折叠速率, 还可能通过影响折叠机制导致胶原蛋白功能失调, 并与一些严重的临床表型相关。

三螺旋结构对非特异性蛋白酶具有天然的抗性, 而胰蛋白酶在 20 °C 下对解链胶原蛋白的胶原区的快速切割能力已被广泛用于评估胶原蛋白的三螺旋构象^[10,14-16,20,28]。本研究的结果表明, Gly→Ala 突变对三螺旋结构的稳定性影响较小, 而 Gly→Val 突变则显著削弱了这一抗性。在胶原模型肽的研究中发现, Gly 被 Ala 替代后, 胶原多肽仍能保持三螺旋结构, 但突变位点存在轻微的解折叠, 原本由主链间直接形成的氢键被水介导的氢键取代^[13]。相比之下, 体积更大的 Val 突变可能引发更强的局部解折叠, 使得蛋白酶更容易接触并切割三螺旋结构。本研究中, ⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷ 序列中 Gly502、Gly505 和 C 端 Gly511 位点的 Gly→Val 突变显著提高了重组蛋白的胰蛋白酶敏感性。然而, 由于局部序列环境和相对位置的差异, 部分突变位点(如 G508V)因其周围的“疏水核心”环境而表现出一定抗酶解能力^[10]。

值得注意的是, OI 数据库报告显示, Gly499 位点的 Gly→Ser 突变与致死型成骨不全(II 型 OI)相关, 而 ⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷ 序列 N 端 6 个三联体内的其他 Gly 突变尚未发现与 OI 相关的报道。本研究观察到, ⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷ 序列 N 端的 Gly→Val 突变体对胰蛋白酶的敏感性增加, 提示这些突变体在体内可能对其他蛋白酶也具有更高的敏感性, 这可能与早期胚胎的致死性相关^[16]。这一发现也从侧面印证了 Gly 突变对胶

原蛋白结构稳定性的影响。

胶原与整合素的相互作用在多种重要的生理过程中发挥着关键作用。已有研究表明, 胶原蛋白配体结合区域内的 Gly 错义突变可干扰胶原蛋白的正常功能, 并与显性 OI 的发生密切相关^[5]。前期研究表明, ⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷ 序列中的 Gly502 或 Gly505 发生 Gly→Ala/Ser/Val 突变均导致整合素结合活性丧失^[10]。位于该序列 N 端、距离 GFPGER 序列最多 4 个三联体的 Gly 突变[如 G(-6)S、G(-3)S、G496S 和 G499S]会显著降低整合素结合能力; 而 G(-9)S 至 G(-15)S 突变体的整合素结合活性逐渐回升, C 端突变(如 G508S 和 G511S)则对整合素结合能力无显著影响^[15]。这些结果提示, 突变位点对生物学效应的影响具有位置不对称性, 这可能与 OI 突变类型的多样性相关。本研究进一步证实, Gly→Val 突变对重组胶原蛋白整合素结合活性的破坏程度显著高于 Gly→Ala 突变, 且影响范围更广, 作用强度与突变位点的局部环境密切相关。具体而言, Gly→Ala 突变主要影响部分位点[如 G(-6)、G(-3)、G502 和 G505], 而 Gly→Ser 突变的影响范围更广, 可延伸至 G(-9)位点。相比之下, Gly→Val 突变几乎对所有检测位点均产生了显著影响。这表明, Gly→Val 突变对胶原蛋白结构的破坏性更强, 可能通过诱导局部解折叠或干扰整合素结合位点的空间排布, 从而更显著地降低结合能力。因此, ⁵⁰²GFPGER⁵⁰⁷ 序列 N 端 Gly 突变对重组胶原蛋白与整合素结合能力的影响与突变残基的性质及其位置密切相关。

综上所述, Gly 突变可能通过多种机制(如局部解折叠、折叠延迟和热稳定性降低等)共同影响胶原蛋白的功能, 并显著干扰其与整合素的相互作用。本研究不仅深化了对 Gly 突变导致胶原蛋白相关疾病分子机制的理解, 也为纤

维胶原蛋白的功能性开发和新型胶原基材料的设计提供了重要的理论依据。尽管本研究通过重组 VCL-Int 模型探讨了 7 个 Gly 位点的突变效应, 但所用的纯化重组蛋白为同源三聚体, 且 3 条链均引入突变, 与实际 OI 病例中通常仅 1 条或 2 条链发生突变的情况有所不同, 这可能限制了对突变效应的全面理解。此外, 本研究主要采用了体外结合实验, 虽然提供了整合素与胶原相互作用的重要信息, 但这些实验条件与生理状态下的细胞环境存在一定差异。因此, 未来的研究应结合真核表达系统或动物模型(如小鼠、斑马鱼等), 进一步验证和扩展本研究的发现, 以更系统地揭示 Gly 突变对胶原蛋白功能的影响, 为成骨不全症的发病机制研究提供更加全面的理论依据。

作者贡献声明

李斐: 数据分析、初稿写作; 侯宇曦: 实验操作、数据管理; 饶犇: 实验操作、方案设计; 刘晓艳、王亚平: 数据管理、稿件润色修改; 邱一敏: 方案设计、数据分析、初稿写作及稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 叶滔, 项琪, 杨艳, 黄亚东. 胶原蛋白的开发与应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 942-960.
YE T, XIANG Q, YANG Y, HUANG YD. Research, development and application of collagen: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 942-960 (in Chinese).
- [2] AN B, KAPLAN DL, BRODSKY B. Engineered recombinant bacterial collagen as an alternative collagen-based biomaterial for tissue engineering[J]. Frontiers in Chemistry, 2014, 2: 40.
- [3] 杜春玲, 姚菊明. 胶原蛋白结构基础上的设计与合成[J]. 生物工程学报, 2007, 23(2): 189-194.
DU CL, YAO JM. Structure-based design and biosynthesis of collagen proteins[J]. Chinese Journal of

- Biotechnology, 2007, 23(2): 189-194 (in Chinese).
- [4] BRODSKY B, PERSIKOV AV. Molecular structure of the collagen triple helix[J]. *Advances in Protein Chemistry*, 2005, 70: 301-339.
- [5] MARINI JC, FORLINO A, CABRAL WA, BARNES AM, SAN ANTONIO JD, MILGROM S, HYLAND JC, KÖRKKÖ J, PROCKOP DJ, de PAEPE A, COUCKE P, SYMOENS S, GLORIEUX FH, ROUGHLEY PJ, LUND AM, KUURILA-SVAHN K, HARTIKKA H, COHN DH, KRAKOW D, MOTTES M, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans[J]. *Human Mutation*, 2007, 28(3): 209-221.
- [6] JOVANOVIĆ M, GUTERMAN-RAM G, MARINI JC. Osteogenesis imperfecta: mechanisms and signaling pathways connecting classical and rare OI types[J]. *Endocrine Reviews*, 2022, 43(1): 61-90.
- [7] ROYCE PM, STEINMANN B. Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects[M]. John Wiley & Sons, 2003.
- [8] DALGLEISH R. The human type I collagen mutation database[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(1): 181-187.
- [9] DALGLEISH R. The human collagen mutation database[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(1): 253-255.
- [10] QIU YM, MEKKAT A, YU HT, YIGIT S, HAMAIA S, FARNDAL RW, KAPLAN DL, LIN YS, BRODSKY B. Collagen Gly missense mutations: effect of residue identity on collagen structure and integrin binding[J]. *Journal of Structural Biology*, 2018, 203(3): 255-262.
- [11] BODIAN DL, MADHAN B, BRODSKY B, KLEIN TE. Predicting the clinical lethality of osteogenesis imperfecta from collagen glycine mutations[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(19): 5424-5432.
- [12] 强书敏. 非标准三重子对胶原蛋白热稳定性的影响: 基于计算与实验的机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
- QIANG SM. Effects of non-standard triplet on the thermal stability of collagen: computational and experimental mechanism study[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023 (in Chinese).
- [13] BECK K, CHAN VC, SHENOY N, KIRKPATRICK A, RAMSHAW JA, BRODSKY B. Destabilization of osteogenesis imperfecta collagen-like model peptides correlates with the identity of the residue replacing glycine[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(8): 4273-4278.
- [14] YEO J, QIU YM, JUNG GS, ZHANG YW, BUEHLER MJ, KAPLAN DL. Adverse effects of alport syndrome-related Gly missense mutations on collagen type IV: insights from molecular simulations and experiments[J]. *Biomaterials*, 2020, 240: 119857.
- [15] YIGIT S, YU HT, AN B, HAMAIA S, FARNDAL RW, KAPLAN DL, LIN YS, BRODSKY B. Mapping the effect of Gly mutations in collagen on $\alpha 2\beta 1$ integrin binding[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(36): 19196-19207.
- [16] CHHUM P, YU HT, AN B, DOYON BR, LIN YS, BRODSKY B. Consequences of glycine mutations in the fibronectin-binding sequence of collagen[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(53): 27073-27086.
- [17] KNIGHT CG, MORTON LF, PEACHEY AR, TUCKWELL DS, FARNDAL RW, BARNES MJ. The collagen-binding A-domains of integrins $\alpha(1)\beta(1)$ and $\alpha(2)\beta(1)$ recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(1): 35-40.
- [18] TUCKWELL D, CALDERWOOD DA, GREEN LJ, HUMPHRIES MJ. Integrin $\alpha 2$ I-domain is a binding site for collagens[J]. *Journal of Cell Science*, 1995, 108 (Pt 4): 1629-1637.
- [19] YU ZX, AN B, RAMSHAW JA, BRODSKY B. Bacterial collagen-like proteins that form triple-helical structures[J]. *Journal of Structural Biology*, 2014, 186(3): 451-461.
- [20] CHENG HM, RASHID S, YU ZX, YOSHIZUMI A, HWANG E, BRODSKY B. Location of glycine mutations within a bacterial collagen protein affects degree of disruption of triple-helix folding and conformation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(3): 2041-2046.
- [21] PICKER J, LAN ZY, ARORA S, GREEN M, HAHN M, COSGRIFF-HERNANDEZ E, HOOK M. Prokaryotic collagen-like proteins as novel biomaterials[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 840939.
- [22] XU Y, GURUSIDDAPPA S, RICH RL, OWENS RT, KEENE DR, MAYNE R, HÖÖK A, HÖÖK M. Multiple binding sites in collagen type I for the integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(50): 38981-38989.
- [23] SEO N, RUSSELL BH, RIVERA JJ, LIANG XW, XU XJ, AFSHAR-KHARGHAN V, HÖÖK M. An engineered $\alpha 1$ integrin-binding collagenous sequence[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(40): 31046-31054.
- [24] YOSHIZUMI A, YU ZX, SILVA T, THIAGARAJAN G, RAMSHAW JA, INOUE M, BRODSKY B. Self-association of *Streptococcus pyogenes* collagen-like constructs into higher order structures[J]. *Protein Science*, 2009, 18(6): 1241-1251.
- [25] PARK S, KLEIN TE, PANDE VS. Folding and misfolding of the collagen triple helix: Markov analysis of molecular dynamics simulations[J]. *Biophysical Journal*, 2007, 93(12): 4108-4115.
- [26] LONG CG, LI MH, BAUM J, BRODSKY B. Nuclear magnetic resonance and circular dichroism studies of a triple-helical peptide with a glycine substitution[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 225(1): 1-4.
- [27] LONG CG, BRASWELL E, ZHU D, APIGO J, BAUM J, BRODSKY B. Characterization of collagen-like peptides containing interruptions in the repeating Gly-X-Y sequence[J]. *Biochemistry*, 1993, 32(43): 11688-11695.
- [28] BRUCKNER P, PROCKOP DJ. Proteolytic enzymes as probes for the triple-helical conformation of procollagen[J]. *Analytical Biochemistry*, 1981, 110(2): 360-368.